

Uzun Süreli Antibiyotik Tedavisi Gören İshalli Çocukların Dışkılarında *Clostridium difficile*'nin Araştırılması

Özden Büyükbaba, Emine Özkan, Ergene Büget

Özet: İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, uzun süre antibiyotik tedavisi gören ve psödomembranöz enterokolit bulguları olan 50 çocuğun dışkı örnekleri *Clostridium difficile* yönünden incelenmiştir. *C.difficile*'nin izolasyonu için, sikloserin-sefoksitin fruktoz agar (CCFA, Biolife) besiyeri kullanılmış, *C.difficile* olması olası kolonilerden saf kültür alınarak biyokimyasal özellikleri "API 20 A" sistemi ile incelenmiştir. *C.difficile* olarak tanımlanan suşlar, latex aglutinasyon deneyi (Meridian) uygulanarak doğrulanmış, toksin A oluşturup oluşturmadıkları EIA (Meridian) ile belirlenmiştir. İncelenen 50 dışkı örneğinin 12 (% 24)'sinden (*C.difficile* izole edilmiş, 12 suştan 8 (% 16)'inin toksin A oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Clostridium difficile*.

Summary: *Clostridium difficile* isolation from stools of children with diarrhea and under antibiotic treatment for a long period. In this study, stool specimens from 50 children with pseudomembranous enterocolitis symptoms, under long periods of antibiotic treatment in Department of Pediatrics, Istanbul Faculty of Medicine. With the aim of *C. difficile* isolation, cycloserin-cefoxitin fructose agar (CCFA, Biolife) was used. Pure cultures were obtained from the bacterial colonies resembling to *C. difficile*. Biochemical characteristics of these strains were investigated by using "API 20A" systems. Furthermore the strains identified by biochemical characteristics as *C. difficile* were confirmed by latex agglutination (Meridian), and production of toxin A determined by enzyme immunoassay (Meridian). As a result, 12 (24 %) *C. difficile* strains were isolated from 50 stool specimens and 8 (16%) out of 12 strains were determined as toxin A producers.

Key Words: *Clostridium difficile*.

Giriş

C. difficile, Gram-pozitif subterminal veya terminal sporlu harekelli, 0.5-2x317 µm büyüklüğünde, çomak şeklinde, zorunlu anaerob bir bakteridir. Doğada, toprakta, kumlarda, samanda, at, eşek, inek, kedi, köpek gibi hayvanların ve insanların dışkısında bulunabilir. Sağlıklı yenidoğanların gastrointestinal florasında % 46 oranında asemptomatik olarak bulunan *C. difficile* 'nin, iki yaş sonrasında oranı % 4'e düşer ve bu oran erişkinlerde de devam eder (1,2).

C. difficile, sikloserin ve sefoksitine diğer *Clostridium* 'lardan daha dirençli olduğu için özellikle bu antimikrobik ajanların ilave edildiği besiyerlerinde, örneğin sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA), sikloserin-mannitol agar (CHA) gibi besiyerlerinde en iyi ürer. Üreme için % 10 CO₂, % 10 H₂ ve % 8 N₂'li ortama gereksinim gösterir. Optimal üreme ısısı 37°C'dir.

C. difficile glikozdan asid oluşturur, salisin, sorbitol, mannitole nadiren etkilii, diğer karbonhidrallara ise etkisizdir. İndol oluşturmaz, bazı suşlar H₂S oluşturur. Proteolitik enzimleri, lipaz ve lesitinaz aktiviteci yoktur. Jelatini hidrolize etmezler. Koyun ve insan kanlarında hemoliz oluşturmaz at kanını nadiren hemoliz ederler (1,3-5).

C. difficile 'nin vejetatif şekilleri fiziksel ve kimyasal etkenlere dirençsizdir. Buna karşın sporları oda ısısında infeksiyöz özelliğini beş ay kadar korur (3).

C. difficile 'nin toksin oluşturan ve oluşturmeyen suşları vardır. Toksin oluşturan suşların ısıya duyarlı, suda eriyen ve protein yapısında olan iki tip toksini vardır. Bunlar enterotoksin A ve sitotoksin B'dir.

C. difficile toksinlerinin antijenik ve biyolojik yapıları farklıdır. Enterotoksin A, barsağın epitel hücrelerinin düzenini bozar ve hücrelerin fonksiyonu engeller (6-7). Sitotoksin B, *C. difficile* 'nin etken olduğu enterokolitlerde görüldüğü gibi antibiyotik tedavisi sonrasında çocuklarda daha sık, erişkinlerde daha ender ol-

mak üzere) sağlıklı semptomsuz bireylerde de görülebilir. Bu nedenle toksin A'nın gösterilmesi daha önemlidir (8).

Toksin A tavşanların barsağında hemorajik ödem oluşturur. Dışkılarında *C. difficile* belirlenen hastaların dışkıları filtre edildikten sonra tavşanlara şırınga edilmiş barsak düğümlenmesi ve hemorajik ödeme neden olduğu gösterilmiştir. Bu etki toksin A ile bağışıklanmış tavşan serumu ile nötralize edilmiştir (7).

Lyerly ve arkadaşları (7) 1982 yılında enterotoksin A'ya karşı elde edilmiş saf antitoksin kullanarak ELISA yöntemi ile antibiyotige bağlı koliti olan çocukların dışkılarında enterotoksin A'ya belirlemişlerdir.

Oral ve parenteral antibiyotik tedavisi sonrası ortaya çıkan psödomembranöz kolitte etkenin *C. difficile* olabileceği şüphesi, bazı antibiyotiklere dirençliliği nedeni ile ortaya çıkmıştır. Bakterinin dirençli olduğu antibiyotikler kullanıldığı zaman barsakta bu bakterilerin sayısının çoğaldığı, enterotoksin konsantrasyonunun yükseldiği ve klinik semptomların ortaya çıktığı düşünülmektedir (9,10). Antibiyotik tedavisi olan erişkinlerde taşıyıcılık oranı % 46'ya kadar çıkar (11). *C. difficile* 'ye bağlı diyare veya psödomembranöz kolit (PMC) gelişmesinde bütün antimikrobik ajanlar ve kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapötik maddeler sorumlu tutulmaktadır. Kalınbarsak stazi olanlar, kalınbarsak ameliyatı sonrası barsak fonksiyonları durmuş olanlar ve ender olarak da herhangi bir risk faktörü bulunmayan kişiler *C. difficile* 'nin etken olduğu gastrointestinal hastalığa yakalanabilirler. Bugünkü bulgulara göre *C. difficile* enterokolitleri genelde ampisilin, klindamisin, sefalosporin, linkomisin gibi antibiyotiklere yapılan tedavilere bağlanmıştır (2-12).

Antibiyotik tedavisi olanlarda *C. difficile* 'ye bağlı olarak ortaya çıkan PMC olgularında, çoğunlukla hastaların genel durumlarının kötü olmamasına karşın bazen çok şiddetli semptomların da ortaya çıkabileceği bildirilmektedir. Semptomlar genelde antibiyotik tedavisinden bir hafta sonra başlar. Bazen de tedavinin bitiminden dört hafta sonra görülebilir. Biyopsi ile ispatlanmış enterokolitlerde günde 10-20 kez sulu dışkılama görülebilir. Hastaların bir kısmının dışkılarında kan ve mukus görülür. Abdominal ağrılar hafiften çok kuvvetliye kadar değişebilir. En şiddetli

Tablo 1. İzole Edilen *C.difficile* Suşlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Spor morfolojisi	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskülin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melobiyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sakaroza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Selobiyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: Terminal spor

komplikeasyon kalıbarsak perforasyonu ve ölümdür. Hastaların çoğunda ateş yüksektir ve dışkılarında polimorf nüveli lökositler hakimdir (10). Kesin tanı dışkıdan mikroorganizmanın izole edilmesi ve toksin varlığının gösterilmesi ile konur. Tedavide kullanılan antibiyotikler oral vankomisin ve metronidazoldür (13). Vankomisin tedavisi ile kesin sonuçlar alınmakta ise de bu antibiyotiği kullananlarda reinfeksiyonlara rastlanmaktadır. Bu olay büyük olasılıkla hastaların yeterli dozda veya sürede tedavi olmamaları nedeni ile barsaktaki *C. difficile* sporlarının vejetatif hale geçmeleri şeklinde açıklanmaktadır.

Yöntemler

Dışkı örneklerinden *C. difficile*'nin izolasyonu için, dışkı örneklerinde, dışkıdan normal flora bakterilerinin üremelerine engel olmak amacı ile "alkol şok" reaksiyonu uygulanmıştır. Bu amaçla dışkı örneklerine eşit miktarda % 95'lik etil alkol ilave edilerek iyice homojenize edilmiş ve bir saat oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda dışkı örnekleri % 5 defibrine at kanı ilave edilerek, sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA) (Biolife) besiyerine ekilmiştir (D-sikloserin 250 mg, sefoksitin 8 mg) % 6 CO₂ ve % 94 H₂ gazı içeren (Anapak, Pasteur) anaerob kavanozlarda 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Besiyerlerinde gri-beyaz, tümsek, düzgün olmayan 4-6 mm çapında *C. difficile* olması olası koloniler Gram yöntemi ile boyanmış terminal veya subterminal oval sporlu Gram-pozitif kolonilerden saf kültür alınmıştır. Saf kültürlerden lateks aglütinasyonu (Meridian) yapılarak suşların *C. difficile* olduğu doğrulanmış; "API 20 A" ile indol oluşumu, jelatin, eskülin indirgeme, gliserol, mannitol, salisin, sorbitol gibi karbonhidratlara etkisi, üreaz aktivitesi ile arabinoz, glikoz, ksiloz, laktoz, mannoz, maltoz, melobiyoz, rafinoz, ramnoz, sakaroz, selobiyoz ve trehaloz gibi şekerlere etkileri incelenmiştir.

İzole edilen *C. difficile* suşlarının toksin A oluşumu EIA (Meridian) ile araştırılmıştır.

Sonuçlar

İncelenen 50 dışkı örneğinin 12'sinden (% 24) *C. difficile* izole edilmiş, izole edilen 12 suştan 8'inin (% 16) EIA ile toksin A oluşturduğu belirlenmiştir.

İzole edilen 12 *C. difficile* suşunun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İrdeleme

C. difficile ilk kez 1935 yılında Hall ve O. Tooele (14) tarafından iki hafta ile bir yaş arasındaki semptomsuz çocukların dışkılarında yapılan taramalarda % 40 oranında izole edilmiştir. Bakterinin izolasyonunun güç olması nedeni ile "difficult=güç" anlamında *C. difficile* adı verilmiş ve uzun yıllar bu bakterinin herhangi bir patolojiye yol açabileceği kabul edilmemiştir (15).

Bartlett (16) antibiyotik sonrası gelişen kolitlerin büyük bir bölümünden *C. difficile*'yi sorumlu tutmuş; Hawkins (17) *C. difficile* suşundan hazırladığı bakterisiz süspansiyonu hamsterlere şırınga ederek enterokolit geliştiğini göstermiş; 1978'de ise George ve arkadaşları (18) psödömembranöz kolitli hastaların dışkılarından *C. difficile* toksinini izole etmişlerdir.

İstatistik bilgilere göre akut barsak infeksiyonlarının İngiltere'de % 5.5'inin İsviçre'de ise % 4.3'nün *C. difficile* ile meydana geldiği bildirilmektedir (6). Yurdumuzda bu konuda yapılan ayrıntılı bir çalışma yoktur. Bu çalışmada ise oran % 24 olarak bulunmuştur.

Fekety (19) *C. difficile*'nin psödömembranöz kolitin ana etkeni olduğunu ve bu olguların % 19'undan sorumlu olduğunu bildirmiştir (20).

Bir çalışmada *C. difficile*'nin antibiyotiğe bağlı diyarelerdeki etkinliği araştırılmış; % 33'ünde *C. difficile* izole edilmiş ve % 50'sinde de sitotoksin belirlenmiştir (21).

Yaşları 4-17 arasında değişen 10 çocukta antibiyotiğe bağlı gelişen psödömembranöz kolit olgularının dokuzundan *C. difficile* izole edilmiş ve dokuz suşun tümünün sitotoksin oluşturduğu belirlenmiştir (22, 23).

İki yaşından küçük çocuklara hizmet veren üç adet bakımevinde üçbuçuk aylık süre içinde görülen beş diyare salgınının *C. difficile* ile geliştiği bildirilmiştir. Bu çocukların 65'inin dışkılarından *C. difficile* izole edilmiş ve toksin oluşturduğu belirlenmiştir. Diyareli 21 çocuğun 12'sinde, diyaresiz 44 çocuğun dördünde hem *C. difficile* izole edilmiş hem de toksini belirlenmiştir. Semptomları olan 12 çocuğun beşinin daha önce geçirdikleri üst solunum yolu infeksiyonu nedeni ile antibiyotik kullandığı bildirilmiştir. Bundan sonra sekiz ay süre ile bu çalışmaya devam edilmiş; bu dönemde altı çocuğun daha *C. difficile* ile infekte olduğu ve diyare geliştiği bildirilmiştir (24). Çalışmanın sonuçları çocuk yuvalarının *C. difficile* yönünden taranması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bir başka çalışmada iki çocuk bakımevinde gelişen gastroenterit salgınında 142 hastanın 27'sinden selektif kültür besiyerlerinde *C. difficile* izole edilmiş, 52'sinin dışkısında sitotoksin belirlenmiştir (25).

Antibiyotiğe bağlı olduğu düşünülen 321 diyareli dışkının 37'sinde (% 11.5) *C. difficile* izole edilmiştir. Bu çalışmada sikloserin sefoksitin-fruktoz agar (CCFA), sikloserin mannitol agar (CMA) ve sikloserin-mannitol kanlı agar (CMBA) besiyerleri kullanılmış 37 suşun 34'ü (% 92) CCFA besiyerinde, 21'i (% 57) CMA besiyerinde üretilmiştir. İzolasyonda en uygun besiyerinin CCFA olduğu belirtilmiştir (26). Bizim çalışmamızda da CCFA besiyeri kullanılmıştır.

Antibiyotiklere bağlı diyaresi olan hastalara vankomisin tedavisi uygulanmış ve tedaviden sonra 20 hastada nüks görülmüştür. Bu hastaların tümünden *C. difficile* izole edilmiş ve 16'sında psödömembranöz kolit geliştiği belirlenmiştir. Çalışmada antibiyotiğe bağlı diyaresi ya da *C. difficile*'ye bağlı kolitli olan tedavi edilmiş hastalarda nükslerin olabileceği bu nedenle hasta takibinin önemli olduğu belirtilmiştir (27).

C. difficile'nin neden olduğu psödömembranöz kolitlerde enterotoksin A ve sitotoksin B önemli rol oynar. Bu nedenle hastaların dışkı örneklerinden *C. difficile*'nin izolasyonunun yanı sıra

oluşturdukları toksinin özellikle toksin A'nın gösterilmesi gereklidir (2).

Bu çalışmada izole edilen 12 *C. difficile* suşundan 8'inin toksin A oluşturduğu belirlenmiş; buna karşın sitotoksin B'yi araştırmak için gerekli kit temin edilemediğinden sitotoksin B araştırılmamıştır.

Bir çalışmada iki gün üst üste alınan dışkı örneklerinin % 7'sinden *C. difficile* izole edilirken, üç gün üst üste çalışılan dışkı örneklerinde bu oran % 10'a çıkmıştır. Sonuç olarak da üç gün üst üste alınan dışkı örneklerinde bakterinin üretilme olasılığının daha fazla olduğu bildirilmiştir (28).

Bu çalışmada ise hasta klinik ve laboratuvar iletişimindeki aksaklıklar nedeni ile tek dışkı örneği ile çalışılabilmiştir.

Sonuç olarak *C. difficile* uzun süreli antibiyotik kullananlarda rutin olarak araştırılması gereken bir patojendir.

Kaynaklar

1. Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus Clostridium prazmowski. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Hold JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986: 1141-3
2. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxic potential of Clostridium difficile isolated from various patient populations. *Gastroenterology* 1981; 81: 5-8
3. Allen SD, Baron EJ. Clostridium. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Hold JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986: 505-10
4. George WL, Sutter VL, Citron DM, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 214-6
5. Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 443-5
6. Donta ST. Mechanisms of action of Clostridium difficile. In: Role RD, Finegold SM, eds. *Clostridium Difficile: Its Role in Intestinal Disease*. New York: Academic Press, 1988: 169-71
7. Lyerly DM, Lockwood S, Richardson H, Wilkins TD. Biological activities of toxin A and B of Clostridium difficile. *Infect Immun* 1982; 35: 1147-50
8. Tucker KD, Carrig PE, Wilkins TD. Toxin A of Clostridium difficile is a potent cytotoxin. *J Clin Microbiol* 1990; 8: 69-71
9. George WL, Rolfe RD, Harding GM, Klein R, Potman CW, Finegold SM. Clostridium difficile and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis. *Infection* 1982; 10: 205-8
10. Gerding DN, Febrhard RL, Summer HW, Peterson LR. Pathology and diagnosis of Clostridium difficile disease. In: Rolfe RD, Finegold SM, eds. *Clostridium Difficile: Its Role in Intestinal Disease*. New York: Academic Press, 1988: 259-71
11. Varki NM, Aguino TI. Isolation of Clostridium difficile from hospitalized patients without antibiotic associated diarrhea of colitis. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 659-61
12. George WL. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis. In: Finegold SM, George WL, eds. *Anaerobic Infections in Humans*. New York: Academic Press, 1989: 661-5
13. Teasley DG, Olson MM, Gebhard RL, Gerding DN, Peterson LR, Schwartz MJ, Lee JT. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for Clostridium difficile associated diarrhea and colitis. *Lancet* 1983; 5: 105-8
14. Hall IC, O'Toole F. Intestinal flora in newborn infants with rescription of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis. *Am J Dis Child* 1935; 49: 390-3
15. Gottschalk G, Andersen JR, Hippe H. The genus Clostridium (non-medical aspects). In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel H, eds. *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Berlin: Springer, 1981: 1767-9
16. Juntus PG, Martin JL, Goldberg DA, Taylor NS, Bartlett JG, Alexander RW, Mathies JR. Myoelectric effects of Clostridium difficile; motility-altering factors distinct from its cytotoxin and enterotoxin in rabbits. *Gastroenterology* 1982; 83: 836-9
17. Hawkings CC, Buggy B, Fekety R, Schaborg DR. Epidemiology of colitis induced by Clostridium difficile in hamsters application of a bacteriophage and bacteriocin typing system. *J Infect Dis* 1984; 5: 149-51
18. George WL, Sutter VL, Finegold SM. Toxicogenicity and antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile a cause of antimicrobial agent-associated colitis. *Curr Microbiol* 1978; 1: 55-7
19. Fekety R. Animal models of Clostridium difficile infection. In: Borriella SP, ed. *Antibiotic-Associated Diarrhea and Colitis*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984: 119-21
20. George WL, Rolfe RD, Finegold SM. Treatment and prevention of antimicrobial agent-induced colitis and diarrhea. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 1049-51
21. Levett PN. Clostridium difficile in habitats other than the human gastrointestinal tract. *J Infect* 1986; 12: 253-5
22. Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 1985; 47: 349-51
23. Raphael PVMD, Bartlett JGMD. Antibiotic associated pseudomembranous colitis in children. *Pediatr* 1981; 67: 381-2
24. Kim K, Dupond HL, Pickering LK. Outbreaks of diarrhea associated with Clostridium difficile and its toxin in day-care centers: evidence of person spread. *J Pediatr* 1983; 102: 376-8
25. Bennett RG, Laughan BE, Mundy LM, et al. Evaluation of latex agglutination test for Clostridium difficile in two nursing home outbreaks. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 889-91
26. Iwen PC, Booth SJ, Woods GL. Comparison of media for screening of diarrheic stools for the recovery of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2105-7
27. Bartlett JG, Tedesco FJ, Shull S. Relapse following oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1980; 78: 431-3
28. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. Clostridium difficile: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 1-3