Σύγχρονη διαγνωστική προσέγγιση από την πλευρά του Μικροβιολόγου

Μ. Ορφανίδου

Βιοπαθολόγος, Επιμελήτρια Α' Μικροβιολογικού Εργαστηρίου ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»

Εισαγωγή

Το *C. difficile* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1935 από τον Hall και την Ο' Toole από δείγματα κοπράνων υγιών νεογνών. Οφείλει το όνομά του στη δυσκολία της καλλιέργειας, αλλά και απομόνωσής του[1]. Η ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1893[2]. Παρά ταύτα, μόλις το 1978, από τους Bartlett και George, έγινε η πρώτη συσχέτιση του *C. difficile* με την πρόκληση ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας και διάρροιας οφειλόμενης, στις πλείστες των περιπτώσεων, στη λήψη αντιβιοτικών[3,4]. Σήμερα, η λοίμωξη του εντέρου από *C. difficile* (*Clostridium Difficile* Infection – CDI) κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των λοιμώξεων των σχετιζομένων με παροχές υγείας (Health-care Associated Infections – HAI)[5].

Μικροβιολογία

Το *C. difficile* είναι ένα Gram θετικό, αναερόβιο βακτηρίδιο. Βρίσκεται στο έντερο ανθρώπων και ζώων, στο έδαφος, στο νερό και στο περιβάλλον. Απαντάται σε δύο μορφές: τη βλαστική μορφή και τη μορφή των σπόρων. Η βλαστική μορφή είναι η δραστική μορφή του και είναι ευαίσθητη στο γαστρικό οξύ, τα κοινά αντισηπτικά και τα αλκοολούχα διαλύματα. Η μορφή των σπόρων είναι η αδρανής μορφή του που, όμως, επιβιώνει επί μακρόν στο περιβάλλον, είναι ανθεκτική στο γαστρικό οξύ και τα αντισηπτικά και αλκοολούχα διαλύματα[6]. Επιπλέον, οι σπόροι είναι ανθεκτικοί στις υψηλές θερμοκρασίες, την υπεριώδη ακτινοβολία και τα αντιβιοτικά. Ειδικότερα, η αντοχή τους στα αντιβιοτικά βοηθά την παραμονή των σπόρων στο γαστρενετερικό σύστημα και, πιθανώς, συμβάλλει στην εμφάνιση και τις υποτροπές της νόσου[7].

Η μετάδοση της λοίμωξης γίνεται μέσω των μολυσμένων χεριών – τόσο του προσωπικού των νοσηλευτικών ιδρυμάτων, όσο και των ασθενών – από άτομο σε άτομο και από τις μολυσμένες επιφάνειες[8].

Λοιμογόνος δράση - Παθογένεση

Για την πρόκληση της λοίμωξης απαραίτητες προϋποθέσεις είναι: (α) η κατάποση του μικροβίου είτε με τη μορφή σπόρων είτε με τη βλαστική του μορφή, (β) η διαταραχή της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, όπως μετά τη λήψη αντιβιοτικών, και (γ) η παραγωγή τοξινών από το *C. difficile*[8].

Το *C. difficile* παράγει τρεις τοξίνες: (α) την τοξίνη Α, που είναι μία εντεροτοξίνη, (β) την τοξίνη Β, που είναι μία κυτταροτοξίνη και (γ) τη δυαδική τοξίνη (CDT – Clostridium difficile

transerase) με υποβοηθητικό ρόλο στη δράση των δύο άλλων τοξινών[9]. Οι τοξίνες Α και Β είναι αυτές που προσδίδουν στο *C. difficile* τη λοιμογόνο δράση του. Μπορεί να παράγονται και οι δύο τοξίνες ταυτόχρονα – στελέχη Α+Β+, ή να παράγεται μόνο η τοξίνη Β – στελέχη Α-Β+, ενώ στελέχη που δεν παράγουν τοξίνες χαρακτηρίζονται ως Α-Β-. Τα τοξινογόνα στελέχη είναι και παθογόνα, σε αντίθεση με τα μη τοξινογόνα που είναι και μη παθογόνα. Η παρουσία της CDT δεν συμβάλλει στο χαρακτηρισμό ενός στελέχους ως παθογόνο ή μη[10].

Οι τοξίνες αυτές κωδικοποιούνται από τα *tcdA* και *tcdB* γονίδια, αντίστοιχα, τα οποία βρίσκονται στον τόπο παθογονικότητας του κλωστηρίδιου, γνωστό ως PaLoc. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν τρία επιπλέον γονίδια: το *tcdD*, που προάγει την παραγωγή των τοξινών, το *tcdC* που αναστέλλει την παραγωγή των τοξινών και το *tcdE* που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας χολίνης που πιστεύεται ότι σχετίζεται με την απελευθέρωση των τοξινών από το μικροβιακό κύτταρο[11].

Οι τοξίνες Α και Β προκαλούν, αμφότερες, φλεγμονή με καταστροφή της ακτίνης του κυτταροσκελετού και λύση των δεσμών μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Το τελικό αποτελέσμα είναι η απόπτωση του εντερικού επιθηλίου με συσσώρευση υγρών και εκτεταμένη βλάβη του παχέως εντέρου με το σχηματισμό ψευδομεμβρανών[12].

Υπερλοιμογόνα στελέχη

Το 2005 απετέλεσε έτος σταθμό στη διάγνωση της CDI, καθώς παρατηρήθηκαν μεγάλες επιδημίες σε Βόρειο Αμερική και Ευρώπη από το υπερλοιμογόνο στέλεχος ριβότυπου 027/NAP1. Το στέλεχος αυτό χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και των τριών τοξινών του κλωστηριδίου (Α, Β και CDT) και από πλήρη εξάλειψη του *tcdC γονίδιου, του αρνητικού ρυθμιστή της παραγωγής των τοξινών, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή τους. Οι επιδημίες αυτές ήταν βαρύτατες και συνοδευόταν από υψηλή θνητότητα*[13-14].

Το 2008, ένας επιπλέον ριβότυπος ο 078 προστέθηκε στα υπελοιμογόνα στελέχη του C. difficile. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από την παραγωγή και των τριών τοξινών και από μερική του *tcdC γονίδιου. Αποτελούν τον τρίτο συχνότερο ριβότυπο σε ασθενείς κοινότητας με CDI. Απαντώνται συχνά σε χοίρους και βοοειδή. Στην Ελλάδα ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των στελεχών C. difficile ανήκουν στον ριβότυπο 078*[15].

Διάγνωση της CDI

Η διάγνωση της CDI βασίζεται στην κλινική εικόνα του ασθενούς και στην αποδεδειγμένη παρουσία τοξινογόνου στελέχους *C. difficile* στα κόπρανα του ασθενούς.

Οι ασθενείς που πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία *C. difficile* σε δείγματα κοπράνων είναι οι εξής:

1. Ασθενείς με πιθανή λοιμώδη διάρροια, στους οποίους οι καλλιέργειες κοπράνων είναι αρνητικές για κοινά εντεροπαθογόνα, παράσιτα και ιούς.
2. Όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν διάρροια μετά την 3η ημέρα νοσηλείας τους («κανόνας των τριών ημερών», IDSA, 2001).
3. Ασθενείς με διάρροια που είχαν εισαχθεί σε νοσοκομείο και/ή ίδρυμα μέχρι και 3 μήνες πριν την εμφάνιση της διάρροιας.
4. Όλοι οι ασθενείς με διάρροια που εμφανίζεται κατά ή μετά, μέχρι και οκτώ εβδομάδες, τη λήψη αντιβιοτικής αγωγής.
5. Όλοι οι ασθενείς με διάρροια και ιστορικό CDI.
6. Ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών με διάρροια, ακόμη και χωρίς την παρουσία άλλων προδιαθεσικών παραγόντων[16].

Α. Συλλογή και Μεταφορά του δείγματος

Το καλύτερο δείγμα είναι η αυτόματη κένωση. Απαραίτητες προϋποθέσεις είναι το δείγμα κοπράνων να είναι:

1. Διαρροϊκό και ως τέτοιο ορίζεται το δείγμα που καταλαμβάνει το σχήμα του δοχείου στο οποίο εμπεριέχεται.
2. Η κένωση να είναι πρόσφατη. Εντός δύο ωρών, το δείγμα θα πρέπει να έχει μεταφερθεί στο εργαστήριο και, ακολούθως, να επεξεργαστεί άμεσα, καθώς ένζυμα που παράγονται από τη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου καταστρέφουν τις τοξίνες του κλωστηριδίου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η άμεση ανίχνευσή τους από το δείγμα των κοπράνων.

Εναλλακτικά, στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η αυτόματη κένωση, μπορεί να παρθεί ορθικό επίχρισμα με βαμβακοφόρο στυλεό[17].

Β. Μικροσκοπική εξέταση

Η μικροσκοπική έξεταση του δείγματος κοπράνων τόσο με τη μορφή νωπού παρασκευάσματος, όσο και με τη Gram χρώση, δεν κρίνεται απαραίτητη, καθώς δεν είναι παθογνωμονική. Η CDI είναι λοιμώδης νόσος του εντέρου και, ως τέτοια, θα έπρεπε να εμφανίζει πυοσφαίρια στα κόπρανα, η τοξίνη Β, όμως, ως κυτταροτοξίνη μπορεί να καταστρέψει και τα λευκά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται κατά τη μικροσκοπική εξέταση.

Γ. Χρυσός κανόνας στη διάγνωση της CDI

1. Μέθοδος κυτταροτοξικότητας

Η μέθοδος αυτή αφορά κυτταροκαλλιέργεια, με τη χρήση μίας κυτταρικής σειράς από κύτταρα ανθρώπου ή άλλων θηλαστικών. Ανιχνεύει την παρουσία μόνο της τοξίνης Β, η οποία δρα στα κύτταρα των θηλαστικών στρογγυλοποιώντας τα και καταστρέφοντάς τα. Η εξέταση διαρκεί 24 – 48 ώρες. Λόγω της δυσκολίας στην εκτέλεσή της και της χρονοβόρου διαδικασίας εφαρμόζεται πλέον μόνο σε εργαστήρια αναφοράς[1].

2. Τοξινογόνος καλλιέργεια για απομόνωση του *Clostridium difficile*

<u>Επεξεργασία με καθαρή αιθυλική αλκοόλη 95% (alcohol shock method)</u>

Η επεξεργασία των κοπράνων με τη μέθοδο αυτή αποσκοπεί στην επιβίωση των σπόρων και την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης των μη σπορογόνων βακτηρίων.
Για το σκοπό αυτό ετοιμάζεται εναιώρημα 1:1 κοπράνων και αιθυλικής αλκοόλης, το οποία παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά – μία ώρα.
Ακολούθως, δύο σταγόνες από το εναιώρημα εμβολιάζονται σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό κυκλοσερίνη-κεφοξιτίνη-φρουκτόζη άγαρ με 5% κρόκο αυγού (CCFA) και σε κυκλοσερίνη-κεφοξιτίνη αιματούχο άγαρ με 7% αίμα αλόγου (CCBA) (κυκλοσερίνης 500mg/L και κεφοξιτίνης 16mg/L).
Τα τρυβλία επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 35-37^{0}C για 48-72 ώρες[17].
Σήμερα, εκτός των συμβατικών θρεπτικών υλικών, στο εμπόριο κυκλοφορούν και χρωμογόνα υλικά που υπόσχονται την απομόνωση του κλωστηριδίου εντός 24 ωρών[18].
Ο χαρακτηρισμός της καλλιέργειας ως τοξινογόνου οφείλεται στον έλεγχο των τοξινών που πραγματοποιείται, πλέον, στο ίδιο το στέλεχος του *C. difficile* που απομονώθηκε από την καλλιέργεια.

Δ. Έλεγχος παραγωγής τοξινών

Στα εργαστήρια ρουτίνας η τοξίνη Α, μεμονωμένα, και οι τοξίνες Α και Β, ταυτόχρονα, μπορούν να αναζητηθούν με ανοσοχρωματογραφία, ELISA και EIA.

Στελέχη θετικά για την τοξίνη Α και για τις τοξίνες Α και Β χαρακτηρίζονται A+B+. Στελέχη αρνητικά για την τοξίνη Α και θετικά για τις τοξίνες Α και Β χαρακτηρίζονται A-B+. Στελέχη αρνητικά για τις τοξίνες, δηλαδή μη τοξινογόνα, χαρακτηρίζονται A-B-. Τέλος, στελέχη θετικά μόνο για την τοξίνη Α θεωρείται ότι δεν υπάρχουν και το αποτέλεσμα θα πρέπει να επανελέγχεται[8].

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο rt-PCR που στοχεύουν κυρίως στην αναζήτηση του γονιδίου παραγωγής της τοξίνης Β (*tcd*B).

Ε. Μέθοδος αναζήτησης της γλουταμικής δεϋδρογενάσης (GDH)

Η GDH είναι μία δομική πρωτεΐνη, ένα αντιγόνο όλων των στελεχών *C. difficile* ανεξάρτητη από την παραγωγή τοξινών. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τον μικροοργανισμό και όταν ανιχνεύεται επιβεβαιώνει την παρουσία του *C. difficile*, χωρίς να μπορεί να το διαφοροποιήσει σε τοξινογόνο ή μη στέλεχος.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι για την αναζήτηση της GDH περιλαμβάνουν την ανοσοχρωματογραφία, την ELISA και την rt-PCR[19].

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται οι παράμετροι των διαφόρων διαθέσιμων μεθόδων για την αναζήτηση των τοξινών και της GDH του C. difficile.

Πίνακας 1. *Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (ΘΠΑ), αρνητική προγνωστική αξία (ΑΠΑ) (%), διάρκεια εξέτασης και κόστος εξέτασης των μεθόδων αναζήτησης του C. difficile από δείγματα κοπράνων*

Μέθοδος	Ευαισθησία	Ειδικότητα	ΘΠΑ	ΑΠΑ	Διάρκεια	Κόστος
EIA						
Τοξίνη A/B	67-97	91-99	49-100	96-99	1-3 ώρες	<10$
GDH	76-94	97-100	59-100	95-99		
IC						
Τοξίνη A/B	75-95	93-100	55-99	96-98	15-20 λεπτά	<20$
GDH	89-92	97-99	86-98	98-99		
rt-PCR	93-100	94-98	63-90	97-100	1-4 ώρες	40-50$

Στον Πίνακα 1 αξίζει να σημειώσουμε την υψηλότατη ΑΠΑ που παρουσιάζουν όλες ανεξαιρέτως οι μέθοδοι για την αναζήτηση της GDH που κυμαίνεται στο 99%. Το γεγονός αυτό ερμηνευόμενο σημαίνει πως το αρνητικό αποτέλεσμα είναι αληθώς αρνητικό.

Αλγόριθμος δύο βημάτων για την αναζήτηση του *C. difficile*

Η παραπάνω παρατήρηση οδήγησε τους Ευρωπαίους και τους Αμερικανούς στο να προτείνουν έναν αλγόριθμο δύο βημάτων για την αναζήτηση του *C. difficile* από δείγματα κοπράνων.

1° Βήμα – Μέθοδος Διαλογής: Αναζήτηση της GDH στα κόπρανα με τη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας ή της ELISA.

2° Βήμα – Επιβεβαιωτική Μέθοδος: τοξινογόνος καλλιέργεια ή PCR ή ανοσοχρωματογραφία ή ELISA για τον έλεγχο των τοξινών, μόνο στα θετικά δείγματα του πρώτου βήματος[16,20].

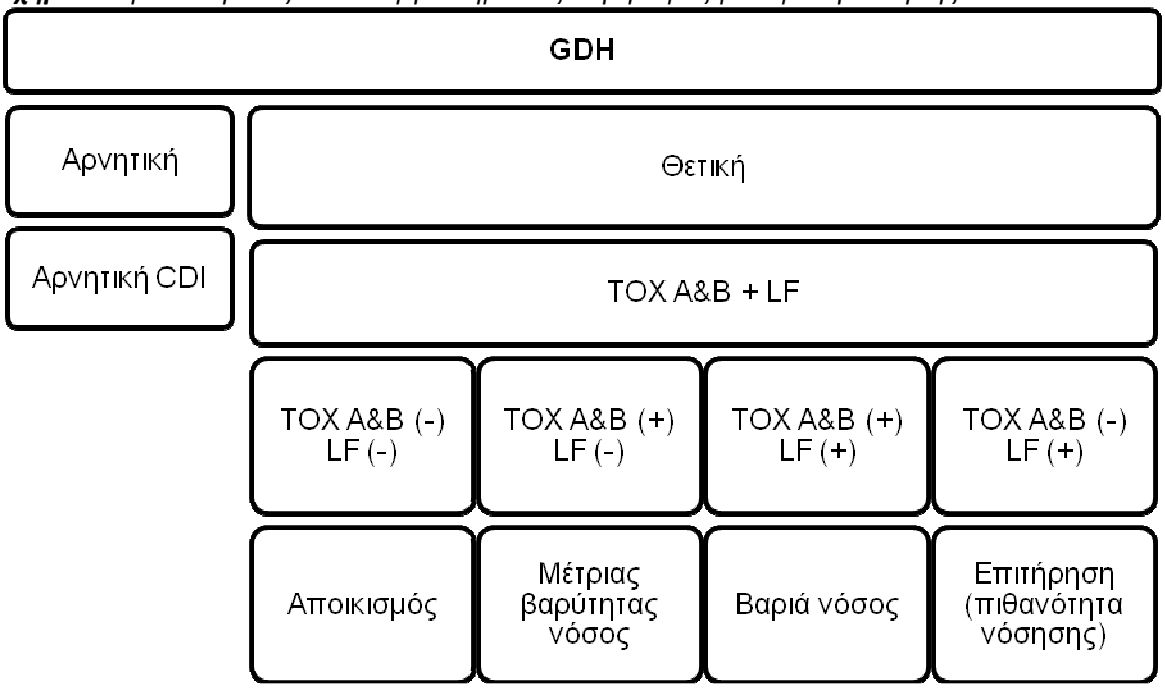
Παρά τον αλγόριθμο των δύο βημάτων, επί ισχυρής κλινικής υποψίας και επί αρνητικού αλγορίθμου συνιστάται να πραγματοποιείται τοξινογόνος καλλιέργεια, καθώς έχει αποδειχθεί πως αυξάνει την πιθανότητα διάγνωσης της CDI κατά 3,5%[21,22].

Αλγόριθμος κλινικοεργαστηριακής εκτίμησης της CDI

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ένας κλινικοεργαστηριακός αλγόριθμος για την εκτίμηση της βαρύτητας της CDI. Ο αλγόριθμος αυτός βασίζεται στην άμεση αναζήτηση από το δείγμα κοπράνων της GDH, αλλά και της λακτοφερρίνης (LF) των κοπράνων. Η λακτοφερρίνη είναι μία πρωτεΐνη με αντιμικροβιακή δράση που παράγεται από τα πολυμορφοπύρηνα. Η παρουσία της επιβεβαιώνει τη φλεγμονώδη διάρροια[23,24].

Ο αλγόριθμος αυτός αποτυπώνεται στο Σχήμα 1.

***Σχήμα 1**. Προτεινόμενος κλινικοεργαστηριακός αλγόριθμος για τη διάγνωση της CDI.*



GDH: γλουταμική δεϋδρογενάση, TOX A&B: τοξίνες A και B, LF: λακτοφερρίνη.

Συμπερασματικά, τα συστήματα υγείας θα πρέπει να παρέχουν τη δυνατότητα εργαστηριακής διάγνωσης της CDI. Απαραίτητη προϋπόθεση, όμως, είναι η συνεργασία μεταξύ νοσοκομείων, ιδρυμάτων (όπως γηροκομεία) και ιδιωτών υγείας. Επιπλέον, θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη ότι η εφαρμογή νέων εργαστηριακών μεθόδων για τη διάγνωση της CDI θα πρέπει να βασίζεται στην αποδεδειγμένη ακρίβεια και ευαισθησία τους και στην αξιολόγηση του κόστους σε σύγκριση με τις υπάρχουσες εξετάσεις.

Βιβλιογραφία

1. Μαλάμου-Λαδά Ε. Διασπορά του *C. difficile* στα νεογνά και στο περιβάλλον νοσοκομειακών νεογνικών μονάδων. Διατριβή για Υφηγεσία, Αθήνα 1984.
2. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* - more difficult than ever. N Engl J Med 2008;359:1932–1940.
3. Bartlett JG. Clostridium difficile: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis 1994;18(suppl 4):S265–S272.
4. George WL, Sutter VL, Goldstein EJ, et al. Aetiology of antimicrobial - agent associated colitis. Lancet 1978;1:802–803.
5. Heinlen L, Ballard JD. *Clostridium difficile* Infection. Am J Med Sci, 2010 September ; 340(3): 247–252.
6. Gerding DN. Disease associated with Clostridium difficile infection. Ann Intern Med, 1989; 110(4): 255-257.
7. Johnson S, Adelmann A, Clabots CR, Peterson LR, Gerding DN. Recurrences of Clostridium difficile diarrhea not caused by the original infecting organism. J Infect Dis, 1989; 159: 340-343.
8. Μαλάμου-Λαδά Ε. Νόσος του εντέρου από *C. difficile*. Εφαρμ Κλιν Μικροβιολ Εργ Διαγν 2006; τόμος 11, τεύχος 4: 160-168.
9. Swan C, Strecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, Wehland J, Aktories K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog 2009 Oct;5(10):e1000626. doi: 10.1371/journal.ppat.1000626. Epub 2009 Oct 16.
10. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev, 2010 Jul; 23(3): 529-49.
11. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile-associated disease. Gut Microbes, 2010 Jan-Feb; 1(1): 58-64.
12. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 247–263.
13. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompos A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet, 2005 Sep 24-30; 366(9491): 1079-84.
14. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. TcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 2007 Jan; 45(1):215-21.
15. Rupnik M, Widmer A, Zimmermann O, Eckert C, Barbut F. *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. J Clin Microbiol, 2008 Jun; 46(6): 2146.
16. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect, 2009 Dec; 15(12): 1053-66.
17. National Standard Methods, Processing of faeces for *Clostridium difficile*, Issue no:1.3, Issue date: September 2008, BSOP 10.
18. Perry D, Asir K, Halimi D, Orenaa S, Dale J, Payne M, Carlton R, Evans J, Gould FK. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours. J Clin Microbiol, 2010; 48(11): 3852-58.

19. Shetty N, Wren MWO, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hospital Infect, 2010 Dec; 77(1): 1-6.
20. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infections in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Society of America (IDSA). Infect Control Epidemiol, 2010; 31(5): 431-55.
21. Wilcox MH. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect, 2012 Dec; 18(6): 13-20.
22. Delmee M, van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhea: a plea for culture. J Med Microbiol, 2005 Feb; 54(Pt2): 187-91.
23. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NR. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydroganase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci, 2009; 66: 1-5.
24. Swale A, Miyajima F, Roberts P, Hall A, Little M, Beadsworth MBJ, Beeching NJ, Kolamunnage-Dona R, Parry CM, Pirmohamed M. Calpotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): Aprospective cohort study. PLOS ONE, 2014 Aug, DOI: 10. 1371/journal.pone.0106118.