

GATA Eğitim Hastanesi'nde Nozokomiyal *Clostridium difficile* Kolonizasyonu Sıklığı#

Dr. A. Bülent BEŞİRBELLİOĞLU*,
Dr. Levent GÖRENEK*, Dr. Ufuk DİZER*,
Dr. Aziz HACİBEKTAŞOĞLU*

* Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde sunulmuştur. (6-10 Ekim 1997, Antalya)

ÖZET

Çalışmamızda hastanemizde uzun süreli yatan hastalarda *Clostridium difficile* kolonizasyonu gelişme riski araştırılmıştır. GATA'da hastalıkları nedeniyle 30 gündür yatmakta olan, diyare yakınması olmayan ve *C. difficile* kolonizasyonu açısından hiçbir predispozan faktöre (kemoterapi, enema, antibiyotik, endoskopi, vb.) maruz kalmamış 37 kişi araştırılmış ve *C. difficile*'nin bir hastane infeksiyonu etkeni olup olmadığı boyutu irdelenmiştir. Bu grupta yer alan hastaların dışkı örnekleri *C. difficile* toksin A (CDTA) yönünden araştırılmış ve Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar (CCFA) besiyerinde *C. difficile* varlığı yönünden incelenmiştir. Hastaneye ilk yatışlarında alınan dışkı örneklerinin hiç birinde *C. difficile* izole edilememiş ve CDTA Enzyme Immunoassay (EIA) ile CDTA negatif olarak saptanmıştır. Hastaneye yattıklarından 30 gün sonra; 4 hastanın (%10.81) dışkılarından *C. difficile* izole edilmiş ve CDTA EIA ile CDTA pozitif bulunmuştur.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak; hiçbir yakınması olmayan ve GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD polikliniğine portör muayenesi nedeniyle başvuran 40 kişi alınmıştır. Bunların da dışkılarında CDTA aranmış CCFA besiyerinde kültür araştırması yapılmıştır. Kontrol Grubu (KG)' ndan sadece bir kişinin dışkı

kültüründe pozitiflik saptanmışsa da bu dışkıda CDTA EIA ile CDTA negatif bulunmuştur.

Sonuçlar KG ile karşılaştırıldığında, her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). Hastanemizde bir ay ve daha fazla yatma sonucunda *C. difficile* kolonizasyonu gelişme riski %10.8 olarak belirlenmiştir. *C. difficile* infeksiyonunun bir hastane infeksiyonu olarak kabul edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hastane İnfeksiyonu, *Clostridium difficile*.

SUMMARY

The Nosocomial Colonization Rate of *Clostridium difficile* in Gülhane Military Medical Academy Training Hospital

This study was performed to evaluate the colonization rate of *C. difficile* in our hospital. Our first group consisted of 37 cases hospitalized for more than 30 days without gastrointestinal symptoms. Stool specimens taken from the patients were cultured in Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar (CCFA) and were analyzed for *C. difficile* toxin A (CDTA) by Enzyme Immunoassay (EIA) on their first hospitalization day, and all of them found negative. This procedure was repeated after 30 days of hospitalization. The colonization of *C. difficile* was detected in 4 patients, this bacteria should be considered as one of the agents responsible for the hospital infections. Our second group, the control group, consisted of 40 healthy people. Stool specimens of the cases were cultured in CCFA and were analyzed for CDTA. None of the cases revealed CDTA positivity, while only one case was detected to have colonization of non-toxigenic *C. difficile*. Results of the cases in hospitals suggested the nosocomial transmission of the *C. difficile*. After the four weeks duration of hospitalization, the colonization rate of *C. difficile* was detected as 10.8% which was significantly high ($p<0.005$).

Key Words: Nosocomial Infection, *Clostridium difficile*.

GİRİŞ

Clostridium difficile, psödomembranöz enterokolit (PMK)de dahil olmak üzere antibiyotik nedenli kolit olgularının en iyi bilinen nedenidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *C. difficile*'nin hastane infeksiyonu olarak karşımıza çıkması bu infeksiyonun önemini bir kat daha arttırmıştır. Hastane ortamında sporadik olgular şeklinde karşılaşıldığı gibi, çok sayıda salgının da geliştiği bildirilmiştir (1,2,3). Hastane koşullarında, kreşlerde ve hemşire lojmanlarında önemli sorunların doğduğu epidemiler saptanmıştır (2,4,5,6). Etken, hastane ortamındaki hastalara sporlarının kolonize olduğu diğer hastalardan veya hastane personelinden bulaşmaktadır (2). *C. difficile* erişkinlerde nozokomiyal diyarelerde izole edilen en önemli etkidir (%91). Rotavirus ikinci sıklıkla gelmekte, *C. albicans* ve *S.aureus* bunları takip etmektedir. Epidemiy esnasında yerler, duvarlar, yatak lazımlıkları, personelin el ve gaitalarında *C. difficile* tespit edilebilmiştir. *C. difficile* çevredeki yüzeylerde beş aya kadar yaşayabilmektedir (7). Oluşan diyare genellikle hafiftir; ancak, hastanede yatış süresini uzatır ve maliyetin artmasına neden olur. Gerek hastanede çalışmanın, gerekse hasta kimliği ile hastanede bulunmanın *C. difficile* kolonizasyonu açısından risk oluşturduğu bilinmektedir. *C. difficile* sağlam kişilerde %0-3 oranında bulunabilmektedir. Mikroorganizmanın hastaneden edinilme şanssızlığı %7-30 arasındadır. Bu hastaların da yaklaşık %70'inde diyare gelişmektedir (2).

Hastanede yatış süresini uzatıp, maliyetin artmasına neden olmasının yanı sıra PMK nedeni olması ve salgınlara da yol açması *C. difficile*'nin bir hastane infeksiyonu etkeni olarak araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla biz de hastanemizin çeşitli kliniklerinde uzun süreli yatmakta zorunda olan hastalarda *C. difficile* kolonizasyonu gelişme riskini araştırdık.

MATERYAL ve METOD

Araştırmamız, Ocak-1994 ile Eylül-1996 ayları arasında GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kliniği ve laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda hastanemizde uzun süreli yatan hastalarda *C. difficile* kolonizasyonu gelişme riski araştırılmıştır. GATA'da hastalıkları nedeniyle (tedavi, tetkik, işlem) 30 gündür yatmakta olan diyare yakınması olmayan ve *C. difficile* kolonizasyonu açısından hiçbir predispozan faktöre (kemoterapi, enema,

antibiyotik, endoskopi vb.) maruz kalmamış 37 kişi araştırılmış ve *C. difficile*'nin bir hastane infeksiyonu etkeni olup olmadığı boyutu irdelenmiştir. Bu amaçla çalışmamıza iki grup dahil edilmiştir.

1. Grup : GATA'nın değişik kliniklerinde 30 günden uzun süredir yatan, gastrointestinal yakınmaları olmayan hastalardan oluşmaktaydı (Hastane Grubu: HG). Bu grupta 25 (%67.6) erkek, 12 (%32.4) bayan bulunmaktaydı. Yaş ortalamaları ise 24.18 (20-74) idi. Hastalardan hastaneye ilk kabul edildikleri gün ve yattıktan 30 gün sonra alınan dışkılarda EIA ile *C.difficile* toksin A (CDTA) arandı ve CCFA besiyerinde kültür çalışmaları yapıldı.

2. Grup : Hiçbir yakınması olmayan ve GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniğine portör muayenesi nedeniyle başvuran kişilerden ibaretti (Kontrol Grubu: KG). Çalışmaya katılan 40 kişinin 32 (%80)'si erkek, 8 (%20)'i bayandı. Yaş ortalaması 23.00 (18-36) idi. Bunların da dışkılarında EIA ile CDTA arandı ve CCFA besiyerinde kültür çalışması yapıldı.

A. Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması: Dışkı örneklerini toplamak amacıyla standart toplama kapları kullanıldı. On iki saat içinde araştırmaya alınacak olan dışkı örnekleri, 2-8°C'de buzdolabında saklandı. Dışkı örnekleri, 12 saatten uzun bir süre sonra çalışılacak ise temiz, steril ve kapaklı tüplere koyularak -45°C'de derin dondurucuda saklandı.

B. Çalışmada Kullanılan Kit ve Besiyerleri:

1. *Cycloserine - Cefoxitin - Fructose Agar* (CCFA) *Besiyeri* :1978'de George ve Sutter tarafından formüle edilen ve 1979'da kullanıma giren bu besiyerinin öncelikle temel (base) besiyeri hazırlandı. İçeriği şöyle idi; Pepton 40 gr, Na₂HPO₄ 5 gr, KH₂PO₄ 1 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ (anhidr.) 0.1 gr, Fructoz 6 gr, Nötral Kırmızısı 3 ml, Agar 20 gr.

Besiyeri, usulüne uygun olarak hazırlandıktan sonra dışkı; öze kullanılarak tek koloni ekimi yöntemi ile ekildi. Plaklar anaerobik ortamın oluşturulması amacı ile kullanılan jar içine konulduktan sonra GasPak kullanıldı. 37°C'de anaerop koşullarda 48-72 saat bekletildi. Süre bitiminde besiyerinde üreme var ise; koloni morfolojisi (2-6 mm çapında, sarı, yassı, çevresi sarı haleli, buzlu cam görünümünde, at gübresi kokulu), Gram boyama ve lateks aglütinasyon testi ışığında identifikasyon yapıldı.

2. *MicroScreen* CDTA EIA kiti (*Microgen Bioproducts, Camberley, U.S.A.*) : Dışkı süspansiyonlarında *C. difficile*'nin toksijenik suşları tarafından üretilen CDTA'nın EIA yöntemi kullanılarak saptanması amacı ile kullanıldı. Bu test, *C. difficile*'nin altı toksijenik suşunu belirleyebilme özelliği taşımaktadır. Bu test ile, toksin üretmeyen *C. difficile* suşları yalancı pozitif sonuç vermemektedir.

MicroScreen CDTA EIA kiti, CDTA'ya karşı oluşmuş iki antikor kullanılması prensibiyle çalışmaktadır. Mikroplaktaki kuyucuklar, CDTA'ya karşı saflaştırılmış poliklonal antikorla kaplanmıştır. İşaretleyici antikor, Horse Radish Peroksidaz ile konjüğe edilmiş monoklonal antikorlardan (konjugat) oluşmuştur. Testte, bir miktar dışkı örneği %0.02 tiyomersal içeren tamponlu protein solüsyonu ile emülsifiye edilir ve dilüe örnek, işaretleyici antikor bulunduran kuyucuklara aktarılır. Eğer örnekte CDTA mevcut ise ilk inkübasyon fazında hem işaretleyici antikora, hem de kuyucuklara bağlı durumdaki hareketsiz poliklonal antikora bağlanacaktır. Bağlanmayan materyal yıkama aşamalarında ortamdan uzaklaşır. Kuyucuklara Substrat A (üre peroksidi içeren tamponlu solüsyon) ve Substrat B (tetrametil benzidin içeren solüsyon) eklenmesi ile ortaya çıkan renk değerlendirilir. Sonuçlar Bio-tek Instruments EL 312e Microplate Bio-kinetics marka mikroplak EIA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. 0.120 absorbans değerinde ve göz ile renksiz görünen kuyucuklar negatif olarak, 0.120-0.199 absorbans değerinde olan ve göz ile soluk sarı renk veren kuyucuklar şüpheli olarak kabul edildi. Şüpheli olgularda test, taze dışkı ile tekrarlandı. 0.200 absorbans değerinin üstünde, gözle sarı renk görülen kuyucuklar ise pozitif olarak değerlendirildi. Kullandığımız CDTA EIA kitinin duyarlılığının %81.3, özgüllüğünün ise %100 olduğu, üretici firma tarafından belirtilmiştir.

3. *MicroScreen C. difficile Lateks Slide Agglutination Test* (*Merica Diagnostic Limited, Guildford, England*) : Yapılan dışkı kültüründe, 37°C'de anaerobik ortamda 48-72 saatte CCFA besiyerinde üreyen bakterinin identifikasyonu amacı ile bakteri antijenlerini belirleyici lateks aglütinasyon testi kullanıldı. Test kiti olarak, *C. difficile*'nin hücre duvar antijenlerine karşı geliştirilmiş IgG tipindeki antikorlar ile kaplanmış lateks partikülleri kullanıldı. Katı besiyerinden alınan *C. difficile* kolonilerinden hazırlanan bakteri süspansiyonu ile antikor

kaplı lateks partikülleri özel slaydı üzerinde karıştırıldı ve iki dakika süre ile rotatorda çalkalandı. Lateks partiküllerinin aglütinasyonu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

4. *Gram Boyama* : Hans Christian Joachim Gram tarafından tanımlanan bu boyama yöntemi kullanılarak; koloni morfolojisi *C. difficile* ile uyumlu olan bakterilerin Gram alma ve morfolojik özellikleri araştırıldı.

C. İstatistiksel Hesaplamalar: Elde ettiğimiz veriler, EPI-INFO version 5.01b paket programı ile kişisel bilgisayara girildi ve değerlendirildi. Sonuçların yorumlanmasında X² testi kullanıldı.

SONUÇLAR

1. HG Sonuçları : Otuzyediyen hastadan hastaneye ilk kabul edildikleri gün alınan dışkılarından yapılan CCFA besiyerinde kültür ekimi sonucunda hiç bir örnekte üreme olmadı. Aynı örneklerde EIA ile CDTA arandığında sonuçlar yine negatif olarak bulundu. Yattıktan 30 gün sonra yinelenen tetkikler sonucunda; kültür ve toksin aranmasında hastaların 4 (%10.8)'ünde *C. difficile*, CCFA besiyerinde üretildi ve bunlarda CDTA varlığı görüldü. Buna göre GATA'da 30 günden uzun süredir yatan ve diyare yakınması olmayan 37 hastaya yapılan tetkikler sonucunda *C. difficile* taşıyıcılığı %10.8 olarak bulundu.

2. KG Sonuçları : Toplumda *C. difficile* insidansını saptamak amacıyla GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniğine başvuran sağlıklı kişilerden oluşan KG'ye 40 kişi dahil edildi. Alınan dışkılarda CDTA arandı ve CCFA besiyerinde *C. difficile* varlığı araştırıldı. Toplam 40 sağlıklı kişinin dışkı kültürlerinde sadece bir pozitiflik (%2.5) saptanmışsa da bu dışkıda CDTA EIA negatif bulunmuştur.

3. İstatistiksel Karşılaştırma : Çalışmamızdaki HG ile KG'ye ait CCFA besiyerinde üreme ve CDTA sonuçlarının istatistiksel karşılaştırması Tablo 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Tıbbi, cerrahi tedavi ve yoğun bakım gerektiren birçok hastalığın tedavisinin hastanelerde yatarak yapılması, kaçınılmaz bir zorunluluktur. Ancak, bu ortamda bulunmanın da hastalar üzerinde bazı olumsuz etkilerinin varlığı bilinmektedir. Psikolojik sorunların ötesinde, birçok hastanın ister istemez küçük bir ortamda, yan yana

Tablo 1. Hastane Grubu ve Kontrol Grubunda CCFA Besiyerinde Üreme ve CDTA Pozitiflik Oranları.

	CCFA (+)		CDTA (+)	
	n	%	n	%
Hastane Grubu (n:37)	4	10.8	4	10.8
Kontrol Grubu (n:40)	1	2.5	0	0
p değeri	0.155		0.049	

bulunması nedeni ile yoğun bir mikroorganizma alış-verişi yaşadıkları bilinmektedir. Günümüzde, herhangi bir hastalığı nedeniyle hastaneye yatırılmış, özgün tedavisi başarı ile uygulanmış ve asıl hastalığı ile sorunu kalmaması beklenen hastaların hastaneden edindikleri mikroorganizmalar nedeniyle kaybediliyor olması, hastane infeksiyonlarının popularitesini oldukça arttırmış ve hastanelerin tüm fiziksel ve teknik özellikleri bu bakış açısından tekrar düzenlenmeye başlanmıştır. Gerek hastanede çalışmanın, gerekse hasta kimliği ile hastanede bulunmanın *C. difficile* kolonizasyonu açısından risk oluşturduğu bilinmektedir.

C. difficile sporları, kolonizasyon gelişmiş olan hastalardan ya da çevrelerindeki kişilerden, temas sonucunda alınabilmekte, çoğu zaman da hastane personelinin elleri ile taşınmaktadır. El ile taşınma önemli bir geçiş şekli olarak düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hastane personelinin lastik eldiven kullanması ile *C. difficile*'ye bağlı diyarelerde beş kat azalma görüldüğü belirlenmiştir (8). *C. difficile* ısıya dirençli sporları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmektedir. Fekety, Kim, Brown ve Cudmore hastane ortamındaki antibiyotiğe bağlı kolit olgularını araştırırken; koğuş, tuvalet, nevresim, paspas, mobilya, steteskop ve termometrelerden *C. difficile* izole edildiğini bildirmişlerdir (9). *C. difficile* sporları hastanede kullanılan dezenfektanlara da dirençlidir ve böylece asemptomatik taşıyıcı pozisyonundaki hastane personelince çevreye yayılabileceği düşünülmektedir.

McFarland ve arkadaşları, iç hastalıkları servisine yatırılan hastaların %7'sinin dışkısında organizma bulunduğunu, bunların %21'inin mikroorganizmayı yatarken edindiğini ve taşıyıcı haldeki bu hastaların %37'sinde diyare geliştiğini bildirmişlerdir (2). Cartmill ve arkadaşları Manchester'de *C. difficile* saptanan 175 hastayı incelemişler, elde edilen izolatların %79'unun tek kökene ait olduğunu ve tek bir koğuştan başlayarak has-

tanedeki diğer 34 koğuşa yayıldığını belirlemişler (10).

Çalışmamızda HG'de bulunan dört hastanın dışkılarında *C. difficile* izole edilmiş ve bunların hepsinin gaitasında CDTA EIA ile CDTA pozitifliği bulunmuştur. Sonuçlar KG ile karşılaştırıldığında, her iki grup arasında toksijenik *C. difficile* açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar ışığında hastanemizde, hastane kaynaklı *C. difficile* kolonizasyonu oranının %10.8 olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda KG olarak kullanılan 40 sağlıklı kişinin dışkı kültürlerinde sadece bir pozitiflik saptanmışsa da bu dışkıda CDTA EIA negatif bulunmuştur. Bu sonuç, kolonize olan bu suşun non-toksijenik bir *C. difficile* suşu olduğu şeklinde yorumlanmış olup, Bartlett ve arkadaşlarının bir çalışmasında elde edilen sonuçlar ile uyum halindedir (11).

Özet olarak, çalışmamızda şu sonuçlar elde edilmiştir :

1. *C. difficile*'nin bir hastane infeksiyonu etkeni olarak kabul edilmesi gereklidir. HG ile KG arasında toksijenik *C. difficile* kolonizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Hastanede bir ay ve daha fazla yatma sonucunda *C. difficile* kolonizasyonu gelişme riski %10.8 olarak belirlenmiştir.

2. Antibiyotik kullanımına bağlı diyarelere yol açtığı bilinen *C. difficile* normal popülasyonda (çalışmamızda 40 kişiden birinde) da izole edilebilmektedir. Ancak, bu bakteriler toksijenik olmadıklarından klinik tablonun gelişmesine yol açmazlar. Bu nedenle tanı amacı ile tek başına CCFA besiyerinde üretmek yeterli değildir. Tablodan sorumlu olduğunun kesinleştirilebilmesi için; bakterinin toksijenik olduğunun (CDTA ve CDTB üretebildiğinin) tercihen EIA gibi, çalışmamızda da tanık olunduğu üzere, çok duyarlı ve özgül teknikler kullanılarak gösterilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Delmee M, Bulliard G, Simmon G. Application of a technique for serogrouping of *Clostridium difficile* in an outbreak of antibiotic-associated diarrhea. J Infect 1986;13:5.
2. Mc Farland LV, Mulligan ME, Kwokk RYY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Eng J Med 1989;320:204-10.
3. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile* in a cohort of hospitalized patients. J Infect Dis 1990; 162:678.
4. Bender BS, Bennett R, Laughon BE. Is *Clostridium difficile* endemic in chronic-care facilities? Lancet 1986;2:11-3.
5. Nolan NPM, Kelly CP, Humphreys JFH. An epidemic of pseudomembranous colitis: importance of person to spread. Gut 1987;28:1467-73.
6. Thomas D, Bennett RG, Laughan BE, Greenough WG. Postantibiotic colonization with *Clostridium difficile* in nursing home patients. J Am Geriatr Soc 1990;38:415-20.
7. Korten V. Hastane infeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). İnfeksiyon Hastalıkları. Birinci baskı, İstanbul: Alemdar Ofset, 1996;281-7.
8. Salyers AA, Whitt DD. Pseudomembranous Colitis. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 1st edition. 1994; 282-9.
9. Fekety R, Kim KH, Brown D. Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Med 1981;70:906.
10. Cartmill TDI, Panigrahi H, Worsley MA et al. Management and control of large outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*. J Hosp Infect 1994;27:1-15.
11. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: clinical considerations. Rev Infect Dis. 1990;12:243.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr. A. Bülent BEŞİRBELLİOĞLU
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
İnfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Etlik - ANKARA