MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 263 - 268

Zastosowanie dwustopniowego algorytmu w diagnostyce chorych z niskim poziomem toksyn A/B *Clostridium difficile* w kale potwierdzonym testem immunoenzymatycznym

The use of two-stage algorithm in the diagnosis of patients with low levels of *Clostridium difficile* toxins A/B in feces confirmed by using enzyme immunoassay

Grażyna Nurzyńska[1], Hanna Pituch[2], Renata Kamola[1], Ewa Swoboda Kopeć[1,2]

[1] Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie
[2] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie

Sześćdziesiąt dziewięć próbek kału pobranych od chorych z biegunką szpitalną, w których nie wykryto toksyn *C. difficile* testem EIA lub uzyskano wynik wątpliwy stosując rutynową diagnostykę, poddano dalszej analizie. Powodem wykonania dodatkowych oznaczeń był stan kliniczny pacjentów. Zastosowano metodę hodowlaną oraz RT-PCR. Zdiagnozowano 55 (78%) pacjentów z niskim poziomem toksyn w kale, zakażonych toksynotwórczym szczepem *C. difficile*, w tym 34 (62%) pacjentów zakażonych szczepem NAP1/BI/027 lub genetycznie pokrewnym. Zastosowanie dodatkowo dwustopniowego algorytmu diagnostycznego zwiększa szansę prawidłowego rozpoznania zakażenia *C.difficile* u pacjentów z niskim poziomem toksyn A/B w kale.

Słowa kluczowe: *zakażenia Clostridium difficile, niski poziom toksyn A/B C.difficile, dwustopniowy algorytm diagnostyczny C. difficile,*

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium difficile* infection (CDI) is a serious problem in hospitalized patients. Rapid and accurate laboratory diagnosis is the key to reducing of CDI. The suboptimal sensitivity and specificity of many commercial enzyme immunoassays have limited their utility. The aim of this study was analysis of faecal samples obtained from patients with clinical evidence of CDI, with non-detectable or questionable result of toxins A/B *C. difficile* recognized by toxins A/B EIA test.

Methods: A two-step algorithm for diagnostics of *C. difficile* infection (CDI) in patients with non-detectable or questionable result of toxins A/B *C. difficile* confirmed by *C. difficile* enzyme immunoassay (EIA) (Wampole, TOX A/B II, TechLab, USA) was used. Sixty nine faecal samples obtained from patients with nosocomial diarrhea were retested. All faecal samples were cultured on selective medium CLO *C.difficile* (BioMérieux, Francja). The positive samples on selective medium were tested by using Real Time-PCR (Xpert CD assay, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Xpert CD assay is a real time multiplex PCR that can be used to detect toxigenic *C. difficile* strains and differentiate the *C. difficile* presumptive NAP1/BI/027 strain. All results when faecal samples were negative in culture growth on selective medium and result of EIA test were questionable was confirmed by use a RT-PCR test.
Results: Among 69 faecal samples 56 were negative for toxins A/B using EIA test and 13 gave questionable results. By anaerobic culture 60 of 69 specimens yielded *C. difficile* isolates. Among 69 faecal samples 55 were positive using RT-PCR. Thirty four (62%) of patients was infected by presumptive *C. difficile* NAP1/BI/027.
Conclusions: *C. difficile* testing by use of culture and Real Time PCR (RT-PCR) increases diagnostic yield in a hospital patients with non-detectable or low level of toxins A/B in stool samples of patients infected by toxigenic *C. difficile* strains including presumptive *C. difficile* NAP1/BI/027.

Key words*: Clostridium difficile infection (CDI), low level of C. difficile toxin A/B, two--step of algorithm for diagnosis CDI*

WSTĘP

Gram-dodatnia, beztlenowa laseczka *Clostridium difficile* jest najczęstszą przyczyną biegunki infekcyjnej u hospitalizowanych pacjentów. Zakażenie spowodowane tym drobnoustrojem może przebiegać bezobjawowo, wywoływać łagodną biegunkę, potencjalnie śmiertelne, rzekomobłoniaste zapalenie okrężnicy, czy też ostre rozdęcie okrężnicy (megacolon toxicum) (1,8). Poważnym problemem są nawroty i reinfekcje zakażeń *C. difficile* (7). Wzrost częstości występowania zakażeń wywołanych przez *C. difficile* w Polsce i wielu innych krajach ma z pewnością związek z pojawieniem się nowych szczepów, w tym wysoce zjadliwego i hiperepidemicznego typu NAPI/BI/027 (5, 11, 12) .

Szybka i właściwa laboratoryjna diagnostyka pacjentów zakażonych *C. difficile* jest kluczem do prawidłowego rozpoznania, postępowania terapeutycznego i ograniczenia rozprzestrzeniania się *C. difficile* w środowisku szpitalnym, umożliwiając wprowadzenie odpowiednich procedur kontroli zakażeń (2, 3). Nowym wyzwaniem diagnostycznym jest pojawienie się w środowisku szpitalnym również w Polsce, szczepów hiperwirulentnych, które należy szybko wykryć i przedsięwziąć odpowiednie procedury kontroli zakażeń jak chociażby izolację chorych (2, 9). Testy immunoenzymatyczne stosowane w diagnostyce laboratoryjnej, umożliwiające wykrycie *C. difficile* w próbkach kału są dalszym ciągu niewystarczająco czułe i swoiste, dlatego stosuje się algorytmy dwu- lub trzystopniowe, w celu zwiększenia szansy właściwego rozpozna CDI (6, 10, 15, 16).

Celem podjętych badań była próba zastosowania wybranego, dwustopniowego algorytmu diagnostycznego w celu weryfikacji ujemnych lub wątpliwych wyników uzyskanych

metodą EIA w kierunku toksyn *C. difficile* ze względu na kliniczne dowody wskazujące na zakażenie *C.difficile* w tej grupie pacjentów.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 69 próbek kału, w których nie wykryto toksyn *C. difficile* stosując metodę EIA, wykorzystywaną rutynowo w diagnostyce laboratoryjnej szpitala SP CSK lub uzyskano wynik wątpliwy. Za wątpliwy uznano wynik oznaczenia próbki o bardzo jasnym zabarwieniu, interpretowany jako (1+). Wszystkie próbki kału (n=69) posiano na podłoże selektywne do izolacji *C.difficile*. W dniu wyhodowania szczepy poddano badaniu na obecność markerów genetycznych testem RT-PCR w celu wykrycia toksynotwórczości. W przedstawionej pracy nie uwzględniono w analizie próbek dodatnich, których wyniki testów EIA nie budziły wątpliwości .

Oznaczanie toksyn metodą EIA. Z każdej próbki wykonano oznaczenie na obecność toksyn A/B metodą immunoenzymatyczną (EIA), z wykorzystaniem testu Wampole *C. difficile* TOX A/B II (TechLab, USA). Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Próbki kału, których nie badano w dniu przesłania materiału do laboratorium, przechowano w temp. 2-8°C do następnego dnia, a te które przechowywano powyżej 24 godzin zamrożono w temp. -20°C. Za dodatni wynik uznano każde oznaczenie, w którym obserwowano żółte zabarwienie badanej próbki. Pozytywne wyniki poddano klasyfikacji: 1+, 2+, 3+, 4+, według załączonej ulotki producenta, przy czym wynik 1+ to próbka zabarwiona na kolor bladożółty, 4+ to próbka zabarwiona na kolor intensywnie żółty. Za ujemny wynik w teście EIA uznano oznaczenia, w których nie obserwowano zabarwienia próbki na kolor żółty, zgodnie z kontrolą ujemną. Za wyniki wątpliwe uznano wyniki określone jako 1+. Po przeprowadzeniu rutynowo pierwszego etapu diagnostycznego testem EIA do dalszych oznaczeń wybrano próbki na podstawie następujących kryteriów: wynik ujemny lub słabo dodatni (+) uzyskany w teście EIA do wykrywania toksyn A/B *C. difficile* dla danego oznaczenia, brak innych czynników etiologicznych biegunki, przedłużające się objawy u pacjenta sugerujące zakażenie *C. difficile*, skuteczność empirycznego leczenia metronidazolem lub wankomycyną (konsultacja z lekarzem). Badanie dotyczyło próbek niepowtarzalnych.

Izolacja szczepów *C. difficile*. Każdą próbkę kału niezwłocznie posiano na podłoże selektywne CLO *C. difficile* (BioMérieux, Francja). Podłoża inkubowano w warunkach beztlenowych z użyciem generatorów gazu GENbox anaer lub GENbag anaer (BioMérieux, Francja), w temperaturze 35-37°C przez 48 godzin. Identyfikację *C. difficile* przeprowadzono na podstawie charakterystycznej morfologii kolonii, żółto-zielonej fluorescencji w lampie Wooda, zapachu para-krezolu oraz wyniku preparatu barwionego metodą Grama jak opisano wcześniej (11). Do dalszej identyfikacji użyto testu lateksowego *C. difficile* Test Kit (Oxoid, Wielka Brytania), w którym cząsteczki lateksu opłaszczono przeciwciałami króliczymi IgG swoistymi dla antygenu ściany komórkowej drobnoustroju (dehydrogenazy glutaminianowej - GDH).

Real Time-PCR (RT-PCR). Badane próbki analizowano stosując automatyczny zestaw do badań Xpert CD assay, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA. Zestaw ten umożliwia wykrycie trzech markerów toksynotwórczości *C. difficile*: fragmentu genu toksyny B (*tcdB*),

fragmentów genów toksyny binarnej (*cdtA* i *cdtB*) oraz delecję w pozycji 117 w genie regulacji negatywnej *tcdC*. System integruje trzy podstawowe reakcje: izolację DNA, amplifikację i detekcję. Materiałem do badań były próbki kału (n=15) lub wyhodowane szczepy (n=54), w zależności od sytuacji diagnostycznej. Testy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Wynik oznaczenia uzyskiwano po upływie ok. 45 minut od wstawienia próbki do aparatu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W 2012 r. w Zakładzie Mikrobiologii SP CSK rozszerzono diagnostykę o dwustopniowy algorytm diagnostyczny w przypadku próbek kału pobranych od 69 od chorych z podejrzeniem biegunki o etiologii *C. difficile*.

Wśród 69 wybranych próbek kału do dalszej analizy, w 56 (81,2%) próbkach wstępnie poddanych rutynowej diagnostyce nie wykryto toksyn testem EIA (wynik ujemny) a w 13 (18,8%) stwierdzono słabo dodatni wynik (wątpliwy) oznaczony jako (+). Z 60 (87%) próbek kału wyhodowano na podłożu stałym szczepy *C. difficile*. Z każdej próbki kału, w której nie wykryto toksyn *C. difficile* metodą EIA, wyhodowano szczep *C. difficile*. Natomiast nie wyhodowano szczepu *C. difficile* z żadnej z 9 (13%) próbek kału, dla których wynik badania był wątpliwy. Dla tych próbek wykonano test RT-PCR z kału jako test rozstrzygający. W dwóch przypadkach uzyskano wynik dodatni a w siedmiu - ujemny. Ogółem dodatni wynik testu RT-PCR uzyskano w 55 (79,7%) oznaczeniach.

Podsumowanie wyników zastosowania wybranego dwustopniowego algorytmu diagnostycznego przedstawiono w tabeli I. Stosując metodę RT-PCR uzyskano 34 (49,3%) oznaczenia, w których stwierdzono wszystkie trzy markery toksynotwórczości, tj. fragment genu toksyny B (*tcdB*), fragmenty genów toksyny binarnej (*cdtA* i/lub *cdtB*) oraz delecję w genie *tcdC* w pozycji 117, których obecność wskazuje na prawdopodobne zakażenie hiperepidemicznym szczepem NAPI/BI/027 lub genetycznie spokrewnionym.

Wyniki te były zgodne z ówczesną sytuacją epidemiologiczną szpitala tj. wzrostem liczby przypadków zakażeń *C. difficile*, dużą liczbą nawrotów oraz trudnościami w leczeniu biegunek szpitalnych.

W 20 (28,9%) szczepach wykryto, stosując metodę RT-PCR, fragment genu *tcdB*, a w jednym szczepie fragment genu toksyny *tcdB* i fragmenty genów toksyny binarnej (*cdtA*

Tabela I. Podsumowanie wyników zastosowania dwustopniowego algorytmu diagnostycznego do weryfikacji 69 próbek kału pochodzących od chorych z niewykrywalnym lub niskim poziomem toksyn *C. difficile* w kale.

Wynik testu EIA do wykrywania toksyn w próbkach kału (n=liczba/odsetek oznaczeń)	Wyniki oznaczeń metodą hodowli		Wyniki oznaczeń metodą RT-PCR	
	dodatni	ujemny	dodatni	Ujemny
Wynik ujemny: n=56 (81,2%)	56 (100%)	0 (0%)	49 (87,5%)	7 (12,5%)
Wynik wątpliwy: n=13 (18,8%)	4 (31%)	9 (69%)	6 (46,2%)	7 (53,8%)

i/lub *cdtB*). W przypadku 14 (20,3%) oznaczeń nie wykryto markerów toksynotwórczości *C.difficile* (Tabela II).

Tabela II. Podsumowanie wyników oznaczeń wykonanych metodą RT-PCR i EIA w próbkach pochodzących od 69 chorych z niskim poziomem toksyn A/B *C. difficile*.

RT-PCR		EIA			
Markery toksynotwórczości	Liczba oznaczeń	Wynik ujemny		Wynik wątpliwy	
		Liczba oznaczeń	Odsetek oznaczeń	Liczba oznaczeń	Odsetek oznaczeń
tcdB (+) *cdtA* i/lub *cdtB* (+) delecja w pozycji nt 117 (+) (prawdopodobnie NAP1/BI/027)	34	31	91%	3	9%
tcdB (+) *cdtA* i/lub *cdtB* (-) delecja nt 117 (-)	20	16	80%	4	20%
tcdB (+) *cdtA* i/lub *cdtB* (+) delecja w pozycji nt 117 (-)	1	1	100%	0	0
tcdB (+) *cdtA* i/lub *cdtB* (+) delecja w pozycji nt 117 (+)	14	7	50%	7	50%

(+) wynik dodatni; (-) wynik ujemny

Analizując powyższe wyniki badań, zwraca uwagę duża liczba oznaczeń ujemnych uzyskanych metodą EIA tj. 31 (91%), w przypadku zakażenia prawdopodobnie szczepem hiperepidemicznym NAP1/BI/027 lub genetycznie spokrewnionym, co potwierdzono stosując metodę RT-PCR. Tak duża rozbieżność wyników prawdopodobnie jest spowodowana niższą czułością metody EIA niż metody RT-PCR, obecnością związków hamujących, nierównomiernego rozkładu toksyn w kale oraz niestabilnością białek toksycznych (11). Z drugiej strony, zwraca uwagę duża liczba, tj 50% (n=7) wyników uzyskanych przy zastosowaniu metody EIA do wykrywania toksyn, które określono zgodnie z instrukcją producenta jako słabododatnie (wątpliwe), nie potwierdzonych jako dodatnie w metodzie RT-PCR.

Testy diagnostyczne stosowane do wykrywania toksynotwórczości szczepów *C. difficile* cechuje niewystarczająca czułość. Złotym standardem jest w dalszym ciągu metoda hodowlana, dzięki której zwiększa się możliwość wykrycia szczepów *C. difficile* (4,13,14). Z naszych obserwacji wynika, co potwierdzają inni autorzy, że automatyczny zestaw do wykonania RT-PCR pozwala na szybkie przeprowadzenie badania diagnostycznego, jakkolwiek w opisanym badaniu zastosowano tę metodę do potwierdzenia toksynotwórczości wyhodowanych szczepów, w tym szczepów potencjalnie hiperwirulentnych NAP1/BI/027 (15).

Diagnostyka pacjentów z zakażeniem *C. difficile* jest trudna i nie zawsze skuteczna. W przypadku pacjentów szpitalnych, u których obraz kliniczny wskazuje na zakażenie *C. difficile*, natomiast wynik badania diagnostycznego z zastosowaniem jednego testu nie potwierdza rozpoznania, należy włączyć inne testy potwierdzające.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bartlett JG* . Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. Ann Intern Med 2006; 145: 758-64.
2. *Barra-Carrasco J, Hernández-Rocha C, Miranda-Cárdenas C* i inni. Diagnostic accuracy of a multiplex real-time PCR to predict *Clostridium difficile* ribotype 027. Anaerobe 2013; 22: 115-7.
3. *Gerding DN, Muto CA, Owens RC Jr.* Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46 Suppl 1: 43.
4. *Kądzielska J, Pituch H, Banaszkiewicz A* i inni. Ocena przydatności podłoża chromogennego do izolacji *Clostridium difficile* z przewodu pokarmowego dzieci z biegunką. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 197-201.
5. *Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS* inni. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. Euro Surveill 2008; 13: 31.
6. *Larson AM, Fung AM, Fang FC*. Evaluation of *tcdB* real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2010; 48:124-30.
7. *Marsh JW, Arora R, Schlackman JL* inni. Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. J Clin Microbiol 2012; 50: 4078-82.
8. *Monaghan T, Boswell T, Mahida YR.* Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. Gut 2008; 57: 850-60.
9. *Muto CA, Blank MK, Marsh JW* i inni. Control of an outbreak of infection with the hypervirulent *Clostridium difficile* BI strain in a university hospital using a comprehensive "bundle" approach. Clin Infect Dis 2007; 45: 1266-73.
10. *Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM* i inni. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol. 2010; 48: 889-93.
11. *Pituch HM*. Zakażenia *Clostridium difficile* w Polsce-nowa epidemiologia. Praca habilitacyjna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa 2008.
12. *Pituch H, Bakker D, Kuijper E* i inni. First isolation of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027/ toxinotype III in Poland. Pol J Microbiol 2008; 57: 267-8.
13. *Reller ME, Lema CA, Perl TM* i inni. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2007; 45: 3601-5.
14. *Shin BM, Kuak EY, Lee EJ, Songer JG.* Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2009; 47: 2952-6.
15. *Shin S, Kim M, Kim M*, i inni. Evaluation of the Xpert *Clostridium difficile* assay for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Ann Lab Med 2012; 32: 355-8.
16. *Stamper PD, Alcabasa R, Aird D* i inni .Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009; 47: 373-8.

Otrzymano: 30 IX 2013 r.

Adres Autora: 02-097 Warszawa ul. Banacha 1a, Zakład Mikrobiologii,
Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny
e-mail: granurz2@ wp.pl