

HASTANEDE YATARKEN GELİŞEN İSHAL OLGULARINDA CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOKSİN A+B ARAŞTIRILMASI

Gökhan AYGÜN, Mustafa ASLAN, Hatice YAŞAR, Kemal ALTAŞ

ÖZET

Clostridium difficile hastanede edinilen ishal olgularında en önemli nedendir. Bu etkeni ortaya koyabilmek amacıyla pek çok tanı yöntemi tanımlanmıştır ve laboratuvarlarda en sık ELISA yöntemiyle toksin varlığı araştırılması önerilmektedir. ELISA yöntemi kullanılarak hastanede yatarken ishal gelişen 125 hastaya ait dışkı örnekleri değerlendirilmiş ve bu örneklerde *C.difficile* toksin A+B varlığı % 3.2 olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Clostridium difficile, toksin A+B, ELISA, nosokomiyal ishal

SUMMARY

Investigation of Clostridium difficile toxin A+B in patients with nosocomial diarrhea.

Clostridium difficile is the most frequent cause in nosocomial diarrhea. Various methods to detect this isolate have been defined and the detection of toxin A+B using ELISA is a frequently used method. In this study we investigated the presence of *Clostridium difficile* toxin A+B in 125 stool samples of the patients diagnosed with nosocomial diarrhea. The rate of *Clostridium difficile* toxin A+B positivity was found to be 3.2%.

Key words: Clostridium difficile, toxin A+B, ELISA, nosocomial diarrhea

GİRİŞ

Clostridium difficile, antibiyotiğe bağlı ishallerde ve nosokomiyal ishallerde en sık etken olarak karşımıza çıkmaktadır (4,5,7). *C.difficile* infeksiyonu tanısında çeşitli testler yanında ELISA yöntemiyle toksinlerin araştırılması hızlı, ucuz,

pratik bir yöntemdir (2,3,5). Biz de ünitemizde hastanede yatarken gelişen ishal nedeniyle laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinde ELISA yöntemini kullanarak *C.difficile* toksin A+B sıklığını belirlemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına 2000 yılı içinde gönderilen, hastanede yatan ve ishal yakınması yatışından 3 gün ya da daha sonra başladığı belirlenen toplam 125 olgu çalışmaya dahil edilmiştir (5). Şekilli dışkı örnekleri verenler ve yeterli bilgi alınamayanlar çalışmaya dahil edilmemişlerdir. Hastaların tümünde son altı haftada antibiyotik kullanımı ve/veya sitotoksik ilaç kullanımı öyküsü belirlenmiştir.

Laboratuvara ulaşan dışkı örnekleri makroskopik ve mikroskopik yönden incelenerek -20°C'de çalışılana kadar bekletilmişler ve en geç bir hafta içinde ELISA yöntemiyle [Ridascreen *C.difficile* toksin A+B (Rbiopharm, Germany)] *C.difficile* toksin A+B varlığı yönünden araştırılmışlardır. Olgulardan 52 tanesine diğer bakteriyel etkenler yönünden dışkı kültürü yapılmıştır (13).

BULGULAR

Hastalara ait bilgiler tabloda gösterilmiştir. Olguların dördünde (% 3.2) *C.difficile* toksin A+B pozitif bulunmuştur. Mikroskopik incelemede 42 olguda (% 33.6) lökosit varlığı saptanmıştır. Direkt tuzlu su ve lugol ile hazırlanan preparatlarda parazit tetkiki yapılmış ve anlamlı sayıda *Blastocystis hominis* belirlenen üç olgu saptanmıştır. Olguların 32'sinde

(% 25.6) yoğun maya hücresi ve/veya psödohipler belirlenmiştir. Bu olgular bildirilmiş fakat etken olup olmadıkları yönünde yorum yapılamamıştır. Dışkı kültürü yapılan 52 olgudan hiç birinde *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas* ya da *Plesiomonas* belirlenmemiştir.

Tablo. Çalışmaya alınan hastaların kimlik ve dışkı inceleme sonuçları.

Özellikler	
Ortanca yaş	38 (2-76)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	(61/64)
Makroskopik inceleme	
Yumuşak	54
Sulu	41
Mukuslu ve/veya kanlı	30
Geldiği klinik / Toksin A+B (+)	
Gastroenteroloji	20/1
Hematoloji	18/0
Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları	12/0
Yoğun Bakım Ünitesi	17/1
Cerrahi	15 /1
Diğer Servisler	43/1
Toplam	125/4 (% 3.2)

TARTIŞMA

Clostridium difficile asemptomatik taşıyıcılıktan toksik megakolona kadar uzanabilen çok geniş bir klinik görünüm oluşturabilir (4,5,8,16). *C.difficile* nozokomiyal ishal (Nİ) ve antibiyotikle ilişkili ishal olgularında en önemli etkindir ve bu olgularda yapılacak ilk test bu etkene yönelik araştırma olmalıdır (5-7). *Clostridium difficile*'ye bağlı Nİ gelişimi için belirlenen başlıca risk faktörleri antibiyotik kullanımı, kanser kemoterapisi, gastrointestinal manipülasyon ve gastrointestinal hastalık öyküsüdür (4,16,18). Fakat bu infeksiyonun yayılımından ve sıklığından başlıca antibiyotik kullanımı ve çevresel kontaminasyonun sorumlu olduğu unutulmamalıdır (16).

Bu olgularda diğer etkenlere yönelik kültür ve dışkıda parazit tetkiki incelemelerinin faydasız olduğu düşünülmektedir (15,19). *C.difficile* ile oluşan Nİ oranı 1000 hasta çıkışı başına 1-30 olarak belirlenmiştir (17). Balaban ve ark. (1) ELISA ve diğer metodları kullanarak *C.difficile* infeksiyonu araştırmışlar ve sonuçta antibiyotiğe bağlı diyare düşünülen olgularda % 9 oranında pozitiflik bularak bu konuya dikkat çekmişlerdir. Merkezimizde daha önceki yıllarda ELISA yöntemiyle yapılan bir çalışmada antimikrobik madde kullananlarda % 34, Onkoloji ve Hematoloji servislerinde tedavi görürken ishal gelişen olgularda % 25.8 ve antimikrobik madde kullanmayan kontrol grubunda % 4.3 oranında toksin-A pozitifliği saptanmıştır (14). Bu çalışmada belirlenen düşük değerler kullanılan kitlerin farklılığından ve artık *C.difficile* infeksiyonunun daha erken tanınıp ampirik tedavi edilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Tamı amacıyla kullanılan ELISA yönteminin duyarlılığının % 70-95 arasında değişen oranlarda ve özgülüğünün daha yüksek olduğu bildirilmiştir (4,5,10). Hafif ve erken olgularda toksin saptanmayabilir (4). Klinikte kullanılacak sigmoidoskopi ve biopsi dışında laboratuvar testleri arasında

altın standart test sitotoksinin hücre kültürlerinde gösterilmesidir ve ELISA dışında, lateks aglütinasyon, moleküler teknikler, kromatografik teknikler, kültür yöntemleri de geliştirilmiştir (3,4,6,10). Günümüzde ELISA yöntemi kısıtlı imkanları olan, hücre kültürü yapamayan laboratuvarlar için uygun bir alternatif olarak ele alınabilir (2,3,5,20,21). ELISA yönteminin duyarlılığının kısıtlı olması nedeniyle tek tanı metodu olarak kullanılmasını önermeyenler de bulunmaktadır (2,21). Vanpoucke ve ark. (21) ticari ELISA kitlerini, kültür, kromatografik yöntemlerle karşılaştırmışlar; bizim de çalışmamızda kullandığımız kitin duyarlılığını % 66 ve özgülüğünü % 97 bulmuşlardır. Bu çalışmada ayrıca kromatografik yöntemlerin ELISA yöntemine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiş, klinik ile birlikte yorumun ve farklı metodlarla çalışılmasının gerekliliği vurgulanmıştır.

Laboratuvar tanısında örneğin alınıp laboratuvara ulaştırılması sonrasında ilk 24 saatte +4°C'de, daha uzun kalacaksa -20°C'de saklanması önerilmektedir (3,6,9,12). Fakat örneğin alınmasından laboratuvara ulaşana kadar geçebilecek en fazla süre konusunda farklı bilgiler vardır (9,12). Bu sürenin 1 saati aşmamasını önerenler (12), 2 saat oda ısısında bekleyebileceğini söyleyenler (9) de bulunmaktadır. Bazı ticari kitler ise örneklerin +4 °C'de transportunu önermektedirler. Dışkıda bulunan proteazların toksini parçalayarak miktarını azaltabileceği düşünülmektedir (11). Kullanılan kit içeriğinde örneklerin soğukta transportu önerilmemişse de transport sırasında geçecek sürenin bir sorun yaratmış olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak Nİ olgularında *C.difficile* tanısında daha farklı yöntemleri de kullanarak yeni yaklaşım modelleri oluşturmak, diğer etkenlerin bu olgulardaki rolünü belirlemek, ampirik metronidazol kullanımından kaçınmak uygun bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Glivener E: Clostridium difficile'ye bağlı enfeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması, *Mikrobiyol Bült* 35:211(2001).
- 2- Barbut F, Kajzer C, Planas N, Petit JC: Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay and toxigenic culture for diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhea, *J Clin Microbiol* 31:963 (1993).
- 3- Doğancı L: Antibiyotiğe bağlı diyare ve psödomembranöz kolit, "H Eraksoy, OŞ Yenen (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji 2000*", s. 183, Klimik Derneęi yayını No: 19, İstanbul (2000).
- 4- Fekety R: Antibiotic-associated colitis, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*", 4th ed, p. 978, Churchill-Livingstone Inc, New York (1995).
- 5- Fekety R: Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis, *Am J Gastroenterol* 92:739 (1997).
- 6- Gerding DN, Brazier JS: Optimal methods for identifying Clostridium difficile infections, *Clin Infect Dis* 16 (Suppl 4): 439 (1993).
- 7- Guerrant RL, van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennis ML, Pickering LK: Practice guidelines for the management of infectious diarrhea, *Clin Infect Dis* 32:331 (2001).
- 8- Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: Clostridium difficile colitis, *N Engl J Med* 330:257 (1994).
- 9- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4th ed., p. 596, JB Lippincott Company, Philadelphia (1992).
- 10- Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Bartlett JG: Clostridium difficile colitis: an efficient clinical approach to diagnosis, *Ann Intern Med* 123:835 (1995).
- 11- Merz CS, Kramer C, Forman M, Gluck L, Mills K, Senft K, Steiman J, Wallace N, Charache P: Comparison of four commercially available rapid enzymeimmunoassays with cytotoxin assay for detection of Clostridium difficile toxin(s) from stool specimens, *J Clin Microbiol* 32:1142 (1994).
- 12- Miller JM, Holmes HT: Specimen collection, transport, and storage, "PR Murray,EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover (eds): *Manual of Clinical Microbiology*" 6th ed., p. 19, ASM Press, Washington D.C. (1995).
- 13- Öztürk R: İshal tanımı, "R Öztürk (ed): *İshal*" s. 70, İstanbul Bulağıcı Hastalıklarla Savaş Derneęi Yayınları No:13, İstanbul (1998).
- 14- Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Eroęlu C, Aygün G, Okyay K: İshalli olgularda ELİSA yöntemiyle Clostridium difficile toksin A aranması. 5. *Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre kitabı s. 101, İstanbul (1995).
- 15- Rao GG, Ozerek AE, Jeanes A: Rational protocols for testing faeces in the investigation of sporadic hospital-acquired diarrhoea, *J Hosp Infect* 47:79 (2001).
- 16- Riley TV: Clostridium difficile: a pathogen of the nineties, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:137 (1998).
- 17- Samore MH, DeGirolami PC, Tluccko A, Lichtenberg DA, Melvin ZA, Karchmer AW: Clostridium difficile colonization and diarrhoea at a tertiary care hospital, *Clin Infect Dis* 18:181 (1994).
- 18- Schwaber MJ, Simhon A, Block C, Roval V, Ferderber N, Shapiro M: Factors associated with nosocomial diarrhea and Clostridium difficile-associated disease on the adult wards of urban tertiary care hospital, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:9 (2000).
- 19- Seigal DL, Edelstein PH, Nachamkin I: Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital, *JAMA* 263:979 (1990).
- 20- Staneck JL, Weckbach LS, Allen SD, Siders JA, Gilligan PH, Coppitt G, Kraft JA, Willis DH: Multicenter evaluation of four methods for Clostridium difficile detection: Immunocard C. difficile, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination, *J Clin Microbiol* 34:2718 (1996).
- 21- Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechutte M, Verschraegen G: Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/or antigen in stool specimens, *Clin Microbiol Infect* 7:55 (2001).