CLOSTRIDIUM DIFFICILE'YE BAĞLI İSHAL OLGULARININ 6 YILLIK DEĞERLENDİRMESİ

SIX YEARS EVALUATION OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ASSOCIATED DIARRHEA

Serpil ERCİS, Alper ERGİN**, Gülşen HASÇELİK**

ÖZET: Bu çalışma, Ocak 1997 - Nisan 2003 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen antibiyotiğe bağlı ishal veya psödomembranöz kolit ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde, *Clostridium difficile* toksin varlığı ve klinik bulgular arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla yapılmıştır. Toksin A ve/veya B varlığı enzim immün yöntemleriyle araştırılmıştır. Altı yıl süreyle 726 hastanın dışkı örneği *C.difficile* toksini açısından incelenmiş, bunların 62'sinde toksin A ve 6'sında toksin B olmak üzere toplam 68'inde (%9.4) pozitiflik saptanmıştır. *C.difficile*'ye bağlı ishalin, hastaların büyük çoğunluğunda (32/68) beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanımına bağlı olarak geliştiği gözlenmiş, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) kullanımı izlemiştir. Yaş aralığı 1-86 yıl (yaş ortalaması: 43.3 yıl) arasında değişen hastaların 36'sında (%52.9) altta yatan hastalık varlığı belirlenmiştir. Bu hastaların 18'inde kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı ve böbrek yetmezliği, 11'inde kanser ve 7'sinde diğer hastalıklar (diyabet, hepatit, transplantasyon ve multiple skleroz) mevcuttur. Sonuç olarak, *C.difficile*'ye bağlı ishallerin tanısında toksin varlığının araştırılması ve bunun hastaların risk faktörleriyle birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Clostridium difficile, antibiyotiğe bağlı ishal, toksin saptanması.

ABSTRACT: This study was aimed to detect the presence of *Clostridium difficile* toxin in the stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhea or pseudomembranous colitis, and to relate its presence with the clinical findings of the patients. Between January 1997 - April 2003, a total of 726 stool samples were investigated for *C.difficile* toxin A and/or B by enzyme immunoassay. Of them, 68 (9.4%) were found positive for *C.difficile* toxin (62 were toxin A, 6 were toxin B). *C.difficile* associated diarrhea were found to be related mostly with the

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Ankara.

Geliş Tarihi: 19.1.2004 Kabul Ediliş Tarihi: 30.3.2004

use of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations (32/68), followed by aminoglycosides (12/68), and cephalosporins (8/68). The ages of the patients were between 1-86 years old (mean: 43.3 years), and 36 (52.9%) of them had an underlying conditions. Chronic obstructive pulmonary disease and chronic renal failure were the underlying disease in 18, malignancy in 11, and others (diabetes, hepatitis, transplantation, multiple sclerosis) in 7 of the patients. In conclusion, toxin detection and knowledge of the risk factors are the beneficial guidelines for the diagnosis of *C.difficile* associated diarrhea in the routine setting.

Key words: Clostridium difficile, antibiotic associated diarrhea, toxin detection.

GİRİŞ

Clostridium difficile hastanede yatan hastalarda antibiyotiğe bağlı ishal ve psödomembranöz kolite neden olan önemli bir patojendir[1]. *C.difficile*'ye bağlı enfeksiyonlardan sorumlu en önemli antibiyotikler ampisilin, amoksisilin, klindamisin ve sefalosporinler olmasına rağmen, bütün antibiyotikler bu mikroorganizmaya bağlı ishale neden olabilmektedir[2]. Antibiyotik kullanımı dışında ileri yaş, gastrointestinal endoskopi ve cerrahi müdahale, kanser, böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar, immün sistemin baskılanması ve antibiyotiğe bağlı ishal geçirme öyküsü de risk faktörleri arasında sayılmaktadır[3,4].

C.difficile'ye bağlı ishal ve psödomembranöz kolitin tanısı klinik bulgular ve dışkı örneğinde toksinin gösterilmesi ile konulmaktadır. Toksin saptanmasında, hücre kültürü altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, uygulama güçlüğü, uzun sürede sonuç vermesi ve pahalı olması nedeniyle, günümüzde rutin laboratuvarlarda, daha çok ticari olarak geliştirilmiş hızlı immünolojik testler kullanılmaktadır[5]. Bazı testler, sadece toksin A'yı gösterirken, bazıları toksin A ve B'nin birlikte gösterilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Son bulgulara göre, sadece toksin A'nın belirlenmesine yönelik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri az olduğu için, toksin A ve B'nin belirlendiği testlerin kullanılması önerilmektedir[6].

Bu çalışma, altı yıllık bir dönemde Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen antibiyotiğe bağlı ishal veya psödomembranöz kolit ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde, *C.difficile* toksin varlığı ve klinik bulgular arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

C.difficile toksin varlığının gösterilmesi amacıyla Ocak 1997 - Nisan 2003 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinin çeşitli kliniklerinden gönderilen, 726 hastanın dışkı örneği (708 yetişkin, 18 çocuk) çalışma kapsamına alındı. Dışkı örnekleri, aynı gün sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar besiyerine ekilerek anaerobik koşullarda 48 saat inkübe edildi. *C.difficile* kolonileri, tipik koloni morfolojisi ve Gram özelliği ile tanımlandıktan sonra *C.difficile*'ye özgü lateks aglütinasyon (Fresenius Diagnostik, Germany) ile tanı doğrulandı. *C.difficile* ATCC 9689 referans suşu kalite kontrol amacıyla kullanıldı. Dışkı örneğinin, geri kalan kısmı enzim immün yöntemi (ELISA) yöntemi ile toksin bakılıncaya kadar –20°C'de saklandı. Bütün örnekler en fazla 2 hafta içerisinde çalışıldı. ELISA kitleri olarak, 1997-1999 tarihleri

arasında, Culturette Toxin CD (Toxin A, Becton and Dickinson, Md, USA), 2000-2003 yılları arasında ProSpecT II *C.difficile* Toxin A (Alexon-Trend, Ramsey, USA) ve RIDASCREEN *C.difficile* Toxin A/B (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) kullanıldı. ELISA kitleri üretici firma önerilerine göre çalışılarak değerlendirildi.

C.difficile toksin pozitifliği gözlenen hastaların klinik bulguları, hasta dosyalarından retrospektif olarak incelendi. Buna göre, başka bir enterik bakteri enfeksiyonuna bağlı olmayan ve iki günden fazla süre ile günde üçten fazla sulu ishal olması, ishal başlamadan altı hafta içerisinde antibiyotik kullanım öyküsü, antibiyotik kullanımının kesilmesinden sonra iyileşme, vankomisin veya metronidazol kullanımı ile iyileşme olması gibi bulgular laboratuvar tanısının desteklenmesi amacıyla kullanıldı[7].

BULGULAR

C.difficile toksin varlığı açısından incelenen 726 dışkı örneğinin, 68'i (%9.4) toksin pozitif olarak tespit edilmiştir. Toksin ve kültür sonuçları karşılaştırıldığında, kültürde üreyen *C.difficile* suşlarının 29'unda toksin pozitifliği saptanırken, 15'inde toksin aktivitesi bulunamamıştır. İncelenen dışkı örneklerinin 62'sinde (%91.1) toksin A, 6'sında (%8.8) toksin B pozitifliği saptanmıştır. Toksin pozitif hastaların 36'sının (%52.9) erkek, 32'sinin (%47) kadın, yaş aralığının 1-86 yıl, yaş ortalamasının 43.3 yıl olduğu belirlenmiştir.

Antibiyotik kullanımı ile ishal arasındaki ilişki Tablo I'da gösterilmiştir. Hastaların büyük çoğunluğunun beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarını kullandığı gözlenmiş, bunu aminoglikozid ve sefalosporin kullanımının izlediği saptanmıştır. Altmış dört hastada metronizadol tedavisinin iyileşme sağladığı izlenmiştir.

Tablo I: *C.difficile* Toksin Pozitifliği Olan Hastaların Kullandıkları Antibiyotiklerin Dağılımı

İlaç grubu	Antibiyotik*	Hasta sayısı**
Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları	Ampisilin, SAM, Pip+Taz	36
Aminoglikozidler	Amikasin, gentamisin	12
Sefalosporinler	Seftriakson, sefepim, seftazidim, sefuroksim	8
Kinolonlar	Siprofloksasin,ofloksasin, levofloksasin	7
Karbapenemler	İmipenem, meropenem	5
Flukonazol ve Amfoterisin		4
Linkozamidler	Klindamisin, linkomisin	3
Vankomisin		3
Makrolidler	Azitromisin, klaritromisin	2
Diğer	Kloramfenikol, SXT, metronidazol	4
Kanser kemoterapisi		7

* SAM: Sulbaktam-ampisilin, Pip: Piperasilin, Taz: Tazobaktam, SXT: Sülfametoksazol-trimetoprim
** Hastaların 14'ü birden fazla antibiyotikle tedavi edilmiştir

C.difficile toksin pozitif olan 68 hastada, ortalama antibiyotik kullanma süresi 5 ile 20 gün arasında değişmekte olup, bu hastaların 54'ünün tekli, 14'ünün kombine antibiyotik tedavisi aldığı tespit edilmiştir.

C.difficile'ye bağlı hastalığı olan kişilerin 18'inde kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve kronik böbrek yetmezliği bulunurken, 11'inde çeşitli kanser tipleri ve geriye kalan yedi hastada ise diyabet, hepatit, transplantasyon, multiple skleroz olduğu belirlenmiştir. Hastaların 32'sinde altta yatan herhangi bir hastalık bulunamamış, iki hastada sulbaktam-ampisilin kullanımına bağlı rölaps oluştuğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

C.difficile'ye bağlı enfeksiyonların sıklığı çalışılan topluma ve hastalığın klinik olarak yorumlanmasına göre değişmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bu enfeksiyon sıklığının %3.8 ile %18.3 arasında değiştiği gözlenmiştir[8,9,10]. Ülkemizde, Büyükbaba ve arkadaşlarının[11] uzun süre antibiyotik tedavisi gören ve psödomembranöz enterokolit bulguları olan 50 çocuğun dışkı örneklerinde yaptıkları çalışmada, 12 (%24) örnekte *C.difficile* izole edilirken, 8'inde (%16) toksin A varlığı tespit edilmiştir. Aygün ve arkadaşları[12], hastanede yatış sırasında diyare gelişen 125 hastadan 4'ünün (%3.2) dışkı örneklerinde toksin A/B varlığı belirlemiştir. Balaban ve arkadaşları[13] da, antibiyotiğe bağlı diyare gelişen hastaların %9'unda ELISA ve diğer tanı yöntemleri ile *C.difficile*'nin etken olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda incelenen 726 dışkı örneğinin, 68'i (%9.4) toksin pozitif olarak tespit edilirken, bunların 62'sinde (%91.1) toksin A, 6'sında (%8.8) toksin B pozitifliği belirlenmiştir.

Rutin laboratuvarlarda, *C.difficile*'ye bağlı ishal olgularını tespit etmek amacıyla, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olması nedeniyle toksin varlığı araştırılmaktadır. Sadece toksin A'nın belirlenmesine yönelik ELISA kitleri tanı duyarlılığını düşürdüğünden, toksin A ve B'nin birlikte belirlendiği testlerin kullanılması önerilmektedir[14]. Samra ve arkadaşları[15], 530 dışkı örneğinin 47'sini (%8.9) toksin A kiti ile pozitif bulurken, 108'ini (%20.4) toksin A/B kiti ile pozitif bulmuştur. Lyerly ve arkadaşları[16] ise, hücre kültürü ile toksin pozitif bulunan 102 dışkı örneğini, toksin A/B kiti ile değerlendirdiklerinde, iki örnekte toksin A negatif, toksin B pozitif izolat tespit etmişlerdir. Büyükbaba[17], *C.difficile* enfeksiyonu ön tanısı ile 1998-2000 yılları arasında incelenen 360 dışkı örneğinin 17'sinde (%4.7) toksin A, 2000-2002 yılları arasında incelenen 400 dışkı örneğinin 48'inde (%12) toksin A/B varlığı saptamıştır. Çalışmamızda, 6 (%8.8) dışkı örneğinde toksin A negatif, toksin B pozitif örnek saptanmıştır ki, bu sonuç rutin laboratuvarlarda her iki toksinin tespit edildiği ticari sistemlerin kullanılmasının önemini vurgulamaktadır.

C.difficile'ye bağlı ishalde en önemli risk faktörlerinden birisi antibiyotik kullanımı olup ülkeden ülkeye değişmektedir. Urban ve arkadaşları[8] Macaristan'da yaptıkları çalışmada, kendi hasta gruplarında en çok beta-laktam, daha sonra da kinolon kullanımının *C.difficile*'ye bağlı ishalde önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. Wiström ve arkadaşları[18] İsveç'te antibiyotiğe bağlı ishalli olgularda yaptıkları çalışmada, ilk sırada sefalosporin, ikinci ve üçüncü sıralarda klindamisin ve geniş spektrumlu

penisilin kullanımının *C.difficile*'ye bağlı ishal riskini artırdığını göstermiştir[18]. Çalışmamızda da, *C.difficile*'ye bağlı ishali olan hastalarda en çok kullanılan antibiyotiklerin sırasıyla beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, aminoglikozidler ve sefalosporinler olduğu gözlenmiştir (Tablo I).

C.difficile'ye bağlı ishalde diğer önemli risk faktörlerinden birisi de altta yatan hastalık varlığıdır[19]. Buchner ve arkadaşlarının[20] çalışmasına göre kanser, kemoterapi, solunum yolları enfeksiyonları ve böbrek yetmezliği *C.difficile*'ye bağlı ishale yakalanma riskini artırmaktadır[20]. Wiström ve arkadaşları[18] da, altta yatan birden fazla hastalığı olan kişilerde *C.difficile*'ye bağlı ishale yakalanma riskinin fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, *C.difficile*'ye bağlı ishali olan olguların yaklaşık %50'sinde altta yatan bir hastalık varlığı tespit edilmiştir.

C.difficile ishallerinde en önemli sorunlardan birisi rölapstır ve bu durum özellikle mortaliteyi, tedavi masraflarını ve antimikrobiyal direnci artırması nedeniyle önem arz etmektedir. Tal ve arkadaşları[21] bu durumun önemini, yaşlılardan oluşan çalışma gruplarındaki 81 hastanın %53.1'inde rölaps görülmesi ile vurgulamışlardır. Çalışmamızda, iki hastada rölaps belirlenmiştir. Birinci olgu 60 yaşında ve altı ay önce psödomembranöz kolit tanısı konulan bir kadın hastadır. Bu hastada alt solunum yolu enfeksiyonuna bağlı olarak beş gün süreyle sulbaktam-ampisilin kullanılmış ve buna bağlı rölaps gözlenmiştir. İkinci olgu ise, 49 yaşında bir erkek hasta olup bir yıl önce psödomembranöz kolit tanısı almış ve rölaps, solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle üç gün süreyle sulbaktam-ampisilin kullanımına bağlanmıştır.

Sonuç olarak, *C.difficile*'ye bağlı ishal olgularının değerlendirilmesinde, toksin varlığının gösterilmesi ve klinik bulgular ile birleştirilmesi çok önemli basamaklardır. Hastaya verilecek uygun tedavinin seçilmesi, klinisyen ve laboratuvar işbirliği sayesinde olacaktır. Bu nedenle bu çalışmada, *C.difficile*'ye bağlı ishal veya psödomembranöz koliti olan hastaların dışkı örneklerinde toksin varlığı tesbitinin ve bunun klinik bulgularla ilişkisinin önemi vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Thielman NM: Antibiotic-associated colitis, p: 1111-1126. In: Mandell GL, Dolin R, Bennett JE (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, New York.
2. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB: *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Arch Intern Med 2001, 161: 525-533.
3. 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 an urban tertiary care hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000, 19: 9-15.
4. Siemann M, Koch-Dörfler M, Rabenhorst G: *Clostridium difficile*-associated diseases. Intensive Care Med 2000, 26: 416-421.
5. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, et al: Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2001, 39: 2846-2849.
6. Wilkins TD, Lyerly DM: *Clostridium difficile* testing: After 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003, 41: 531-534.
7. 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 1993, 31: 963-967.

8. Urban E, Tusnadi A, Terhes G, Nagy E: Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary. J Hosp Infect 2002, 51: 175-178.
9. Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, Gourdeau M, Ishak M: Morbidity, mortality and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2002, 23: 137-140.
10. Rao GG, Rao CSM, Starke I: *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in patients with community-acquired lower respiratory infection being treated with levofloxacin compared with beta-lactam-based therapy. J Antimicrob Chemother 2003, 51: 697-701.
11. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büget E: Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishalli çocukların dışkılarında *Clostridium difficile*'nin araştırılması. Klimik Derg 1994, 7: 105-107.
12. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K: Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. Ankem Derg 2002, 16: 82-84.
13. Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Güvener E: *Clostridium difficile*'ye bağlı enfeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült 2001, 35: 211-218.
14. Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, Weber M, Mory F: Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: Usefulness of premier cytoclone A+B enzyme immunoassay for combined detection of stool toxins and toxigenic *C.difficile* strains. J Clin Microbiol 2001, 39: 1996-1998.
15. Samra Z, Talmor S, Bahar J: High prevalence of toxin A-negative toxin B-positive *Clostridium difficile* in hospitalized patients with gastrointestinal disease. Diagn Microbiol Infect Dis 2002, 43: 189-192.
16. Lyerly DM, Neville LM, Evans DT, et al: Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B test. J Clin Microbiol 1998, 36: 184-190.
17. Büyükbaba Boral Ö: *Clostridium difficile* infeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002, 33: 220-224.
18. Wiström J, Norrby SR, Myhre EB, et al: Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: A prospective study. J Antimicrob Chemother 2001, 47: 43-50.
19. Barbut F, Petit JC: Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect 2001, 7: 405-410.
20. Buchner AM, Sonnenberg A: Medical diagnoses and procedures associated with *Clostridium difficile* colitis. Am J Gastroenterol 2001, 96: 766-772.
21. Tal S, Gurevich A, Guller V, Gurevich I, Berger D, Levi S: Risk factors for the recurrence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in the elderly. Scand J Infect Dis 2002, 34: 594-597.