ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДА ELISA ПРИ МИКРОБИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПСЕВДОМЕМБРАНОЗЕН КОЛИТ

Салиха Гюнай, Пенка Аргилашка, Мария Сайкова
Медицински университет - Пловдив, Медицински колеж
Специалност „Медицински лаборант

Резюме: Псевдомембранозният колит представлява инфекция на дебелото черво, причинена от бактерията Clostridium difficile, която обикновено се свързва с прилагането на антибиотици.

Цел: Доказване значимостта на прилагане на метода ELISA при изследване на фекални проби, взети от пациенти със съмнения за инфекция, причинена от C. difficile.

Задачи:

1. Стриктно прилагане на правилата при използване на теста CoproELISA C. difficile. tox. A/B.
2. Отчитане броя на положителните резултати.

Ключовите фактори за вирулентността на C. difficile са токсин A и B. Тези токсини демонстрират висока последователност и функционална хомология.

Принцип на работа на теста CoproELISA C. difficile. tox. A/B е ензимен имуноанализ за улавяне на токсин A и токсин B в човешки фекални проби. Клостридиум дифициле е бактерий, който може да се установи в дебелото черво на човека. Между 5 и 15% от възрастните хора са носители без да имат клинични симптоми. При новородените носителството може да надхвърли 80%. След 2000 г. зачестяват съобщенията за инфекции при възрастните, причинени от Clostridium difficile, които протичат с различно изразена тежест.

Броят на положителните резултати в микробиологична лаборатория УМБАЛ "Свети Георги" – гр. Пловдив за период от 05.01 - 23.03.2017 г. е 13 с различна възраст, пол и от различни клиники на УМБАЛ.

Пациентите са с диагноза токсичен псевдомембранозен колит на базата на дисбактериоза след продължителен прием на антибиотици, която се потвърждава с положителния тест за токсини за Clostridium difficile.

Ключови думи: Псевдомембранозен колит, дисбактериоза, Clostridium difficile, ELISA.

APPLICATION OF THE ELISA METHOD FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF PSEUDOMEMBRANOUS COLITIS

Saliha Gunay, Penka Argilashka, Mariya Saikova
Medical University – Plovdiv, Medical College
Speciality of Medical Laboratory Assistant

Summary: Pseudomembranous colitis is an infection of the colon caused by Clostridium difficile, which is very common in the use of antibiotics.

Objective: To demonstrate the significance of applying the ELISA method to a study of faecal samples taken from patients suspected of C. difficile infection.

Tasks:

1. Strictly apply rules when using the CoproELISAC. difficile test. tox A/B.
2. Report the number of positive results.

Key factors for the virulence of C. difficile are toxin A and B. These toxins demonstrate high sequence and functional homology.

Principle of operation of the test. CoproELISA C. difficile. tox A/B test is an immunoassay for capturing toxin A and toxin B in human faecal samples. Clostridium difficile is a bacterium that can be found in the human colon. Between 5 and 15% of the elderly are carriers without clinical symptoms. In newborns the percentage of carrier may exceed 80%. Since 2000, reports of adult infections caused by Clostridium difficile have been increasing, with varying severity.

The number of positive results in microbiological laboratory "Sveti Georgi" University Hospital - Plovdiv for the period 05.01 - 23.03.2017 is 13 different age, sex and different clinics of the University Hospital.

Patients are diagnosed with toxic pseudomembranous colitis based on dysbacteriosis after prolonged antibiotic administration, which is confirmed by the positive toxin test for Clostridium difficile.

Key words: Pseudomembranous colitis, dysbacteriosis, Clostridium difficile, ELISA.

Изложение:

Псевдомембранозният колит представлява инфекция на дебелото черво, причинена от бактерията Clostridium difficile, която обикновено се свързва с използването на антибиотици. Грам положителният анаеробен бацил Клостридиум дифициле е водещия причинител na диарията, свързана с антибиотици и псевдомембранозен колит. Този патоген може да причини остро дори летално заболяване, ако не бъде диагностициран и третиран на време. Приемът на антибиотици е главният рисков фактор за инфектирането с Клостридиум дифициле. Инфекцията се развива когато бъде нарушена нормалната стомашночревна флора вследствие на антибиотичното лечение и пациентът развие произвеждащия токсин Клостридиум дифициле, предаван обикновено по фекално-орален път. [1]

Clostridium difficile за първи път е изолиран от фецес на новородени през 1935 г. Дълго време се е считало, че е част от нормалната фекална флора, тъй като е откриван в 40-50% от децата. При възрастни е откриван рядко. От 1977 г. се открива все по-често и сега се приема за причинител на псевдомембранозния колит. Обикновено този колит се развива след перорално приемане на антибиотици, които селектират резистентни щамове C. difficile, който продуцира некротизиращ токсин. Заболяването е било с висок леталитет.

Ключовите фактори за вирулентността на C. difficile са токсин A и B. Тези токсини демонстрират висока последователност и функционална хомология. Токсин А се описва като повреждащ тъканите ентеротоксин, който привлича неутрофили и моноцити, а токсин В като потенциален цитотоксин, който разгражда клоналните епителни клетки. Повечето вирулентни щамове произвеждат и двата токсина, но щамовете, отрицателни за токсин А и положителни за токсин В също могат да бъдат причинител. Имуноензимното улавяне на токсин А и токсин В във фекални проби често се използва като спомагателно средство в диагностицирането. [3]

Заболелите от псевдомембранозен колит имат диария с воднисти и кървави фекалии, повишена температура и болки в корема. Патохистологичните промени в червата се представят като плаки и псевдомембрани, под чиято повърхност се развиват нектотични промени. [4]

Терапия - C. difficile е чувстителен на Vancomycin и метронидазол.

Вземане и изследване на фекална маса

За вземането на проба от фекалии се използва стерилен контейнер за фецес. Необходимото количество фецес е 3-5 гр колкото грахово зърно, а при течни фекални маси до 2-3 мл.

Микроскопско изследване – не се прави, тъй като C. difficile се съдържа в малко количество във фецес.

Културелни особености: Изолира се в селективни хранителни среди (среда на George). Колониите са почти плоски с матово бяла повърхност, 4-5 мм в диаметър. Стриктен анаероб. Взискателен към хранителните среди. Расте добре на кръвен агар и на цефокситин-циклозерин-захароза агар. На кръвен агар колониите са сивеещи, в R-форма. Не са хемолитични. Култивирането продължава 4 дни. [2]

Биохимична активност: Повечето щамове ферментират малтоза и захароза. Хидролизират ескулин, а някои щамове втечняват желатина.

Резистентност: Вегетативните форми на C. difficile са много чувствителни на кислород. Спорите са силно резистентни, издържат на температура до 80°C за 30 мин и не се влияят от алкохоли.

Ензимно свързан имуносорбентен анализ ELISA за откриване на причинителя

Принцип на теста - CoproELISA C. difficile: токсин A/B е ензимен имуноанализ за улавяне на токсин A и токсин B в човешки фекални проби. Гнездата на плаката, които могат да се отделят, са натоварени със специфични за C. difficile поликлонални антитела. Към натоварените с антитела гнезда се добавят конюгирани с хрянова пероксидаза (HRP) поликлонални антитоксин A и антитоксин B антитела. Фекалните проби се разреждат с разредител за пробата и се добавят в гнездата. На тази стъпка C. difficile токсините се обозначават специфично от HRP конюгираните антитела и се имобилизират от натоварените антитела. Несвързалият се конюгат се отстранява с отмиване. След добавяне на TMB субстрата се хидролизира с пероксидаза, което води до образуването на син разтвор на намаления субстрат. След добавяне на стопиращ разтвор синият цвят става жълт и се разчита с четеца Елайза с дължина на вълната 450/620 нм. Абсорбцията е пропорционална на нивото на налични токсини C. difficile в пробата. [6]

Клостридиум дифициле е бактерий, който може да се установи в дебелото черво на човека. Между 5 и 15% от възрастните хора го носят без да имат клинични симптоми. При новородените носителството може да надхвърли 80%. След 2000 г. зачестяват съобщенията за инфекции при възрастните, причинени от *Clostridium difficile*, които протичат с различно изразена тежест.

Броят на положителните резултати в микробиологична лаборатория УМБАЛ "Свети Георги"- гр. Пловдив за период от 05.01 - 23.03.2017 г. е 13, с различна възраст, пол и от различни клиники на УМБАЛ.

№	Дата	Пациент	Пол	Възраст	Клиника	Резултат
1.	05/01	ИЗ 2492	ж	58 г.	Инфекциозна клиника	Токсин А/Б положително
2.	05/01	ИЗ 75733	м	15 г.	IV-то детско отделение	Токсин А/Б положително
3.	12/01	ИЗ 75343	м	64 г.	Инфекциозна клиника	Токсин А/Б положително

4.	09/02	ИЗ 4941	м	25 г.	Кардиохирургия	Токсин А/Б положително
5.	09/02	ИЗ 8447	м	26 г.	Гастроентерология	Токсин А/Б положително
6.	16/02	ИЗ 9101	ж	73 г.	Гастроентерология	Токсин А/Б положително
7.	23/02	ИЗ 4729	м	63 г.	Фтизиотрия	Токсин А/Б положително
8.	02/03		м	69 г.	Кардиохирургия	Токсин А/Б положително
9.	09/03		ж	83 г.	Амбулаторен пациент	Токсин А/Б положително
10.	09/03	ИЗ 11825	ж	67 г.	Неврохирургия	Токсин А/Б положително
11.	16/03	ИЗ 13419	м	65 г.	Фтизиотрия	Токсин А/Б положително
12.	16/03		ж	66 г.	Амбулаторен пациент	Токсин А/Б положително
13.	23/03	ИЗ 18045	м	11г.	V$^{-то}$ детско отделение	Токсин А/Б положително

Пациентите са с диагноза токсичен псевдомембранозен колит на базата на дисбактериоза след продължителен прием на антибиотици, която се потвърждава с положителния тест за токсини за C. difficile.

Заключение: Clostridium difficile е анаероб, който при 10% от населението нормално обитава червата. Тази бактерия може да причини диария, колит или псевдомембранозен колит. Заболяването се развива при хора, които са приемали дълго време антибиотици, при имуносупресирани или тежко болни хора на легло. Клостридиум дефициле образува токсини – А и В, чрез които причинява съответната симптоматика. Съществува бърз тест, който доказва веднага наличието им във фецес и по този начин диагнозата може сигурно да бъде поставена. Ранната диагноза и подходящи промени в схемата на лечение с антибиотици са жизнено важни за инфекцията. Важна роля за изследването са правилно взетия материал, стриктното спазване на правилата за провеждане на метода и техника на лаборанта.

Библиография

1. Хайдушка И., М. Атанасова, В. Кирина, Медицинска микробиология, Лакс Бук 2016 г.
2. Митов Г., Ръководство за практически упражнения по микробиология. Медицина и физкултура, София 1990 г.
3. Лаборатория Здраве - Clostridium Difficile: http://ruse.cibalab.com/?page_id=1865
4. Гастроентерология - clostridium difficile диария: http://medicine-bg.net/the-ancient-art-of-the-treatment/dr-kehayov/2984-clostridium-difficile-diarija
5. CoproELISA™ C. difficile Toxin A/B http://www.savyondiagnostics.com/?CategoryID=178&ArticleID=264