



**Karolinska
Institutet**

Clostridium difficile

Diagnostiska metoder

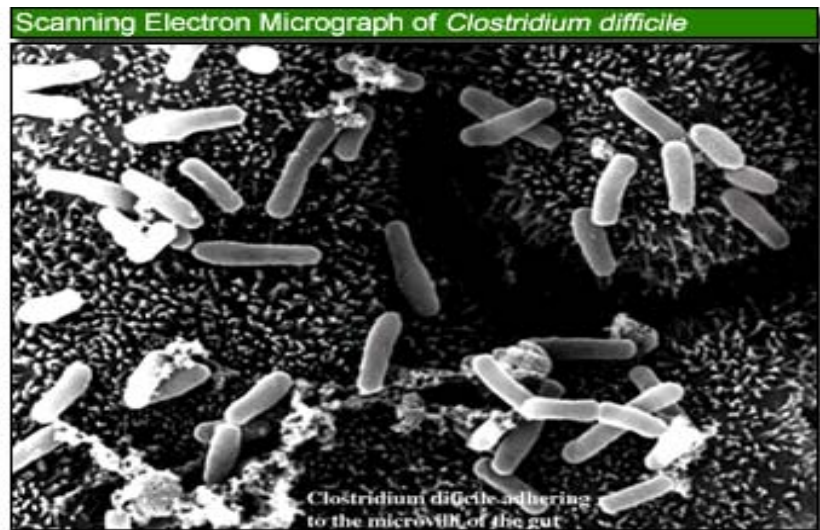
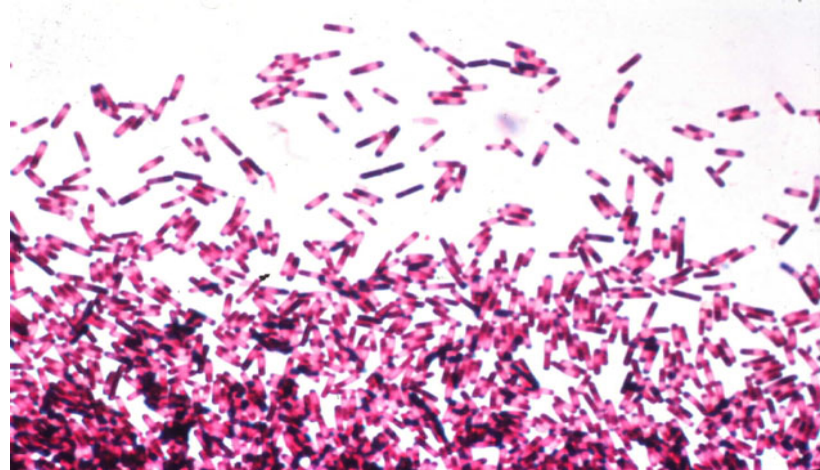
Andrej Weintraub

Karolinska Institutet

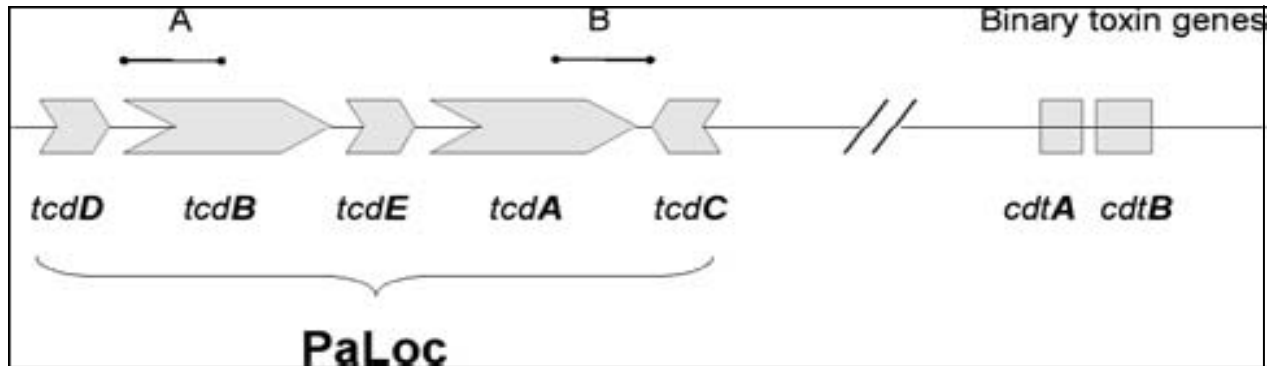
Karolinska Universitetssjukhuset, Huddinge

Clostridium difficile

- Anaerob
- Gram positiv
- Sporbildande
- Toxinbildande
 - Toxin A
 - Toxin B
 - Binärt toxin
 - Vissa kloner



Virulensfaktorer



- Toxin A (TcdA)
 - 308-kDa enterotoxin
- Toxin B (TcdB)
 - 270-kDa cytotoxin
- Binärt toxin (CDT)
 - aktin-specifik ADP-ribosyl transferas

A+B+ Vanligaste
A-B+ Förekommer
A+B- Inte påträffad
CDT+ Vissa kloner

C. difficile diagnostik - vad är viktigt

- Tillförlitlig
 - Specifik
 - Låg specificitet - falskt positiva resultat
 - Känslig
 - Låg känslighet - falskt negativa resultat
- Snabb
- Enkel

***C. difficile* diagnostik - vad kan göras**

- Odling
- Påvisning av *C. difficile* i faeces
- Påvisning av toxin
 - I faeces
 - Isolatet
- Påvisning av toxingen(er)
 - I faeces
 - Isolatet



Odling

- **Selektiva substrat**
 - CCFA, TCCFA
- **Icke selektiva substrat**
 - Blodplattor (Bx)
- **Förutsättning**
 - Möjlighet till odling i anaerobmiljö
 - Tillgång till selektiva medier
- **Fördelar**
 - Lätt att känna igen
 - Tillgång till isolat
 - Toxin påvisning på isolatet
 - Bestämning av PCR-ribotyp
 - Resistensbestämning
 - Molekylärbiologisk karakterisering
- **Nackdelar**
 - Tidskrävande, minst 2 dygn

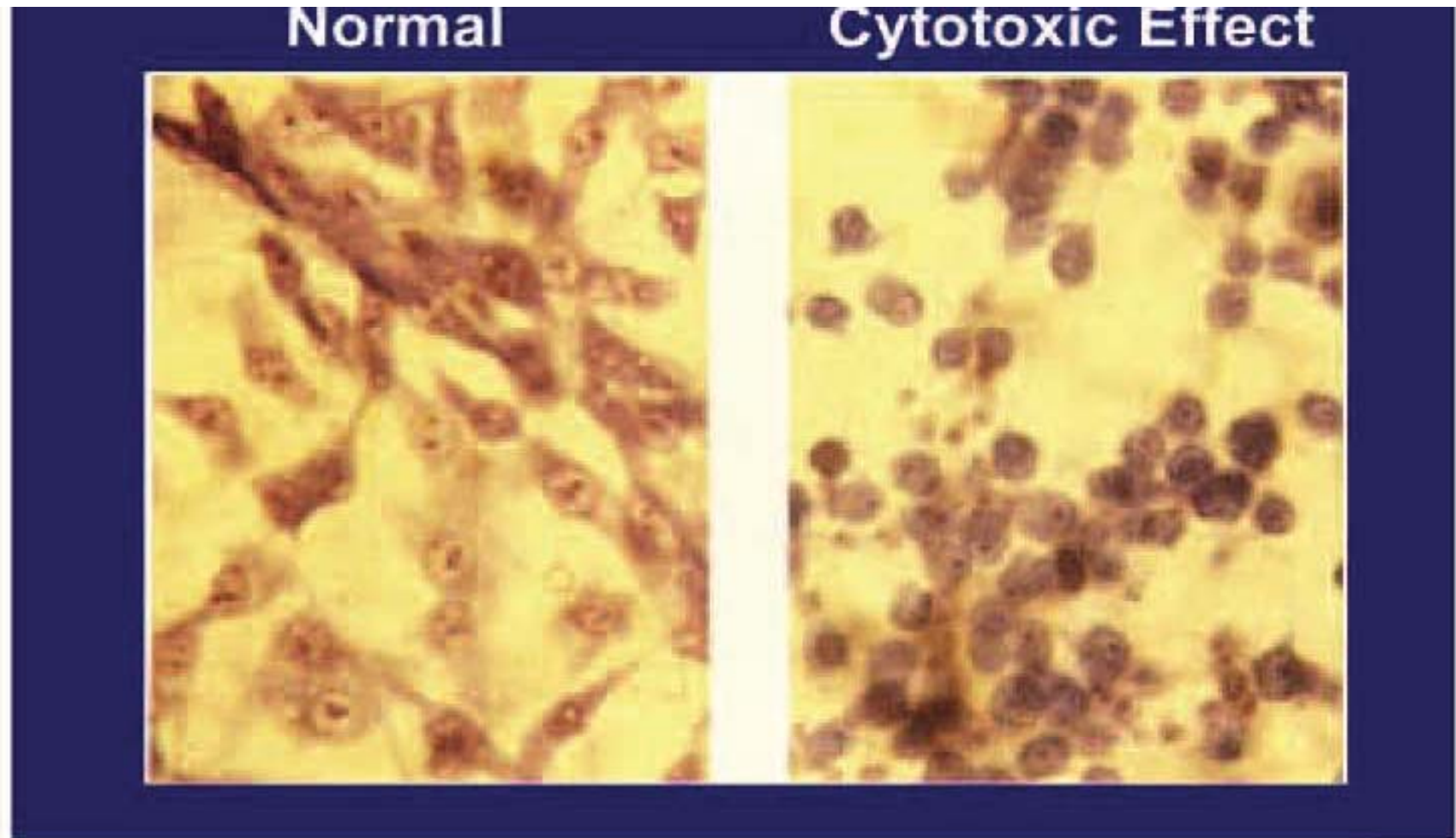


Toxin påvisning - celltoxicitetsmetod

- **Fördelar**
 - "Golden standard"
 - Görs direkt på faeces och kan göras på isolat
 - Biologisk aktivitet
 - Neutralisation med anti-toxin
 - Lätt att tolka
 - Hög känslighet och specificitet
 - Om kombinerad med odling
 - Enbart celltoxicitet inte tillräckligt

- **Nackdelar**
 - Tillgång till celler (fibroblaster) och möjlighet till cellodling (CO₂ miljö)
 - Tidskrävande - 1 dygn
 - Detekterar endast toxin B

Celltoxicitetsmetod - tolkning



Toxin påvisning - immunologisk

- **Enzyme Immuno Assay (EIA)**
- Olika system och leverantörer - gemensamt för alla - detektion av toxin med hjälp av antikroppar
- **Fördelar**
 - Snabb
 - Utförs direkt på faeces eller på isolat
 - Färdiga kit och system finns tillgängliga
 - Påvisar både Toxin A och B
- **Nackdelar**
 - Sämre känslighet än celltoxicitetsmetod
 - Mäter förekomsten av toxin, ej biologisk aktivitet
 - Vissa system kräver special utrustning

Toxin påvisning - immunologisk

Känslighet och specificitet Jämförelse med celltoxicitet

| Test | Studier (n) | Patienter (n) | Känslighet (%) | Specificitet (%) |
|-----------------------------------|----------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Meridian Premier A&B ¹ | 9 | 2891 | 86-97 | 95-98 |
| TechLab Tox A/B II ¹ | 6 | 2158 | 82-85 | 98-100 |
| Meridian Immunocard ¹ | 6 | 1982 | 87-92 | 98-100 |
| BioMérieux VIDAS A&B ² | 1 | 1011 | 88 | 100 |

Lågt känslighet - falskt negativa
Lågt specificitet - falskt positiva

¹Lancet Infect Dis, 2008, 8:777-84
²Poster ASM 2008

Clostridium difficile diagnostiska metoder - Sammanställning av metodik som används i Sverige 2008 (1995)

- 45% (45%) kombinerar toxinpåvisning i faeces med odling
- 55% (55%) endast toxinpåvisning i faeces
- 83% (61%) använder immunologisk metod (totalt tre olika varianter)
- 17% (39%) celltoxicitetsmetod för påvisande av toxin

Tizza P. Zomer, J. Struwe, T. Åkerlund, S. Kühlmann-Berenzon, Y. Andersson, K. Tegmark-Wisell
Poster på Läkarsammanträdet 2008

Framtiden - RT-PCR

- BD GeneOhm Cdiff assay
 - Snabb
 - Känslig
 - Kan köras direkt på faeces eller på isolat
 - Toxin B genen
 - Hög känslighet och specificitet
- Cepheid Xpert (Multiplex RT-PCR)
 - Snabb
 - Känslig
 - Kan köras direkt på faeces eller på isolat
 - Toxin B, Binärt toxin generna samt tcdC deletion (nt 117)
 - Hög känslighet och specificitet

Relativ känslighet av *C. difficile* tester

Odling + toxin påvisning

RT-PCR?

Celltoxicitetsmetod

Toxin A & B EIA

Diagnostiska metoder idag - svagheter och styrkor

- **Odling**
 - Känsligaste metod (i kombination med toxinpåvisning)
 - Möjlighet till vidare karakterisering (ribotypbestämning osv)
 - Resistensbestämning
 - Tidskrävande
- **Celltoxicitetsmetod - endast Toxin B**
 - "Golden standard"
 - Mäter biologisk aktivitet av toxinet
 - Tidskrävande
 - Tillgång till celler och möjlighet till cellodling
- **EIA**
 - Snabb
 - ej tillfredställande känslighet
 - Risk för falsk negativa resultat

Hur gör vi på Karolinska Universitetslaboratoriet

- Odlar på TCCFA plattor
- Cytotoxintest
 - Humana lung fibroblaster (från virusavdelningen)
 - Provet spädes, centrifugeras
 - En del av supernatanten sätts på cellerna och en del blandas med specifika anti-toxin B antikroppar (neutralisations assay)
- Toxintestetet inkuberas i 37°C i CO₂ över natt
- Avläsning i mikroskop på morgonen
 - Positivt - svaras som positiv
- Nästa dag - kontroll av TCCFA plattor
 - Toxin + och odling +
 - Svaras som positiv för *C. difficile*
 - Toxin - och odling +
 - Toxin test på isolatet (tar ytterliggare 1 dygn)
 - Om positiv - svaras som växt av toxinproducerande *C. difficile*

Generella rekommendationer

- Odling i kombination med toxinpåvisning - känsligaste metoden
 - Möjlighet till resistensbestämning
 - Metronidazole
 - Möjlighet till vidare karakterisering
 - Kontroll av eventuella utbrott och klonal spridning
- Celltoxicitetsmetoden ger säkrare diagnostik än EIA

Slutsatser

- Diagnostik av *C. difficile* bör baseras på en kombination av odling och toxinpåvisning
- Den kliniska bilden hos patienten bör beaktas vid tolkning av laboratoriefyndet
 - Asymptomatiska bärare förekommer
- Nya diagnostiska metoder som RT-PCR är lovande men behöver ytterligare utvärderas