

# CLOSTRIDIUM DIFFICILE İNFEKSİYONLARININ LABORATUVAR TANISI

Clostridium difficile, Gram pozitif, anaerop, sporlu bir basildir. C.difficile infeksiyonları antibiyotiğe bağıli diyareden, ağır psödomembranoz kolite kadar değişebilmektedir. Virülanstaki farklılıklar ve antibiyotik tedavisindeki değişiklikler nedeniyle son dönemlerde C.difficile infeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde artış gözlenmektedir. Bu nedenle tanıda hızlı ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Tanıda altın standart toksijenik kültür yöntemidir fakat hızlı tanıda pratik değillerdir. Yeni nesil, Real-time PCR yöntemi, Hızlı ve ELISA ile karşılaştırıldığında daha duyarlı bir yöntemdir.



# CLOSTRIDIUM DIFFICILE İNFEKSİYONLARININ LABORATUVAR TANISI

Clostridium difficile, Gram pozitif, anaerop, sporlu bir basildir.

C.difficile'nin toksijenik ve toksijenik olmayan kökenleri sağlıklı bireylerde asemptomatik olarak bulunabilir. Sağlıklı erişkinlerde taşıyıcılık oranı yaklaşık % 5 iken, yenidoğan bebeklerde % 70 civarındadır. Toksikojenik suşlarla kolonize olan yenidoğanlarda infeksiyon görülme sıklığı azdır çünkü yenidoğan barsak mukoza epitelinde toksin reseptörleri henüz gelişmemiştir. (2,5,7)

C.difficile sporları hastanelerde, bakımevlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu sporlar çevreden ya da taşıyıcı hastalardan, sağlık personelinin elleri ile diğer hastalara geçirilmektedir. Hastanede yatan hastalarda % 50'lere varabilen kolonizasyon oranları bildirilmektedir. (2,5,7)

C.difficile infeksiyonları antibiyotiğe bağlı diyareten, ağır psödomembranöz kolite kadar değişebilmektedir. C.difficile infeksiyonlarında kanlı ve mukuslu ishal, kramp şeklinde karın ağrısı, lökositoz ve ateş görülebilir. (2,5,7)

Günümüzde özellikle hastanede yatan, altta yatan hastalığı bulunan, yaşlı hastalarda antibiyotik kullanımı ile ilişkili infeksiyonlara neden olan C.difficile'nin toplumdan kazanılmış infeksiyonlara da neden olduğu bilinmektedir. (2,5,7)

C.difficile'ye bağlı ishal oluşumunda en önemli risk faktörlerinden birisi antibiyotik ve kemoterapötik kullanımıdır. İnfeksiyon, antibiyotik veya antineoplastik ajanların kullanımı sırasında barsak florasının bozulmasıyla meydana gelmektedir.(2,5,7)

C.difficile'nin Toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) olmak üzere iki önemli toksini vardır. Bakterinin virulansı bu iki toksinin üretimine bağlıdır. Bu toksinler epitel hücrelerinde inflamasyona ve mukozal bütünlüğün bozulmasına neden olmaktadır. (2,5,7)

Toksijenik suşların genomunda bulunan patojenite lokusunda bulunan tcdA ve tcdB genleri toksinlerin sentezinden sorumludurlar. Çeşitli ülkelerde hastane salgınlarına yol açan virülansı yüksek B1/NAP1/027 kökeninin, tcdC geninde delesyon olduğu, buna bağlı olarak yüksek düzeyde toksin A ve B salgıladığı bildirilmiştir. (2,5,7)

B1/NAP1/027 kökeninin aynı zamanda "binary toksin" olarak tanımlanan üçüncü bir toksin ürettiği de gösterilmiştir. Patojenite lokusu dışındaki cdtA ve

cdtB genleri "binary" toksini (CDT) kodlamaktadır. Bu toksinin epitel hücre yüzeyinde mikrotübül oluşumunu indüklediği ve daha çok sayıda bakterinin hücre yüzeyine tutunmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu toksin daha şiddetli infeksiyonlara neden olmaktadır. (2,5,7)

Binary toksin, C.difficile kökenlerinde tek başına bulunabilir, diğer toksin A ve toksin B salgılayan veya varyant kökenlerde de bulunabilir. En sık (%65) tcdA ve tcdB toksinlerinin ikisini de üreten kökenler görülmektedir. TcdB ise kökenlerin %97'si tarafından üretilir.

Hipervirülan epidemik suşun bir diğer özelliği de diğer suşlardan farklı olarak florokinolonlara dirençli oluşudur. (2,5,7)

## LABORATUVAR TANI (1,2,3,4,5,6,7):

Virülanstaki farklılıklar ve antibiyotik tedavisindeki değişiklikler nedeniyle son dönemlerde C.difficile infeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde artış gözlenmektedir. Bu nedenle tanıda hızlı ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Tanıda altın standart toksijenik kültür yöntemidir. (Anaerop kültür+Hücre kültürü sitotoksin testi) Özgüllük ve duyarlılığı yüksektir. Toksin B'yi saptar. Bu testler zaman alan (3 gün), özel ekipman ve deneyimli eleman gerektiren, maliyeti yüksek testlerdir. Bu yüzden hızlı tanıda pratik değillerdir.

EIA ile C.difficile GDH saptanması. Glutamat Dehidrogenaz çoğu toksijenik ve nontoksijenik Clostridium difficile kökenlerinde bulunabilen bir hücre yüzey proteindir. Bu test hızlıdır ancak toksijenik ve toksijenik olmayan suşları birbirinden ayıramamaktadır. GDH'yı tespit eden testlerde düşük spesifitesinden dolayı pozitiflik saptandığında daha spesifik bir yöntemle (ELISA, hücre kültürü, moleküler yöntemler gibi toksin üreten genleri tanımlayan yöntemlerle) doğrulanmalıdır.

Toksin A ve B için ELISA: Hızlı ve kolay testler olmasına rağmen bu testlerin genellikle duyarlılıkları ve özgüllükleri hücre kültür sistemlerine ve moleküler yöntemlere göre düşüktür. ELISA ile ancak 100-1000 pg toksin A veya B saptanabilmektedir. Bu nedenle %10-20 oranında bir yalancı negatiflik söz konusudur.

Moleküler testler toksijenik C.difficile DNA'sının

amplifikasyonuna dayanır. Hız ve güvenilirlik avantajları vardır. Aynı zamanda çok daha şiddetli infeksiyonlara neden olan binary toksin ve varyant kökenleri saptayabilme avantajları vardır.

Real-time PCR yöntemi, tcdB, CdtA ve CdtB genlerine sahip kökenleri (binary toksin) ve tcdC genindeki delesyonları da belirleyebilir. Hızlı ve ELISA ile

karşılaştırıldığında daha duyarlı bir yöntemdir.( Duyarlılık % 88-96, Özgüllük %94-100)

Günümüzde yüksek duyarlılıkları ve özgüllükleri, binary toksin ve varyant kökenleri saptayabilme avantajlarından dolayı bu testler klinik pratikte toksijenik C.difficile'nin saptanmasında ELISA testlerinin yerini almaktadırlar.

C.difficile laboratuvar tanısında kullanılan testler (1,3,4,5,6,7)

Test edilen	Metot	Duyarlılık%	Özgüllük%	Avantajları	Dezavantajları
<b>Organizma</b>	Toksijenik kültür	> 90	96-97	Duyarlılık ve özgüllük yüksek	Etkinliği laboratuvarlar arasında değişken, toksin saptama metodunun eklenmesi gerek
<b>GDH</b>	Lateks aglütinasyonu, membran EIA	80-98	96-98	Hızlı ve basit	Düşük duyarlılığa sahip, toksijenik ve nontoksijenik suşları ayıramaz
<b>Toksin B</b>	Hücre kültürü	% 94-100	99	Duyarlılık ve özgüllük yüksek, altın standart	24-48 saat sonra sonuç verir. Maliyet yüksek. Toksin B inaktive olabilir bu nedenle yanlış negatif sonuçlar alınabilir
<b>Toksin A+B</b>	EIA,membran EIA	45-95	75-100	Hızlı ve basit	Duyarlılığı ve özgüllüğü düşük
<b>C.difficile DNA</b>	PCR	88-96	94-100	Hızlı, basit, binary toksin ve varyant suşları tanımlayabiliyor.	Maliyet

## KAYNAKLAR

- Susan M.NW, Elizabeth M.M et al. 2010. Clostridium difficile testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. Journal of Clinical Microbiology, Mar.2010, p.889-893
- Bartlett JG and Gerding DN.2008. Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis 46(Suppl 1):S12-S18.
- Haihui H, Andrej W et al. 2009. Comparison of a commercial multiplex real-time PCR to the cell cytotoxicity neutralization assay for diagnosis of Clostridium difficile infections. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 2009, p.3729-3731.
- Kimberle Chapin. 2012. Discrepancies in testing recommendations for Clostridium difficile infection: updated review favors amplification test systems. Expert Rev. Mol. Diagn. 12(3), 223-226 (2012).
- Deniz U, Ülger N ve ark.2011. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen Clostridium difficile kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45 (1):1-10.
- Elizabeth J Kvach, David Ferguson et al. Comparison of BD GeneOhm Cdiff Real-Time PCR assay with a two step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic Clostridium difficile infection. J.Clin.Microbiol.2010, 48(1):109.
- Murray Patrick R, Baron Ellen Jo. Manual of Clinical Microbiology, Cilt 2, 9.Baskı, s.889-910



Gürsel Mahallesi Kağıthane Caddesi 14/3 34400 Kağıthane - İstanbul  
T. 0212 320 64 00 D. 0212 320 64 17

[centro@centro.com.tr](mailto:centro@centro.com.tr) - [www.centro.com.tr](http://www.centro.com.tr)