

# Antibiyotikle İlişkili İshal Olgularında Clostridium difficile Toksin A+B Araştırılması

Gökhan AYGÜN(\*) , Mustafa ASLAN(\*), Hatice YAŞAR(\*), Kemal ALTAŞ(\*)

(\*)İstanbul Üniversitesi , Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

Antibiyotikle ilişkili ishal ve nozokomiyal ishal olgularında en sık etken Clostridium difficile olarak belirlenmektedir. Bu etkeni araştırarak çeşitli yöntemler belirlenmiştir ve ELİSA ile toksin A+B saptanması sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada antibiyotikle ilişkili ishal tanısı almış, hastanede yatmayan olgularda C. difficile toksin A+B varlığı ELİSA yöntemiyle araştırılmış ve 70 olgunun üç (%4.3) tanesinde pozitif bulunmuştur. Bu oran beklenen oranlardan düşük bulunmuş, bu durumun olası nedenleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Clostridium difficile , antibiyotikle ilişkili ishal, ELİSA

## SUMMARY

Investigation of Clostridium difficile Toxin A+B in Patients with Antibiotic - Associated Diarrhoea.

Clostridium difficile is the most frequent cause in antibiotic-associated diarrhoea and nosocomial diarrhoea. Various methods to detect this agent 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 outpatients diagnosed with antibiotic associated diarrhoea using ELISA. The number of positive cases was 3 out of 70 samples (4.3%). This rate was found to be less than expected and the possible reasons are discussed.

Key words: Clostridium difficile, Antibiotic-associated diarrhoea, ELISA

## GİRİŞ

Klinik olarak asemptomatik taşıyıcılıktan ölümle sonlanabilen psödomembranöz enterokolit tablolarına kadar çok geniş bir yelpazesi olan Clostridium difficile , antibiyotikle ilişkili ishallerde(Aİİ) ve nozokomiyal ishallerde(Nİ) en sık rastlanan etken olarak karşımıza çıkmaktadır (1-3). C. difficile enfeksiyonu tanısında toksinlerin sitotoksin testleriyle tanımlanması, ELİSA, lateks testleriyle toksin A ve B'nin saptanması, kültürde bakteriyi üretmek, endoskopik inceleme ve biopsi gibi çeşitli tanı yöntemleri tanımlanmıştır (3-5). Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında C. difficile dışında başka etkenlerin de bulunabileceği fakat en sık etkenin C. difficile olduğu belirtilmektedir(6). Bu çalışmada ünitemizde antibiyotiğe bağlı ishal tanısıyla başvuran olgularda , dışkı örneklerinde ELİSA yöntemi kullanarak C. difficile toksin A+B varlığı araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarına 2000 yılı içinde , hastanede yatmayan, son üç ay içinde antibiyotik kullanımı hikayesi olan ve antibiyotiğe bağlı ishal düşünülerek gönderilen ve dışkı örneği inceleme-sinde yumuşak kıvamlı ya da sulu mukuslu örneği olan olgular çalışmaya alınmıştır(3). Klinik yakınlığı olsa bile forme dışkı örneği olanlar çalışmaya dahil edilmemişlerdir. Laboratuvara ulaşan dışkı örnekleri makroskopik ve mikroskopik yönden incele-nerek -20 °C 'de çalışılana kadar bekletilmişler ,bu dışkı örneklerinde en geç bir hafta içinde ELİSA yöntemiyle( Ridascreen C difficile toksin A+B (r-biopharm , Germany) ) C. difficile toksin A+B varlığı araştırılmıştır. Tüm örneklerde kültür yapılarak Salmonella, Shigella, Aeromonas, Plesiomonas varlığı araştırılmıştır. Direkt inceleme ve lugol ile hazırla-

nan preparatlarda parazit yönünden değerlendirilmiş, ayrıca direkt incelemede yoğun maya hücreleri varlığı ve/veya psödohif oluşumu da incelenmiş fakat kantitatif kültür uygulanmamıştır(7).

## BULGULAR

Olgulara ait bilgiler Tablo 1 'de gösterilmiştir. Tanımlanan özelliklere sahip 70 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların üçünde (%4.3) (Biri Gastroenteroloji, biri Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları ve biri diğer poliklinik-lerden) C. difficile toksin A+B pozitif bulunmuştur. Örneklerin 23 tanesinde (% 32.8) lökosit varlığı saptanmıştır. Bakteriye kültürlerden hiçbirinde anlamlı üreme belirlenmemiştir. Olguların 30'unda (%43) artmış oranda maya hücreleri ve /veya psödohif varlığı belirlenmiş fakat kantitatif kültür yapılmadığı için anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Parazitolojik inceleme sırasında üç olguda nadir alanlarda Blastocystis hominis varlığı belirlenmiş fakat anlamlı olarak kabul edilmiş ve bildirilmemiştir.

**Tablo1. Çalışmaya alınan hastaların kimlik ve dışkı inceleme sonuçları**

ÖZELLİKLER	
Ortanca Yaş	31 (5-70)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	(33/37)
Geldiği klinik	
Gastroenteroloji	17
Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları	10
Diğer Poliklinikler	43
Dışkıların makroskopisi	
Yumuşak	42
Sulu	25
Kanlı-mukuslu	3
Toksin A+B POZİTİF bulunanlar	3 (%4.3)

## TARTIŞMA

*Clostridium difficile* Nİ ve Aİİ olgularında en önemli etkenidir ve bu olgularda yapılacak ilk test bu etkene yönelik araştırma olmalıdır (1-4,8). Bu olgularda diğer etkenlere yönelik kültür ve dışkıda parazit tetkiki incelemelerinin faydasız olduğu düşünülmektedir (2,9,10).

Aİİ olgularının yaklaşık %10-30'undan, psödomembranöz kolit olgularının hemen tümünden ve Nİ olgularının yaklaşık %20'sinden C. difficile sorumlu

tutulmuştur (1,11-13). Merkezimizde daha önceki yıllarda yapılan bir çalışmada antimikrobik madde kullanan olgularda % 34 ve sağlıklı kontrol grubunda % 4.3 oranında dışkıda toksin –A pozitifliği belirlenmiştir (14). Çalışmamızda Aİİ olgularında öngörülenenden daha düşük oranlarda C difficile toksin A+B pozitifliği belirlenmiştir. Bu çalışmadaki düşük değerler kullanılan kitlerin farklılığından ve artık C. difficile infeksiyonunun daha erken tanınıp ampirik tedavi edilmesinden kaynaklanıyor olabilir. Balaban ve ark (15) çalışmalarında Aİİ olgularında beklenenden daha düşük bir oranda (%9) C. difficile saptadıklarını bildirmişler ve bu konuya dikkat çekmişlerdir.

Tanı amacıyla kullanılan ELİSA yönteminin duyarlılığının %70-95 arasında değişen oranlarda bulunduğu ve özgülüğünün daha yüksek olduğu bildirilmiştir (1,3,4). Hafif ve erken olgularda toksin saptanmayabilir (1). Klinikte kullanılacak sigmoidoskopi ve biopsi dışında laboratuvar testleri arasında altın standart test sitotoksinin hücre kültürlerinde gösterilmesidir ve ELİSA dışında, lateks aglütinasyon, moleküler teknikler, kroma-tografik teknikler, kültür yöntemleri de geliştirilmiştir (1-6,16). Günümüzde ELİSA yöntemi kısıtlı imkanları olan, hücre kültürü yapamayan laboratuvarlar için uygun bir alternatif olarak ele alınabilir(3,5,15,16). ELİSA yönteminin duyarlılığının kısıtlı olması nedeniyle tek tanı metodu olarak kullanılmasını önermeyenler de bulunmaktadır(17). İncelenen dışkı örneği sayısı arttığında C. difficile tanısının konulabilme ihtimalinin arttığı ve en az iki örnek incelenerek karar verilmesi gerektiği de önerilmiştir(4,6).

C. difficile ile ilgili laboratuvar tanısında örneğin alınıp laboratuvara ulaştırılması sonrasında ilk 24 saatte +4 °C'de, daha uzun kalacaksa – 20 °C de saklanması önerilmektedir. Fakat örneğin alınmasından laboratuvara ulaşana kadar geçen süre konusunda farklı bilgiler vardır(18,19). Bu sürenin 1 saati aşmamasını önerenler (18), 2 saat oda ısısında bekleyebileceğini söyleyenler(19) bulunmaktadır. Bazı ticari kitler ise örneklerin +4 °C'de transportunu önermektedirler. Dışkıda bulunan proteazların toksini parçalayarak miktarını azaltabileceği düşünülmektedir(20). Örneklerin alınması ve transportu sırasında geçen süre testlerin sonuçlarını olumsuz etkilemiş

olabilir. Gerçi kullanılan kit içeriğinde örneklerin soğukta transportu önerilmemiş de bu durumun bir sorun yaratabileceği düşünülebilir.

Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında C. difficile yanında Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Salmonella, Candida cinsi mantarların ve antibiyotiklerin direkt etkilerinin de ishal oluşumundan sorumlu olabilecekleri belirtilmiştir(6). Bu etkenler arasında Candida cinsi mantarların değerlendirilmesi ve etken olarak tanımlanmaları konusunda çeşitli görüşler bulunmaktadır ve en çok önerilen yöntem kantitatif kültür yapmaktır(6,7,21).

Sonuç olarak Aİİ olgularında C. difficile tanısında daha farklı yöntemleri de kullanarak yeni yaklaşım modelleri oluşturmak, diğer etkenlerin (örneğin Candida) bu olgulardaki rolünü belirlemek, ampirik metronidazol kullanımından kaçınmak uygun olacaktır.

#### KAYNAKLAR

- 1.Fekety R:** Antibiotic-associated colitis. "GL Mandell, JE Bennett ,R Dolin (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases" p978, 4th ed, Chuchill-Livingstone Inc. New York (1995).
- 2. Guerrant RL, van Gilder T, Steiner TS, et al:** Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 32 : 331 (2001).
- 3 . Fekety R:** Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. Am J Gastroenterol 92: 739 (1997).
- 4 .Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Barlett JG:** Clostridium difficile colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. Ann Intern Med 123: 835 (1995).
- 5.Doğancı L:** Antibiyotiğe bağlı diyare ve psödomembranöz kolit."H Eraksoy, OŞ Yenen ed İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji 2000" s183 , KLİMİK Derneği yayını No:19 İstanbul (2000).
- 6.Högenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC:** Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea . Clin Infect Dis 27: 702 (1998).
- 7.Öztürk R:** İshal tanımı. " R Öztürk ed . İshal " s. 70 İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayınları No:13, İstanbul (1998).
- 8.Gerding DN, Brazier JS:** Optimal methods for identifying Clostridium difficile infections. Clin Infect Dis 16 (Suppl 4): 439 (1993).
- 9. 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).
- 10.Seigal DL, Edelstein PH, Nachamkin I:** Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital. JAMA 263: 979 (1990).
- 11.Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT:** Clostridium difficile colitis. N Engl J Med 330: 257 (1994).
- 12.Bartlett JG:** Antibiotic-associated diarrhoea . Clin Infect Dis 15: 573 (1992).
- 13.Öztürk R :** Antibiyotikle ilişkili ishal . "R Öztürk ed.İshal" s. 176, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayınları No:13, İstanbul , (1998).
- 14.Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Eroğlu C, Aygün G, Okyay K:** İshalli olgularda ELİSA yöntemiyle Clostridium difficile toksin A aranması. 5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı, s:101(1995).
- 15.Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Güvener E:** Clostridium difficileye bağlı infeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül 35 : 211(2001).
- 16.Staneck JL, WeckbachLS, Allen SD et al.:** Multicenter evaluation of four methods for Clostridium difficile detection: Immunocard C. difficile, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. J Clin Microbiol 34: 2718 (1996).
- 17.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 dartheae. J Clin Microbiol 31: 963 (1993).
- 18.Miller JM, Holmes HT:** Specimen collection, transport, and storage. "PR Murray,EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Yolkin eds Manuel of Clinical Microbiology " p.19 6th ed. ASM Press , Washington D.C. (1995).
- 19.Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr.WC:** Color Atlas and Textbookof Diagnostic Microbiology , p596 , 4th ed. JB Lippincott Company, Philadelphia (1992).
- 20. Merz CS, Kramer C, Forman M et al:** Comparison of four commercialy available rapid enzymeimmunoassays with cytotoxin assay for detection of Clostridium difficile toxin(s) from stool specimens. J Clin Microbiol 32 : 1142 (1994).
- 21.Levine J, Dykoski RD, Janoff EN:** Candida –associated diarrhea: a syndrome in search of credibility. Clin Infect Dis 21: 881 (1995).