

Metodeforbedring medfører en optimering af arbejdsgangen i laboratoriet



En sammenligning af to Real-time PCR metoder og en enzym immunoassay (EIA), til detektion af toksin-producerende *Clostridium difficile*

David Sekunda og Jane Schøn Jager Skou-Christensen, bioanalytikere,
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Diagnostisk Center

Introduktion

Clostridium difficile (Cl. diff.) er en anaerob, Gram-positiv, sporedannende stav, der ofte producerer toksinerne A og B og i nogle tilfælde et binært toksin. Disse toksiner forårsager inflammation i tarmslimhinden og kan føre til den alvorlige tilstand af pseudomembranøs enterokolitis (en diarésygdom, som kan opstå efter brug af antibiotika). Binært toksin er desuden under mistanke for at være et mere virulent toksin, der kan give anledning til en øget resistens¹. Udiagnosticeret kan denne tilstand medføre et toksisk forløb med en mortalitet på ca. 15 %. Infektionen opstår som regel i forbindelse med en antibiotisk behandling (antibiotika-associeret tyktarmsbetændelse).

Tarminflammationen forekommer hyppigt hos ældre indlagte patienter. Den antibiotiske behandling kan forårsage forandringer i den bakterielle normalflora i tarmen, og disse forandringer giver Cl. diff. gode muligheder for at trives, da den er resistent over for mange antibiotika, samtidig med at den kan overleve i tarmslimhinden som sporeform. Med udviklingen af nye PCR analyser er det interessant at se på optimering og besparelser, uden at det går ind og påvirker svartid og kvaliteten af analysen.

Materiale og metode

Fænotypisk identifikation: Dyrkning af Cl. diff på CCFA (cycloserin-cefoxitin-fructose agar). Dette medie er selektivt for Cl. diff., idet væksten af andre bakterier hæmmes. Agarpladen inkuberes i 48 timer under anaerobe forhold. Ved vækst af Cl. diff. kan toksin A og B påvises ved brug af enzym immunoassay (EIA): Hurtigtesten Immuno Card Toxins A&B fra Meridian Bioscience, Inc. Denne metode tager ca. 15-17 minutter per prøve.

Clostridium difficile PCR på BD Max fra Beckton Dickinson: Dette er en real-time PCR metode, der har til formål at identificere toksin A og B samt binært toksin fra *Cl. diff.* direkte i fæces. Der kan analyseres 22 prøver + 2 positive kontroller i en kørsel. Efter ca. 2,5 time, kan PCR-resultaterne aflæses.

GeneXpert *Clostridium difficile* assay: Dette er en multiplex real-time PCR metode, der detekterer toksin B samt det binære toksin. Analysen tager cirka 45 minutter, og der kan køres 2 prøver ad gangen.

Tidligere arbejdsgang i laboratoriet: Fæcesprøven modtages og dyrkes for bl.a. *Cl. diff* på en CCFA plade samt *Cl. diff* PCR på BD Max. Når pladen aflæses på 2. døgn, skal evt. *Cl. diff* kolonier resistensbestemmes og isoleres til nærmere toksinbestemmelse vha. Immuno Card, medmindre der foreligger et positivt PCR svar fra BD max på prøven. Så vil man overføre PCR svaret. Resistensbestemmelsen og isolatet inkuberes i et døgn under anaerobe forhold til aflæsning og toksinbestemmelse dagen efter.

Hvis stammen viser resistens, eller hvis den findes negativ for toksiner ved Immuno Card, skal den sendes til videre analysering på GeneXpert. Denne metode er i stand til at detektere det binære toksin, som kan give anledning til en øget resistens. Den er desuden mere sensitiv end Immuno Card metoden², og derfor skal alle negative ligeledes dobbeltjekkes. Dette er en meget tidskrævende og langvarig procedure, og da en hurtigere og mere præcis diagnostik er essentiel for korrekt behandling og forebyggelse af smitte, giver det god mening at optimere arbejdsgangen i laboratoriet.

Resultater

Vi har analyseret 35 fæcesprøver, der var positive for *Cl. diff* (6 negative/25 positive for toksin A, B/4 inkonklusive) på GeneXpert (gold standard) og sammenlignet svarene med henholdsvis Immuno card og BD max.

I 7 af de positive *Cl. diff* prøver, var binært toksin ligeledes påvist. Alle analyserne er lavet på *Cl. diff* kolonier, det vil sige ikke direkte fra fæces.

Resultaterne viste en højere specificitet for begge PCR analyser i forhold til Immuno Card. Alle tre metoder havde samme sensitivitet, dog kan man på baggrund af litteraturen læse sig til at Immuno Card har tendens til en lavere sensitivitet i forhold til PCR².

Diskussion

På baggrund af vores resultater, kunne man med fordel fjerne Immuno Card metoden fra proceduren og i stedet udføre PCR direkte på bakteriekolonier vha. BD Max. Man kunne ligeledes udelade resistensbestemmelsen, da PCR analysen på

BD Max er i stand til at detektere det binære toksin. Desuden behandles toksinproducerende *Cl. diff* altid med vancomycin, så en resistensbestemmelse er ikke interessant i behandlingsøjemed. Dette ville give en mere optimeret og tidsbesparende arbejdsgang i laboratoriet samt en hurtigere svarafgivelse, idet man med fordel vil kunne lave PCR allerede på 2 døgn, og dermed undlade at skulle isolere stammen og inkubere i yderligere 1 døgn, før en toksinbestemmelse var mulig. Ligeledes kunne BD max anvendes og erstatte GeneXpert til påvisning af toksin A og B samt binært toksin, da der kan analyseres flere prøver ad gangen på BD Max. Begge analyser afgiver svar indenfor et par timer og BD Max er i stand til at detektere et toksin yderligere, toksin A.

Referencer

1. L. Clifford McDonald et al. 2005. An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*. JM, Vol. 353, no.23
2. L. M. Sloan et al. 2008. Comparison of Real-Time PCR for Detection of the *tcdC* Gene with Four Toxin Immunoassays and Culture in Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. JCM, vol. 46. No.6