

Clostridium difficile İnfeksiyonu Ön Tanılı Hastaların Dışkı Örneklerinde Toksin A ve B'nin Belirlenme Sıklığı

Özden BÜYÜKBABA BORAL(*)

ÖZET

Clostridium difficile hastanede yatan hastalarda diyareye neden olan en önemli nozokomiyal patojen bakteridir. Son yıllarda geliştirilen duyarlı tanı yöntemleri, etkin antibiyotik tedavisi ve hastane infeksiyonları kontrol önlemlerine rağmen, *C.difficile*'nin neden olduğu diyare ve kolit önemli bir problem olmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda *C.difficile* infeksiyonu ön tanısı ile 1998-2000 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen 360 hastanın dışkı örneğinde "ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic)" kit ile, 2000-2002 yılları arasında gönderilen 400 dışkı örneğinde ise, "Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic)" kit kullanılarak toksin varlığı araştırılmıştır.

İlk çalışma döneminde toksin A varlığı hastaların %4.7'sinde, ikinci çalışma döneminde ise toksin A/B varlığı hastaların %12'sinde saptanmıştır. İki ayrı çalışma döneminde elde edilen pozitif sonuçlar karşılaştırıldığında, son iki yılda istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artma olduğu ($\chi^2=11.98$ $p<0.001$) gözlenmiştir. Sonuçlarımız, *C.difficile*'nin toxA- toxB+ suşlarının varlığı göz önüne alınarak, *C.difficile* infeksiyonlarının tanısında her iki toksini birlikte saptamaya yönelik kitlerin kullanılmasının uygun olacağını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *C.difficile* infeksiyonları, toksin A/B, ELISA

GİRİŞ

Clostridium difficile, insanların %2-10'unun normal gastrointestinal florasında yer alan bir bakteridir. *C.difficile*'nin önemli bir özelliği, bir çok antibiyotiğe nisbi dirençli olmasıdır. Bu nedenle, antibiyotik kullanımı sırasında veya kullanımını izleyen dönemde hızla çoğalarak toksin üretebilirler. Üretilen toksin enterokolit gelişimine yol açar. Daha sonraki dönemde ise inflamatuvar hücre ve fibrin birikimi, mukozaya nekrozu ve pseudomembran oluşumuna neden

(*) İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

SUMMARY

Frequency of the Toxin A and B in Stool Samples of Patients with Suspected *Clostridium difficile* Infection

C.difficile is the most important nosocomial pathogen causing diarrhea in hospitalized patients. Despite the sensitive diagnostic methods developed in the recent years, effective antimicrobial treatment and hospital infection control measures, diarrhea and colitis caused by *C.difficile* continues to be an important problem.

In this study stool samples of 360 patients sent to our laboratory between the years 1998-2000 with the suspicion of *C.difficile* infection were investigated by using "ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic)" kit and 400 stool samples sent between the years 2000-2002 were investigated by using "Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic)" kit for the presence of toxins.

In the first part of the study, the presence of toxin A was observed in 4.7% of the patients, and in the second part of the study the presence of toxins A/B was observed in 12% of the patients. When the positive results obtained in the two parts of the study are compared, statistically important increase was observed ($\chi^2=11.98$ $p<0.001$) in the last two years.

Our results show that considering the presence of *C.difficile* toxA- toxB+ strains it is appropriate to use kits that detect both toxins together for the diagnosis of *C.difficile* infections.

Key words: *C.difficile* infections, toxins A/B, ELISA

olur ve sonuçta pseudomembranöz kolit gelişebilir (1,2).

C.difficile suşlarında toksin üretimi, kromozomal bir gen olan "tox" geninin kontrolündedir ve bu gen tüm suşlarda bulunmaz. Toksin A (308 kDa) ve toksin B (270 kDa) olmak üzere iki farklı toksin üretebilirler. Toksin A bir enterotoksin, toksin B ise bir sitotoksindir. Her iki toksininde barsak mukozasında harabiyete neden olan sitotoksik enzimler olduğu ve mukozal hücreleri harabiyetinde sinerjistik etkileri olduğu kanıtlanmıştır (3,4). Bu patogenezin gerçekleşebilmesi için bakterinin barsak epitel hücrelerine önceden ko-

lonize olması gerekir. *C.difficile*'nin adezyonu ve kolonizasyonunda rol oynayan çeşitli virulans faktörleri belirlenmiştir. Bunlar kapsül, hiyaluronidaz, kollagenaz gibi proteolitik enzimler ve mukoza hücre birlikteliğinde rol oynayan adhezinlerdir (5,9). Kolonizasyondan sonra uygun koşullar olduğunda hızla çoğalan *C.difficile*'nin toksijenik suşları toksin üretir. Toksin A enterosit mikrovilluslarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanır. Polonükleer hücrelerin ve makrofajların göçünü uyarak yoğun inflamatuvar reaksiyona neden olur. Kuvvetli bir sitotoksine sahip olan toksin B ise inflamasyona uğrayan dokulara penetre olarak mukozada ciddi lezyonların gelişimine yol açar (2,3,10).

C.difficile'nin patojenitesini etkileyen önemli bir faktör de konak direncidir. Yenidoğanların dışkıсында toksin A/B miktarı çok yüksek düzeydedir. Ancak yenidoğanlarda infeksiyon görülmez. Çünkü toksin A'nın bağlandığı epitel hücre reseptörü ileri yaşlarda (yaşla orantılı olarak) üretilir. Bununla birlikte, asemptomatik erişkinlerdeki konak direncinin nedeni henüz bilinmemektedir. Sonuç olarak *C.difficile*'nin neden olduğu klinik tabloların ciddiyeti sadece suşa bağlı bir olay değildir (2).

C.difficile tümü antibiyotiğe bağlı olmak üzere; diyare gelişen hastaların %20-30'unda, kolit gelişen hastaların %50-75'inde ve pseudomembranöz kolit gelişen hastaların %90'dan fazlasında etken olarak bulunmaktadır (11-14).

C.difficile ilişkili diyare ve kolitin klinik tanısı için en çok kullanılan yöntem, dışkı örneklerinde toksinlerin gösterilmesidir. Sitotoksin B'nin hücre kültürlerinde belirlenmesi duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajları; pozitif sonuçların dört saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesine karşın, negatif bir sonuç verebilmek için 48 saat beklemeye gereksinim olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve pahalı olmasıdır (15,16). Toksin A ve B'nin belirlenmesi amacı ile bir çok ELISA kiti geliştirilmiştir. Bu kitlerin duyarlılıkları %63-94, özgüllükleri ise %75-100 arasında değişmektedir (3,17).

F sero grubunda yer alan *C.difficile* suşları, toksin A üretmeden, sadece toksin B üretirler, bu nedenle sadece toksin A'nın belirlenmesine yönelik hazırlanan

ELISA kitlerinin duyarlılık ve özgüllükleri daha azdır (18).

Bu çalışmada; 1998-2000 yılları arasında *C.difficile* infeksiyonu ön tanısı ile Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen 360 hastanın dışkı örneklerinde ImmunoCard toksin A kiti kullanılarak alınan sonuçlar ile, 2000-2002 yılları arasında yine *C.difficile* infeksiyonu ön tanısı ile gönderilen 400 hastanın dışkı örneklerinde Premier toksin A/B kiti kullanılarak alınan sonuçlar karşılaştırılmış ve tartışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1998-2000 yılları arasında *C.difficile* diyaresi ön tanılı 360 hastanın dışkı örneği "ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic)" kit kullanılarak, kit prosedürüne uygun olarak incelenmiştir.

2000-2002 yılları arasında *C.difficile* diyaresi şüphesi ile gönderilen 400 hastaya ait dışkı örneği "Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic)" kit kullanılarak, kit kurallarına uyularak incelenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Ki-kare testi kullanılmıştır.

BULGULAR

1998-2000 yılları arasında, *C.difficile* toksin A, yönünden incelenen 360 dışkı örneğinin 17 (%4.7)'sinde toksin A saptanmıştır.

2000-2002 yılları arasında *C.difficile* toksin A/B yönünden incelenen 400 dışkı örneğinin 48 (%12)'sinde toksin A/B belirlenmiştir. İki ayrı çalışma döneminde elde edilen pozitif sonuçlar karşılaştırıldığında, son iki yılda artış olduğu gözlenmiş ve aradaki farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu ($\chi^2= 11.98$ $p<0.001$) saptanmıştır.

TARTIŞMA

Antibiyotiğe bağlı diyarelerin en önemli etkeni *C.difficile*'dir. *C.difficile*'nin bu infeksiyonlarda bulunma sıklığının, kullanılan antimikrobiyal ajanlara, hastanın toplumda veya hastanede bulunmasına, ko-nağa göre değiştiği ve %3.2-%29 arasında olduğu bildirilmektedir (19,20). Sağlıklı erişkinlerde *C.difficile* kolonizasyonu çok az görülmektedir. Ancak hastanede yatan hastalar arasında kolonizasyon oranı, 1-2 haftalık yatış süresinde %13 iken, dört haftadan fazla yatış süresinde %50'ye kadar çıkmaktadır (21).

ABD’nde önemli nozokomiyal patojenlerden olduğu kabul edilen *C.difficile*’nin her yıl yaklaşık 3 milyon olguya, hastane dışında tedavi edilen hastalar arasında ise, yılda 20.000 olguya neden olduğu tahmin edilmektedir (22).

C.difficile’nin hastanede yatan ve beta-laktam antibiyotik alan hastaların %15’inde, klindamisin kullananların %10-25’inde diyareye neden olduğu bildirilmektedir (20,23).

Yurdumuzda *C.difficile* ile ilgili çalışmalar azdır. Bu çalışmalardan birinde Öztürk ve ark. (24) antimikrobiyal madde kullanılan ve diyaresi olan 238 hastanın 81 (%34)’inde ELISA ile toksin A varlığı belirlemişlerdir. Bu yüksek orana karşılık, bu çalışmada birinci çalışma döneminde (1998-2000) 360 hastanın sadece %4.7’sinde toksin A varlığı saptanmıştır. Karaer ve ark. (25) akut diyaresi olan 457 hastanın 24 (%5.2)’ünün, kontrol grubundaki 90 sağlıklı bireyin ise 7 (%7.7)’sinin dışkı örneklerinde *C.difficile* üretilmiştir. Ancak kontrol grubuna ait suşların toksin oluşturmadığını, buna karşılık, diyareli hasta grubundan 4 (%0.8)’ünün toksin A/B ürettiğini bildirmişlerdir. Aygün ve ark. (26) hastanede yatış sırasında diyare gelişen 125 hastadan dördünün (%3.2) dışkı örneklerinde ELISA ile toksin A/B varlığı belirlemişlerdir. Balaban ve ark. (27) antibiyotiğe bağlı diyare gelişen hastaların %9’unda ELISA ve diğer tanı yöntemleri ile, *C.difficile*’nin etken olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da ikinci çalışma döneminde (2000-2002) toksin A/B varlığı çalışma sonucuna yakın bir oranda (%12) belirlenmiştir. Ancak hastanelerin antibiyotik kullanım politikaları, hastaların hastanede yatış süreleri, hastane infeksiyonu kontrol yöntemleri arasındaki farkların, infeksiyon sıklığını önemli ölçüde değiştirebileceği göz önünde tutulmalıdır.

Çalışmamızda birinci ve ikinci çalışma dönemlerinde alınan pozitif sonuçlar arasındaki fark, büyük olasılıkla 1998-2000 yılları arasında sadece toksin A’yı belirlemeye yönelik bir kitin kullanılmış olması ve bu nedenle *C.difficile* toxA- toxB+ suşlar ile gelişen infeksiyonların belirlenememiş olmasına ve muhtemelen ikinci çalışma döneminde daha yaygın antibiyotik kullanımına bağlanabilir.

C.difficile infeksiyonu tanısında kullanılabilecek bir

çok yöntem vardır. Bunlar arasında yer alan kültür yönteminin duyarlılığı %89-100, özgüllüğü %84-99’dur. Ancak üretilen suşun toksin oluşturup oluşturmadığının ek bir deneyle belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle zaman alıcı ve pahalı olduğundan rutin olarak kullanımı kısıtlıdır (28). Toksinlerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Örneğin; hücre kültürlerinde sitotoksin belirlenmesi, duyarlılığı (%67-100), özgüllüğü (%85-100) yüksek bir yöntem olmakla birlikte pahalı, standardizasyonunun tam sağlanamamış olması ve zaman alıcı (48 saat) olması nedeni ile pratikte kullanılmamaktadır (29). Lateks aglutinasyonu ile *C.difficile* glutamat dehidrogenaz antijeninin belirlenmesi hızlı ve pratik bir yöntem olmakla beraber duyarlılığı (%58-92) ve özgüllüğü (%80-96) düşüktür. Ayrıca non-toksijenik suşlarla oluşan kolonizasyonlarda da yanlış pozitif sonuçlar vermektedir (3,28). ELISA ile dışkıda toksin A/B’nin belirlenmesi en sık kullanılan rutin tanı yöntemidir. Bu amaçla bir çok ticari kit geliştirilmiştir. Bu kitlerde duyarlılığın %65-%95, özgüllüğün ise %75-%100 olduğu bildirilmektedir (17).

Çeşitli çalışmalarda, *C.difficile*’nin hem toxA- toxB+ ve hem de toxA⁺ toxB⁻ suşlarının bulunabileceği ve her ikisinin de infeksiyon oluşturabildiği bildirilmektedir (30-32). Bu nedenle sadece toksin A’nın belirlenmesine yönelik ELISA kitleri tanı duyarlılığını düşürmektedir (32).

Lozniewski ve ark. (32) *C.difficile* toksini aranması isteği ile laboratuvara gönderilen diyareli 1104 dışkı örneğinin 130 (%11.7)’unda, Premier toksin A/B ELISA kit ve toksijenik kültür yöntemleri ile pozitiflik saptamışlar ve ELISA’nın hızlı, duyarlı ve rutin tanı için uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

O’Connor ve ark. (33) dışkı örneklerinde, *C.difficile* kültürü ve Vero hücre kültürlerinde sitotoksik aktivitenin belirlenmesini altın standart olarak almışlar, dört farklı ticari tanı kitinin duyarlılık ve özgüllüğünü karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic) kit için duyarlılığın %52, özgüllüğün %100, *C.difficile* toksin A (Oxoid Ltd.) kitin duyarlılığının %49, özgüllüğünün %99, Toxin A/B-TechLab kitinin duyarlılığının %80, özgüllüğünün %99 ve Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic) kitinin duyarlılığının %82, özgüllüğünün %99 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda O'Connor ve ark.'nın denedikleri iki kit kullanılmıştır. İlk çalışma döneminde kullanılan ImmunoCard toksin A kit ile alınan pozitiflik oranlarının düşük (%4.7) olması bu kitin O'Connor ve ark.'nın da belirledikleri gibi düşük duyarlılık oranına (%52) sahip olmasından ve daha önce de bildirildiği gibi, *C.difficile* toxA- toxB+ suşlarının saptanmamasından kaynaklanabilir. Son iki yıllık çalışma döneminde kullandığımız Premier toksin A/B kitinin O'Connor ve ark. duyarlılık ve özgüllük yönünden diğer tanı kitlerine göre en üstün olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu kitle son iki yılda saptanan pozitiflik oranı %12'ye çıkmış ve iki ayrı çalışma dönemindeki farkında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0.001).

Sonuç olarak, dışkı örneklerinde ELISA ile toksin A/B'nin saptanması, *C.difficile*'nin neden olduğu infeksiyonların belirlenmesinde pratik ve duyarlı bir yöntemdir. Ancak toksijenik kültür ile birlikte uygulandığında duyarlılığın %100, özgüllüğün %99.3'e çıktığı göz önüne alınırsa, olanağı olan laboratuvarların bu iki yöntemi birlikte uygulaması tanı duyarlılığını arttıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA: *Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology*, 22nd ed. p187, 267, McGraw-Hill Co., London (2001).
2. Johnson S, Gerding DN: *Clostridium difficile*. "Mayhall CG (ed). *Hospital Epidemiology and Infection Control*", 2nd ed. p467, Lippincott Williams and Wilkins, New York (1999).
3. Donald EF: *Clostridium difficile* infection. "Moellering RC (ed). *Emerging Pathogens: Implications for the Future*", p51, Pharma Libri, Montreal (2000).
4. Boriello SP, Davies MA, Kamiya S, Reed PJ, Seddon S: Virulence factors of *Clostridium difficile*, *Rev Infect Dis* 12(Suppl 1.2):185 (1990).
5. Boriello SP, Welch AR, Barclay FE, Davies MA: Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract, *J Med Microbiol* 25:191 (1988).
6. Seddon SV, Boriello SP: Proteolytic activity of *Clostridium difficile*, *J Med Microbiol* 36:307 (1992).
7. Eveillard M, Fourel V, Barc MC, Kerneis S, Coconier MH, Karjalainen T, Bourlioux P, Servin AL: Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT 29 cells in culture, *Mol Microbiol* 7:371 (1993).

8. Karjalainen T, Barc MC, Collignon A, Trolle S, Boreau H, Cotte-Laffitte J, Bourlioux P: Cloning of a genetic determinant from *Clostridium difficile* involved in adherence to tissue culture cells and mucus, *Infect Immun* 62:4347 (1994).
9. Waligora AJ, Barc MC, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T: *Clostridium difficile* cell attachment in modified by environmental factors, *Appl Environ Microbiol* 65:4234 (1999).
10. Davies MA, Boriello SP: Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxicogenicity, *Microb Pathog* 9:141 (1990).
11. Bartlett JG: *Clostridium difficile*: Clinical considerations, *Rev Infect Dis* 12:243 (1990).
12. George WL, Rolfe RD, Finegold SM: *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions, *J Clin Microbiol* 15:1049 (1982).
13. Bartlett JG, Taylor NS, Chang T, Dzik J: Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis, *Am J Clin Nutr* 33:2521 (1980).
14. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: *Clostridium difficile* colitis, *N Engl J Med* 330:257 (1994).
15. Lyerly DM, Neville LM, Evans DT, Fill J, Allen S, Greene W, Sautter R, Hnatuck P, Toprey DJ, Schwalbe R: Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST, *J Clin Microbiol* 36:184 (1998).
16. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD: *Clostridium difficile*: Its disease and toxins, *Clin Microbiol Rev* 1:1 (1988).
17. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, et al: *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis, *Infect Control Hosp Epidemiol* 16:459 (1995).
18. Depitre C, Delmee M, Avesani V, et al: Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A, *J Med Microbiol* 3:434 (1993).
19. McFarland LV: Diarrhea acquired in the hospital, *Gastroenterol Clin North Am* 22:563 (1993).
20. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al: Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo, *Am J Gastroenterol* 90:430 (1995).
21. Landry ML, Topal J, Ferguson D, Gludetti D, Tang Y: Evaluation of biosite triage *Clostridium difficile* panel for rapid detection of *Clostridium difficile* in stool samples, *J Clin Microbiol* 39:1855 (2001).
22. Hirschhorn LR, Trnka Y, Onderdonk A, et al: Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea, *J Infect Dis* 169:127 (1994).
23. Barlett JG: Antibiotic-associated diarrhea, *Clin Infect Dis* 15:573 (1992).
24. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Eroğlu C, Aygün G, Okay K: İshalli olgularda ELISA yöntemi ile *Clostridium difficile* toksin A aranması, 5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı s101, İstanbul (1995).
25. Karaer P, Yarkın F, Alhan E, Köksal F: İshalli ve asemptomatik kişilerin dışkılarında *Clostridium difficile*

ve toksinleri ile diğer enteric patojenlerin insidansı, 5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı s.101, İstanbul (1995).

26. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K: Hastanede yatkın gelişen ishal olgularında Clostridium difficile toksin A+B araştırılması, ANKEM Derg 16:82 (2002).

27. Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Güvener E: Clostridium difficile'ye bağlı infeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması, Mikrobiyol Bül 35:211 (2001).

28. Thielman NM: antibiotic-associated colitis. "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases", p1111, 5th Ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).

29. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: Clostridium difficile colitis, N Engl J Med 330:257 (1994).

30. Al-Barrak A, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, Kabani A: An outbreak of toxin A negative, toxin

B positive Clostridium difficile-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital, Can Commun Dis Rep 25:65 (1999).

31. Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR: Pseudomembraneous colitis caused by a toxin A- B+ strain of Clostridium difficile, J Clin Microbiol 38:1696 (2000).

32. Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, Weber M, Mory F: Laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis: Usefulness of premier cytolone A+B enzyme immunoassay for combined detection of stool toxins and toxigenic C.difficile strains, J Clin Microbiol 39:1996 (2001).

33. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M: Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of Clostridium difficile associated diarrhea, J Clin Microbiol 39:2846 (2001).

XI.TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

30 MART- 3 NİSAN 2003
İSTANBUL

www.klimik2003.kongresi.org