

Методично указание за микробиологична диагностика и докладване при изследване на фецес за *Clostridium difficile*

Адаптиран превод от основен документ: „Стандарти на Агенцията по Обществено здраве във Великобритания (Public Health in England, PHE) за микробиологични изследвания. B10: Инструкция за изследване на клиничен материал (фецес) за *Clostridium difficile*”

Изготвил: гл.ас. Елина Добрева, дм, занимаваща се с диагностика, потвърждение и молекулярно характеризирание на изолати *Clostridium difficile* в НРЛ «КМАР», отдел «Микробиология» при НЦЗПБ

Съдържание

Цел на стандартите за микробиологично изследване

Цел на инструкцията за изследване на фецес за *Clostridium difficile*

Въведение

Техническа информация/Ограничения

1. Мерки за безопасност в хода на работата
2. Вземане и събиране на материали
3. Транспорт и съхранение на материалите
4. Процедури по обработка на материалите
5. Докладване на резултатите.

Библиография

Цел на стандартите за микробиологично изследване

Стандартите за микробиологично изследване са основен документ за специалистите, работещи в сферата на лабораторната медицина, както и за тези, занимаващи се с контрола на инфекциите в Агенцията по обществено здраве във Великобритания (PHE). Документите предоставят информация на клиницистите, относно видовете изследвания и мястото- лабораторията, в която могат да бъдат извършени.

Стандартите обхващат целия препоръчителен микробиологичен алгоритъм, включващ преаналитични (клинични симптоми), аналитични (лабораторни изследвания) и постаналитични етапи (интерпретация на резултатите и докладване).

Цел на инструкцията за изследване на фецес за *Clostridium difficile*

Вид на клиничен материал

Фецес

Настоящата инструкция описва методи за култивиране и идентификация на *Clostridium difficile* от фецес. Препоръчва се всички клинични материали да бъдат изследвани първо с диагностичен тест (toxin detection kit) за доказване на токсини или да бъде проведен анализ за определяне на клетъчна цитотоксичност. В регионалните микробиологични лаборатории трябва да се съхраняват фецесите с положителен резултат за продукция на токсини. Токсин-позитивните фецеси се култивират и получените изолати се характеризират чрез PCR-риботипиране в “*C. difficile* Ribotyping Network” във Великобритания (CDRNE). Проучването на изолатите може да е свързано с обследване на въреболничен взрив.

В нашата страна генетични анализи, свързани с:

- идентификация и потвърждение на *Clostridium difficile* в клиничен материал (фецес) и на култура чрез доказване на гените за глутамат дехидрогеназа (*gluD*) и токсин В (*tcdB*);
- доказване на гените, кодиращи синтеза на токсинА (*tcdA*) и бинарен токсин (*cdtA* и *cdtB*);
- проучване на епидемиологична и генетична връзка на изолати *C. difficile* при вътреболнични взривове чрез методи за типизиране

се извършват в НРЛ “Контрол и Мониториране на антибиотичната резистентност (КМАР)”, отдел Микробиология в НЦЗПБ

Адрес: гр.София- 1504

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)

Отдел Микробиология

НРЛ „Контрол и Мониториране на Антибиотичната резистентност (КМАР)”

Бул. „Янко Сакъзов” № 26

Зав. лаб. Доц. д-р Иван Иванов, дм

Тел. за контакти: + 359 2 944 69 99, в. 208; 02/ 944 69 99

Въведение

Инфекция, причинена от *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* Infection, CDI) и Диария, свързана с антибиотичното лечение (Antibiotic Associated Diarrhoea, AAD)

C. difficile е Грам-положителен, спорообразуващ и строг анаеробен бактерий. Вегетативните клетки на *C. difficile* са по-големи по размер, в сравнение с клетките на други бактериални видове. Образуват устойчиви субтерминални спори, които издържат месеци и години в околна среда. Подвижността на бактериите се определя от перитрихно разположени флагели. Името на причинителя (*difficile*) идва от трудностите, които се наблюдават при неговото култивиране и характеризиране³. Токсигенните щамове *C. difficile* продуцират токсини (протеини), наречени токсин А (ентеротоксин) и токсин В (цитотоксин), които са важни фактори на вирулентност⁴. Техният синтез се кодира от хромозмни гени. Гените *tcdA* и *tcdB* кодират синтеза на токсин А и съответно токсин В. Те са локализирани на острова на патогенност на *C. difficile* (Pathogenicity Locus, PaLoc). Щамове *C. difficile*, които нямат PaLoc, не носят генетична информация за синтез на токсини. В PaLoc са локализирани и други гени: *tcdC*, *tcdD* и *tcdE*. Гените *tcdC* и *tcdD* са отговорни, респективно за негативния и позитивния контрол на токсин-кодиращите гени. Функцията на *tcdE* не е напълно изяснена, но се предполага, че е свързана с освобождаването на токсините от клетката. Щамове *C. difficile* тип 027/BI/NAP1 имат 18bp делеция в *tcdC* гена и продуцират токсините А и В в много по-високи нива в сравнение с други познати риботипове *C. difficile*. При риботип 027 (както и при 023, 078) се доказва и трети токсин, наречен бинарен токсин (CDT токсин). Бинарният токсин е изграден от две субединици (субединица А и субединица В), които се кодират от гените *cdtA* и *cdtB*.

Повечето от заболяванията, асоциирани с *C. difficile* (CDAD) са гастроинтестинални инфекции, но макар и по-рядко патогенният бактерий може да бъде изолиран и от материал, различен от фецес, като кръв или някаква тъкан⁹.

Промените в чревната микрофлора, в резултат на терапията с тясно-спектърни антибиотици и химиотерапевтични средства води до колонизация с *C. difficile*. Това е и най-честата причина за възникване на антибиотико-асоциирано заболяване (antibiotic associated diarrhea, AAD)¹⁰. Почти всички антибактериални средства могат да се асоциират с AAD, но най-чести са тясно спектърни бета-лактами, цефалоспорини, клиндамицин и флуорохинолони¹¹. Разпространението на *C. difficile* инфекциите е в

пряка връзка с антибиотичната употреба. Когато антимикробната употребата е рационална и контролирана се забелязва тенденция към намаляване честотата на разпространение на CDI.

Синергичното действие на токсин А и токсин В води до характерни изменения в мукозната лигавица на дебелото черво, изразяващи се във формиране на плаки, подобни на лезии, които могат да се свържат (конфлуират) в псевдомембрани. Не всички щамове *C. difficile* продуцират токсини, следователно не всички могат да причинят заболяване. Клинично значими са само тези, които са токсинсинтезиращи.

Клиничният спектър на заболяванията, причинени от *C. difficile* варира от самоограничаваща се лека форма на диария до сериозни прогресиращи състояния като псевдомембранозен колит (ПМК). Най-точната диагноза псевдомембранозен колит се поставя след ендоскопско изследване, чрез което се откриват псевдомембрани или микроабсцеси на дебелото черво на пациенти с диария и предхождащо антибиотично лечение. Фецесите на тези пациенти са положителни за токсините на *C. difficile*.

Като усложнения на CDI се възприемат релапсите и реинфекциите.

Релапсите представляват CDI инфекция, причинена от щам *C. difficile*, след проведено антибиотично лечение на първоначална инфекция от същия щам. Честота на разпространение на релапсите варира от 20% до 50% . Реинфекцията представлява CDI причинена от нов (различен от първоначалния) щам *C. difficile*.

Днес не се прави ясно разграничаване на релапси от реинфекции, поради тази причина се обединяват под общото наименование рекурентни инфекции.

C. difficile причинява взривове в болници и медицински заведения за продължително лечение на възрастни пациенти¹². Ентеропатогенният бактерия е основен причинител на инфекции, асоциирани с медицинското обслужване (ИСМО). Изолира се от материали на околна среда (почва), болнична среда, клинични материали (фецес) от хора и животни¹³. Рядко се открива като нормален представител от нормалната микрофлора на възрастни пациенти, за разлика от тази на новородени. При повече от 50% от новородените се наблюдава колонизация с *C. difficile*, въпреки, че CDI не е характерна инфекция в тази възраст^{14,15}. *C. difficile* инфекцията е по-често срещана при възрастни пациенти, отколкото при млади хора. Макар, че напоследък се наблюдават все повече случаи на CDI при млади пациенти. Причините за това не са ясни, предполага се, че съществена роля оказват понижените бариерни механизми на макроорганизма на възрастния индивид. Повечето от случаите на CDI (81%) са

диагностицирани при пациенти на възраст >65г., най-често с хирургична интервенция и хронични бъбречни заболявания⁸⁻²¹.

Токсини на *Clostridium difficile*

Доказване на токсините на ентеропатогенния бактерий

Доказване на токсини на *C. difficile* в диарични фецеси е достатъчно индикативно за CDI, в случаите на отсъствие на други обективни причини за гастроинтестинални смущения. При взривове е необходимо паралелно и култивиране на фецесите, освен провеждането на изследвания за доказване на токсини в клиничните материали²². Културите от токсин-негативните фецеси трябва да се изследват повторно за токсинна продукция²³.

Според някои автори като “златен стандарт” се определя метода за доказване на цитопатичния ефект на токсините на *C. difficile* в тъканни култури (неутрализация с *C. sordellii* антитоксин). Цитопатичният метод изисква допълнителни технически познания и време за изпълнение от 24ч. (може и по-продължително до 48ч.)²⁴. Тъканна култура от Vero клетки може да се използва за доказване и на други цитотоксини от диаричен фецес като ентеротоксина на *C. perfringens*²². Цитопатичният ефект (ЦПЕ), който не се неутрализира от *C. sordellii* антитоксин може да е индикативен за наличие на инфекция от друг патоген.

Съществуват различни разновидности от търговски диагностични набори (китове) за доказване на токсините на *C. difficile*. Чрез някои от тях се доказва само токсин А, други са и за двата токсина- токсин А и токсин В. Чувствителността и специфичността на диагностичните набори е много различна²⁵⁻²⁹. Търговските имуноензимни анализи (ИЕА) чрез, които се доказват двата токсина- А и В се смятат за по-практични, в сравнение с тези, които са само за токсин А, защото повечето докладвани CDI са причинени от щамове, които са А+В+ (продуциращи както ентеротоксин, така и цитотоксин)³⁰.

Съществуват и имуноензимни тестове, чрез които се доказва ензима глутамат дехидрогеназа (GDH), който е общ антиген за всички *C. difficile* и токсин В.

Латекс аглутинационните тестове не се характеризират с необходимата точност и специфичност като на имуноензимните, поради по-ниската им чувствителност³¹.

Методът имуно-електрофореза се характеризира с ниска чувствителност и специфичност и поради тази причина не се прилага³²⁻³³.

В настоящия документ са разгледани и други методи за доказване на токсините на *C. difficile*³⁴.

През последните години се прибъгва до антитяло-базирани тестове (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) за доказване на токсините на *C. difficile*, поради по-ниската им цена и бързината на анализите (в рамките на минути, а не часове, както е при цитотоксичния метод и културелния метод). Има два типа имуноензимни анализи за доказване на токсини във фецес: конвенционален имуноензимен анализ и мембранно имунохроматографски метод.

Чрез генетични методи, първоначално във фецес е търсен 16S rRNA ген на *C. difficile*. Чрез този метод не могат да бъдат разграничени токсигенните от нетоксигенните щамове.

През последните години са разработени редица PCR базирани методи за идентификация и доказване на токсин-кодиращите гени на патогена. Препоръчва се прилагане на генетични анализи, разработени не само въз основа на един ген от PaLoc (например *tcdB*, поради възможни изменения в неговата структура), а на няколко гена на *C. difficile*, които да се доказват в една амплификационна реакция (мултиплексен анализ, multiplex).

В НРЛ „КМАР” се провежда duplex Evagreen Real time PCR метод за доказване на гена, кодиращ ензима глутамат дехидрогеназа (*gluD*) и токсинВ (*tcdB*) директно от фецес, както и за потвърждение на култури. Извършват се и конвенционални PCR методи за доказване на гените, кодиращи токсин А (*tcdA*) и бинарен токсин (CDТА/В).

Типиране на изолати *C. difficile*

Типирането на изолати *C. difficile* се прилага при проучване на много случаи на CDI на едно място (например в едно отделение, в няколко или цяла болница). Има различни методи за типирание като бактериофаго, бактериолизин типирание и серотипирание^{35,36}. Методът PCR-риботипирание е приет като единен международен метод за типирание на изолати *C. difficile* от всички европейски страни. Във Великобритания е изградена PCR-ribotyping network scheme (CDRNE) от PHE, която работи активно в случаите на повишена честота на CDI, поява на тежки инфекции с много усложнения, чести рекурентни инфекции и случаи с фатален изход³⁷.

Риботипирането на изолатите *C. difficile* в света се провежда в референтни микробиологични лаборатории. В България риботипиране на *C. difficile* се осъществява в НРЛ «КМАР» на отдел Микробиология в НЦЗПБ.

Друг познат метод за типирание на изолати *C. difficile* е базиран на установени разлики в профила на клетъчния повърхностен протеин на Грам-положителния бактерии. Успешно се прилагат и други методи за генотипиране на *C. difficile*³⁸⁻⁴⁰. Познати са методи като токсинотипиране и мултилокусен анализ на вариабилен набор тандемно повторени последователности (MLVA).

Техническа информация/ Ограничения

Препоръките в стандартите за микробиологично изследване са направени въз основа на обективни доказателства (напр. чувствителност и специфичност), експертно мнение, практически опит. При необходимост винаги могат да се проведат и допълнителни изследвания в лабораториите. Преди въвеждането на даден стандарт е необходимо да се знае дали всички тестове (методи), които са посочени в него се прилагат в мрежата от лаборатории в страната, независимо от техния произход (търговски или лабораторно подготвени, in house made), дали са валидирани и са напълно пригодени за съответните цели.

Контейнери за събиране на клинични материали (фецес)^{1,2}

Клиничните материали (фецес) се събират и транспортират в стерилни контейнери. Дизайнът на контейнерите трябва да позволява тяхното лесно хващане с ръка (да не са с много голям диаметър, за да могат лесно да се хващат); да имат обозначено място за изписване на данни (матова повърхност, която да позволява писане с маркер или залепване на етикет); да предпазва пробата от замърсяване (винтова капачка, по възможност уплътнена с гумен пръстен). Контейнерът не трябва да е изцапан с клиничен материал от външната му повърхност. Той се поставя и в допълнителна торбичка (плик с „zip” закопчаване), с цел елиминиране опасността от контаминация на околна среда при обръщане на контейнера и разливане на съдържанието му. Винаги материалите са придружени със съпроводително писмо с данните на пациента, което се поставя в отделен плик от този с клиничния материал (най-често папка тип „джоб”).

1. Мерки за безопасност в хода на работата ^{1, 2, 43-57}

1.2. Вземане и събиране на материали. Транспорт и съхранение ^{1,2, 43-46}

Прилага се асептична техника.

Фецесът се събира в пластмасов стерилен контейнер, които се поставя в найлонов плик с „zip” закопчаване (плътно затворен) и се транспортира до лабораторията за изследване.

Необходимо е спазване на всички задължителни наредби, относно пощенските услуги, транспорта и съхранението.

Клиничните материали се изпращат в НРЛ „КМАР” в стерилни пластмасови контейнери, които се поставят в допълнителни пликове (в плик по един контейнер, а не всички контейнери в общ плик) и после в кутия по пощата (съобразно необходимите изисквания) или с куриер. При изпращане по пощата е необходимо да се обозначи горната страна на контейнерите (при отварянето на кутията, специалистът да е ориентиран за разположението на контейнерите в кутията). Съпроводителните писма се поставят в отделен джоб, за да нямат досег с материалите.

Болниците, които имат договор с НЦЗПБ, могат да изпращат материалите в лабораторията за изследване, съобразно договорите, които са сключили с центъра.

Амбулаторни пациенти също могат да бъдат изследвани. Центърът няма договор с НЗОК за тези анализи.

1.2. Процедури, свързани с обработката на материалите ^{1, 2, 43-57}

Работи се в Ниво на безопасност 2

Ниво на безопасност 3 се препоръчва при суспекти микроорганизми или лабораторни показатели за:

- *Salmonella* Typhi;
- *Salmonella* Paratyphi A, B и C;
- Vero cytotoxin продуциращи *Escherichia coli* O157 (VTEC) и
- *Shigella dysenteriae*

Култивиране на материали за *C. difficile* не се изисква при пациенти, които имат или са суспектни за някои от горе изброените микроорганизми. Но ако клиничните показатели или рутинната култура показват резултат за някои от горе споменатите бактерии, но е необходимо изследване и за *C. difficile*, тогава обработката на

клиничните материали и култивирането се извършват в ламинарен бокс в ниво на безопасност 3.

Като правило микробиологичните процедури, които могат да доведат до получаване на инфекциозен аерозол се работят задължително в ламинарен бокс ⁴⁹.

2. Вземане и събиране на материали

2.1. Тип на материалите

Фецес

2. 2. Оптимално време и методи за събиране ⁵⁸

Относно правилата за безопасност виж **Секция 1.1.**

Вземане на материали преди антиминокробна терапия (когато това е възможно) ⁵⁸

Материалите могат да бъдат взети от чиста, суха (по възможност за еднократна употреба) подлога или подобен съд. Фецесът се пренася до лаборотарията за изследване в стерилен контейнер по обозначения начин (виж **1.1.**)

Материалите са негодни за изследване (водят до получаване на незадоволителни резултати), ако в подлогата или съда има остатъчно количество сапун, детергент или дезинфектант. Оформените фецеси (с твърда консистенция) са неподходящи за изследване на *C. difficile*. По-често, материалите са течни или с кашоподобна консистенция. Макар че, все по-често има случаи на доказани CDI инфекции при пациенти с твърди фецеси или твърди, комбинирани със слуз. Не е изключено наличието на инфекция и при пациенти, при които се наблюдава редуване на разстройство със състояние на запек.

2. 3. Оптимално количество проба и подходящ брой материали ⁵⁸

Течен материал (фецес) в обем 1-2 мл. е достатъчен за култивиране и изследване за токсини. Повторно изследване на пробите с положителен резултат се провежда след период от поне 28 дни, в които не се наблюдават индикации за инфекция (изчезват клиничните симптоми, в резултат на проведена антибиотична терапия).

Когато резултатът е негативен, но са налични симптоми, е необходимо повторно изследване до установяване на причината.

При съмнение за взривове, пробите трябва да бъдат съхранявани на +4°C или на

-20°C с цел култивирането им на по-късен етап.

Изолатите (или фецесите, ако лабораторията няма възможност за култивиране) *C. difficile* се изпращат за молекулярно характеризирание чрез риботипиране в НРЛ „КМАР”.

3. Транспорт и съхранение на материалите^{1,2}

3.1. Оптимален транспорт и условия за съхранение

За условията за безопасност виж. **секция 1.1.**

Материалите трябва да бъдат транспортирани и обработени, колкото е възможно по-бързо. Ако не могат да бъдат обработени и се очаква забавяне, съхранението в хладилник е за предпочитане пред съхранението на стайна температура ⁴⁴.

Пробите могат да се съхраняват в хладилник до два дни, ако не е възможна обработката им в близките два часа. Пробите трябва да бъдат замразени на -20°C или на по-ниска температура, ако не могат да бъдат обработени до два дни след взимането им и доставянето в лабораторията ⁵⁹.

Всички фецеси с положителен резултат за токсини на *C. difficile* трябва да се съхраняват в хладилник или да бъдат замразени, с цел последващо култивиране и риботипиране на получените изолати⁶⁰. Не е необходимо да се пази цялото количество клиничен материал (фецес). Необходимо е да се запази малко количество от него в епруветка (с винт). Продължителността на съхранение се определя на локално ниво, но трябва да е достатъчно дълга, за да може да се проучат изолатите.

4. Процедура по обработка на материалите^{1,2}

4.1. Изследване на материал

- При клинични показания;

- Скрининг на пациенти, които имат някои от следните критерии:

- антибиотик-асоциирана диария, ААД (всеки един пациент на възраст >2г.);
- псевдомембранозен колит (ПМК);
- след антибиотично лечение на всички пациенти >65г.;

- всички пациенти >65г., които имат разстройство ⁶¹.

Когато се използват диагностични набори (китове) за доказване на токсини на *C. difficile* е необходимо да се спазва инструкцията на производителя. Препоръчва се прилагането на китове, чрез които се доказва както токсин А така и токсин В. Всички фецеси, които са с положителен резултат за токсини се съхраняват на +4°C или -20°C за последващо култивиране при обследване на взривове.

Култивирането и идентификацията на *C. difficile* от фецес се прави при взривове или когато се извършва надзор на CDI. Методът е описан в секция **4.5. Култивиране и изследване.**

Ако фецесите са дали положителен резултат при изследване за токсини чрез имуноензимен анализ (ИЕА), ELISA или друг метод в дадено болнично заведение (лаборатория), но е необходимо потвърдителен анализ- материалите могат да се изпратят в НРЛ «КМАР» за потвърдителен анализ и допълнително изследване.

4. 2. Характеристика на материал (отличителни белези, вид)

Няма доказани налични характеристики (отличителни белези, вид), на които трябва да отговаря материала.

4. 3. Подготовка на материала

За безопасност при работа с материала, виж. **Секция 1.2.**

4.3.1. Стандарт

Метод на алкохолния шок

След провеждане на метода с алкохолен шок, оцеляват само спорите на *C. difficile* и по този начин се извършва селекция на патогена от останалите микробни представители във фецеса. Така се елиминира растежа на други неспорообразуващи микроорганизми от фецеса. В хранителните среди се добавят селективни агенти като цефокситин и циклосерин (описани са и други в научната литература), които инхибират растежа и на различните от *C. difficile* клостридиални видове. При активна форма на CDI би трябвало да расте само *C. difficile* и да се получи чиста култура от ентеропатогенния бактерий. Колониите на *C. difficile* имат различна

морфология, в зависимост от добавените в средата супленти (не са посочени определени характеристики). За провеждането на алкохолен шок е необходимо да се направи суспензия от смесването на фецес с абсолютен алкохол в съотношение 1:1. Суспензията се прави в епруветка с винт. След хомогенизирането на пробата тя се оставя на стайна температура за около 30 мин. (до 60 мин.).

4. 3. 2. Допълнителна обработка

Не е посочена.

4. 4. Микроскопиране

4.4.1. Стандарт

Не е посочен.

4. 5. Култивиране на материалите.

С пастьорка за еднократна употреба се инокулират две капки (около 50-75µl) от обработената проба с етанол върху цефокситин-цикloserин-яйчено жълтъчен селективен агар *(cefoxitin-cycloserin-egg-yolk agar, SSEY) и се разсява за единични колонии. Паралелно се посяват и контролни микроорганизми от спорова суспензия отново на SSEY среда.

*яйчено-жълтъчните супленти са оптимални за растежа на *C. difficile*.

В литературата се посочва и наименованието cycloserin-cefoxitin-fructose-agar, CCFA като селективна среда за *C. difficile*.

Споменава се и за среда на Brazier (към която се добавят супленти).

C. difficile расте добре на кръвен агар, фенилетил алкохолен кръвен агар (PEA), Бруцела агар с 5% овнешка кръв и супленти, Columbia агар, brain heard infusion агар с дрождев екстракт, витамин К, хемин и супленти (цикloserин, цефокситин), Шедлер агар при анаеробни условия за 48 часа.

4.5.1. Хранителна среда, условия и микроорганизми

Клинични детайли/условия	Материал	Стандартна среда	Температура на инкубация	Атмосфера на инкуб.	Време	Отчита не	Организъм
<p>При пациенти, които са с един от следните критерии:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Антибиотик-асоциирана диария, ААД, (≥ 2 г.) ● Псевдомембранозен колит (ПМК) ● След антибиотично лечение на всички пациенти >65г. 	Фецес	CCEY	35°-37°C	Анаеробна	48-72ч.	*след 48ч	<i>Clostridium difficile</i>

* Растежът на културите може да бъде отчетен след 24ч. инкубация, но те не трябва да бъдат изваждани извън анаеробния бокс, защото младите култури лесно могат да загинат при излагането им на кислород, а споролирането може да се инхибира на селективна среда.

4.6. Идентификация

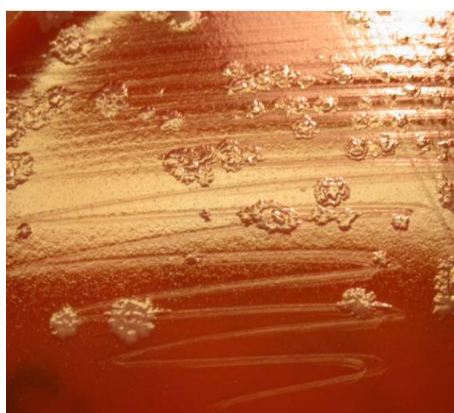
Колониите на *Clostridium difficile* могат да се отличават със следните характеристики:

- Ако използваме яйчено-жълтъчен агар, около колониите на *C. difficile* **не** се наблюдава образуване на прозрачна зона, тъй като те не продуцират ензима лецитиназа. За разлика от *C. perfringens*, *C. sordelii* и *C. bifermentas*, които продуцират този ензим.
- Колонии със зелено-жълта флуоресценция при облъчване с UV-светлина с дължина на вълната (λ) в дългия спектър (виж. по-долу)
- Аглутинация с *C. difficile*-латекс реагент за доказване на соматичния антиген (глутамат дехидрогеназа, GDH) (виж по-долу)

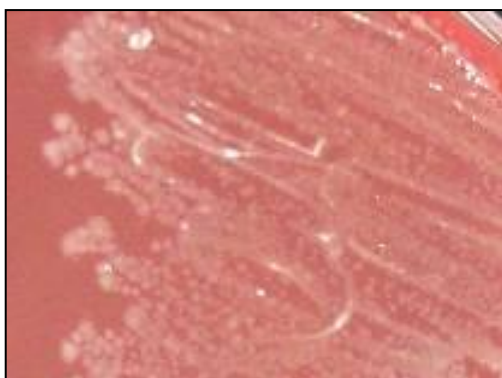
За по-категорично доказване и идентифициране на колониите е необходимо повторно култивиране на съмнителните колонии *C. difficile* (субкултивиране).

Отчитане на растеж

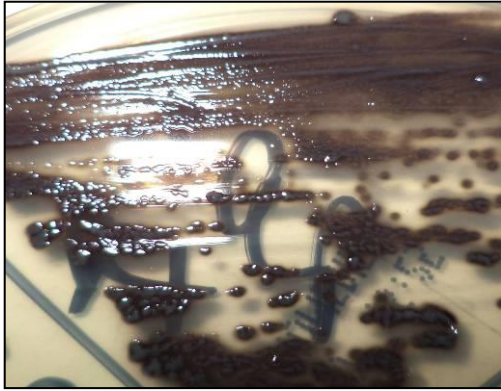
Колониите на *C. difficile* могат да бъдат гладки или грапави и да варират значително по размера си. Типични колонии могат да се наблюдават след субкултивиране на съмнителните колонии на селективна среда (анаеробен агар за взискателни микроорганизми, fastidious anaerobe agar, FAA) (**виж петри 1**).



Петри 1. Колонии на *C. difficile* върху анаеробен агар за взискателни микроорганизми (FAA)



Петри 2. Растеж на *C. difficile* на Бруцела агар с кръв



Петри 3: Хромогенна среда за *C. difficile*

Флуоресценция на колониите

- Проверява се флуоресценцията на изследваните и контролните щамове *C. difficile* като за целта колониите се излагат на ултравиолетова светлина ($\lambda = 365\text{nm}$) в тъмна стая или петритата се доближават до източник на UV светлина.

Бележка: Задължително се ползват защитни очила срещу вредното въздействие на UV-лъчите върху очите на наблюдаващия.

- Колониите на *C. difficile* могат да се различават в интензитета на флуоресценцията си, но най-често се наблюдава характерната жълто-зелена флуоресценция. Флуоресценцията зависи много от състава на агаровата среда за култивиране. Върху някои среди е много слаба, докато върху други като FFA е много силна. Изключително важно е да се сравни флуоресценцията на тест микроорганизмите с тази на контролните микроорганизми, за да се разграничат позитивните от негативните резултати. Флуоресценцията на културите след >48ч. или на неселективна среда намалява вследствие на повишена спорулация.
- Съмнителните флуоресциращи колонии (очертани с тъмен маркер от долната страна на петрито) се субкултивират на FAA и се култивират при анаеробни условия за 48ч.

Бележка: Оцветяването по Грам е рядко приложимо директно на култура *C. difficile* от селективна среда; но от кръвен агар- субтерминалните спори, както и вегетативните пръчки на *C. difficile* се оцветяват като Грам-положителни, макар че има и форми, както и при други клостридиални представители, които варират по своето оцветяване.

Оцветяването по Грам за *C. difficile* не се препоръчва в инструкцията.

На Бруцела агар с 5% овнешка кръв и суплементи (**петри 2.**), Columbia агар, ВНИ (brain heard infusion агар), Шедлер агар, колониите на *C. difficile* са плоски, с леко сив цвят и имат характерен вид на “счупено стъкло”, характеризират се с определен мирис (конски копита, конски обор), вследствие на изо-валериановата, изо-капроновата киселина и р-крезола, които са продукти на микроорганизма, получени в хода на различни метаболитни пътища. На кръвен агар колониите не образуват хемолитични зони. При култивиране на *C. difficile* ефективно могат да се прилагат и хромогенни хранителни среди (**петри 3.**)

Въпреки създадените анаеробни условия и подходящите хранителни среди, izolацията на *C. difficile* е труден процес и често съпроводен с наличието и на други видове, поради, което субкултивирането и идентификацията са наложителни.

Латекс-аглутинационен тест за доказване на соматичния антиген на *C. difficile*

Използва се латекс-аглутинационен тест за доказване на соматичния антиген (глутамат дехидрогеназа, GDH) на *C. difficile* като се следват инструкциите на производителя.

Ограничения на теста

Могат да бъдат наблюдавани кръстосани реакции с

- *C. bifermentas*
- *C. sordellii*
- *C. glycoliticum*

Контроли

Необходимо е да се залагат контролни щамове, заедно с изследваните при всяка нова партида на средата (**виж. 2.5**)

Контроните организми, които се изискват са:

- *C. bifermentas*
- *C. sordellii*
- *C. difficile*

Други клостридиални видове като: *C. innocuum*, *C. glycoliticum*, *C. bifermentas* и *C. sordellii* често могат да бъдат сбъркани с *C. difficile*.

В **таблица 1** са посочени критериите, по които могат да бъдат разграничени отделните представители.

Табл. 1. Характерни тестове за разграничаване на колонии на *C. difficile* от други клостридиални представители

	<i>C. difficile</i>	<i>C. bifermentas</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. glycoliticum</i>	<i>C. innocuum</i>
UV-флуоресценция при $\lambda=365\text{nm}$	+	-	-	-	+
Латекс аглутинация	+	+	+	+	-
Лецитиназа на Brazier CSEY агар	-	+	+	-	-

Микроорганизмите могат да бъдат подробно идентифицирани при клинична или епидемиологична необходимост. За идентификация им е необходимо да се вземе под внимание съответната инструкция.

4.7. Тестове за определяне на антимикробна чувствителност

Препоръчват се стандартите на Британската организация за антимикробна химиотерапия (British Society of Antimicrobial Chemotherapy, BSAC) и/или EUCAST в нашата страна като членка на Европейския съюз.

4.8. Изследване на взривове

Изолати

Изолатите *C. difficile* се изпращат за PCR-риботипиране в Национална референтна лаборатория (Във Великобритания има НРЛ за Анаероби). В България в НРЛ «КМАР».

Изолатите трябва да са култивирани на FAA поне 48ч. при анаеробни условия (стандарти на колегите от Великобритания). След това се събира култура с тампон, който се поставя в транспортна хранителна среда и се изпраща до лабораторията.

Бележка: Важно е да се изпратят изолати, които са култивирани 48-72ч., за да е сигурно, че са спорулирали.

В България ако лабораториите нямат възможност за култивиране на *C. difficile* могат да изпратят фецесите с положителен резултат за токсини за последващи анализи в НЦЗПБ.

Съхранение на изолати

Изолатите могат да се запазят след растеж на FFA среда в свеж разтвор от алкохол и физиологичен разтвор в съотношение 2:1. Епруветките трябва да бъдат обозначени със съответния номер на изолата. Съхраняват се на -20°C. Като алтернативен метод прави се гъста суспензия от колонии в разтвор алкохол:физиологичен разтвор в съотношение 2:1 и се съхранява на -70°C.

Фецеси

На територията на Англия съществува „Мрежа за риботипиране на *C. difficile*/ *C. difficile* Ribotyping Network, CDRNE”, която се състои от шест лаборатории, които са във връзка с регионалните микробиолози. Микробиолозите контактуват с мрежата в случаите на проблеми, дължащи се на повишена честота на *C. difficile* инфекции (CDI); наличие на тежки случаи с усложнения и фатален изход или повишена поява на рекурентни случаи. Мрежата разполага с електронна форма, която се попълва от специалистите.

В България няма изградена подобна мрежа, както във Великобритания, но всички микробиолози от страната, които имат въпроси или материали за изследване на *C. difficile* могат да влязат в контакт със специалистите от НЦЗПБ.

Национална схема за надзор на *C. difficile* DN/PHE

Във Великобритания не се използва формата за изследване на взривове, а друга форма, която се попълва веднъж седмично от микробиолозите, които стриктно обозначават броя на токсин-позитивните фецеси, доказани в регионалните болници.

В НЦЗПБ се води статистика на изпратените токсин-положителни фецеси от болниците и медицинските заведения от страната. Получените изолати (повечето, от които изолирани в Центъра) се риботипират и по този начин се получава информация за циркулиращите риботипове в страната, което е важно при провеждането на надзор на CDI.

Тестове за определяне на антимикробна чувствителност

Във Великобритания се мониторира антибиотичната чувствителност на всички изолати в националната схема за надзор на *C. difficile* чрез прилагане на E-тест за определяне на минималната инхибираща концентрация към осем антибиотика.

Тестовете се провеждат в “Мрежата за риботипиране на *C. difficile* (CDRNE)” с цел проследяване на резистентността на изолатите и отчитане на нововъзникнала резистентност към антибиотиците за лечение (метронидазол и ванкомицин).

Микроорганизми с необичайна или новооткрита резистентност, както и такива, които представляват лабораторен или клиничен проблем също могат да бъдат изпращани до Мрежата.

5. Докладване на резултатите

5.1. Микроскопия

Не се изисква.

5.2. Култивиране

Изолатите *C. difficile* се проучват чрез методи за типирание (PCR-риботипиране).

5.3. Изследване за токсини

Токсин продуциращ *C. difficile*

Не токсин продуциращ *C. difficile*

5.4. Изследване на антимикробна чувствителност

Докладаване на чувствителността по клинични показания. Прилагане на антибиотици спрямо локални и национални протоколи.

Библиография

1. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
2. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
3. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe M, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986. p. 1165-6

4. Groschel DH. *Clostridium difficile* infection. Crit Rev Clin Lab Sci 1996;33:203-45.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis.[comment]. [Review] [51 refs]. New England Journal of Medicine 1994;330:257-62.
6. Thielman NM. Antibiotic-associated colitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Vol 1. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 1111-26.
7. Lorber B. Gas gangrene and other Clostridium-associated diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Vol 1. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2549-61.
8. Brook I. Clostridial infection in children. J Med Microbiol 1995;42:78-82.
9. Feldman RJ, Kallich M, Weinstein MP. Bacteremia due to *Clostridium difficile*: case report and review of extraintestinal C. difficile infections. Clin Infect Dis 1995;20:1560-2.
10. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998;40:1-15.
11. Impallomeni M, Galletly NP, Wort SJ, Starr JM, Rogers TR. Increased risk of diarrhoea caused by *Clostridium difficile* in elderly patients receiving cefotaxime. BMJ 1995;311:1345-6.
12. Worsley MA. A major outbreak of antibiotic-associated diarrhoea. PHLS Microbiol Dig 1993;97-9.
13. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 1998;41:47-57.
14. Wilson KH. The microecology of *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis 1993;16 Suppl 4:S214-S218.
15. el Mohandes AE, Keiser JF, Refat M, Jackson BJ. Prevalence and toxigenicity of *Clostridium difficile* isolates in fecal microflora of preterm infants in the intensive care nursery. Biol Neonate 1993;63:225-9.
16. Borriello SP, Barclay FE. An in-vitro model of colonisation resistance to *Clostridium difficile* infection. J Med Microbiol 1986;21:299-309.
17. CDSC. *Clostridium difficile* in England and Wales. CDR Weekly 2000;10:369.
18. Testore GP, Pantosti A, Cerquetti M, Babudieri S, Panichi G, Gianfrilli PM. Evidence for crossinfection in an outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a surgical unit. J Med Microbiol 1988;26:125-8.
19. Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, Agus SG. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. Arch Intern Med 1992;152:1715-7.

20. Gerard M, Defresne N, Daneau D, Van der AP, Delmee M, Bourguignon AM, et al. Incidence and significance of *Clostridium difficile* in hospitalized cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:274-8.
21. Cumming AD, Thomson BJ, Sharp J, Poxton IR, Fraser A. Diarrhoea due to *Clostridium difficile* associated with antibiotic treatment in patients receiving dialysis: the role of cross infection. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:238-9.
22. Brazier JS. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin Infect Dis* 1993;16:Suppl 4: S228-S233.
23. Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol* 2005;54:187-91.
24. Liesenfeld O, Saeger F, Hahn H. Detection of *Clostridium difficile* toxin by enzyme immunoassay, tissue culture test and culture. *Infection* 1994;22:29-32.
25. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M. Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea.[comment]. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2846-9.
26. Musher DM, Manhas A, Jain P, Nuila F, Waqar A, Logan N, et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin: comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:2737-9.
27. Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, Carlson L, Miller P, Ulness B, et al. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:667-70.
28. Yucesoy M, McCoubrey J, Brown R, Poxton IR. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:413-8.
29. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:55-64.
30. Al Barrak A, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Canada Communicable Disease Report* 1999;25:65-9.

31. Gilligan PH, Walden P, Kelly WF, Wait KJ, Kraft JA, Willis DH. The use of a commercially available enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* toxin A. Arch Pathol Lab Med 1993;117:507-10.
32. Poxton IR, Byrne MD. Detection of *Clostridium difficile* toxin by counterimmunoelectrophoresis: a note of caution. J Clin Microbiol 1981;14:349.
33. West SE, Wilkins TD. Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for detecting *Clostridium difficile* toxin. Journal of Clinical Microbiology 1982;15:347-9.
34. Department of Health. National *Clostridium difficile* Standards Group: Report to the Department of Health. J Hosp Infect 2004;56 Suppl 1:1-38.
35. Silva J, Jr., Iezzi C. *Clostridium difficile* as a nosocomial pathogen. J Hosp Infect 1988;11 Suppl A:378-85.
36. Tabaqchali S, Wilks M. Epidemiological aspects of infections caused by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:1049-57.
37. 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;37:461-3.
38. Poxton IR, Aronsson B, Mollby R, Nord CE, Collee JG. Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea. J Med Microbiol 1984;17:317-24.
39. Public Health Laboratory Service. Report of the PHLS *Clostridium difficile* Working Group. PHLS Microbiol Dig 1994;11:22-4.
40. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. J Clin Microbiol 2006;44:2558-66.
41. Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998;27:702-10.
42. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006;44:2785-91.
43. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
44. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.

45. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
46. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
47. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
48. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
49. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
50. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
52. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
53. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002. UNDER REVIEW
54. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
55. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
56. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
57. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
58. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr., et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis 2013;57:e22-e121.

- 59.** Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D, et al. Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. Star Publishing Company; 2002. p. 135-8.
- 60.** Brazier JS, Duerden BI. Guidelines for optimal surveillance of *Clostridium difficile* infection in hospitals. Commun Dis Public Health 1998;1:229-30.
- 61.** Chief Medical Officer and Chief Nursing Officer. Letter from the Chief Medical Officer and Chief Nursing Officer. 2007.
- 62.** Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
- 63.** Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
- 64.** Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
- 65.** Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
- 66.** The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
- 67.** Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amend).