

Tartalom:

***Clostridium difficile* infekció (CDI) Magyarországon; diagnosztika, epidemiológia munkaértekezlet programja (Budapest, 2015. április 9.)**

Történeti áttekintés, a „CDI Europe” céljai és az elért eredmények (eredeti prezentáció)

Nagy Erzsébet

***Clostridium difficile* fertőzés – evidenciákon alapuló általános tudnivalók – hogyan gondolkodjunk?**

Rákóczi Éva

A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei

Urbán Edit

***Clostridium difficile*: a hazai laboratóriumi diagnosztika felmérése 2014-ben**

Pászti Judit

A *Clostridium difficile* infekciók hazai járványügyi helyzete a surveillance jelentések alapján

Kurcz Andrea, Hajdu Ágnes, Szőnyi Katalin, Strupka Veronika, Nyolczas Szilvia

Hazai tipizálási adatok 2000 és 2010 között

Terhes Gabriella, Nagy Erzsébet, Urbán Edit

Egy 2014-es hazai felmérés eredménye „capillary gel electrophoresis-based” PCR ribotipizálás módszer alkalmazásával

Tóth Judit, Fekete Eszter, Terhes Gabriella, Indra Alexander Pecavar Verena, Kaltenecker Borbála, Benczik Márta, Urbán Edit, Osztie Hilda, Latkóczy Krisztina, Nagy Erzsébet

A rendezvény fővédnöke: Astellas Pharma Kft.

***A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának támogatói:
Biolab Zrt., Biomedica Hungária Orvostechnikai Kft.,
bioMérieux Hungária Kft., Buda Labor Kft.,
Chemium Kft., Diagnosticum Zrt.***



Kiadja: Országos Epidemiológiai Központ

A kiadó és a szerkesztőség székhelye: 1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.

Alapító szerkesztők:

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Dr. Visontai Ildikó

Szerkesztő:

Dr. Csire Márta (Ph.D.)

Dr. Tirczka Tamás

Dr. Tóth Ákos (Ph.D.)

Technikai szerkesztő:

Ertlne Czinege Ildikó

Huszár Csilla

Olvasó szerkesztő:

Dr. Gacs Mária

Készült az Országos Tisztifőorvosi Hivatal nyomdájában
180 példányban

Nyomdavezető: Novák Anikó

ISSN 2063-9805 (Nyomtatott)

ISSN 2063-9813 (Online)



PROGRAM

Clostridium difficile infekció (CDI) Magyarországon; diagnosztika, epidemiológia

Munkaértekezlet mikrobiológusok, epidemiológusok részére az *Országos Epidemiológiai Központ (OEK)* és a *SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet* közös szervezésében

Budapest 2015. április 9. 10.00-16.00

Helyszín: Budapest, Albert Flórián út 2-6. A épület Nagy tanterem

Levezető elnökök: Nagy Erzsébet, Pásztai Judit

10.00-10.30 Történeti áttekintés, a "CDI Europe" céljai és az elért eredmények
Nagy Erzsébet (*SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged*)

10.30-11.00 A CDI klinikuma. Mikor kér a klinikus vizsgálatot
Rákóczi Éva (*Kenézy Kórház Debrecen*)

11.00-11.30 Mikrobiológiai módszerek a diagnosztikában a tenyésztéstől a PCR-ig
Urbán Edit (*SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged*)

11.30-12.00 A magyarországi laboratóriumok CDI diagnosztikájáról készült 2014-es felmérés eredményei
Pásztai Judit (*OEK, Budapest*)

12.00-13.00 Szünet (büfé, kiállítók megtekintése)

13.00-13.30 Hazai epidemiológiai helyzet
Kurcz Andrea (*OEK, Budapest*)

13.30-14.00 Hazai tipizálási adatok 2000-2011 között - Terhes Gabriella (*SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged*)

Hazai tipizálási adatok 2011-2014 között - Pásztai Judit (*OEK, Budapest*)

Egy 2014-es hazai felmérés eredménye „capillary gel electrophoresis-based” PCR ribotipizálás módszer alkalmazásával - Tóth Judit, Fekete Eszter, Pecavar Verena, Indra Alexander, (*SYNLAB, Budapest, SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged, AGES Bács*)

14.00-14.30 Terápiás lehetőségek a probiotikumoktól a széklet transzplantációig
Fried Katalin (*Szent László Kórház, Budapest*)

14.30-15.30 Megbeszélés (kérdések, megjegyzések)

15.30-16.00 Konklúziók:

Hazai diagnosztikus algoritmus a CDI gyanúja esetén (Nagy Erzsébet)

Jelentési rendszer 2015-től (Kurcz Andrea)

A tipizáló laboratórium elvárásai (Barna Zsuzsanna, Pásztai Judit)

Laboratóriumi surveillance tervezése, ütemezése (Kurcz Andrea, Barna Zsuzsanna, Pásztai Judit)

Történeti áttekintés, a “CDI Europe” céljai és az elért eredmények

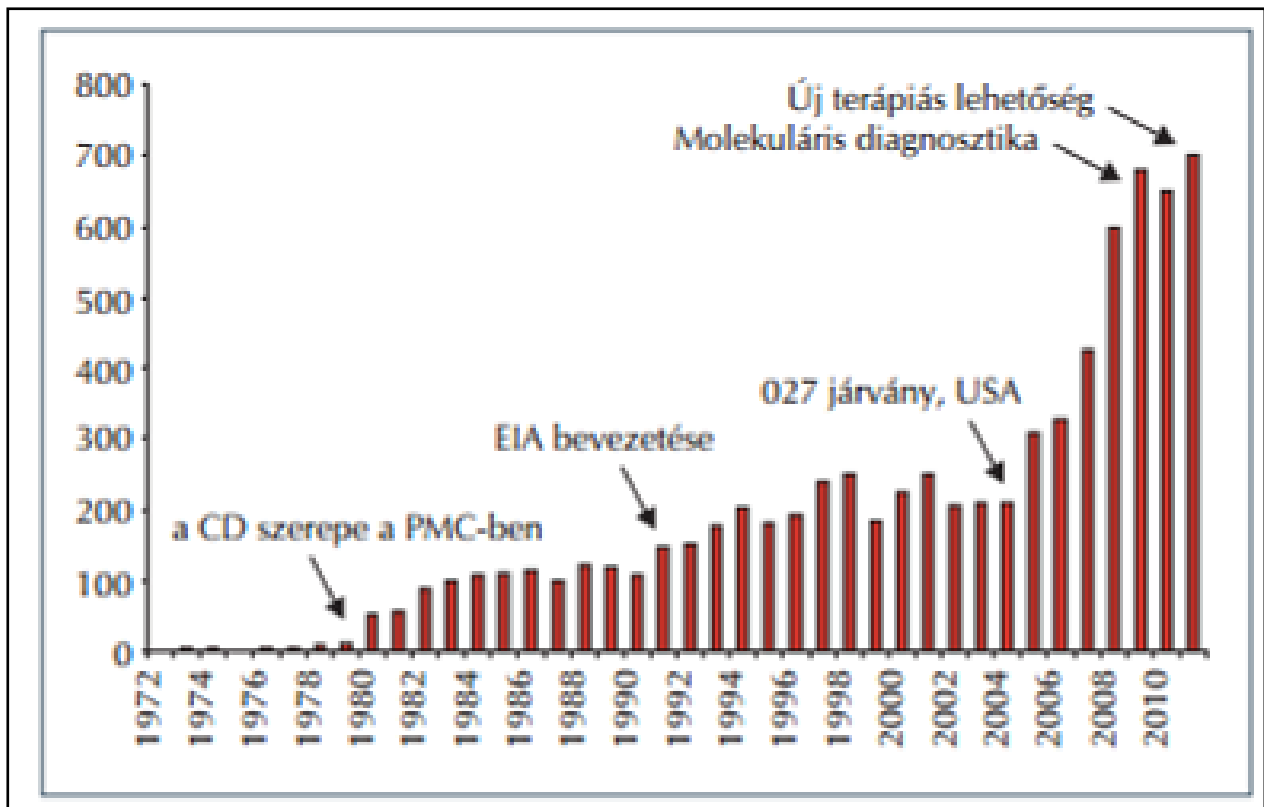
Nagy Erzsébet

SZTE, ÁOK, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet,
Szeged
Anaerob Baktériumok Nemzeti Referencia Laboratóriuma
(„De facto”)



Munkaértekezlet (Budapest, 2015. április 9.)

A *C. difficile* témájú tudományos publikációk száma évente a jelentősebb diagnosztikus vagy terápiás fejlesztések tükrében



(Web of science, key word: *C. difficile*) PMC: pseudomembranosus colitis; LAM 2014;24 (1–2):25–33

- Nagy E, Várkonyi A, Gacs M, Réthy I: *Clostridium difficile* okozta hasmenések előfordulása **újszülött és gyermekkorban**. Magyar Pediáter 20, 141-142 (1985)
- Nagy E, Fodor E, Rózsa J, Deák J, Földes J: *Clostridium difficile* citotoxikus antigénjének kimutatása **szendvics ELISA módszerrel**. Egészségtudomány 33, 155-161 (1989)
- Nagy E, Földes J: Electron microscopic investigation of **lysogeny of *Clostridium difficile*** strains isolated from antibiotic-associated diarrhoea cases and from healthy carriers. APMIS 99, 321-326 (1991)
- Terhes G, Urbán E, Sóki J, Hamid KA, Nagy E: **Community-acquired *Clostridium difficile*** diarrhoea caused by binary toxin, toxin A and toxin B gene-positive isolates in Hungary. Journal of Clinical Microbiology 42: 4316-4318 (2004)
- Terhes G, Urbán E, Sóki J, Szikra L, Konkoly-Thege M, Vollain M, Nagy E: Assessment of **changes in the epidemiology** of *Clostridium difficile* isolated from diarrhoeal patients in Hungary. Anaerobe 15: 237-40 (2009)
- Terhes G, Urban E, Sóki J, Nacsá E, Nagy E: Comparison of a rapid molecular method, the **BD GeneOHm Cdiff assay** to the most frequently used laboratory tests for detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in diarrhoeal feces. J Clin Micro 47: 3478-3481 (2009)
- Urbán E, Terhes G, Markotics A, Sóki J, Nagy E: **Rare extraintestinal infection** caused by toxin-producing *Clostridium difficile* Anaerobe 16: 301-303 (2010)

- Vonberg R.P. *et al.*: Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. CMI (suppl 5):12-20 (2008)
- Kuijper EJ, *et al.*: Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008 Euro Surveill 2008; 13: pii:18942
- Spigaglia P, *et al.*: Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 66: 2227-2234 (2011)
- Bauer MP, *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 377: 63-73 (2011)
- Becher SM, Novak-Weekly, Nagy E: Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections: there is a light at the end of the colon. CID 57: 11-75-81 (2013)

- 2012 óta az OEK átvette a *C. difficile* referencia laboratórium szerepet (tipizálás)
- Ennek két oka volt
 - Az ECDC felé történő járványügyi jelentési kötelezettség
 - Az SZTE KMDI forráshiánya országos tipizálási feladatok ellátására
- Ennek megfelelően az EUCLID felmérést az OEK szervezte (publikáció 2014)

Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID)

2014

Kerrie A Davies, Christopher M Longshaw, Georgina L Davis, Emilio Bouza, Frédéric Barbut, Zsuzsanna Barna, Michel Delmée, Fidelma Fitzpatrick, Kate Ivanova, Ed Kuijper, Ioana S Macovei, Silja Mentula, Paola Mastrantonio, Lutz von Müller, Mónica Oleastro, Efthymia Petinaki, Hanna Pituch, Torbjörn Norén, Elena Nováková, Otakar Nyč, Maja Rupnik, Daniela Schmid, Mark H Wilcox

Interpretation A wide variety of testing strategies for *C difficile* infection are used across Europe. Absence of clinical suspicion and suboptimum laboratory diagnostic methods mean that an estimated 40000 inpatients with *C difficile* infection are potentially undiagnosed every year in 482 European hospitals.

In conclusion, findings of the EUCLID study highlight the large variation and inconsistencies in diagnosis of *C difficile* infection across Europe (panel). Many surveillance systems rely on the reported rate of *C difficile* infection without accounting for the underlying diagnostic methods.^{529,30} Diagnosis of *C difficile* infection should be standardised, not only to ensure that data within and between countries can be compared meaningfully but also so that prevention and control resources are directed appropriately.

Konklúzió

McDonald *et al.*, EID 2006 12:409-415.

Increase in *Clostridium difficile*-related Mortality Rates, United States, 1999-2004

Matthew D. Redelings,* Frank Sorvillo,*† and Laurene Mascola*

Table. Demographic characteristics of patients with *Clostridium difficile*-related deaths, United States, 1999-2004

Demographic group	<i>C. difficile</i> -related deaths, no. (%)	Age-adjusted mortality rate/million population
Sex		
Female	12,488 (80)	11.8
Male	6,174 (40)	12.7
Race/ethnicity		
White	18,534 (90)	12.9
Hispanic	602 (3)	7.2
Black	1,304 (6)	9.3
Asian/Pacific Islander	139 (1)	3.6
American Indian/Alaska Native	63 (<1)	7.9
Age group, y		
<1	17 (<1)	0.7*
1-4	11 (<1)	0.1*
5-14	12 (<1)	0.1*
15-24	24 (<1)	0.1*
25-34	62 (<1)	0.3*
35-44	171 (1)	0.8*
45-54	464 (2)	2.0*
55-64	1,159 (6)	7.6*
65-74	3,238 (16)	29.3*
75-84	7,859 (38)	104.0*
>85	7,623 (37)	287.1*
Total	20,642	12.2

*This statistic is not age-adjusted because it only pertains to 1 age group.

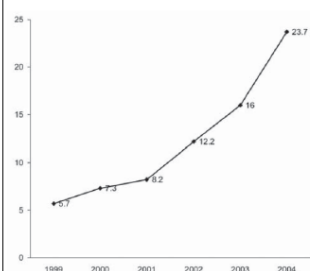
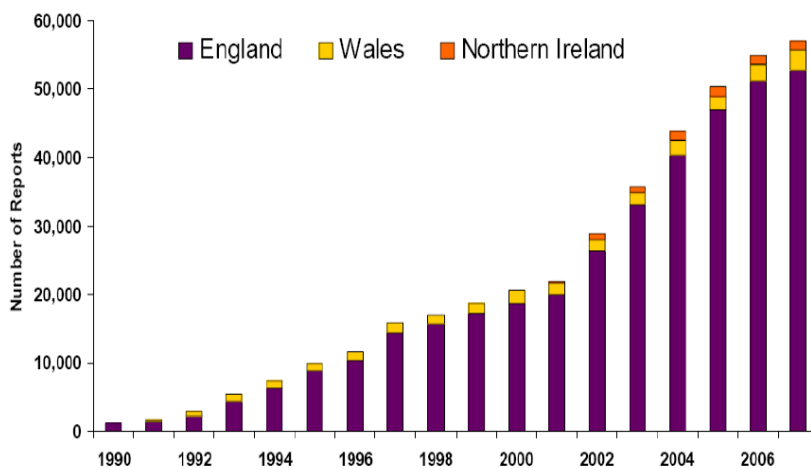


Figure. Yearly *Clostridium difficile*-related mortality rates per million population, United States, 1999-2004.

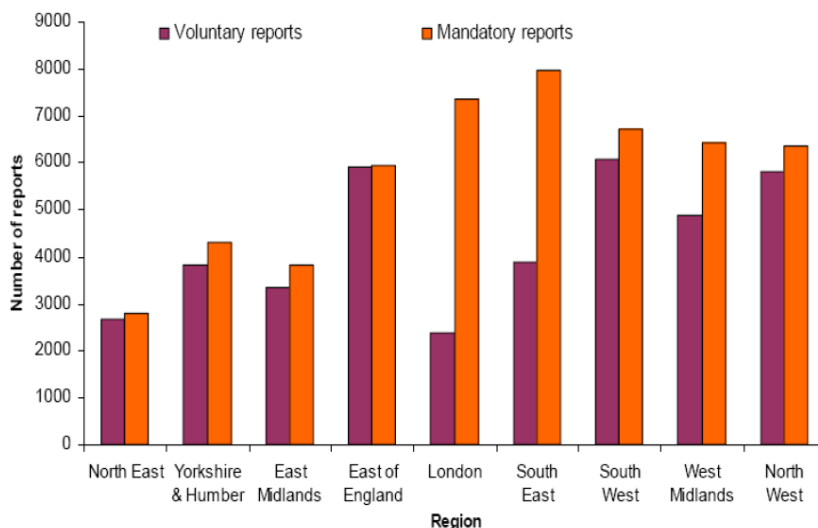
C. difficile okozta, bejelentett hasmenéses esetek száma az Egyesült Királyságban



Kötelező jelentés rendszere 2007-ben indult

www.hpa.org.uk

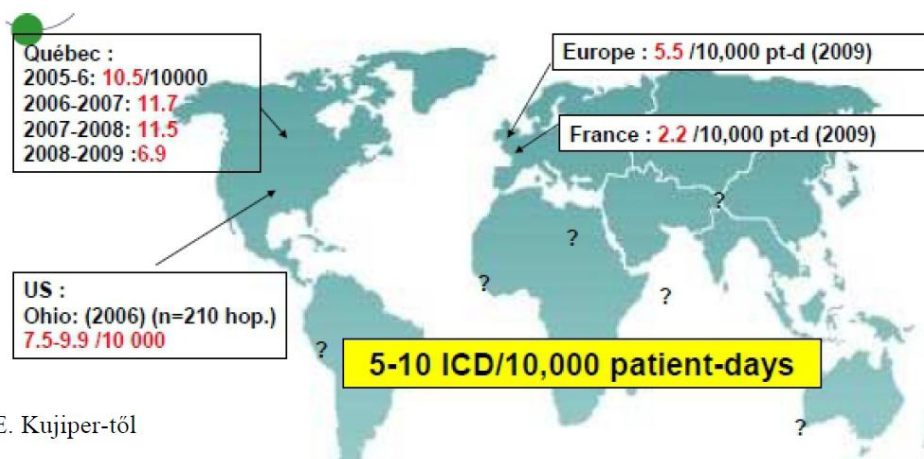
C. difficile okozta, bejelentett hasmenéses esetek száma az Egyesült Királyságban



Kötelező jelentés rendszere 2007-ben indult

www.hpa.org.uk

C. difficile infekció előfordulása a világ különböző országaiban



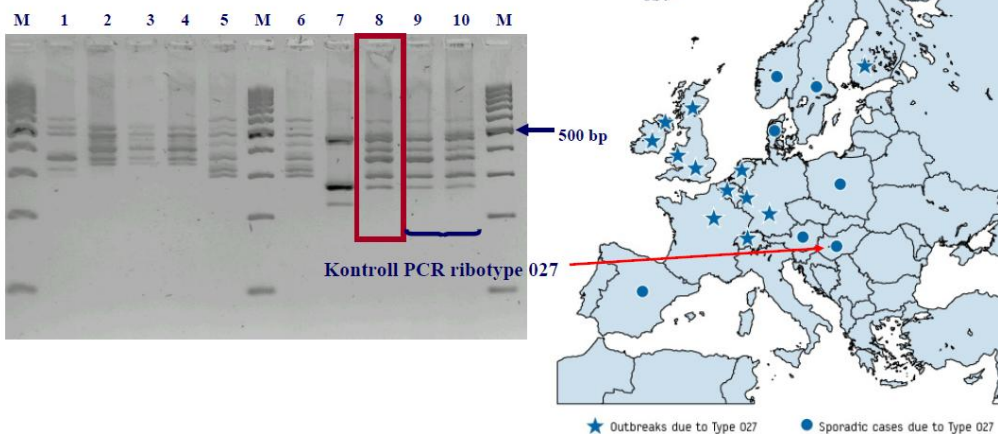
E. Kujiper-től

700 000 cases /y.
1.2-3.2 billion US\$/y.
 (Kyne CID 2002; Dubberke, EID 2008; O'Brien ICHE 2007)

Eckert C., ICAAC 2010
 Dubberke E, ICHE 2010
 Bauer M., Lancet 2010

„Hipervirulens” *C. difficile* (PCR ribotype 027) törzs európai terjedése

- 2007 júniusi eset (Bp)
- 2007 decemberben igazoltuk hogy 027
- Terhes *et al*: CMI 2009 15: 885-886
- nem lett az esetből járvány !!!



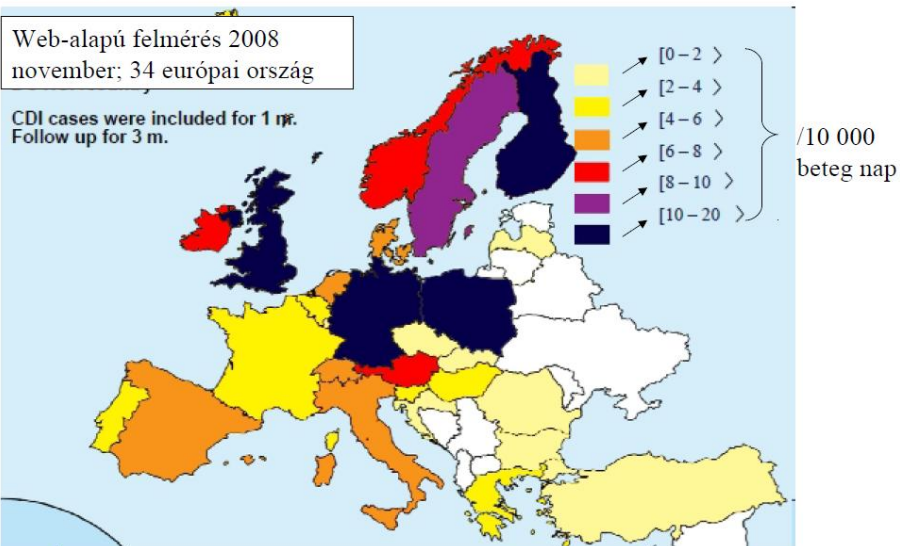
Forrás: Eurosurveillance (2008) Vol. 13, Issue 31.

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

Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey

Lancet 2011; 377: 63-73

Martijn P Bauer, Daan W Notermans, Birgit H B van Benthem, Jon S Brazier, Mark H Wilcox, Maja Rupnik, Dominique L Monnet, Jaap T van Dissel, Ed J Kuijper, for the ECDIS Study Group*



	Number of toxin-positive cases/number of patients tested	Number of patients tested per 10 000 patient-days	Number of participating hospitals*	Weighted mean health-care-associated <i>C. difficile</i> infection incidence rate per hospital (minimum to maximum range)†		Percentage of health-care-associated <i>C. difficile</i> infection cases in health-care-associated and community-associated <i>C. difficile</i> infections	Number of complicated cases/number of cases with available data (%)	Toxin tests used (number of hospitals)
				Per 10 000 patient-days	Per 10 000 admissions			
Austria	53/330 (16%)	52	3	7.5 (4.3-10.9)	36 (20-46)	92%	4/26 (15%)	A+B (2); A+B and Cu (1)
Belgium	16/283 (6%)	55	3	2.8 (0.0-6.2)	19 (0-39)	91%	0/11 (0%)	A+B (1); Cy and A+B (1); A (1)
Bulgaria	2/9 (22%)	3	3	0.6 (0.0-2.1)	3 (0-10)	100%	1/1 (100%)	A+B (3)
Croatia	22/197 (11%)	41	3(2)	0.7 (0.5-2.1)	6 (4-20)	18%	1/14 (7%)	A+B (2)
Cyprus	1/28 (4%)	34	1	1.2	5	100%	0/1 (0%)	A+B (1)
Czech Republic	10/152 (7%)	17	3	1.1 (0.0-1.3)	7 (0-9)	100%	2/7 (29%)	A+B (3)
Denmark	28/330 (8%)	74	3	5.5 (4.4-9.6)	18 (10-25)	88%	1/19 (5%)	A+B (1); Cu (2)
Finland	52/351 (15%)	141	3	19.1 (8.7-28.5)	80 (30-132)	91%	2/22 (9%)	A+B and Cu (1); Cu (1); A&B (1)
France	37/626 (6%)	42	5(4)	2.1 (1.0-3.1)	15 (6-27)	84%	4/34 (12%)	A+B (2); Cu (1); Cy (1)
Germany	93/602 (15%)	72	6(5)	7.4 (2.9-16.4)	60 (25-276)	91%	2/24 (8%)	A+B (3); Cu (1); Cy (1)
Greece	21/288 (9%)	60	3	3.7 (1.3-4.9)	29 (9-44)	84%	0/17 (0%)	A+B (3)
Hungary	22/333 (7%)	38	3	2.0 (0.4-3.9)	9 (1-23)	68%	1/25 (4%)	A+B (3)
Iceland	6/0	-	1	-	-	100%	0/6 (0%)	-
Ireland	38/493 (8%)	94	3	7.3 (6.5-7.9)	63 (39-92)	100%	5/21 (24%)	A+B (3)
Italy	57/533 (11%)	39	5	3.6 (0.4-5.8)	22 (2-61)	85%	5/18 (28%)	AB (2); GluD and A+B (1); Cy (1)
Latvia	13/64 (20%)	10	3	1.9 (0.0-2.8)	13 (0-20)	91%	0/13 (0%)	A (2); A+B (1)
Luxembourg	0/28 (0%)	49	1	0.0	0	NA	0	A+B
Netherlands	18/309 (6%)	69	3	4.0 (2.3-8.5)	23 (13-43)	100%	1/15 (9%)	A+B (2); Cy (1)
Norway	37/241 (15%)	50	3	7.6 (0.4-16.5)	56 (3-229)	100%	1/16 (6%)	A+B (3)
Poland	102/263 (39%)	45	3	12.5 (3.8-36.3)	76 (29-189)	79%	1/11 (9%)	A+B (2); Cu (1)
Portugal	14/158 (9%)	45	3(2)	2.6 (1.9-8.2)	13 (13-14)	86%	0/10 (0%)	A+B (3)
Romania	1/11 (9%)	3	5(1)	0.3	2	100%	0/1 (0%)	A+B (2)
Slovakia	10/91 (11%)	16	3(2)	1.4 (0.0-2.1)	11 (0-15)	71%	0/5 (0%)	A (1); Cu (1)
Slovenia	24/123 (20%)	17	3(2)	2.8 (1.5-3.2)	19 (10-23)	67%	1/10 (10%)	A+B (2)

Az incidencia átlag 4.1, de 0 és 36.3 /10 000 betegnap között mozog

C. difficile törzsek toxintermelése (SZTE)

Vizsgálati időszak	2003	2006-2007	2008-2009	2010
Vizsgált izolátumok száma	n=118	n=150	n=161	n=101
A és B + (%)	72	80	83,9	91,1
A - és B + (%)	0	0	0	0 **
Binary toxin + (%)	2,5	5,3	1,9	42,6

A törzsek döntő többsége 027 ribotípus

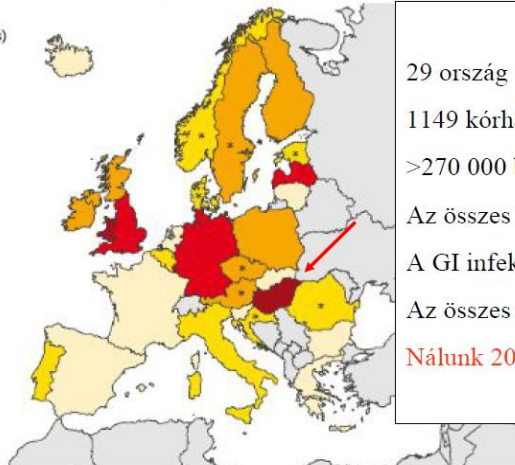
Csak olyan toxin kimutató teszt használható a rutinban, amely a B toxint vagy mind a kettőt detektálja!!!!

ECDC pont prevalencia vizsgálat a nozokomiális infekciókról Európában (2011-2012)

Figure 42. Relative frequency of *Clostridium difficile* as a percentage of all microorganisms reported for HAIs, by country (n=548 isolates), ECDC PPS 2011–2012

Clostridium difficile
(% of isolates in HAIs)

- <2
- 2 to <6
- 6 to <10
- 10 to <14
- >=14
- Not included



Non-visible countries

- Liechtenstein
- Luxembourg
- Malta

29 ország
1149 kórház
>270 000 beteg adatai
Az összes HAI 7.7% volt GI infekció
A GI infekciók 48%-át *C. difficile* okozta!
Az összes izolátum 5.4% volt *C. difficile*
Nálunk 20.6%-a volt *C. difficile*

www.ecdc.europa.eu

2012 április-tól működik

“CDI Europe” kezdeményezés résztvevői:

- Dr. Frédéric Barbut (Franciaország)
- Prof. Oliver Cornely (Németország)
- Prof. Fidelma Fitzpatrick (Írország)
- Prof. Ed J Kuijper (Hollandia)
- Prof. Elisabeth Nagy (Magyarország)
- Prof. Maja Rupnik (Szlovénia)
- Dr. Michael Tvede (Dánia)
- Prof. Mark Wilcox (Egyesült királyság)



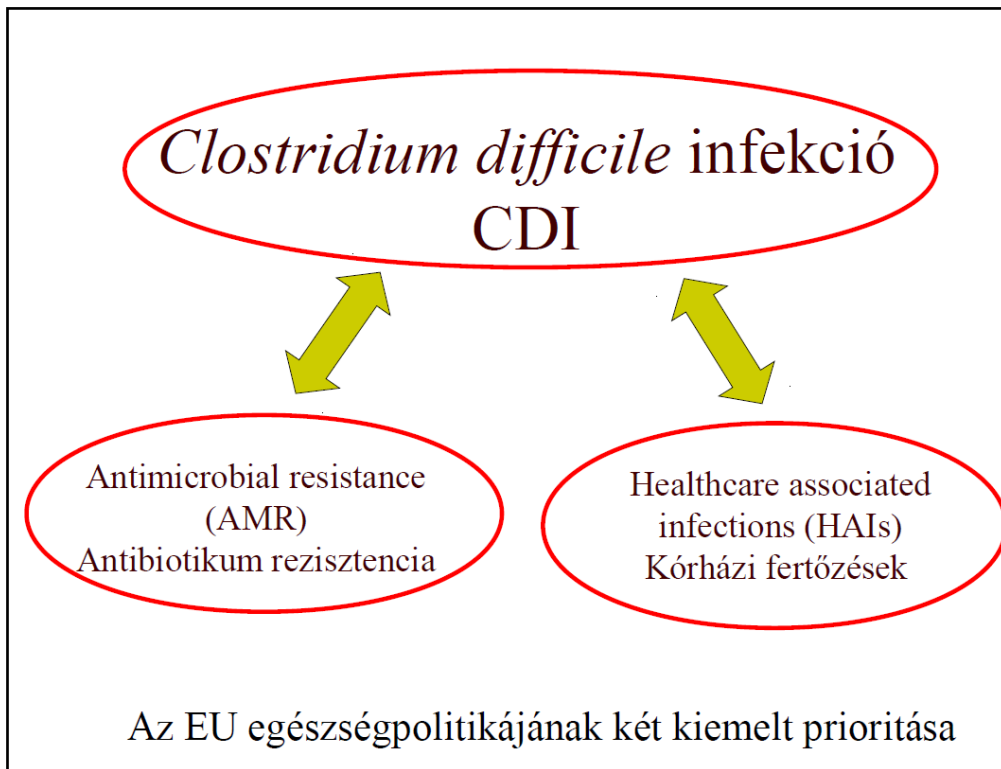
<http://www.epgonline.org> (2013)

Főbb célkitűzések

- A kezdeményezés célja volt, hogy a *C. difficile* infekciók területén végzett tudományos kutatások eredményeit, az egészségpolitika számára lefordítva, ráirányítsa a figyelmet
 - a CDI **fontosságára**,
 - a mikrobiológiai **diagnosztika** modern módszereinek alkalmazására, a standardizálás fontosságára,
 - a **megelőzés és a terápia** új lehetőségeire,
 - az **infekció kontrol** speciális kérdéseire CDI esetében,
 - a CDI esetek - mint egy fontos kórházi fertőzés - jelentési kötelezettségére a **surveillance** megszervezésére,
 - és nem utolsó sorban a CDI okozta **morbiditás, mortalitás csökkentésének** lehetőségeire Európa különböző országaiban

Kapcsolattartás

- ESCMID Study Group of *C. difficile* (ESGCD) – alapkutatás, Európai felmérések
- ECDC – európai egységes surveillance lehetőségének a megteremtése (klinikai / laboratóriumi adat gyűjtés, vagy több ??)
- Európai parlament egészségüggyel foglalkozó bizottságai – politikusok meggyőzése



European Parliament Event on CDI and HAIs (2014 december 2)

- Austrian MEP, Karin Kadenbach chaired the meeting
- National experts from 15 countries and journalists
- Desired outcome:
 - MEPs and EU policy makers support specific measures to improve CDI management
 - CDI Europe is recognized as expert body on CDI and influence in HAU policies
 - CDI Europe strengthen relationship with key European professional Societies
- 2014. 12. 15-én: Európai összefogás a *C. difficile* fertőzések ellen (medicalonline)

Miért gondoltuk hogy szükség van egy ilyen munkaértekezletre?

Megdöbbentő kérdések laboratóriumi szakemberektől:

- A/B toxin-negatív *C. difficile* -t izoláltam formált székletből. Biztos nem kell kezelni?
- Koraszülött széklete *C. difficile* pozitív majd másnap negatív. IV. vancomycin terápiát kell-e indítani?
- Újszülöttől tamponnal vett székletmintát lehet-e *C. difficile* toxin irányba feldolgozni?
- CDI igazolt esetében a terápia után kell-e tenyészteni vagy toxint kimutatni?

Milyen hibákat követhetünk el a mikrobiológiai laboratóriumban?

- Hamis pozitív eredmény
(eredendő hordozás vagy CDI terápia után kialakuló)

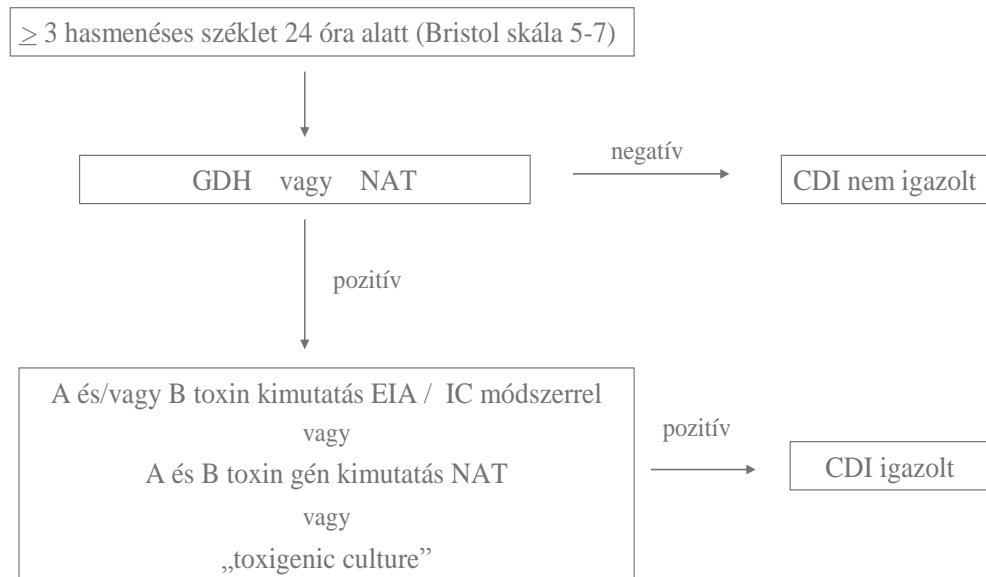
Fölösleges antibiotikum adás

- Hamis negatív eredmény
(nem megfelelően megválasztott teszt, rossz minta transzport)

Nem időben kezdett terápia, a *C. difficile* szóródása

Konszenzuson alapuló CDI diagnosztikai algoritmus Magyarországon (2015)

megjelent a MIFKMT honlapján a Guidance dokumentumok között
(https://www.doki.net/tarsasag/infektologia/info.aspx?sp=7&web_id=37364C25E869D0A&q=C.%20difficile)



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 (NAAT) negativitás esetén a CDI nagy biztonsággal kizárható, ha pozitív, akkor javasolt megerősíteni a diagnózist egy érzékeny toxin kimutatási teszttel.

***Clostridium difficile* fertőzés – evidenciákon alapuló általános tudnivalók – hogyan gondolkodjunk?**

Rákóczi Éva

Klinikai Farmakológiai, Infektológiai és Allergológiai Intézet, Kenézy Gyula

Kórház - és Rendelőintézet, Debrecen

Infektológiai Osztály, Gyermekgyógyászati Klinika, De KK, Debrecen

Bevezetés

Az alapellátás és a szakorvosi ellátás egyik kulcsfontosságú ellátási nehézségei közé tartozik a *Clostridium difficile* asszociált colitis (CDI) diagnosztikája és kezelése. A graduális és postgraduális képzésben a hasmenés definíciója, formáinak elkülönítése, megfelelő diagnosztikája és kezelése nem kerülnek kellőképpen kidomborításra. A definíciók ismerete és tisztázása hiányában úgy tűnik, káosz kezd kialakulni az ellátók munkája során, melyet célszerű tisztába tenni, és néhány alapvető szempontot megvilágítani. Az alábbi cikk ezekre a kérdéskörökre koncentrálnak és nyújt segítséget minden ellátónak.

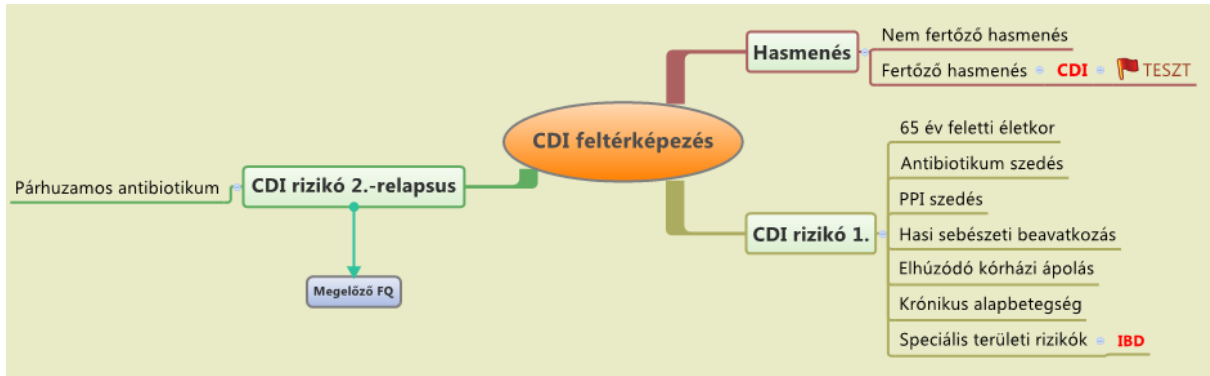
Fertőzéses vagy nem fertőzéses eredetű a hasmenés?

A WHO definíciója alapján hasmenésről beszélünk 3, vagy több laza konzisztenciájú széklet ürítése esetén 24 óra alatt. A hasmenéseket heveny, vagy krónikus formákra oszthatjuk. A heveny hasmenés kevesebb, mint 5 napig tart, a krónikus hasmenés meghaladja a 30 napot.

Fertőzéses eredetű hasmenés lehetősége merül fel, ha a heveny hasmenéshez legalább egy, vagy több tünet társul az alábbiak közül: láz, hasi fájdalom, hányinger, hányás, tenesmus.

Mikor gondoljunk *Clostridium difficile* asszociált colitisre?

A fertőzéses hasmenés lehetősége esetén akkor kell gondolnunk erre a kóroki tényezőre, ha speciális rizikófaktorok állnak fenn (1. ábra). Fertőzéses hasmenés esetén a következő rizikófaktorok esetén jön szóba *Clostridium difficile* (CD) etiológiai szerepe: 65 év feletti életkor, a hasmenés kezdete előtt 2 hónapon belüli antibiotikum szedés (elegendő egyetlen adag bevétele), protonpumpa gátló szedése (PPI), megelőző hasi sebészeti beavatkozás, elhúzódó (több, mint 21 napos) kórházi kezelés, krónikus betegségek – immunszupprimált állapotok (krónikus vesebetegség, haemodialízis, diabetes mellitus, aktív daganatos vagy hematológiai betegségek).



1. ábra. A hasmenések klinikumának feltérképezése: *Clostridium difficile* colitis rizikótényezői

Melyek a területen szerzett CDI- rizikófaktora?

Egy 2015. februárban megjelent szisztematikus metaanalízisben áttekintették az elmúlt 35 év szakirodalmát 2014. március 31-ig bezárólag. Az analízis azt vizsgálta, melyek a leggyakoribb rizikófaktork, melyek hajlamosítják a betegeket területen szerzett CDI előfordulására. A 12 publikáció közel 60.000 beteg adatait foglalta össze. Az eredmények azt igazolták, hogy antibiotikum, vagy szteroid használat mellett gyakoribb a területen szerzett CDI.

A krónikus betegségek közül kiemelték a gyulladós bélbetegségek szerepét, emellett hangsúlyos szerepet kapott a veseelégtelenség, a lymphoma/leukémia és a cukorbetegség is.

CDI és relapszus

Fertőzés kiújulásáról (relapszus) akkor beszélünk, amikor az első CDI eseményre alkalmazott komplettált antibiotikum kezelés után – legalább 2 nap tünetmentességet követően – ismételten jelentkezik hasmenés az első esemény kialakulásától számított 8 héten belül, és más etiológia kizárható. Relapszus a betegek 20-30%-ban alakulhat ki, melynek mechanizmusa jelenleg pontosan nem ismert. Egy 2015. áprilisában közzétett metaanalízis 33 tanulmány eredményét összegezte megközelítőleg 19.000 beteg adatának értékelésével. Az 5 független rizikófaktor közül kiemelték a 65 éven felüli életkort, a CDI során más infekcióra párhuzamosan alkalmazott antibiotikum terápiát, illetve a megelőző fluorokinolon kezelés alkalmazását. További rizikótényezőként hangsúlyozták a PPI kezelést és a veseelégtelenséget.








Kolonizáció és infekció kérdése

Egészséges felnőttekben tünetmentes hordozás 3-5 %-ban fordul elő. Kórházban alkalmazott antibiotikum kezelés a tünetmentes hordozók számát akár 20%-ra is növelheti.

Több tanulmány elemezte a kolonizáció és infekció kérdését. 810 felnőtt vizsgálata során (192 tünetmentes hordozó, 618 nem kolonizált) igazolták, hogy a nem kolonizáltak között közel 4-szer gyakoribb volt a CDI előfordulása, mint a kolonizáltak között. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy tünetmentes, azaz hasmenésben nem szenvedő betegnél *C. difficile* kóroki szerepét igazoló székletvizsgálat elvégzése indokolatlan, és félrevezető lehet. Indokolatlan továbbá a gyógyulás utáni felszabadító vizsgálat is. A CDI-ben szenvedő beteg 2 napos tünetmentességet követően elkülönítést a továbbiakban már nem igényel, azaz nem tartandó fertőzőnek.

A Bristol skála használata

A hasmenés objektív követésére az 1997. óta ismert Bristol skála javasolt. A beteg, az ápolószemélyzet és a kezelőorvos is könnyen elsajátíthatja a skála használatát. A székletürítés napi gyakoriságának és az ürített székletek típusainak pontos megjelölése olyan objektíven értékelhető faktor, mely a betegkövetéshez, a kórkép lefolyásához és a terápiás válasz megítéléséhez szolgál pontos információval. A 2011-ben közzétett magyarországi módszertani levél kiemeli a skála (2. ábra) alkalmazásának fontosságát. Jelenleg kevés kórház vezette be kötelezően a Bristol skála alkalmazását és használatát a kórházi dokumentációba, holott az ez irányú törekvések kifejezetten hasznosak lennének minden ellátó és a betegek számára -akár a területi ellátásban is.

1-es típus		Különálló, kisméretű bogycsok (nehéz üríteni)	Székrekedésre utaló széklet
2-es típus		Alakja hurkaszerű, felszíne göröngyös	
3-as típus		Formált, alakja hurkaszerű, felszíne struktúrált	Normál széklet
4-es típus		Formált, alakja virsliszerű, képlékeny, felszíne sima	
5-ös típus		Lágy, amorf, darabos, széle jól körühatárolt (könnyű üríteni)	Hasmenéses széklet
6-os típus		Részben híg, részben darabos, pépszerű széklet	
7-es típus		Vizes, nincs szilárd része TELJESEN FOLYÉKONY	Kifejezetten hasmenéses széklet

2. ábra Bristol skála

Adaptálva: Lewis S.J., Heaton K.W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. Scand J Gastroenterol 1997; 32: 920–924.

Immunszupprimáltak CDI fertőzése - leukémia

Egy amerikai munkacsoport 2015-ös tanulmányában 1,2 millió kórházban ápolt leukémiás betegnél előforduló CDI kimenetelét elemezte. A 7 éves követés során közel 43.000 CDI előfordulását regisztrálták. A betegeknél 2,6-szer magasabb volt a CDI fertőzés rizikója, mint a nem-leukémiás betegcsoportban, 20%-os mortalitás növekedéssel.

A statisztikai adatok rávilágítottak, hogy a 65 év feletti életkor, a férfi nem, az elhúzódó kórházi kezelés; a komplikációk közül a szepszis, a neutropenia, a veseelégtelenség; a beavatkozások közül pedig a csontvelő-, vagy őssejt transzplantáció mutatott szignifikáns összefüggést a CDI előfordulásával.

Súlyos CDI forma – újabb rizikótényezők – pontozásos rendszer

A közel 40 év irodalmát átfogó, újabban publikált összefoglaló tanulmány a felnőttekben előforduló CDI fertőzések diagnosztikáját elemezte. Az elemzésen belül 746 beteg adatait vizsgálták egy prospektív tanulmány keretében, melyben a súlyos formák diagnosztikai szempontjait határozták meg (1. táblázat). A 4 fő rizikófaktor (életkor, fehérvérsejt szám, szívelégtelenség jelenléte, diffúz hasi nyomásérzékenység) pontértéke alapján a súlyosság rizikója számszerűsíthető volt. Az értékelés során kiemelt szerepet kaptak a szívelégtelenség és a diffúz hasi nyomásérzékenység (7 és 6 pont). A score rendszeren belül tehát alarmírozó, ha szívelégtelenségben szenvedő beteg kap CDI-t, illetve ha CDI mellett diffúz hasi nyomásérzékenység észlelhető fizikális vizsgálat kapcsán.

Score	Pont értéke
Életkor > 70 év	2
2000 G/l < Fvs > 20.000 G/l	1
Szívelégtelenség	7
Diffúz hasi nyomásérzékenység	6
Összesen	16
Magas rizikó	> 6

1. táblázat CDI súlyossági rizikó: diagnosztikai pontozás

Összefoglalás

A CDI fertőzés napjaink pestisének tekinthető, ezért minden egészségügyi ellátó feladata a betegség legfrissebb szakirodalmának nyomon követése, mert a naprakész ismeretek birtokában leszünk csak felvértezve a kórformával szemben. Az új ismeretek birtokában válhat csak követhetővé a betegség sokszínűsége, ami hozzásegíti az ellátót ahhoz, hogy a CDI betegeket legszakszerűbben kezelhesse. A jelenlegi ismereteink alapján a gondolkodásmód főbb szempontjai a következők:

Sarokkövek - CDI

1. Fertőző hasmenésben **speciális rizikófaktorok** hívják fel a figyelmet CDI-re.
2. **Területen** szerzett CDI esetén kiemelt szerepe van az **antibiotikum, vagy szteroid** kezelésnek, illetve a komorbiditások közül a **gyulladásos bélbetegségnek**, a veseelégtelenségnek, a lymphomanak, leukémiának, illetve a cukorbetegségnek.
3. **Tünetmentes állapotban indokolatlan a székletvizsgálat *Clostridium difficile* irányában** és felszabadító vizsgálat sem szükséges. A kolonizáció nem növeli a CDI kialakulásának rizikóját.
4. **Relapszusra hajlamosít** a 65 éven felüli életkor, a CDI során más infekcióra **párhuzamosan alkalmazott antibiotikum terápia, a megelőző fluorokinolon** vagy PPI kezelés és a veseelégtelenség.
5. A **Bristol skála használata segíti** a kórkép súlyosságának megítélését, és nyomon követhető a betegség progressziója, valamint a terápiás válasz.
6. **Leukémiás betegek:** magasabb CDI rizikó, magasabb mortalitás, a nem-leukémiás betegekhez viszonyítva.
7. A **CDI súlyossági** rizikófaktorai közül kiemelendő a **szívelégtelenség és a diffúz hasi nyomásérzékenység.**

Felhasznált irodalom

1. Az Országos Epidemiológiai Központ, az Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium és az Infektológiai Szakmai Kollégium Módszertani levele a *Clostridium difficile* fertőzések diagnosztikájáról, terápiájáról és megelőzéséről. *Epinfo*, 2011; 18:4 különszám
2. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN: Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA* 2015 Jan 27;313(4):398-408.
3. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. (2014) The Committee. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*, 2014 (suppl 2): 1-26.
4. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DD, Hernandez AV, Donskey CJ, Fraser TG: Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Apr; 36(4):452-60.
5. Furuya-Kanamori L, Stone JC, Clark J, McKenzie SJ, Yakob L, Paterson DL, Riley TV, Doi SA, Clements AC: Comorbidities, Exposure to Medications, and the Risk of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Feb; 36(2):132-41.
6. Lewis S. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J Gastroenterol*. 1997; 32(9): 920-924.
7. Luo R, Greenberg A, Stone CD: Outcomes of *Clostridium difficile* infection in hospitalized leukemia patients: a nationwide analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Jul; 36(7):794-801.
8. Nagy E: Aktualitások a *Clostridium difficile* okozta infekciók epidemiológiájában, diagnosztikájában és terápiájában – európai kitekintés. *LAM* 2014; 24(1–2):25–33.
9. Sándor É, Rákóczi É: Antibiotikum kezelés hasmenésben. *Granum* 2014; 17(3): 8-10.
10. Shim JK(1), Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN: Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet*. 1998 Feb 28;351(9103):633-6.

A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei

Urbán Edit

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

Laboratóriumi diagnosztikai módszerek (1. táblázat)

Citotoxin neutralizációs próba sejt kultúrán (Cell culture cytotoxicity neutralization assay, CCCNA)

A *C. difficile* patogenitási szigete (PaLoc) két génből: az enterotoxin A-t (TcdA), illetve a citotoxin B-t (TcdB) kódoló génekből áll. Ezek a nagy exotoxinok – a 308 kDa-os A enterotoxin, valamint a 269 kDa-os B citotoxin – több mint 45 %-os aminosav-sorrendbeli homológiát mutatnak. A patogén törzsek mindkét toxin (sőt sok esetben még a binary toxin) egyidejű termelésére képesek. Az A illetve B toxin feltehetőleg szinergistaként működik, ugyanis a kutatások alapján a B toxin hatása az A toxin szövetroncsolásától függ. Bár az A toxint teszik elsősorban felelőssé az enterális tünetek kialakításáért, egyre nagyobb számú tanulmány jelenik meg A toxin-negatív törzsek által okozott megbetegedésekről, ahol a B toxinnak egy jelentős, az A toxintól független, patogenitásban betöltött szerepet tulajdonítanak. A toxinok citopátiás hatásának kimutatása a széklet szuszpenziójának centrifugált, szűrt felülúszójából (és/vagy a folyékony -exponenciális fázisban lévő- tenyészet szűrt felülúszójából) feles hígítások alkalmazásával, *C. sordelli* antitoxin vagy *C. difficile* antitoxinnal történő neutralizációs próbával történik a megfelelő monolayer sejtvonalon. Számos különböző, laboratóriumban alkalmazott sejtvonalat használnak erre a célra: mint pld. humán fibroblastok, Veró-, McCoy- sejtvonalak, MRC-5 tüdő fibroblast, HeLa cervikális adenocarcinoma és Hep2 sejtek. A megfelelő körülmények között történő 24, illetve 48 óra inkubációt követően a toxin-indukált citopátiás hatás a sejteken inverz mikroszkópot használva megfigyelhető. Abban az esetben, ha a citopátiás hatás látható a sejt kultúrán, a nem-specifikus toxicitás kiküszöbölése miatt el kell végezni a neutralizációs tesztet a mintából. Bár főként a B toxinnak van kifejezett citotoxikus hatása, tehát elsődlegesen a módszer a B toxin kimutatására alkalmas, azonban a módszerrel az A toxin enyhébb citotoxikus hatása is kimutatható [1]. Az A toxin kódolásáért felelős gének molekuláris vizsgálata során, azonosítottak olyan toxin A variáns törzseket (A toxint nem termelő, B toxint termelő), melyek több mint 1,7 kb-nyi deléciót hordoznak az A toxint kódoló gén „repeat” régiójában. A mutáció PCR technikával detektálható, a cytotoxicitási teszt különböző sejtvonalakon pozitív eredményt ad az intakt B toxin jelenléte miatt.

A módszer szenzitivitása a közölt adatok alapján igen széles határok között változik: 65%-90% [2].

A szenzitivitást számos tényező befolyásolja: a toxin degradálódhat a mintában, tehát a székletminta hosszas tárolása szobahőn fals negatív eredményhez vezethet, függ a felhasznált sejtvonaltól, a preanalitikai-analitikai tényezőktől, esetlegesen az alkalmazott antibiotikum terápiától. Általában a szakirodalomban a közlemények - annak ellenére, hogy a módszer szenzitivitása nem megbízható, - az összehasonlító vizsgálatok esetében a citotoxin neutralizációs módszert „gold standard”-ként használják. A laboratóriumok ma már kevésbé használják a mindennapos rutin diagnosztikai tevékenységük során, ugyanis a módszer hosszadalmas, időigényes, a sejtvonat fenntartását, kezelését biztosító megfelelő laboratóriumi háttérrel igényel [3].

Toxin-termelő törzs tenyésztése

A toxin termelés kimutatása különböző módszerekkel nemcsak a székletmintából közvetlenül, hanem a székletből izolált törzs esetén is történhet. Ennek a lényege természetesen a székletminta anaerob körülmények között, szelektív táptalajon történő tenyésztése, majd a kitenyészett törzs toxinstátuszának bizonyítása. A törzsek minél nagyobb arányban történő kitenyészésére, a tenyésztés szelektivitásának elősegítésére több szerző a hő-sokk-, illetve alkohol sokk kezelést ajánlja a tenyésztés előtt, ezzel elősegítve a mintában lévő spórák túlélését, majd később a megfelelő körülmények közötti germinálódását. Különböző 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 szelektivitását a cycloserin és cefoxitin biztosítja, amelyek hatékonyan gátolják az anaerob és fakultatív anaerob baktériumok szaporodását, de ennek számos módosítása (pld. cefoxitin cycloserin egg yolk agar CCEY/Brazier agar, CMA cefoxitin-mannitol agar, CMBA cefoxitin-mannitol vértartalmú agar, TCCA taurocholsav-cycloserin-cefoxitin agar) is ismert és használt [4]. A legújabb diagnosztikai módszerek között fontos megemlíteni a chromogén szubsztrátokat tartalmazó, különböző gyártók által forgalmazott táptalajokat, melyeken nem csak izoláljuk a kórokozót, hanem a specifikus chromogén szubsztrát segítségével már identifikálni is lehet a kitenyészett baktériumtörzset egy lépésben. Bár a chromogén táptalajok szenzitivitása magas: 97-99%, a rutin diagnosztikában való mindennapos alkalmazásuk ma még meglehetősen drága [5]. A kitenyészett törzseket a hagyományos táptalajokról különböző (biokémiai próbák, gyári kitek, MALDI-TOF) módszerekkel a jellegzetes sajátosságokat felhasználva (típusos szag, telepmorfológia, UV fluoreszcencia) viszonylag egyszerűen tudjuk identifikálni. Az izolált, majd identifikált telepekből folyékony (BHI brain heart infusion, CM húsos bouillon) szubkultúrát kell készíteni, majd az inkubációs idő letelte után a logaritmikusan fázisban lévő folyékony tenyészet felülúszójából kell elvégezni a toxin vizsgálatot valamelyik módszerrel.

A tenyésztés – főleg epidémiás helyzetben – nemcsak a törzs toxin státuszának meghatározása szempontjából fontos, hanem az esetleges járvány kialakulásakor a ribotípus meghatározása, a járványért felelős törzs azonosítása szempontjából is rendkívül lényeges. A tenyésztési módszer rutin diagnosztikában történő alkalmazása (annak ellenére, hogy epidemiológiai szempontból kiemelt jelentőségű) egyre kevésbé elterjedt, elsősorban idő-, munka- és anaerob termosztát igénye miatt. Megjelentek olyan irodalmi hivatkozások, mint a SHEA/IDSA irányelv [2], mely a törzs tenyésztése utáni toxin státusz ellenőrzését „gold-standard”-ként ajánlja a különböző diagnosztikai módszerek összehasonlítása esetén, azonban vannak olyan közlemények, melyek szerint bár a pozitív esetek aránya magasabb, a klinikailag releváns esetek bizonyítására nem tartják jobbnak a módszert a CCCNA-nál [3].

Toxin immunoassay-ek, Enzim immunoassay-ek (EIA)

A különböző típusú enzim-immuno-assay 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 egyeduralgok voltak a klinikai laboratóriumokban. Számos gyártó különböző típusú EIA terméke elérhető ma Magyarországon: a teljesség igénye nélkül pld. Prima System *C. difficile* Tox A, (Trinity Biotech), VIDAS *C. difficile* Tox A/B (bioMérieux); ImmunoCard *C. difficile* (Meridian Diagnostics Inc.), Triage Micro *C. difficile* (Biosite Diagnostics); Premier Cytoclone A/B (Meridian Diagnostics Inc.) és *C. difficile* Tox A/B (Techlab Inc.). Kezdetekben ezeket a tesztek főleg a toxin A kimutatására fejlesztették ki, de ezekkel a kitékkel nem mutatható ki a B toxin jelenléte, az immunodomináns régió hiánya következtében. 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 toxint nem termelő B toxint termelő törzsek kimutatása is a megnövekedett előfordulás, klinikai jelentőség miatt. A másik elterjedt, gyors módszer jelenleg a különböző, immunkromatográfián alapuló tesztek: pld. a *C. difficile* Toxin A Test (Oxoid), ezek munka- és időigénye rendkívül csekély (30-50 perc), könnyen kivitelezhetőek akár a kórházi osztályokon is („ágy mellett” POCT tesztek) elvégezhetőek. A módszer előnye a viszonylag alacsony ára, a rövid detektálási idő, (bár ez függ a különböző teszt-típusoktól). A kereskedelmi forgalomban kapható kit-ek specificitása és szenzitivitása az elérhető irodalmi adatok alapján igen eltérő, széles határok között mozog: 40-100% [6]. „Gold standard”-ként az összehasonlító vizsgálatokat végző közlemények a citotoxin neutralizációs próbát, illetve a toxin-termelő törzs tenyésztését alkalmazták. Eastwood és mtsai közleménye szerint az immunoassay tesztek specificitása és szenzitivitása nagymértékben függött az összehasonlítás során alkalmazott „gold standard” módszertől [7].

Glutamát-dehidrogenáz antigén kimutatása

A glutamát-dehidrogenáz (GDH) metabolikus enzim, melyet a *gluD* gén kódol. Ezt az enzimet mind a toxin-termelő, mind a toxint nem termelő törzsek nagy mennyiségben termelik, azonban a *Clostridium sordellii* törzsek is gyakran keresztreakciót adhatnak. Ezért a módszer „screening” (szűrő) módszerként használatos, a negatív prediktív értéke igen magas, pozitív esetben azonban a toxin-termelést valamilyen más módszerrel (EIA, molekuláris módszerek) konfirmálni kell. A GDH kimutatására számos gyártó forgalmaz tesztek a módszerek elve vagy plates EIA, vagy immunkromatográfián alapul. A különböző módszerek szenzitivitása hasonló: 80-100% közötti [8]. A módszer előnye, hogy a negatív eredményt rövid „turn around time” múlva közölni lehet a klinikussal. Az eszközígyény minimális, ára alacsony, különösen, ha a molekuláris módszerekhez viszonyítjuk. A GDH kimutatás különösen azoknak a rutin diagnosztikai laboratóriumoknak ajánlott szűrőmódszerként, amelyek nincsenek felkészülve molekuláris diagnosztikai módszerek rutinszerű alkalmazására. Az elmúlt években megjelentek olyan közlemények, melyek vitatták a GDH kimutatás szűrőmódszerként történő alkalmazását: [9-10].

Kombinált módszerek: GDH kimutatás+ toxin kimutatás egy lépésben

Több olyan gyári diagnosztikai készítmény van a laboratóriumi gyakorlatban, amely kombinálja egy lépésben a GDH- és a toxin kimutatást: pld. GDH és toxin EIA módszerek egy plate-en, immunkromatográfiás módszerek egy kitben (Quick CHEK). Ezek a tesztek viszonylag gyorsan kivitelezhetőek és egyelőre még olcsóbbak, mint a molekuláris diagnosztikai tesztek. A GDH kimutatás része a teszteknek hasonló szenzitivitású, mint az egyedüli teszteké, azonban a kombinált tesztekben alkalmazott toxin kimutatási EIA módszerek szenzitivitása alatta marad az egyedülként alkalmazott hasonló tesztekének. Általánosságban: ha mind a GDH, mind a toxin kimutatás negatív: viszonylag magas biztonsággal megadhatjuk a 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 (CCCNA, vagy molekuláris módszer) meg kell erősíteni az eredményt [8].

Molekuláris módszerek közvetlenül a székletből történő toxin kimutatásra

Közvetlenül a székletmintákból történő *C. difficile* toxinok kimutatására a nukleinsav amplifikáción alapuló molekuláris módszereket (NAAT) az 1990-es évek elején kezdték el a szakirodalomban közölni [9]. Ezek a korai publikációk a konvencionális PCR módszereket mutatták be, melyek során különböző gén targetet használtak (*tcdA*, *tcdB* és 16S rRNS gének).

A real-time PCR módszerrel egy nap alatt kiadható az eredmény, ami rövidebb, mint ha a citotoxicitási módszert alkalmaznánk. Jóval kevésbé munkaigényes, mint az egyéb módszerek, ha nem vesszük figyelembe a PCR utáni analízisre fordított időt. Másik nagy előnye a real-time PCR módszernek, hogy igen alacsony a kontamináció valószínűsége, valamint kiszűrhetőek vele az aszimptomatikus hordozók. Ekkor még ezek a módszerek azért viszonylag időigényesek voltak, a PCR termékeket gél elektroforézissel, illetve Southern blot analízissel mutatták ki és számos esetben egyéb *Clostridium* speciesekkel keresztreakciót adott. Mára azonban, köszönhetően a molekuláris diagnosztikai módszerek dinamikus fejlődésének, a toxinok detektálása sokkal kifinomultabb, szenzitívebb, a kimutathatósági határ jelentősen lecsökkent. A közvetlenül a székletmintából történő DNS extrakció a bevezetésre került újabb nukleinsav kivonó kit-ek alkalmazásával számottevően javult, a real-time PCR berendezések (Cepheid SmartCycler, Roche LightCycler, Bio-Rad iCycler IQ) ma már a laboratóriumok számára elérhetővé váltak (2. táblázat). Számos új, korszerű gyári kit van a forgalomban, ebből ma Magyarországon három elérhető: elsőként a manuális kivitelezésű BD GeneOhm Cdiff (BD Diagnostics, US), – mely módszert a Cepheid SmartCycler készülékre tervezték, – került bevezetésre 2009-ben. A módszer során a törzsek konzervált *tcdB* régióit amplifikálják, majd az amplifikált terméket fluorogén target-specifikus hibridizációs próbával detektálják. Újabban vezették be a modern, automatizált változatát: BD Max Cdiff néven, mely a jelentősen csökkentette a kivitelezési időt, ez a minták számától függően kb. 3 óra. Nem csak a *tcdB* gén, hanem a binary toxin gének, illetve a 117 nucleotid delécióját a *tcdC* génen (a 027/NAP1/B1 törzsek genetikai markere) detektálja a Xpert C. difficile Epi teszt (Cepheid US). A módszer egyszerű, gyors, könnyen kivitelezhető, automatizált, gyakorlatilag egy kazettában játszódik le az összes folyamat. Az Illumigene módszer (Meridian Bioscience, US) LAMP amplifikáción („loop-mediated isothermal amplification”) alapszik. Ez a módszer a *tcdA* konzervált 5' szekvenciáját mutatja ki a PaLoc-ban, 4 primert használva, mely hat különböző régiót jelöl ki, így a toxin A negatív, toxin B pozitív törzseket is képes kimutatni. Ezek a módszerek minden esetben jóval érzékenyebbek, mint más módszerek, azonban a közlemények szerint egyik fő hibájuk, hogy nem tesznek különbséget az aktív infekció és az aszimptomatikus hordozó állapot között, tehát minden esetben rendkívül fontos a klinikai kép ismerete, a klinikussal történő konzultáció [10-15].

Irodalomjegyzék:

- [1] Lyster DM, Krivan HC, Wilkins TD: *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1(1):1-18.
- [2] Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America: 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). Infect Control Hosp Epidemiol 2010;31(5):431-55.
- [3] Planche T, Wilcox M: Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? J Clin Pathol 2011;64(1):1-5.
- [4] Hink T, Burnham CA, Dubberke ER: A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. Anaerobe 2013;19:39-43.
- [5] Eckert C, Burghoffer B, Lalande V, Barbut F: Evaluation of the chromogenic agar chromID *C. difficile*. J Clin Microbiol 2013;51(3):1002-1004.
- [6] Chapin KC, Dickenson RA, Wu F, Andrea SB: Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin. J Mol Diagn 2011;13(4):395-400.
- [7] Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M: Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol 2009;47(10):3211-3217.
- [8] Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R: Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2008;46(1):328-30.
- [9] Wren B, Clayton C, Tabaqchali S: Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. Lancet 1990;335(8686):423.
- [10] Carroll KC: Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. Anaerobe. 2011;17(4):170-174.
- [11] Vasoo S, Stevens J, Portillo L, Barza R, Schejbal D, Wu MM, Chancey C, Singh KJ: Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Microbiol Immunol Infect. 2012 Aug 23.
- [12] Wren B, Clayton C, Tabaqchali S: Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. Lancet 1990;335(8686):423.
- [13] Bélanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG: Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003;41(2):730-734.

- [14] Le Guern R, Herwegh S, Grandbastien B, Courcol R, Wallet F: Evaluation of a new molecular test, the BD Max Cdiff, for detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples. J Clin Microbiol 2012;50(9):3089-3090.
- [15] Shin S, Kim M, Kim M, Lim H, Kim H, Lee K, Chong Y: Evaluation of the Xpert *Clostridium difficile* assay for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Ann Lab Med 2012;32(5):355-358.

1. táblázat: A különböző diagnosztikai módszerek összehasonlítása

Teszt	Költség (EUR)	Kivitelezés (h)	Módszer kivitelezhetősége	Szenzitivitás (%)	Specifitás (%)	Megjegyzés
Széket tenyésztés	≤2	24-48-72	Könnyű			
„Toxigenic culture”	<20	>96	Közepes-nehez	100	93-96	Tenyésztés - Tenyésztetoxinstátuszának meghatározása (EIA, NAAT, CCNA)
Cell culture cytotoxicity neutralization assays (CCNAs)	15-23	24-48	Nehéz	67-86	97-100	CPE detektálása Vero, HeLA stb. sejtvonalon
Toxin A/B EIA	>2	<3	Könnyű	53-77	95-100	
GDH EIA/IC	>2	<3	Könnyű	70-91	76-98	
NAAT	19-38	1.5-2	Könnyű-nehez	77-100	93-100	ícdA/B

 Forrás: Humphries (2012) *Clinical Microbiology Newsletter* **34**: 151-157

2. táblázat: Magyarországon forgalomban lévő NAAT módszerek összehasonlítása

Módszer neve	Target	Extrakció	Módszer	Detektálási idő (DNS extrakcióval)	Készülék	Szenzitivitás	Specifititás
BD GeneOhm Cdiff	<i>tcdB</i>	Manuális	PCR-moleculárisbaon	2-3 h	Smart Cycler (Cepheid)	95,5%	97,9%
Xpert C. difficile	<i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> , <i>tcdC</i> deléció	Automata	PCR-Taqman	1 h	GeneXpert (Cepheid)	97,8%	97,9%
<i>illumigene C. difficile</i>	<i>tcdA</i>	Manuális	LAMP	1 h	<i>illumipro-10</i>	86,7%	100%

***Clostridium difficile*: a hazai laboratóriumi diagnosztika felmérése 2014-ben**

Pásztai Judit

Országos Epidemiológiai Központ

Bevezetés

A toxintermelő *Clostridium difficile* (TCD) által okozott infekciók, és a nozokomiális járványok jelentős betegbiztonsági kockázatot jelentenek világszerte, így Magyarországon is.

Számos nemzetközi és hazai tanulmány született, mely adatokkal támasztja alá, hogy a szigorú, részben speciális kórházhigiénés tevékenység és az infekciókontroll intézkedések következetes végrehajtásának eredményeként jelentősen csökkenthető a TCD (és más kórokozók által okozott) fertőzések kialakulása, így a halmozott, vagy járványos előfordulása is. E komplex tevékenység alappillérei közé tartozik az (ECDC által kidolgozott) egységes kritériumokon nyugvó surveillance, a korszerű, gyors mikrobiológiai diagnosztika, melynek fejlesztése, a jó gyakorlatok adaptálása (harmonizált módszerek) ugyancsak hozzájárulnak a kórokozó terjedésének csökkentéséhez [1-2].

Magyarországon a laboratóriumi szerkezet átalakulásainak sajátosságaiból következően nem volt pontos ismeretünk az egyes laboratóriumok által a TCD irányában végzett vizsgálatok technikai és minőségi paramétereiről.

Nagy Erzsébet és munkatársai (SZOTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, KMDI) 2010., 2012. években végeztek felmérést a hazai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumokban a TCD-diagnosztikával kapcsolatban. A felmérések eredményei alapján a hazai helyzet javítása érdekében számos szakmai fórumon ismertették a diagnosztikai módszerek fejlesztésének szükségességét és lehetőségeit, valamint az Országos Epidemiológiai Központtal közösen módszertani ajánlást adtak ki a diagnosztikai laboratóriumok számára [3].

A TCD okozta fertőzések járványügyi jelentősége 2012. óta tovább növekedett, ezért szükségesnek látszik további, a laboratóriumi diagnosztikát is érintő stratégia kidolgozása és intézkedések bevezetése. A hazai gyakorlat további fejlesztése érdekében az utóbbi két évben módszertani ajánlások és közlemények jelentek meg, amelyek a nemzetközi irányelveken alapulnak [4-6].

2012-ben megtörtént a diagnosztikai vizsgálati kapacitás bővítése, valamint a megerősítő és tipizálási vizsgálatok lehetőségének megteremtése, mely alapján a bejelentett TCD-járványokból származó mintákat és/vagy izolátumokat az OEK Anaerob Laboratóriuma fogadja további vizsgálatokra (toxintermelés - kimutatás, megerősítés, tenyésztés, ribotipizálás stb.) (www.oek.hu, Tájékoztató, 2013. március 6.)

A következő lépés 2014-ben egy országos, önkéntes on-line felmérés volt, melynek eredményei alapján egy frissített módszertani levél kiadását, valamint harmonizált vizsgálati algoritmus ajánlását tervezzük.

Módszer

Az OEK laboratóriumi és járványügyi, valamint a SZOTE KMDI munkatársai által összeállított on-line kérdőív. A kérdőív kitöltésére a valamennyi hazai laboratóriumot felkértük rendelkezésre álló címlista alapján (69 laboratórium). A kérdőív a Google speciális alkalmazásán keresztül volt elérhető:

https://docs.google.com/forms/d/13tb6dhdqXv4LOhZBDsKMbZcqQna6FNsFfw75fXYPNUE/viewform?c=0&w=1&usp=mail_form_link-en. A kitöltött kérdőívek egy külön erre a célra létrehozott gmail fiókba érkeztek, ahonnan az adatokat exportáltuk feldolgozásra. A kérdőívek adatai a 2013-as évre vonatkoztak.

A kérdőív szerkezete:

- A résztvevő laboratórium adatai, vezetője, a kérdőívet kitöltő személy, elérhetősége;
- A laboratórium ellátási területe;
- Minta fogadás;
- *C. difficile* kimutatás;
- *C. difficile* diagnosztikában alkalmazott módszerek;
- További *C. difficile*-vel kapcsolatos vizsgálatok;
- Minőségbiztosítás, körvizsgálatban való részvétel.

Az értékelés során az eredményeket – párhuzamos kérdések esetén – összehasonlítottuk a 2012. évben a SZOTE KMDI munkatársai által végzett, a 2011. évi adatokra alapozott kérdőíves felmérés eredményeivel.

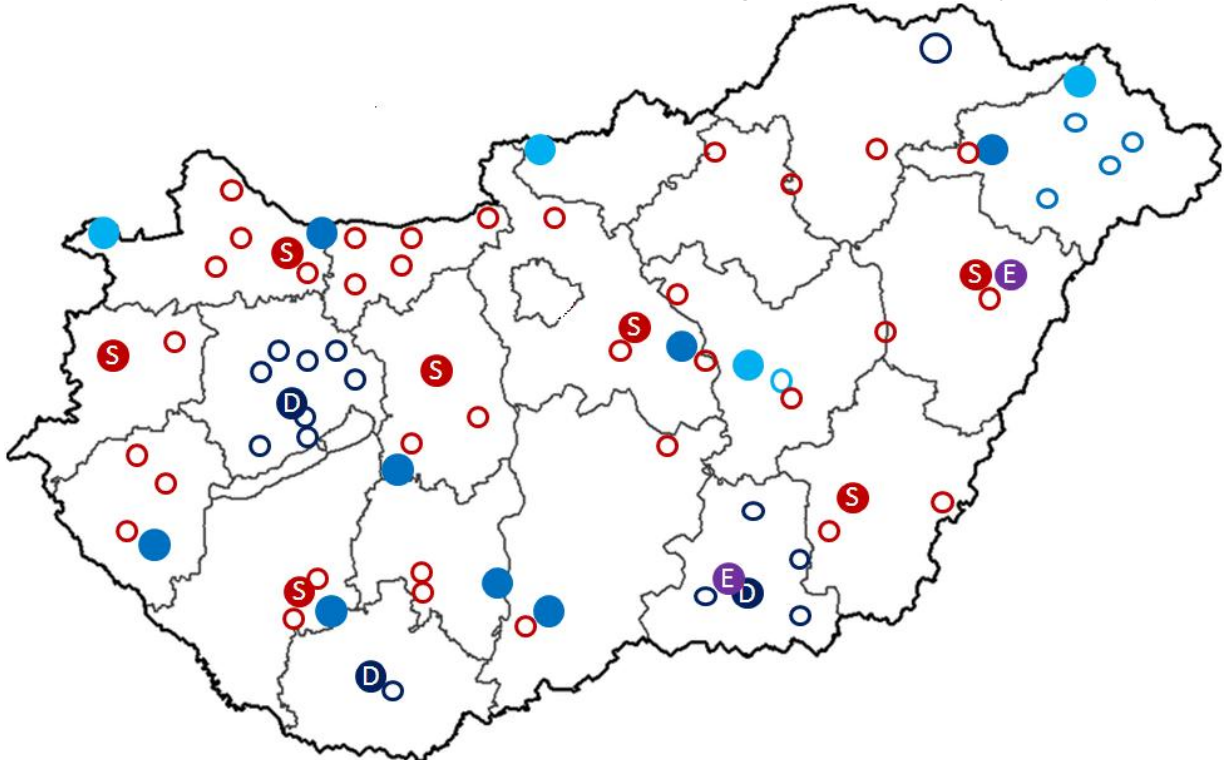
Eredmények

A kérdőívet 69 laboratórium részére küldtük ki, ebből 39 válaszolt. Hat laboratórium nem végez TCD irányú vizsgálatot, a kérdőívre adott válasz szerint az anyagot továbbítja fogadó laboratóriumba. Így 33 laboratórium adatait dolgoztuk fel.

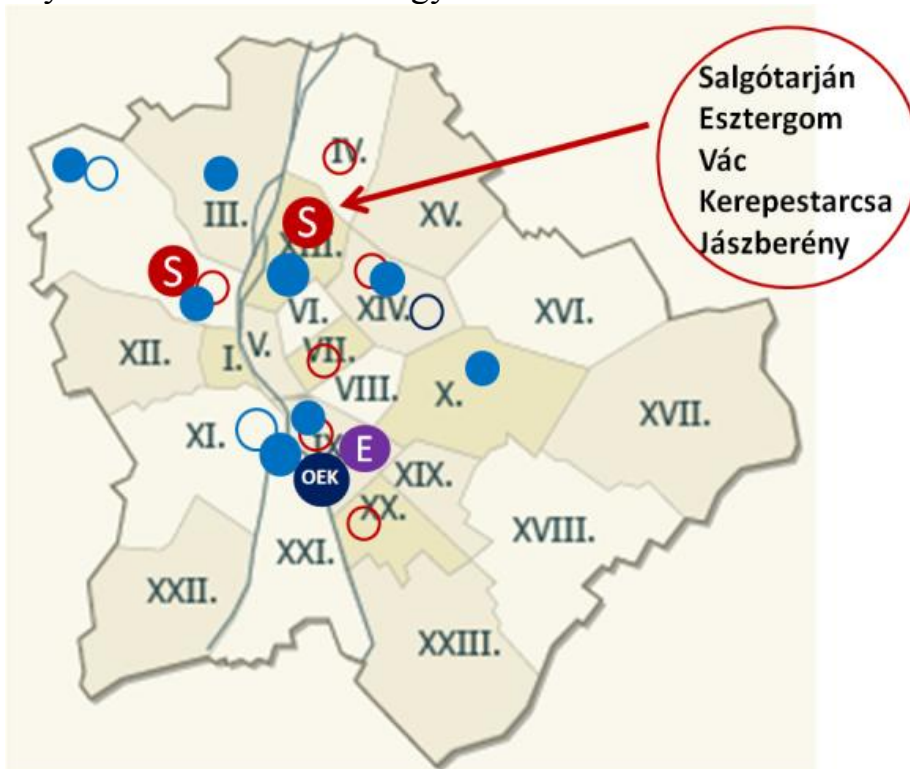
Mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumok területi eloszlása

A térképen azokat az intézményeket tüntettük fel, amelyekre vonatkozóan információt szereztünk TCD irányában végzett diagnosztikai vizsgálatokról. A kitöltött körök jelzik az anyagokat feldolgozó (fogadó) diagnosztikai laboratóriumokat, az üres körök pedig az anyagokat továbbító fekvőbeteg-ellátó (kiszolgált) intézményeket. A „D” jelzés (4 laboratórium) a NSzSz, az „E” (3 laboratórium) az egyetemi, az „S” a Synlab Kft. 7, ill a 2 budapesti laboratóriumát jelöli (1a).

Külön ábrán jeleztük Budapest és környéke laboratóriumait, mivel itt jelentős számban vannak a laboratóriumok és a fekvőbeteg-ellátó intézmények is (1b.)



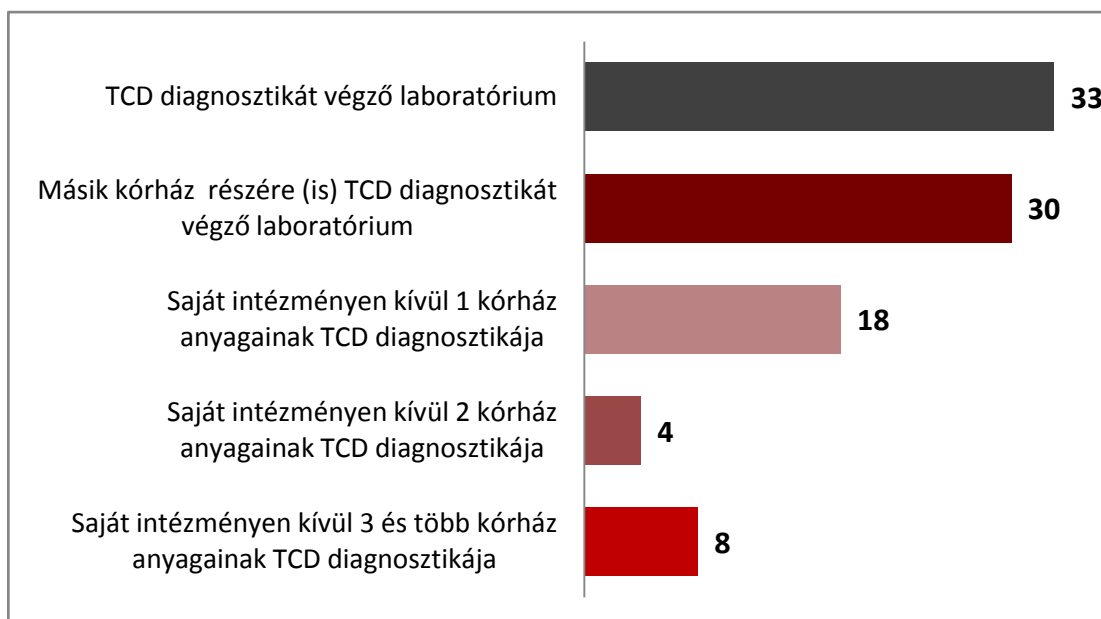
1. a. ábra Választ adó laboratóriumok és az általuk kiszolgált fekvőbeteg-ellátó intézmények területi eloszlása megyénként



1. b. ábra Választ adó laboratóriumok és az általuk kiszolgált fekvőbeteg-ellátó intézmények területi eloszlása Budapesten

Kiszolgált fekvőbeteg-ellátó intézmények száma laboratóriumonként

A választ adó TCD-vizsgáló laboratóriumok száma 33 volt, ebből 30 laboratórium saját vizsgálati anyagán kívül más fekvőbeteg-ellátó intézménytől is fogadott mintát: tíz laboratórium 1, négy laboratórium 2-3 kórház anyagát is feldolgozta 2013-ban. Nyolc laboratórium 3-nál több, számos esetben nagyobb régiók valamennyi intézményének vizsgálati anyagait gyűjtötte és dolgozta fel.



2. ábra Választ adó (n=33), TCD-diagnosztikát végző laboratóriumok és kiszolgált egészségügyi egységek (kórházak)

Ez az adatsor jelzi a vizsgálatok koncentrációját néhány laboratóriumban.

A kiszolgált (aktív és krónikus) fekvőbeteg-ellátó intézmények száma a kérdőívek összesítése alapján 83 volt, az ágyszám szerinti megoszlást az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat Fogadó laboratóriumok által kiszolgált (aktív és krónikus) fekvőbeteg-ellátó intézmények száma

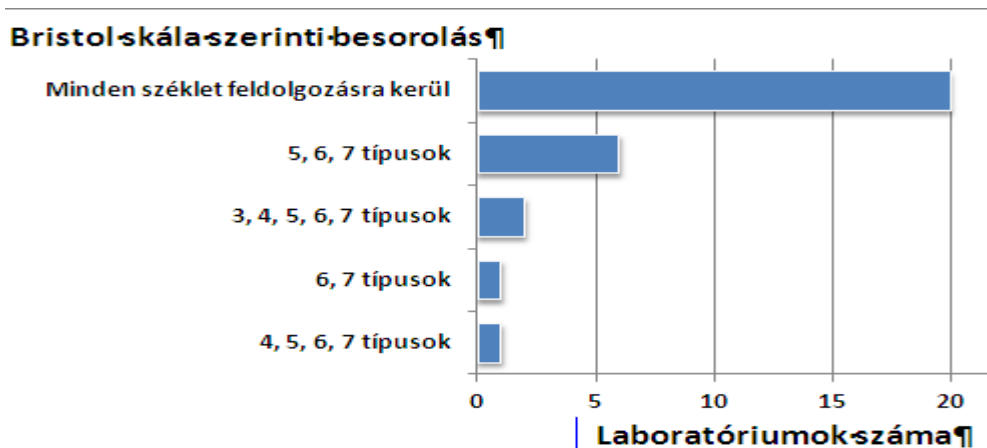
Intézetek besorolása aktív ágyszám szerint	Intézmények száma
650 feletti ágyszám	27
400-650 közötti ágyszám	19
200-399 közötti ágyszám	9
200 alatti ágyszám	16
Intézetek ágyszám megjelölése nélkül	12
Összesen:	83

17 laboratórium fogadott szociális intézményi beküldőktől is mintákat, a fekvőbeteg-ellátó intézményeken kívül, de csupán 7 laboratórium adott (24 szociális intézmény) választ az intézmények nevének feltüntetésével. 23 laboratórium háziorvosi rendelőből, 8 pedig egyéb beküldőktől (pl. munkaegészségügyi szolgáltatók) is fogad mintákat.

TCD-diagnosztika

TCD irányában diagnosztikát a választ adó laboratóriumok 84,6%-a végzett. Ez magasabb arány a 2011-ben gyűjtött adatokhoz képest (66,6%).

A székletminták Bristol-skála szerinti besorolását, ill. annak figyelembevételét a feldolgozás kritériumaként igen változatosan alkalmazták. A 33 laboratórium közül 30 válasza alapján az eredményeket a 2. ábra mutatja.

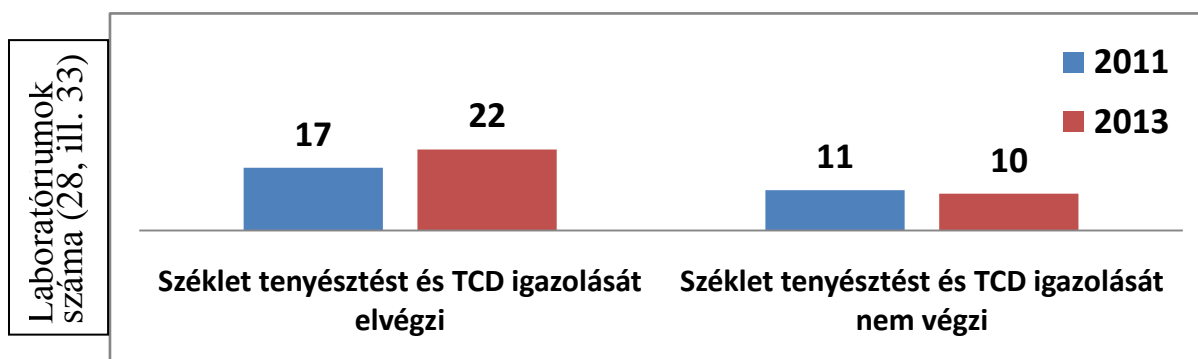


3. ábra TCD irányában feldolgozott minták Bristol-skála szerinti (3) megoszlása

Rendkívül magas az aránya a „Minden széklet feldolgozásra kerül” válasznak, melynek egyik oka lehetett, hogy a megelőző kérdések az enterális diagnosztikára, majd ezen belül a TCD-tenyésztésre vonatkoztak. A laboratóriumok csupán 20%-a alkalmazta a protokollnak megfelelő besorolás/feldolgozás ajánlást (5-7-es típus/besorolás), 10% 3-7, és 3% 4-7, 3 % 6-7-es besorolású mintákat dolgozott fel.

A választ adó 33 diagnosztikai laboratóriumban rutinszerűen végeznek enterális diagnosztikát, mely a bakteriális és virális kórokozókra egyaránt kiterjed.

A széklettenyésztéssel és visszaellenőrzéssel megerősítést is végző laboratóriumok aránya nőtt a kérdőívet kitöltő laboratóriumokban (4. ábra).



4. ábra Tenyésztéses és megerősítő vizsgálatokat (izolátum toxintermelés ellenőrzését) is végző laboratóriumok számának alakulása 2011., 2013.

A TCD-diagnosztikával kapcsolatos metodikai kérdésekre adott válaszok összesítése alapján a GDH antigén-kimutatást közvetlenül székletmintából, valamennyi (33) laboratórium elvégzi (ez az arány 2011-ben 90% volt) az A+B toxinkimutatását pedig 32 laboratórium állítja be.

A laboratóriumok 70%-a végez tenyésztést is a TCD kimutatására és visszaellenőrzésére az előzetesen elvégzett GDH, A+B toxin-gyorsteszt(ek) alkalmazása mellett.

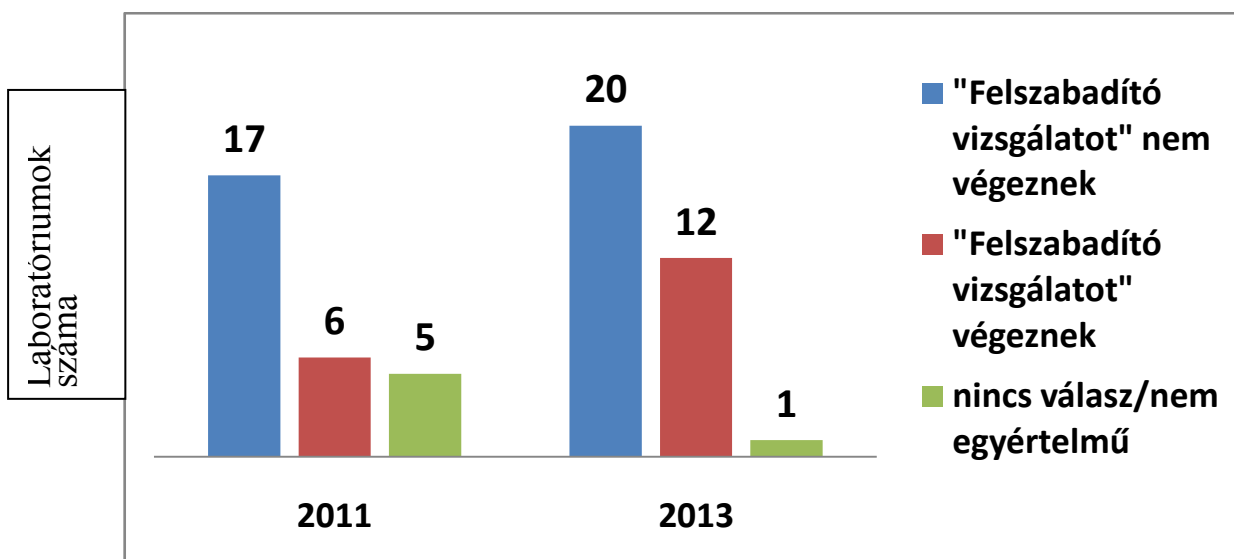
Algoritmus	Laboratóriumok %-a
Székettenyésztés és <i>C. difficile</i> izolálása, Direkt toxin A és B, valamint GDH-kimutatás	58%
Direkt toxinkimutatás A és B, GDH antigén-kimutatás	27%
Székettenyésztés és <i>C. difficile</i> izolálása, Direkt toxinkimutatás A és B	3%
Székettenyésztés és <i>C. difficile</i> izolálása, Direkt toxinkimutatás A és B, GDH antigén-kimutatás, antibiotikum-érzékenységi vizsgálat	9% (orvos kérésére)
GDH kimutatás	3%

2. táblázat A TCD diagnosztikai módszerek/algorithmus alkalmazása

A 28, választ adó laboratórium közül 6 jelölte meg, hogy már továbbított izolátumot ribotipizálási vizsgálatra, egy esetben a KMDI, öt esetben az OEK laboratóriumába.

A szűrővizsgálatok végzésével kapcsolatos kérdések alapján 2011-ben a választ adó laboratóriumok 39,2%-a végzett (szakmailag teljesen indokolatlanul) nem hasmenéses székletből szűrővizsgálatot, 2014-ben ez az arány már 72% volt!

„Felszabadító vizsgálatot” 12 laboratóriumban végeztek, ebből nyolc esetben a klinikus kérését jelölték meg a vizsgálat indokaként. Az eredményeket az 5. ábra mutatja.



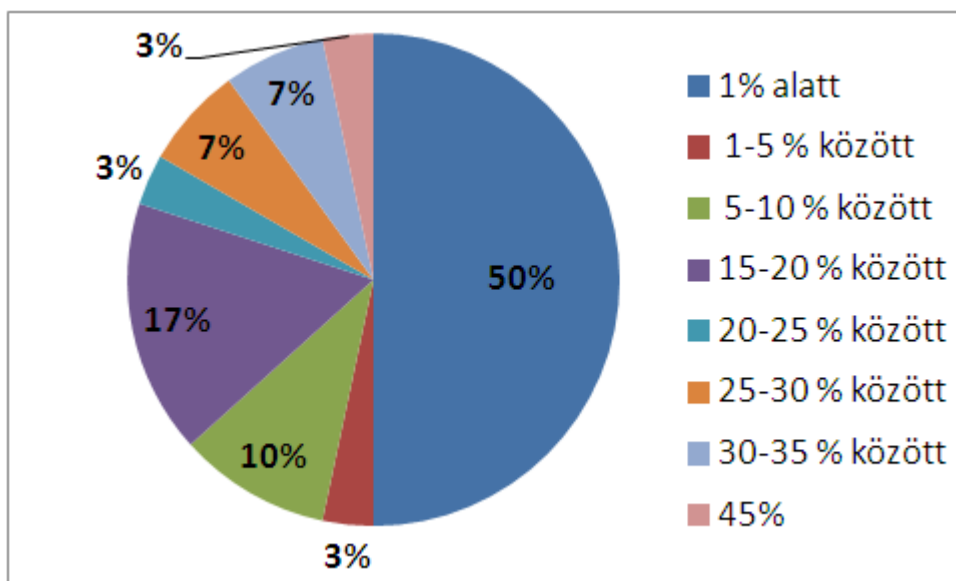
5. ábra TCD-„Felszabadító vizsgálatokat” végző laboratóriumok számának alakulása (2011 és 2013)

A választ adó laboratóriumok (30/33) 2013-ban összesen 238.392 székletmintát dolgoztak fel, célzottan (beküldő kérésére és/vagy székletminta állaga alapján) a TCD kimutatására 61.026 minta került. A pozitív minták aránya átlagosan 10,1% volt (6.164 TCD-pozitív mintát jelent).

A pozitivitási arány laboratóriumonként igen nagy szórást mutatott (0,1-45%) az ellátott fekvőbeteg-ellátó intézmények profiljának függvényében (pl. Egyesített Szent István és Szent László Kórház, 45%).

A 30 laboratórium közül 12-ben (37%) 15-45% volt a TCD-pozitívnak talált minták aránya. Ebbe a kategóriába tartozott pl. a Synlab 5, a NSzSz 2, valamint 2 nagy, és 2 kisebb budapesti kórház laboratóriuma. Ezek azok a laboratóriumok, melyek jelentős ellátási területtel rendelkeznek, több fekvőbeteg-ellátó intézmény anyagait dolgozták fel. Három laboratóriumban 5-10% között volt a pozitivitási arány. Mindhárom egység 650 aktív és krónikus ágy feletti, nagy területet ellátó (megyei, oktató) kórház saját központi laboratóriuma. Igen alacsony, 1% alatti pozitivitási arány azokra a kórházi mikrobiológiai laboratóriumokra volt jellemző, melyek kizárólag az adott kórház mikrobiológiai vizsgálatait anyagait dolgozták fel (15 laboratórium).

A pozitivitási arányok százalékos megoszlását a 6. ábra mutatja.



6. ábra TCD-pozitivitási arány alakulása 2013-ban (n=30)

További elemzésekre van szükség annak megállapítására, hogy az ellátó hely sajátosságain kívül (infektológiai osztály, központosított laboratórium, stb.) milyen tényezők játszhatnak szerepet a pozitivitási arány alakulásában.

Megbeszélés

Az utóbbi években a laboratóriumi szerkezet folyamatos változása, a módszerek, a forgalmazott diagnosztikai anyagok (kit-ek) és műszerek (automaták) kínálatának jelentős bővülése volt megfigyelhető. Ebből, és a TCD járványügyi sajátosságaiból eredően szükséges a nemzetközi gyakorlatnak is megfelelő, de a hazai gyakorlatban is alkalmazható laboratóriumi diagnosztikai irányelv, ill. módszertani ajánlás előkészítése. Ennek keretében elvégzett felmérés számos problémára mutatott rá.

A mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálatok, és ezen belül a TCD-diagnosztika néhány nagy/központi laboratóriumban koncentrált. Ennek a tendenciának számos előnye (lehet):

- a vizsgáló személyzet nagy tapasztalattal rendelkezik a TCD - diagnosztikában;
- gazdaságos a működtetés.

Az előnyök mellett a napi tapasztalat számos problémát is jelez, mely a diagnosztika eredményességét ront(hat)ja:

- mintavételtől a feldolgozásig eltelt idő (hétköznapi és hétvége, ünnepnapok) az adekvát kezelés megkezdését késleltetheti;
- szigorú tárolási és szállítási (fagyasztás, hűtés) követelmények biztosítása (nem megfelelés esetén a toxin elbomlását eredményezheti, pl. ál-negatív eredmény, plusz vizsgálatok végzése);

- az alkalmazott vizsgálatkérő lapok (indikáció, kezelési előzmények, stb.) különbözősége intézményenként (indokolatlan, pl. szűrővizsgálatok elvégzése);
- a mikrobiológus korlátozott konzultációs lehetősége infektológus, kórházhygiénés szakemberrel (pl. ismételt vizsgálatok kérése, antibiotikum-terápiával kapcsolatos konzultáció, stb.).
- rendkívül magas azoknak a laboratóriumoknak az aránya, amelyek valamennyi székletet feldolgozzák TCD irányába is. Gyakran a beérkező minták kísérőiratai nincsenek megfelelően kitöltve, a kérés indikációja hiányzik, viszont a körülmények gyakran lehetetlenné teszik a személyes konzultációt a kérő orvossal, így a laboratórium elvégzi a kért vizsgálatot nem hasmenéses mintából is.

A vizsgálati kérésekkel (beküldők), a diagnosztikával és a vizsgálati eredményekkel kapcsolatos kérdés rámutatott az alábbiakra is:

- A pozitivitási arány laboratóriumonként igen eltérőnek bizonyult: a nagyon magas, ill. igen alacsony arányt részben „helyi” sajátossággal lehetett magyarázni. Ezzel szemben számos tényezőben, mind a beszállítói terület, a logisztika, a fekvőbeteg ellátók, mind a Bristol-skála alkalmazása, diagnosztikai algoritmus tekintetében hasonló laboratóriumoknál is jelentős szórás volt tapasztalható, melynek feltárására további elemzések szükségesek (táptalajok, kit-ek, személyi feltételek, stb).
- A laboratóriumok jelentős része tenyésztést is végzett/végez, amely igen örvendetes (toxin jelenlétének kimutatása izolátumból), de a tenyészetek (sokszor helytelen) tárolása gyakran lehetetlenné teszi a további vizsgálatok, pl. a ribotipizálás elvégzését járványgyanú, vagy halmozódás esetén, melyet a Módszertani ajánlás, ill. a 2013-ban kiadott „Tájékoztató” előír.
- Indokolatlanul magas a szűrővizsgálatok száma, melynek hátterében gyakran az ápolási intézmények közötti beteg-áthelyezések, valamint a szociális intézmények által megkövetelt vizsgálatok állnak. Ennek szakmai indokoltsága megkérdőjelezhető, ezért központi intézkedés (is) szükséges a szociális intézmények felvételi követelményeinek áttekintésében.

Összefoglalás

A 2014-ben szervezett, a 2013-as évre vonatkozó kérdőíves felmérésben 39 laboratórium vett részt, közülük 33 laboratórium végzett konkrét diagnosztikai tevékenységet TCD irányában.

A válaszadók eredményei alapján a TCD diagnosztikájának hazai laboratóriumi kapacitása az ország jelenlegi vizsgálati igényeit kielégíti, azonban a hazai járványügyi helyzet indokolná a diagnosztikus vizsgálatok számának emelését a jelenleg is érvényes módszertani ajánlásoknak megfelelően.

A választ adó 33 laboratóriumban 2013-ban TCD irányába összesen 61.026 mintát dolgoztak fel. A laboratóriumok által megadott pozitivitási arány alapján az összes mintára vonatkozó átlagos pozitivitási arány 10,1% volt. Az alkalmazott diagnosztikai módszerek/algorithmus, kit-ek megfelelőek, 85%-ban követik a módszertani ajánlásban foglaltakat.

Több laboratórium nyilatkozott, hogy az elvégzett vizsgálatok gyakran klinikai indikáció nélkül, helytelen indikációval (pl. felvételi szűrővizsgálat) alapján történtek.

A laboratóriumok 61%-a tenyésztési módszerrel is igazolta a TCD jelenlétét, és az izolátumokat megőrizte. Problémát jelent ugyanakkor, hogy a NSzSz, vagy kórházhygiénikus által kért ribotipizálási vizsgálatok nem történtek meg, mivel az OEK-be beküldött izolátumok jelentős részét nem, vagy csak jelentős többletmunkával lehetett visszatenyészteni (idő, többletmunka, plusz költség). Ez felveti az alkalmazott tárolási technika megfelelőségének kérdését és szükségessé teszi a helyes gyakorlat megfogalmazását, ajánlás kidolgozását a laboratóriumok részére.

A 2015. április 9-i CDI szakmai nap az előadások mellett kiváló alkalmat teremtett a szakmai párbeszédre, a problémák felvetésére, vitára, melynek összegezésével lehet további lépéseket tenni a hazai TCD-diagnosztika fejlesztésére.

Irodalom

1. Supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level (2010-2014). <http://www.ecdisnet.eu>
2. Nagy Erzsébet: Európai összefogás a *Clostridium difficile* fertőzések ellen. 2014. december 15. 05:15, <http://www.medicalonline.hu>
3. Módszertani levél a *Clostridium difficile* fertőzések diagnosztikájáról, terápiájáról és megelőzéséről, (Epinfo 18. évfolyam 4. különszám, 2011.)
4. Nagy Erzsébet: Aktualitások a *Clostridium difficile* okozta infekciók epidemiológiájában, diagnosztikájában és terápiájában - európai kitekintés. LAM (Lege Artis Medicinæ), 2014;24(01-02)

5. *Clostridium difficile* infection in Europe A CDI Europe Report, 2013.
www.epgonline.org/anti-infectives-knowledge-network/index.cfm és
<http://www.dificlir.co.uk/section-choice>.
6. Urbán Edit: A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei. IME XII. évfolyam 8. szám 2013.

A *Clostridium difficile* infekciók hazai járványügyi helyzete a surveillance jelentések alapján

Kurcz Andrea, Hajdu Ágnes, Szőnyi Katalin, Strupka Veronika, Nyolczas Szilvia

Országos Epidemiológiai Központ Kórházi- járványügyi osztály

A CDI jelentések rendje Magyarországon

A toxintermelő *Clostridium difficile* (TCD) által okozott, sporadikusan előforduló fertőzések 2009. évig „enteritis infectosa” fertőzésként kerültek bejelentésre a kórokozó megjelölésével a hazai fertőzőbeteg-jelentőrendszer enterális surveillance alrendszerébe. A CD okozta nozokomiális vagy területi járványok jelentése nem tért és nem tér el a más etiológiájú járványok jelentésétől, a vonatkozó jogszabályok érvényesek rá.

A nozokomiális CDI (*Clostridium difficile* infekció) először önkéntes alapon történő regisztrálása a Nemzeti Nozokomiális Surveillance Rendszer (NNSR) online jelentési felületén (EFRIR) 2009. novemberétől vált lehetségessé. Az önkéntes jelentés első eredményeiből és a bejelentett CD okozta nozokomiális járványok 2010. évi megugró számából következtetni lehetett arra, hogy a CDI komoly járványügyi problémaként jelentkezik Magyarországon.

2011. márciusában az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) kiadta az infekciókontroll beavatkozások és a hazai surveillance alapját képező CDI módszertani levelet és Országos Tisztifőorvosi körlevél rendelte el minden fekvőbeteg intézmény számára a jelentést. 2012. májusától már jogszabály rendelkezik az egészségügyi ellátással összefüggő CDI személyes adatokkal történő bejelentéséről.

A kórházak jelentési kötelezettségét a 2014. február 1-jén hatályba lépett, a fertőző betegségek jelentésének rendjéről szóló 1/2014. (I. 16.) EMMI rendelet ismételten megerősítette. Egy új online jelentési felület (Országos Szakmai Információs Rendszer, OSZIR) 2015. január 1-jei indulásával a fekvőbeteg intézményekben kialakuló, egészségügyi ellátással összefüggő CDI regisztrálása a tervezett európai CDI surveillance módszertanához igazodva önálló modulként működik az NNSR-ben. A fekvőbeteg intézményekben kialakult fertőzések jelentése egyedi bejelentő lapokon, személyes adatokkal történik.

Hazánkban tehát a CD okozta nozokomiális járványok és a sporadikus, nozokomiális/egészségügyi ellátással összefüggő CDI előfordulásáról több éve vannak adataink. Ezeket az adatokat szervesen kiegészíti a 2012. év májusában

reprezentatív módon kiválasztott 29 hazai aktív fekvőbeteg-ellátó intézményben az európai módszertan alapján elvégzett, egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések pontprevalencia vizsgálatának (PPV) eredménye.

A CDI hazai kórházi járványügyi helyzete

Hazai adatok tehát az alábbi adatbázisokból állnak rendelkezésre:

- 1, NNSR CDI modul
- 2, Nozokomiális járványok
- 3, Európai pontprevalencia vizsgálat

1. NNSR CDI modul: Az NNSR-be jelentő intézmények száma évről évre folyamatosan nő. Az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP) által megjelentetett „Kórházi ágyszám- és betegforgalmi kimutatás” dokumentuma alapján, a jelentő kórházak betegforgalma a hazánkban ellátott fekvőbetegek közel 95%-át lefedte 2014-ben. A CDI incidenciája és incidencia sűrűsége a 2013. és 2014. között jelentősen nem változott. 2014. évben az incidencia 31,9 / 10.000 kibocsájtott beteg, az incidencia sűrűség 37,5 / 100 ezer ápolási nap volt. (1. táblázat)

A surveillance eredmények az OEK honlapján minden évben publikálásra kerülnek.

1. táblázat: *Clostridium difficile* által okozott egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések esetszáma, incidenciája és incidencia sűrűsége, Magyarország, 2013-2014

Év	Jelentő intézmények száma	Kibocsájtott betegek száma	Teljesített ápolási napok száma	Bejelentett CDI szám	Incidencia 10000 betegre*	Incidencia sűrűség 100 000 ápolási nap*
2013	85	1 943 941	16 859 789	6182	31,8	36,7
2014	90	2 051 141	17 476 277	6551	31,9	37,5

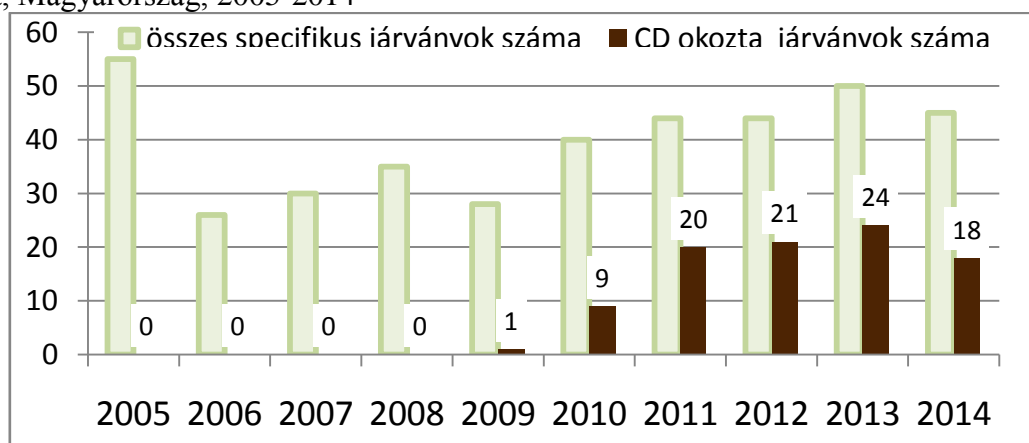
* incidencia = CDI fertőzések száma / kibocsájtott betegek száma *10.000

** incidencia sűrűség = CDI fertőzések száma / teljesített ápolási napok száma *100.000

2014. december 31-ig technikailag az NNSR Multirezisztens kórokozók okozta fertőzések (MRK) moduljába kerültek bejelentésre az egészségügyi ellátással összefüggő CDI esetek, míg 2015. január 1-től indult az NNSR-CDI önálló modul az OSZIR-ban. A fekvőbeteg-ellátó intézmények a betegekre vonatkozó alapadatokat, a fertőzésre vonatkozó adatokat, rizikótényezőket és mikrobiológia vizsgálatokra vonatkozó adatokat rögzítik. A jelentés módszertani alapja továbbra is a vonatkozó módszertani levél.

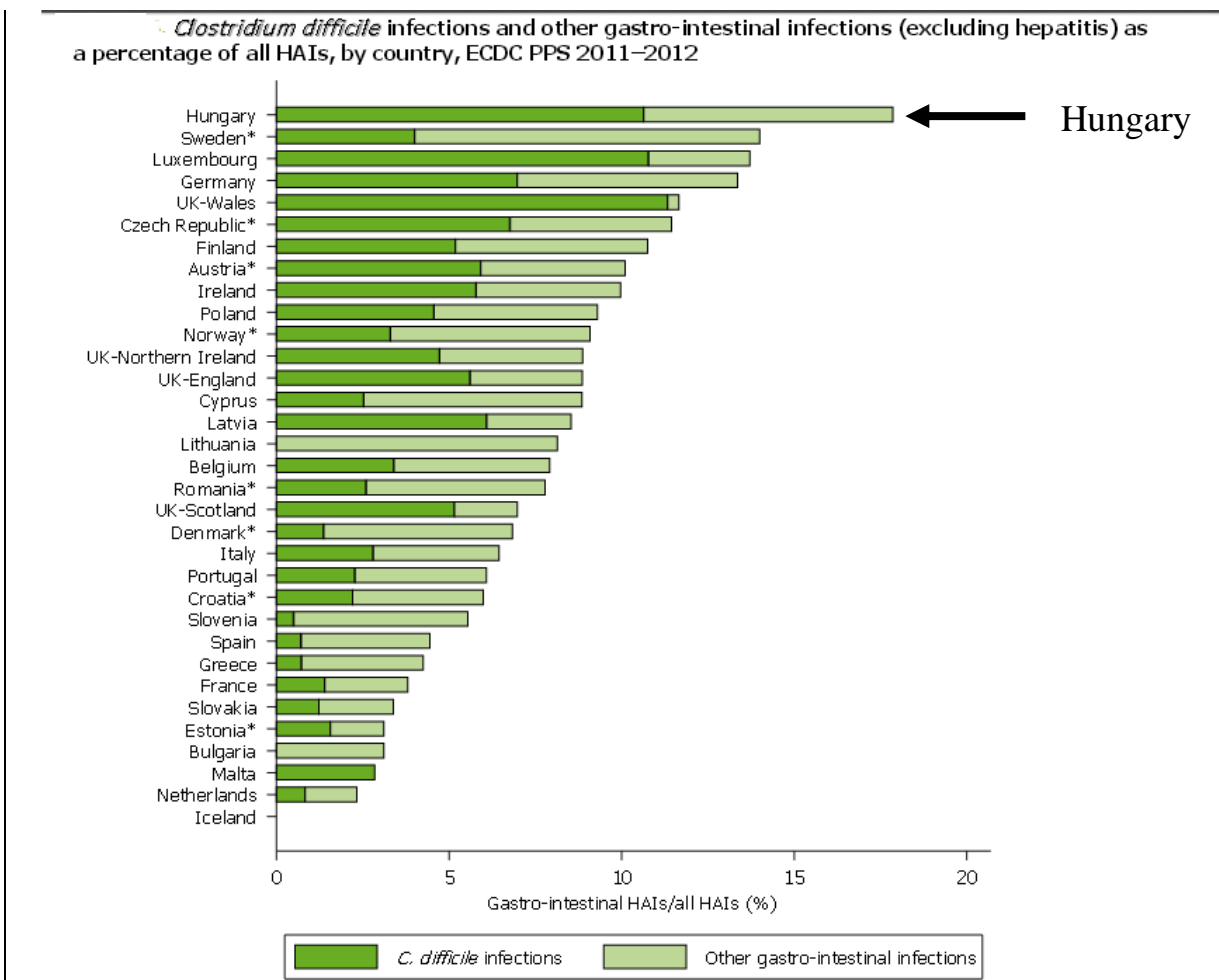
2, Nozokomiális járványok: Az egészségügyi ellátással összefüggő, CD okozta járványok bejelentett száma 2010-ben jelentősen megnőtt hazánkban (1. ábra). 2005. és 2008. között nem érkezett CD járvány jelentés, 2009-ben egy halmozódás került bejelentésre, 2010-ben kilenc járvány volt, majd az azt követő években 18-24 CDI járványt jelentettek. A CD okozta járványok az összes bejelentett nozokomiális enterális járvány 6,2%-át tették ki 2010-ben, míg 24,3%-át 2014-ben.

1. ábra: Specifikus nozokomiális járványok és azon belül a CD okozta járványok bejelentett száma, Magyarország, 2005-2014



3, Európai pontprevalencia vizsgálat: Az ECDC koordinációjával 2011. és 2012. között zajlott az egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések és az antimikrobiális szer felhasználás európai pontprevalencia vizsgálata, melyben valamennyi európai uniós tagállam több mint ezer aktív fekvőbeteg-ellátó intézménye vett részt. A hazai reprezentatív vizsgálat 2012. májusában zajlott, 29 aktív fekvőbeteg-ellátó intézmény és 10.180 ápolott részvételével. A CD okozta egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések az összes egészségügyi ellátással összefüggő fertőzés 10,6%-át tették ki az európai 3,6%-os arányhoz képest (2. ábra).

2. ábra: A CDI aránya az egészségügyi ellátással összefüggő gasztointesztinális fertőzések között országoként az Európai Pontprevalencia Vizsgálatban, 2011-2012.



Forrás : <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>

Az egészségügyi ellátással összefüggő CDI európai surveillance-a

Mivel az Európai Unió tagállamaiban jelenleg nem egységes a CDI surveillance módszere, az ECDC 2010-ben pályázatot írt ki az európai CDI surveillance fejlesztésére. A pályázatot az Európai *Clostridium difficile* Surveillance Hálózat (European *Clostridium difficile* Surveillance Network - ECDIS-Net) konzorcium nyerte. Az európai surveillance célja a standardizált módszertan kialakítása mellett többek között:

- A CDI teljes betegségterhének felmérése (beleértve a visszatérő eseteket és a kórházban kezelt területi eseteket) az európai aktív fekvőbeteg-ellátást nyújtó intézményekben;
- A CDI kedvezőtlen kimeneteleinek (pl. szövődmények, halálozás) felmérése;
- A CD törzsek antibiotikum érzékenységének, PCR-ribotípusának leírása, a TcdA, TcdB és a binary toxin jelenlétének meghatározása, és az újonnan felbukkanó, veszélyes CD típusok azonosítása helyi, országos és európai szinten.

A ECDIS-Net által kialakított és számos szakember közreműködésével véglegesített CDI surveillance protokoll több, lépcsőzetesen felépített surveillance modult javasol, melyeknek keretében a konszenzusos módszertannak megfelelően aggregált adatok, betegalapú járványügyi adatok, valamint részletes mikrobiológiai adatok is gyűjtendők.

(A protokoll online elérhetősége:

http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1402)

Az első surveillance periódus (min. 3 hónap) 2016. januárjában indul. OSZIR NNSR-CDI modul technikailag kompatibilis az európai surveillance-ban szereplő valamennyi modullal.

Hazai tipizálási adatok 2000 és 2010 között

Terhes Gabriella, Nagy Erzsébet, Urbán Edit

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

A 027-es PCR ribotípusú *Clostridium difficile* (*C. difficile*) törzs által okozott nagy kiterjedésű járványokkal a törzsek molekuláris tipizálása is egyre nagyobb hangsúlyt kap. A tipizálási módszerek segítségével követhetjük a CDI-t (*C. difficile* Infection) és az általa okozott járványokat, adatokat kaphatunk az egyes törzsek regionális vagy globális terjedéséről, követhető egy-egy virulensebb törzs cirkulációja.

Az elmúlt években ennek köszönhetően számos molekuláris tipizálási módszer terjedt el a törzsek típusának meghatározására. Minden esetben az alkalmazott módszert úgy érdemes megválasztani, hogy a törzsek nagy része tipizálható, az alkalmazott módszer megfelelően diszkriminatív, reprodukálható és könnyen kivitelezhető legyen. Az alkalmazott módszerek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók. Az 1980-as években a fenotipizálási, míg későbbiekben a genotipizálási módszerek terjedtek el. A fenotipizálási módszereket elsősorban alacsony reprodukálhatóságuk, alacsony diszkriminatív tulajdonságuk miatt kiszorították a genotipizálási módszerek, amelyek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: a band-alapú módszerek és a szekvencia alapú módszerek. Az 1990-es évek elejétől a band-alapú, míg a 2000-es évektől a szekvencia alapú módszerek terjedtek el. A band-alapú módszerek közül a legismertebb a hagyományos vagy kapilláris PCR ribotipizálás, a REA (Restriction Endonuclease Analysis), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), toxinotipizálás, MLVA (Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis). A szekvenálás alapú módszerek közül az MLST (Multilocus Sequence Typing) a legismertebb, míg a teljes genom szekvenálás, ugyan ígéretesnek mutatkozik, de a jelenlegi költségei miatt, csak néhány külföldi laboratóriumban elérhető. Európában főként a PCR ribotipizálás terjedt el, elsősorban a módszer egyszerűsége, a többi módszerhez képest alacsony költségigénye és gyors kivitelezhetősége miatt. A módszer alapjait Gutler és mtsai rakták le, a PCR a 16S és 23S rRNS-t kódoló gének által közrefogott ISR (Intergenic Spacer Region) szakaszok amplifikálásán és a keletkezett PCR fragmentumok gélelektroforézissel történő szétválasztásán és detektálásán alapszik.

Az elmúlt években az alap módszert számos kutatócsoport módosította. Voltak olyan változások, amelyek a primereket, míg mások a PCR körülményeket vagy a detektálási lépéseket módosították, ezért ma már lehetetlen (az amúgy is detektálási lépésekre érzékeny módszer esetén) az egyes országok adatainak összehasonlító vizsgálata. Sőt körvizsgálatok eredményei azt is kimutatták, hogy egy országon belül, a minden tekintetben azonos módszer

használata ellenére is, az egyes centrumok esetén eltérőek az eredmények. Jelenleg több mint 400-féle különböző ribotípus ismert, az egyes típusokra vonatkozó jellegzetességek pl.: band mintázat a nagyobb centrumokban többnyire korlátozott mértékben elérhető. A legtöbb európai ország egy korábbi vizsgálatsorozat segítségével hozzájuthatott az Európában leggyakrabban előforduló néhány ribotípust tartalmazó törzsgyűjteményhez, amelyet felhasználhatott a saját PCR ribotipizálási könyvtár kiépítéséhez. Ez azonban csak töredéke a már említett több mint 400 törzsnek, teljes könyvtár hiányában pedig nem határozhatók meg a ritkábban előforduló PCR ribotípusok. Mindezen korlátok miatt a PCR ribotipizálás jelenleg csak helyi összehasonlításokra, helyi járványok felismerésére alkalmazható. Egységes nevezéktan hiányában és a PCR ribotipizálást érintő apró változások miatt mára szinte lehetetlen az egyes országok adatainak összehasonlítása. PCR ribotipizálás esetén a termékek elválasztása során felmerülő problémák megoldására az elmúlt években egyre több országban alkalmazzák a kapilláris gélelektroforézist, amellyel a hagyományos módszerhez képest a szubjektivitás kiküszöbölhető, a detektálás standardizálása is egyszerűbb, de nem oldja meg a PCR ribotipizálási könyvtárral és a nevezéktannal kapcsolatos problémákat.

Szintén Európához (elsősorban Szlovéniához) köthető a toxinotipizálási módszer, amely esetén a PaLoc (Pathogenecity Locus) régió különböző szakaszait, elsősorban a fő toxinokat kódoló géneket és a regulátor régiókat PCR módszerrel amplifikálják, majd restrikciós enzimekkel emésztik. A keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel szeparálják és a kapott mintázat alapján történik az egyes típusok meghatározása. Az eredmények ugyan jól reprodukálhatók, de a diszkriminatív jellege a módszernek alacsony, egy toxinotípuson belül akár több PCR ribotípus is elkülöníthető ezért az epidemiológiai vizsgálatok során ritkán alkalmazzák.

Észak-Amerikában viszont a leggyakrabban alkalmazott tipizálási módszer a PFGE. A módszer alapja a genomiális DNS hasítása restrikciós enzimmel és a keletkezett termékek szeparálása PFGE segítségével. A módszert számos élelmiszer közvetítette patogén esetén alkalmazzák sikeresen, sikerült standardizálni és validálni, de ezek az erőfeszítések a *C. difficile* esetén kudarcba fulladtak. Munka- és időigényessége miatt ezt a módszert Európában szinte egyáltalán nem alkalmazzák. Az európai és amerikai eltérő irányvonal miatt, számos problémát okozott, hogy több közleményben az egyes törzsekhez többféle típus meghatározási eredményt is közöltek, amely a típusok számának növekedésével követhetlenné vált.

Az elmúlt években egyre gyakrabban alkalmazzák az MLST technikát, amely 7 háztartási gén 300 és 500 bp közötti szakaszának szekvencia meghatározásán alapul. Az MLST eredmények interpretálása objektív, jól reprodukálhatók és lehetőség van a laboratóriumok közötti információcserére, ezáltal az eredmények is összehasonlíthatók, ingyenesen elérhető egy MLST

könyvtár, ahová az egyes szekvenciák feltölthetők. Mindezen előnyök ellenére, sajnos a módszer terjedésének gátat szab a magas szekvenálási költség. Ugyanezen ok miatt a teljes genom szekvenálás szintén háttérbe szorul és csak néhány laboratórium esetén van lehetőség a módszer alkalmazására.

Magyarországon az elmúlt években évről évre követtük a *C. difficile* törzsek cirkulációját. 2001-ben 65, míg 2006-ban 105 törzs PCR ribotípusát határoztuk meg az eredeti a cardiff-i Anaerob Referencia Laboratóriumban kidolgozott módszerrel. Az első vizsgálati időszak alatt a 087, 012 és 001 PCR ribotípusok előfordulása volt számottevő, míg a második vizsgálati időszak alatt 014 és 002 PCR ribotípusok domináltak. A 2006-ban publikált eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy nemcsak vizsgálati időszakonként, de az országon belül az egyes régiókban is eltér az egyes PCR ribotípusok előfordulása. Szintén eltérő ribotípusok fordultak elő a fekvő-és járóbetegek esetén. 2007-ben az ország különböző területeiről származó *C. difficile* törzsek vizsgálata során találtunk egy olyan binary toxin-termelő törzset, amely a törzs további vizsgálatai során 027-es PCR ribotípusnak bizonyult. Az eset érdekessége volt, hogy ugyanezen időszak alatt a 027-es PCR ribotípus már kiterjedt járványt okozott Észak-Amerikában és számos európai országban, ugyanakkor a hazai törzsek között ebben az időszakban csak ez az egyetlen törzs bizonyult 027-es PCR ribotípusnak. Az epidemiológiai vizsgálatok során a binary toxin-termelő törzsek előfordulása a hazai toxintermelő törzsek között 1,9-5,3%-os volt, míg 2010-ben 101 törzs vizsgálata során a binary toxin-termelő törzsek előfordulása 42,6%-nak bizonyult. A nagymértékű emelkedés felhívta a figyelmet, egy esetleges binary toxin-termelő törzs által okozott járványra, mindezek miatt egy intenzív törzsgyűjtés indult 2010. májusától 2011. decemberéig. Ennek eredményeképpen 1.085 *C. difficile* törzs vizsgálatára került sor. A törzsek, mintegy 74,1%-a bizonyult A és B toxin pozitívnek, ezen törzsek 46,2%-a volt binary toxin-termelő. A binary toxin-termelő törzsek 97,8%-a pedig a 027-es PCR ribotípusba volt sorolható. A laboratóriumunkba küldött törzsek 20,7%-a nem volt alkalmas molekuláris vizsgálatra, ennek fő oka a törzsek nagyfokú szennyezettsége volt, valamint a nem megfelelő identifikálás.

A hazai és nemzetközi vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a *C. difficile* PCR ribotípusok megoszlása vizsgálati időszakonként, földrajzi területenként, kórházanként, járó-fekvőbetegek esetén is eltér. Hazánkban, mint ahogy számos európai országban 2010. óta jelentős problémát okoz a 027-es PCR ribotípusú törzs gyakori előfordulása, valamint a törzs által okozott helyi járványok. Az egyre gyakrabban megfigyelhető járványok miatt szükséges egy megfelelő, kellően diszkriminatív tipizálási módszer hazai alkalmazása és a törzsek cirkulációjának meghatározott időnként történő követése, amelyre a PCR ribotipizálás elérhető módszer, még hazai viszonyok mellett is.

Ugyanakkor mindenképpen szükséges a sikeres munkához a hazai laboratóriumok együttműködése, a megfelelő minőségű tenyészetek vagy minták biztosítása és a megfelelő szintű adatszolgáltatás.

Irodalom

1. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ: Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. Euro Surveill 2013, 18: 20381.
2. Terhes G, Brazier JS, Urbán E, Sóki J, Nagy E: Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. J Med Microbiol 2006, 55: 279-282.
3. Terhes G, Urbán E, Konkoly-Thege M, Székely É, Brazier JS, Kuijper EJ, Nagy E: First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 from a patient with severe persistent diarrhoea in Hungary. Clin Microbiol Infect 2009, 15: 885-886.
4. Urbán E, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI: PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. J Med Microbiol 2001, 50: 1082-1086.

Egy 2014-es hazai felmérés eredménye „capillary gel electrophoresis-based” PCR ribotipizálás módszer alkalmazásával

Tóth Judit¹, Fekete Eszter², Terhes Gabriella², Indra Alexander³, Pecavar Verena³, Kaltenecker Borbála⁴, Benczik Márta⁴, Urbán Edit², Osztie Hilda¹, Latkóczy Krisztina¹, Nagy Erzsébet²

¹Synlab Hungary Kft, Synlab Budapest Diagnosztikai Központ, Mikrobiológiai Laboratóriuma, Budapest

²SZTE, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

³Agency for Health and Food Safety (AGES), Bécs

⁴Synlab Hungary Kft, Synlab Budapest Diagnosztikai Központ, Genoid Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriuma

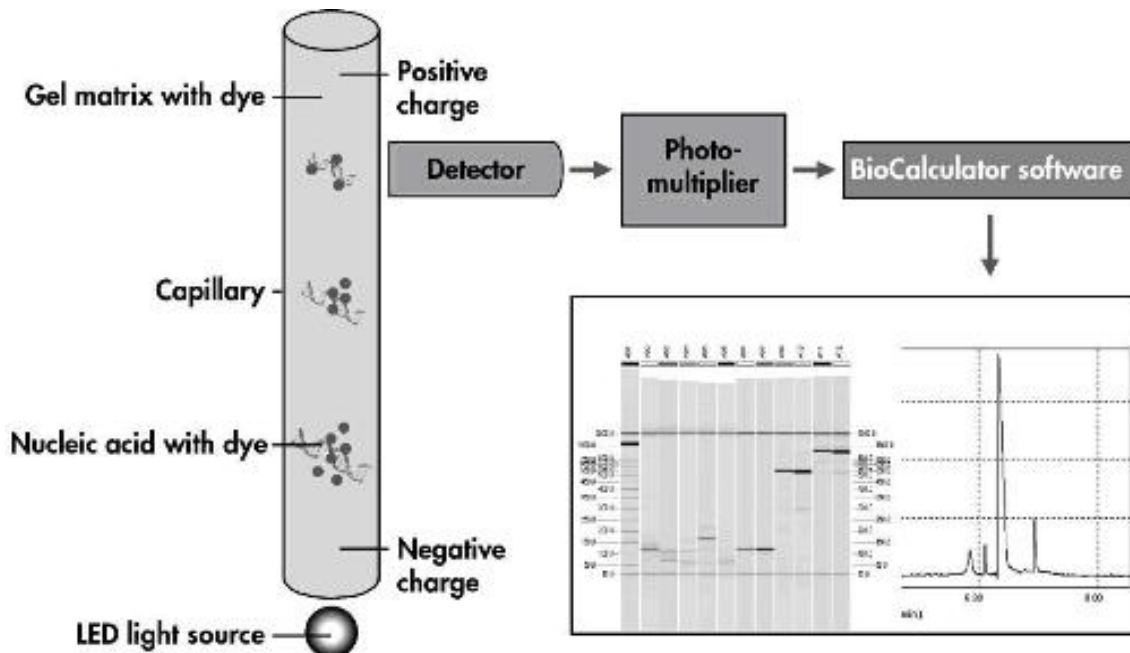
A *Clostridium difficile* fertőzés következményeként kialakuló hasmenéses megbetegedés napjainkban gyakori kórházi fertőzés, mely elsősorban az idősebb korcsoportot érinti és nem egyszer direkt vagy indirekt oka a halálzásnak. Az egészségügyi ellátással összefüggő *C. difficile* infekció (CDI) epidemiológiájának változása részben egy új, virulens *Clostridium difficile* törzsnek köszönhető, a PCR 027 ribotípusnak, mely a 2000-es évek elejétől súlyos lefolyású kórházi járványokat okozott Kanadában, az Egyesült Államokban és az Egyesült Királyságban, majd több nyugat-európai országban [1]. Jellemző még e típusra a magas visszaesési arány és jelentős halálzás, különösen az idősebb betegek körében. 2008-ban 34 európai ország részvételével végzett kórházi vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy kontinensünkön a nozokomiális CDI esetek körében a 014/020 (16%), a 001 (9%), és a 078 ribotípus (8%) a leggyakoribb [2, 3].

A ribotípusok vizsgálatára számos tipizálási módszert fejlesztettek ki, mint például a multi-locus szekvencia tipizálás, restriktációs endonukleáz tipizálás, toxintipizálás, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), PCR ribotípus meghatározás agaróz alapú gélek elektroforézissel, melyek segítségével a járványos terjedés követhető, illetve az egyes virulens törzsek elkülöníthetők [4,5,6]. Az így kapott eredmények segítségével követhetjük a megjelenő járványokat, igazolhatunk visszatérő eseteket, karakterizálhatunk endémiás törzseket, és jellemezhetjük utóbbiak terjedését. A ribotípusok vizsgálatát Magyarországon a szegedi Klinikai Mikrobiológiai Intézetben kezdték el vizsgálni 2001-ben, először a klinikákon előforduló törzsek megoszlását vizsgálták [7], majd ezt az egész országra kiterjedő ribotípus eloszlás vizsgálata követte 2006-ban [8, 9]. Az utóbbi időben fejlesztésre kerültek más technikák is a *C. difficile* különböző törzseinek elkülönítésére/csoportosítására. Az eddig széles körben használt metodikák, mint például a klasszikus PCR ribotipizálás agaróz alapú gélek elektroforézissel, kis mértékben átalakításra került, ezáltal a vizsgálat kivitelezése könnyebbé vált, valamint az analízis ideje töredéke lett az addiginak [10].

Számos közlemény foglalkozik a *C. difficile* epidemiológiájával, melyek a fertőzést okozó törzs ribotípus variánsainak földrajzilag diverz képét mutatják, nem csak helyileg, hanem országoként is.

A legtöbb *C. difficile* fertőzés epidemiológiájával foglalkozó tanulmány helyi, vagy nemzeti szinten vizsgálja a megoszlást, és sajnos többféle, ribotípus meghatározására alkalmas módszert vesz igénybe. Éppen ezért problémás lehet az ilyen módon meghatározott ribotípusok összehasonlítása, vagy átfogó epidemiológiára vonatkozó analízis elkészítése. Európában a legelterjedtebb technika, melyet PCR ribotípus meghatározásra alkalmaznak, az agaróz gél elektroforézis. Utóbbi elég magas szenzitivitást és specificitást mutat, valamint hasonlóan más PCR alapú technikához jó reprodukálhatóságot biztosít, de nem standardizált technika, a laboratóriumok között magas a variabilitás a band-ek mintázatában, így az interpretálásban is. Ennek következtében a különböző centrumokban kapott adatokat nehéz összehasonlítani [11]. Átütő újdonságot jelentett Indra és munkatársai 2008-ban publikált közleménye, melyben a kapilláris gélelektroforézis alapú PCR ribotipizálást használták. Ezen technika esetén kevesebb ciklust állítottak be a cél szekvencia felsokszorozására, valamint az elektroforézis idejének csökkentésével és a batch nagyság növelésével egy gyors, standardizálható, költséghatékony módszert fejlesztettek ki [12]. A módszer standardizálását Wilcox és munkatársai 2015. februárjában publikált cikke fejt ki [11].

A technika lényege a felsokszorozott célszekvencia gélen való futtatásáig nagyjából megegyezik. Míg az agaróz gélelektroforézis esetében agaróz gélen történik a különböző nagyságú fragmentek elválasztása és vizualizálása, addig a kapilláris gélelektroforézis esetében a DNS fragmentek elválasztása egy kis átmérőjű kapillárisban történik, ahol az egyes fluoreszcensen jelölt DNS darabok nagyságuk szerint különböző sebességgel vándorolnak az elektromos térben, amelyeket egy detektor érzékel, a fluoreszcens jelet ezt követően egy biokalkulátor software segítségével csúcsok formájában jelenít meg. Minden egyes csúcs egy meghatározott nagyságú DNS fragmentnek felel meg, és a software segítségével az egy mintában előforduló csúcsok mintázata egy meghatározott ribotípust takar (1. ábra).



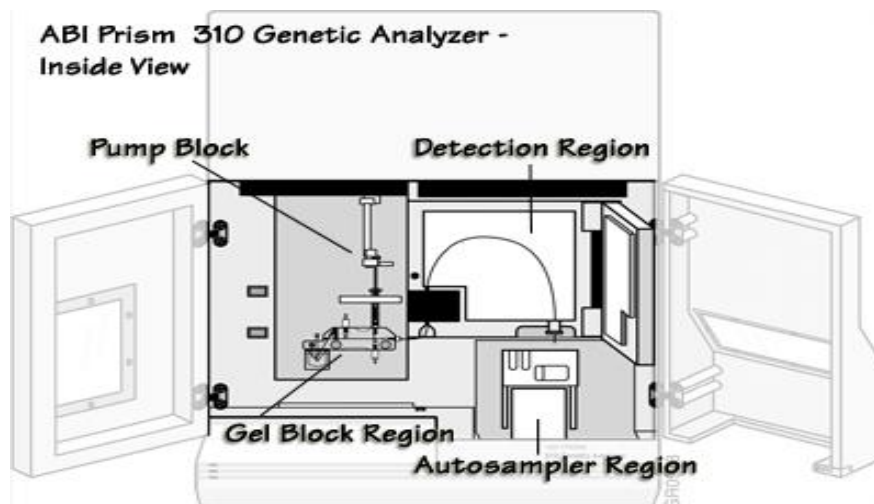
1. ábra Kapilláris gélelektroforézis sematikus ábrája

A fragmentek elválasztása és a kapott eredmény kiértékelése sokkal kevesebb időt vesz igénybe, mint az agaróz gélelektroforézis, ahol az agaróz öntése, a futtatáskörülményei, a fragmentek láthatóvá tétele és mintázatuknak kiértékelése nagy gyakorlatot igényel.

Az általunk végzett tanulmány célja volt az ország két mikrobiológiai centrumában gyűjtött *C. difficile* törzsek ribotípus megoszlásának vizsgálata egy eddig nálunk nem használt technika segítségével, a kapilláris gélelektroforézis alapú PCR ribotipizálással.

Vizsgálatunk egy kooperáció eredményeként jöhetett létre, mely a Szegedi Tudomány Egyetem, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, az Agency for Health and Food Safety (AGES), valamint a Synlab Hungary Kft. részvételével valósult meg. Munkánk során vizsgálatainkat a szegedi Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetben és a Synlab Hungary Kft. Laboratóriumaiban 2014. január és október hónap között gyűjtött 96 – 96 db A+B toxintermelő *C. difficile* törzsön végeztük. A Szegeden gyűjtött törzsek mindegyike fekvőbetegektől származott, akik az Egyetem különböző klinikáin feküdtek, míg a Budapesten gyűjtött törzsek közül 70 kórházi fekvőbetegtől, 26 járóbetegtől küldött mintából került izolálásra. A Budapesten gyűjtött törzsek legnagyobb hányada, 53%-a Budapestről és Pest megyéből származott, de jelentős arányban, 34%-ban vontunk be a vizsgálatba kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Kórházból és a Kiskunhalasi Semmelweis Kórházból is A+B toxin pozitív *C. difficile* törzseket. Néhány izolátum Nógrád és Komárom-Esztergom megyéből származott.

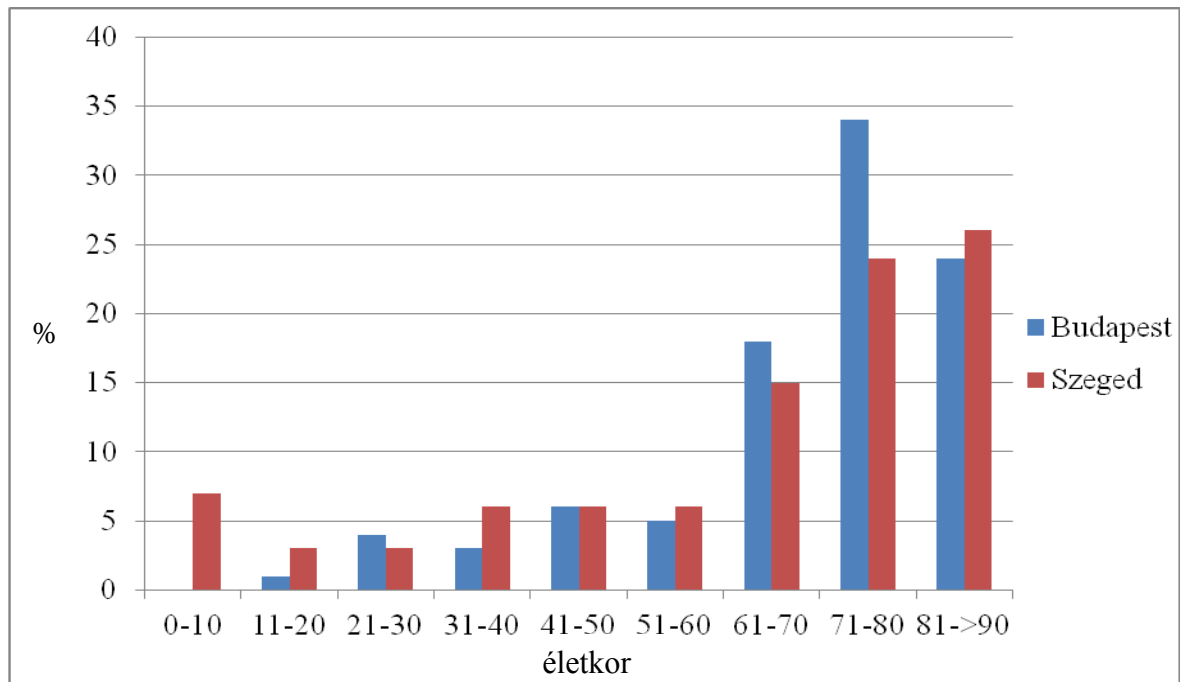
A PCR ribotipizálás kapilláris gélelektroforézissel Bécsben, az AGES intézetében történt. *C. difficile* törzsek 24 órás agar lemez tenyészetéből Chelex-100 gyanta segítségével DNS extrakciót végeztünk és az izolált DNS-t vittük ki Bécsbe. A PCR amplifikációhoz felhasznált primerek megegyeztek a Bidet és munkatársai [13] által leírt 16S-23S intergénikus spacer régióra tervezett primerekkel, annyi módosítással, hogy a 16S primer 5' vége karboxifluoreszcinnel (FAM), hexaklorofluoreszcinnel (HEX), vagy tetraklorofluoreszcinnel (TET) lett jelölve. A templát DNS 1:20 hígítását használtuk a PCR során, ahol a reakcióelegy továbbá HotStart Taq Master Mixet és 10pmol/μl koncentrációban a primerpárt és PCR tisztaságú vizet tartalmazott. A PCR program 15 perc 95°C-on történő enzim aktivációval kezdődött, melyet 1 perc 95°C-os denaturáció, 1 perc 57°C annealing és 1 perc 72°C elongáció követett 22 cikluson keresztül. Ezt követően a kapott PCR fragmentek analízise ABI310 genetikai analizátorban történt (2. ábra), POP-4 szeparációs mátrixon. A minták injektálása 5kV-on történt 5 percig és a teljes futtatási idő 30 perc volt 15kV feszültségen. A kapott csúcsok nagyságának meghatározása Peak Scanner software 1.0 (Applied Biosystem) segítségével történt.



2. ábra ABI Prism 310

A kapilláris gélelektroforézis alapú PCR ribotípusok kiértékeléshez egy web-alapú adatbázis (<http://webribo.ages.at>) került kifejlesztésre.

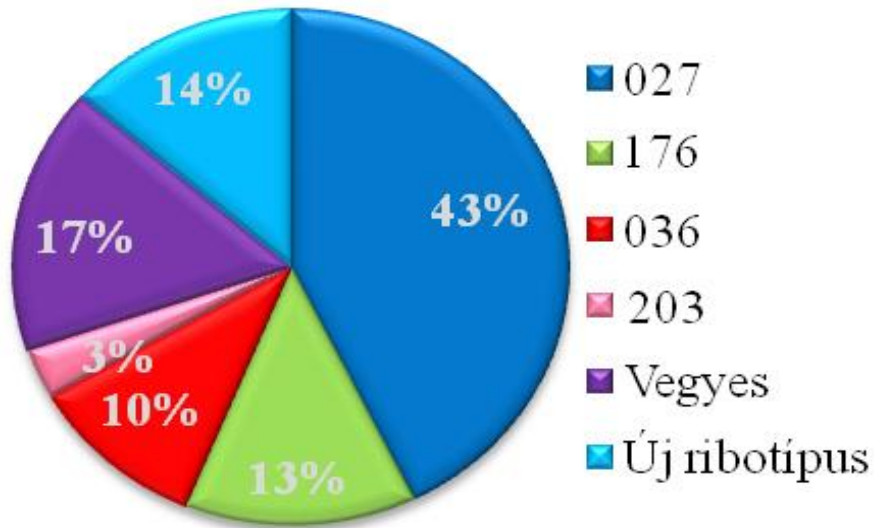
A vizsgált betegek életkor szerinti megoszlása a várakozásnak megfelelően, az idősebb páciensek körében mutatott emelkedett számú esetet (3. ábra).



3. ábra A betegek életkor szerinti megoszlása, akiktől a *C. difficile* törzsek izolálásra kerültek

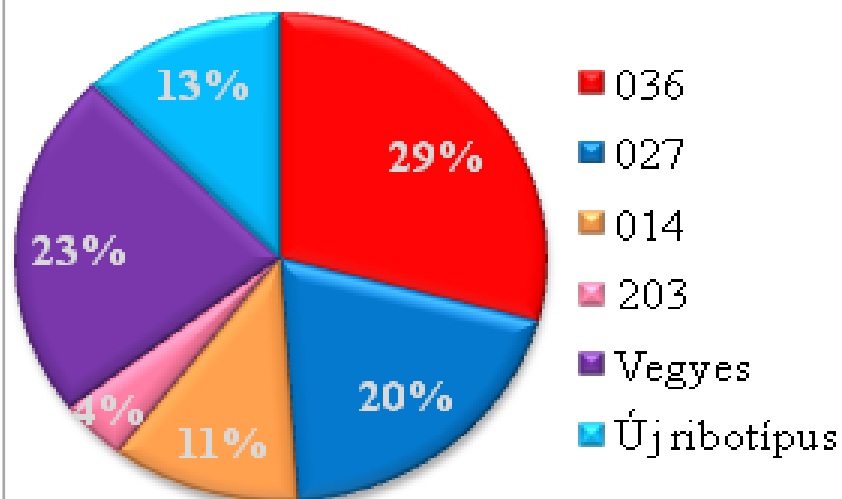
Eredményeink szerint a Budapesten gyűjtött törzsek esetében a leggyakoribb a 027-es ribotípus volt, mind a járóbetegek, mind a fekvőbetegek körében, ezt követte a 176 (13%) és a 036 (10%) PCR ribotípus. A Szegeden gyűjtött törzsek esetében a 036 (29%) PCR ribotípus volt a legelterjedtebb, melyet a 027 (20%) és a 014 (11%) PCR ribotípus követett. A Budapesten gyűjtött járó- és fekvőbetegektől származó törzsek összehasonlításakor azt találtuk, hogy a járóbeteg szakellátáson jelentkező páciensektől származó törzsek esetén a második leggyakoribb ribotípus a 176 (27%) volt, mely a 027 ribotípushoz hasonló hipervirulens törzs [13]. A Budapesten gyűjtött törzsek között a harmadik leggyakoribb PCR ribotípus a 036 volt. Ezen törzs területi eloszlásának vizsgálatokor fény derült arra, hogy a kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Kórházból gyűjtött izolátumok esetében ez a ribotípus a leggyakoribb, itt megelőzi a 027 PCR ribotípust. A Budapesten gyűjtött törzsek esetében 17%-ban, a Szegeden gyűjtött izolátumoknál 23%-ban találtunk vegyes PCR ribotípust, ami a kis számban előforduló ribotípusokat foglalja magában, mint például többek között a 003, 010, 012, 018, 020, 026 és 449 PCR ribotípusok (4. ábra). E ribotípusok között kitűnt, hogy a szegedi törzsek esetében 5 izolátumnál, a Budapesten gyűjtött törzsek között 1 esetben volt kimutatható az AI ribotípus, mely egy Ausztriában elterjedt ribotípust takar.

Budapesten gyűjtött törzsek



Vegyes ribotípusok: 003, 012, 018, 020, 070, 078, 087, 126, 449, 484, 653, **AI (1 izolátum)**

Szegeden gyűjtött törzsek



Vegyes ribotípusok: 010, 012, 018, 020, 056, 066, 078, 126, 209, 430, 449, 541, **AI (5 izolátum)**

4. ábra Szegeden és Budapesten gyűjtött törzsek ribotípus megoszlása

Összefoglalásként megemlíthetjük, hogy munkánk során egy új, Magyarországon eddig még nem alkalmazott technika használatára nyílt lehetőségünk a *C. difficile* törzsek típus meghatározása során. Ez a metodika rövidebb időt vesz igénybe, mint az eddig rutinban használt módszereké, valamint az eljárás standardizált, így a kapott eredményeink akár más országok ribotípusaival is összevethetők.

Irodalom:

1. Nagy E: Aktualitások a *Clostridium difficile* infekciók epidemiológiájában, diagnosztikájában és terápiájában – európai kitekintés. *Lege Artis Medicinae* 24(1-2) 25-33 (2014)
2. Böröcz K, Hajdu Á, Pászti J.: Összefoglaló az egészségügyi ellátással összefüggő *Clostridium difficile* fertőzések hazai járványügyi helyzetéről. *Epinfo* 2013; 20: 169-173.
3. file:///C:/Users/user/Downloads/C_difficile_OEK_Modszer_tani_Level_vazlat.pdf
4. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, et al.: Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis pulsed-field gel electrophoresis, PCR—ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2008;46: 431–437.
5. 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)
6. O’Neill GL, Ogunisola FT, Brazier JS, Duerden BI.: Modification of a PCR-ribotyping method for application as a routine typing scheme for *Clostridium difficile*. *Anaerobe.* 1996;2: 205–209.
7. Urban E, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI.: PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. [J Med Microbiol.](#) 2001 Dec;50(12):1082-6.
8. Terhes G, Brazier JS, Urbán E, Sóki J, Nagy E.: Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. [J Med Microbiol.](#) 2006 Mar;55(Pt 3):279-82.
9. Terhes G, Urbán E, Konkoly-Thege M. et al.: First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotyp 027 from a patient with severe persistent diarrhoea in Hungary. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 885-886.
10. Stubbs SL, Brazier JS, O’Neill GL, Duerden BI.: PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 461–463.

11. Fawley W. N, Knetsch C. W, MacCannell D. R, Harmanus C, Du T, Mulvey M. R, Paulick A, Anderson L, Kuijper E. J, Wilcox M. H.: Development and Validation of an Internationally-Standardized, High-Resolution Capillary Gel-Based Electrophoresis PCR-Ribotyping Protocol for *Clostridium difficile*. PLOS ONE 2015 Febr. DOI: 10.1371
12. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, Wewalka G, Allenberger F, Kuijper E. J.: Characterisation of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J. Med. Microbiol. 2008, 57, 1377-1382
13. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit J. C.: Developement of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. 1999. FEMS Microbiol Lett 175, 261-266.
14. Krutova M, Matejkova J, Nyc O.: *Clostridium difficile* ribotype 027 or 176? Folia Microbiol (Praha). 2014 Nov; 59(6):523-6.