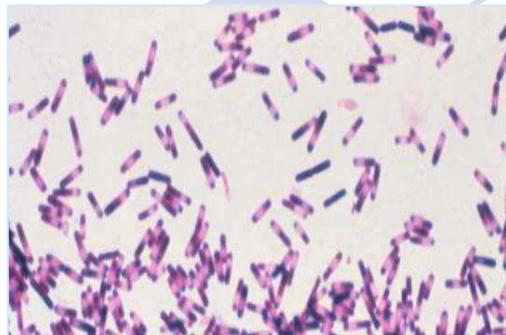


# ***Clostridium difficile* – současné přístupy k laboratorní diagnostice**

**Otakar Nyč, Jana Matějková, pracovní skupina pro  
*C.difficile* při PSMR SZU...**



## *Clostridium difficile*...

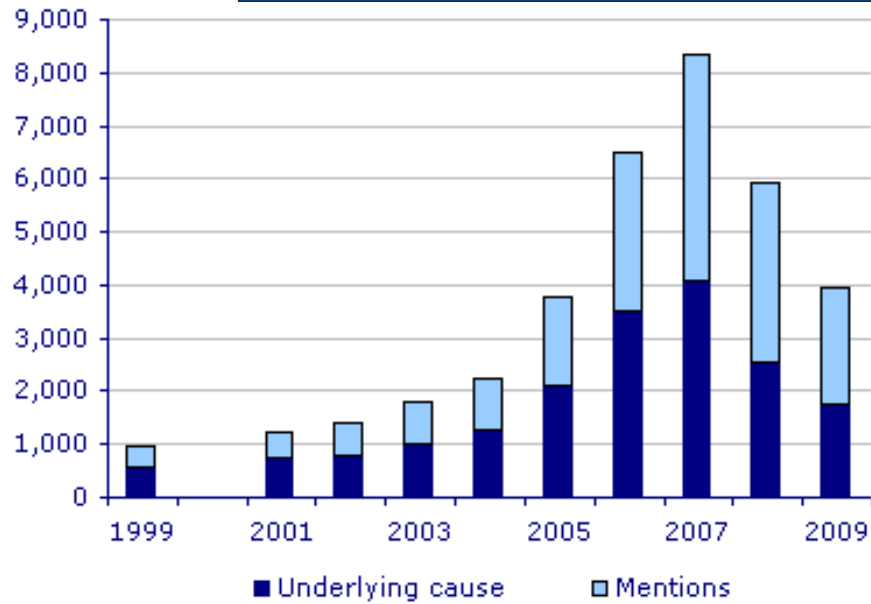
- 1935 jako součást střevní flóry novorozenců
- 70. léta - původce pseudomebranósní kolitidy (PMC)
- 15 –25 % post antibiotických průjmů
- 50 – 75 % post antibiotických kolitid
- 95 – 100 % PMC
- Narůstající význam jako původce nemocničních a komunitních infekcí

# Měnící se epidemiologie CDI...

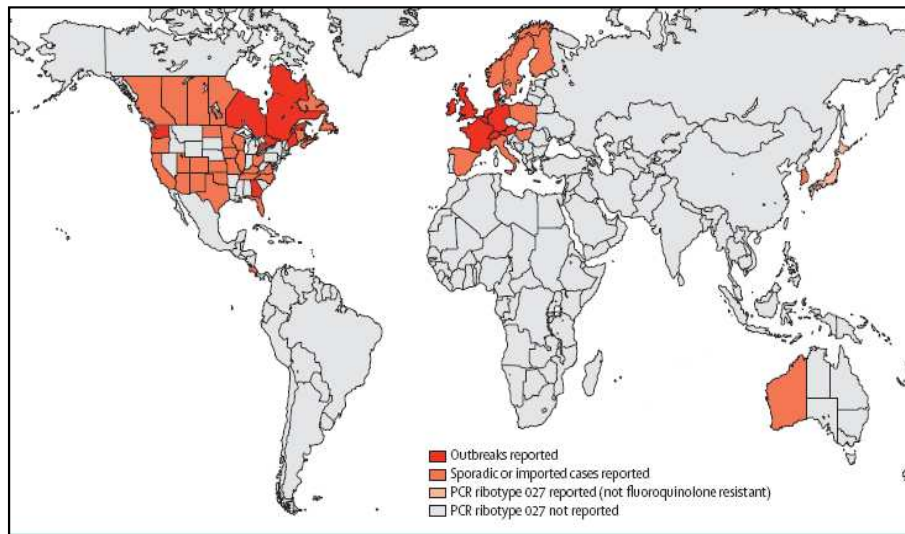
- Začátek nového tisíciletí – Kanada, USA...UK
- **Hypervirulentní ribotyp 027**
- Rizikové faktory – ATB, věk, hospitalizace, komorbidity...
- **Současnost :**
- Další šíření těžkých forem CDI
- Další epidemické virulentní ribotypy (078,001,176...) ↓
- Nové skupiny : komunita, děti, gravidní, bez ATB medikace

Number of deaths

Mortality *C.difficile* – Anglie a Wales

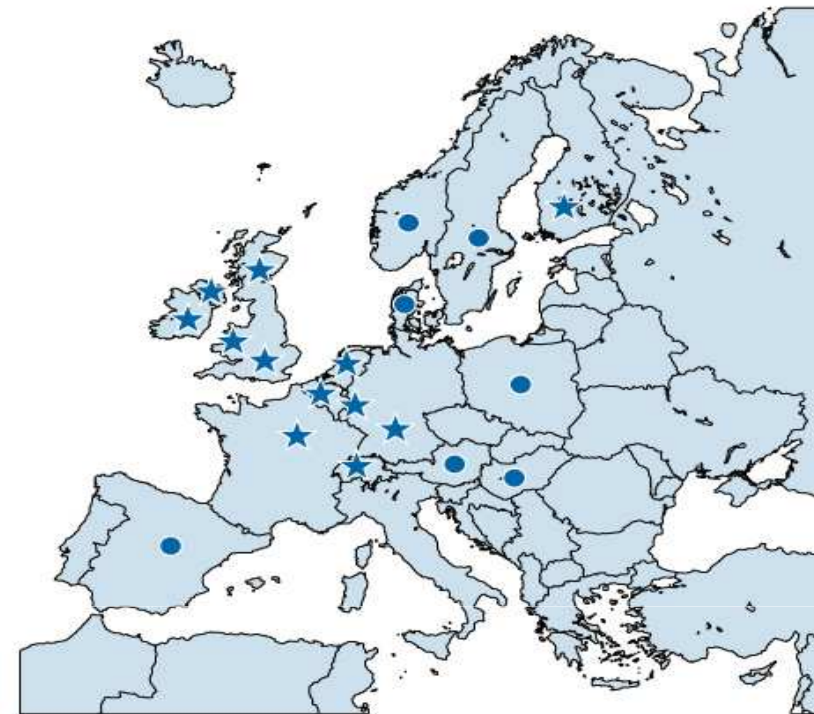


Ribotyp 027 v roce 2009



FIGURE

Distribution of *Clostridium difficile* Type 027 by country in Europe\* as of June 2008



★ Outbreaks due to Type 027      ● Sporadic cases due to Type 027

\* Not all countries have performed surveillance studies to *C. difficile* type 027 and this figure may underestimate the number of affected countries.

Eurosurveillance, Volume 13, Issue 31, 31 July 2008

# Zvířecí původ CDI ?

- Novorozená telata, prasata
- Stejné ribotypy jako u lidí - 078,027,001...
- Masné výrobky
- Koně ? Domácí mazlíčci ?
- Přenos na člověka zatím neprokázán, ale možný zdroj....



Gould H, Limbago B. *CID* 2010:051

Table 1. Summary of Findings from Studies Demonstrating the Presence of *Clostridium difficile* in Retail Foods

Country (region), product	No. of positive samples/ total no. cultured (%)	PCR ribotype
<b>United States (Arizona)</b>		
Ground beef	13/26 (50.0)	027, 078
Summer sausage	1/7 (14.3)	027
Ground pork	3/7 (42.9)	027, 078
Braunschweiger	10/16 (62.5)	027, 078
Chorizo	3/10 (30)	027, 078
Pork sausage	3/13 (23.1)	027, 078
Ground turkey	4/9 (44.4)	078
<b>Canada (Ontario, Quebec)</b>		
Ground beef	11/53 (20.8)	077, M31, 014, M26
Ground veal	1/7 (14.3)	M31
<b>Canada (nationwide)</b>		
Ground beef	10/149 (6.7)	M26, 077, J, 014, C, F, H
Veal chops	3/65 (4.6)	M26, J, K
<b>Canada (British Columbia, Saskatchewan, Ontario, Quebec)</b>		
Ground beef	14/115 (12.2)	078, 027, C
Ground pork	14/115 (12.2)	078, 027, C, E, Y
<b>Scotland</b>		
Salad	3/40 (7.5)	017, 001

# Evropský průzkum – listopad 2008

- 34 zemí
- 97 nemocnic, 109 laboratoří
- Incidence – průměr 4,1( 0,0-36,3)... **ČR 1,1**
- 509 případů, 101 úmrtí- ve 40 % prokazatelná souvislost s CDI
- 75 různých ribotypů – 014/020,078,087....
- **Ribotyp 027 prevalence jen 5 %**
- 3 % toxigenních izolátů pouze toxin B

*C.difficile* infection in Europe: a hospital based survey,  
[www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) - Lancet on line Nov 2010

# Evropský průzkum – 2008 II

- 80 % nozokomiální původ CDI
- 92 % ATB medikace v předchozích 3 měsících
  - aminopenicilin/inhibitor – 19%
  - fluorochinolony – 23 %
  - cefalosporiny – 34% ( ceftazidim 17% !)...
  - ....i.v. glykopeptidy - 7%; linkosamidy- 6%...
- 63 % > 65 let
- 16 % rekurence...

*C.difficile* infection in Europe: a hospital based survey,  
[www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) - Lancet on line Nov 2010

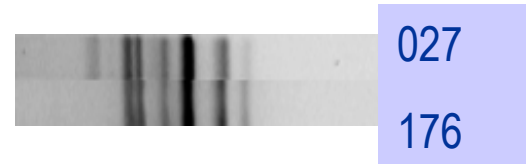


## Situace v ČR ?

- **Dílčí výsledky z panevropské studie 08 – 3 velké nemocnice ( FN u sv. Anny Brno, FN Plzeň, FN Motol Praha )**
- **7 izolátů – (ribotypy 017,023,087 )**
- **Incidence 1,1**
  
- **2009 – zvýšená incidence a závažnost CDI : východní Čechy a oblast Brna, sporadicky Č.Budějovice**
- **Neobvyklý ribotyp 176**

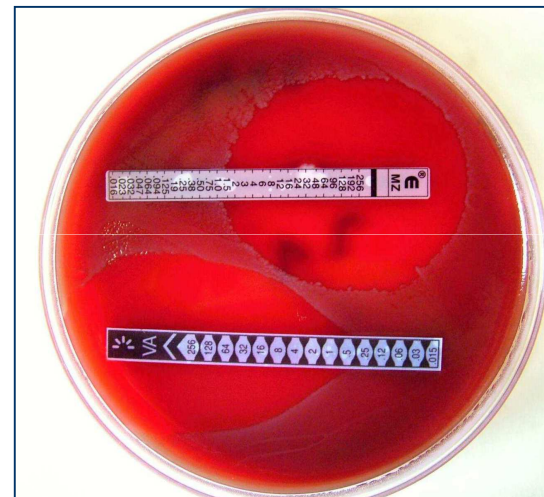
# Ribotypy 027 a 176

- Téměř shodný profil v rámci PCR ribotypizace
- Produkce binárního toxinu
- Shodná delece 18 bp (nt 117 bp) genu TcdC – negativní regulátor produkce toxinů
- *GeneXpert* (Cepheid) signalizuje oba ribotypy jako 027



# Ribotyp 176

- **Sporadický výskyt :**  
**Holandsko a Japonsko**
- **Epidemický výskyt :** **Polsko a**  
**ČR**
- **Biologicky podobné**  
**vlastnosti jako ribotyp 027**
- **Rezistence :** **erytromycin,**  
**ciprofloxacin, moxifloxacin**
- **Citlivost :** **klindamycin,**  
**vankomycin, metronidazol...**

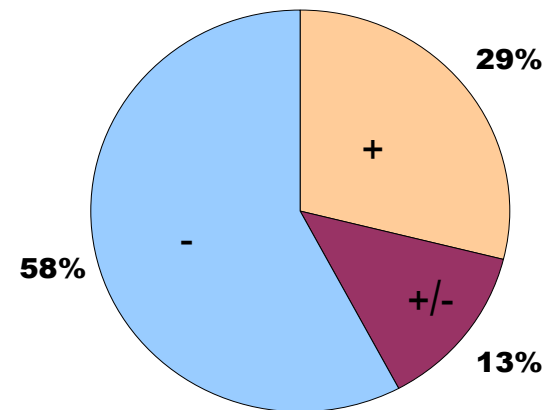


# Laboratorní diagnostika CDI v ČR – dotazník prosinec 2010

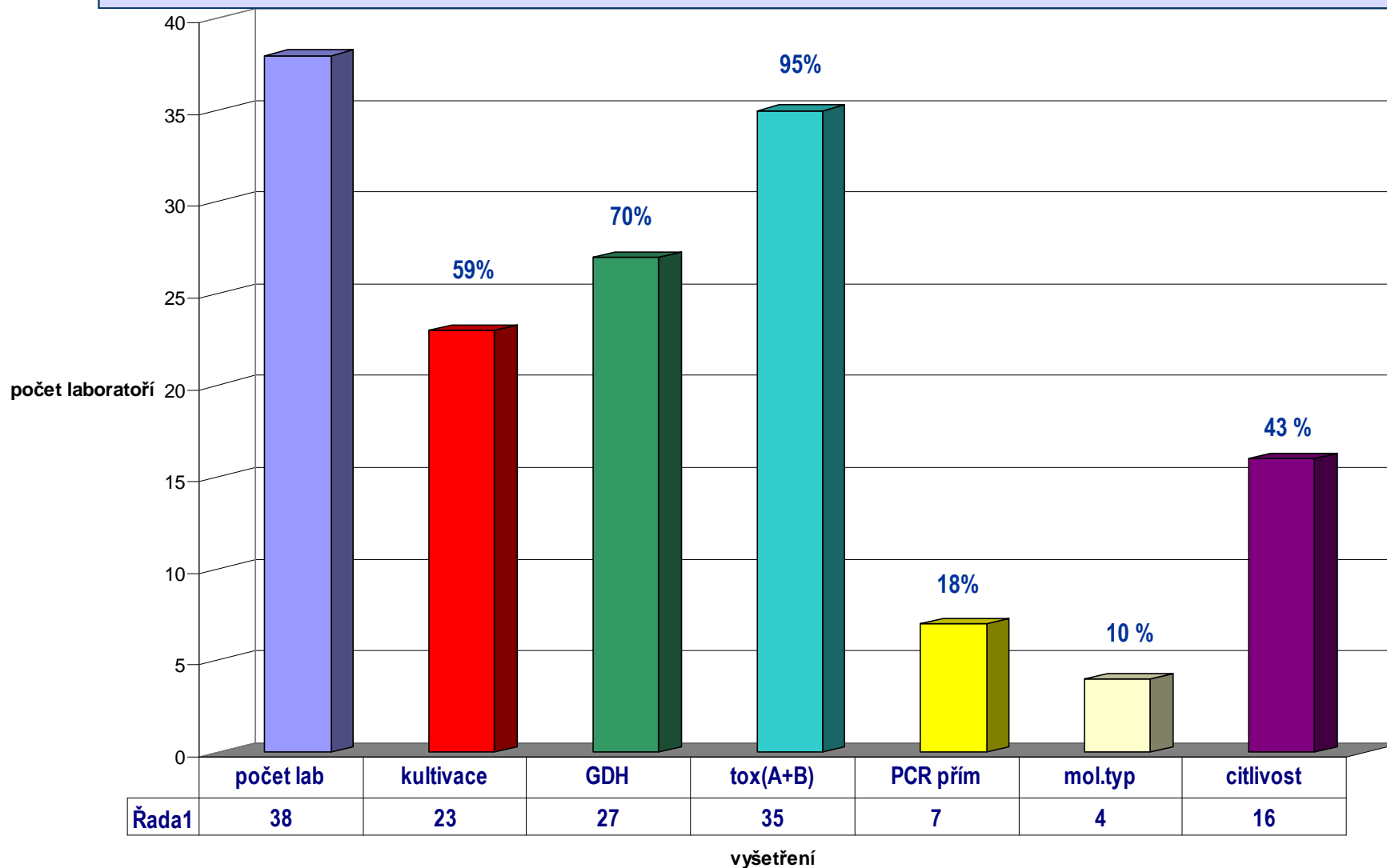
- Celkem 38 laboratoří, z toho 34 nemocničních
- Celkový počet lůžek 28 377 ?
- **Zvýšený výskyt a závažnost CDI :**
  - **11 ( 29%)**
  - nejistota 5 (14 %)

**Brno, severní Morava, východní  
Čechy**

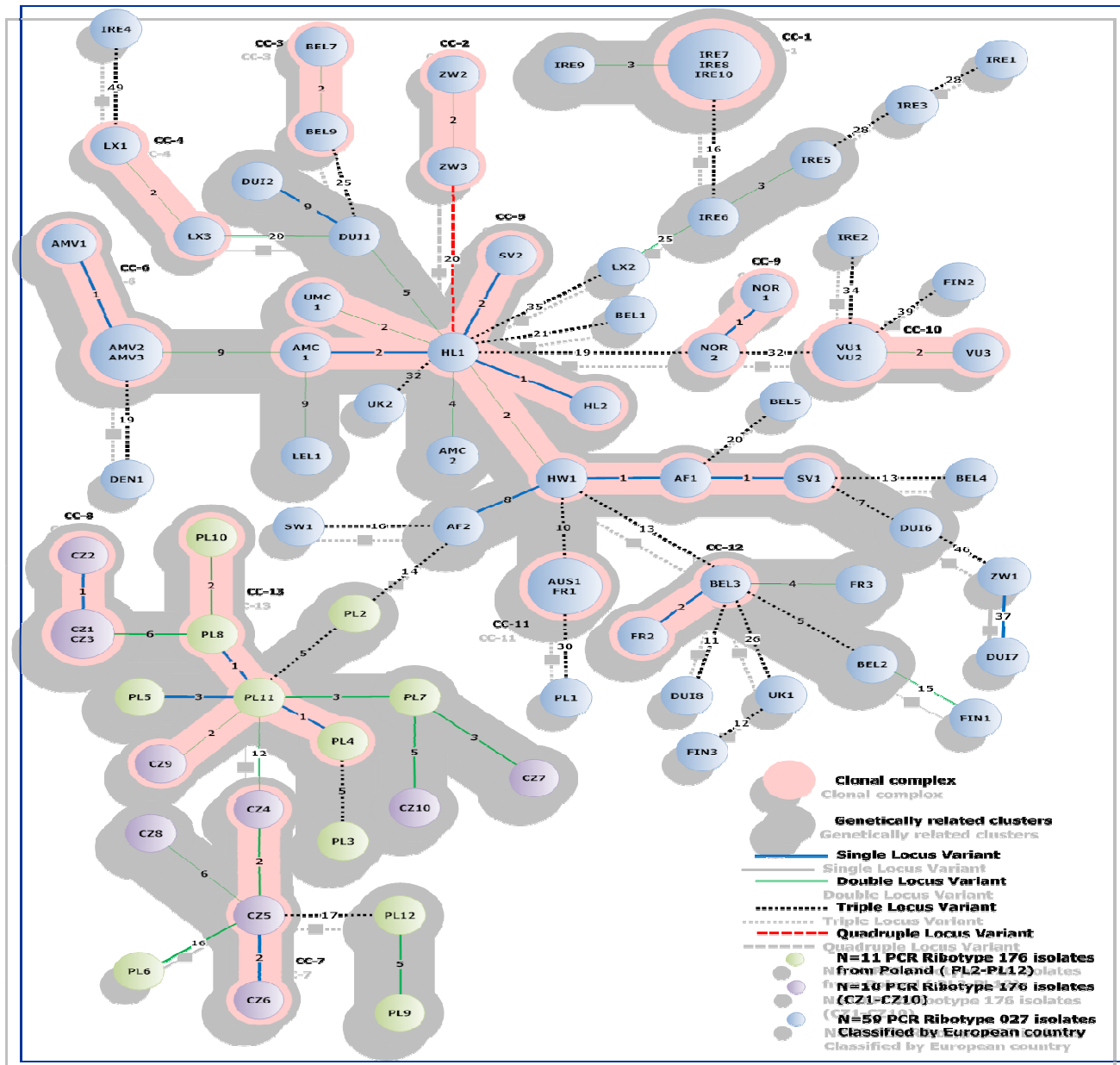
Změny v četnosti a závažnosti CDI



# Laboratorní diagnostika CDI v ČR – dotazník prosinec 2010



MLVA ribotypů  
176 (ČR a Polsko)  
a 027



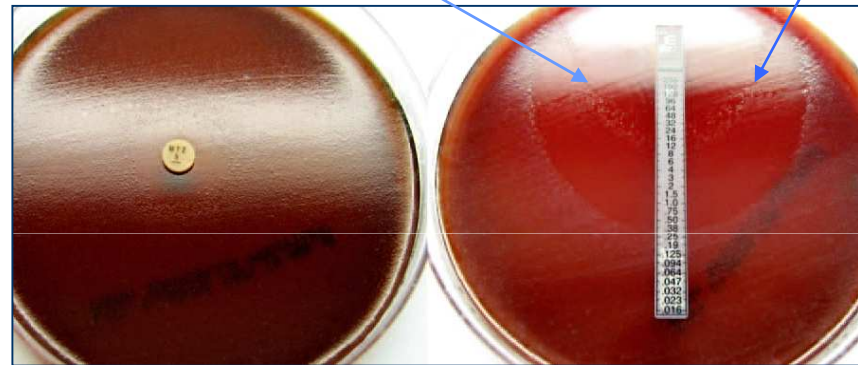
Referenční centrum pro *C.difficile* - Leiden

# CDI – rezistence léků volby ?

- Vankomycin – zcela výjimečně MIC 4 - 8 mg/l
- Ve vztahu k hladinám vázaným na p.o. podání ( stovky-tisíce mg/l) zcela nevýznamné
- Potřebujeme jiná antibiotika ??
- ( rifamixin, fidaximicin)

# Rezistence CDI k metronidazolu ?

- Heterorezistence, neznámý mechanismus
- Detekce především u čerstvých izolátů, ztráta po rozmrazení nebo pasážováním
- Korelace rezistence a terapeutického selhání neprokázána !
- 6,5 % izolátů MIC 16 – 64 mg/l – Španělsko !!



# Laboratorní diagnostika CDI - požadavky



- rychlá dostupnost výsledku
- vysoká spolehlivost
- jednoduchost
- jednoznačná interpretace
- „přijatelná“ cena

# Rizika falešně negativních a pozitivních výsledků... CDI

- Neadekvátní léčba, progresse nemoci...
- Ohrožení dalších vnímavých pacientů

- 
- Zbytečná ATB léčba
  - Riziko infekce CDI od izolovaných pacientů s CDI
  - Chybná diagnóza



# Srovnání laboratorních metod průkazu *C.difficile*

TABLE 1. Laboratory Tests for *Clostridium difficile* Infection

Test	Substance detected	Time required	Sensitivity, <sup>a</sup> %	Specificity, <sup>a</sup> %	Concerns and comments
Cytotoxin	Toxin B	1–3 days	95	90–95	Long time required and technical demands; rarely used now
Toxin culture	Toxigenic <i>C. difficile</i>	3–5 days	>95	80–90	Long time required and technical demands; rarely used in US
EIA toxin A or A/B	Toxin A or A/B	Hours	75–80	97–98	False-negative results, but rapid and not technically difficult; used by most US laboratories in 2008
EIA GDH	<i>C. difficile</i>	Hours	95–100	70–80	Some variations in reported sensitivity and nonspecificity
EIA GDH and toxin A/B	<i>C. difficile</i> and <i>C. difficile</i> toxin	Hours	95–100	97–98	Results depend on the toxin test
RT-PCR	Toxigenic <i>C. difficile</i>	Hours	>98	80–99	Nonspecificity attributed to carriers

NOTE. EIA, enzyme immunoassay; GDH, glutamine dehydrogenase; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> Reported data for sensitivity and specificity are based on multiple reports. It is assumed that 20%–30% of hospitalized patients are colonized with *C. difficile* and that 50% of strains are toxigenic. Clinical correlations are always important but are especially important with RT-PCR and EIA tests for GDH.

## Srovnání laboratorních metod průkazu *C.difficile*, podle Barlett JG, Infection Control and Hospital Epidemiology 2010, vol.31

Diagnostický test	Detekce	Doba testu	Senzitivita	Specificita	Výhody	Nevýhody
Kultivace	<i>C.Difficile</i> + Toxigenní kmen	72 hodin	> 95 %	90%	Možnost mol. typizace	Primárně neodlíší netox.kmeny, Časová prodleva
Cytotoxicita a neutr. test	Toxin B	48 hodin	90-95 %	90-95 %	Zlatý standard Detekce A-B+	Falešná pozitivita, náročná standardizace
Běžný antigen GDH (EIA)	<i>C.difficile</i>	30 – 45 min	95 - 100 %	70-80%	Jednoduchost Detekce A-B+	Neodlíší netox.kmeny, zkřížená reaktivita
ELISA (A i B)	Toxiny A + (B)	2 hodiny	70 - 80%	90-95 %	Jednoduchost	Variabilní citlivost - nespolehlivost
Real-time PCR (komerční testy)	Toxigenní <i>C.difficile</i>	cca 1 hodina	> 98 %	90- 99%	Jednoduchost vysoká citlivost+ detekce 027...	Dostupnost, interpretace

# Zlatý standard diagnostiky CDI ?

- Kultivace ?
- Cytotoxicita ?
- Nevýhody : čas, standardizace, náročnost, **rozdílná citlivost obou testů**
- **Průkaz toxigenního kmene x detekce toxinu**



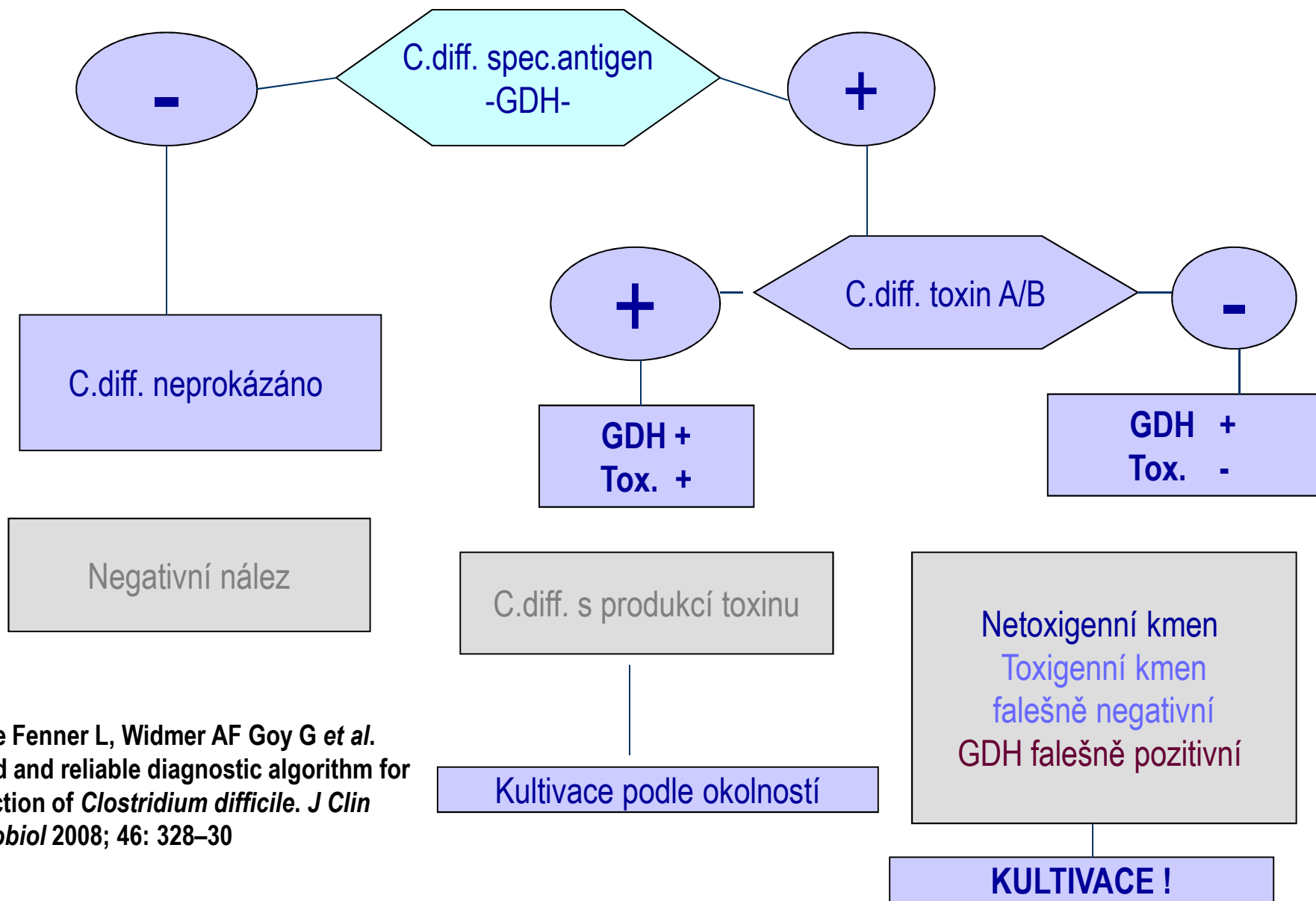
## Průkaz toxinů *C.difficile* ?

“Several recent studies in the UK, Europe and the USA have shown that current laboratory testing based on the enzyme immunoassay (EIA) detection of *C. difficile* toxins may miss up to 50% of positive patients. Mike Wren and his team support these findings, and analysis of their own data shows a 47.3% false-negative rate”

*Wren, M. (2008) (The Biomedical Scientist August 2008, 689-691)  
Clostridium difficile: toxin testing alone is not enough*

- Velká nabídka komerčních testů
- Velká variabilita v senzitivitě a specificitě
- Významné rozdíly ve výsledcích i v rámci jednoho testovacího kitu
- Zhruba každý 5 – 10. výsledek je chybný
- Opakování testů ??

## Příklad algoritmu vyšetření CDI



Podle Fenner L, Widmer AF Goy G *et al.*  
Rapid and reliable diagnostic algorithm for  
detection of *Clostridium difficile*. *J Clin*  
*Microbiol* 2008; 46: 328–30

# GDH jako „first line screening tool“ ?

## Summary of GDH sensitivities

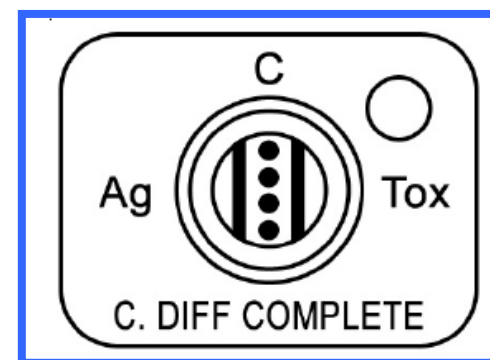
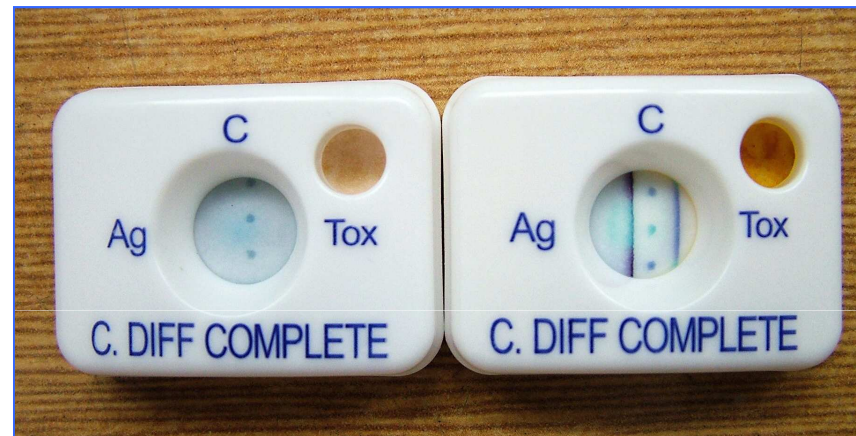
Study	Product	Sens %	NPV %
Wren et al BJS (2008) Vs Toxigenic culture <sup>(5)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	94.7	99.3
Swindells et al (2009) Vs Toxigenic Culture <sup>(11)</sup>	GDH (Techlab Quik Chek Complete)	100	100
Fenner et al (2008) Vs Culture <sup>(17)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	93.4	99.2
Fenner et al (2008) Vs Culture and/or gluD PCR <sup>(17)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	93.6	99.2
Zheng et al (2004) Vs Tissue Culture <sup>(10)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	94.2	99
Ticehurst et al (2006) Vs. C. difficile Cytotoxin <sup>(15)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	96	99.5
Goldenberg et al (2009) Vs. Toxigenic Culture <sup>(16)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	100	100
Wilcox et al (2009) Vs. Cytotoxigenic Culture <sup>(7)</sup>	GDH (Techlab C.diff Chek 60)	87.6*	98.6

A recent publication - 'Comparison of nine commercially available C.difficile toxin detection assays, a real time PCR assay for C.difficile tcdB and a GDH detection assay, with Cytotoxin testing and Cytotoxigenic culture' - stated a sensitivity of 87.6% and an NPV of 98.6% versus cytotoxigenic culture at a prevalence of 10%.

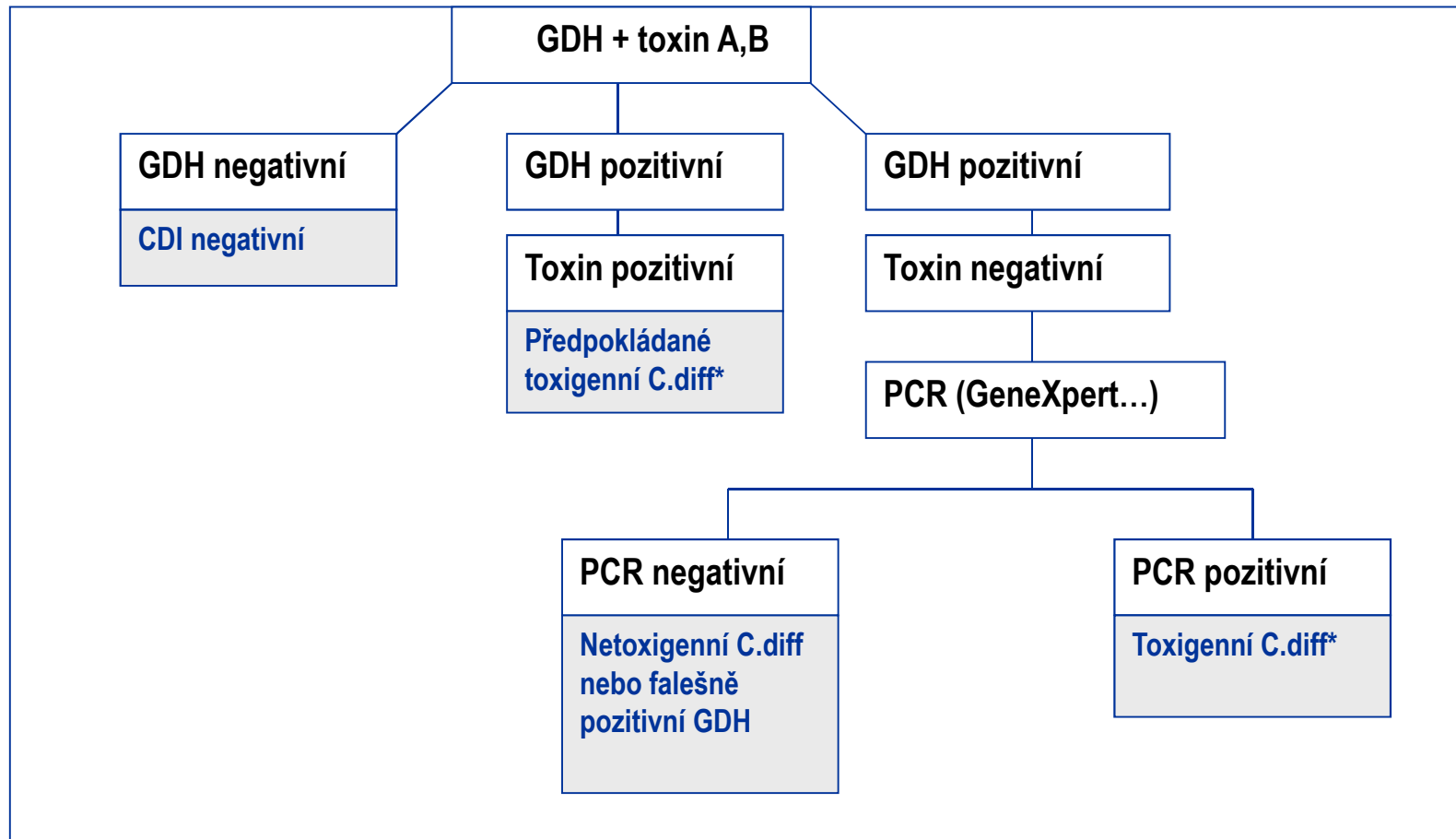
7.) Wilcox, M., Eastwood, K., Else, P. and Charlett, A. (2009)  
*Comparison of nine commercially available C. difficile toxin detection assays, a real time PCR assay for C. difficile tcdB and a GDH detection assay, with cytotoxin testing and cytotoxigenic culture*  
(J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.01082-09)

# C.DIFF QUICK CHEK COMPLETE TechLab

- Detekce GDH+ A,B toxinů
- Senzitivita průkazu toxinů cca 80- 95 %
- Výsledek do 30 minut



# Algoritmus diagnostiky *C. difficile* ve FN Motol



\* U těžkých CDI a z epidemiologických důvodů kultivace a případná molekulární typizace kmene CD

# PCR v diagnostice CDI ?

- vysoká senzitivita, maximální NPV
- specificita ?



- Nedetekuje toxin
- Možný průkaz u kolonizovaných jedinců – zejména starší populace s průjmy z jiných příčin (ATB, laxativa, noroviry...)
- Asymptomatictí nosiči po prodělané epizodě CDI ?
- Interpretace ?

# Dvoj – trojstupňové algoritmy x PCR ?

- **Rozdíly v senzitivě a specificitě nedosahují hladiny statistické významnosti...**

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 Jan;48(1):124-30

Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol. 2010 Jan;48(1):109-14

Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, Weissfeld A. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):889-93

- **Toxin EIA + GDH pouze 73% senzitivita ve srovnání s PCR u neepidemických ribotypů...**

Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, Peterson LR, Davis T, Schreckenberger P, Fang FC, Dascal A, Gerding DN, Nomura JH, Goering RV, Akerlund T, Weissfeld AS, Baron EJ, Wong E, Marlowe EM, Whitmore J, Persing DH. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. J Clin Microbiol. 2010 Oct;48(10):3719-24

**Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile*  
Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare  
Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases  
Society of America (IDSA)**

- **Průkaz toxinů metodou EIA je suboptimální metoda**
- **Preference algoritmu kombinujícího GDH s kultivací nebo průkazem cytotoxicity**
- **PCR zatím ne jako rutinní test ( chybí dostatek dat )**
- **Opakované testování v rámci jedné průjemové epizody není nutné a rutinně se nedoporučuje...**



## **Otázky ?**

- **Infekční dávka ?**
- **Limity - přípustné množství spor ?**
- **Úloha antitoxických protilátek ?**
- **Cesta přenosu – přímý kontakt, kontaminované potraviny ?**
- **Rizikové faktory v komunitě ?**

# Optimální laboratorní diagnostika CDI ?

- Trvale kontroverzní téma
- Různé referenční metody mají nestejně výsledky
- Kultivační průkaz toxigenního kmene je citlivější, ale nemusí nutně znamenat, že je lepší pro confirmaci CDI
- Průkaz cytotoxicity je citlivější k potvrzení CDI, ale měl by být confirmován kultivací + náročnost a standardizace
- komerční testy (EIA, imunochromatografie) pro průkaz toxinů jsou v současné době **nedostatečně citlivé**
- Komerční PCR pro přímý průkaz vysoce citlivé perspektivní, ale....
- Kombinace průkazu GDH s dalším testem (y) je zatím stále považováno a doporučováno jako standard





**C. DIFF**  
(Clostridium difficile)



Děkuji za pozornost

