

ANTİBİYOTİĞE BAĞLI İSHAL GELİŞEN NÖTROPENİK VE NÖTROPENİK OLMAYAN HASTALARDA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOKSİN SIKLIĞI VE RİSK FAKTÖRLERİNİN ANALİZİ

THE FREQUENCY OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOXIN IN NEUTROPENIC AND NON-NEUTROPENIC PATIENTS WITH ANTIBIOTIC-ASSOCIATED DIARRHEA AND ANALYSIS OF THE RISK FACTORS

Özlem GÜZEL TUNÇCAN¹, Fatma ULUTAN¹, Resul KARAKUŞ²

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakterioloji Anabilim Dalı, Ankara.
(oz_guz@yahoo.com)

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada, Ocak 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında hastanede yatan ve antibiyotik kullanımı sonrası ishal gelişen 74 nötroopenik hasta (yaş ortalaması: 41.78 ± 14.3 yıl; 40'ı erkek) ile 75 nötroopenik olmayan hasta (yaş ortalaması: 44.09 ± 15.6 yıl; 30'u erkek) *Clostridium difficile* toksin varlığı yönünden araştırılmış ve risk faktörleri irdelenmiştir. Hastalardan alınan dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A varlığı immünokromatografik yöntemle (Toxin Detection Kit, Oxoid, İngiltere), toksin A/B varlığı ELISA yöntemiyle (*Clostridium difficile* Antigen, Generic Assays GmbH, Almanya) çalışılmıştır. Dışkı örnekleri ayrıca, ishal nedeni olabilecek diğer bakteri ve parazit varlığı açısından da incelenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede, Kaplan-Meier ve Cox analizi yöntemleri kullanılmıştır. Nötroopenik olan ve olmayan gruplar, toplam hastanede yatma süresi, toplam antibiyotik kullanma süreleri ve tanıya kadar geçen hastanede yatma süreleri temel alınarak insidans yoğunlukları açısından karşılaştırılmıştır. Kullanılan antibiyotiklerin dağılımları nötroopenik grupta piperasilin-tazobaktam (%41.9), imipenem (%25.7), sefepim (%17.5), siprofloksasin (%2.7) ve diğerleri (%12.2) iken; nötroopenik olmayan grupta ampisilin-sulbaktam (SAM) (%29.3), siprofloksasin (%18.7), seftriakson (%14.6) ve diğerleri (%30.7) şeklindedir. Çalışmada, nötroopenik grupta 10 (%13.5), nötroopenik olmayan grupta 11 (%14.7) olmak üzere toplam 21 (%14.1) hastanın dışkıında *C.difficile* toksin A pozitifliği saptanmıştır. *C.difficile* toksin A/B ise, nötroopenik grupta %24.3 (n= 18), nötroopenik olmayan grupta %21.3 (n= 16) olmak üzere toplam %22.8 (n= 34) oranında pozitif bulunmuştur. Toksin A veya A/B pozitifliği açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p> 0.05). Toksin A/B pozitif saptanan 34 olgunun 13 (%38.2)'ünde toksin A'nın negatif olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; nötroopenik grupta enfeksiyonun daha erken geliştiği, toksin pozitiflerde tanıya kadar geçen hastanede yatma ve antibiyotik kullanım sürelerinin anlamlı ölçüde daha kısa olmasıyla gösterilmiştir (sırasıyla; p< 0.01 ve p< 0.001). Nötroopenik olmayan grup için SAM veya amoksisilin-klavulanik asit kullanımı bir risk faktörü olarak belirlenmiştir. Hastanede yatma

süresi, özellikle nötropenik hastalarda antibiyotik kullanımına ek olarak *C.difficile*'ye bağlı ishal gelişmesinde önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre, nötropenik olgularda, nispeten erken gelişen antibiyotikle ilişkili ishallerin *C.difficile* toksini açısından pozitif olma olasılığının daha yüksek olduğunu belirtmek mümkündür. Uygun kontrol önlemlerinin bu anlamda göz önünde tutulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: *Clostridium difficile*, toksin, nötropeni, risk faktörleri.

ABSTRACT

This study was carried out in order to investigate the frequency of *Clostridium difficile* toxin in the stool samples of hospitalized 74 neutropenic (mean age: 41.78 ± 14.3 years; 40 male) and 75 non-neutropenic patients (mean age: 44.09 ± 15.6 years; 30 male) who developed antibiotic-associated diarrhea between January 2003-September 2004 in a university hospital and also to analyze the related risk factors. *C.difficile* toxin A and toxin A/B were searched by immunochromatographic method (Toxin Detection Kit, Oxoid, UK), and commercial ELISA (*Clostridium difficile* Antigen, Generic Assays GmbH, Germany) kit, respectively. Stool samples were also analysed in terms of the presence of other bacterial and parasitic agents which may cause diarrhea. Statistical evaluation were performed by Kaplan-Meier survival analysis and by Cox regression analysis. Both neutropenic and non-neutropenic groups were compared according to their incidence densities based on times in days of overall hospitalization, total antibiotic use and hospitalization until diagnosis. The antibiotics used in neutropenic patients were piperacillin-tazobactam (41.9%), imipenem (25.7%), cefepime (17.5%), ciprofloxacin (2.7%) and others (12.2%) and in non-neutropenic patients were ampicillin-sulbactam (29.3%), ciprofloxacin (18.7%), ceftriaxone (14.6%) and others (30.7%). *C.difficile* toxin A positivity rates in neutropenic and non-neutropenic groups were found as 13.5% (10/74) and 14.7% (11/75), respectively, with a total rate of 14.1% (21/149). The positivity rate of toxin A/B was 24.3% (n= 18) for neutropenic, and 21.3% (n= 16) for non-neutropenic patients, with a total rate of 22.8% (n= 34). There was no statistically significant difference between the groups by means of toxin A or toxin A/B positivity rates ($p > 0.05$). Thirteen (38.2%) of 34 toxin A/B positive patients yielded negative results with toxin A detection test. Our results revealed that infection in the neutropenic patients developed much earlier than that in the non-neutropenic group by comparing durations of hospitalization and antibiotic use which were shorter for toxin positive individuals ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). In the control group, implementation of sulbactam-ampicillin or amoxicillin-clavulanate was determined as a risk factor. In addition to duration of hospitalization, use of antibiotics was evaluated as a risk factor for *C.difficile* associated colitis, especially in the neutropenic group. According to these results, it is possible to point out that antibiotic-associated colitis develops relatively earlier in neutropenic patients and is more frequently *C.difficile* toxin positive. In this context, appropriate control measures should therefore be kept in mind.

Key words: *Clostridium difficile*, toxin, neutropenia, risk factors.

GİRİŞ

Antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında gelişen ve başka bir nedenle açıklanamayan ishaller genel olarak antibiyotikle ilişkili ishal olarak adlandırılır. *Clostridium difficile*, antibiyotikle ilişkili ishallerin en iyi bilinen etkeni olup antibiyotik kullanımı sonrası görülen ishallerin %15-20'sinden sorumludur¹. İshalli hastalarda son iki ayda antibiyotik kullanma öyküsü varsa veya hastanede yatarken üç günden sonra ishal gelişmişse *C.difficile* akla gelmelidir². Psödomembranöz enterokolit yalnızca ek tedavi maliyeti yaratmakla kalmayıp, sıvı ve iyon kaybını olduğu, ağır klinik bulgularla seyredabilen komorbid bir duruma da yol açmaktadır^{2,3}.

C.difficile'ye bağlı ishal gelişiminde en önemli risk faktörleri arasında; geniş spektrumlu ve uzun süreli antibiyotik kullanımı, hastanede yatma süresi, altta yatan hastalığın şiddeti, ileri yaş, yoğun bakımda yatma, gastrointestinal sisteme invazif girişimler, nazo-gastrik tüp uygulaması ve enteral beslenme sayılabilir⁴. Nötropenik kanser hastalarında ek olarak kemoterapi ve mukozit gelişimi gibi faktörler de etkilidir⁵. Bu faktörlerin çoğunun hastalarda normal intestinal floranın bozulması sonucunda, yoğun bakımda veya hastanede uzun süreli yatışın ise *C.difficile* ile karşılaşma sıklığı ve yoğunluğunu artırması sonucunda ishale yol açtığı düşünülmektedir^{4,6}.

C.difficile ishali toksin aracılığı ile gelişen bir hastalıktır. Bu nedenle toksin saptamaya yönelik testlerle daha hızlı tanı konabilmektedir. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishal durumunda, uygun yöntemle *C.difficile* toksini bakılması hastalığın tanısı açısından önemlidir⁵. Bu çalışmada, hastanede yatan ve nötropenik olan ve olmayan iki farklı hasta grubunda antibiyotik kullanımı sonrasında gelişen ishallerde *C.difficile* toksin sıklığının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan ve antibiyotik kullanımı sonrası gelişen ishali olan ≥ 16 yaş 149 hasta alındı. Olgu grubundaki 74 hasta malignite nedeniyle hastanede yatan ve nötropenisi olan hastalar; kontrol grubundaki 75 hasta ise hastanenin diğer servislerinde yatan ve nötropenik olmayan hastalardı. Çalışmaya alınan tüm hastalarda yaş, cinsiyet, altta yatan hastalıklar, antibiyotik kullanma endikasyonları, antibiyotik türleri, toplam antibiyotik kullanım süreleri, toplam hastanede yatma süreleri, ishal başlayıncaya kadar geçen toplam hastanede yatma ve antibiyotik kullanım süreleri, hastaya uygulanan invazif girişimler ve hastaların hematolojik ve biyokimyasal verilerinin kayıtları tutularak değerlendirilmeye alındı. Tüm örnekler eritrosit, lökosit ve parazit varlığı açısından direkt mikroskopi ile incelendi ve her birinden yayma preparat hazırlanıp Gram ile boyanarak lökosit ve gram-pozitif çomak varlığı açısından değerlendirildi. Dışkı örneklerinin diğer patojenler açısından EMB (Eosine Methylene Blue) besiyerine ekimleri yapıldı. Örnekler hemen laboratuvara ulaştırıldı ve işleme alındı; hemen çalışılamayacak örnekler -80°C'de saklandı.

Toksin A tespiti için immünokromatografik bir test (Toxin Detection Kits, Oxoid^R, İngiltere), toksin A/B için ise ELISA yöntemi (*Clostridium difficile* Antigen, Generic Assays GmbH, Almanya) kullanıldı. Her iki test de üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışıldı. ELISA sonuçları, üretici firmanın kılavuzunda belirtilen sınır değeri (cut-off) kullanılarak, negatif, sınırdan ve pozitif olmak üzere üç kategoride değerlendirildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Kaplan Meier analizlerinde Log Rank ve Breslow testleri ile tek değişkenli analiz (univariate) gerçekleştirildi. Zamana bağlı olarak atfedilebilir risk değerlerinde değişiklik gösterebilen veriler için Cox doğrusallık analizi yapıldıktan sonra "Cox proportional multivariate" analizi yapıldı. İnsidans yoğunluklarının karşılaştırılmasında PEPI (Program for Epidemiologists, Version 4.0), oransal karşılaştırmalarda STATS version 1.1, güven aralıklarının kontrolü için EPI 6.0 kullanıldı.

İnsidans Yoğunluğu

C.difficile ishalinin gelişiminde toksin pozitifliği için, antibiyotik kullanımının yanında hastanede yatma süresi de bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Toksin pozitifliklerinin karşılaştırılmasında, zaman faktörünün de devreye sokulduğu insidans yoğunluğuna dayalı karşılaştırma yapıldı^{4,7} [İnsidans yoğunluğu= (gelişen olay/risk altındaki kişi-zaman) x 1000].

BULGULAR

Nötropenik olan ve olmayan olgulardaki tanımlayıcı veriler Tablo I’de, altta yatan hastalıklara göre dağılımlar ise Tablo II’de sunulmuştur. Kullanılan antibakteriyel ajanların dağılımı ele alındığında, tüm hastalarda en sık beta-laktam ve kinolon gruplarının öne çıktığı gözlenmiştir. Kullanılan antibiyotiklerin dağılımları olgu grubunda piperasilin-tazobaktam (n= 31, %41.9), imipenem (n= 19, %25.7), sefepim (n= 13, %17.5), siprofloksasin (n= 2, %2.7) ve diğer farklı antibiyotikler (n= 9, %12.2) iken, kontrol grubundaki hastalarda en sık ampisilin-sulbaktam (n= 22, %29.3), siprofloksasin (n= 14, %18.7), seftriakson (n= 11, %14.6) ve diğer farklı antibiyotikler (n= 23, %30.7) olarak saptanmıştır.

Tablo I. Nötropenik Olan ve Olmayan Hasta Gruplarının Tanımlayıcı Verilerinin Dağılımı

	Nötropenik (n= 74)		Nötropenik olmayan (n= 75)		Toplam
	Ortalama ± SD*	Toplam	Ortalama ± SD*	Toplam	
Kadın/Erkek		34/40		45/30	79/70
Yaş (yıl)	41.78 ± 14.3		44.09 ± 15.6		
Hastanede yatma süresi (gün)	32.31 ± 30.28	2391	13.51 ± 11.36	1013	3404
Taniya kadar geçen hastanede yatma süresi (gün)	27.57 ± 27.99	2040	12.23 ± 9.97	917	2957
Antibiyotik toplam kullanım süresi (gün)	11.58 ± 3.87	857	10.39 ± 4.15	779	1636
Taniya kadar geçen antibiyotik kullanım süresi (gün)	9.35 ± 3.96	692	9.32 ± 4.13	699	1391
* Standart sapma.					

Tablo II. Nötropenik Olan ve Olmayan Hasta Gruplarında Altta Yatan Hastalıklar

Grup	Altta yatan hastalıklar	Sayı	%
Nötropenik (n= 74)	Akut miyeloblastik lösemi	33	44.6
	Multipl miyeloma	24	32.4
	Solid tümörler	6	8.1
	Diğer hematolojik hastalıklar	11	14.8
Nötropenik olmayan (n= 75)	Üst solunum yolu enfeksiyonu	19	25.3
	Pnömoni	9	12
	İdrar yolu enfeksiyonu	7	9.3
	Diğer enfeksiyonlar	40	53.3

Çalışmamızda, nötropenik grupta 10 (%13.5) ve nötropenik olmayan grupta 11 (%14.7) olmak üzere toplam 21 (%14.1) hastanın dışkıında *C.difficile* toksin A pozitifliği saptanmıştır ($p > 0.05$). Bu sayı ve oranlar *C.difficile* toksin A/B pozitifliği için nötropenik grupta 18 (%24.3), nötropenik olmayan grupta ise 16 (%21.3) olmak üzere toplam 34 (%22.8)'tür. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Toksin A/B saptanan toplam 34 olgunun 13 (%38.2)'ünde toksin A negatif olarak saptanmıştır.

Her iki grupta hastanede yatış ve antibiyotik kullanım süreleri toksin pozitifliği açısından karşılaştırılmış ve anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Tablo III).

Toksin A/B pozitifliğinin insidans yoğunluğu, hastanede yatışın başlangıcından, tanı alana kadar geçen süre gün sayısı olarak alındığında olgu grubu, kontrol grubu ve tüm hastalar için sırasıyla %08.8, %17.5 ve %11.5 olarak bulunmuştur. İnsidans yoğunlukları antibakteriyel ajan başladıktan sonra tanıya kadar geçen süre gün sayısı temel alınarak hesaplandığında ise olgu, kontrol grubu ve tüm hastalar için sırasıyla %26, %22.9 ve %24.4 olarak saptanmıştır. Hesaplanan insidans yoğunluklarının ayrıntıları ve grup karşılaştırmaları Tablo IV'te verilmiştir.

Antibiyotik başladıktan sonra ishal gelişimine kadar geçen antibiyotik kullanım sürelerinin toksin A/B pozitifliği veya negatifliği açısından bir etki oluşturup oluşturmadığı

Tablo III. Nötropenik Olan ve Olmayan Gruplarda Toksin A/B Sonucuna Göre Tanıdan Önceki Hastanede Yatma ve Antibiyotik Kullanma Sürelerinin Grup İçi ve Toplamda Karşılaştırılması

Gruplar	Hastanede yatma süresi*			Antibiyotik kullanım süresi*		
	Toksin A/B Pozitif	Toksin A/B Negatif	p**	Toksin A/B Pozitif	Toksin A/B Negatif	p**
Nötropenik	378 (21 ± 10.7)	1662 (29.7 ± 31.4)	< 0.01	113 (6.3 ± 3.4)	579 (10.3 ± 3.6)	< 0.001
Nötropenik olmayan	199 (12.4 ± 6)	718 (12.2 ± 10.8)	> 0.05	106 (6.6 ± 3.6)	593 (10.1 ± 3.9)	< 0.001
Toplam	577 (16.9 ± 9.7)	2380 (20.7 ± 24.8)	> 0.05	219 (6.4 ± 3.5)	1172 (10.2 ± 3.8)	< 0.001

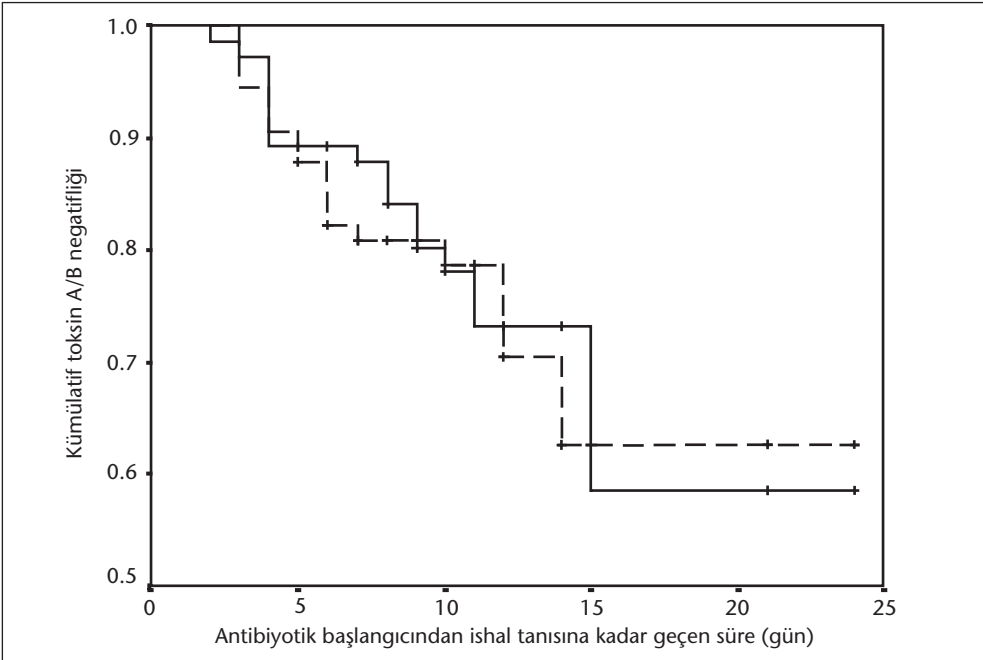
* Toplam gün sayısı (ortalama ± standart sapma).
** Ki-kare.

Tablo IV. Nötropenik Olan ve Olmayan Hastalarda Tanıdan Önceki Hastanede Yatma ve Antibiyotik Kullanım Sürelerine Göre Toksin A/B Pozitifliği İnsidans Yoğunluğu

		Nötropenik	Nötropenik olmayan	p değeri; %95 güven aralığı
Hastanede yatma süresi	Toplam gün	2040	917	0.043; 0.26-0.99
	İnsidans yoğunluğu (‰)	8.8	17.5	
Antibiyotik kullanım süresi	Toplam gün	692	699	0.344; 0.58-2.23
	İnsidans yoğunluğu (‰)	26	22.9	

Kaplan-Meier sağkalım analizi ile irdelenmiştir. Sağkalım kriteri olarak toksin A/B negatifliği belirlenerek yapılan analizlerde, nötropenik grupta antibiyotik başlandıktan sonraki ilk 7 günde gelişen ishallerin kümülatif olarak %80.8'inin toksin A/B negatif, ilk 15 günde gelişen ishallerin ise kümülatif olarak %62.6'sının toksin A/B negatif olduğu belirlenmiştir. Aynı zaman aralıklarında nötropenik olmayan grupta gelişen ishallerin ilk 7 ve ilk 15 gün için sırasıyla %87.9 ve %58.6 oranında toksin A/B negatif olduğu belirlenmiştir. Her iki grupta da antibiyotik başlangıcından yaklaşık 15 gün sonra gelişen ishallerin toksin A/B negatiflik oranlarını değiştirmedeği gözlenmiştir (Log Rank-Mantel Cox-, $p > 0.05$). Sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.

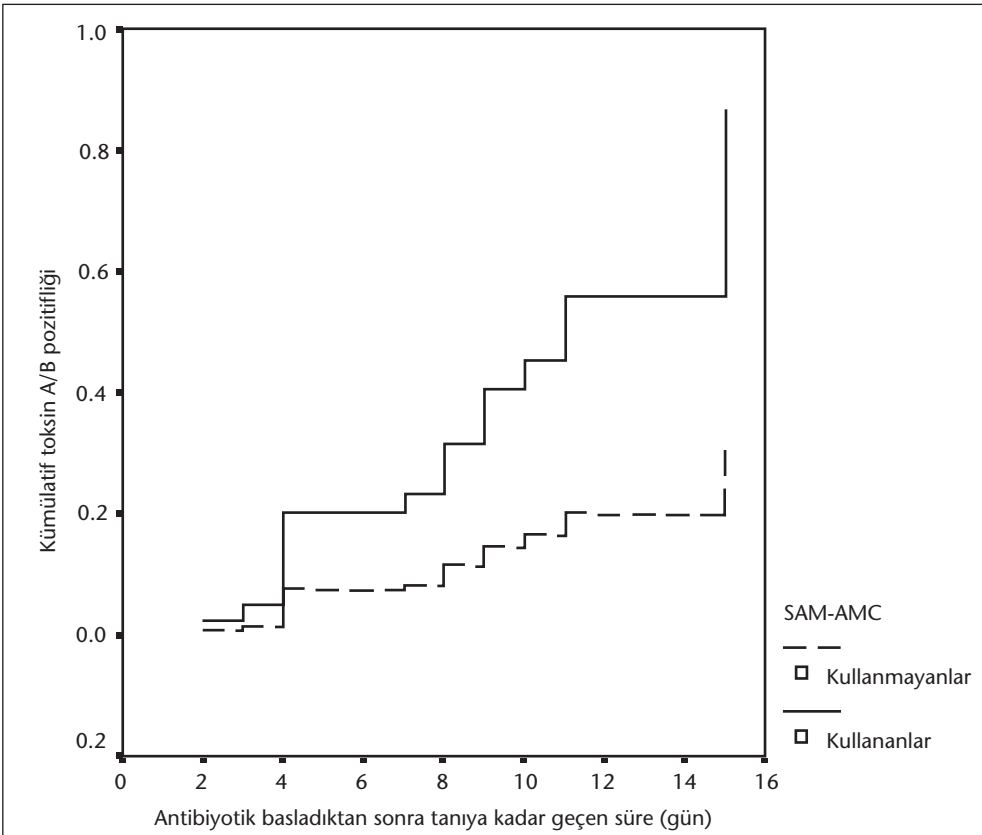
Her iki grupta toksin A/B pozitifliğine katkısı olan faktörlerin belirlenmesi amacıyla ilgili değişkenler Cox regresyon analizine tabi tutulmuştur. Doğrusal Cox analizi için gerekli varsayımlar test edilerek nötropenik olmayan grupta yaş, cinsiyet, tanı alana kadar geçen hastanede yatma süresi (gün), ampisilin-sulbaktam (SAM) veya amoksisilin-klavulanik asit (AMC) kullanımından oluşan modeller, nötropenik olan grupta ise SAM veya AMC kullanımı olmadığı için antibiyotikler genellenip beta-laktam ± kombinasyonu olarak modele alınmıştır. Nötropenik olmayan grupta cinsiyet, yaş ve tanı alana kadar geçen hastanede yatma süresi bir risk faktörü olarak tanımlanmazken (hepsi için $p > 0.05$), SAM veya AMC kullanımının bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. İlgili değişkenlerden



Şekil 1. Toksin A/B negatifliği için gözlenen kümülatif oranlar. Kesikli çizgiler nötropenik grubu, sürekli çizgiler nötropenik olmayan grubu temsil etmektedir ($p > 0.05$). "+" işaretli olgular inceleme süresi içinde toksin A/B negatif saptanan olgulardır.

oluşturulan bu model içerisinde SAM veya AMC kullanımının diğer antibiyotiklere göre toksin A/B pozitif ishale yol açma olasılığının 2.8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Model içinde SAM veya AMC kullanımı tek değişken olarak girildiğinde $p = 0.047$ olarak saptanırken, belirtilen diğer değişkenlerle birlikte girildiğinde $p = 0.049$ olarak saptanmıştır. Böylelikle, nötropenik olmayan grupta belirtilen değişkenlerle oluşturulan modelde SAM veya AMC kullanımının bağımsız bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Nötropenik olmayan grupta SAM veya AMC kullanımının kümülatif toksin A/B pozitifliği üzerine etkisi Şekil 2’de gösterilmiştir.

Aynı değişkenlerle nötropenik grup için kurulan modelde yaş, cinsiyet, tanı alana kadar geçen hastanede yatma süresinin toksin A/B pozitifliğine anlamlı sınırdan etkide bulunmadığı saptanmıştır (tüm değişkenler için $p > 0.05$). Nötropenik grupta beta-laktam grubu antibiyotik kullanımının anormal bir dağılıma sahip olması nedeniyle (kullanan $n = 71$, kullanmayan $n = 3$) anlamlı bir istatistiksel analiz gerçekleştirilememiştir.



Şekil 2. Nötropenik olmayan grupta SAM veya AMC kullanımının kümülatif toksin A/B pozitifliği üzerine etkisi. Bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanan SAM veya AMC kullanımı, toksin A/B pozitif ishal için 2.8 kat gibi bir risk oluşturmaktadır ($p < 0.05$, %95 güven aralığı 1.012-7.478).

TARTIŞMA

Antibiyotikle ilişkili ishal, gerek ayaktan izlenen gerekse hastanede yatan hastalarda önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. *C.difficile*'yi bu derece önemli yapan unsur, spor yapabilme özelliği ve sporların enfektivitelerini kaybetmeden çevrede uzun süre canlı kalabilmesi olarak belirtilmektedir⁸. *C.difficile*'ye bağlı enfeksiyonların sıklığının, yapılan çeşitli çalışmalarda, çalışılan hasta grubunun özellikleri ve kurumların farklılıkları nedeniyle değiştiği gözlenmiştir³. Öztürk ve arkadaşları⁹ yaptıkları çalışmada, antibiyotik sonrası ishal gelişen olguların %34'ünde ELISA ile toksin A varlığı belirlemiştir. Ercis ve arkadaşlarının¹⁰ yaptıkları diğer bir çalışmada da, antibiyotik sonrası ishal gelişen olguların %9.4'ünde toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. Karaer ve arkadaşları¹¹ ise, sağlıklı bireylerin %5.2'si ile ishalleri hastaların %7.7'sinin dışı örneklerinde *C.difficile* üretmişler ve sadece ishalleri hastaların %0.8'inde toksin A/B pozitifliği saptamışlardır. Boral¹², 1998-2000 yılları arasında 360 örnekte toksin A'yı %4.7; 2000-2002 yılları arasında 400 dışkıda toksin A/B'yi %12 oranında saptamıştır. Aygün ve arkadaşları¹³ da, hastanede yatarak ishal gelişen 125 hastada *C.difficile* pozitifliğini %3.2 olarak bulmuştur. Ancak aynı merkezde Öztürk ve arkadaşlarının⁹ çalışmasında, hematoloji ve onkoloji servislerinde antibiyotik sonrası ishal gelişen olguların %25.8'inde *C.difficile* toksin pozitifliği saptandığı bildirilmektedir. Samra ve arkadaşları¹⁴, 530 dışkı örneğinden %8.9'unu toksin A kiti ile, %20.4'ünü ise toksin A/B kiti ile pozitif bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise *C.difficile* toksin A %14, toksin A/B %22.8 oranında pozitif saptanmıştır. Oranlar arasındaki farklılıklar; kullanılan kitlerin farklılığına, örneklerin saklanma ve incelenmesindeki yöntem farklılıklarına, hasta popülasyonlarının farklılığına, hastanelerin antibiyotik kullanım politikalarının farklılığına, hastaların hastanede yatış süreleri ve altta yatan hastalık varlığına ve hastane enfeksiyon kontrol önlemleri arasındaki farklılıkların enfeksiyon sıklığına etkisiyle açıklanabilir.

C.difficile toksininin saptanmasında kullanılacak örneklerin saklama koşulları büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, ısının fekal toksin denatürasyonuna yol açtığını göstermiştir¹⁵⁻¹⁷. 22°C'de saklanan örneklerde sitotoksinin 2 log azaldığı; 4°C'de saklanan toksin pozitif dışkı örneklerinde ise 52 gün sonra toksin A'nın negatifleştiği belirtilmekte ve uzun süreli saklamaların -70°C'de yapılması gerektiği vurgulanmaktadır^{16,17}. Bizim çalışmamızda da hemen çalışılamayacak dışkı örnekleri, toksin denatürasyon olasılığı nedeniyle -80°C'de muhafaza edilmiştir.

C.difficile tanısında altın standart, dışkı kültüründen bakterinin izolasyonu ve toksin üretiminin doku kültüründe sitotoksinite testi ile gösterilmesidir. Ancak bu yöntem pahalı, zaman alıcı (24-48 saat) ve her laboratuvarında uygulanma imkanı olmayan bir yöntemdir. *C.difficile* toksin varlığının rutin laboratuvarlarda, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan ELISA ile araştırılması önerilmekte, diğer tanı testleri (lateks aglutinasyon, karşılıklı immünoelektroforez ve floresan antikor tekniği ise duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle önerilmemektedir^{1,2,15}. Staneck ve arkadaşlarının¹⁸ yaptığı çok merkezli bir çalışmada, dört farklı metodun duyarlılıkları incelenmiş ve kültürle sitotoksin saptama %90, immünokartla %85, sitotoksin değerlendirmeye %82 ve lateks aglutinasyonla %67 olarak belirlenmiştir.

F serogrubunda olan suşların toksin A negatif, toksin B pozitif olabilmesi nedeniyle sadece toksin A belirlenmesine yönelik ELISA kitlerinin, bu suşlar için tanı duyarlılığının düşük olabilmesi söz konusudur¹⁹. Bu nedenle toksin A/B'nin saptanmasına yönelik ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir. Lyster ve arkadaşları²⁰, hücre kültüründe toksin pozitif bulunan 102 dışkı örneğini, toksin A/B kiti ile değerlendirmişler, örneklerin 2 (%1.9)'ünde toksin A negatif, toksin B pozitif izolat tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, toksin A/B'yi saptayan bir ELISA kiti ve karşılaştırma yapmak amacıyla da toksin A saptayan bir immünokromatografik test kullanılmıştır. Toksin A/B pozitif bulduğumuz 34 olgudan 13 (%38.2)'ünde toksin A negatif olarak saptanmıştır. Toksin A/B için elde ettiğimiz toplam pozitiflik %22.8, toksin A için ise %14.1 olup, sonuçlar arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Benzer şekilde Balaban ve arkadaşları²¹, antibiyotige bağlı ishal gelişen hastalarda ELISA ve immünokromatografik test ile *C.difficile* toksin A'yı araştırdıkları çalışmalarında, her iki yöntemle de %9 pozitiflik bulmuşlardır. *C.difficile* enfeksiyonlarının belirlenmesinde, pratik ve duyarlı bir yöntem olması nedeniyle immünokromatografik test ile toksin A saptanması da rutin tanıda kullanılabilir bir yöntemdir.

Antibiyotik kullanımı, ülkeler, bölgeler ve hatta hastaneler arasında farklılık göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar, *C.difficile*'ye bağlı ishallerden en sık sorumlu olan antibiyotiklerin, ülkelere ve bölgelere göre değişmekle birlikte beta-laktamlar, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, kinolonlar, sefalosporinler, aminoglikozidler, klindamisin ve geniş spektrumlu penisilinler olduğunu göstermektedir^{10,22-24}. Bizim çalışmamızda en sık beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları ve kinolonların öne çıktığı gözlenmiştir. Çalışmamızda nütropenik olmayan grupta sulbaktam-ampisilin veya amoksisilin-klavulanik asit kullanımının diğer antibiyotiklere göre toksin pozitif ishale yol açma olasılığı literatürle uyumlu olarak 2.8 kat daha fazla saptanmıştır²⁵.

C.difficile'ye bağlı ishalde diğer bir önemli risk faktörü de ileri yaş (> 65 yaş) olarak belirlenmiştir^{3,4,25-27}. Çalışmamızda, olgularımızın yaş ortalaması görece olarak düşük (nütropenik grup: 41.78 ± 14.3 yıl, nütropenik olmayan grup: 44.09 ± 15.6 yıl) olup, 65 yaşın üzerindeki hasta sayısı azdır (9 olgu). Bu nedenle ileri yaş, bir risk olarak ortaya çıkmamış ve yapılan risk faktörü analizinde, yaşın toksin pozitifliği üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

C.difficile'ye bağlı ishalde diğer önemli risk faktörlerinden birisi de altta yatan hastalık varlığıdır⁴. Buchner ve arkadaşları²⁸, altta yatan birden fazla hastalığı olan kişilerde *C.difficile*'ye bağlı ishale yakalanma riskinin fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ercis ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında, *C.difficile* saptanan olguların %50'sinde altta yatan hastalık varlığı tespit edilmiş, bunlar arasında en sık rastlanılanların kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve böbrek hastalığı olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda, nütropenik hastalarda görülme sıklığı olarak diğer hasta grubundan farklı sonuç elde etmemiş olmamız, bu grupta en sık kullanılan antibakteriyellerin *C.difficile* enfeksiyonuna sıklıkla yol açan antibiyotikler olmasıyla açıklanabilir. Hastaların nütropeni durumları, primer hastalıklarına ve verilen kemoterapiye bağlı olarak gelişmiştir. Çalışmalarda, antineoplastik ilaçlar tek başlarına bağımsız bir risk faktörü olarak gösterilememiş olsa da, özellikle metotreksat, paklitaksel, sisplatin gibi kanser ilaçlarının *C.difficile* enfeksiyonu için riski artırdığı bildirilmiştir^{5,7,25}.

C.difficile'ye bağlı ishalde diğer önemli risk faktörlerinden biri de hastanede yatış süresidir. *C.difficile* ishal insidansı, dört haftanın üzerinde hastanede yatış öyküsü, altta yatan hastalık ve kullanılan antibiyotiğin türüne bağlı olarak artmaktadır^{4,5}. Yapılan bir çalışmada, *C.difficile* ishalinin bir hastane enfeksiyonu olup olmadığı irdelenmiş ve hiçbir predispozan faktör tanımlanmayan 37 kişinin %10.8'inin dışkısından hastaneye yattıktan 30 gün sonra *C.difficile* izole edilmiştir²⁹. Bir başka çalışmada da, hastanede yatan hastalarda kolonizasyon oranı %17-30 iken, poliklinik hastalarında %1-3 olduğu belirtilmiştir⁶. Hastanede gelişen enfeksiyon için bilinen önemli bir risk faktörü de, enfekte hasta ile aynı odanın paylaşılmasıdır. Böylece hastadan hastaya veya çevreden hastaya çapraz bulaşma ile enfeksiyon gelişmektedir. Hastanede *C.difficile* taşıyan oda arkadaşı ile kalan kişilere *C.difficile* bulaşı, tek kişilik odada yatan ya da oda arkadaşı *C.difficile* negatif olan kişilere göre daha kısa sürede olmaktadır (3.2 güne karşı 18.9 gün)³⁰.

Çalışmamızın verileri, nötropenik grupta enfeksiyonun daha erken geliştiği, toksin pozitiflerde tanıya kadar geçen hastanede yatma ve antibiyotik kullanım sürelerinin anlamlı ölçüde daha kısa olmasıyla gösterilmiştir. Aynı karşılaştırma nötropenik olmayan grup için yapıldığında ise, toksin pozitif ve negatifler arasında hastanede yatma sürelerinin anlamlı düzeyde farklı olmadığı, ancak tanıya kadar geçen sürede antibiyotik kullanım süresinin anlamlı fark gösterdiği izlenmiştir. Nötropenik grupta *C.difficile* ishalinin daha kısa sürede gelişmesinin nedenleri olarak, tekrarlanan antibiyotik kullanımı, kemoterapiler, hastalığa veya ilaçlara bağlı gelişen mukozitler ve hastanede yatma sürelerinin uzun olması ile daha erken dönemde kolonize olmaları gösterilebilir. Sonuç olarak, önemli bir nozokomiyal gastroenterit etkeni olan *C.difficile* sıklığının azaltılması, yeterli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve uygun antibiyotik kullanım politikaları ile sağlanabilir. Bununla birlikte hastalara uygun tedavi için *C.difficile* tanısının doğru ve hızlı şekilde yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol 1997; 92: 739-50.
2. Thielman NM. Antibiotic-associated colitis, pp: 1249-63. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
3. Donald EF. *Clostridium difficile* infection, pp: 51-75. In: Moellering RC, Jr (ed), Emerging Pathogens: Implications for the Future. 2000. PharmaLibri, Montreal, Chicago.
4. Bignardi GE. Risk factors of *Clostridium difficile* infection. J Hospital Infect 1998; 40: 1-15.
5. Gorschluter M, Glasmacher A, Hahn C, et al. *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. Clin Infect Dis 2001; 33: 786-91.
6. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 405-10.
7. Hsu MS, Wang JT, Huang WK, Liu YC, Chang SC. Prevalence and clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a tertiary hospital in northern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39: 242-8.
8. McFarland LV, Stanme WE. Review of *Clostridium difficile* associated diseases. Am J Infect Control 1986; 14: 99-103.

9. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Eroğlu C, Aygün G, Okyay K. İshalli olgularda ELISA yöntemi ile *Clostridium difficile* toksin A aranması. 5. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 4-6 Eylül 1995, İstanbul. Kongre Kitabı, s: 101.
10. Ercis S, Ergin A, Haşcelik G. Six years evaluation of *Clostridium difficile* associated diarrhea. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 45-50.
11. Karaer P, Yarkan F, Alhan E, Köksal F. İshalli ve asemptomatik kişilerin dışkılarında *Clostridium difficile* toksinleri ile diğer enterik patojenlerin insidansı. 5. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 4-6 Eylül 1995, İstanbul. Kongre Kitabı, s: 101.
12. Boral Ö. *C.difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 32: 220-4.
13. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+ B araştırılması. Ankem Derg 2002; 16: 82-4.
14. 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: 189-92.
15. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 29-40.
16. Bowman RA, Riley TV. Isolation of *Clostridium difficile* from stored specimens and comparative susceptibility of various tissue culture cell lines to cytotoxin. FEMS Microbiol Letters 1986; 34: 31-5.
17. Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl C): 13-9.
18. Stanek JL, Weckbach LS, Allen SD, Sider JA. Multicenter evaluation on four methods for *Clostridium difficile* detection: immunocard *C.difficile* cytotoxin assay culture and latex agglutination. J Clin Microbiol 1996; 34: 2718-21.
19. Depitre C, Delmée M, Avesani V. Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A. J Med Microbiol 1993; 38: 434-41.
20. Lysterly DM, Neville LM, Evans DT. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* tox A/B test. J Clin Microbiol 1998; 36: 184-90.
21. Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Güvener E. *Clostridium difficile*'ye bağlı enfeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2001; 35: 211-8.
22. 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: 175-8.
23. Wistrom 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.
24. Settle CD, Wilcox MH, Fawley WN, Corrada OJ, Hawley PM. Prospective study of the risk of *Clostridium difficile* diarrhea in elderly patients following treatment with cefotaxime or piperacillin-tazobactam. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12: 1217-23.
25. Oldfield EC 3rd. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: risk factors, diagnostic methods, and treatment. Rev Gastroenterol Disord 2004; 4: 186-95.
26. Djuretic T, Wall PG, Brazier JS. *Clostridium difficile*: An update on its epidemiology and role in hospital outbreaks in England and Wales. J Hospital Infect 1999; 41: 213-8.
27. Kyne L, Farrell RJ, Kelly CP. *Clostridium difficile*. Gastroenterol Clin N Am 2001; 30: 753-77.
28. Buchner AM, Sonnenberg A. Medical diagnoses and procedures associated with *Clostridium difficile* colitis. Am J Gastroenterol 2001; 96: 766-72.
29. Beşirbellioğlu AB, Görenek L, Dizer U, Hacıbektaşoğlu A. GATA Eğitim Hastanesinde nozokomiyal *Clostridium difficile* kolonizasyonu sıklığı. Hastane Enfeksiyon Derg 1997; 1: 158-62.
30. McFarland LV, Mulligan ME, Kwak RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 1989; 320: 204-10.