

## **A *Clostridium difficile* infekció (CDI) mikrobiológiai diagnosztikája**

### **I. rész: Amit a klinikusnak tudnia kell a CDI mikrobiológiai diagnosztikájáról**

### **II. rész: A CDI különböző mikrobiológiai diagnosztikai módszerei (előnyök, hátrányok); praktikus tanácsok a mikrobiológusok részére**

**Összeállította:** Nagy Erzsébet, Terhes Gabriella és Urbán Edit

Gyakorlati szempontok az infektológiai ellátásban és a klinikai mikrobiológiai diagnosztikában: a Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság konszenzus álláspontja

#### **Rövidítések jegyzéke:**

CCCNA	cell culture cytotoxicity neutralisation assay
CDI	<i>C. difficile</i> infekció
EIA	enzyme immunoassay
GDH	glutamát-dehidrogenáz
IC	immunkromatográfia
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MIC	minimal inhibitory concentration
MLST	multilocus sequence typing
MLVA	multilocus variable-number tandem repeat analysis
NAT	nukleinsav amplifikációs teszt
PCR	polymerase chain reaction
TAT	turn around time

### **I. rész: Amit a klinikusnak tudnia kell a CDI mikrobiológiai diagnosztikájáról**

- Minden 2-es és 3-as kompetencia szintű mikrobiológiai laboratórium végezhet CDI diagnosztikát. Ha ennek ellenére a laboratórium továbbküldi a mintát (hasmenéses széklet), az rontja a pozitív eredmény esélyét, és jelentősen késlelteti az eredményközlést.
- Érdemes a klinikusnak tájékozódnia, hogy mennyi időbe telik a hasmenéses székletminta transzportja és hogy a mikrobiológiai laboratórium milyen módszert használ. Ezek ismeretében tudja a kapott eredményt értékelni, hiszen mind hamis negatív, mind pedig hamis pozitív eredmény születhet a ma elérhető módszerekkel.
- *C. difficile* infekció irányába mikrobiológiai vizsgálatokat kell végezni minden olyan hasmenésben szenvedő beteg esetében (>3 hasmenéses széklet 24 órán belül – a „Bristol skála” 5-7 fokozata szerint),
  - akinél más bélrendszeri fertőzést okozó baktériumot, vírust vagy parazitát nem tudtak kimutatni, illetve egyéb, nem infekciós eredetű okkal nem magyarázható a hasmenés,
  - akinél hasmenés jelentkezik antibiotikum kezelés alatt vagy után, akár a kórházi kezelés alatt, vagy később otthonában,
  - akinél már korábban diagnosztizáltak *C. difficile* infekciót (relapszus?),
  - > 65 év feletti, ápolási osztályon fekvő beteg esetében, vagy a háziorvosi gyakorlatban, ha a hasmenés egyéb okkal nem magyarázható.
- Ha a székletminta szilárd konzisztenciájú, a CDI irányába kért mikrobiológiai vizsgálatot a laboratórium visszautasítja, ha a klinikus nem közli a kísérő iraton, hogy a betegnek ileusa vagy toxikus megacolonja van, illetve egyéb klinikai adatok vagy az alapbetegségek alapján a CDI megalapozott gyanúja áll fenn.
- Egyéves kor alatt *C. difficile* irányú mikrobiológiai vizsgálat végzése nem javasolt. Egy és 3 év között csak akkor indokolt a *C. difficile* infekció irányba történő vizsgálatkérés, ha minden más enterális patogén (elsősorban vírusok) kóroki szerepe már kizárt. Három éves kor felett a felnőttekre érvényes kritériumok alapján javasolt a CDI igazolására vizsgálatot végezni.

- A terápia befejezését, valamint a beteg gyógyulását követően *C. difficile* felszabadító vizsgálatra nincs szükség, továbbá a beteg környezetét nem kell szűrni. Ilyen irányú vizsgálatot a laboratóriumok visszautasítanak.
- A „toxigenic culture” a CDI kimutatásának „gold standard”-ja. Diagnosztikai célból kevés laboratórium végzi. A „turn around time” (TAT) negatív esetben az anyag beérkezését követő minimum 48 óra. Pozitív esetben 48-96 óra attól függően, hogy a laboratórium milyen toxin kimutatási módszert használ.
- A *C. difficile* jelenlétének direkt kimutatása székletből a gutamát-dehidrogenáz (GDH) enzim jelenléte alapján nem elegendő a CDI bizonyítására. Negativitás esetén a CDI nagy valószínűséggel kizárható (magas negatív prediktív érték). Pozitív esetben el kell végezni a toxin kimutatást is a CDI igazolására. A várható TAT - a laboratórium által használt módszertől függően - a székletminta beérkezést követő 3-24 óra.
- A *C. difficile* toxin(ok) közvetlenül a hasmenéses székletmintából történő kimutatására szolgáló módszereken (CCCNA, EIA, IC) alapuló gyári kitek szenzitivitása, specificitása, valamint a TAT jelentősen eltér (3->24 óra).
- Közvetlenül a hasmenéses székletből végzett *C. difficile* toxin gén(ek) kimutatására szolgáló érzékeny nukleinsav amplifikációs teszt (NAT) gyári kit formájában történő alkalmazása esetén, ha vizsgálat eredménye negatív a CDI kizárható, újabb vizsgálat végzése nem indokolt (magas negatív prediktív érték). Pozitív esetben érdemes megerősítő vizsgálatot végezni érzékeny toxin detektáló kittel a toxintermelő *C. difficile* hordozás kizárása érdekében. A TAT a minta beérkezésétől számítva 3-5 órától 24 óráig tart.
- A *C. difficile* törzs tenyésztése elengedhetetlen, ha járványügyi célból tipizálást kell végezni, valamint ha antibiotikum rezisztencia meghatározásra van szükség.
- A *C. difficile* törzsek tipizálása csak igazolt kórházi esethalmozódás, járvány esetén indokolt. A tipizálást az OEK Bakteriológiai osztálya végzi. Ehhez a mikrobiológiai

laboratórium az izolált törzset vagy friss székletmintát továbbítja az OEK-be, előzetes egyeztetést követően.

## **A téma aktualitása**

Bár meglehetősen régen, az 1970-es évek végétől elismert nozokómiális enterális pathogén a *C. difficile*, az általa okozott infekció a 2000-es évek elejétől került az érdeklődés előterébe. Az Egyesült Királyságból származó surveillance adatok alapján a *C. difficile* infekciók (CDI) száma a gasztrointesztinális fertőzések körülbelül 60%-át teszi ki, valamint az összes kórházi infekció körülbelül 9%-áért tehető felelőssé. A CDI-k kérdése két kiemelt Európai Unió egészségpolitikai prioritással áll szoros kapcsolatban: az antibiotikum rezisztencia terjedésével (antimicrobial resistance - AMR) és a kórházi fertőzések kérdésével (hospital acquired infections - HAI). Mivel az európai országok többségében nincs egységes surveillance rendszer a CDI vonatkozásában, valamint nincs egységesen használt diagnosztikai séma, elég nehéz megbecsülni a CDI esetek számát a kórházakban, ápolási intézményekben. Európai szintű esetszám becslés a 2011-2012-ben gyűjtött angliai surveillance adatok alapján megközelíti az évi 200 000 CDI esetet, ami jelentős emelkedést mutat az előző évek adataihoz képest. Ennek hátterében a 2000 óta az USA-ban, Kanadában majd Európában rohamosan terjedő 027 ribotípusba tartozó „A”, „B” és „binary” toxint termelő, hipervirulens, sokszor fluorokinolon rezisztens *C. difficile* törzs áll, néhány más, ugyancsak magasabb morbiditással, mortalitással, gyakoribb relapsussal járó infekciót okozó egyéb (078, 016, 056, stb) ribotípussal együtt.

A hazai, Nemzeti Nosocomiális Surveillance Rendszer járványmoduljában kötelezően bejelentett kórházi járványok, illetve 2011-től a *C. difficile* okozta fertőzések moduljában bejelentett egyedi esetek elemzése alapján is megfigyelhető a CDI esetek számának hazai emelkedése. A sporadikus esetek bejelentése 2012 óta kötelező, ennek során 84 kórház 4 506 CDI esetet jelentett 22,3%-os halálozással 2012-ben. A kórházi környezetben terjedő CDI esetek mellett egyre több közlemény számol be a kórházon kívüli hasmenéses esetek hátterében a toxintermelő *C. difficile* jelenlétéről

## ***C. difficile* előfordulása és pathogenitási tényezői**

A *C. difficile* Gram-pozitív, spóráképző, obligát anaerob pálcá. Széles körben megtalálható a környezetben (trágyában, talajban, felszíni- és szennyvizekben) és az állati és emberi béltraktusban. Az egészséges hordozók aránya területileg változó (2-15%),

újszülöttekben viszont a hordozási arány elérheti a 60%-ot is. Vegetatív formája a szabad levegőn hamar elpusztul, de az általa termelt spóra kedvezőtlen körülmények között hónapokig is túlélhet a környezetben, így a kórházi-ápolási környezetben is. A *C. difficile* spórák ellenállnak a hőhatásnak, a szárításnak és a kémiai anyagoknak, beleértve az alkohol alapú fertőtlenítőszeret is. Kedvező körülmények között a béltraktusban a spórából újra szaporodásra és toxintermelésre képes baktériumsejt lesz.

A *C. difficile* infekció (CDI) leggyakoribb tünete a hasmenés, súlyos esetben akár halálhoz is vezető álhártyás bélgyulladás is kialakulhat. Ritkán extraintestinalis kórképekben is leírták. A fő pathogenitási tényezők az „A” és „B” toxin, melyet a legtöbb törzs párhuzamosan termel, és csak kis számban írtak le „A” toxin negatív „B” toxin pozitív törzsek által okozott infekciókat. A két toxin patogenitásban játszott szerepéről, elsődlegességéről a CDI kialakulásában ellentmondó tudományos eredmények születtek, de végső soron ezek felelősek a bélnyálkahártya degradációjáért és a kialakuló gyulladással járó tünetekért. A törzsek egy kis része termel egy harmadik toxint is a „binary” toxint, melynek a patogenitásban játszott szerepéről ugyancsak megoszlanak a vélemények. Fontos tudni, hogy toxint termelő és toxint nem termelő törzsek is jelen lehetnek a bélcsatornában egészséges vagy egyéb okok miatt hasmenésben szenvedő beteg esetében. A diagnosztikai módszerek megválasztásában és azok értékelésében ennek igen komoly szerepe van.

### **CDI igazolására szolgáló mikrobiológiai laboratóriumi módszerek (amit a klinikusnak tudnia kell)**

A hazai laboratóriumok felkészültségüktől, műszerezettségüktől és anyagi lehetőségüktől függően különböző mikrobiológiai diagnosztikai módszereket használnak a CDI klinikai gyanújának igazolására (ezek részletes leírását lásd a mikrobiológusoknak szóló részben). Hasmenéses széklet esetében, ha az más okkal nem magyarázható, a CDI irányú vizsgálatot a laboratórium elvégzi. Ha nem hasmenéses a széklet, csak akkor végez CDI irányú vizsgálatot a laboratórium, ha a klinikus feltünteti a kísérőíraton, milyen indokok alapján kéri a célzott vizsgálatot.

Számos módszer áll a laboratóriumok rendelkezésére a *C. difficile* székletből (néha egyéb vizsgálati anyagból – ritka extraintestinalis infekció esetén) történő izolálás, majd a toxin termelés igazolásától („toxigenic culture”), a *C. difficile* és toxinjainak, illetve a toxin termelésért felelős gének direkt a székletmintából történő kimutatásáig. A direkt széklet diagnosztika esetében számos gyári kit szerezhető be, melyek szenzitivitása, specificitása,

negatív és pozitív prediktív értéke, ára, valamint a TAT is igen különböző lehet. A laboratórium felelőssége, hogy az általa kiszolgált kórházak, házi orvosok által beküldött székletminták, a hazai epidemiológiai helyzet és a mintaszállítás időtartamának ismeretében megválassza a legmegfelelőbb módszert. A klinikus feladata, hogy tájékozódjon az igénybe vett mikrobiológiai laboratóriumban használt, CDI igazolására szolgáló módszerek szenzitivitása és specificitása felől, hogy a kapott eredményt megfelelő módon értékelje. Tudni kell, hogy a preanalitikai körülményektől függően minden módszer járhat hamis negatív vagy hamis pozitív eredménnyel, amely jelentős kihatással lehet az adott beteg gyógyítására (pl. főleg *C. difficile* ellenes antibiotikum adás tünetmentes (eredetileg hordozó, vagy kezelést követően még detektálható pozitívitás) vagy más okok miatt hasmenésben szenvedő betegeknél, illetve hamis negatív esetben a CDI klinikai tünetek alapján történő vagy későn kezdett kezelése).

A *C. difficile* okozta infekció kezelését terápiai „guideline”-ok szabályozzák, nincs szükség az izolált törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatára. Ilyen vizsgálatokat epidemiológiai okok miatt végeznek, legtöbbször referencia laboratóriumban.

A CDI-t okozó törzsek tipizálására (PCR-ribotipizálás) csak halmozódás, vagy járvány gyanúja esetén van szükség, az OEK bakteriális tipizáló laboratóriumával történő előzetes egyeztetést követően. Az izolált törzset vagy a hasmenéses székletmintát a laboratórium továbbítja az OEK-be. Az OEK maga is szervez felméréseket az országban vagy egyes területeken izolált *C. difficile* ribotípusok időbeni változásának követésére.

Irodalom: Lásd a mikrobiológusoknak szóló rész után

## **II. rész: A CDI különböző mikrobiológiai diagnosztikai módszerei (előnyök, hátrányok); praktikus tanácsok mikrobiológusok részére.**

- Minden 2-es és 3-as kompetencia szintű mikrobiológiai laboratóriumnak fel kell készülnie a *C. difficile* infekciók diagnosztikájára.

- *C. difficile* infekció irányába mikrobiológiai vizsgálatokat kell végezni minden olyan hasmenéses székletből, ahol a klinikusban felmerül a CDI diagnózisának gyanúja a predisponáló tényezők és a klinikai tünetek alapján.
- *C. difficile* infekció irányába kért mikrobiológiai vizsgálatot vissza kell utasítani, ha a székletminta szilárd konzisztenciájú, kivéve, ha a kísérőíraton szerepel, hogy a betegnek ileusa vagy toxikus megacolonja van, illetve ha CDI megalapozott gyanúját indokolja a vizsgálatot kérő klinikus. Ilyen esetben tamponnal vett rektális törlés is elfogadható.
- Egyéves kor alatt *C. difficile* irányú mikrobiológiai vizsgálatot ne végezzen a laboratórium. Egyéves kor feletti gyermek esetében csak akkor szabad CDI irányába vizsgálatot végezni, ha egyéb enterális kórokozó (elsősorban enterális vírusok) kóroki szerepét kizárták.
- A terápia befejezését, a beteg gyógyulását követően *C. difficile* felszabadító vizsgálatot, illetve a beteg környezetének szűrésére irányuló vizsgálatot a laboratóriumnak vissza kell utasítania.
- A *C. difficile* infekció kimutatásának „gold standard”-ja a törzs izolálása a hasmenéses székletmintából, majd a toxintermelés kimutatása a törzs levestenyészetének szűrt felülúszójából szövet-toxicitási próbával neutralizációt követően vagy más érzékeny toxin kimutatási módszerrel („toxigenic culture”).
- A *C. difficile* jelenlétének kimutatása anaerob tenyésztéssel, vagy az általa termelt glutamát-dehidrogenáz (GDH) enzimnek a székletből történő direkt kimutatásával enzim-immunoassay (EIA) vagy immunkromatográfiás (IC) módszerrel nem elegendő a CDI bizonyítására (ok: toxint nem termelő *C. difficile* törzs hordozása lehetséges).
- A direkt székletmintából történő diagnosztika során a *C. difficile* toxin(ok) illetve a toxin gének kimutatására rendelkezésre álló módszerek (szövet toxicitási próba, EIA, IC, illetve nukleinsav kimutatáson alapuló eljárások) szenzitivitása és specificitása jelentősen eltér.

- Közvetlenül a székletből végzett toxin gén(ek) kimutatására szolgáló érzékeny nukleinsav amplifikációs teszt, vagy a *C. difficile* specifikus antigént (glutamát-dehidrogenáz – GDH) kimutató teszt negativitása esetén újabb vizsgálat végzése nem indokolt (az említett módszerek magas negatív prediktív értéke miatt).
- Gyorsaság és költséghatékonyság szempontjából diagnosztikus algoritmus alkalmazása javasolt (lásd az „Ajánlott diagnosztikus algoritmus” részt).
- A *C. difficile* törzs tenyésztése elengedhetetlen, ha járványügyi célból tipizálást kell végezni, valamint ha antibiotikum rezisztencia meghatározásra van szükség.
- A *C. difficile* törzsek tipizálása csak igazolt kórházi esethalmozódás, járvány esetén indokolt. A tipizálást az OEK Bakteriológiai osztálya végzi. Ehhez izolált törzset anaerob transzport táptalajban, vagy friss székletmintát kell beküldeni. Jelenleg a hagyományos, vagy kapilláris PCR ribotipizálás alkalmazása javasolt.

### **A téma aktualitása**

Hazánkban - hasonlóan a világ számos országához - megnőtt a *C. difficile* okozta hasmenések száma, nem csak a kórházi környezetben, hanem a házi orvosi gyakorlatban is. Az utóbbi néhány évben az esetek igen nagy részét „A” és „B” toxin pozitív, valamint „binary” toxint is termelő törzs (legtöbb esetben a 027 PCR-ribotípusba tartozó törzs) okozza. A 2011-ben és 2014-ben végzett kérdőíves felmérés alapján megállapítható, hogy a magyarországi mikrobiológiai laboratóriumoknak csak egy része végez megfelelő, a nemzetközi „guideline”-okban meghatározott diagnosztikát a CDI esetek bizonyítására.

Annak ellenére, hogy a CDI sokszor a klinikai tünetek és az anamnesztikus adatok alapján diagnosztizálható, fontos a klinikai diagnózis megerősítése a mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálatok eredményével. Cél, hogy a számos mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikai eljárás közül a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően a legköltséghatékonyabb, gyorsan eredményt adó és magas szenzitivitású diagnosztikus sémát használják a hazai laboratóriumok.

### ***C. difficile* előfordulása és pathogenitási tényezői**



A *C. difficile* Gram-pozitív, spóráképző, obligát anaerob pálcá. Széles körben megtalálható a környezetben (trágyában, talajban, felszíni- és szennyvizekben) és az állati és emberi béltraktusban. Az egészséges hordozók aránya területileg változó (2-15%), újszülöttekben viszont a hordozási arány elérheti a 60%-ot is. Vegetatív formája a szabad levegőn hamar elpusztul, de az általa termelt spóra kedvezőtlen körülmények között hónapokig is túlélhet a környezetben, így a kórházi-ápolási környezetben is. A *C. difficile* spórák ellenállnak a hőhatásnak, a szárításnak és a kémiai anyagoknak, beleértve az alkohol alapú fertőtlenítőszereket. Kedvező körülmények között a béltraktusban a spórából újra szaporodásra és toxintermelésre képes baktériumsejt lesz.

A CDI leggyakoribb tünete a hasmenés, súlyos esetben akár halálhoz is vezető álhártyás bélgyulladás is kialakulhat. Ritkán extraintestinalis kórképekben is leírták. A fő pathogenitási tényezők az „A” és „B” toxin, melyet a legtöbb törzs párhuzamosan termel és csak kis számban írtak le „A” toxin negatív „B” toxin pozitív törzsek által okozott infekciókat. A két toxin patogenitásában játszott szerepéről, elsődlegességéről a CDI kialakulásában ellentmondó tudományos eredmények születtek, de végső soron ezek felelősek a bél nyálkahártya degradációjáért és a kialakuló gyulladással járó tünetekért. A törzsek egy része termel (kb. a ribotípusok 4%-a) egy harmadik toxint is a „binary” toxint, melynek a pathogenitásában játszott szerepéről ugyancsak megoszlanak a vélemények. Az újabb vizsgálatok eredményei azonban azt mutatják, hogy azon betegek között, akiknél az infekciót „binary” toxint is termelő *C. difficile* okozza, magasabb a 30 napon belüli letalitás. A *C. difficile* specifikus toxinok fehérjetermészetéből adódik, hogy a székletben degradálódhatnak a nem megfelelő körülmények között történő és elhúzódtó transzport alatt, ami a direkt toxin kimutatási módszerek szenzitivitását csökkentheti. A *C. difficile*-nek jelenlegi ismereteink szerint több száz ribotípusa és 27 toxintípusa létezik.

### **Mikrobiológiai módszerek a CDI diagnosztikájában (előny, hátrány)**

*C. difficile* tenyésztés székletmintából és az izolált törzs toxintermelésének vizsgálata („toxicogenic culture” – „gold standard”)

A *C. difficile* törzs tenyésztése a hasmenéses székletmintából anaerob körülmények között és a törzs toxintermelésének igazolása a CDI klasszikus diagnosztikai módszere. Ennek során olyan anaerob szelektív táptalaj alkalmazása szükséges, amely a széklet normál baktériumflórájának szaporodását gátolja, és elősegíti a *C. difficile* spórák germinációját és

szaporodását. Mivel mind a toxintermelő, mind a toxint nem termelő *C. difficile* törzsek tenyésztéssel pozitív eredményt adnak, így valamely toxin detektáló módszerrel igazolni kell az izolált törzs toxintermelését. A tenyésztés pozitivitását növelheti, ha a hosszabb ideig tárolt, szállított székletminták (vagy a környezeti minták) esetében hő-sokk vagy alkohol-sokk kezelést alkalmaznak tenyésztés előtt a kísérő flóra csökkentésére és a kedvezőtlen körülmények között bespórá sodott *C. difficile* spóra tartalom dúsítására. Ennek alkalmazása kizárólag abban az esetben javasolt, ha a székletminta nem friss, esetleg több napig tartott a szállítása vagy fagyaszttva tárolták, esetleg tartósítót használtak, és ezen okok miatt várható a mintában az előrehaladott spórá képzés. Bármilyen táptalajon történik a *C. difficile* tenyésztése, javasolt a komplett vagy szelektív táptalajok előredukálása és szigorú oxigénmentes környezet biztosítása az inkubáció során. E nélkül a tenyésztés szenzitivitása csökkenhet.

Különbözö típusú szelektív táptalajok használatosak a rutin diagnosztikában, főleg a törzsek azon tulajdonságát felhasználva, hogy képesek a fruktózt fermentálni. A legáltalánosabban elterjedt a cycloserin-cefoxitin-fruktóz agar (CCFA), ahol a szelektivitást a cycloserin és cefoxitin biztosítja, hatékonyan gátolva az anaerob és fakultatív anaerob baktériumok szaporodását. Ennek a táptalajnak számos módosítása terjedt el, így a cefoxitin-cycloserin-egg-yolk agar (CCEY/Brazier agar), cefoxitin-mannitol agar (CMA), cefoxitin-mannitol blood agar (CMBA), taurocholsav-cycloserin-cefoxitin agar (TCCA). A különbözö gyártók által forgalmazott, kromogén szubsztátokat tartalmazó *C. difficile* szelektív táptalajok nem csak a törzs izolálására, de egy lépésben azonosításukra is alkalmasak. Használatuk a magas szenzitivitás (97-99%) miatt javasolt. A hagyományos, vagy kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajról izolált *C. difficile* törzseket különbözö biokémiai próbák, gyári kitek, MALDI-TOF MS módszer segítségével lehet azonosítani. A jellegzetes sajátágaik felhasználásával (típusos szag, telepmorfológia, UV fluoreszcencia) viszonylag egyszerű az identifikálásuk. Az izolált, majd identifikált telepekből folyékony táptalajban (BHI - brain heart infusion, CM - húsos bouillon) szubkultúrát kell készíteni, majd az anaerob inkubációs idő letelte után a logaritmikus fázisban lévő folyékony tenyészet szűrt felülúszójából kell elvégezni a toxinvizsgálatot valamelyik toxindetektáló módszerrel. A tenyésztés - esethalmozódáskor - nemcsak a törzs toxin státuszának meghatározása miatt fontos, hanem a törzsek tipizálása (ribotípus meghatározása) szempontjából is. A CDI diagnosztikájában a tenyésztéses módszer egyre inkább háttérbe szorul (annak ellenére, hogy epidemiológiai szempontból kiemelt jelentőségű), elsősorban idő-, munka- és a kifogástalan anaerob tenyésztési körülmények igénye miatt. Mindezek ellenére az amerikai (SHEA/IDSA) és európai (ESCMID) irányelv alapján is új diagnosztikus módszerek hatékonyságának

megítélésére vagy epidemiológiai felmérésekre a "toxigenic culture" módszert mint "gold-standard" ajánlják.

*C. difficile* törzs toxintermelésének kimutatása, illetve hasmenéses székletből történő direkt toxinkimutatás citotoxin neutralizációs próbával sejt kultúrán ("cell culture cytotoxicity neutralization assay" CCCNA)

Az „A” és „B” toxin citopátiás hatásának kimutatása az izolált törzs folyékony tenyészetének centrifugált, szűrt felülúszójából történik különböző szövetkultúrák (sejtvonalak) felhasználásával. A hasmenéses székletmintából történő toxinkimutatás során a széklet szuszpenzió centrifugált, szűrt felülúszóját használjuk. Számos különböző, sejtvonalat használnak erre a célra: mint pld. humán fibroblastok, Vero, McCoy, MRC-5, HeLa és Hep2 sejtek. A toxinok indukálta citopátiás hatást 24 órás inkubálást követően inverz mikroszkópos vizsgálattal lehet detektálni és a kettes léptékű hígítási sort használva, mennyiségileg mérni. A toxinhatás specificitását a *C. sordelli* vagy *C. difficile* antitoxinnal történő neutralizációs próbával kell igazolni. Az „A” toxin negatív „B” toxin pozitív törzsek is pozitív citotoxikus hatást mutatnak a szövetkultúra tesztben. A „binary” toxinnak is van citotoxikus hatása, tönkreteszi a sejtek actin-cytoskeletonját, vékony dinamikus mikrotubulosok kialakulásához vezet, ez növeli a *C. difficile* törzs adhézióját a sejtekhez, és ezzel elősegíti a toxintermelő törzsekkel való kolonizációt. A CCCNA módszer idő és anyagigényes, a szövetkultúrák fenntartása, valamint a toxinhatás mikroszkópos értékelése nagy szakmai tapasztalatot igényel. Közvetlenül székletmintából történő toxinkimutatás során a szenzitivitást számos tényező befolyásolja: a toxin degradálódhat a mintában, így a székletminta hosszas tárolása szobahőmérsékleten fals negatív eredményhez vezethet; függ a felhasznált sejtvonal érzékenységtől, és egyéb preanalitikai és analitikai tényezőktől. A laboratóriumok ma már kevésbé használják szövet toxicitási próbát a *C. difficile* toxin detektálására mindennapi rutin diagnosztikai tevékenységük során.

*C. difficile* toxin(ok) kimutatása enzim-immunoassay-kkel (EIA), immunkromatográfiás (IC) módszerrel

A különböző típusú EIA módszerek a *C. difficile* toxin(ok) ellen termeltetett monoklonális, illetve poliklonális ellenanyagokat használják. Gyakorlatilag az elmúlt évtizedig a *C. difficile* toxin kimutatási módszerek közül az EIA módszerek egyeduralgkodóak voltak a klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban. Számos gyártó különböző típusú EIA terméke elérhető ma Magyarországon: a teljesség igénye nélkül pl. Prima System *C. difficile*

ToxA, (Trinity Biotech), VIDAS *C. difficile* ToxA/B (bioMérieux); Meridian Premier A/B EIA (Meridian Diagnostic Inc.), Triage Micro *C. difficile* (Biosite Diagnostics); és *C. difficile* ToxA/B (Techlab Inc.). Kezdetben ezeket a tesztek az „A” toxin kimutatására fejlesztették ki. Ma már egyre inkább az „A” és „B” toxinok egyidejű, egymás melletti kimutatására is alkalmas módszerek használatosak a rutin diagnosztikai laboratóriumokban, mivel fontos az „A” toxin negatív „B” toxin pozitív törzsek kimutatása is a megnövekedett előfordulás, klinikai jelentőség miatt.

A másik elterjedt, gyorsdiagnosztikai módszer az IC-n alapuló különböző tesztek: pld. a *C. difficile* ToxinA Test (Oxoid), ImmunoCard *C. difficile* (Meridian Diagnostics Inc.), Direct *C. difficile* Toxin A+B (CerTest), RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B (R-Biopharm), *C. diff* QUICK CHEK (Techlab Inc.). Ezek munka- és időigénye rendkívül csekély (30-50 perc), könnyen kivitelezhetőek, akár a kórházi osztályokon is elvégezhetőek (ágy melletti „point of care” tesztek, bár meggondolandó a laboratóriumon kívül történő használatuk a *C. difficile* kontamináció miatt). A módszer előnye a viszonylag alacsony ár, a rövid detektálási idő, (bár ez változó a különböző teszt-típusoknál). A kereskedelmi forgalomban kapható kitek, legyenek azok EIA vagy IC módszeren alapuló kitek, specificitása és szenzitivitása az irodalmi adatok alapján igen eltérő, széles határok között mozog: 40-100%. „Gold standard”-ként az összehasonlító vizsgálatok során az anaerob tenyésztésen alapuló módszert („toxigenic culture”), illetve közvetlenül a székletmintából a citotoxin neutralizációs próba alkalmazását javasolják.

#### *Glutamát-dehidrogenáz antigén kimutatása*

A glutamát-dehidrogenáz (GDH) metabolikus enzim, melyet a *gluD* gén kódol. Ezt az enzimet mind a toxintermelő, mind a toxint nem termelő *C. difficile* törzsek nagy mennyiségben termelik, azonban a *C. sordellii* törzsek is gyakran keresztreakciót adhatnak. Ezért a módszer „screening” (szűrő) módszerként használatos, a negatív prediktív értéke igen magas, pozitív esetben azonban a toxintermelést valamilyen további vizsgálattal (szövet toxicitási teszt, EIA, IC, vagy a toxin gén kimutatása nukleinsav amplifikációs módszerrel) konfirmálni kell. A GDH kimutatására számos gyártó forgalmaz tesztek, melyek vagy plate-s EIA-n, vagy IC-n alapulnak. A különböző GDH tesztek szenzitivitása hasonló: >90%, elhanyagolható a hamis pozitív eredmények száma. A magas negatív prediktív érték, valamint a rövid „turn around time” miatt a negatív eredmény gyorsan közölhető a klinikussal. Az eszközígyény minimális, az ár alacsony. A GDH mint szűrő módszer különösen azoknak a

rutin diagnosztikai laboratóriumoknak ajánlott, ahol alacsony a CDI prevalenciája, és amelyek költség hatékony módon szeretnének gyorsan negatív eredményt közölni.

#### *GDH és toxin kimutatás egy lépésben*

Több olyan gyári kit van a mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatban, amely kombinálja a GDH és a toxin kimutatást: pld. GDH és toxin EIA módszerek egy plate-en, vagy IC módszeren alapuló kombinált kit (pl. QuickChek Complete – TechLab). Ezek a tesztek viszonylag gyorsan kivitelezhetőek és jóval olcsóbbak, mint a nukleinsav amplifikáción alapuló diagnosztikai tesztek. A GDH kimutatási része mind az EIA-n, mind az IC-n alapuló teszteknek hasonló szenzitivitású, mint az egyedüli teszteké. Azonban a kombinált tesztekben alkalmazott toxin kimutatási EIA vagy IC szenzitivitása alacsonyabb, mint az egyedülként alkalmazott hasonló, toxindetektáló teszteké. Az értékelés során, ha mind a GDH, mind a toxin kimutatás negatív, viszonylag magas biztonsággal megadhatjuk a CDI negatív eredményt. Ha a GDH és a toxin kimutatás is pozitív, ugyanilyen biztonsággal pozitívként interpretálhatjuk a mintát. Abban az esetben, ha a minta GDH pozitív, de toxin negatív, valamelyik konfirmáló módszerrel (a toxin gén kimutatása nukleinsav amplifikációs módszerrel, egy érzékeny toxindetektáló EIA-val, vagy a CCCNA) meg kell erősíteni az eredményt. A kombinált teszt használta javasolt, ahol magas a CDI prevalenciája, a gyors eredményközlés érdekében.

#### *Nukleinsav amplifikáción alapuló módszerek alkalmazása a CDI diagnosztikájában*

A *C. difficile* toxinok termeléséért felelős gének kimutatása megtörténhet direkt hasmenéses székletmintából vagy a kitenyésztett *C. difficile* törzs tenyészetéből. A *C. difficile* laboratóriumi diagnosztikában alkalmazott nukleinsav amplifikáción alapuló tesztek nagy része „in-house assay”, amelyeknél a kimutatott target gén szakasz(ok) leggyakrabban az „A” és „B” toxint kódoló gének konzervált régiója. Ritkán a fő toxingének mellett a „binary” toxint kódoló gének, az enzimatikus domaint kódoló *cdtA* vagy a receptorkötő domaint kódoló *cdtB* gének amplifikációja, a *C. difficile* 16S rRNA gén, vagy a glutamát-dehidrogenázt kódoló gén kimutatása is szóba jön. A laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok során nem elegendő a *C. difficile* jelenlétét bizonyító 16S rRNS gén, vagy a glutamát-dehidrogenázt kódoló gén kimutatása, minden esetben elvárás a székletben lévő törzs toxintermelésének igazolása az „A” és/vagy „B” toxin gének kimutatásával. „In-house assay”-k alkalmazása esetén a primerek megválasztásánál ügyelni kell arra, hogy a toxingének 3' régiójának variábilis szakaszaira ne tervezzünk primert, mert ez hamis negatív eredményhez

vezethet. „In-house assay”-k alkalmazása esetén további elvárás a negatív, pozitív, valamint egy internális (belső) kontroll alkalmazása, ez utóbbi ugyanis kiküszöbölheti a székletben lévő PCR inhibitorok jelenlétéből adódó esetleges hamis negatív eredményeket.

A kereskedelmi forgalomban elérhető nukleinsav amplifikáción alapuló tesztek többsége ma már real-time PCR, mint pl. a BD-GeneOhm Cdiff assay (BD), a Cepheid geneXpert *C. difficile* (Cepheid) vagy loop mediated amplifikáción (LAMP) alapuló módszer, mint az Illumigene *C. difficile* assay (Meridian Diagnostics). A leggyakrabban alkalmazott tesztek a „B” toxint kódoló gén konzervált régióját, ritkábban az „A” és esetleg a binary toxint (*cdtA*, *cdtB*) kódoló géneket alkalmazzák targetként. Bizonyos tesztek a 027-es PCR ribotípus kiszűrése miatt a negatív reguláló *tcdC* gén delécióját is képesek kimutatni. A legtöbb esetben a nukleinsav amplifikálást megelőző nukleinsav izolálás különböző manuális kitek segítségével kivitelezhető, míg ritkábban a kit olyan komplex rendszer, amely a nukleinsav izolálást is magába foglalja.

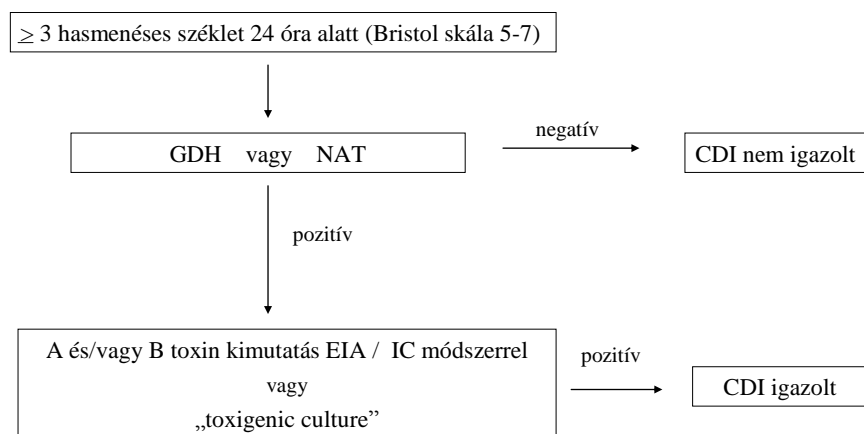
A nukleinsav amplifikációs tesztek alkalmazása esetén szigorúan csak hasmenéssel székletminta feldolgozása javasolt, ezzel ugyanis elkerülhetjük a toxintermelő törzsszel történő kolonizáció kimutatását, és ennek antibiotikummal történő felesleges kezelését. Hasmenéssel székletminta esetén, ha molekuláris teszt negatív eredményt ad, 7 napon belül újabb székletminta vizsgálata molekuláris módszerrel nem javasolt.

A nukleinsav amplifikációs módszerek alkalmazásának legfőbb hátránya a biológiailag aktív toxin kimutatásának hiánya. A toxintermelésért felelős gének expressziója környezeti faktorok által befolyásolt, ezért sokan úgy gondolják, hogy a biológiailag aktív toxin kimutatásának a székletmintában sokkal nagyobb a diagnosztikai értéke. Szintén hátrány, hogy a nukleinsav amplifikációs tesztek magas érzékenysége miatt, a nem hasmenéssel székletminta esetén a módszer pozitív eredményt ad a toxintermelő törzsszel történő kolonizáció esetében is, ami felesleges antibiotikum alkalmazáshoz vezet.

### **Ajánlott diagnosztikus algoritmus**

A gyári kit formájában rendelkezésre álló, direkt a székletből történő toxin gén kimutatására szolgáló nukleinsav amplifikációs tesztek magas szenzitivitása és specificitása, valamint a gyors eredményközlés lehetősége miatt az USA-ban egyre több „guideline” (SHEA/IDSA) „stand alone” tesztként javasolja használni a CDI diagnosztikájában, amennyiben a betegnek  $\geq 3$  hasmenéssel széklete van 24 órán belül és ez megismétlődik a következő napon is. Ezt elsősorban azzal a klinikusi szokással állítják szembe, mely szerint a

kevésbé érzékeny, direkt széklet toxin kimutatására szolgáló EIA módszer esetén 3 egymást követő székletmintából kéri a *C. difficile* toxin detektálását adott beteg esetében. Az európai (ESCMID) „guideline” hangsúlyozza, hogy a toxin gének direkt székletmintából történő érzékeny detektálását követően érdemes a toxin mennyiségi meghatározása is egy érzékeny toxin kimutató EIA módszerrel annak elkerülésére, hogy kolonizáló, toxintermelő *C. difficile* törzs kimutatására kerüljön sor egyéb ok miatt hasmenéses betegnél. Az irodalomban számos 2 és 3 lépéses diagnosztikai algoritmus került megfogalmazásra és kipróbálásra a CDI hatékony diagnosztikájára. Ezek alapján és a hazai mikrobiológiai laboratóriumok anyagi és műszeres ellátottságát figyelembe véve, az alábbi 2 lépéses diagnosztikus algoritmust javasoljuk a *C. difficile* okozta hasmenés gyors és hatékony kimutatására.



### Megjegyzések:

1. GDH és toxin A/B kombinált teszt használata esetén (pl. QuickChek complete) ha mindkét teszt pozitív, további vizsgálatra nincs szükség, a CDI diagnózis bizonyított. Ha mind a két teszt negatív, a CDI nagy biztonsággal kizárható.
2. Eltérő eredmény esetén (GDH +, toxin - vagy GDH-, toxin+) újabb vizsgálatot kell végezni (friss hasmenéses székletből: tenyésztés és toxin meghatározás, vagy a direkt kombinált antigén kimutatási teszt), ha a CDI klinikai gyanúja erős.
3. Nukleinsav amplifikációs teszt (NAT) negativitás esetén a CDI nagy biztonsággal kizárható, ha pozitív, akkor javasolt megerősíteni a diagnózist egy érzékeny toxinkimutatási teszttel.

## **Rezisztencia vizsgálatok**

A *C. difficile* izolálást követően antibiotikum érzékenységi vizsgálatra rutinszerűen nem kerül sor. A terápiában szóba kerülő metronidazol esetében ugyan írtak le emelkedett MIC értékkel (2-8 µg/ml) rendelkező törzseket, de magas fokú rezisztencia igen ritka, a rezisztencia genetikai háttere nem ismert. A terápia során észlelt hatástalanság sokkal inkább a metronidazol szokásos adagolása mellett a hasmenéses székletben elérhető alacsony koncentrációra vezethető vissza. A vancomycinnel és a nemrég bevezetett fidaxomicinnel szemben a vizsgált törzsek egységesen érzékenynek bizonyulnak. A fidaxomicin székletkoncentrációja több százszorosán meghaladja a *C. difficile* törzsek esetében mért MIC értékeket. Rezisztencia surveillance vizsgálatok során *C. difficile* esetében az agarhígításos módszer, illetve az E-teszt használata javasolt. Ilyen esetekben nem csak a CDI terápiajában használatos antibiotikumokkal szembeni érzékenység vizsgálatára kerül sor, hanem a cél számos más, egyes hipervirulens törzsekre jellemző rezisztenciák követése (pl. 027 PCR-ribotípusba tartozó törzsek fluorokinolon rezisztenciája). Hangsúlyozni kell, hogy a rezisztencia vizsgálat során különösen figyelni kell a megfelelő anaerobiosis (oxigénmentes környezet) biztosítására, különösen a metronidazol esetében, hiszen már kis mennyiségű oxigén jelenlétében is jelentősen csökkenhet a zónaátmérő a metronidazol korong körül, vagy emelkedhet a metronidazol MIC értéke.

### ***C. difficile* törzsek ribotípus meghatározása esethalmozódás vagy járvány esetén**

A *C. difficile* törzsek tipizálására számos, molekuláris technikán alapuló módszer elérhető. Kereskedelmi forgalomban kapható IVD minősítésű, tipizálásra alkalmas teszt tudomásunk szerint jelenleg nincs forgalomban, ezért a laboratóriumok többsége a nemzetközi tapasztalatok alapján választja ki az adott laboratórium számára legmegfelelőbb módszert (PFGE, MLST, MLVA, PCR-ribotipizálás, stb). A kiválasztásnál leginkább érvényesülő szempontok, hogy a módszerrel a legtöbb törzs tipizálható legyen, a módszer legyen kellően diszkriminatív, egyszerű legyen a teszt kivitelezése, legyen olcsó, rövid idő alatt adjon eredmény, ezeken kívül fontos szempont még a munkaigény, reprodukálhatóság és



az eredmények könnyű, egyértelmű kiértékelhetősége. Mindezeknek a feltételeknek leginkább a PCR ribotipizálás felel meg. A PCR ribotipizálás esetén PCR módszerrel a riboszómális 16S és 23S RNS-t kódoló génekhez tervezett primerekkel történik a spacer régió amplifikálása. A képződött termékek mérete és száma törzsenként eltér, az egyedi mintázat pedig lehetőséget biztosít a törzsek epidemiológiai célból történő vizsgálatára. A PCR termékek detektálására korábban speciális agaróz gél futtatást alkalmaztak, ma már a módszer jobb reprodukálhatóságát és az eredmények könnyebb kiértékelhetőségét speciális kapilláris gélelektroforézis biztosíthatja. A PCR ribotipizálási módszer világszerte elterjedt, és sokáig cél volt az egyes PCR ribotipusok földrajzi elterjedésének vizsgálata, amely viszont számos nehézségbe ütközött. Egy univerzális, mindenki számára elérhető és fejleszhető könyvtár lett volna szükség. Több év tapasztalata során világossá vált, hogy ennek a könyvtárnak a létrejötte nem lehetséges, ugyanis a laboratóriumok jelentős része a kidolgozott módszert saját laboratóriumára adaptálva finomításokat végzett, amely az egyes ribotipusok mintázatában változásokat eredményezett. Miután az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy az egyes ribotipusok földrajzi megoszlása eltér, sőt egy régióon belül időszakonként, járó-és fekvőbeteg csoport szerint is eltér a ribotipusok előfordulása, a PCR-ribotipizálást lokális halmozódás vagy járvány esetén javasolt alkalmazni. Ilyen esetben a tipizálást végző laboratórium, az általa adaptált PCR-ribotipizálási módszerrel a saját adatbázisában végez összehasonlításokat annak a megállapítására, hogy az adott időszakban és adott helyen cirkuláló törzsek azonosnak tekinthetők-e. Magyarországon javasolt a *C. difficile* törzsek ribotipus meghatározását járvány igazolására vagy az országban terjedő ribotipusok követésére az OEK baktérium tipizáló laboratóriumában végezni.

### **Nyilatkozat:**

A konszenzus állásfoglalásban kifejtettek egyetlen, a *C. difficile* diagnosztikában érdekelt cég sem támogatta se közvetlenül, se közvetett módon.

### **Irodalom:**

Brecher SM, Novak-Weekley SM, Nagy E. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections: There is light at the end of the colon. Clin Infect Dis 2013; 57:1175-1181.

Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infections: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clin Microbiol Rev 2013; 26:604-630

Carroll KC, Bartlett JG: Biology of *Clostridium difficile*: Implication for epidemiology and diagnosis. Ann Rev Microbiol 2011; 65:501-521.

*Clostridium difficile* infections in Europe: A CDI Europe Report.

<http://www.aiknowledgenetwork.eu> 2013

Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Disease Society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31:431-455.

Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI) Clin Microbiol Infect 2009; 15:1053-1066.

Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance Gut Microbes 2014; S1:15-27.

Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. Current application and future perspectives of molecular typing method to study *Clostridium difficile* infections. Euro Surveill 2013; 18(4):pii=20381

link: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20381>

Peterson LR, Robicsek A. Does my patient have *Clostridium difficile* infection? Ann Intern Med 2009; 151:176-179.

Planche TD, Davies KD, Coen PG, *et al.* Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. Lancet Infect Dis 2013; 13:936-945.

Wilcox MH. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2012; 18(suppl 6):13-20.