

#67
marzec 2014

aktualności bioMérieux



BIOMÉRIEUX

w tym numerze:

3-7

Mikrobiologia.
Zakażenia *Clostridium difficile*.

9-10

Mikrobiologia.
Zastosowanie podłoża chromID™ *C.difficile*
w diagnostyce mikrobiologicznej.

11-15

Mikrobiologia.
Technologia MALDI-TOF MS

16-19

Co nowego w programie
FORUMVITEK 2?

20-21

Biologia molekularna.
Genotype CDiff

22

W pełni zautomatyzowany proces barwienia
od utrwalenia do wysuszenia preparatu

23

Nowe informacje
na stronie www.biomerieux.pl

Redakcja



wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna: Elżbieta Wójcik

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 67:

Marcin Iszkuło
Ireneusz Popławski
Alicja Rusinek
Piotr Szczegółow
Joanna Świdarska – Kiec
Konrad Klimek
Marta Warowny
Aneta Lesiuk (korekta)

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 9
tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54
www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne:

Mariusz Glejzer
www.glejzer.com

Szanowni Państwo,

Po kilku latach od powstania w Polsce firma bioMérieux zauważyła potrzebę stworzenia nowego kanału komunikacji przeznaczonego dla Klientów, służącego zarówno do informowania o nowych produktach czy usługach świadczonych przez firmę, jak również przekazującego ważne informacje z życia firmy. W 1997 podjęliśmy decyzję o rozpoczęciu prac nad tak dziś lubianym i cenionym przez Państwa kwartalnikiem *Aktualności bioMérieux*. W ciągu kolejnych kilkunastu lat nieustannie dzielili się Państwo z nami swoimi cennymi uwagami i konstruktywnymi opiniami, co pozwoliło redakcji na podniesienie poziomu merytorycznego, dzięki czemu *Aktualności* zyskały sporą popularność nie tylko wśród diagnostów, lecz również wśród lekarzy, a także studentów.

Pierwsze numery naszego czasopisma miały formę kilkustronicowej broszury, z czasem kolejne wydania zwiększały swoją objętość, a redakcja stale dbając o jakość i rozwijając wartość merytoryczną nieustannie poszerzała zakres podejmowanych tematów. Naszym celem w tamtym czasie było dotarcie do jak największej grupy czytelników, którym mieliśmy do zaoferowania wiele ciekawych i wartościowych treści. W konsekwencji zwiększał się też z roku na rok nakład *Aktualności*, który w ostatnim czasie wyniósł już 1000 egzemplarzy.

Obecnie, w drugim już dziesięcioleciu XXI wieku, w dobie Internetu i nośników elektronicznych, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom naszych czytelników, którzy coraz większą wagę przywiązują do komunikacji elektronicznej, podjęliśmy ważną decyzję o zmianie nie tylko szaty graficznej naszego czasopisma, ale także sposobu oraz formy jego wydawania. Dlatego postanowiliśmy stworzyć bardziej nowoczesną i atrakcyjną formę elektroniczną naszego kwartalnika, co pozwoli nam z pewnością poszerzyć grono potencjalnych czytelników. Nowy format *Aktualności* staje się też w ten sposób bardziej ekologiczny, a przez to lepiej dostosowany do strategii **bioMérieux GOES GREEN**.

Zmiana formy i sposobu wydawania *Aktualności* może wpłynąć wyłącznie pozytywnie na zawartość merytoryczną naszego kwartalnika, w którym nadal będą Państwo mogli znaleźć ciekawe i wartościowe artykuły związane z diagnostyką laboratoryjną, nowoczesnymi metodami diagnostycznymi, światowymi trendami oraz problemami i wyzwaniem, przed jakimi staje współczesna medycyna. W tej dziedzinie będziemy współpracować z wybitnymi specjalistami zarówno z naszego kraju, jak również z zagranicy. *Aktualności*, stając się nowoczesną platformą komunikacyjną, będą informowały Państwa na bieżąco nie tylko o wprowadzanych czy unowocześnianych produktach bądź usługach, ale również o nowatorskich i pionierskich rozwiązaniach diagnostycznych oferowanych przez firmę bioMérieux.

Każde wydanie *Aktualności* będzie nie tylko publikowane na naszej stronie internetowej www.biomerieux.pl, ale również wysyłane na adres e-mail klientów, którzy wypełnili kwestionariusz zgody na komunikację elektroniczną. Tych z Państwa, którzy jeszcze tego nie zrobili, a chcieliby otrzymywać kolejne wydania naszego kwartalnika na swoją skrzynkę mailową, prosimy o pobranie kwestionariusza ze strony internetowej, uzupełnienie, podpisanie go oraz odeślanie faksem na numer: 22 5698554.

Jesteśmy pewni, że nowoczesna i wygodna forma, w jakiej będą od teraz wydawane *Aktualności*, spotka się z Państwa zainteresowaniem, a ewentualne uwagi i opinie umożliwią redakcji dalsze doskonalenie merytorycznej zawartości czasopisma.

Dziękujemy naszym Czytelnikom za minione 17 lat i gorąco zachęcamy do czytania kolejnych numerów *Aktualności bioMérieux*.

Zakażenia *Clostridium difficile*: algorytmy diagnostyczne z zastosowaniem testów wykrywających dehydrogenazę glutaminianową

prof. dr hab. n. med. **Gayane Martirosian**
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Historia

Clostridium difficile jest beztlenowo rosnącą Gram-dodatnia laseczką, wytwarzającą spory. Bakteria powoduje zakażenia układu pokarmowego o różnym nasileniu: od biegunek średniej ciężkości do rzekomobłoniastego zapalenia jelit, często przebiegającego z komplikacjami i wysoką śmiertelnością.

Bakteria *C. difficile* została wyhodowana ze smółki noworodka w 1935 roku przez Hall'a i O'Tolle. Dużo wcześniej, w 1893 roku Finney opisał zmiany rzekomobłoniaste u 22-letniej pacjentki po zabiegu chirurgicznym. Podobne zmiany były notowane przez chirurgów i później, od początku lat 50-ych XX wieku. Wtedy gronkowca złocistego uznano za czynnik etiologiczny tych zjawisk, zwłaszcza że wankomycyna podawana doustnie była bardzo skuteczna w tych przypadkach. Dopiero w latach 70-ych XX wieku po wprowadzeniu do na rynek światowy antybiotyku klindamycyny ponownie zwrócono uwagę na ten drobnoustroj. Biegunki poantybiotykowe (wcześniej nazywane również po-klindamycynowymi) i rzekomobłoniaste zapalenie jelit stwierdzano coraz częściej u pacjentów w różnych krajach, co było powodem rozpoczęcia szeregu badań nad tym drobnoustrojem. W latach 80-ych i 90-ych XX wieku dokładnie przebadano właściwości *C. difficile*, zdolność do wytwarzania toksyn (toksyna A – enterotoksyna, toksyna B – cytotoksyna, toksyna binarna), opublikowano szereg prac na temat epidemiologii zakażeń i możliwości szerzenia się zakażeń *C. difficile*, zwłaszcza w warunkach szpitalnych, opracowano szereg testów diagnostycznych opartych na bezpośrednim wykrywaniu toksyn w kale biegunkowym, opisano testy biochemiczne do identyfikacji bakterii, przeprowadzono badania wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki i opracowano metody leczenia zakażeń *C. difficile*, wykazano patomechanizmy zakażeń *C. difficile*, między innymi zwrócono uwagę na niszczenie przez antybiotyki tak zwanego "colonization resistance factor", czyli fizjologicznej mikroflory jelit, chroniącej makroorganizm przed kolonizacją drobnoustrojami patogennymi.

Czynniki ryzyka zakażeń *C. difficile*

Za główne czynniki ryzyka zakażeń *C. difficile* uznano:

- antybiotykoterapię,
- hospitalizację,
- podeszły wiek (≥ 65 r. życia).

Przeprowadzono liczne badania, żeby wskazać, jakie konkretnie antybiotyki stwarzają największe zagrożenie wywoływania biegunek poantybiotykowych. Wymieniano cefalosporyny, penicyliny, fluorochinolony i inne. Opisywano także przypadki zakażeń *C. difficile*, niezwiązane z antybiotykoterapią, jednak były to tylko przypadki kazuistyczne.

Badano także inne leki w kierunku możliwości wywoływania zakażeń *C. difficile*. Początkowo spośród leków antyneoplastycznych, tylko metotreksaty wiązano z zakażeniem *C. difficile*.

Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień na temat korelacji między stosowaniem inhibitorów pompy protonowej a zakażeniem *C. difficile*. Kwas żołądkowy pełni 3 główne funkcje: aktywuje pepsynogen, sprzyja absorpcji wapnia i żelaza z pokarmu i zamyka dojście drobnoustrojom patogennym do jelit. Uważa się, że podwyższenie pH żołądka na skutek zastosowania inhibitorów pompy protonowej może sprzyjać większej przeżywalności spor *C. difficile* i dotarciu ich do jelita grubego, gdzie po germinacji i zasiedleniu bakterie produkują toksyny, które odpowiadają za objawy chorobowe. Potwierdzono to w eksperymentach ze zwierzętami (myszy). Udowodniono także, że stosowanie leków antydepresyjnych podwaja ryzyko zakażeń *C. difficile*, co zostało wykryte przypadkiem przez epidemiologów CDC, którzy badając ogniska zakażeń *C. difficile* odkryli, że trzykrotnie częściej występują one u pacjentów mających depresję i psychozy. Inne leki np. statyny zmniejszają ryzyko rozwoju zakażeń *C. difficile* zarówno związanych, jak i niezwiązanych ze służbą zdrowia. Statyny są lekami z wyboru dla większości pacjentów z dyslipidemią. Jest to grupa leków obniżających stężenia lipidów poprzez hamowanie reduktazy HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A), co powoduje zmniejszenie syntezy cholesterolu.

Mają one także szereg innych właściwości niezwiązanych z obniżeniem stężenia cholesterolu, np. poprzez działanie pleotropowe są pomocne w leczeniu zakażeń, zwłaszcza wirusowych. Wykazano, że statyny zmniejszają ryzyko rozwoju zakażeń *C. difficile* poprzez działanie przeciwwzapalne i modulujące.

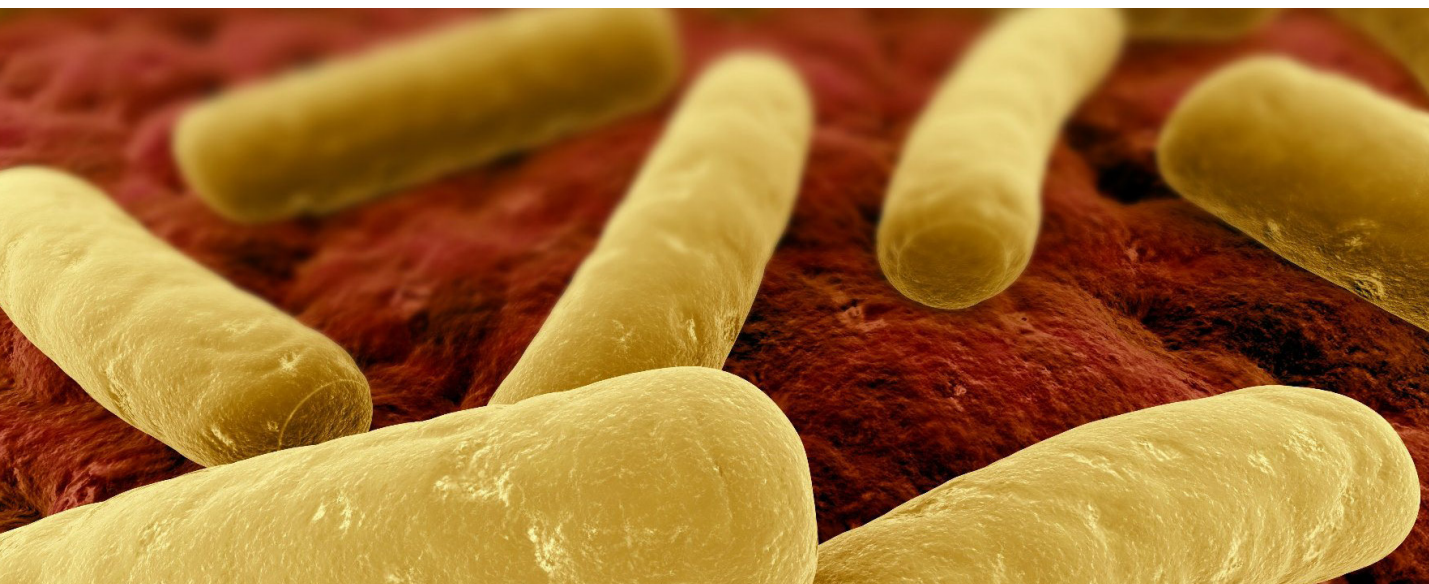
Szereg prac poświęcono badaniu zakażeń *C. difficile* u pacjentów pediatrycznych. Próby wskazania *C. difficile* jako czynnika etiologicznego niemowlęcego martwiczego zapalenia jelit, zespołu nagłej śmierci niemowląt, choroby Crohn'a, wrzodziejącego zapalenia jelit lub przewlekłych biegunek nie zostały potwierdzone na dużą skalę. Ostatnio coraz częściej lekarze wiążą zaostrzenie objawów IBD (zapalnych chorób jelitowych) z obecnością toksynotwórczych szczepów *C. difficile*, ponieważ prawie u połowy pacjentów z IBD stwierdzono obecność tej bakterii. Początkowo badania związane z zakażeniami *C. difficile* ukierunkowano na niemowlęta. U niemowląt stwierdzano kolonizację toksynotwórczymi szczepami *C. difficile* bardzo często, jednak bez widocznych objawów klinicznych. Jest to jedyna grupa wiekowa, w której objawy kliniczne nie towarzyszą obecności *C. difficile*. Za przyczynę tego zjawiska uważa się niedostateczny rozwój układu odpornościowego i brak receptorów dla toksyn *C. difficile* u niemowląt, chociaż nie jest to jednoznacznie udowodnione. Zakażenia, co prawda rzadziej, ale stwierdza się u dzieci > 1 roku życia i co jest bardzo ważne, stosunkowo rzadko korelują one z antybiotykoterapią. Jednak ostatnio liczba hospitalizacji z powodu zakażeń *C. difficile* wzrosła dwukrotnie wśród pacjentów pediatrycznych. Najwyższą zapadalność zaobserwowano u dzieci od 1 do 4 roku życia, a najniższą u niemowląt. Biorąc pod uwagę wysoką (50-70%) kolonizację *C. difficile* u niemowląt <1 roku życia, trudno jest określić, czy *C. difficile* w tej grupie wiekowej jest przyczyną prawdziwych zakażeń, czy tylko kolonizacji, zwłaszcza że niemowlęta nigdy nie posiadają stolca tak uformowanego jak osoby dorosłe. Najnowsze badania sugerują, że dzieci ≥ 1 roku życia z chorobami współistniejącymi (nowotwory, przeszczep narządu, gastrostomia lub jejunostomia) są w grupie podwyższonego ryzyka zakażeń *C. difficile*.

Hiperepidemiczny szczep

C. difficile NAP1/027/BI

Pod koniec XX wieku wydawało się, że wszystko już wiadomo na temat tego drobnoustroju i nie spodziewano się żadnych niespodzianek ze strony *C. difficile*.

Z początkiem XXI wieku zaobserwowano jednak istotne zmiany w epidemiologii i przebiegu klinicznym zakażeń *C. difficile*. Najpierw w Ameryce Północnej, później w Europie zaobserwowano zwiększoną liczbę zakażeń *C. difficile*, które charakteryzowały się ciężkim przebiegiem, a nawet notowano zwiększenie liczby przypadków zgonów z powodu tych zakażeń. W USA wyliczono, że na leczenie jednego pacjenta zakażonego *C. difficile* przeznaczona jest około 12.607 \$, a roczne koszty związane z hospitalizacją pacjentów zakażonych *C. difficile* wynoszą około 5 miliardów dolarów. W krajach europejskich (Irlandia, Wielka Brytania, Niemcy) stwierdzono około dwukrotny wzrost kosztów leczenia zakażeń *C. difficile*: aż do około £ 8.843 w roku 2010. Dokładna analiza tych przypadków wykazała szerzenie się zakażeń, wywołanych hiperepidemicznym szczepem *C. difficile* NAP1/027/BI. Szczep ten dokładnie przebadano i stwierdzono obecność delekcji w genach regionu PaLoc (wyspa patogenności), zwłaszcza w negatywnym regulatorze toksynotworzenia. Szczep NAP1/027 wyróżnia się wzmocnionym wytwarzaniem toksyn A i B (odpowiednio 16 i 23 razy.). W tym samym czasie jednak stwierdzono bardzo ciężkie przypadki zakażeń wywołane innymi genotypami szczepów. Analiza 14 genomów różnych szczepów wywołujących bardzo ciężkie zakażenia łącznie z NAP1/027 wykazała, że *C. difficile* posiada genom rdzeniowy o wielkości 3,4 Mb, na który składa się około 3.000 genów. Udało się zidentyfikować 20 markerów DNA i 10.683 polimorfizmów w pojedynczych nukleotydach (SNP-single nucleotide polymorphism), związanych z ciężkim przebiegiem zakażenia (NAP1). Jeden z tych markerów *sspA* był obecny we wszystkich badanych szczepach. Dwa inne markery CD1269 i CD1265 zostały wykryte nawet w szczepach A-/B+ i mogą być wykorzystane w celach diagnostycznych.



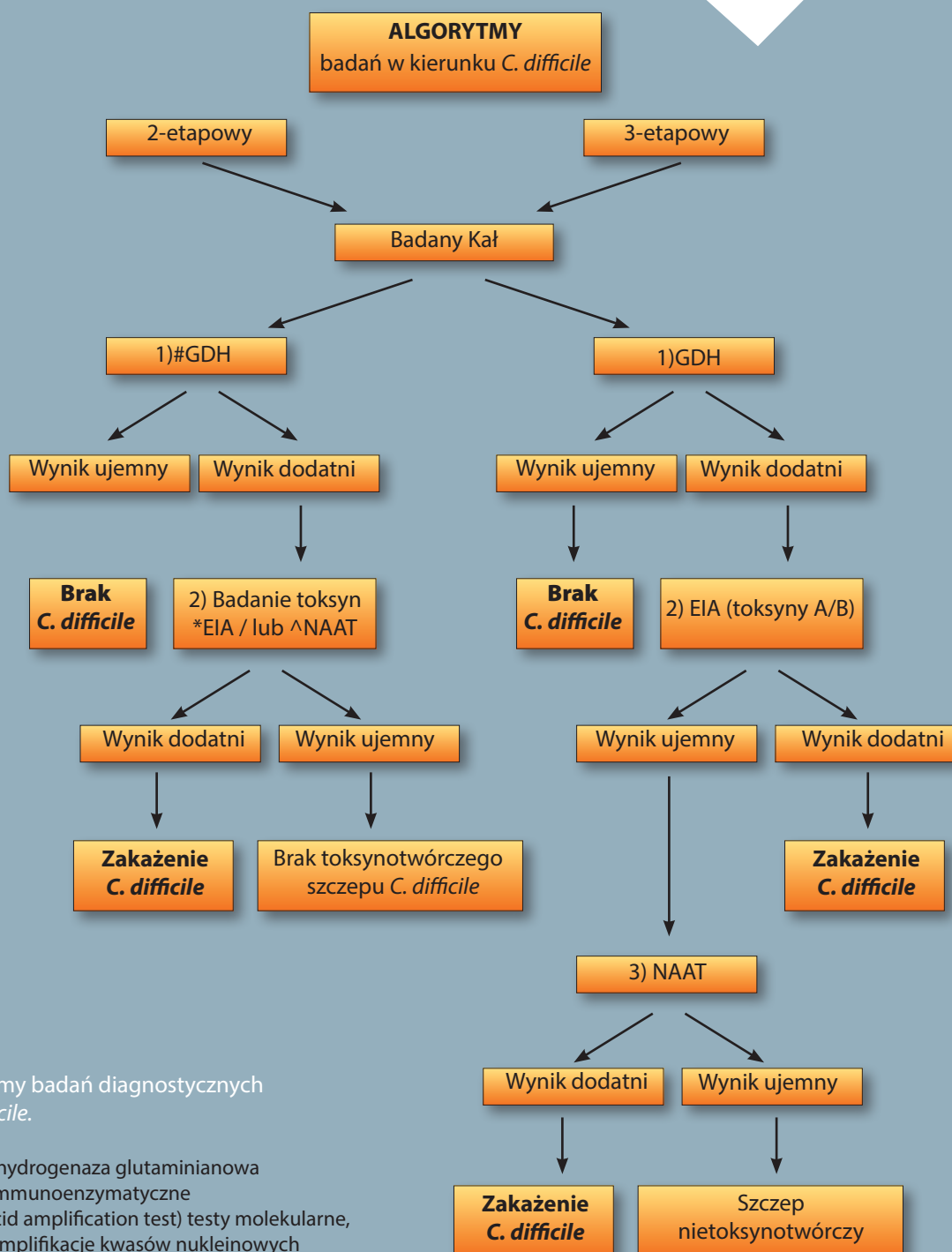
W związku z zaistniałą sytuacją epidemiologiczną w wielu krajach podjęto decyzję o zgłaszaniu zakażeń *C. difficile* do odpowiednich jednostek, zajmujących się monitorowaniem i zwalczaniem zakażeń. Również w Polsce, na podstawie Ustawy o chorobach zakaźnych wśród patogenów alarmowych podlegających zgłaszaniu znalazł się i drobnoustrój *C. difficile*. W Polsce zapadalność na zakażenia *C. difficile* nie jest znana, opisywane są przypadki epidemicznego rozprzestrzeniania się szczepów *C. difficile* opornych na fluorochinolony, udział środowiska szpitalnego w zakażeniach itd. Przy ekstrapolacji danych dotyczących zapadalności z USA i Europy w szpi-

talu wojewódzkim (30.000 hospitalizacji rocznie) może być stwierdzanych rocznie 30-260 przypadków zakażeń *C. difficile*, w szpitalu powiatowym (10.000 hospitalizacji rocznie) 10-90 przypadków / rocznie.

Algorytmy diagnostyczne

Pojawienie się hiperwirulentnego szczepu poskutkowało także zmianami w przyjętych schematach diagnostycznych. Zaproponowano dwu- i trzyetapowe algorytmy diagnostyczne zakażeń *C. difficile*.

Algorytmy te polegają na kolejnym stosowaniu odpowiednich testów, przedstawionych na Rycinie 1.



» Rycina 1. Algorytmy badań diagnostycznych w kierunku *C. difficile*.

- #GDH – enzym dehydrogenaza glutaminianowa
- *EIA – odczyny immunoenzymatyczne
- ^NAAT – (nucleic acid amplification test) testy molekularne, oparte o amplifikację kwasów nukleinowych

Zaproponowane testy są używane w różnych kombinacjach w różnych krajach i laboratoriach. Niektórzy proponują w celach oszczędnościowych bezpośrednio zastosowanie testów molekularnych, wykrywających geny, kodujące toksyny *C. difficile*. Według innych autorów jednak nie jest to zupełnie wystarczające, gdyż istnieje możliwość kolonizacji przewodu pokarmowego pacjenta toksynotwórczym szczepem *C. difficile*, nawet po skutecznym wyleczeniu zakażenia *C. difficile* antybiotykami z wyboru.

Wykrywanie GDH

– dehydrogenazy glutaminianowej

W diagnostyce zakażeń *C. difficile* ostatnio ponownie wrócono do oznaczenia enzymu (antygeny) GDH bezpośrednio w materiale badanym. Antygen ten wykorzystywano w celach diagnostycznych biegunek poantybiotykowych w latach 90-ych ubiegłego stulecia. Później zrezygnowano z tego badania ze względu na to, że GDH jest antygenem wspólnym dla wszystkich szczepów *C. difficile* zarówno toksynotwórczych jak i nietoksynotwórczych. Z tego powodu, że oznaczenie GDH nie dawało możliwości różnicowania szczepów toksynotwórczych od nietoksynotwórczych, a generowało dodatkowe koszty, zrezygnowano z zastosowania tego testu w celach diagnostycznych. Dodatkowo testy obecne na rynku w latach 90-ych XX wieku reagując krzyżowo z antygenem GDH, obecnym u innych drobnoustrojów (w tym również u innych gatunków *Clostridium* spp.), przyczyniały się do uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników.

Obecnie w testach dostępnych na rynku stosuje się przeciwciała monoklonalne, wykrywające wyłącznie GDH *C. difficile* niedające reakcji krzyżowych z antygenami innych drobnoustrojów beztlenowo rosnących (*Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., i inne).

Dehydrogenazy glutaminianowe (GDH – glutamate dehydrogenase) są enzymami produkowanymi zarówno przez komórki eukariotyczne, jak i prokariotyczne. Zainteresowanie tymi enzymami rośnie od 1952 roku, kiedy Olsonowi i Anfinsenowi udało się oczyszczenie i krystalizacja pierwszych enzymów z tej rodziny. Enzymy te charakteryzują się dużą stabilnością w środowisku, dlatego też mogą być używane do wykrywania w testach diagnostycznych jako punkty docelowe.

Większość dehydrogenaz glutaminianowych są to oligomeryczne, zwykle heksameryczne struktury białkowe, taka specyficzna struktura stwarza możliwości interakcji między podjednostkami. W przypadku GDH eukariotycznego sugeruje się obecność szeregu nukleotydów wiążących w każdym monomerze. Bakteryjne GDH w odróżnieniu od GDH eukariotycznego nie reaguje z GTP i ADP, reprezentując nie-klasyczną kinetykę. Różne warunki (pH, temperatura, różne stężenia NAD itd.) mogą zmieniać zachowanie bakteryjnego GDH. Wśród prokariotycznych dehydrogenaz glutaminianowych najlepiej przebadaną jest GDH *Clostridium symbiosum*. W badaniach z zastosowaniem krystalografii udowodniono, że heksamer zawiera powtarzające się identyczne podjednostki z domeną wiążącą ko-enzym i domeną wiążącą glutaminian.

Enzym metaboliczny GDH szczepów *C. difficile* jest kodowany przez gen *gluD*. Badano także szczepy, reprezentujące różne rybotypy w kontekście posiadania genu *gluD*. Do badania zakwalifikowano 104 szczepy z różnych krajów, reprezentujące 77 różnych rybotypów, w tym 25 nietoksynotwórczych. Do badania włączono również PCR rybotypy 027 i 001 wyhodowane zarówno z ognisk epidemicznych, jak i z przypadków sporadycznych. Autorzy udowodnili, że gen *gluD* jest regionem bardzo konserwatywnym i że antygen GDH jest obecny we wszystkich badanych szczepach o różnych rybotypach w ilościach nawet o 500 razy przekraczających dolny limit detekcji tego enzymu w testach komercyjnych.

Zainteresowanie naukowców wykrywaniem antygeny GDH *C. difficile* ostatnio wzrasta, na co wskazuje szereg publikacji dotyczących zastosowań testów, wykrywających GDH w celach diagnostycznych zakażeń *C. difficile*. Wykazano bardzo wysoką negatywną wartość predykcyjną tych testów (NPV – Negative Predictive Value) i w większości laboratoriów mikrobiologicznych test GDH jest stosowany jako test przesiewowy. W przypadku uzyskania wyniku negatywnego badanie dalej nie jest kontynuowane. Uważa się, że negatywny wynik testu oznacza brak *C. difficile* w danym materiale badanym. Grupa autorów z Wielkiej Brytanii (HPA – Health Protection Agency) opublikowała wyniki meta-analizy, obejmującej 13 artykułów, przedstawionych w bazach Pubmed, Medline i Cochrane, odnośnie zastosowania testów wykrywających antygen GDH w diagnostyce zakażeń *C. difficile* z lat 2000-2009. W meta-analizie porównywano wyniki testu GDH ze "złotym standardem" – testem neutralizacji cytotoksyczności nadsącza badanego kału na hodowlach komórkowych lub z testem oznaczenia cytotoksyczności szczepów wyhodowanych, lub też z hodowlą szczepów *C. difficile*. Autorzy angielscy wykazali bardzo dobrą korelację testu GDH z hodowlą: > 90% czułości i >95% swoistości. Kiedy porównano wyniki testu GDH z hodowlą i oznaczeniem toksynotwórczości tych szczepów, wykazano swoistość w granicach 80-100%, wyniki fałszywie dodatnie zaś stanowiły około 20%, co prawdopodobnie wynika z faktu wytwarzania enzymu GDH zarówno przez toksynotwórcze, jak i nietoksynotwórcze szczepy *C. difficile*. Autorzy meta-analizy wnioskują, że ze względu na wysoką czułość i swoistość i oraz negatywną wartość predykcyjną (od 94,6% do 100%) test GDH jest bardzo dobrym testem do zastosowania w algorytmach uwzględniających dalsze badania materiału w kierunku poszukiwania toksyn A/B *C. difficile*.

Dokładna diagnostyka zakażeń *C. difficile* polega na wykazaniu obecności toksyn *C. difficile* bezpośrednio w materiale badanym (kał) za pośrednictwem testu neutralizacji cytotoksyczności na hodowli komórek tkankowych lub stosując z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA), lub immunochromatograficznych. Test cytotoksyczności uznano za "złoty standard", z którym porównuje się wszystkie inne testy, wykrywające toksyny *C. difficile*.

Test ten jednak ma określone ograniczenia łącznie z wyższymi kosztami i dłuższym czasem oczekiwania na wyniki (>24 godziny). W celach diagnostycznych test ten nie jest szeroko stosowany, używa się go głównie w laboratoriach doświadczalno-naukowych. Wyhodowanie szczepów *C. difficile* z materiału badanego i oznaczenie jego toksynotwórczości (TC - toxigenic culture) zaproponowano jako alternatywę dla testu cytotoksyczności na hodowli komórkowej. Tutaj również są ograniczenia czasowe (hodowla trwa > 48 godzin), a także istnieje niebezpieczeństwo nadmiernej diagnostyki i niepotrzebnej antybiotykoterapii, gdy pacjent jest tylko skolonizowany toksynotwórczym szczepem *C. difficile*, a biegunkę powoduje inny drobnoustrój. Problemy z testami ELISA i immunochromatograficznymi polegają głównie na stosunkowo niskiej czułości i pozytywnej wartości predykcyjnej tych testów.

Dlatego też często uzyskuje się wyniki fałszywie ujemne (jak również fałszywie dodatnie, chociaż dużo rzadziej). Granica wykrywania toksyn *C. difficile* w testach immunoenzymatycznych wynosi od 100 do 1000 pg toksyn w porównaniu z testem cytotoksyczności i neutralizacji na hodowli komórkowej, wykrywającym < 10 pg. Testy immunoenzymatyczne posiadają stosunkowo niską czułość. Dobrą alternatywą są testy molekularne, wykrywające do 1 x 10⁵ komórek *C. difficile* w 1 g kału badanego. Czułość tych testów wynosi prawie 100%, a swoistość wynosi 95% w porównaniu do testu cytotoksyczności i neutralizacji na komórkach tkankowych. Jednak kiedy porównuje się testy molekularne do hodowli szczepu i wykrywaniu jego zdolności do toksynotworzenia, czułość tych testów wynosi tylko 83,6%, a swoistość – 98,2%. Znacznie różnią się także koszty wymienionych testów: według danych z Wielkiej Brytanii jedno oznaczenie toksyn A/B/C. *difficile* kosztuje około £6, test w kierunku GDH (EIA) kosztuje £3,20, a badanie PCR – £20 (w koszty nie wliczono kosztów pracy personelu medycznego).

Porównując różne metody i algorytmy diagnostyczne zakażeń *C. difficile* grupa autorów angielskich dochodzi do wniosku, że tylko test cytotoksyczności pozytywnie koreluje ze stanem klinicznym pacjenta, dlatego też metoda oznaczenia cytotoksyny w kale najlepiej definiuje prawdziwe przypadki infekcji wywołanych przez *C. difficile*. Opisano także nową diagnostyczną kategorię "Potencjalnych wydalaczy *C. difficile* – potential *C. difficile* excretor" [cytotoksyna w kale (-) / cytotoksyna w szczepie (+)] charakteryzującą pacjentów z biegunką, prawdopodobnie niewywołaną przez *C. difficile*, ale pacjent taki może stanowić źródło zakażeń dla innych pacjentów (cross-infection- zakażenia krzyżowe). Wiadomo, że lekami z wyboru w leczeniu zakażeń *C. difficile* są metronidazol i wankomycyna. W literaturze medycznej coraz częściej pojawiają się doniesienia o sukcesach w poszukiwaniu nowych leków do walki z zakażeniami *C. difficile*, ostatnio bardzo poszukiwanych zwłaszcza do leczenia pacjentów z nawrotami choroby. W USA i Europie zatwierdzono nowy lek – fidaksonemycynę bardzo skuteczną w leczeniu nawrotów zakażeń. Pojawiła się także duża grupa zwolenników tak zwanej

„fecal transplant = transplantacji kału” pobranego od osoby zdrowej w celu normalizacji mikroflory jelitowej pacjentów z zakażeniem *C. difficile*. Metoda ta była z powodzeniem zastosowana w Polsce jeszcze w ostatnich dekadach XX wieku przez panią prof. Felicję Meisel-Mikołajczyk.

Według ostatnich badań autorów amerykańskich u większości pacjentów ze stwierdzonym zakażeniem *C. difficile* leczonych wankomycyną hamujące stężenia antybiotyku w kale wykrywano jeszcze po 4-5 dniach od zakończenia terapii. U pacjentów leczonych metronidazolem hamujące stężenia stwierdzono tylko w trakcie terapii. Udowodniono, że w ciągu 14-21 dni po terapii większość zawiesin kałowych podtrzymywała wzrost *C. difficile*, a sekwencjonowanie (16S rRNA) wykazało trwałe i wyraźne zmiany mikroflory jelitowej. Po 21-28 dniach po zakończeniu leczenia większość zawiesin kałowych już hamowała wzrost *C. difficile*, wtedy odnotowywano także ewidentne przypadki przywrócenia normalnej mikroflory jelitowej. Autorzy wywnioskowali, że czas podatności pacjentów na ponowną kolonizację szczepami *C. difficile* po leczeniu poprzedzającego zakażenia *C. difficile* rozpoczyna się już po kilku dniach od momentu zakończenia leczenia i u większości pacjentów trwa do około 3 tygodni. Dlatego też po ustąpieniu objawów klinicznych pacjenci nadal (nawet do 3 tygodni) są narażeni na ponowne zakażenie *C. difficile* i muszą być chronieni przed kontaktem zarówno z pacjentem z zakażeniem objawowym, jak i z nosicielami bakterii. Sprawa postępowania z nosicielami *C. difficile* lub też tak zwanymi "potencjalnymi wydalaczami" bakterii nie jest jeszcze do końca doprecyzowana. Na pewno wiadomo, że osoby mogące być źródłem zakażenia muszą być w oddziałach szpitalnych izolowane, natomiast dalsze postępowanie dotyczące leczenia tych pacjentów jest nadal szeroko dyskutowane w czasopiśmie specjalistycznych.

Ze względu na fakt, że populacja osób w starszym wieku w krajach europejskich będzie wzrastać, w przyszłości można oczekiwać także zwiększenia liczby pacjentów z zakażeniami *C. difficile*. Dlatego też w kilku ośrodkach amerykańskich i europejskich są prowadzone intensywne i dość zaawansowane badania w kierunku opracowania szczepionki, chroniącej przed zakażeniem *C. difficile*.



Jakościowy test w systemie VIDAS wykrywający dehydrogenazę glutaminianową - antygen charakterystyczny dla *Clostridium difficile*.

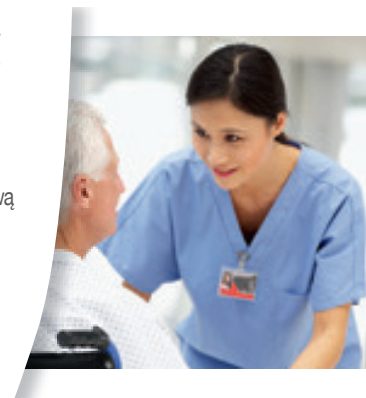
KLIKNIJ ABY ODWIEDZIĆ STRONĘ WWW

Infekcja *C. difficile*

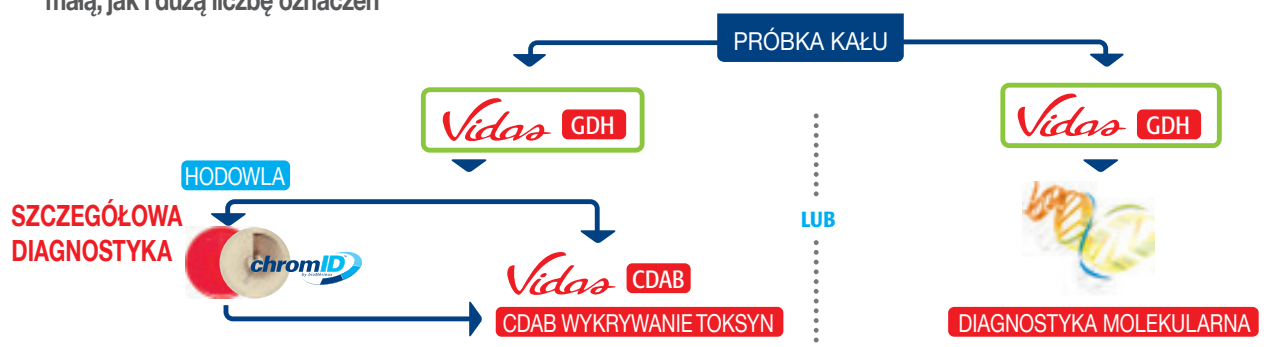
Clostridium difficile jest naturalnie występującą bakterią gram-dodatnią, należącą do rodzaju *Clostridium*. Odpowiada za 15 – 25 % przypadków biegunek związanych z pobytem w placówkach opieki zdrowotnej. *C. difficile* jest też główną przyczyną poantybiotykowego zapalenia jelit.*

VIDAS® *C. difficile* GDH

VIDAS® *C. difficile* GDH to jakościowy test, który wykrywa antygen *C. difficile* - dehydrogenazę glutaminianową (GDH) w próbkach kału. Test jest szczególnie przydatny w **badaniach przesiewowych pacjentów z podejrzeniem zakażenia *C. difficile*** (badania z 2 lub 3-stopniowym algorytmem).



- > Automatyczny i łatwy w użyciu
- > Pomaga wykluczyć pacjentów z wynikiem ujemnym (bez infekcji *C. difficile*) w zaledwie 50 minut
- > Elastyczne rozwiązanie, odpowiednie dla laboratoriów wykonujących małą, jak i dużą liczbę oznaczeń



Wiarygodne wyniki

	VIDAS GDH porównanie z CCFA** (306 dodatnich i 1598 ujemnych)	VIDAS GDH porównanie z chromID <i>C. difficile</i> (350 dodatnich i 1554 ujemnych)
Czułość	95.8% [92.8 – 97.7]%	92.9% [89.6 – 95.3]%
Specyficzność	90.0% [88.4 – 91.4]%	91.8% [90.3 – 93.1]%
Ujemna wartość predykcyjna	99.1% [98.5 – 99.5]%	98.3% [97.5 – 98.9]%

	VIDAS® <i>C. difficile</i> GDH
Nr katalogowy	30125
Zawartość zestawu	60 testów
Czas oczekiwania na wynik	50 minut
Rodzaj próbki	Kał
Objętość próbki kału	200 µL
Objętość próbki po wstępnej obróbce	300 µL
Kalibracja	Co 28 dni

Testy do diagnostyki *C. difficile* w ofercie bioMérieux

- **Badania przesiewowe:** VIDAS® *C. difficile* GDH - Nr kat. 30125
- **Wykrywanie toksyn:** VIDAS® *C. difficile* Toxin A&B - Nr kat. 30118
- **Hodowla drobnoustrojów:** chromID® *C. difficile* agar - Nr kat. 43871
Clostridium difficile agar - Nr kat. 43431

* (Bartlett JG, 2002).

** CCFA : Agar z cykloseryną, cefoksytyną i fruktozą. (Cycloserine-Cefoxitin-Fructose agar).

Zastosowanie podłoża chromID™ *C.difficile* w diagnostyce mikrobiologicznej

dr n. biol. Wanda Kamińska
Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej,
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”



Podłoże chromID™ *C.difficile* jest przeznaczone do selektywnego wykrywania laseczek *Clostridium difficile* w materiale klinicznym, najczęściej w próbkach kału. Zakażenie toksynotwórczym szczepem *C.difficile* odpowiada za szereg objawów ze strony przewodu pokarmowego, od biegunek o różnym nasileniu, do rzekomobłoniastego zapalenia okrężnicy, którego ciężki lub powikłany przebieg może doprowadzić do śmierci pacjenta. Rozwój zakażenia jest związany ze stosowaniem antybiotyków, które zaburzają prawidłową florę przewodu pokarmowego i sprzyjają selekcji *C.difficile*. Drobnoustroj ten jako laseczka Gram-dodatnia wytwarzająca przetrwalniki, odporne na działanie wysokiej temperatury, wysuszenie oraz liczne środki dezynfekcyjne, często występuje w środowisku szpitalnym i łatwo kolonizuje przewód pokarmowy pacjentów. Ze względu na obecność form przetrwalnikowych, podczas opieki nad zakażonymi pacjentami zalecane jest mycie rąk wodą z mydłem, zamiast lub niezależnie od dezynfekcji. Bakterie *C.difficile* cechuje łatwość rozprzestrzeniania i wywoływania epidemicznych zakażeń u licznych pacjentów na oddziale, a z drugiej strony zdolność wywoływania zakażeń inwazyjnych o ciężkim przebiegu. Właściwości te zaważyły na umieszczeniu drobnoustroju na liście czynników alarmowych, podlegających zgłaszaniu i raportowaniu jako zakażenie szpitalne, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2011 roku (załącznik 1). Zgłaszaniu podlega zarówno izolacja (wyhodowanie) chorobotwórczego drobnoustroju, jak i wykrycie wytwarzanych przez niego toksyn A/B. Ze względu na nosicielstwo kałowe, częste zwłaszcza u niemowląt i małych dzieci, badania w kierunku *C.difficile* należy wykonywać wyłącznie u pacjentów z biegunką, z wyjątkiem pacjentów z objawami niedrożności jelit.

Hodowla *C.difficile* jest metodą wykrywania drobnoustroju alternatywną dla szybkich testów na obecność toksyn A/B. Podłoża konwencjonalne, nawet te, na których *C.difficile* wytwarza charakterystyczne kolonie o swoistym zapachu, wymagają 48 godzin inkubacji, co jest zbyt długim czasem dla identyfikacji patogenu alarmowego. Testy wykrywające toksyny są drogie i nie zawsze mimo obecności toksynotwórczego drobnoustroju dają wynik dodatni – np. w przypadku niskiego stężenia toksyny lub obecności w próbce kału czynników hamujących reakcję immunologiczną, na której oparto zasadę działania testu. Bardzo wygodnym rozwiązaniem jest wykorzystanie podłoża chromogennego chromID *C.difficile*, które cechuje wysoka selektywność i swoistość, a przy tym hodowlę charakterystycznych kolonii uzyskuje się po 24 godzinach inkubacji w temp. 35°C w warunkach beztlenowych. Na przezrystych płytkach agarowych chromID *C.difficile* rosną doskonale widoczne czarne kolonie *C.difficile*, o nieregularnych brzegach.

Wzrost większości innych bakterii obecnych w próbce kału jest zahamowany lub tworzą one kolonie bezbarwne, czasem rosną czarne kolonie mniejsze, okrągłe i błyszczące, nie będące koloniami *Clostridium*, np. enterokoki. Należy zwracać uwagę, aby płytki oglądać po pełnych 24 godzinach inkubacji, kilka godzin wcześniej czarne kolonie są wprawdzie widoczne, ale są mniejsze i mogą być mniej skonstrastowane w porównaniu z nieswoistym wzrostem flory towarzyszącej. Po przedłużeniu hodowli o kolejną dobę, wzrasta kontrast oraz wielkość i natężenie barwy kolonii.

ChromID *C.difficile* jest jedynym podłożem dostępnym na polskim rynku, na którym hodowlę *C.difficile* uzyskuje się po 24 godzinach inkubacji. Wysoką selektywność podłoża uzyskano dzięki zastosowaniu mieszaniny antybiotyków. Wyizolowane kolonie *C.difficile* mogą posłużyć do wykonania testu na obecność toksyny A/B; wynik dodatni z hodowli uzyskiwany jest częściej niż z próbki kału. Dodatni wynik hodowli potwierdzony wykryciem toksyny jest podstawą do zarejestrowania zakażenia szpitalnego o etiologii *C.difficile* i podjęcia stosownego działania terapeutycznego.

W Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej IPCZD wykonujemy około 1600 badań w kierunku *C.difficile* rocznie, z czego 6,6% to wyniki dodatnie (2013). Najwięcej badań zlecają oddziały: chirurgii, intensywnej terapii, gastroenterologii oraz onkologii. Na oddziałach tych przeważają pacjenci obciążeni czynnikami ryzyka zakażenia *C.difficile*: poddawani przewlekłej antybiotykoterapii, z upośledzeniem odporności, z chorobą podstawową w obrębie jelit. Badani w kierunku *C.difficile* są również pacjenci przyjmowani z domu lub z innego szpitala z biegunką o nieznannej etiologii (u małych dzieci po wykluczeniu zakażenia rotawirusowego). Diagnostykę prowadzimy wg najnowszego algorytmu wykrywania *C.difficile*, obejmującego wykrywanie GDH (enzym dehydrogenaza glutaminianowa, wytwarzany przez wszystkie szczepy *C.difficile*) oraz toksyn A/B. Wynik dodatni zarówno dla GDH, jak i toksyny świadczy o obecności szczepu toksynotwórczego. Hodowla w tym wypadku nie jest konieczna, o ile wyizolowanie szczepu nie jest potrzebne do celów epidemiologicznych (np. typowanie genetyczne w przypadkach zakażeń szpitalnych). W przypadku dodatniego wyniku dla GDH i ujemnego wyniku dla toksyny, o wykryciu *C.difficile* decyduje

posiew kału. W takiej próbce występuje *C.difficile*, lecz może to być szczep nietoksynotwórczy lub też stężenie toksyny może być poniżej granicy czułości testu. Odsetek próbek GDH(+) TOX(-) wynosi w badanej przez nas populacji 10%. Z uzyskanej hodowli *C.difficile* wykonujemy test na obecność toksyny. Odsetek wyników dodatnich z hodowli przy ujemnym wyniku dla toksyny w teście wykonanym bezpośrednio z kału wynosi także 10%. Odsetek ten będzie tym wyższy, im niższa będzie czułość stosowanego przez laboratorium testu wykrywającego toksyny bezpośrednio w kale. Niskie stężenie toksyny może utrzymywać się u pacjentów w okresie zdrowienia po zakażeniu *C.difficile*, może występować w początkowym okresie choroby lub w przypadku kału biegunkowego. Wyizolowanie toksynotwórczego szczepu wiąże się z decyzjami terapeutycznymi i logistycznymi np. przedłużeniem izolacji pacjenta. Przewlekłe utrzymywanie się *C.difficile* w jelicie może występować u pacjentów z obniżoną odpornością, z zaburzeniami perystaltyki i innymi chorobami jelit oraz u starszych pacjentów powyżej 65 roku życia.

Podsumowując, posiew w kierunku *C.difficile* wykonujemy w następujących sytuacjach klinicznych:

1. Uzyskanie ujemnego wyniku testu na obecność toksyny przy jednoczesnym wykryciu GDH (lub w przypadku braku oznaczenia GDH);
2. Dla potwierdzenia eradykacji *C.difficile* w celu złagodzenia reżimu sanitarnego stosowanego wobec pacjenta oraz u pacjentów przewlekłe zakażonych;
3. W celu wyizolowania szczepu *C.difficile* do badań epidemiologicznych.

Wg towarzystw amerykańskich: Society for Healthcare Epidemiology of America oraz Infectious Diseases Society of America posiew kału jest najczulszym badaniem użytecznym w celach epidemiologicznych; ze względu na dużą czułość i swoistość posiew kału uzupełniony wykrywaniem wytwarzania toksyn przez wyhodowany szczep jest złotym standardem, wobec którego porównywane są inne testy diagnostyczne.

Zalety Zalety podłoża chromID™
C.difficile, na które zwróciliśmy
uwagę w naszym laboratorium, to:
krótki czas hodowli (24 godziny)
wysoka selektywność i swoistość



Technologia MALDI-TOF MS

- nowa technika identyfikacji drobnoustrojów w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych

dr n. med. Elżbieta Stefaniuk,

¹Narodowy Instytut Leków, Warszawa

²Centralny Ośrodek Badań Jakości

w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa

Celem medycznej diagnostyki mikrobiologicznej jest m.in. stwierdzenie w badanym materiale pobranym od człowieka, czy też w próbce materiału pochodzącego ze środowiska, występowania drobnoustrojów, ich identyfikacja, ocena cech zjadliwości, ocena ich wrażliwości na leki przeciwdrobnoustrojowe. Uzyskanie wiarygodnego wyniku badania mikrobiologicznego, przydatnego w procesie diagnostyczno-terapeutycznym, ale także w postępowaniu epidemiologicznym zależy od wielu wzajemnie się uzupełniających elementów:

- przestrzegania obowiązujących i aktualnych zaleceń w kwestii przygotowania pacjenta do pobrania materiału klinicznego do badania mikrobiologicznego,
- zachowania należytej staranności podczas pozyskiwania próbki materiału do badania, z uwzględnieniem sposobu pobierania, ilości materiału, właściwego zabezpieczenia materiału,
- właściwej organizacji sposobu dostarczenia materiału do laboratorium mikrobiologicznego, ze szczególnym naciskiem na czas i warunki transportu,
- przestrzegania procedur diagnostycznych, opracowanych w laboratorium na podstawie aktualnych rekomendacji, piśmiennictwa i doświadczenia personelu, z wykorzystaniem dostępnych metod i technik,
- właściwej interpretacji uzyskanych w laboratorium wyników,
- zapewnienia właściwego zrozumienia przez lekarza wydanego wyniku laboratoryjnego.

Nadzór nad poszczególnymi etapami postępowania diagnostycznego, właściwymi dla osiągnięcia celu, jakim jest rzetelny, zrozumiały dla lekarza i przydatny wynik badania mikrobiologicznego, powinien sprawować specjalista w dz. mikrobiologii, mikrobiologii medycznej lub mikrobiologii lekarskiej, posiadający wiedzę zarówno w kwestii klasycznych, od lat stosowanych technik badawczych, jak również nowych technologii wprowadzanych do diagnostyki mikrobiologicznej.

Do takich nowych technik badawczych niewątpliwie należy zaliczyć spektrometrię masową (MS). Spektrometria masowa po raz pierwszy została zastosowana na świecie na przełomie XVIII i XIX wieku przez angielskiego fizyka, odkrywcę elektronu - Josepha Johna Thomsona, konstruktora pierwszego spektrometru mas. Nowoczesny spektrometr mas zbudował w latach 1919-1920 brytyjski

chemik i fizyk - Francis William Aston, a za pomiar masy atomu z wykorzystaniem spektrometrii masowej otrzymał w 1922 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Kolejne lata to dalszy rozwój możliwości badawczych z wykorzystaniem technologii MS, m.in. rok 1966 to sekwencjonowanie peptydów przy pomocy spektrometru mas, kolejna Nagroda Nobla (2002) za łagodne techniki jonizacji i możliwość zastosowania technologii MS do badań nad biopolimerami. Obecnie spektrometria masowa znajduje zastosowanie do identyfikacji związków chemicznych, ustalania składu pierwiastkowego i izotopowego, ustalanie struktury związków chemicznych, określania ilości substancji i ustalania składu mieszanin poprzez identyfikację białek.

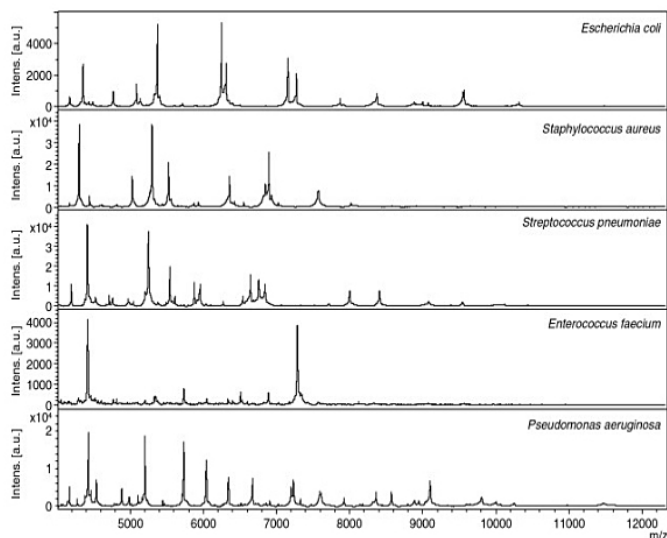
Technika spektrometrii masowej jest też obiecującą metodą szybkiej identyfikacji drobnoustrojów (bakterii, grzybów drożdżopodobnych, grzybów strzępkowych, wirusów), jak i, zgodnie z aktualnym piśmiennictwem, analizy pokrewieństwa w obrębie izolatów tego samego gatunku. Obecnie w Polsce stosowane są systemy dwa systemy: MALDI BioTyper firmy Bruker i VITEK MS firmy bioMérieux.

Identyfikacja z wykorzystaniem systemu VITEK MS stanowi szybką metodę identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio z hodowli. System przeznaczony jest do pracy w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych, do identyfikacji czynników chorobotwórczych wywołujących zakażenia człowieka.

VITEK MS to system stanowiący połączenie technologii spektrometrii masowej z techniką jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy połączonej z pomiarem czasu przelotu jonów - MALDI-TOF (ang. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). W technice tej próbka mierzona umieszczana jest wraz z substancją wspomagającą jonizację - matrycą - na płytce, a następnie podlega suszeniu. Promień lasera przeprowadza obojętne cząsteczki próbki w naładowane jony, które z kolei ulegają przyspieszeniu w polu elektrycznym. Pomiar czasu ich przelotu pozwala na precyzyjne określenie ich masy cząsteczkowej i ustalenie stosunku masy (m) do ładunku (z) jonów. Wynik przedstawiany jest w postaci widma masowego, w którym na osi OX odkładany jest stosunek m/z , a na osi OY intensywność - sygnał proporcjonalny do liczby jonów. W przypadku analizy całych komórek bakteryjnych analizowany jest cały profil masowy składający się z wszystkich cząsteczek komórki ulegających w danych warunkach jonizacji.

Uzyskane widma podlegają analizie porównawczej z widniami w bazie danych widmami gatunków bakteryjnych, w tym szczepów drobnoustrojów wzorcowych. Identyfikacja drobnoustroju podawana jest w oparciu o stopień, poziom zgodności z widmami porównawczymi. Widma są bardzo zróżnicowane, a ich różnorodność uwarunkowana jest profilami białkowymi poszczególnych rodzajów/gatunków drobnoustrojów (patrz poniżej).

» Rycina 1. Widma masowe dla wybranych gatunków drobnoustrojów.



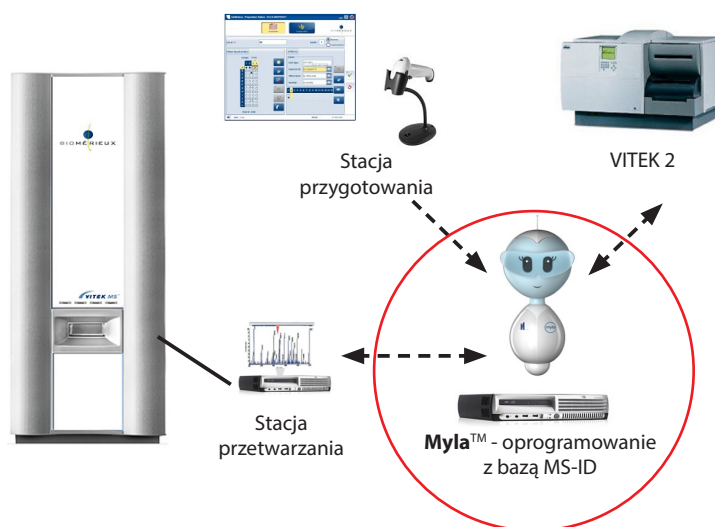
Analiza w systemie VITEK MS dokonywana jest na podstawie ok. 30.000 widm drobnoustrojów zdeponowanych w bazie danych systemu. Baza danych systemu VITEK MS początkowo zawierała 586 klinicznie istotnych gatunków drobnoustrojów, każda nowa wersja oprogramowania wzbogacana jest o nowe istotne klinicznie gatunki bakterii tlenowych i beztlenowych, mykobakterii, grzybów drożdżoidalnych oraz grzybów pleśniowych i obecnie liczy około 700 gatunków.

Podstawą identyfikacji drobnoustrojów metodą spektrometrii masowej jest więc analiza niepowtarzalnego, czyli unikatowego dla każdego gatunku drobnoustroju zestawu białek (tzw. profilu białkowego), określanego jako molekularny „odcisk palca”. Metoda ta zakłada, że każdy gatunek drobnoustroju posiadający odmienny zestaw genów kodujących białka, posiada także charakterystyczny, niepowtarzalny skład białek wewnątrzkomórkowych. W szczególności dotyczy to składu białek rybosomalnych, które w komórkach drobnoustroju występują w największej ilości i podobnej liczbie kopii. Analiza profilu białkowego drobnoustroju badanego i jego porównanie do wzorcowego zestawu białek drobnoustrojów referencyjnych umożliwia określenie gatunku badanego mikroorganizmu.

Opis urządzenia

Składowe systemu VITEK MS stanowią: stacja przygotowawcza, stacja przetwarzania, aparat VITEK MS i oprogramowanie MYLA™ (Rycina 2). System VITEK MS przystosowany jest do pracy w sieci komputerowej, może być sprzężony z automatycznymi systemami do oznaczania lekowrażliwości np. VITEK 2, VITEK 2 Compact. System VITEK MS posiada certyfikat CE oraz IVD obejmujące system, odczynniki i bazę danych, zapewniając walidację metody na każdym etapie pracy.

Rycina 2. Organizacja pracy systemu VITEK MS.



Technologia ta umożliwia przeprowadzenie wiarygodnej identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów w ciągu kilku minut dla pojedynczej próbki i w czasie odpowiednio dłuższym dla większej liczby drobnoustrojów poddawanych jednoczesnej identyfikacji, tj. ok. 40 minut dla płytki z 48 próbkami, czy też ok. 1,5 godziny dla płytki z 96 próbkami, w zależności od zastosowanego systemu. Pojawiły się także pierwsze doniesienia o możliwości identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio w próbkach moczu pobranego od pacjenta lub w próbkach hodowli krwi.

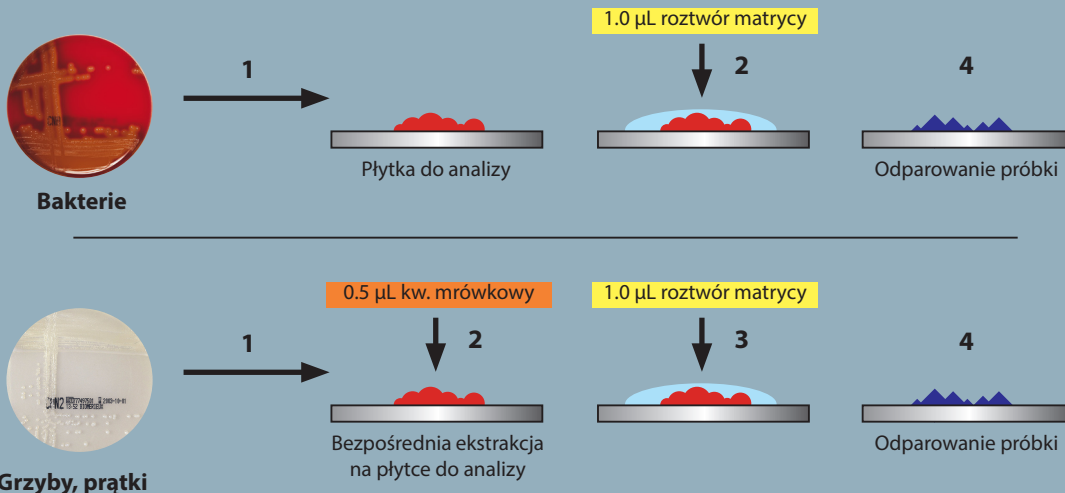
Akcesoria i odczynniki niezbędne do przeprowadzenia badania:

- odczynniki gotowe do użycia, dostarczane przez producenta systemu – matryca + kwas mrówkowy,
- jednorazowe płytki do analizy z kodami kreskowymi - 1 płytka do analizy składa się z trzech pól, po 16 miejsc pomiarowych każde, łącznie dla 48 próbek. Pośrodku każdego 16-„dołkowego” pola znajduje się miejsce do nałożenia szczepu wzorcowego Escherichia coli ATCC 8739,
- szczep wzorcowy do kalibracji: E. coli ATCC 8739 (1 kontrola/16 próbek),
- ezy jednorazowe 10µl,
- pipeta automatyczna 0,5-2 µl,
- jałowe końcówki do pipet automatycznych.

Przygotowanie próbek

Procedura wykonania badania jest prosta i nieskomplikowana (Rycina 3); wymaga jednak staranności i doświadczenia w przygotowaniu próbek poddawanych analizie w systemie VITEK MS. Etap wstępny badania - sposób przygotowania próbki do analizy nieznacznie różni się dla bakterii tlenowych i beztlenowych i dla mykobakterii i grzybów. Różnica wynika z budowy komórki poszczególnych grup drobnoustrojów i polega na etapie ekstrakcji białek z komórek mykobakterii i grzybów za pomocą kwasu mrówkowego, przed nałożeniem na kolonię drobnoustroju matrycy (tzw. metoda półekstrakcji).

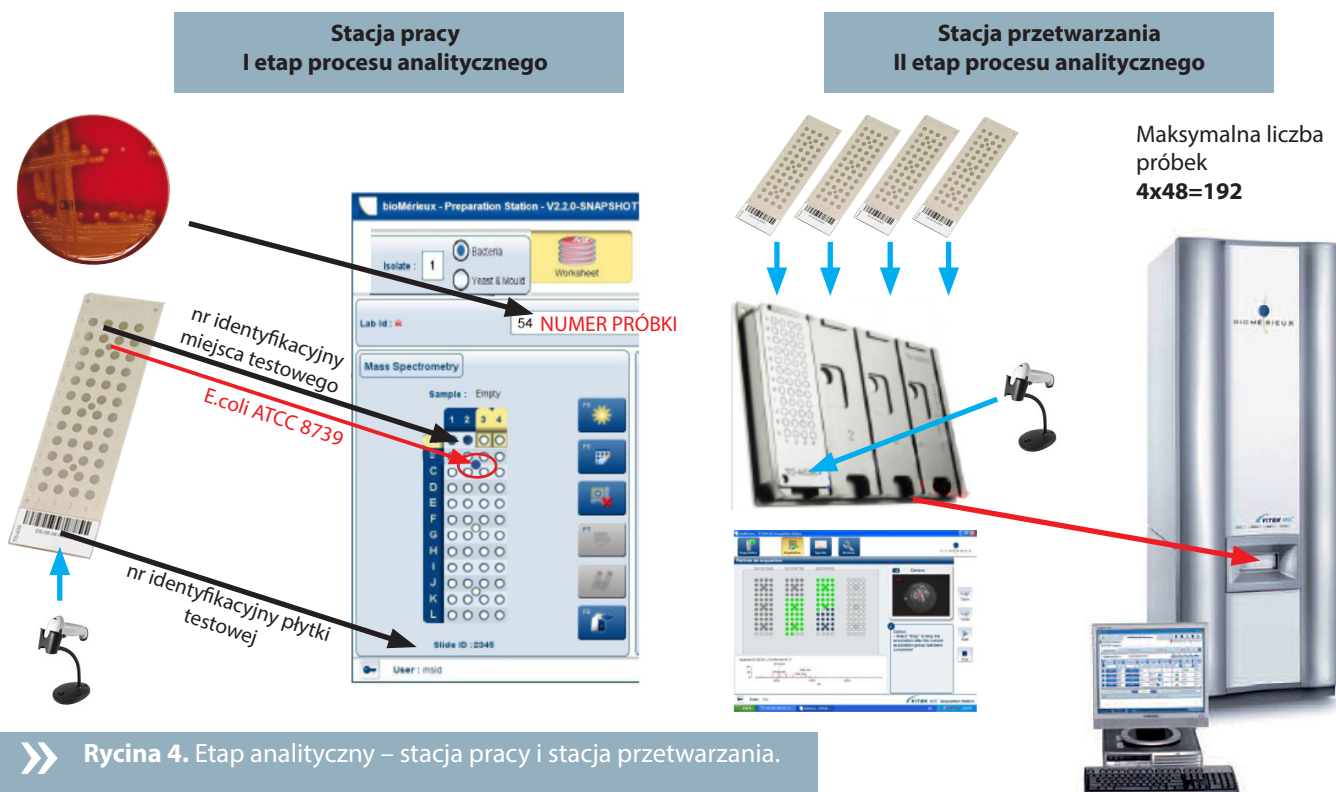
Zaletą systemu jest dostępność gotowych odczynników, z certyfikatem IVD, wymagających przechowywania w określonej temperaturze i przestrzegania daty ważności. Czynność ta nie jest wykonywana w przypadku innych bakterii tlenowych i beztlenowych. Dodatkowy etap wydłuża czas przygotowania jednej próbki maksymalnie o 30 sekund, czyli do 1 minuty. W przypadku grzybów pleśniowych konieczne jest zastosowanie tzw. pełnej metody ekstrakcji białek, a więc wykonania szeregu czynności polegających na rozcieńczaniu, płukaniu i wirowaniu, zapewnienia wirówki i dodatkowo 70% etanolu, acetonitrylu, 70% kwasu mrówkowego.



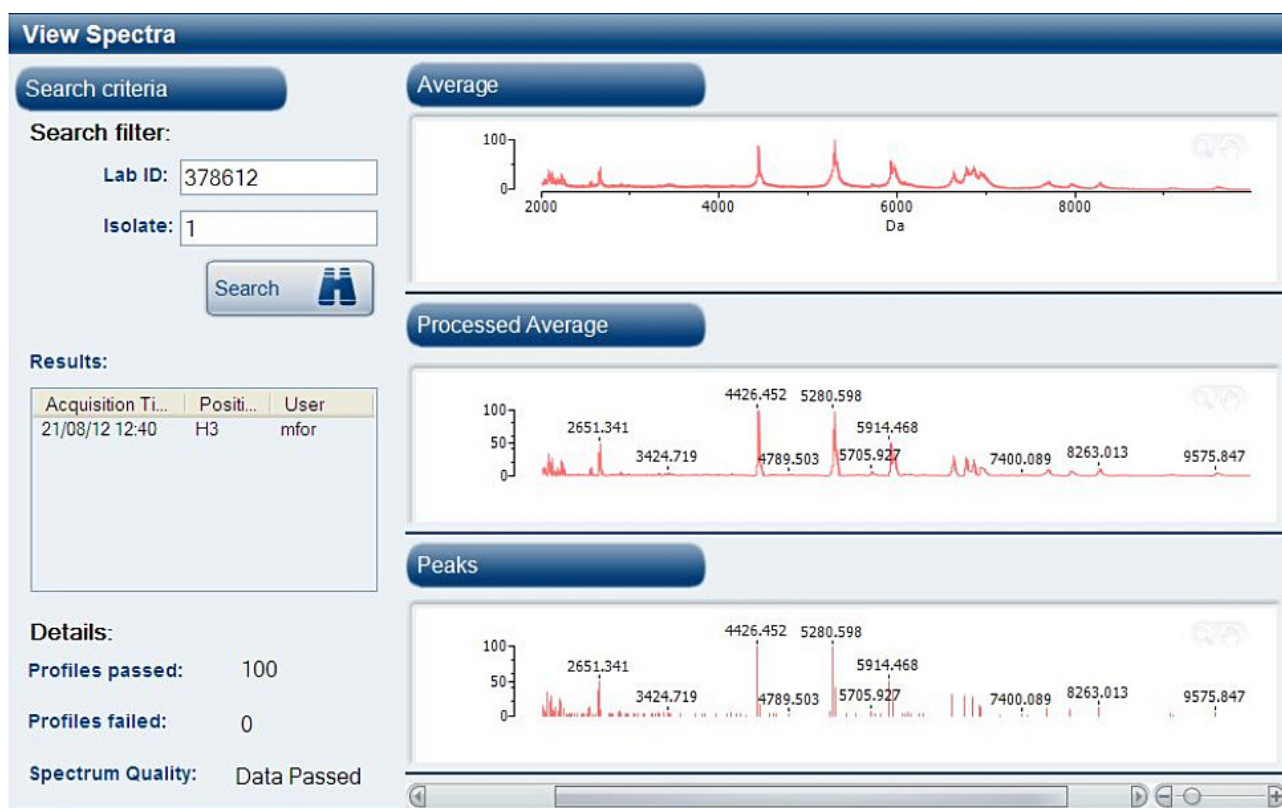
Etap analityczny

Płytki z naniesionymi próbkami, po zeskanowaniu kodów kreskowych umieszczają się w komorze aparatu (Rycina 4). W systemie jednocześnie można umieścić 4 płytki, co pozwala dokonać jednoczesnej identyfikacji 196 izolatów.

Obsługa systemu jest nieskomplikowana. Użytkownik poprzez obserwację ekranu komputera ma możliwość śledzić na bieżąco postęp analizy, jaka dokonuje się w środowisku próżni aparatu (Rycina 5).



Rycina 4. Etap analityczny – stacja pracy i stacja przetwarzania.



» Rycina 5. Analiza widm.

Za pośrednictwem oprogramowania MYLA™ wyniki identyfikacji przesyłane są automatycznie do systemu VITEK 2 i łączone z wynikami lekowrażliwości. Oprogramowanie MYLA™ to przejrzysty interfejs w postaci tabel i ikon, umożliwia prezentację wyników w czasie rzeczywistym, pozwala personelowi laboratorium na zdalny dostęp do wyników analiz z każdego miejsca poza laboratorium.

» Zakres oceny

W Pracowni Mikrobiologii Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej przeprowadzono we współpracy z Zakładem Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków identyfikację wybranych grup drobnoustrojów odpowiedzialnych za zakażenia człowieka przy użyciu rutynowo stosowanych metod (metody konwencjonalne, komercyjne testy identyfikacyjne /testy API, ID32, VITEK 2 Compact/, hodowla na podłożach chromogennych, metody biologii molekularnej) i uzyskane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi w systemie VITEK MS. Ocenie podlegała zgodność identyfikacji izolatów bakteryjnych i grzybiczych na poziomie rodzaju i na poziomie gatunku, czas uzyskania wyniku, a także ocena systemu pod względem jakości pracy i mogących wystąpić utrudnień.

Do badań wykorzystano 849 dobrze scharakteryzowanych izolatów klinicznych – szczepy bakterii tlenowych i beztlenowych oraz szczepy grzybów drożdżopodobnych – z kolekcji Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej i Narodowego Instytutu Leków: grzyby drożdżoidalne, ziarenkowce Gram-dodatnie: gronkowce, paciorkowce, enterokoki; pałeczki hemofilie; pałeczki Gram-ujemne z rodziny Enterobacteriaceae i pałeczki niefermentujące; bakterie beztlenowe; *Corynebacterium* spp. W ramach wewnętrznej kontroli jakości użyto szczepy wzorcowe pochodzące z międzynarodowej kolekcji ATCC – American Type Culture Collection, odpowiednie dla badanych gatunków drobnoustrojów.

Wyniki

Powtarzalność i odtwarzalność identyfikacji izolatów z grupy gronkowców koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych w systemie VITEK MS wyniosła 100%. Także zgodność identyfikacji enterokoków i pneumokoków metodami stosowanymi w laboratorium: metody konwencjonalne, metody automatyczne, metody biologii

molekularnej w porównaniu z wynikami VITEK MS wyniosła 100%. W przypadku paciorkowców zielniejących uzyskano 93% zgodności do poziomu rodzaju wyników identyfikacji VITEK MS i metodą referencyjną; dla Streptococcus grupy Mitis identyfikacja w systemie VITEK MS wykazała >80% poziom zgodności gatunkowej z wynikami metody molekularnej (publikacja w toku).

Dla pałeczek Gram-ujemnych z rodziny Enterobacteriaceae należących do gatunków Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Citrobacter freundii oraz wybranych gatunków Yersinia uzyskano 100% zgodności identyfikacji Vitek 2 Compact z identyfikacją VITEK MS. Zadowalająca była także identyfikacja pałeczek niefermentujących.

W przypadku izolatów Salmonella Enteritidis i Salmonella Typhimurium identyfikacja w systemie VITEK MS nie powiodła się, w celu dokładnej identyfikacji należało przeprowadzić typowanie serologiczne. Pałeczki Shigella VITEK MS zidentyfikował jako E. coli. Ze względu na podobieństwo bakterii z rodzajów Shigella i Escherichia istnieje wiele technik pozwalających na ich różnicowanie. W praktyce rodzaj Shigella różnicuje się stwierdzając niezdolność komórek do ruchu i dekarboksylacji lizyny oraz niezdolność wielu szczepów do fermentacji laktozy. Do różnicowania tych dwóch rodzajów pałeczek lub do ich selektywnej hodowli, wykorzystywane są również podłoża selektywne zawierające związki selenu. Podłoża selenowe

są bardziej toksyczne dla pałeczek Escherichia niż Salmonella lub Shigella i mogą służyć do wybiórczego namnożenia dwóch ostatnich z wymienionych rodzajów bakterii obecnych w badanej próbce.

Dla wybranych gatunków bakterii beztlenowych identyfikację do poziomu rodzaju uzyskano dla 92-100%

badanych szczepów, zgodność identyfikacji gatunkowej uzyskanej dotychczas stosowanymi w laboratorium metodami z wynikami MS uzyskano w zależności od grupy drobnoustrojów w zakresie od 46-100%. Z powodu niedoskonałości identyfikacji biochemicznej szczepów z rodzaju Corynebacterium nie oceniano zgodności wyników oceny biochemicznej z wynikami identyfikacji VITEK MS. Analizie poddano natomiast powtarzalność i odtwarzalność, obydwa parametry były równe 100%.

VITEK MS doskonale zidentyfikował także poddane badaniu izolaty grzybów drożdżopodobnych (praca w przygotowaniu).

PODSUMOWANIE

- Technologia spektrometrii mas z użyciem desorpcji/ jonizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu - MALDI-TOF umożliwia szybką i wiarygodną identyfikację większości izolatów bakteryjnych i grzybiczych odpowiedzialnych za zakażenia, szczególnie w przypadku drobnoustrojów, których identyfikacja jest niemożliwa rutynowo stosowanymi metodami.
- System VITEK MS posiada poparta certyfikat CE oraz IVD obejmujące system, odczytniki i bazę danych, zapewniając walidację metody na każdym etapie pracy.
- Analiza przeprowadzana tą techniką (VITEK MS) jest szybka i pomijając koszt aparatury jest tania, a liczba gatunków i szczepów w dostępnych bazach danych systematycznie rośnie.
- Procedura wykonania badania w systemie VITEK MS jest nieskomplikowana, a dodatkowe wyposażenie ograniczone do minimum.
- Ważnym etapem badania jest etap wstępny – przygotowanie próbki, który wymaga doświadczenia i dokładności w nakładaniu drobnoustroju na płytkę. Jednakowe postępowanie z próbkami zapewni wyłącznie dedykowany personel do obsługi systemu VITEK MS.
- Program MYLA™ i możliwość dostępu przez internet stanowią pomoc i wygodę dla użytkowników systemu VITEK MS.
- Wskazany dedykowany personel do obsługi systemu VITEK MS - ze względu na bardzo szeroką bazę możliwych do identyfikacji gatunków drobnoustrojów, wynik identyfikacji uzyskany w systemie VITEK MS zawsze powinien być oceniany przez doświadczony, kompetentny, posiadający odpowiednie kwalifikacje personel.



Co nowego w programie FORUM VITEK2 ?

mgr Ewa Młodzińska
*Centralny Ośrodek Badań Jakości
 w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa*

Program Forum Vitek 2 (FV2) skupia grupę zaawansowanych użytkowników systemów VITEK 2 i VITEK 2 Compact wskazanych przez firmę bioMérieux Polska i stanowi platformę wymiany doświadczeń i rozważań na temat możliwości diagnostycznych i interpretacyjnych tych systemów. Rolą ośrodków uczestniczących w FV2 jest wypracowanie odpowiednich procedur diagnostycznych, uwzględniających możliwości diagnostyczne stosowanych systemów VITEK 2, które pozwolą rozwiązywać trudne lub nietypowe sytuacje z zakresu identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości pojawiające się w codziennej pracy laboratorium. Program został zainicjowany w roku 2008 przez firmę bioMérieux Polska we współpracy z Centralnym Ośrodkiem Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (COBJwDM), nie ma charakteru kontroli zewnątrzlaboratoryjnej, jest programem niezwiązanym z Programem POLMICRO. Program rozpoczął się w roku 2008 – była to pierwsza edycja pilotażowa, w 2009 zorganizowano dwie tury programu, natomiast od roku 2010 są przeprowadzane trzy tury rocznie.

Centralny Ośrodek w porozumieniu z firmą bioMérieux dokonuje trzy razy w roku (w marcu, czerwcu oraz na przełomie października i listopada) wyboru izolatów bakteryjnych, które w ocenie zespołu FV2 lub Ośrodka mogą stwarzać trudności diagnostyczne. Istotą Programu FV2 jest dobór szczepów trudnych diagnostycznie. Dystrybucja przygotowanych zestawów leży w gestii firmy bioMérieux.

Uczestnicy FV2 z wykorzystaniem systemów VITEK 2 i VITEK 2 Compact i w razie konieczności innych metod rutynowo stosowanych w danym laboratorium, przeprowadzają identyfikację przesłanych izolatów, oznaczają ich wrażliwość na leki i wykrywają mechanizmy oporności.

Na potrzeby Programu FV2 utworzono stronę internetową <http://forumvitek2.pl> zawierającą modyfikowaną na bieżąco ankietę elektroniczną do wprowadzania wyników oznaczeń. Każdy uczestnik posiada swój login oraz hasło, które umożliwiają dostęp do systemu. Analizę wyników prowadzi zespół COBJwDM, zaś zbiorcze opracowania przygotowane przez Ośrodek przekazywane są do Laboratoriów przez koordynatora Programu FV2 z ramienia firmy bioMérieux.

Pod koniec każdego roku kalendarzowego firma bioMérieux organizuje spotkania zespołu FV2 (laboratoria zaproszone do udziału w programie, przedstawiciele

Centralnego Ośrodka i firmy bioMérieux), na którym jest omawiana i podsumowywana działalność programu FV2. W ramach tych cyklicznych spotkań podejmowane są przez bioMérieux kolejne aktywności związane z usprawnieniem i ujednoczeniem metodyki oznaczania lekowrażliwości w systemach VITEK 2.

Po przeanalizowaniu danych zebranych w programie FORUM VITEK 2 i zestawieniu kart antybiogramowych stosowanych przez laboratoria uczestniczące w projekcie, stwierdzono bardzo dużą różnorodność w doborze kart do oceny lekowrażliwości, zwłaszcza bakterii Gram-ujemnych. Prawdopodobnie tak duża różnorodność kart używanych w Programie wynika z zakresu świadczonej rutynowo diagnostyki mikrobiologicznej, wykonywania badań dla różnych zleciodawców (profil pacjentów, typy oddziałów szpitalnych itd.), co powoduje, że laboratoria dobierają karty z odpowiednim zestawem antybiotyków. Stosowanie więc różnych testów do diagnostyki tych samych obiektów badań (jak to ma przykład w programie FV2) stanowiło dla bioMérieux sygnał do podjęcia kroków zmierzających do ujednoczenia kart antybiogramowych i dostosowania ich do zaleceń europejskich - EUCAST i rekomendacji Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. W związku z tym firma bioMérieux zaproponowała opracowanie nowych kart antybiogramowych specjalnie na rynek polski, uwzględniając najnowsze rekomendacje obowiązujące w Polsce.

Po raz pierwszy, na spotkaniu w grudniu 2011 roku, zespół FV2 we współpracy z Krajowym Ośrodkiem Referencyjnym ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów i Centralnym Ośrodkiem Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej ustalił zestawy leków przeciwdrobnoustrojowych i zakres stężeń do nowych kart antybiogramowych przeznaczonych do oznaczania lekowrażliwości pałeczek Gram-ujemnych w systemach VITEK 2 i VITEK 2 Compact, w tym izolatów wyhodowanych z moczu. Karty te dostępne są w ofercie firmy od połowy 2012. Kolejne spotkanie zespołu FV2 w grudniu 2013 roku zaowocowało przygotowaniem zestawu nowych kart antybiogramowych, tym razem dla bakterii Gram-dodatnich.

Wprowadzanie nowych kart o konfiguracji leków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej zgodnych z europejskimi i krajowymi rekomendacjami stanowi wymierną korzyść dla laboratoriów, pozwala zoptymalizować i ujednoczyć metodykę oznaczania lekowrażliwości czynników etiologicznych zakażeń w grupie laboratoriów pracujących w systemach VITEK 2, ułatwia porównywanie uzyskiwanych wyników, bez względu na zakres

prowadzonej diagnostyki mikrobiologicznej – w laboratoriach szpitalnych i pozaszpitalnych, a więc wykonujących badania szerokiego spektrum materiałów diagnostycznych.

FORUM VITEK 2- 2013 – edycja VI

W roku 2013 przeprowadzono kolejną już VI edycję FORUM VITEK 2; wzięło w niej udział dziewięć laboratoriów, działających w strukturach przedstawionych poniżej jednostek:

1. Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku,
2. Pracownia Mikrobiologii Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Specjalistycznego im. L. Rydygiera w Krakowie,
3. Zakład Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie,
4. Zakład Mikrobiologii Wojewódzkiego Centrum Medycznego w Opolu,
5. Laboratorium Mikrobiologii Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego w Poznaniu,
6. Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu,
7. Zakład Mikrobiologii Szpitala Wojewódzkiego w Rzeszowie,
8. Katedra Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa
9. bioMérieux Polska, Warszawa.

Zgodnie z założeniami w 2013 przeprowadzono trzy tury Programu FV2 – przedmiot analizy stanowił każdorazowo zestaw trzech trzech szczepów pochodzących z kolekcji COBJwDM. Przedmiotem badań pierwszej tury były pałeczki Gram-ujemne, druga i trzecia tura były poświęcone ziarenkowcom Gram-dodatnim. W tabeli 1 przedstawiono wszystkie szczepy wykorzystane w roku 2013 w programie FV2.

I tura FV2-2013

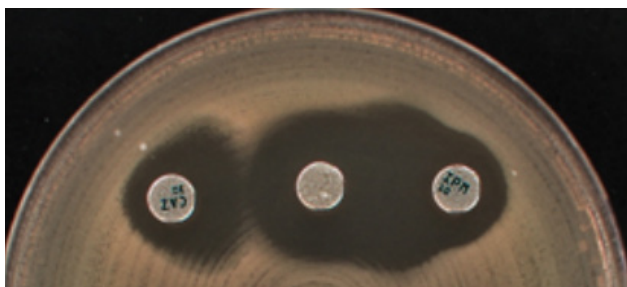
Zestaw przesłany w pierwszej turze zawierał trzy szczepy: *Acinetobacter lwoffii* i *Enterobacter cloacae* wytwarzające metalo- β -laktamazę – (MBL-dodatni) oraz szczep *Klebsiella pneumoniae* produkujący β -laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym ESBL (ESBL-dodatni). Wszystkie szczepy zostały jednakowo zidentyfikowane przez wszystkich uczestników. Do oznaczania lekowrażliwości szczepu *A. lwoffii* pięć laboratoriów zastosowało nową kartę AST-N260. Oznaczenie lekowrażliwości szczepów *E. cloacae* i *K. pneumoniae* zostało przeprowadzone za pomocą karty AST-N259 - siedem laboratoriów, AST-N258 i AST- N195 – po jednym laboratorium. Jednakową kartę AST-N259 do badania wszystkich trzech izolatów użyły trzy laboratoria, a jedno laboratorium kartę AST-N258. Trzy z wymienionych rodzajów kart zostały opracowane specjalnie na rynek polski do stosowania w systemach VITEK2 i VITEK 2 Compact. Dla przypomnienia przedstawiamy przeznaczenie poszczególnych kart:

- AST-N258 – do oznaczania lekowrażliwości pałeczek fermentujących wyhodowanych z moczu;
- AST-N259 – do oznaczania lekowrażliwości pałeczek fermentujących wyhodowanych z materiałów innych niż moczu;
- AST-N260 – do oznaczania lekowrażliwości pałeczek niefermentujących wyhodowanych ze wszystkich materiałów.

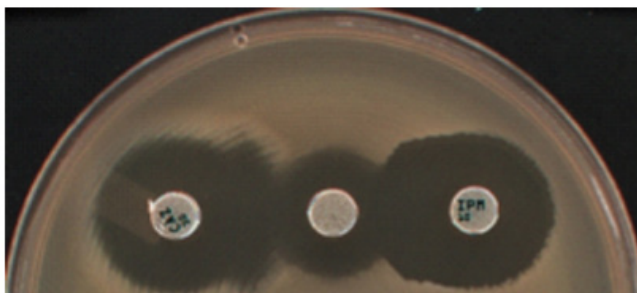
Pojawianie się i rozprzestrzenianie opornych na karbapenemy pałeczek Gram-ujemnych jest w ostatnich latach zjawiskiem coraz powszechniejszym. Oporność uwarunkowana może być wieloma czynnikami, ale najczęstszą przyczyną jest produkcja β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy, czyli metalo- β -laktamaz klasy B – MBL; β -laktamaz klasy A – np. KPC oraz β -laktamaz klasy D (CHDL) – np. OXA-48. Zgodnie z rekomendacjami KORLD medyczne laboratoria mikrobiologiczne są zobowiązane do wykrywania tych mechanizmów. Izolaty nr 1 i 2 rozesłane w ramach FV2 wykazywały obniżoną wrażliwość na karbapenemy i były producentami MBL.

» Tabela 1. Izolaty bakteryjne rozesłane w VI edycji Forum Vitek 2 - 2013

EDYCJA / ROK	GATUNEK / LICZBA	MECHANIZMY OPORNOŚCI	RODZAJE KART VITEK 2 / LICZBA
Tura I/2013	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (n=1)	MBL dodatni	AST-N260 (n=5)
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=1)	MBL dodatni	AST-N259 (n=7)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=1)	MBL dodatni	AST-N258 (n=1) AST-N195 (n=1)
Tura II/2013	<i>Enterococcus faecium</i> (n=1)	VRE	AST-P592 (n=5)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=1)	VRE	AST-P586 (n=3)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=1)	HLAR	
Tura III/2013	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=1)	MRCNS MLS _B indukcyjny	AST-P580 (n=5) AST-P592 (n=4)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)	MRSA	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n=1)		



Zdj. 1. A.lwoffii - MBL-dodatni



Zdj. 2. E. cloacae.– MBL-dodatni

Siedem laboratoriów dodatkowo wykonało testy na obecność MBL w szczepach A. lwoffii oraz E. cloacae. Cztery laboratoria (44%) podały wyniki oznaczeń zgodne z oczekiwanymi dla A. lwoffii, a dwa (22%) dla E. cloacae. Zdjęcia numer 1 i 2 przedstawiają testy fenotypowe pozwalające określić mechanizm MBL. Trudno odnieść się do uzyskanych wyników, gdyż laboratoria (poza jednym) nie wskazały zastosowanej metody.

Szczep nr 3 – *K.pneumoniae* był producentem β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym ESBL. ESBL wykryło pięć laboratoriów, trzy zamieściły jedynie informację o braku mechanizmów MBL i KPC z pominięciem ESBL. Jedno laboratorium nie podało żadnych informacji na temat mechanizmów.

II tura FV2-2013

Przygotowany w ramach drugiej tury zestaw zawierał trzy szczepy należące do rodzaju Enterococcus – jeden należący do gatunku E. faecium, dwa pozostałe to były szczepy E. faecalis różniące się mechanizmami oporności. Nie odnotowano żadnych rozbieżności w wynikach identyfikacji badanych szczepów. Lekowrażliwość została określona za pomocą dwóch rodzajów kart, z czego pięć laboratoriów do badania wszystkich trzech izolatów użyło karty AST-P592, pozostałe trzy laboratoria zastosowały kartę AST-P586. Karty te zawierają zestawy antybiotyków zgodne z zaleceniami EUCAST, na karcie AST-P586 znajdują się dodatkowo chinupristyna/dalfopristyna, dla której wartości graniczne odnoszą się wyłącznie do szczepów E. faecium oraz nitrofurantoina, dla której wartości graniczne odnoszą się wyłącznie do niepowikłanych zakażeń układu moczowego o etiologii E. faecalis.

Wszystkie enterokoki uważane są za naturalnie odporne na: niskie stężenia aminoglikozydów, cefalosporyny, klindamycynę. Szczególnie u E. faecium obserwuje się zwiększenie oporności na ampicylinę, związaną ze zmianami w białkach PBP5; zmiany te powodują obniżenie powinowactwa do β -laktamów, włączając w nie wszystkie penicyliny i karbapenemy.

Szczepy numer 1 - E. faecium i 2 - E. faecalis charakteryzowały się obecnością fenotypu VanA, oznaczającego oporność wysokiego stopnia zarówno na wankomycynę (MIC>256mg/L), jak i teikoplaninę (MIC \geq 32 mg/L). E. faecalis nr 3 to szczep z mechanizmem HLAR o wysokim stopniu oporności na aminoglikozydy, co oznacza brak synergizmu z penicylinami i glikopeptydami.

Zastosowane karty antybiogramowe umożliwiły określenie obydwu fenotypów oporności: VRE (oporność na glikopeptydy) i HLAR (oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy), które mają istotne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne, a enterokoki, które posiadają te mechanizmy, mogą być źródłem ciężkich zakażeń szpitalnych.

III tura FV2-2013

W składzie zestawu trzeciej tury FV2 znalazły się z kolei szczepy z rodzaju Staphylococcus: Staphylococcus haemolyticus (nr 1), Staphylococcus aureus (nr 2) i Staphylococcus lugdunensis (nr 3). Szczepy numer 1 – S.haemolyticus i 2 – S.aureus były odporne na metycylinę, dodatkowo szczep nr 1 charakteryzował się obecnością indukcyjnego mechanizmu MLSB.

Również i tym razem nie odnotowano trudności w identyfikacji drobnoustrojów. Oznaczenie wrażliwości na leki zostało przeprowadzone za pomocą dwóch rodzajów kart, z czego pięć laboratoriów do badania wszystkich trzech izolatów użyło karty AST-P580, pozostałe cztery laboratoria zastosowały kartę AST-P592. Karty te zawierają zestawy antybiotyków zgodne z zaleceniami EUCAST, umożliwiają określenie oporności na metycylinę i wykrycie indukcyjnego mechanizmu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy - MLSB, które mają istotne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne.

Wyniki oznaczeń mechanizmów oporności były prawidłowe, z jednym wyjątkiem. Jedno laboratorium dla szczepu nr 2 - S. aureus zamieściło w ankiecie wynik dodatni dla indukcyjnego mechanizmu MLSB, jednakże wartości MIC zamieszczone w ankiecie z wynikami sugerowały, że nastąpiła pomyłka użytkownika podczas wprowadzania danych na stronie programu. Wprowadzone wartości MIC odpowiadały wartościom MIC uzyskanym dla szczepu nr 1 S.haemolyticus, a nie, jako podano dla szczepu nr 2.

Laboratoria, podobnie jak w latach ubiegłych, przekazywały wyniki drogą elektroniczną (<http://forumvitek2.pl/panel>) i automatycznie uzyskiwały odpowiedź o ewentualnych rozbieżnościach uzyskanych wartości MIC (mg/L) z wartościami referencyjnymi. Oczekiwane wartości MIC (mg/L) podawane były wyłącznie w odniesieniu do leków zalecanych w Rekomendacjach ds. doboru testów wrażliwości bakterii na leki i chemioterapeutyki Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów oraz Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej.

Wszystkie laboratoria zaproszone do programu FORUM VITEK 2 potwierdziły po raz kolejny swoje kompetencje i gotowość do świadczenia mikrobiologicznych usług diagnostycznych na najwyższym poziomie; wykazały się możliwościami i umiejętnościami stosowania różnorodnych testów w celu uzyskania wyników wiarygodnych i wysokiej jakości.



VITEK 2™ — technology



Potwierdziły także konieczność i zasadność utrzymywania w laboratoriach różnych technik diagnostycznych, co jest szczególnie istotne w sytuacji pojawiania się tzw. trudnych izolatów, a więc charakteryzujących się szczególnymi czynnikami zjadliwości, w tym wielolekoopornością.

Program FORUM VITEK 2 z założenia ma być platformą wymiany wiedzy i doświadczeń w gronie specjalistów w dz. mikrobiologii. Organizatorzy Programu oczekują od uczestników zgłaszania i nadsyłania „problematycznych” szczepów, jednak z powodu braku takich zgłoszeń w roku 2013, zestawy szczepów przygotowane do VI edycji programu FV2 pochodziły wyłącznie z kolekcji

COBJWDM. Udział w Programie stanowi niewątpliwie dodatkowe obciążenie dla wybranych laboratoriów, tym cenniejsze jest ich zaangażowanie. Doświadczenie i kompetencje uczestników FORUM VITEK 2 służą podniesieniu kwalifikacji wszystkich użytkowników systemów VITEK 2 w Polsce oraz ujednoczeniu metod diagnostycznych w tych laboratoriach, o czym na bieżąco będzie informowała firma bioMérieux. Organizatorzy FV2 zachęcają również pozostałe laboratoria mikrobiologiczne w Polsce pracujące w systemach VITEK 2, a niebędące w sieci FV2, do zgłaszania problemów diagnostycznych, które mogłyby być przeanalizowane w ramach omawianego programu.

Diagnostyka molekularna zakażeń *Clostridium difficile* z uwzględnieniem rybotypu 027, test GenoType CDiff

mgr Joanna Świdarska – Kiec
bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Infekcje *Clostridium difficile*

Clostridium difficile to bakterie beztlenowe, Gram-dodatnie występujące w postaci laseczek i mogące tworzyć formy przetrwalnikowe, powodujące poantybiotykową przewlekłą biegunkę lub rzekomobłoniaste zapalenie jelit. Bakteria ta została odkryta w 1935 roku, jednak do lat siedemdziesiątych XX wieku nie potwierdzony został udział tego patogenu w schorzeniach u ludzi. Dopiero w latach dziewięćdziesiątych zanotowano zwiększenie liczby zakażeń spowodowanych narastaniem lekooporności. Bakterie te mogą występować bezobjawowo jako flora fizjologiczna w przewodzie pokarmowym u ok. 5% populacji. Uważa się, że rozwój bakterii następuje głównie w przypadkach hospitalizacji lub na skutek przyjmowania antybiotyków o szerokim spektrum działania powodujących zmiany w stanie bakteryjnym flory jelit lub cytostatyków utrudniających odnowę nabłonka. Ponad 9% szpitalnych rejestracji CDAD (*Clostridium difficile*-associated disease), czyli chorób powiązanych z *Clostridium difficile*, kończy się zgonem, w porównaniu do ok. 2% pozostałych zgłoszeń. Przetrwalniki *C. difficile* są w stanie zachować żywotność do 6 miesięcy na powierzchniach nieożywionych. Są odporne na detergenty i środki do dezynfekcji zawierające alkohol, w związku z czym transmisja tego drobnoustroju w obrębie instytucji ochrony zdrowia zachodzi poprzez ręce personelu lub przez zanieczyszczenie środowiska szpitalnego. Najbardziej narażeni są pacjenci starsi oraz z obniżoną odpornością organizmu. Chociaż zakażenia CDAD powiązane są głównie z placówkami opieki medycznej w ostatnim czasie znacznie częściej pojawiają się one u osób młodych i niehospitalizowanych.

Znaczenie kliniczne zakażeń

Najważniejszym czynnikiem ryzyka zakażeń *C. difficile* jest stosowanie antybiotyków, które hamują wzrost naturalnej mikroflory. Początek choroby może nastąpić 4-10 dni od rozpoczęcia antybiotykoterapii do kilku tygodni po jej zakończeniu. Pacjenci mogą też nie ujawniać objawów do czasu ekspozycji na działanie czynników sprzyjających rozwojowi *C. difficile*. Najczęściej zakażenie ujawnia się jako biegunka (zwykle wodnista), gorączka i ból brzucha. Jednak objawy mogą przebiegać od bezobjawowego nosicielstwa do piorunującego zapalenia otrzewnej, które jest wtórne do perforacji jelita. Wśród zakażeń *C. difficile* można wyróżnić zakażenia pierwotne i nawracające, występujące u chorych hospitalizowanych jako zakażenia zarówno szpitalne, jak i poza szpitalne.

Czynniki wirulencji

Głównymi czynnikami wirulencji powiązanych z CDAD są dwie toksyny – toksyna A i B, które wykazują odpowiednio aktywność enterotoksyny i cytotoksyny. Obydwie toksyny powodują wystąpienie objawów klinicznych, mogą wywołać zapalenie jelit i uszkodzenie powierzchni nabłonka. Obie toksyny niszczą aktywną, podstawowy składnik cytoszkieletu komórek nabłonka jelit, wywołując biegunkę oraz zapalenie jelit. Toksyny te są kodowane w regionie genomu zwanym locus patogenności (PaLoc). Region ten zawiera 5 genów (cdA, tcdB, tcdC, tcdR, Tode), które są odpowiedzialne za regulację i syntezę toksyn A i B. Dwa dodatkowe geny (cdtA i cdtB) niebędące częścią PaLoc, kodują toksynę bienarną. Toksynotwórcze warianty szczepów *C. difficile* wywołują zakażenie o cięższym przebiegu niż szczepy wytwarzające tylko toksynę A.

Rybotyp 027

W ciągu minionej dekady częstość występowania CDAD i nasilenie choroby wzrosły zauważalnie na całym świecie. Wzrost ten wiąże się z pojawieniem w 2005 roku nowego hiperwirulentnego szczepu *C. difficile* - określanego jako rybotyp 027, toksynotyp III i PFGE NAP1. Jego obecność odnotowano w szpitalach w wielu krajach, także w Polsce. Szczep rybotypu 027 wytwarza toksynę A i B szybciej i w większych ilościach (hiperprodukcja), a także jest zdolny do wytwarzania toksyny binarnej (CDT). Szacuje się, że szczep ten jest w stanie wyprodukować 16 razy więcej toksyny A i 23 razy więcej toksyny B niż regularny szczep bez delekcji w genie tcdC. Dlatego też szczepy te są przyczyną bardziej poważnego przebiegu choroby, zwiększonej śmiertelności i nawracających infekcji. Ponadto są one odporne na fluorochinolony (moksifloksacyne) i erytromycynę.

Wpływ prawidłowej diagnostyki

Dokładne i szybkie rozpoznanie CDAD jest podstawą udanego leczenia, ale także pomaga w prewencji transmisji *C. difficile*. Wczesne wykrycie przypadków i ewentualnych ognisk choroby jest kluczowe dla rozpoczęcia dedykowanego leczenia i wczesnego wdrożenia skutecznych procedur kontroli rozprzestrzeniania się zakażeń. Szczególnie ważne jest wykrycie hiperwirulentnego rybotypu 027 odpowiedzialnego za ciężką CDAD.

Aby próbka została wysłana do laboratorium w celu jej diagnostyki, muszą występować kliniczne wskazania do badania w kierunku *Clostridium difficile*.

Diagnostyce podlegają chorzy, którzy ujawniają objawy zakażenia, byli ostatnio hospitalizowani i/lub otrzymywali antybiotyki. Zaleca się, aby prowadzić badania u każdego hospitalizowanego pacjenta z biegunką, który w ciągu ostatnich dwóch miesięcy przyjmował antybiotyki i/lub kiedy biegunka wystąpiła po rozpoczęciu hospitalizacji. Test mikrobiologiczny z użyciem hodowli jest nadal złotym standardem w diagnostyce *C. difficile*, jednak testy genetyczne oparte na technologii PCR stanowią coraz częstsze rozwiązanie na szybką i bardzo precyzyjną diagnostykę.

Leczenie

W przypadku wystąpienia objawów CDAD należy zaprzestać stosowania dotychczasowej antybiotykoterapii i czynników anty-perystaltycznych aż do wykluczenia etiologii *C. difficile*. W przypadku potwierdzenia zakażenia stosujemy terapię metronidazolem lub wankomycyną.

GenoType CDiff test molekularny do wykrywania Clostridium difficile

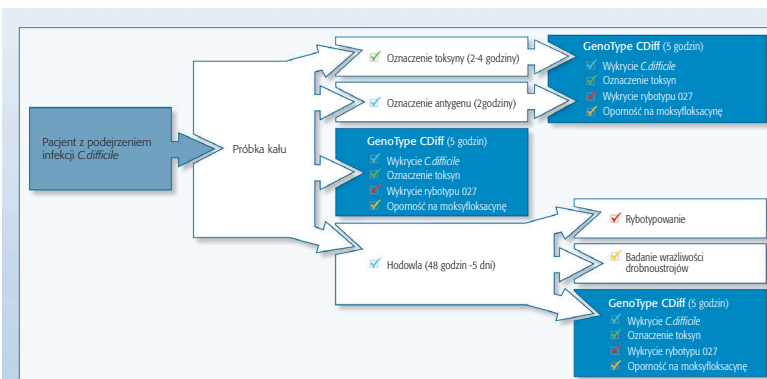
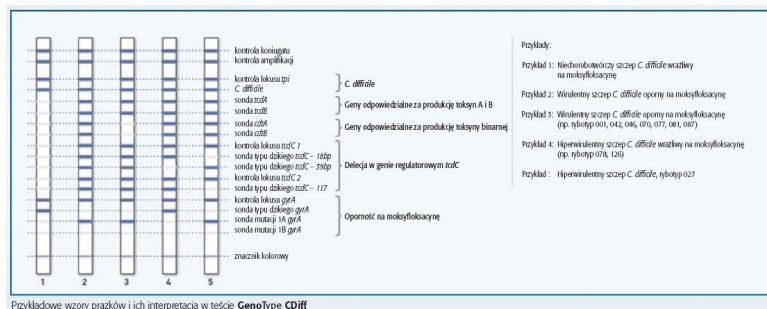
Test GenoType CDiff firmy Hain LifeScience to niezawodny test molekularny do wykrywania *Clostridium difficile*, bezpośrednio z próbek kału jak i z materiału pochodzącego z hodowli. Pozwala na różnicowanie niechorobotwórczych, wirulentnych i hiperwirulentnych szczepów, w tym rybotypu 027. Test GenoType CDiff łączy wyniki kilku różnych metod w jednym systemie testowym, umożliwia wykrycie Clostridium difficile, toksyny A, toksyny B, toksyny binarnej, delekcji fragmentów sekwencji kodującej genu regulatorowego tcdC oraz oporności na działanie moksifloksacyny. Test pozwala więc wykryć *C. difficile* w krótkim czasie i wiarygodnie określić jej patogenność oraz zjadliwość.

Hybrydyzacja - TwinCubator

Testy GenoType CDiff opierają się na zasadzie hybrydyzacji produktów PCR do pasków zawierających odpowiednie sondy. Aparat do hybrydyzacji TwinCubator został specjalnie zaprojektowany przez Hain Lifescience dla ułatwienia pracy z produktami bazującymi na technologii DNA STRIP, takimi jak CDiff. Umożliwia laboratorium szybką i prostą w obsłudze platformę hybrydyzacyjną, pozywającą na jednoczesną hybrydyzację 12. testów paskowych GenoType. Główną zaletą aparatu jest wysokiej jakości układ Peltiera zastosowany w urządzeniu gwarantujący precyzyjne ogrzewanie i schładzanie, zapewniając optymalne warunki do hybrydyzacji testów. Natomiast sucha inkubacja wykorzystywana w tym systemie zapobiega kontaminacji prób.

Diagnostyka zakażeń Clostridium difficile – schemat postępowania

Test GenoType CDiff to molekularny system testowy pozwalający na wykrywanie Clostridium difficile oraz rozróżnienia szczepów niechorobotwórczych, wirulentnych i hiperwilurentnych. Zasada działania testu opiera się na ekstrakcji DNA, po którym następuje proces amplifikacji i odwrotnej hybrydyzacji. Głównymi zaletami testu są dokładne wyniki uzyskiwane w ciągu kilku godzin, wysoka czułość i specyficzność.



W pełni zautomatyzowany proces barwienia od utrwalenia do wysuszenia preparatu

dr n. med. Alicja Rusinek
bioMérieux Polska Sp. z o.o.



PREVITM
— Color Gram

Preparat barwiony metodą Grama pozostaje jedną z podstawowych technik stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej, pomimo ciągłych zmian zmierzających do jej przyspieszenia. Niesie on ze sobą wiele cennych informacji, które mogą ukierunkować dalszą diagnostykę lub postawienie wstępnej diagnozy. Wydaje się nieoczekiwany w przypadku badań płynu mózgowo-rdzeniowego, dodatnich posiewów krwi, materiałów pobranych z ran i wielu innych. Niestety wielu mikrobiologów uważa preparat za uciążliwy w wykonaniu ze względu na wiele czynności manualnych, konieczność dokładnego odmierzania czasu, powstające niebezpieczne, brudzące odpady.

Nowoczesnym rozwiązaniem problemów związanych z procesem barwienia metodą Grama jest nowa wersja aparatu.

PREVI Color v.2

Aparat ten umożliwia w pełni automatyczne wybarwienie preparatów od utrwalenia do wysuszenia. Nowoczesna linia, wyposażenie w graficzne oprogramowanie z ekranem dotykowym i czytnik kodów kreskowych dla kontroli odczynników i preparatów, to nowe cechy systemu.

Zastosowana specjalna metoda rozpylania barwników poprzez dysze, gwarantuje standaryzację procesu barwienia, optymalizuje zużycie odczynników i ogranicza ilość odpadów. Dzięki wprowadzonym w nowej wersji PREVI Color czujnikom, użytkownik ma możliwość automatycznego nadzorowania poziomu zarówno odczynników, jak i odpadów.

Proces barwienia odbywa się w układzie zamkniętym, a odpady są usuwane do zintegrowanego z aparatem pojemnika. Zapewnia to czystość w laboratorium i pełne bezpieczeństwo operatora.

Niewielkie wymiary aparatu pozwalają na ustawienie go w dowolnym miejscu laboratorium. Nie jest to również uzależnione od dostępu do wody, zlewu itp.

Z uwagi na dużą elastyczność systemu PREVI Color Gram może stać się elementem wyposażenia każdego laboratorium, niezależnie od jego wielkości i specyfiki. Dwie wielkości rotora na preparaty umożliwiają jednoczesne barwienie 1-12 lub 1-30 szkiełek. W zależności od rodzaju lub grubości preparatu użytkownik wybiera jeden z dziesięciu różnych programów lub w razie konieczności wprowadza własny.

Integralną część systemu PREVI Color Gram stanowią gotowe do bezpośredniego użytku odczynniki w specjalnych butelkach dopasowanych do aparatu. W ofercie znajduje się kilka wersji odczynnika kontrastowego, tak by laboratorium mogło wybrać najlepszy z punktu widzenia swoich potrzeb i przyzwyczajzeń.

Aby zagęścić badany materiał przed wykonaniem preparatu barwionego metodą Grama, rotor do barwienia można zamienić na specjalny rotor do cytowania. W ten sposób jeden aparat w zależności od potrzeb może stać się cytowórką lub systemem do automatycznego barwienia.

Podsumowując PREVI Color Gram to system, który w każdym laboratorium pomoże uzyskać preparat barwiony metodą Grama w sposób wystandaryzowany, bezpieczny, ograniczając manualną pracę i możliwość popełnienia błędów.

www.biomerieux.pl

Nowe informacje na stronie internetowej

mgr Marta Warowny
bioMérieux Polska Sp. z o.o.

„W centrum uwagi” znajdują Państwo informacje o infekcjach sezonowych oraz szybkich testach immunochromatograficznych, które wspierają ich diagnostykę. Testy bioNexia Strep A Plus oraz bioNexia Strep A dipstick służą do wykrywania antygenów paciorkowców grupy A w próbkach z nosogardła. Kolejnym testem, który warto wykonać w diagnostyce różnicowej w zakresie etiologii infekcji jest bioNexia Influenza. Umożliwia on różnicowanie antygenów grypy typu A i B w próbkach z nosogardła. Testy bioNexia Strep A oraz bioNexia Influenza mogą być wykorzystywane przez lekarzy jako element konsultacji medycznej lub być przeprowadzane w laboratoriach.

Kolejną informacją, którą znajdują Państwo „w centrum uwagi”, jest diagnostyka boreliozy z Lyme. Prezentujemy test VIDAS Lyme IgG i IgM. Umożliwiają one określenie statusu serologicznego pacjenta i prowadzenie diagnostyki różnicowej boreliozy (wywoływanej przez szczepy *Borrelia – sensu, stricto, afzelii, garinii*) w zaledwie 27 minut.

W zakładce „Z ostatniej chwili” dostępne są informacje na temat nowego testu VIDAS *C.difficile* GDH. Jest to jakościowy test, który wykrywa antygen *C. difficile* – dehydrogenazę glutaminianową (GDH) w próbkach kału. Test jest szczególnie przydatny w badaniach przesiewowych pacjentów z podejrzeniem zakażenia *C. difficile*. Pomaga wykluczyć pacjentów z wynikiem ujemnym (bez infekcji *C. difficile*) w zaledwie 50 minut.

Na stronie głównej w zakładce „Kongresy” umieszczona jest aktualna lista kongresów i konferencji, w których firma bioMérieux będzie brać udział.

W nadchodzących tygodniach będziemy uczestniczyć w następujących wydarzeniach:

- Wiosennej Szkole Mikrobiologii Klinicznej. Konferencja odbędzie się w dniach 15 – 18 maja 2014 roku w Zakopanem.
- Krajowej Konferencji Pulmonologów i Mikrobiologów, organizowanej przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc. Konferencja odbędzie się w dniach 11 – 13 czerwca 2014 roku w Zakopanem.

W zakładce obsługa klienta znajdują Państwo nową książeczkę edukacyjną: „Praktyczny przewodnik Polityka Antybiotykowa w Szpitalach”, która w wyczerpujący sposób prezentuje problem narastającej antybiotykoodporności w szpitalach oraz pokazuje, w jaki sposób można zahamować to zjawisko. Książeczkę można pobrać w formie pliku PDF.

Przypominamy również o funkcjonowaniu serwisu www.mybiomerieux.com. Za jego pośrednictwem mogą Państwo korzystać z dokumentacji bibliotecznej: ulotek technicznych, instrukcji, certyfikatów. Od początku roku 2014 bezpośrednio w Bibliotece Technicznej bioMérieux dostępna jest dokumentacja techniczna produktów AES CHEMUNEX.





BIOMÉRIEUX

www.biomerieux.pl