

MUDr. Martin Novotný, PhD.

MUDr. Ján Hockicko

 Klinika infektológie a cestovnej medicíny
 Univerzitnej nemocnice L. Pasteura
 v Košiciach a UPJŠ LF Košice

Možnosti diagnostiky klostrídiovej kolidity pomocou POCT PCR v klinickej praxi

Clostridioides difficile (CD) je najčastejšou príčinou postantibiotických hnačiek a ich dôležitosť stúpa najmä v súvislosti s nozokomiálnymi infekciami. Infekcie spôsobené *Clostridioides difficile* (CDI, z angl. *Clostridioides difficile* infection) majú podľa údajov v literatúre stúpajúci trend a v období pandémie COVID-19 je tento vzostup akcelerovaný nadmernou preskripciou antibiotík. Závažnosť CDI stúpa s vekom a početnosťou recidív.

Diagnostika CDI a interpretácia výsledkov prináša v klinickej praxi veľa zložitých situácií. Relevantnosť výsledkov môže byť modifikovaná neadekvátnou indikáciou alebo nesprávnou manipuláciou so vzorkou stolice. Všeobecne platí, že na diagnostiku CDI je nutné zvoliť kombináciu minimálne dvoch diagnostických testov. Dôvodom kombinácie testov je ich rozdielna prediktívna hodnota, citlivosť a možná falošná negativita najmä pri stanovení toxínov s ohľadom na ich termolabilitu. Použitie metódy PCR komplikuje otázka kolonizácie netoxigénnymi kmeňmi CD. Vzhľadom

na tepelnú nestálosť klostrídiových toxínov by mala byť vyšetovaná stolica spracovaná bezodkladne. Ak nie je možné túto stolicu vyšetriť ihneď, mala by byť skladovaná pri teplote 5 °C.

Pri vytváraní diagnostických algoritmov možno využiť kombináciu nasledujúcich testov:

Dôkaz klostrídiového antigénu – glutamátdehydrogenáza (EIA)
 Glutamátdehydrogenáza (GDH) je špecifický exoenzým produkovaný kmeňmi CD.

Rovnako ako dôkaz toxínov je táto metóda založená zväčša na „enzyme immunoassay“ (EIA). Stanovenie GDH je ideálnym testom na vylúčenie CDI, jeho vysoká negatívna prediktívna hodnota s vysokou pravdepodobnosťou vylučuje prítomnosť CD. Zároveň na základe pozitivity GDH nie je možné odlišiť toxigénne a netoxigénne kmene CD.

Dôkaz klostrídiových toxínov A/B (EIA)
 Stanovenie toxínov metódou EIA má s prihliadnutím na ich termolabilitu nižšiu citlivosť oproti stanoveniu GDH. Pri pozitívnom výsledku ma vysokú pozitívnu prediktívnu hodnotu v stanovení CDI.

Stanovenie génov kódujúcich toxíny CD (PCR)

Real-time PCR stanovenie génov kódujúcich toxíny CD sa postupne dostáva do rutinej laboratórnej praxe a to nielen ako konfirmačný, ale aj skríningový test. Okrem extrémnej citlivosti tejto metódy (99–100 %) je výhodou rýchla dostupnosť výsledkov, poprípade stanovením typických delécií je možné určiť najčastejšie hypervirulentné kmene CD. Vysoká citlivosť testu obmedzuje jeho skríningové použitie. Test je natoľko citlivý že zachytí aj minimálne množstvo toxigénnych CD. Tento fakt znižuje jeho pozitívnu prediktívnu hodnotu. Pri skríningovom vyšetrení je nutné test kombinovať s EIA stanovením toxínov CD.



Diagnostický test	Trvanie testu	Senzitívnosť/Špecifickosť	PPH* /NPH**	Výhody	Nevýhody
Anaeróbna kultivácia	2–3 dni	90–98 % / 91 %	– % –	Určenie ATB citlivosti, možnosť ďalšej molekulárnej typizácie	Kolonizácia vs. infekcia trvanie testu
Stanovenie cytotoxicity na tkanivových kultúrach / neutralizačný test	2 dni	80–100 % / 93–97 % 65–90 % / 96–100 %	57–91 % / 87–97 % 50–87 % / 97–99 %	Historický význam	Riziko falošnej pozitivity, náročnosť, trvanie testu
EIA Stanovenie klostrídiového antigénu – glutamátdehydrogenázy (GDH)	15–45 minút	87–100 % / 76–98 %	71–91 % / 97–100 %	Jednoduchosť a rýchlosť testu. Vysoká NPV*	Kolonizácia vs. infekcia
EIA Stanovenie klostrídiových toxínov A a B	2 hod.	40–100 % / 84–100 %	50–100 % / 78–99 %	Jednoduchosť a rýchlosť testu, Vysoká PPV**	Obmedzená citlivosť
Real-time PCR stanovenie génov kódujúcich toxíny A/B	60–120 minút	83–100 % / 87–98 %	46–94 % / 96–100 %	Vysoká citlivosť	Kolonizácia vs. infekcia Znížená PPV**
POCT Real-time PCR stanovenie génov kódujúcich toxíny A/B	do 25 minút	88–96 % / 94–97 %	46–94 % / 86–100 %	Rýchlosť testu Dostupnosť Vysoká citlivosť	Kolonizácia vs. infekcia Znížená PPV**

> Tabuľka 1: Prehľad jednotlivých laboratórnych metód používaných v diagnostike CDI^{1,2}

Dôkaz GDH alebo PCR ^a	Dôkaz toxínov A a B (EIA)	Interpretácia výsledkov
pozitívny	pozitívny	Vysoká pravdepodobnosť CDI. Nutná izolácia a liečba CDI.
pozitívny	negatívny	Suspektná CDI. Pri interpretácii výsledkov nutné zohľadniť anamnézu pacienta a ostatné laboratórne výsledky. Vhodná izolácia a podľa závažnosti ochorenia začať empirickú liečbu. Pre potvrdenie diagnózy je vhodné doplniť kultiváciu stolice na <i>C. difficile</i> , alebo zväziť rektoskopiu.
negatívny	pozitívny	Pravdepodobne ide o laboratórnu chybu. Je vhodné zopakovať vyšetrenie.
negatívny	negatívny	CDI laboratórne vylúčená, nutné hľadať iný zdroj ťažkostí.

> Tabuľka 2: Příklad algoritmu diagnostiky *C. difficile* v stolici a interpretácia nálezov podľa Českého odporúčaného postupu pre diagnostiku a liečbu kolidity spôsobenej CD (^a GDH – glutamátdehydrogenáza; PCR – dôkaz génov pre tvorbu toxínov A a B.)

Anaeróbna kultivácia CD

Kultivácia CD je prístrojovo, časovo a finančne náročná metóda. Tvorba spór CD vytvára priestor na kultiváciu po ich vyklíčení aj po dlhšom čase. Konfirmáciu kultivačného nálezu možno realizovať množstvom metód od latex aglutinačných cez biochemické, až k moderným metódam ako MALDI-TOF alebo PCR. Náročnosť tohoto

procesu predurčuje kultiváciu CD na konfirmačný test, nie ako skríningový. Výhodou kultivácie je možnosť stanovenia citlivosti CD na antibiotiká.

Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach

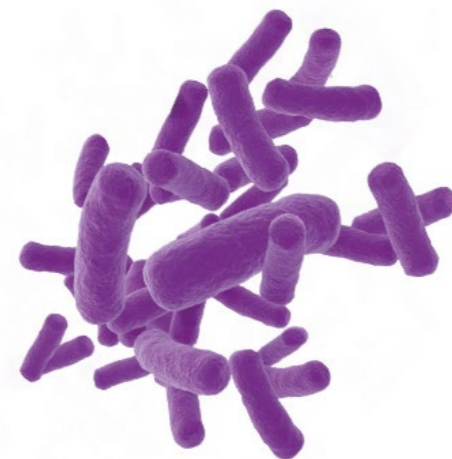
Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach je konfirmačným vyšetrením v malom

množstve laboratórií vzhľadom na náročnosť metódy nielen z pohľadu vybavenia laboratória, ale aj hodnotenia výsledkov.

Stratégia diagnostiky CDI

Každá z metód popísaných vyššie má svoje výhody a zároveň svoje slabiny. Vytvorené algoritmy diagnostiky CDI kombinujú jednotlivé metódy so snahou maximálne využiť

silné stránky testov a zároveň eliminovať ich slabiny. Zo správnej kombinácie testov profituje nielen pacient, ale aj zdravotnícke zariadenie liečiace pacienta. Pri tvorbe algoritmov zohráva dôležitú úlohu nielen presnosť výsledku, cena testu, ale aj doba dostupnosti výsledku. Skúšky cytotoxicity a kultiváciu CD s ohľadom na časovú náročnosť možno použiť len na doplnkovú – rozšírenú diagnostiku. Real-time PCR bola donedávna ťažšie dostupná a drahá metóda, čo ju významne eliminovalo pri jej použití v algoritmoch diagnostiky CDI. Posledné obdobie sme svedkami nevidaného pokroku pri použití molekulárnych metód v medicínskej praxi, čo nám poskytuje priestor na častejšie použitie PCR v diagnostike CDI. Dostupnosť POCT PCR v praxi významne znižuje časové okno na potvrdenie pravdepodobnej infekcie CDI.



identifikácii pacienta s infekčnou chorobou a správnom manažmente pacienta vrátane karanténnych opatrení.

Extrémna citlivosť POCT real-time PCR je výhodou aj slabosťou tejto metodiky. Ako je uvedené v tabuľke 1, PCR diagnostika má vyššiu citlivosť oproti stanoveniu GDH. PCR dokáže zachytiť už minimálny počet toxigénnych kmeňov CD, a tak je na jednoznačné potvrdenie CDI nutné doplniť aj vyšetrenie toxínov EIA. Pri použití iba PCR testu bez doplnujúceho testu podľa algoritmov sme

vystavení riziku falošnej pozitivity na podklade kolonizácie tráviaceho traktu CD. U pacienta s pozitívnou PCR, ale negatívnym toxínom, je nutné v diagnostike CDI zohľadniť aj klinický stav pacienta, rizikovú anamnézu a laboratórny nález, poprípade zväžiť rektoskopické vyšetrenie.

Priemerná dostupnosť laboratórnych výsledkov je za ideálnych podmienok menej ako 18 hodín. Moderné POCT prístroje dokážu stanoviť výsledok vrátane odberu do pol hodiny. Praktické trvanie testu však

závisí od organizácie práce pracoviska, množstva zaškoleného personálu a umiestnenia prístroja. Pri použití v ambulancii je popisovaný čas najkratší.

Problém ekonomickej výhodnosti POCT PCR je nutné analyzovať nielen z pohľadu jednotkovej ceny testu, ale najmä vo vzťahu k umiestneniu POCT PCR v algoritme diagnostiky. Trojstupňový algoritmus (GDH + Toxín EIA+PCR) je ekonomicke nevýhodný, a oproti dvojstupňovému s PCR testom (PCR + toxín EIA) významne nezvyšuje citlivosť algoritmu. V porovnaní dvojstupňových algoritmov s PCR (PCR + toxín EIA + PCR) a bez neho (GDH + toxín EIA), je test z ekonomickeho pohľadu výhodnejší, avšak menej senzitívny. Finančná výhoda pri skorej diagnostike s nastavením adekvátnej liečby karanténnych opatrení so zabránením ďalších nozokomiálnych nákaz bola publikovaná v množstve prác. Jednoduchá obsluha a skorá dostupnosť výsledku významne zjednodušuje určenie správnej diagnózy liečby a ďalšieho postupu.

Aj z našej praktickej skúsenosti pri validácii metodiky cobas® Cdiff Nucleic acid test

pre cobas® Liat® System sme sa presvedčili o vysokej citlivosti testu. Vyšetřili sme 6 pacientov s prítomnými hnačkami po liečbe antibiotikami. Všetkým pacientom bol súčasne realizovaný dôkaz GDH a klostrídiových toxínov imunoenzymaticky. Zo 6 vyšetření bola CDI vylúčená u 2 pacientov (negatívne POCT PCR, súčasne negatívne GDH a dôkaz toxínov EIA), u 2 bola s PCR pozitívou potvrdená pozitívita GDH aj toxínov EIA. U 2 pacientov sme CDI suponovali s ohľadom na klinickú symptomatológiu a typický laboratórny nález, pričom imunoenzymatické vyšetřenie toxínov bolo opakovane negatívne. POCT PCR bolo u oboch pozitívne, pričom u jedného pacienta bola CDI verifikovaná aj rektoskopickým vyšetřením. Po nasadení liečby vankomycínom došlo u všetkých 4 pacientov k zlepšeniu stavu, zníženiu frekvencie hnačiek a poklesu zápalovej aktivity.

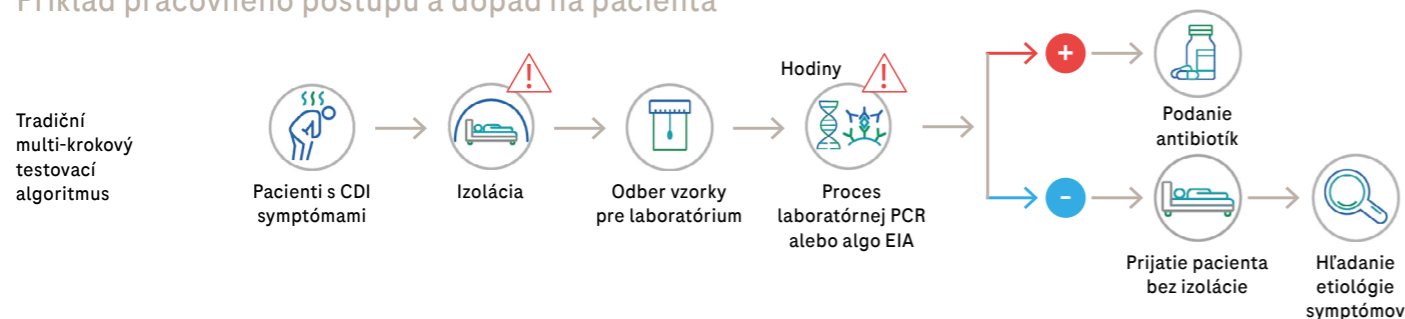
Skorá a správna identifikácia nie je kľúčová len pri ochorení COVID-19, ale aj pri CDI. Pri zavádzaní metodiky do praxe je preto nutné zohľadniť nielen citlivosť testu, ale aj rýchlosť dostupnosti výsledku. Na základe skorého určenia správnej diagnózy, adekvátnej liečby a karanténnych opatrení vychádza

na prvý pohľad drahšia metodika nakoniec ako výhodnejšia, s významnou úsporou finančných nákladov.

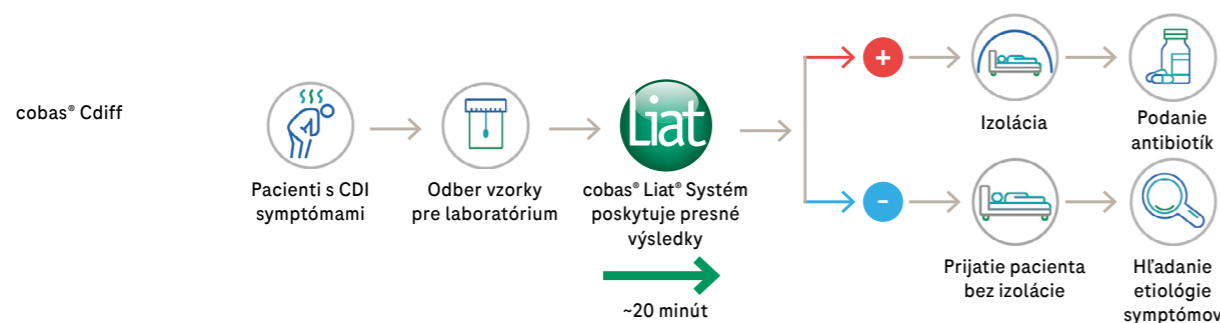


MUDr. Martin Novotný, PhD.
Klinika infekčológie a cestovnej medicíny Univerzity nemocnice L. Pasteura v Košiciach a UPJŠ LF Košice
Kontakt: martin.novotny@unlp.sk
Zastupca prednostu a VŠ učiteľ Kliniky infekčológie a CM UNLP a UPJŠ LF v Košiciach. Absolvent Lekárskej Fakulty UPJŠ v Košiciach je členom Infektologickej spoločnosti SLS. V odbore infekčológie sa špecializuje na diagnostiku a liečbu infekcií spôsobených Clostridioides difficile, so zameraním na transplantáciu fekálnej mikrobioty a jej implementáciu do bežnej praxe. Svoj voľný čas venuje najmä rodine, manželke a dvom synom.

Príklad pracovného postupu a dopad na pacienta



Spoliehajú sa na rýchle a presné výsledky z cobas® Cdiff, sú teraz zdravotnícki pracovníci schopní zefektívniť diagnostiku CDI, aby sa znížila zbytočná izolácia, empirické používanie antibiotík a iniciovali sa vhodné opatrenia na kontrolu infekcie.



Test cobas® Cdiff je in vitro zdravotnícky prostriedok pro použití v systému cobas® Liat®. Test je automatizovaný, kvalitativní a využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) v reálném čase pro detekci genu pro toxin B (tcdB) toxigenního Clostridioides difficile (C. difficile) v neformovaných (tekutých nebo měkkých) vzorcích stolice, získaných od pacientů s podezřením na infekci C. difficile (CDI). Test nukleových kyselin cobas® Cdiff v kombinaci s analyzátořem cobas® Liat® je určen k použití jako pomůcka při diagnostice CDI u lidí ve spojení s klinickými a epidemiologickými rizikovými faktory. Analytická citlivost je 45 až 90 CFU/stěr v závislosti na izolátu. Určeno k použití odborníky ve zdravotnictví.

Literatúra

- > BENEŠ, Jiří, Petr HUSA a Otakar NYČ. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané Clostridium difficile. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. Praha: Trios s.r.o., 2012, roč. 18, č. 5, s. 160-167. ISSN 1211-264X. <https://www.infekce.cz/dpCDI14.htm>.
- > Via practica. Supplement . Odporúčaný postup diagnostiky a liečby kolitidy spôsobenej Clostridium difficile. - ISSN 1336-930X. - Bratislava : SOLEN, 2015. - Roč. 12, supl. S1 (2015), s. 4-11.
- > Boly FJ, Reske KA, Kwon JH. The Role of Diagnostic Stewardship in Clostridioides difficile Testing: Challenges and Opportunities. Curr Infect Dis Rep. 2020 Mar;22(3):7. doi: 10.1007/s11908-020-0715-4. Epub 2020 Feb 17. PMID: 33762897; PMCID: PMC7987129.
- > Krehelová M, Sinajová E: Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných Clostridium difficile. Newslab, 2018; roč. 9 (2): 86 – 90
- <https://www.newslab.sk/moznosti-laboratornej-diagnostiky-infekcii-vyvolanych-clostridium-difficile/>.
- > Goldenberg SD, Bisnauthsing KN, Patel A, Postulka A, Wyncoll D, Schiff R, French GL. Point-of-Care Testing for Clostridium Difficile Infection: A Real-World Feasibility Study of a Rapid Molecular Test in Two Hospital Settings. Infect Dis Ther. 2014 Dec;3(2):295-306. doi: 10.1007/s40121-014-0038-6. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25205503; PMCID: PMC4269636.
- > Jones WS, Rice S, Power HM, Maniopoulos G, Suklan J, Beyer F, Wilcox MH, Permain M, Simpson AJ, Price DA, Allen AJ. Cost Consequences for the NHS of Using a Two-Step Testing Method for the Detection of Clostridium difficile with a Point of Care, Polymerase Chain Reaction Test as the First Step. Diagnostics (Basel). 2020 Oct 14;10(10):E819. doi: 10.3390/diagnostics10100819. PMID: 33066456; PMCID: PMC7602277.