

Antibiyotiğe Bağlı Diyarelerde *Clostridium difficile*'nin Yeri

Celalettin Ovaran, Şaban Çavuşlu, M. Fevzi Özsoy, Kenan Keskin, O.Şadi Yenen

Özet: Bu çalışmada Nisan 1993-Eylül 1994 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde antibiyotik tedavisi gören hastalardan, antibiyotik kullanımından sonra diyare şikayeti başlayan 97'sinden alınan dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* varlığı sikloserin sefoksitin früktoz agar (CCFA)'da kültür yöntemiyle, *C. difficile* toksin A varlığı ELISA yöntemiyle (Premier, Meridian Diagnostics), *C. difficile* ortak antijeninin varlığı lateks yöntemiyle (Meritec, Meridian Diagnostics) araştırılmıştır. 97 dışkı örneğinin 19'unda (% 19.6) *C. difficile* ortak antijeni varlığı gösterilmiş, 15'inde (% 15.5) kültür pozitifliği bulunmuştur. Örneklerden 37 tanesinde CCFA kültür, lateks aglütinasyon ve ELISA yöntemleri aynı anda uygulanmıştır. 37 örnekten 6'sında (% 16.2) toksin A pozitifliği, 8'inde (% 21.6) ortak antijen pozitifliği, 5'inde (% 13.5) ise kültür pozitifliği saptanmıştır. Bulduğumuz oranlar daha önceden yurtdışında yapılan çalışmalarda elde edilen oranlarla uyumludur. Elde edilen sonuçlar diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de *C.difficile*'ye bağlı diyarelerin dikkatle gözlenmesi gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Clostridium difficile*, antibiyotik, diyare.

Summary: Importance of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated diarrheas. In this study, between April 1993-September 1994 in the fecal specimens taken from 97 of the patients who had diarrhea after the antibiotic therapy evaluated for the presence of *Clostridium difficile* by Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (CCFA) culturing method, *C. difficile* toxin A by ELISA method (Premier, Meridian Diagnostics), *C. difficile* common antigen by latex method (Meritec, Meridian Diagnostics). Presence of *C. difficile* common antigen has shown in 19 of 97 fecal samples (19.6%), and *C. difficile* found positive by CCFA culturing method in 15 fecal samples (15.5%) CCFA culturing, latex agglutination and ELISA methods were performed at the same time in the 37 of the fecal samples. Of the 37 samples, 6 (16.2%) was positive for toxin A, 8 (21.6%) was positive for common antigen, and 5 (13.5%) was positive by CCFA culturing methods. Our results are similar to those of obtained in other countries before. The results shown us that we have to keep on careful observation about diarrhea caused by *C. difficile* as in other countries.

Key Words: *Clostridium difficile*, antibiotic, diarrhea.

Giriş

Günümüzde infeksiyonların kontrolü ve tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılan antibiyotikler, sağladıkları faydalar yanında birtakım istenmeyen etkilere de sahiptirler. Bunlar arasında, kullanılan antibiyotiklerin kolon florasına etkileyip diyarelere neden olmaları ve *Clostridium difficile*'nin neden olduğu psödomembranöz kolit (PMK)'e zemin hazırlamalarını da sayabiliriz. 1970'lerin sonlarına doğru, *C. difficile* artan görülme sıklığı ile birlikte önemli bir enterik patojen olarak kabul edilmeye başlanmıştır (1). Bu hastalığın fizyopatolojisinin anlaşılmasına başlanması tanı ve tedavide gelişmeleri de beraberinde getirmiştir.

C.difficile konakta asemptomatik taşıyıcılıktan PMK, megakolon ve perforasyona kadar uzanan, oldukça farklı tablolara yol açar. Hastaların mikroorganizmaya yanıtındaki bu farklılıkların nedeni tam olarak anlaşılmamıştır. Yine de bu durumun suşlar arasındaki farklardan, konaktaki toksin reseptörlerinin farklılığından ya da immün yanıt farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (2,3).

C.difficile iki tip toksin yapar. Birincisi enterotoksin (toksin A), diğeri sitotoksin (toksin B)'dir. Bununla birlikte toksin üretmeyen suşlar da izole edilmiştir (4). *C.difficile* sporları her yerde bulunabilirse de özellikle antibiyotik kullanımı sonrasında intestinal floranın değişmesiyle burada kolonize olurlar.

Genelde, hastalarda görülen rölapslar ilk infeksiyonu meydana getiren suşun reinfeksiyonu ile ortaya çıkar (5,6). Hastane salgınları da aynı suşun hastadan hastaya bulaşmasıyla görülür (1,7).

Tüm antibiyotiklerin *C.difficile* kolitiyle ilişkili olduğu söylenmekle birlikte, buna en çok neden olanların başında ampisilin, klindamisin, sefalosporinler, aminoglikozidler ve bunların kombinasyonlarının geldiğine inanılmaktadır (8). Antibiyotiklerin kolon bariyerini nasıl bozduğu hakkında pek fazla birşey bilinmemekle birlikte, kolonda *C.difficile* kolonizasyonunun *Bacteroides*'lerin

varlığını yitirmesine bağlı olduğuna dair birtakım ipuçları vardır (9).

Antibiyotik kullanımının barsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten 6 hafta sonrasına kadar sürmekte, bu süre zarfında *C. difficile*'ye bağlı kolitler ortaya çıkabilmektedir.

Özellikle tanının geciktiği ciddi olgularda kolon mukozasının tüm katları psödomembranlar tarafından tutulur. Perforasyon, apse formasyonu, vasküler trombüsler PMK'in cerrahi örneklerde ya da otopsi materyallerinde görülebilen geç komplikasyonlardır (10).

C.difficile için günümüzde kullanılan başlıca tanı yöntemleri arasında anaerob kültür, toksin B için sitotoksin testi, toksin A ve B için ELISA, "dot immunobinding assay" ve lateks aglütinasyon yöntemleri sayılabilir. Dışkı örneklerinde 10 pg'lık sitotoksin (toksin B)'i tespit edebilme yeteneği nedeniyle hücre kültürleri altın standart olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada antibiyotik kullanımından sonra diyare yakınması başlayan kişilerden alınan dışkı örneklerinde kültür, lateks ve ELISA yöntemlerini uygulayarak *C.difficile*'nin böyle vakalarda ne oranda etken olduğunu saptamaya amaçladık.

Yöntemler

Bu çalışmada Nisan 1993-Eylül 1994 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde antibiyotik kullanımı sonrasında ishal yakınması başlayan 97 hastadan alınan dışkı örneklerinde *C.difficile*'nin ve *C.difficile* toksin A'nın varlığı araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda ve alınan dışkı örneklerinde başlıca şu kriterler aranmıştır: [1] Dışkıların şekilsiz ve sulu olması; [2] en az iki gün süren, günde üç kez veya daha fazla sayıda sulu ya da şekilsiz dışkılama olması; [3] semptomlar başlamadan 8 hafta öncesine kadar antimikrobiyal tedavi alınmış olması, [4] diğer bir diyare etkeninin saptanamamış olması; [5] antibiyotik kesilmesiyle semptomlarda düzelme görülmesi.

Alınan tüm dışkı örnekleri sırasıyla makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Makroskopik inceleme de dışkının görü-

Tablo 1. Dışkı Örneklerinde Lateks Aglütinasyon ve CCFA'da Kültür Yöntemleriyle Pozitiflik Oranları (n= 97)

Yöntem	Pozitiflik	
	Sayı	(%)
Lateks aglütinasyonu ile ortak antijen	19	(19.6)
CCFA'da kültür	15	(15.5)

nümü, kan veya mukus bulunup bulunmadığı kontrol edilmiş, sonra dışkının mikroskopik incelenmesine geçilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda paraziter bir diyare etkeni saptanamayan dışkı örneklerinde patojen mikroorganizma ve toksin araştırmak için sırasıyla EMB veya MacConkey besiyerinde kültür, sikloserin sefoksitin fruktoz agar (CCFA)'da kültür, *C. difficile* ortak antijeni varlığı için lateks aglütinasyon, *C. difficile* toksin A için ELISA yöntemleri uygulanmıştır.

CCFA besiyerinin hazırlanmasında *C. difficile* Agar Base (Oxoid) ve *C. difficile* Supplement (bioMerieux)'tan yararlanılmıştır. Anaerob kavanozda bekletilen CCFA besiyerleri ekim için çıkarılmış, ihtiyaç duyulanlar ekim için kullanılmış, diğerleri ise tekrar hemen kapatılarak depolanmalarında anaerob ortamın sürekliliği sağlanmıştır. Dışkı örneklerinden direkt olarak özüyle CCFA besiyerine ekim yapılmıştır. Anaerob ortamda 36-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda besiyerleri *C. difficile*'ye özgü 2-5 mm çapında, kenarları yuvarlak, sarı-yeşilimsi kolonilerin varlığı açısından araştırılmıştır. Kolonilerin ultraviyole ışınları altında floresans verip vermediklerine bakılmıştır. Koloniler Gram yöntemiyle boyanarak ışık mikroskopunda Gram-pozitif, subterminal-terminal sporlu basillerin varlığı açısından incelenmiştir. Üreyen Gram-pozitif çomaklara biyoşimik testler uygulanmış ve jelatin hidrolizi pozitif, süt sindirimi negatif, glikoz pozitif, sükröz negatif, nişasta negatif, laktöz negatif, mannoz pozitif/negatif, ksiloz negatif, mannitol pozitif/negatif, indol negatif, lesitinaz negatif, lipaz negatif, üreaz negatif, eskülin hidrolizi pozitif, hidrojen oluşturma pozitif bulunanlar *C. difficile* olarak kabul edilmiştir.

Dışkıda *C. difficile* ortak antijeni varlığını araştırmak için ticari bir lateks kiti (Meritec, Meridian Diagnostics) kullanılmıştır. Lateks çalışması için kit saklanmakta olduğu buzdolabından alınarak, oda ısısına gelinceye kadar bekletilmiştir. Dışkı örneği üzerine sulandırıcı eklenerek homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış, daha sonra 1200 rpm'de santrifüje edilmiştir. Santrifüjasyon sonrası 50 µl süpernatant ile 50 µl test sıvısı, test kartı üzerinde karşılaştırılarak üç dakika içinde aglütinasyon olup olmadığı gözlemlenmiştir. Aglütinasyon olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A araştırılması için hazırlanmış ticari bir ELISA kiti (Premier, Meridian Diagnostics) kullanılmıştır. Çalışma sırasında kit saklanmakta olduğu buzdolabından alınarak, oda ısısına ulaşmaya kadar beklenmiştir. Çalışılacak olan örnek sayısına ek olarak bir pozitif, bir de negatif kontrol için gerekli sayıda kuyucuk ayrılmıştır. Kullanılmayan kuyucuklar hemen paketine kaldırılmıştır. Test prosedürü üretici firmanın kit kılavuzunda belirttiği şekilde uygulanmıştır.

Sonuçlar

İncelediğimiz 97 dışkı örneğinde hem CCFA'da *C. difficile* kültürü yapılmış, hem de lateks aglütinasyon ile *C. difficile* ortak antijeni araştırılmış ve sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Dışkı örneklerinin 37'sinde CCFA'da kültür, lateks aglütinasyon ve toksin A için ELISA yöntemleri aynı anda uygulanmış ve bu sonuçlar da Tablo 2'de gösterilmiştir.

İrdeleme

Di Persio ve arkadaşları (11), 1991 yılında 328 dışkı örneğinde CCFA'da kültür, lateks aglütinasyon, hücre kültüründe toksin ara-

Tablo 2. Dışkı Örneklerinden ELISA, Lateks ve CCFA'da Kültür Yöntemlerinin Aynı Anda Uygulandığı Grupla Pozitiflik Oranları (n=37)

Yöntem	Pozitiflik	
	Sayı	(%)
ELISA ile toksin A	6	(16.2)
Lateks aglütinasyonu ile ortak antijen	8	(21.6)
CCFA'da kültür	5	(13.5)

tırılması ve dışkıda ELISA ile toksin A araştırılması yöntemlerini aynı anda uygulayarak *C. difficile* araştırmışlar; 52 örnekte (% 15.9) bir veya daha fazla test yöntemiyle pozitiflik bulmuşlardır. Pozitiflik bulunan örneklerin sadece 22'sinde (% 35) dört yöntemin hepsinde birden pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma sonunda ELISA ile dışkıda toksin A araştırılmasının % 87.4 duyarlılığı, % 98.1 özgüllüğe, lateks aglütinasyon yönteminin ise % 66.7 duyarlılığı, % 94.6 özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda dışkıda ELISA yöntemiyle elde edilen toksin A pozitiflik oranı (%16.2) Di Persio ve arkadaşları (11)'nin bildirdiği oranlara yakındır. Hasta seçiminde biz de bu araştırmacıların ölçütlerini kullandık. Çalışmamızda lateks aglütinasyon yöntemi ile ELISA'ya göre daha yüksek bir pozitiflik oranı (%21.6) elde edilmiş olması, bu testin özgüllüğünün ELISA'ya göre nispeten düşük olması nedeniyle pek şaşırtıcı değildir. Yine aynı olgularla yapılan CCFA kültür yöntemiyle %13.5 gibi düşük bir pozitiflik elde edilmesi ise anaerob ortam gerektiren kültür yönteminin oldukça kompleks oluşuna ve hata kaynaklarının fazlalığına bağlanmıştır.

Tompson ve arkadaşları (12)'nin 1983 yılında yaptıkları bir çalışmada antibiyotik kullanımı sonrası diyare gelişen 208 çocuk hastada *C. difficile*'nin varlığı araştırılarak % 20 oranında sitotoksin saptanmıştır. Biz çocukları çalışmamıza dahil etmemekle birlikte erişkinlerde bulduğumuz lateks aglütinasyon pozitifliği oranı bu araştırmada saptanan sitotoksin pozitifliği ile paralellik göstermektedir. Sitotoksinin varlığı *C. difficile*'nin dışkıdaki varlığı için çok güvenilir bir kanıt olsa da PMK'in asıl nedeninin toksin A olması, sitotoksin pozitifliği olan her hastanın mutlaka PMK olduğu sonucunu çıkarmamızı engellemekte ve yalnız *C. difficile* kolonizasyonu hakkında fikir verebilmektedir. Benzer bir durum da dışkıda lateks aglütinasyonu ile *C. difficile* ortak antijeni aranmasında söz konusudur. Bu yöntemle toksin olmayan suşlar ve dışkıdaki diğer anaerob bakteriler pozitif reaksiyon verebilmektedir (13).

Lusk ve arkadaşları (14) ile Pierce ve arkadaşları (15)'nin yaptıkları çalışmalarda antibiyotik kullanımından sonra ortaya çıkan diyarelerde özellikle klindamisin, ampisilin, sefalosporinler ve aminoglikozidlerin sorumlu olduğu sonucuna varılmış, hastalığın ciddiyetinin antibiyotik dozuyla ilişkili olduğu ve hastalara daha önceden lavman uygulanması, nazogastrik tüp takılması ve gastro-intestinal cerrahi uygulanması gibi durumlarda ilişkinin daha da güçlendiği bildirilmiştir. Tedesco ve arkadaşları (16) ise antibiyotik kullanımından sonra ortaya çıkan diyarelerde özellikle klindamisin rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Donta ve arkadaşları (17) çocuk kliniklerinde yaptıkları çalışmalarda sağlıklı yenidoğanlarda %10.5 oranında, yoğun bakım biriminde yatan asemptomatik yenidoğanlarda ise %55 oranında *C. difficile* sitotoksin pozitifliği saptamışlardır. İlk günlerde oldukça düşük olan sitotoksin pozitifliğinin hastalara antibiyotik vermeye başlanmasıyla birlikte artmaya başladığı ve antibiyotik uygulama süresi uzadıkça bu oranın % 85'e kadar ulaştığı bulunmuştur.

Mc Farland ve arkadaşları (1)'nin yaptıkları bir çalışmada *C. difficile* infeksiyonuna yol açan olası risk faktörleri araştırılmıştır. Antibiyotik kullanmadığı halde diyare gelişen hastalarda hasta odalarındaki kontamine eşyalar, tıbbi gereçler ve hastalarla yakın

teması olan, bakteriyeye rezervuarlık eden asemptomatik taşıyıcı hastaların ve personelin en önemli risk faktörleri olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca Larson ve arkadaşları (18) ile Al-Jumaili ve arkadaşları (19)'nın yaptıkları çalışmalarda da bulaşmadaki çevre faktörünün önemi ortaya konmuştur.

Hastaneye yatan ve diyare yakınması olmayan asemptomatik hastaların önemli bir kısmında da *C.difficile* kolonizasyonu bulunması tanıda güçlüklerle yol açmaktadır (1). Bu nedenle kültür yöntemi ve kültür dışı bir yöntemin (özellikle toksin A araştırılması) birlikte uygulanması daha uygun olacaktır. Çalışmamızda toksin A araştırması ile birlikte lateks aglütinasyon yöntemi ile *C. difficile* ortak antijeni araştırılmıştır. CCFA'da kültür ve/veya ELISA ile pozitif sonuç alınmış hiçbir örnekte lateks aglütinasyonu ile negatif sonuç alınmamıştır. Elde edilen sonuçlar kültür ve ELISA gibi uygulanması zor olan, özel teknik donanımlar gerektiren testlerden önce tarama amacıyla lateks aglütinasyon yönteminin uygulanabileceğini düşündürmektedir.

Dışkıda *C.difficile* sitotoksini varlığının gösterilmesi, lateks aglütinasyonu ile *C.difficile* ortak antijeni varlığı veya CCFA'da *C. difficile* üretilmesi değerli testlerdir. Ancak bunlardan hiçbirini tek başına *C. difficile*'ye bağlı PMK tanısı koyabilmek için yeterli de-

ğildir. Bir hastaya kesin olarak PMK diyebilmek için laboratuvar yöntemleriyle birlikte mutlaka proktosigmoidoskopi uygulamak ve lezyonları görmek gerekir.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde en güvenilir yöntem olan ELISA ile toksin A araştırılmasının sonucu olan % 16.2 oranı antibiyotik kullanımı sonrası ortaya çıkan diyarelerde *C. difficile*'nin yeri hakkında daha gerçekçi bir fikir vermektedir. Lateks aglütinasyonu ile dışkıda *C. difficile* ortak antijeni araştırılması toksik olmayan *C. difficile* suşlarının da pozitif sonuçlara neden olmasına ve diğer bakterilerin çapraz reaksiyonları nedeniyle hatalı pozitif sonuçlara yol açmaktadır (13).

CCFA'da üreyen *C. difficile* suşları toksin A üretmeyen suşlar olabilirler ve diyareye neden olmayabilirler. Bu da kültür yönteminin laboratuvar tanı yöntemi olarak güvenilirliğinin iyice düşmesine neden olmaktadır.

Bizim bulduğumuz sonuçlar Di Persio ve arkadaşları (11) ile Tompson ve arkadaşları (12)'nin de bulduğu gibi antibiyotik kullanımından sonra gelişen diyare olgularında *C. difficile*'nin rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak ülkemizdeki durumun doğru olarak saptanabilmesi için daha geniş hasta gruplarında yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Mc Farland LV, Mulligan ME, Kwok RYS, Stamm WE. Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. *N Engl J Med* 1989; 320: 204-10
2. Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, et al. Diminished Clostridium difficile toxin A sensitivity is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 1992; 90: 822-9
3. Pothoulakis C, La Mont JT, Eglow R, et al. Characterization of rabbit ileal receptors for Clostridium difficile toxin A: evidence for a receptor-coupled G-protein. *J Clin Invest* 1991; 88:119-25
4. Hafiz S, Oakley CL. Clostridium difficile: isolation and characteristics. *J Med Microbiol* 1976; 9: 136-41
5. Bartlett JG, Tedesco FJ, Shull S, Lowe B, Chang T. Symptomatic relaps after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1980; 78:431-4
6. Tedesco FJ. Treatment of recurrent antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Am J Gastroenterol* 1982; 77:220-1
7. Würst J, Sullivan NM, Hardegger U, Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J Clin Microbiol* 1982; 16:1096-101
8. Bartlett JG. Antibiotic-associated colitis. *Clin Gastroenterol* 1979; 8:783-9
9. Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing clostridium diarrhea in six patients. *Lancet* 1989; 1:1156-60
10. Bogomoletz WV. Fibrin thrombi, a cause of clindamycin-associated colitis? *Gut* 1976; 17: 483-7
11. Di Persio JP, Varga FJ, Conwell DL, et al. Development of a rapid enzyme immunoassay for Clostridium difficile toxin A and its use in the diagnosis of C.difficile-associated disease. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2724-30
12. Tompson CM, Gilligan PH, Fisher MC, Long SS. Clostridium difficile cytotoxin in a pediatric population. *Am J Dis Child* 1983; 137:271-4
13. Lyerly DM, Barosso LA, Wilkins TD. Identification of the latex test-reactive protein of Clostridium difficile as glutamate dehydrogenase. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2639-42
14. Lusk RH, Feketey FR, Silva J, et al. Gastrointestinal side-effects of clindamycin and ampicillin therapy. *J Infect Dis* 1977; 135 (Suppl): 111-9
15. Pierce PF, Wilson R, Silva J, et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis: an epidemiological investigation of a cluster of cases. *J Infect Dis* 1982; 145: 269-74
16. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers HD. Clindamycin-associated colitis. *Ann Intern Med* 1974; 81:429-33
17. Donta ST, Myers MG. Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates. *J Pediatr* 1982; 100:431-4
18. Larson HE, Barclay FE, Honour P, Hill ID. Epidemiology of Clostridium difficile in infants. *J Infect Dis* 1982; 146:727-33
19. Al-Jumaili IJ, Shibley M, Linsman AH, Record CO. Incidence and origin of Clostridium difficile in neonates. *J Clin Microbiol* 1984; 19:77-8