Mikrobiológiai vizsgálatok a gastroenterológiai gyakorlatban

Kenesei Éva
Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinika

Témakörök

- A gastroenteritist okozó pathogének, kimutatásuk- új diagnosztikai módszerek
- Mintavétel
- Transzport, tárolás
- Tenyésztés
- Nem tenyésztéses módszerek
- *Clostridium difficile*
- Új molekuláris módszerek, értékelésük

Az alsó intestinalis traktus infekciói 1.

Légúti megbetegedések után a második leggyakoribb fertőzés

Többségük enyhe tünetekkel jár, „egyszerű” **vizes hasmenés**- spontán gyógyul- ilyen esetben széklet labor általában nem indokolt

Ennek oka: **a vizsgálatok találati aránya alacsony**

a pozitív leltnek nincs hatása a kezelésre

Kórokozók lehetnek:

- vírusok: Rota-, Adeno-, Noro-, Sapo-, Astrovírus
- baktériumok:ETEC, EPEC, *C. perfringens, B.cereus, S. aureus*
- parazita:*Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum,*

de a kóroki diagnózis indokolt

- **Újszülöttek, csecsemők súlyos hasmenése,**
- **Elhúzódó, súlyos hasmenés**
- **Extraintestinális megbetegedést mutató tünetek esetén,**
- **Járványügyi szempontból, kórházi halmozódás esetén**

Az alsó intestinalis traktus infekciói 2.

Laboratóriumi vizsgálat indokolt, (bizonyos esetekben kötelező):

véres széklet, dysenteriás tünetek, lázzal járó enteritis esetén

Kórokozók:

•baktériumok: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., EIEC, EHEC, EAEC *Campylobacter* spp.,*Yersinia* spp.,, *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *C. difficile*

•paraziták: *Entamoeba histolytica*

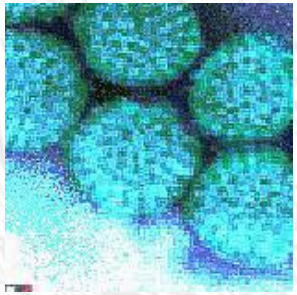
A hasmenéses megbetegedések kóroki diagnosztikája, nehézségi:

A „vizes-véres széklet” besorolásban lehetnek átfedések-
Különböző eredet – hasonló tünetek,
A laboratóriumi módszerek, vizsgálat iránya többféle
különbség: érzékenységben, specificitásban, kimutatás módszerében, árban, TAT-ban

Baktérium?

Hagyományos módszerrel?
Milyen kórokozókra ?
Toxin kimutatás ?

Vírus?



Milyen vírusra ?
Milyen módszerrel?

Parazita?

Mely parazitára,
Milyen módszerre?

Gastroenteritis kórokozói

Baktériumok	Vírus	Paraziták
***Salmonella* spp.**	**Norovírus GI, GII**	***Giardia lamblia***
***E. Coli* , STEC, O157**	**Sapovírus**	***Cryptosporodium* spp.**
EPEC,EIEC,EAEC, ETEC	**Rotavírus A**	***Entamoeba histolytica***
***Campylobacter* spp.**	**Adenovírus F 40/41**	
***Shigella* spp.**	**Astrovírus**	
Clostridium difficile		
Yersinia enterocolitica		
Plesiomonas shigelloides		
Vibrio cholerae		
***Aeromonas* spp.**		
Ételmérgezést okozók:		
Staphylococcus aureus		
Bacillus cereus		
Clostridium perfringens		

Új bakteriális kórokozók

Bacteroides fragilis- ETBF -enterotoxin (fragilysin) termelő nem csak 5 év alatti gyermekenél gyakori. Diagnosztikája nehéz (PCR-el B. fragilis toxin gén (bft) kimutatás, vagy cytopathiás hatás vizsgálata sejttenyészeten

Edwarsiella tarda **–** fertőzés forrása:halak, tengeri állatok, szennyezett víz

5 év alatti gyermek, ill 50 év fölöttiek a veszélyeztetett.

Escherichia albertii- 2003-ban írták le, enteropathogén virulencia faktor

Rutin tenyésztés során összetéveszthető *Hafnia, Salmonella, Citrobacter* vagy inaktív *E. coli* törzsekkel.

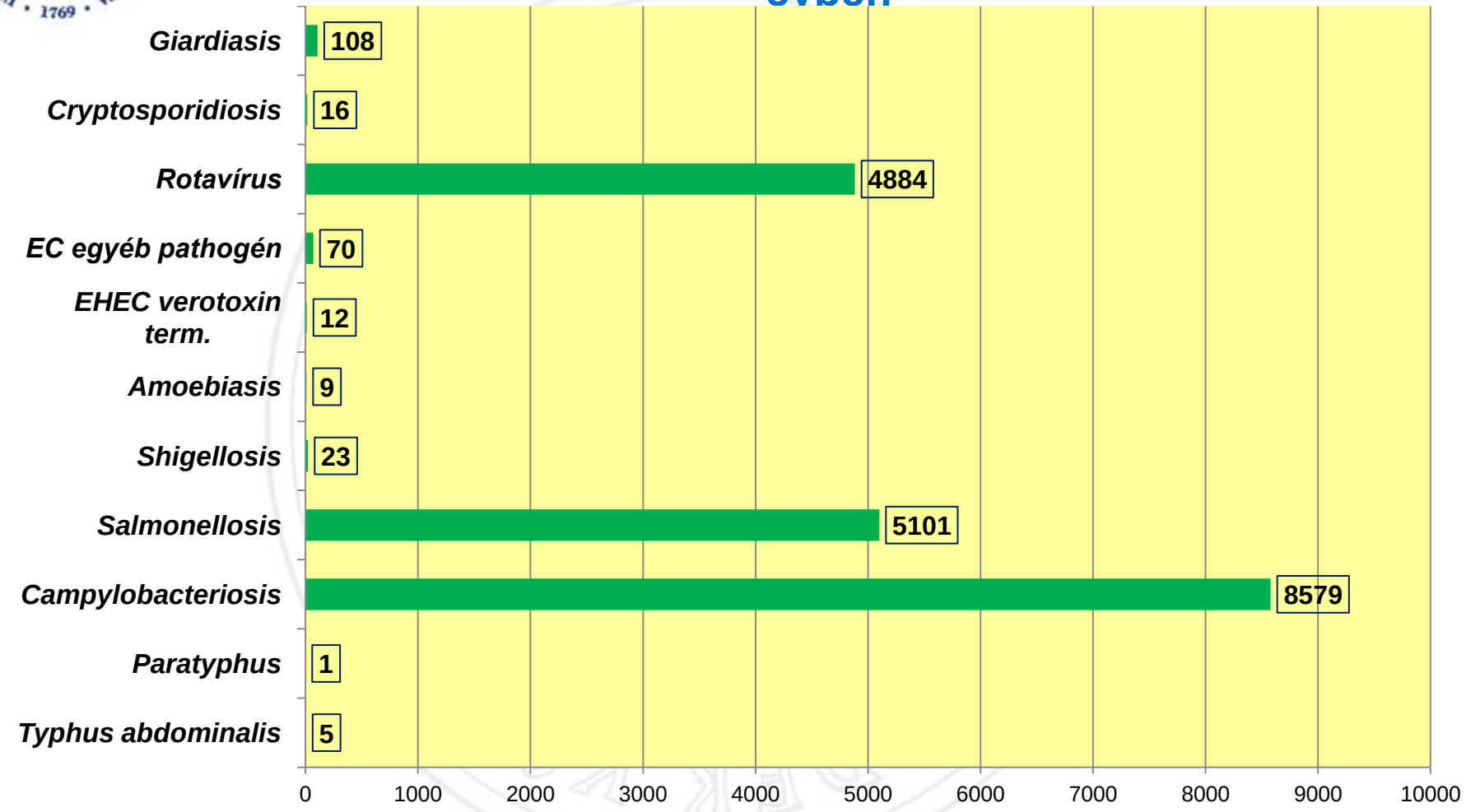
Klebsiella oxtoca –cytotoxin termelő törzs.

2006- antibiotikum asszociált hemorrhagiás colitisban írták le *C. difficile* negatív betegeknél.

Providencia alcalifaciens- utazók hasmenése, kontaminált étel, gyermekek veszélyeztetettek.

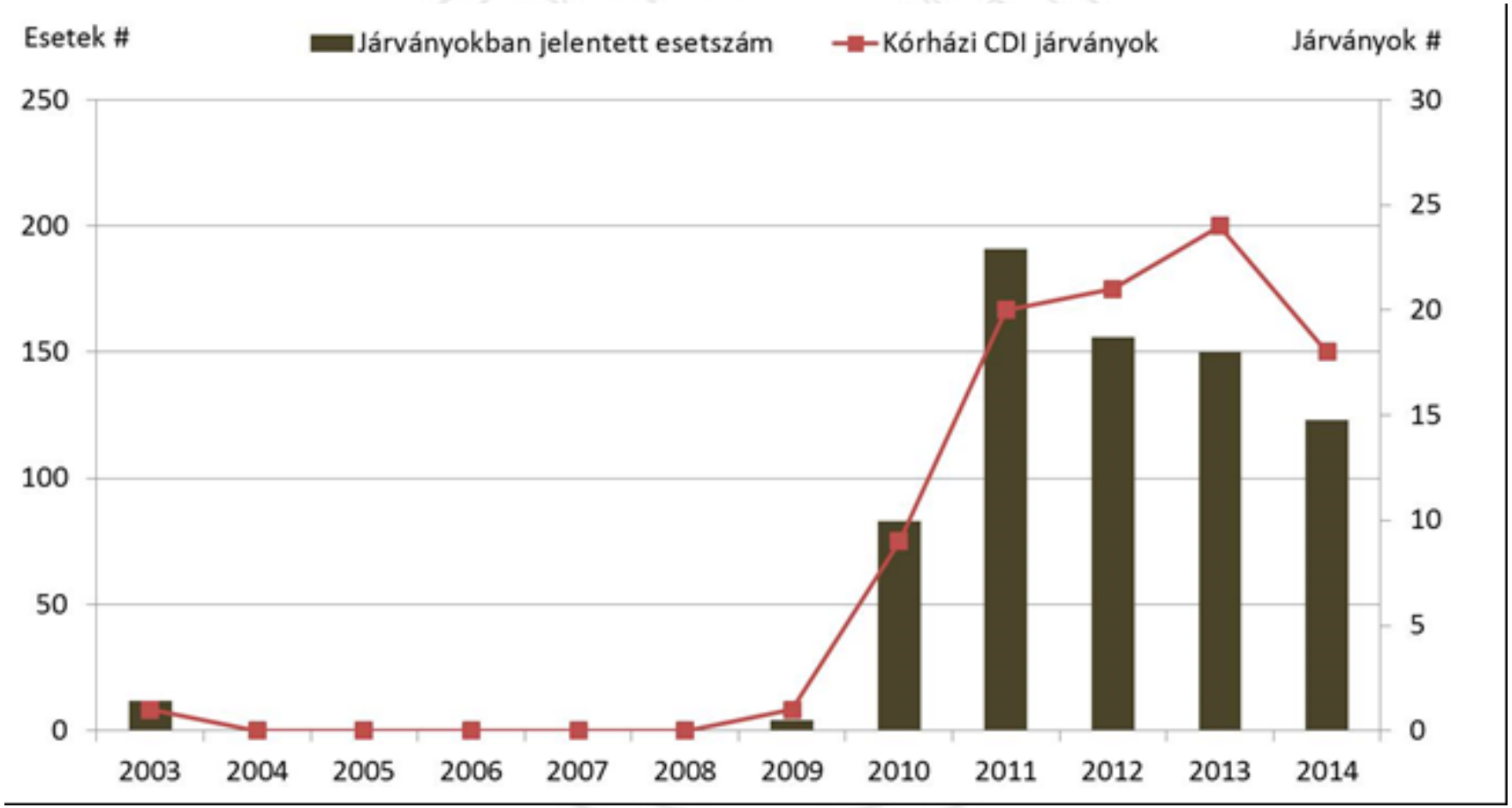
Romney M.et al: Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis Clin.Microb. Rev 28;1. 2015.

Bejelentett fertőző megbetegedés Magyarországon 2016 évben



Forrás:EMMI kórházhigiénés és Járványügyi Felügyeleti Főosztály

C. difficile által okozott kórházi járványok Magyarországon, 2012-2014



OEK *C. difficile* fertőzések Módszertani levél 2016.

A diagnosztika lépései

1. Preanalitika –mintavétel

2. Diagnosztikai módszerei

3. Eredmény értékelése

Széklet mintavétel és tárolás

Bakteriológiai vizsgálatra:

- Mintavétel:a betegség aktív szakában.
- (EHEC- kitenyésztése hasmenést követő 2. nap
  6. nap után kimutathatósága <30%)
- Jól záró steril tartályba. Antibiotikum kezelés előtt !
- A széklet makroszkóposan nyákos, gennyes, véres részéből

Tárolás:

- szobahőn max. 2 óra *(Campylobacter, Shigella, Vibrio* gyorsan elpusztul a toxikus bomlástermékek miatt)
- + 4 C-on 24-48 óra még elfogadható

Transzport médium használata:

Cary- Blair transzport közeg

Glicerin-salin transzport közeg- Campylobacter tenyésztésére nem alkalmas

Antigén kimutatás, PCR vizsgálat- 15 °C-on tárolható a minta

Széklet mintavétel és tárolás

Vírus vizsgálatra:

2-4 g minta jól zárható steril tartályba

Rota vírus esetén: a betegség 3-5. napján, Calici-, Astro-,

Adenovírus: az első 48 órában vett minta + 4 C tárolva.

Parazitológiai vizsgálatra:

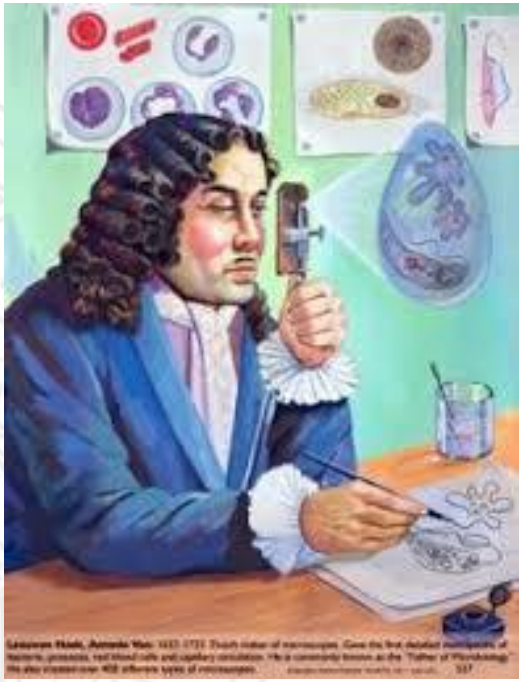
Mint bakteriológiai vizsg.

Trophozoita mikroszkópos kimutatása esetén:

a folyékony, lágy székletet fél órán belül testmelegen kell eljuttatni a laboratóriumba, vagy transzport közeget alkalmazni.

A paraziták intermittáló ürítése miatt 3 mintavétel szükséges a betegség 4. 7. 10. napja között.

Mikroszkóp

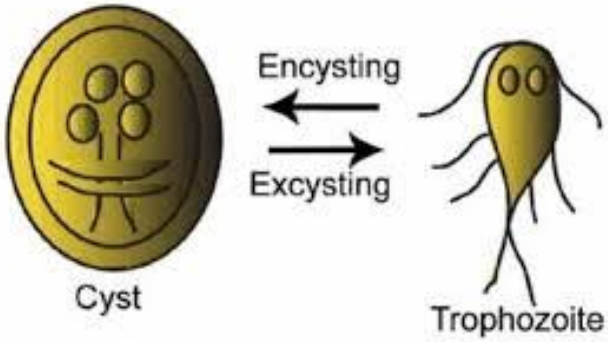


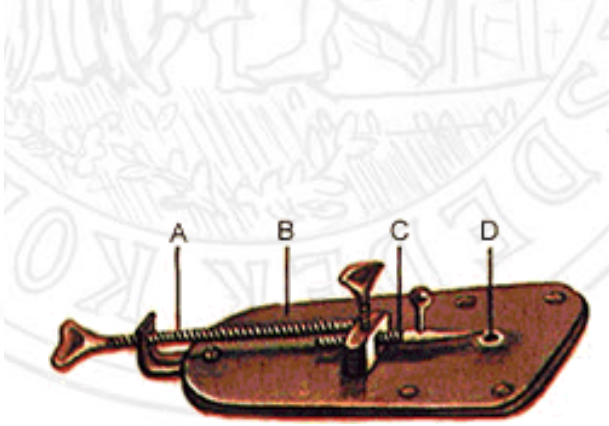
1681-ban Antonie von Leeuwenhoek (1632-1723)

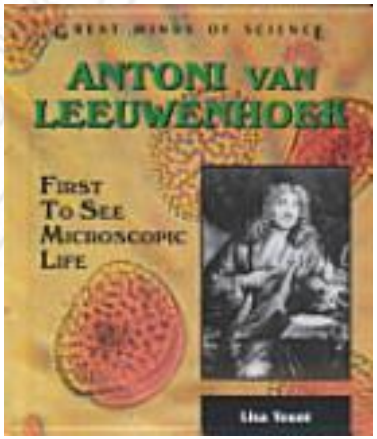
saját székletében látta meg mikroszkópjával a *Giardia* trophozoitát

Sokáig kétséges volt a Giardia pathogén szerepe

1970-ben Szovjetuniból visszatérő utazó csoportnál diagnosztizálták







MS. Wolfe:Giardiasis Clin. Microbiol. Rev. Jan.1992.

Mikroszkópos vizsgálat:

- Direkt vagy festett kenet -protozoonok vegetatív alakja,
  ciszták, féregpeték, fehérvérsejtek, vvt.

Fénymikroszkóp előnye:

- Gyors, olcsó, pozitív esetben informatív

Hátrányai:

- alacsony szenzitivitás és specificitás,
- gyakorlott szakembert igényel

Bakteriológiai tenyésztés – általános rutin vizsgálatok, minimális panel:

Salmonella spp., *Shigella* spp.,*Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni,* kisgyermekeknél EPEC

Javasolt bevonni az enterohaemorrhagias *E. coli* (EHEC) csoportot is

csak az O157:H7 kimutatása a gyakorlat

Rutin diagnosznikában többnyire elegendő a faj szintű meghatározás,de

- *Shigella dysenteria* 1- az, hogy Shiga toxint termelhet e – fontos
- Salmonelláknák a typhoid típusok, kisgyermekeknél invazív típusok

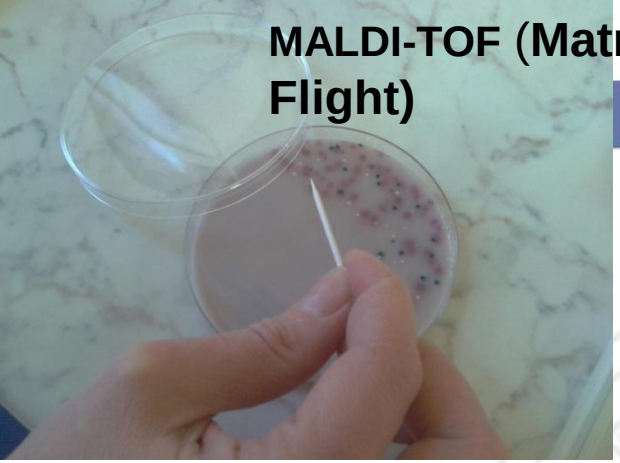
Jelezni kell, ha diszpepszia coli csop. EPEC, EHEC, Shiga toxin kimutatás,*Clostridium difficile,*

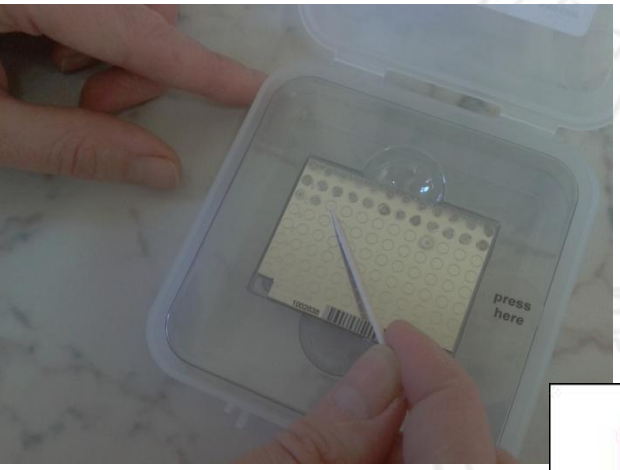
Vibrio cholerae, ételmérgezések kórokozói (*S. aureus,*

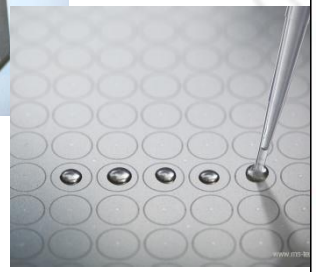
Aeromonas, stb.) vagy más felmerülő kórokozó kimutatását kérjük.

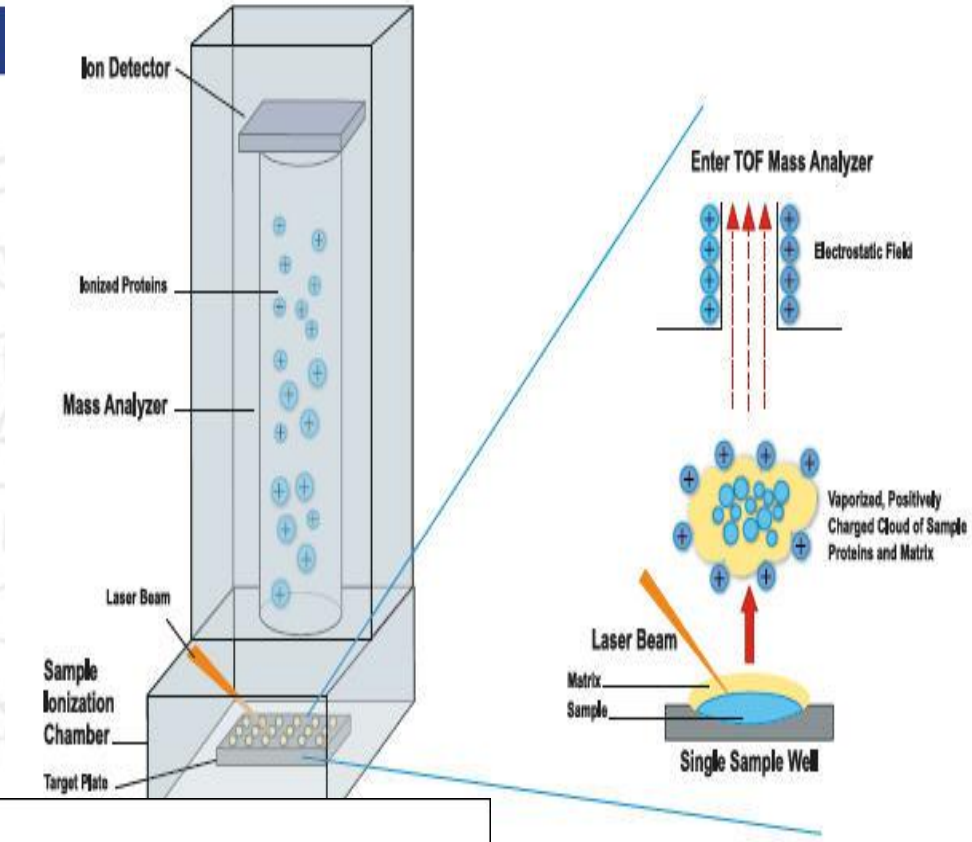
A laboratóriumnak informálni kell az ellátási területéhez tartozó klinikusokat a vizsgálati panelről, amit minden feldolgozandó mintánál alkalmaz

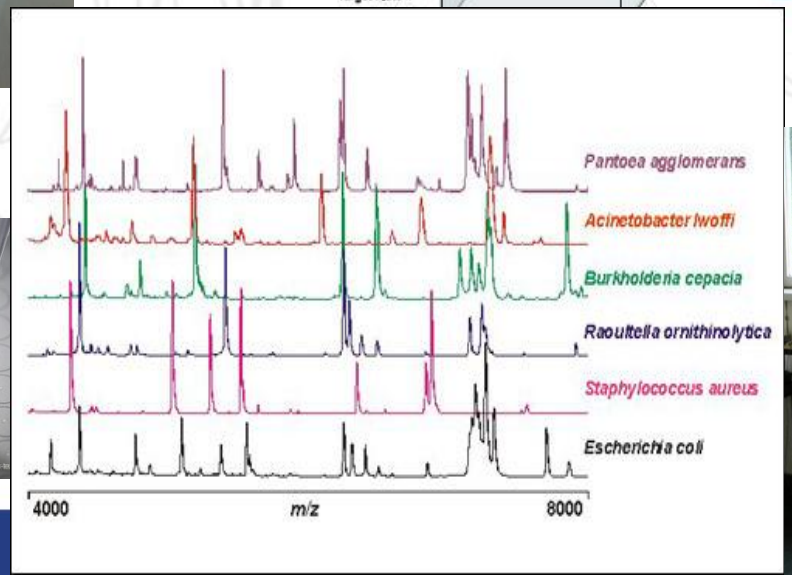
MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight)





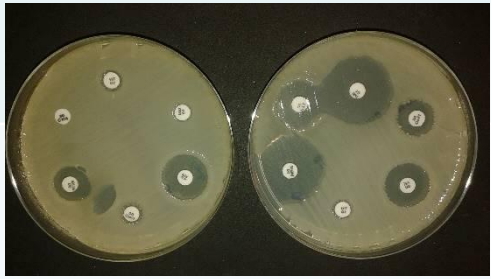






Antibiotikum adás, érzékenységi vizsgálat

Kórokozó/Kórkép	Antibiotikum adás	Érzékenységi vizsgálat
Salmonellosis (nontyohoid) bacteraemiával	Javasolt, bizonyítottan hasznos	szükséges
Shigellosis, *S. enterica ser. typhi, S. paratyphi,* EIEC, ETEC, *V. cholerae, Aeromonas, Plesiomonas* spp.	Hasznos, súlyos esetben javasolt	szükséges
Campylobacteriosis	Mérsékelten hasznos (de súlyos esetben gyermekeknél, időseknél, immunhiányos állapotban ajánlott)	rutinszerűen nem közölt (azitromycin rezisztencia ritka, fluoriquinolon rezisztencia nő, doxyciclin rezisztencia magas)
Nontiphoid salmonellosis	Haszna nem bizonyított	rutinszerűen nem javasolt ab. adás esetén elhúzódó hordozás, relapszus
STEC, EHEC (Shiga-toxin)	Nem ajánlott, káros lehet ab. Beindítja a Stx fág litikus ciklusát, sejtszétesést, toxin kiszabadulást	nem
C.difficile (toxin termelő)		az általánosan használt szerekre (metronidazol, vancomycin, teicoplanin fidaxomicin) érzékeny a törzs.



Nem tenyésztéses eljárások, antigének, toxinok, pathogenitásért felelős gének kimutatása

Enterohaemorrhagias *E. coli* (EHEC) Shiga-toxin; Stx1, Stx2,

ELISA, EIA, PCR módszerrel.

adhéziós faktor, *eae* gén által kódolt intimin kimutatása

(de: Németországi járványt okozó O104:H4 törzs *eae* negatív, de aggregatív adhéziós képességgel bírt- korábban nem ismert szerotípus)

Enterotoxikus *E. coli* (ETEC) enterotoxin kimutatás

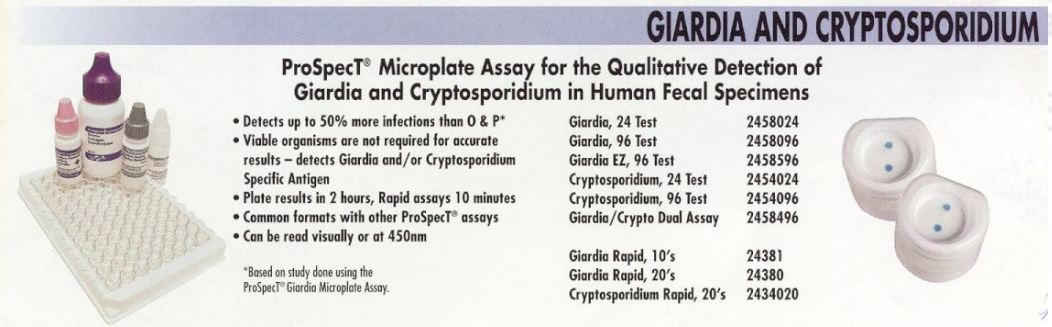
Hőlabil (LT) és hőstabil (ST) toxin kimutatás. Ritka vizsgálat.

Clostridium difficile antigén és toxin kimutatás:

ELISA módszer (gyors teszt), PCR-,

Toxin A: szövetkárosító entrotoxin

Toxin B: citopatogen hatás



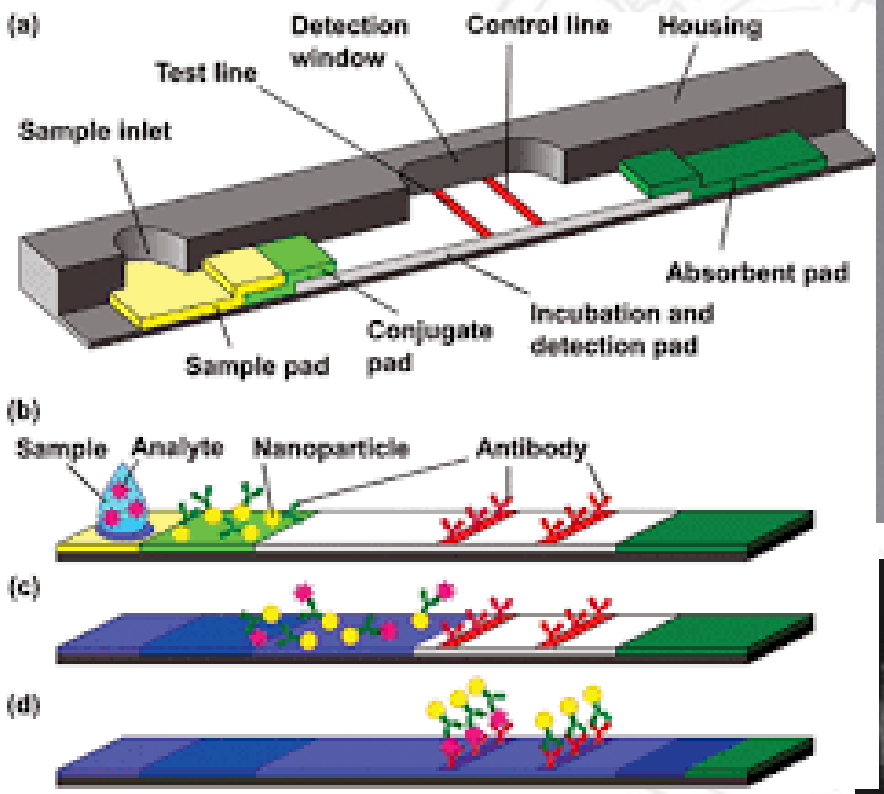
Gyorsdiagnosztikai módszerek előnye:

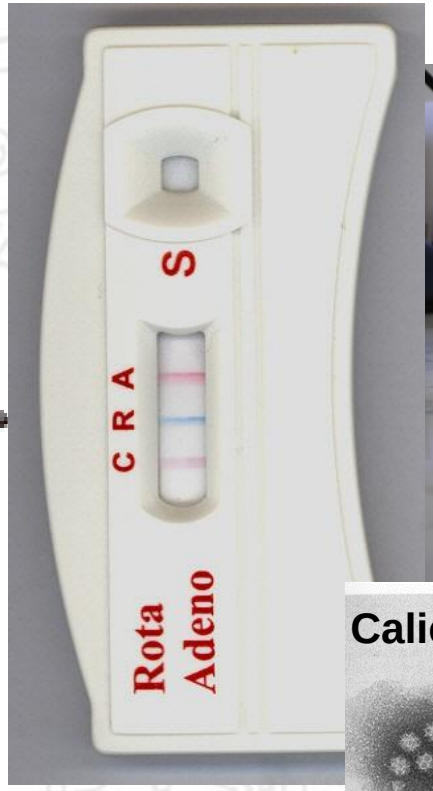
- eredmény fél egy órán belül, gyors diagnózis
- gyors intézkedés- hatékony infekciókontrol alapfeltétele
- Fontos: a teszt megbízhatóságának, szenzitivitás, specificitás ismerete!

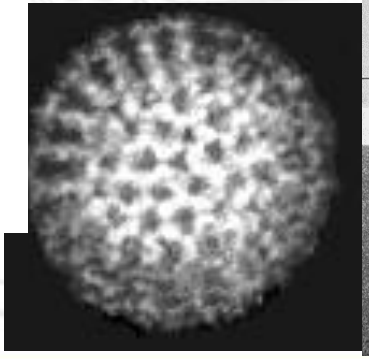
A toxinok bomlékonyak! Mintatárolás 2-8 C-on!

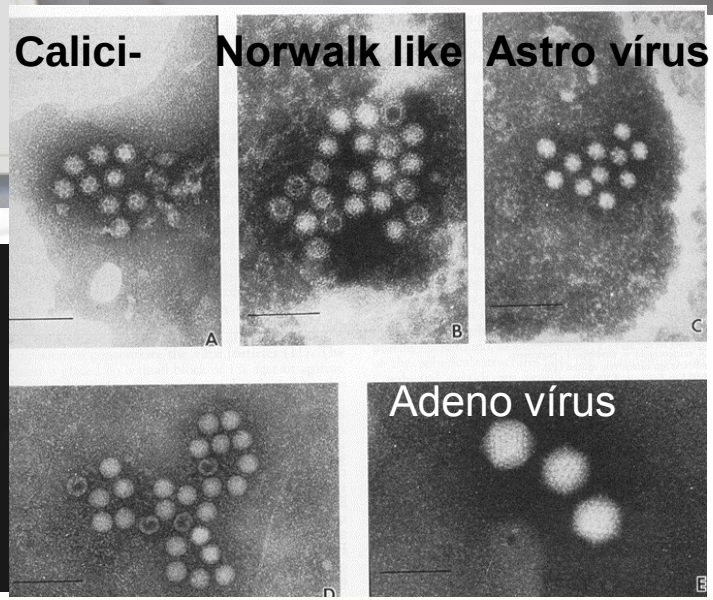
Direkt antigének, toxinok kimutatása

Vírusok kimutatása

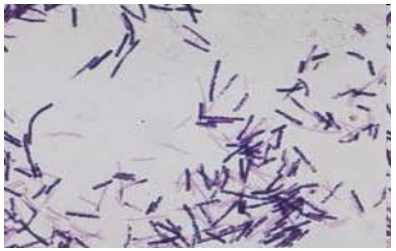








Clostridium difficile



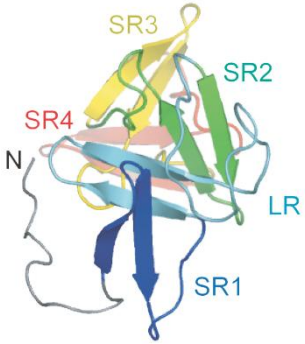
1935 - Hall és O'Tool *„Bacillus difficilis"* újszülöttek normál bélflórájában irta le

tenyésztés 1977-től

Bacillaceae család
anaerob, Gram pozitív, mozgó, spórás pálca

Pathogenitás:

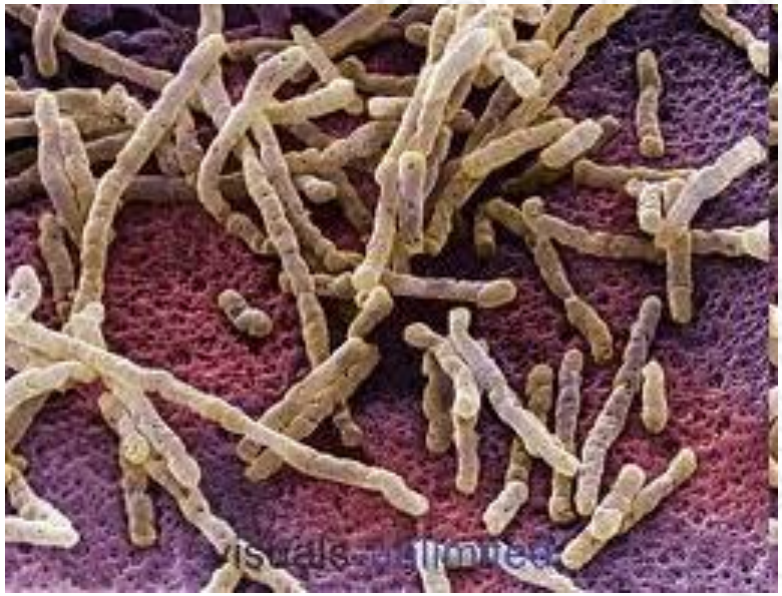
Enterotoxin	A toxin – *tcdA* gén kódolja
Cytotoxin	B toxin – *tcdB* gén kódolja
„binary" toxin	glycosyltransferazok – (szinergén hatás feltételezett)



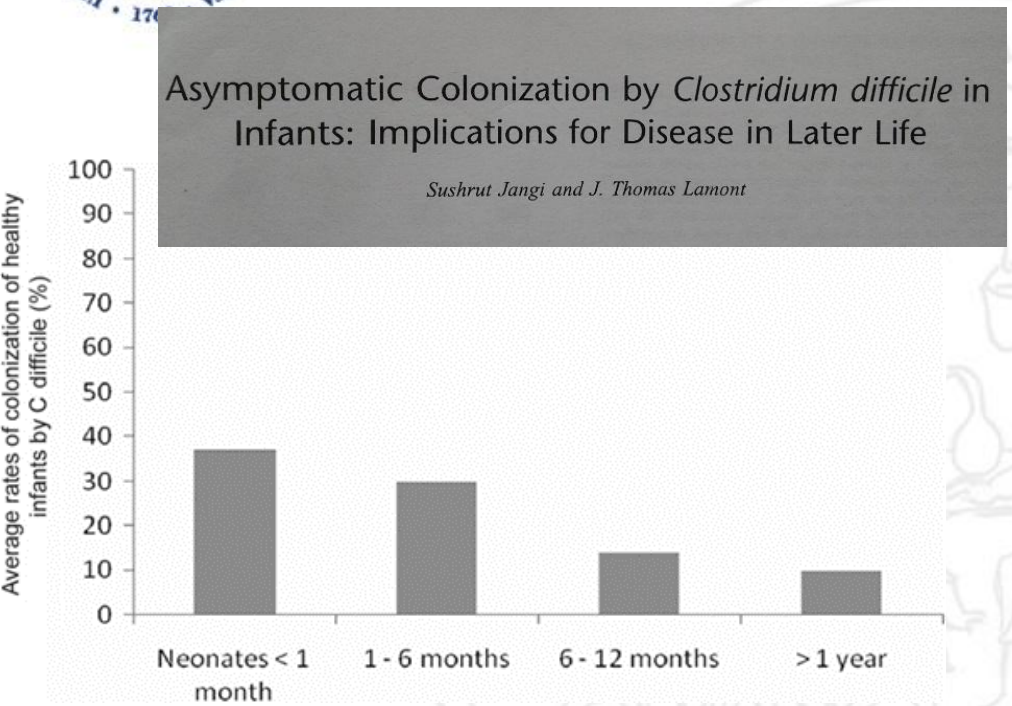
2000-es év elejétől hipervirulens PCR O27 és O78 ribitípus
(toxin A/B expressziójának negatív szabályozása csökkent / hiányzik)
2003 óta nehezen megfékezhető CDI járványokat okoz

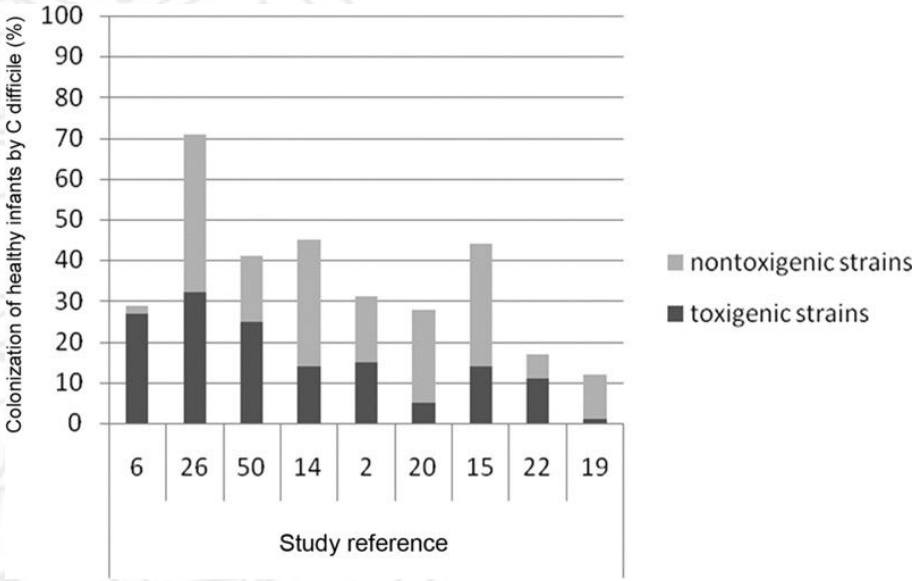
Hyperviruleens O27 típus megjelenése

Elkülönitésére a hagyományos tesztek nem alkalmasak



C. difficile kolonizáció újszülötteknél, csecsemőknél





Újszülött, csecsemő *C. difficile* hordozás magas
3 éves korra a felnőttekhez hasonlóan 3% hordozó

Két éves kor alatt megbetegedés nagyon ritka – oka nem ismert, valószínű a toxin receptor hiány

S. Jangi .Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants:implications for disease in later life
JPGN Volume 51, No1, JULY 2010

C. difficile vizsgálat indikációi

- A vizsgálatot csak hasmenéses tüneteket mutató gyerekeknél végezzük **híg széklet mintából** (>3 széklet/24 óra), feltételezhető a CDI

A magas kolonizáció miatt életkor szerint a vizsgálat javaslata:

- 1éves kor alatt- a vizsgálat nem ajánlott.
- 1-3 éves kor - ha más infekciós eredetet, mint vírus, kizártunk. Pozitív vizsgálati eredmény esetén egyéb okokat is kell vizsgálni.
- >3 éves kor – a pozitív eredmény feltételezhető a CDI

Diagnosztikai módszerek

Hagyományos tenyésztéses eljárás, majd toxin kimutatás – időigényes

Cytotoxicitás vizsgálata – speciális módszer, idő igényes, nem a rutin diagnosztika része

ELISA

immunkromatográfia

Glutamát dehidrogezáz (GDH) kimutatás + toxin

GDH pozitív toxin negatív esetben:

tenyésztés, majd a tenyésztett mintából toxin kimutatás (nukleinsav amplifikáció)

A minták 8-10 % GDH pozitív toxin negatív

Molekuláris módszerek- toxin gének kimutatása

Molekuláris módszerek

A hasmenéses megbetegedés etiológiai igazolásához sokszor a hagyományos tesztek kombinációjára van szükség .
– ezt váltják fel a multiplex molekuláris panelek

Gastrointestinalis pathogenek kimutathatósága különböző multiplex assay-vel

Target[a]	Multiplex panel[b] Verigene EP	FilmArray GI	xTAG GPP -Luminex
Aeromonas		IUO[c]	
Campylobacter	✓	✓	✓
Clostridium difficile (toxin A/B)		✓	✓
Plesiomonas shigelloides		✓	
Salmonella	✓	✓	✓
Yersinia enterocolitica	✓	✓	RUO[d]
Vibrio spp.	✓	✓	✓
EAEC		✓	
EPEC		✓	
ETEC		✓	✓
STEC (stx_1 and stx_2)	✓[e]	✓	✓
E. coli 0157		✓	✓
EIEC[f]/Shigella	✓	✓	✓
Cryptosporidium		✓	✓
Cyclospora cayetanensis		✓	
Entamoeba histolytica		✓	✓
Giardia lamblia		✓	✓
Adenovirus 40/41		✓	✓
Norovirus GI/GII	✓	✓	✓
Rotavirus A	✓	✓	✓
Sapovirus		✓	
Astrovirus		✓	

JCM 2015 Vol 53, No. 12

Baktériumok

Aeromonas
Campylobacter
Clostridium difficile (toxin A/B)
(enterotoxin és cytotoxin gén, *tcd*A, *tcd*B)
Plesiomonas shigelloides

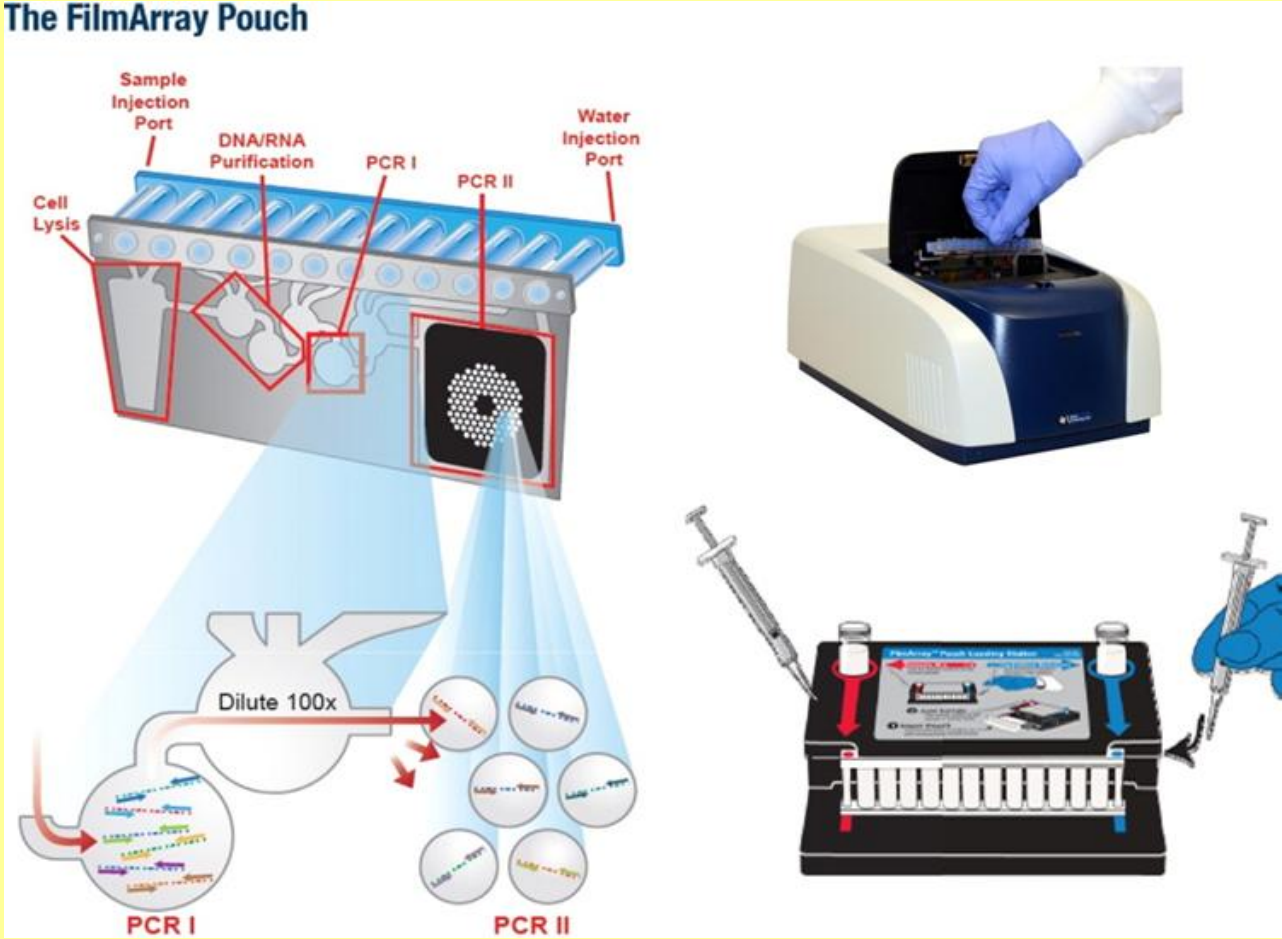
Salmonella
Yersinia enterocolitica
Vibrio spp.
EAEC (pAA virulencia plazmid)
EPEC (intimin gén:*eae*)
ETEC (heat-labile *lt*, heat-stabile *st* enterotoxin
STEC (stx_1 and stx_2)
E.coli O157
EIEC/*Shigella* (invázio plazmid antigén H gén *ipah)*

Vírusok

Adenovirus 40/41
Norovirus GI/GII
Rotavirus A
Sapovirus
Astrovirus

Paraziták

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia



FilmArray GI panellel detektált enteropathogének spektruma közösségben szerzett gastroenteritisben Európai multicentrikus tanulmány

Tíz európai ország, pont-prevalencia vizsgálat 4 alkalommal (jan., ápril.,júli., okt.)

Közösségben szertett hasmenés betegek

n=709 székletminta

Életkor: <5 év =108

5-59 év =388

>60 év =213

Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis

A. Spina[1], K. G. Kerr[2], M. Cormican[3], F. Barbut[4], A. Eigentler[5], L. Zerva[6], P. Tassios[6], G. A. Popescu[7], A. Rafila[7], E. Eerola[8], J. Batista[9], M. Maass[10], R. Aschbacher[11], K. E. P. Olsen[12] and F. Allerberger[1]

1) Austrian Agency for Health and Food Safety, Vienna, Austria, 2) Harrogate & District NHS Foundation Trust, Harrogate, UK, 3) National University of Ireland, Galway, Ireland, 4) Hôpital Saint-Antoine, Paris, France, 5) Labor Moest, Innsbruck, Austria, 6) Attikon University Hospital, Athens-Chaidari, Greece, 7) National Institute for Infectious Diseases and Carol Davila University, Bucharest, Romania, 8) Turku University, Turku, Finland, 9) Occidental Hospital Centre, Lisbon, Portugal, 10) Labor Dr Heidrich & Kollegen MVZ, Hamburg, Germany, 11) Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia, Bolzano, Italy and 12) Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

Kivitelezés:

-helyi laboratóriumok, hagyományos módszerrel

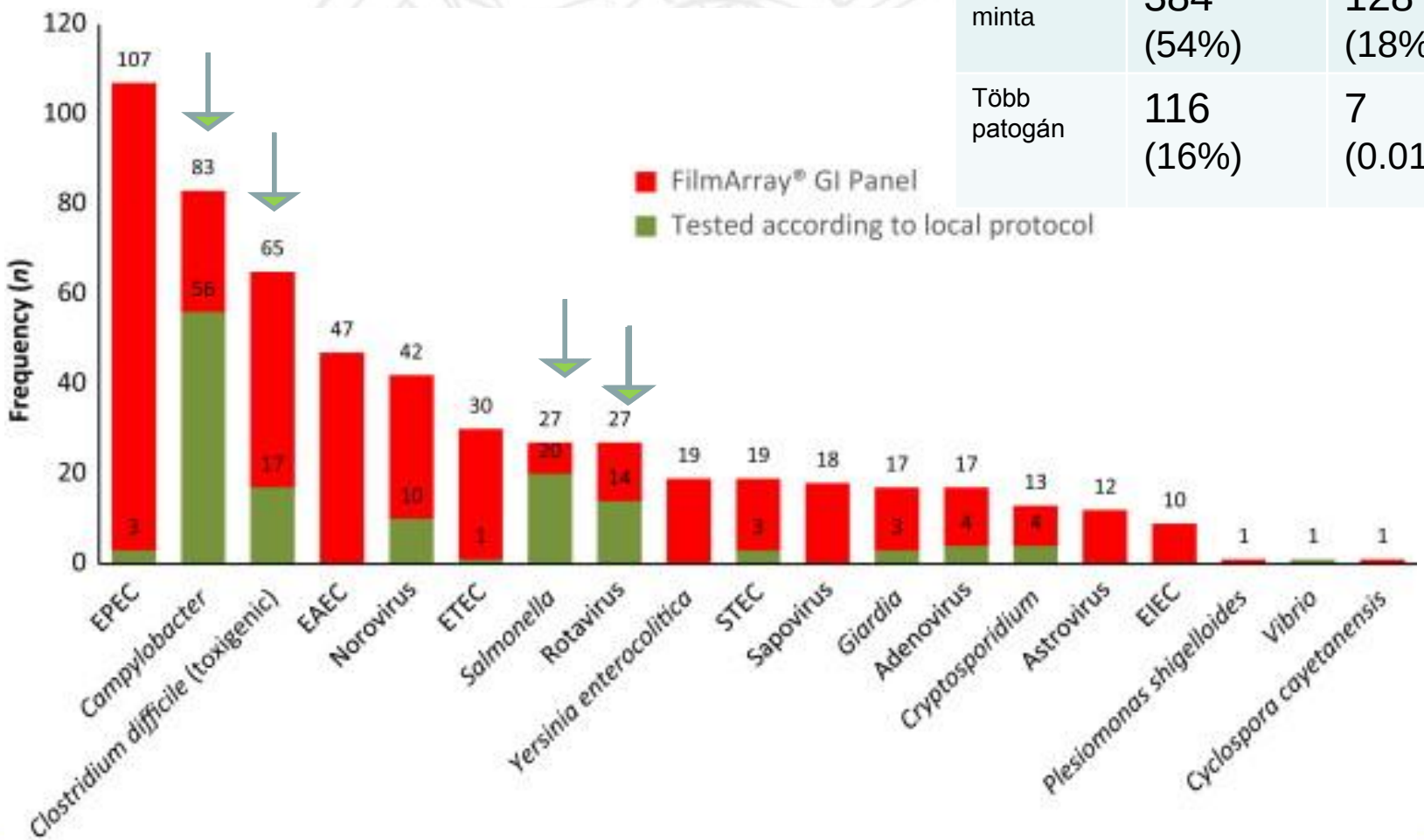
-központilag FilmArray PCR

Clin Microbiol Infect 2015;21:719-728

Hagyományos módszerrel és multiplex PCR-el detektált patogének

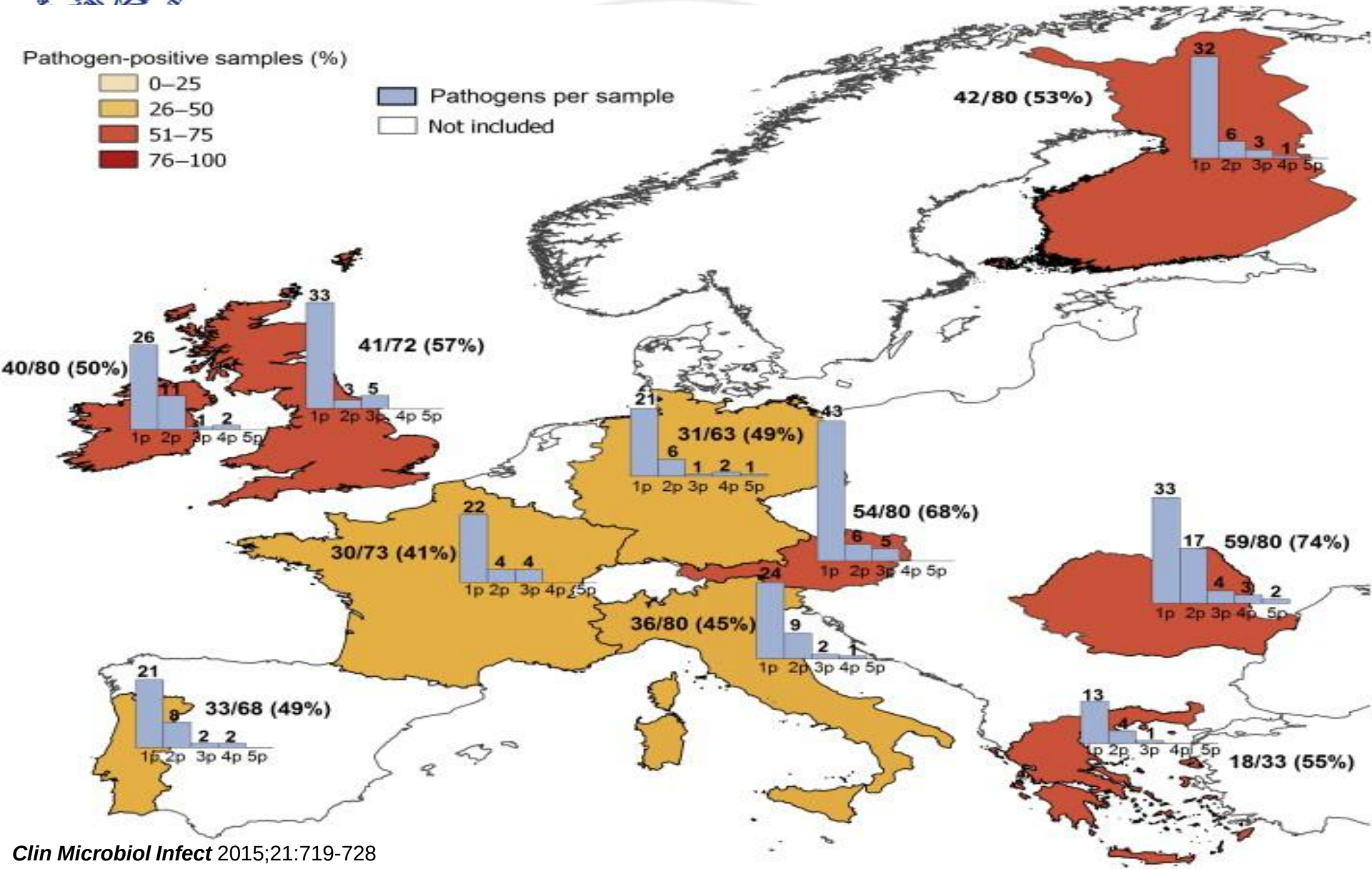
N=709	Film Array	Hagyományos
Pozitív minta	384 (54%)	128 (18%)
Több patogán	116 (16%)	7 (0.01%)

N= 709 minta



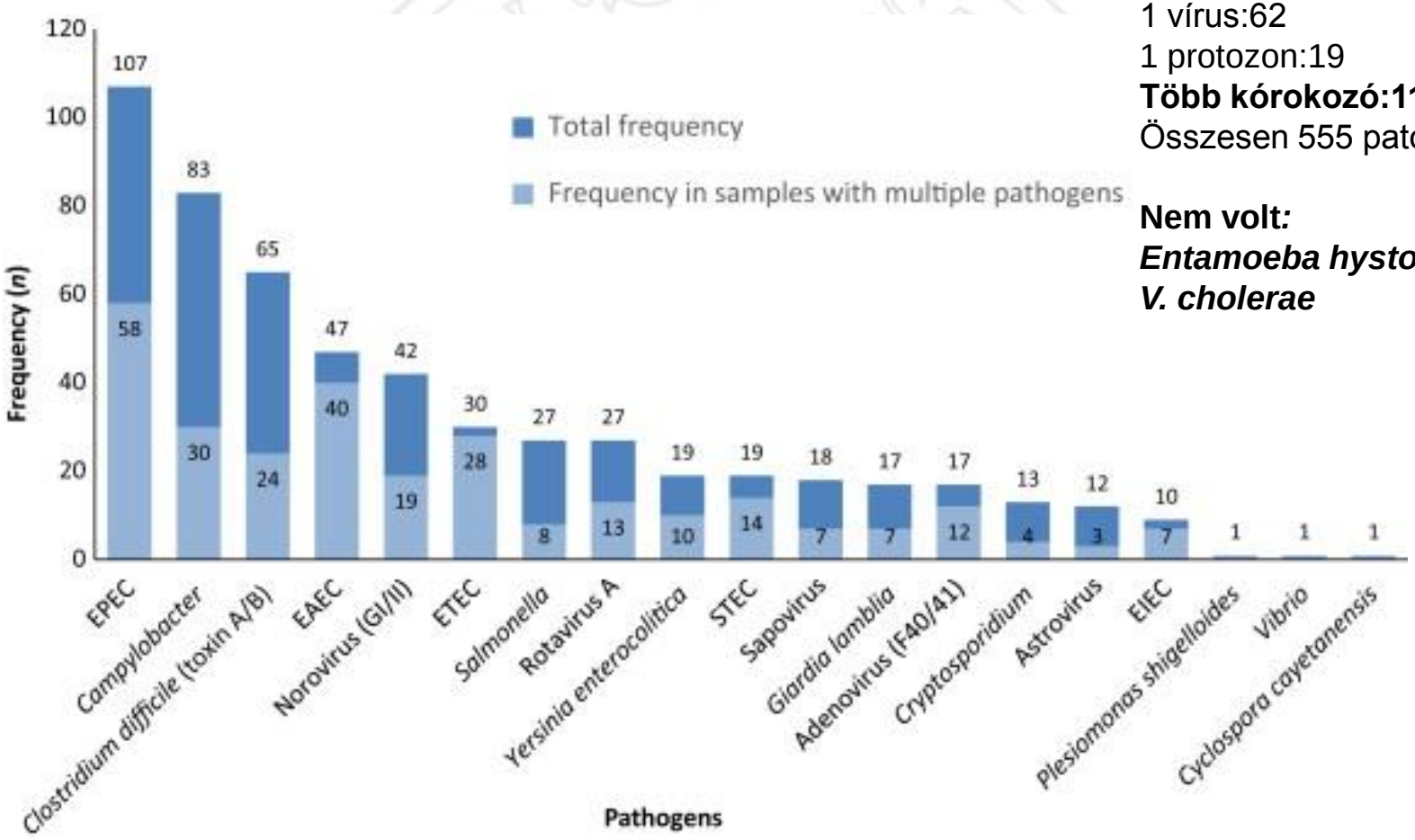
Clin Microbiol Infect 2015;21:719-728

Pozitív minták és mintánkénti patogének előfordulása a vizsgált országokban



Clin Microbiol Infect 2015;21:719-728

Pathogenek össz gyakorisága és kevert előfordulásuk FilmArray vizsgálattal

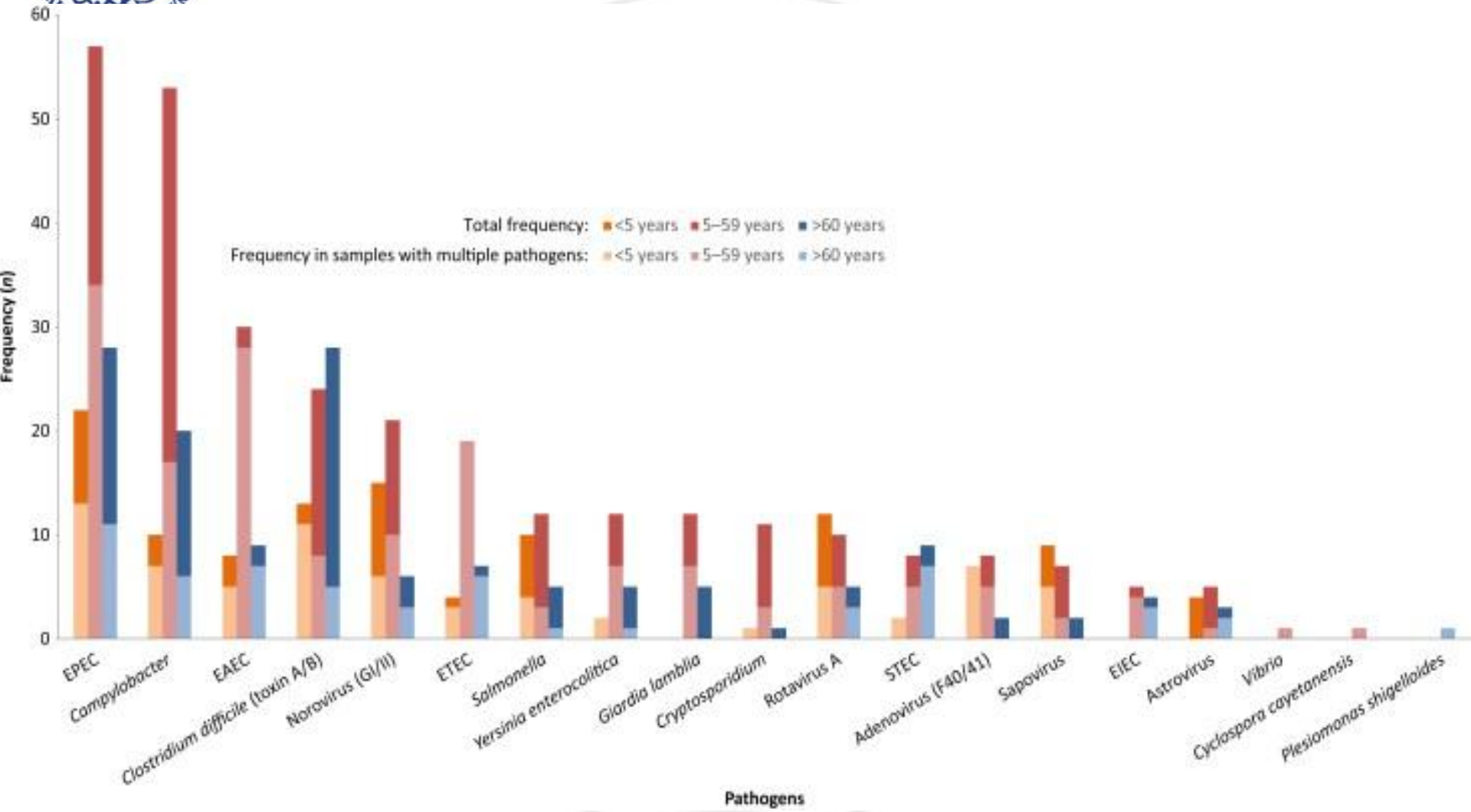


1 baktérium:187
1 vírus:62
1 protozon:19
Több kórokozó:116
Összesen 555 patogén

Nem volt*:*
Entamoeba hystolytica* és *V. cholerae

Clin Microbiol Infect 2015;21:719-728

Pathogenek eloszlása életkor szerint



Clin Microbiol Infect 2015;21:719-728

ORIGINAL ARTICLE INFECTIOUS DISEASES

How well does physician selection of microbiologic tests identify *Clostridium difficile* and other pathogens in paediatric diarrhoea? Insights using multiplex PCR-based detection

C. Stockmann[1], M. Rogatcheva[2], B. Harrel[2], M. Vaughn[2], R. Crisp[2], M. Poritz[2], S. Thatcher[2], E. K. Korgenski[3], T. Barney[3], J. Daly[3,4] and A. T. Pavia[1]

1) *Department of Pediatrics, University of Utah Health Sciences Center,* 2) *BioFire Diagnostics Inc.,* 3) *Primary Children's Hospital, Intermountain Healthcare and* 4) *Department of Pathology, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT, USA*

Acut gastroenteritises betegek (hasmenés, hányás, hasi fájdalom, láz tüneteivel)

Életkor:1-25 éves kor

378 minta vizsgálata

Minta beválasztás: hányféle standard laboratóriumi vizsgálatot/tesztet rendelt az orvos

125 - betegnél egy teszt

118 - betegnél 2 teszt

135 - betegnél 3 vagy több teszt

Clinical Microbiology and infection 2015;21:179.e9-179.e15

A klinikusok által kért vizsgálatok és az alkalmazott standard laboratóriumi módszerek

- Rutin széklettenyésztés: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp.,*E.coli* O157:H7 és O121, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*

  STEC-immunassay -Shiga toxin kimutatására
- *C. difficile* – PCR,
- *Giardia* és *Cryptosporidium* –antigén kimutatás -immunoassay módszerrel
- Rota és Adenovírus F 40/41- antigén - immunoassay
- Noro- Astro- és Sapovirus kimutatást nem kértek

Eredmények:

Hagyományos módszer:

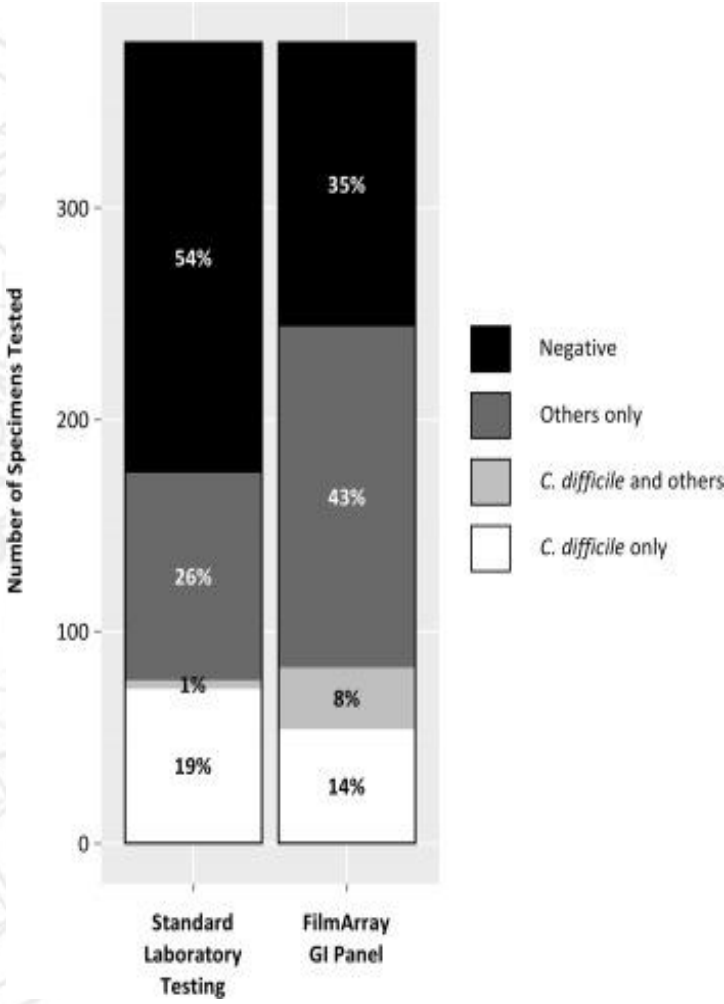
46% -ban találtak gastrointestinális pathogént

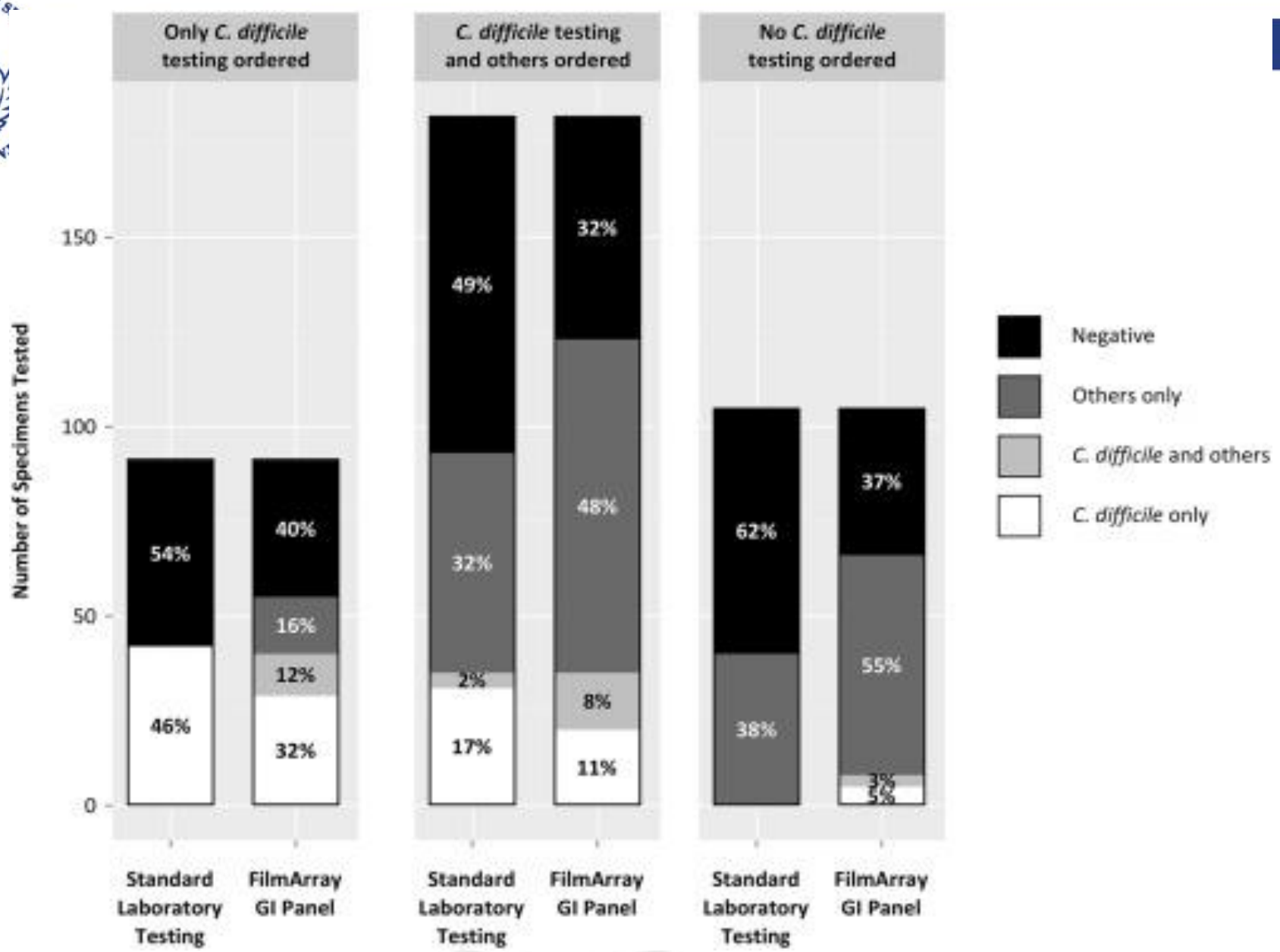
Több pathogén:**1.6 %**-ban

Film-Array multiplex PCR:

65%-ban találtak gastrointestinalis pathogént

Több pathogént **20%-**ban





Clinical Microbiology and infection 2015;21:179.e9-179.e15

Multiplex panel eredményeinek interpretálási buktatói
Jobb-e a több?

Mikrobiális DNS, RSN-t mutatunk ki- a vizsgálat **nem tesz különbséget élő**- infekcióért felelőssé tehető és **élettelen** kórokozók között

Gyógyult, tünetmentes gyermekenél hosszú ideig kimutatható volt a noro-, rota-, adeno-, astrovírus és Salmonella

C. difficile sokkal gyakrabban volt kimutatható.- a tesztleírás hangsúlyozza, hogy csak tünetekkel rendelkező betegeknél, **híg székletből** értékelhető az eredmény. Transzport közegben érkezett széklet állapota a laboratóriumban már nem ítélhető meg, csak híg székletmintából releváns a vizsgálat, formált székletminta a vizsgálat elvégzése kontraindikált mert ilyen esetben a kolonizációt is diagnosztizálja a laboratórium- fölösleges ab. adást indukál.

Multiplex panellel a pozitív minták száma 2-4x-re emelkedik, **nem várt pathogén**, minta EAEC, EPEC- 10-14% nő. Multiplex patogének száma nő- **Nehéz az eredmény interpretálása.**

Alkalmazásukkal nő a pozitivitás, a kevert fertőzés- de gyors és érzékeny – ugyanakkor továbbra is fontos a hagyományos tenyésztés és érzékenységi vizsgálat és járványügyi/epidemiológiai szempontok miatt.

Összefoglaló megállapítások

- Klinikus –laboros kommunikáció elengedhetetlen, hogy betegre szabott laborvizsgálatok történjenek
- A laborosnak tájékoztatni kell a klinikust az elérhető vizsgálatokról, módszerekről, érzékenységről, specificitásról.
- A megismert gastroenteritist okozó baktérium száma emelkedik.
- A diagnosztikában a hagyományos tenyésztéses módszert a gyors, nem tenyésztéses eljárás váltja fel- előny- hátrány
- A laboratóriumi diagnózis költséges – törekedni kell a célzott vizsgálat kérésre