

"*Clostridium difficile* İnfeksiyonları ve Antibiyotiğe Bağlı İshal" Sempozyumu  
28 Mayıs 2014, Ankara

# ***CLOSTRIDIUM DIFFICILE*** **İNFEKSİYONLARININ** **LABORATUVAR TANISI**

**Dr. Belkıs LEVENT**

**Türkiye Halk Sağlığı Kurumu**

**Mikrobiyoloji Referans Lab. Dai. Bşk.**

**Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı**



# Sunum Planı

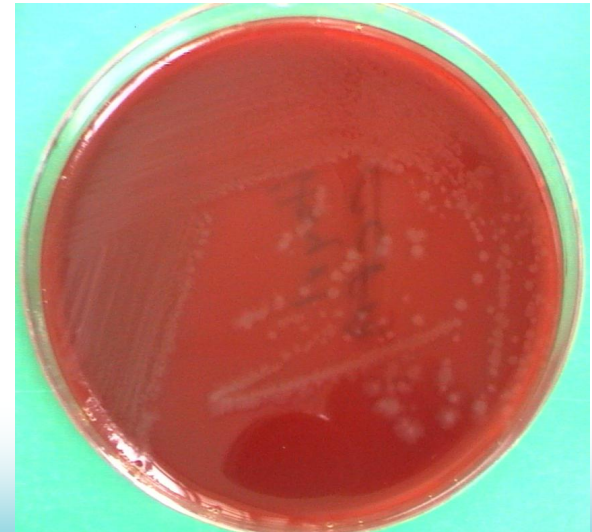
*Clostridium difficile* ve Önemi

Laboratuvar Tanısı

Laboratuvar Çalışmalarımız

# *Clostridium difficile*

- ❑ Anaerob, sporlu, Gram pozitif çomak
- ❑ Sitotoksin ve enterotoksin üretimi
- ❑ Toksikjenik *C. sordellii* ile yakın ilişkili
- ❑ Sağlıklı infantlarda normal flora elemanı
- ❑ Çoğu antibiyotiğe dirençli



# *Clostridium difficile*



## Vejetatif formlar

- Barsakta bulunur
- Ortamda 4-6 saat canlı kalır
- Gastrik asit, antibakteriyel sabunlar, alkol bazlı el dezenfektanlarına duyarlı

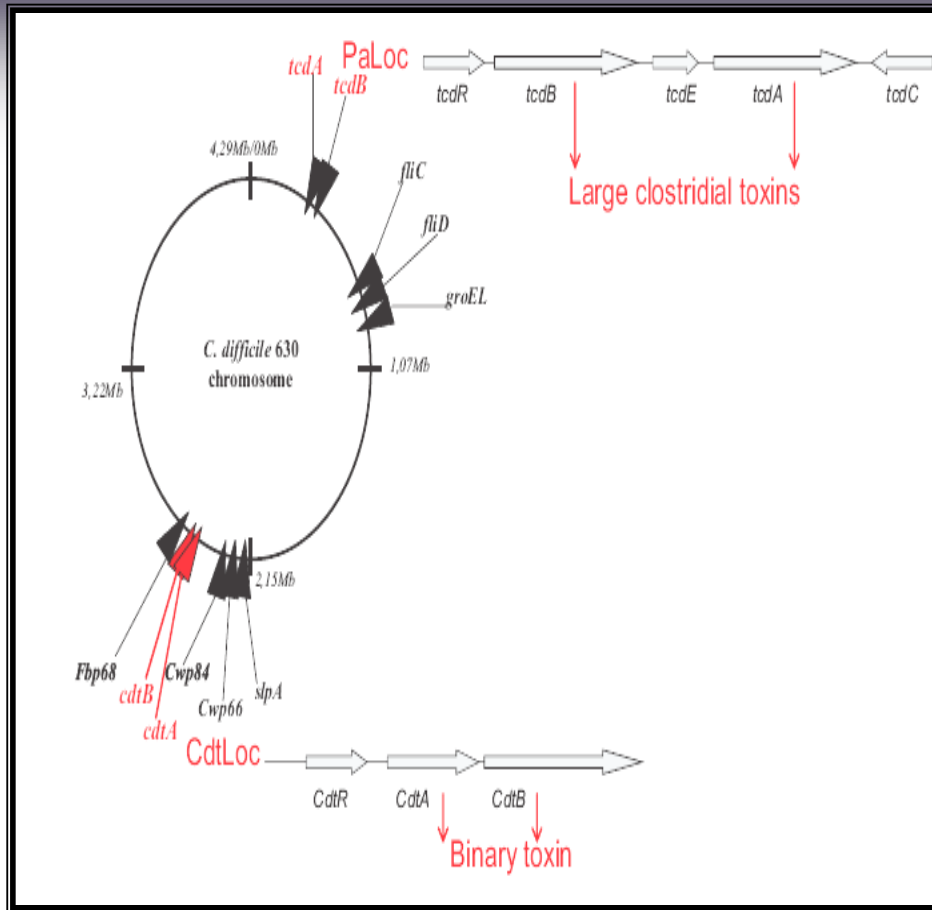


## Spor formları

- Barsakta ve ortamda bulunur
- Organizmada strese bağılı spor oluşur
  - Çevresel faktörler, antimikrobiyaller, subletal konsantrasyonda mikrobisidal temizlik ürünleri
- Mide asidi, antibakteriyel sabunlar ve alkol bazlı el dezenfektanlarına dirençli
- Yüzeylerde yıllarca yaşayabilir

# *C. difficile* Toksinleri

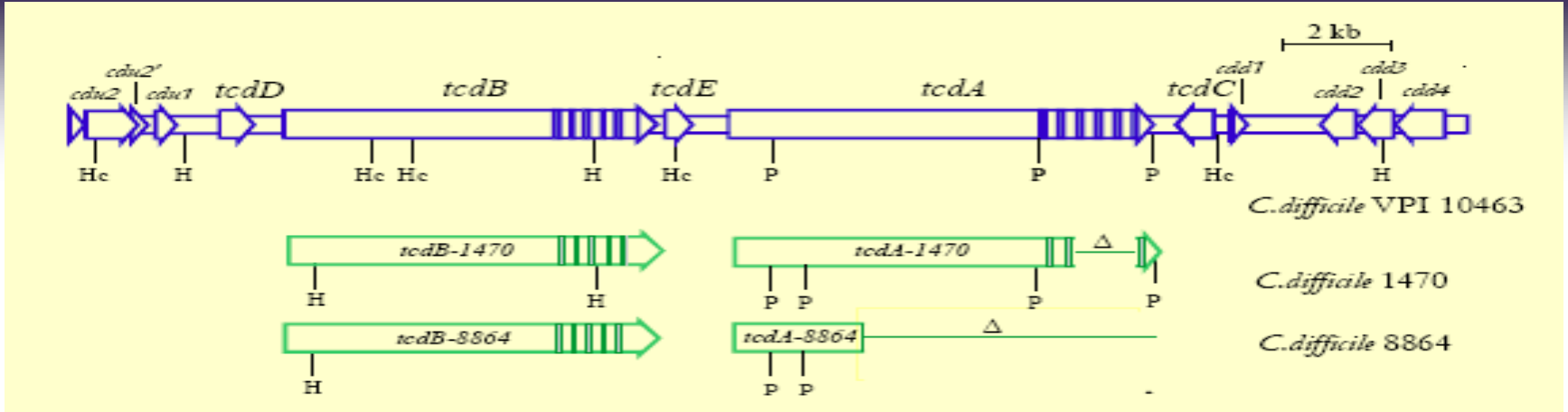
## Toksin A, Toksin B ve Binary toksin



	TcdB	TcdA	CDT	
Tip 1	+	+	-	En sık
Tip 2	+	-	-	%0.2-12
Tip 3	+	+	+	%1.6-8
Tip 4	+	-	+	Çok nadir
Tip 5	-	-	+	%1.6
Tip 6	-	-	-	%20

Binary toksin prevalansı %1.6-20.8

# Toksin A-B+ *C. difficile* Suşları



## ☐ Toksin A üretmeyen suşlar

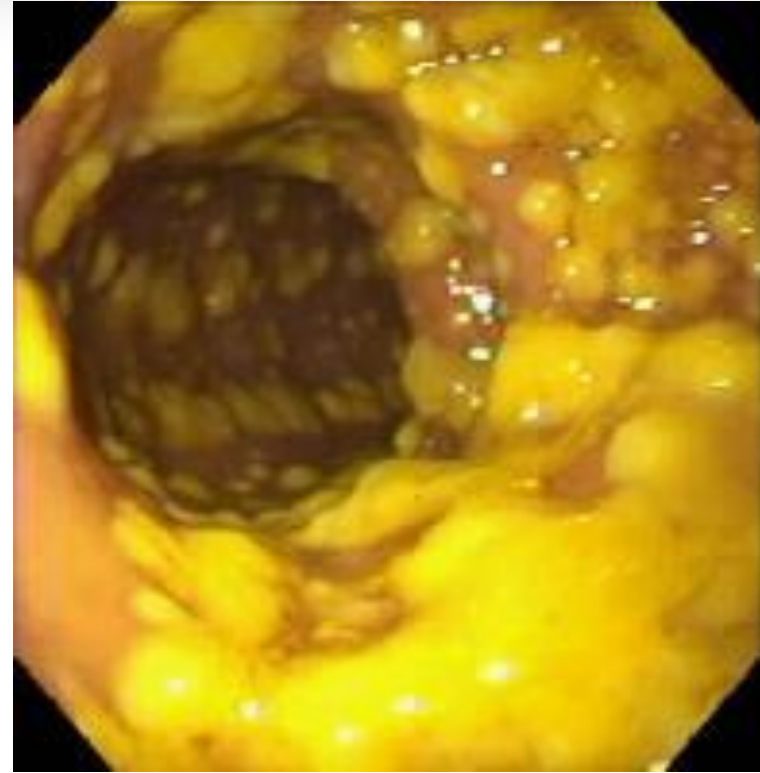
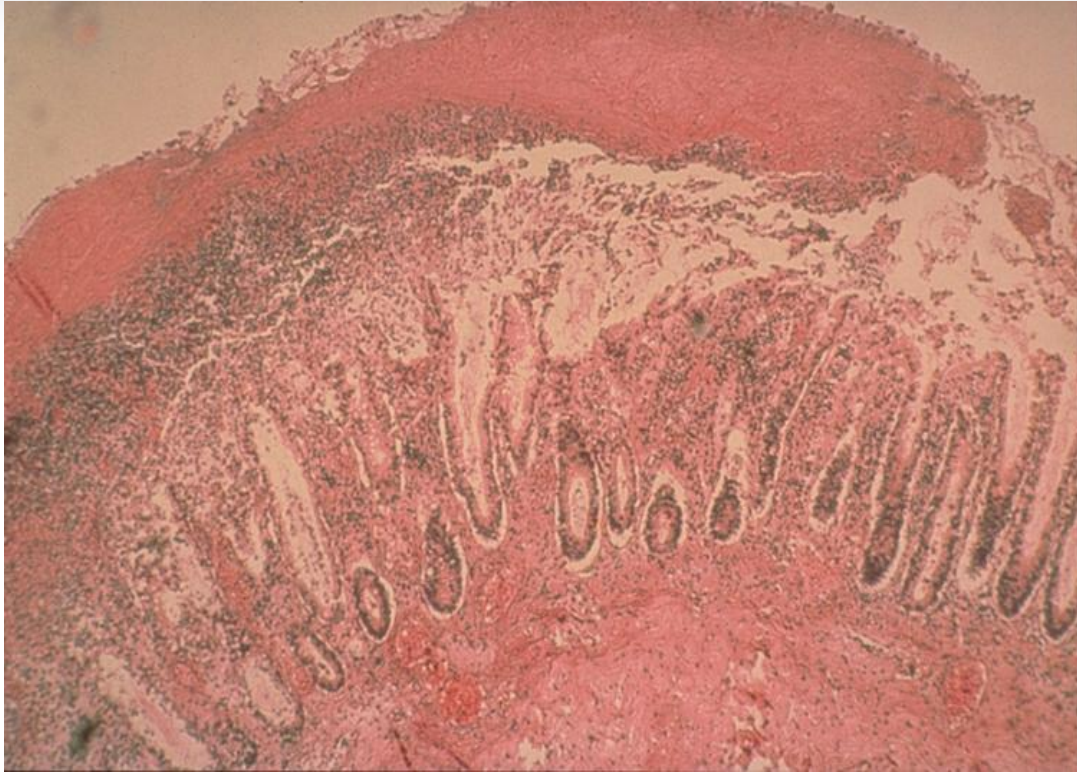
- ☐ Binary toksin - veya +
- ☐ Toksin A'nın toksin bağlanması ile ilgili tekrarlayan gen bölgesinde delesyon

## ☐ Virülan

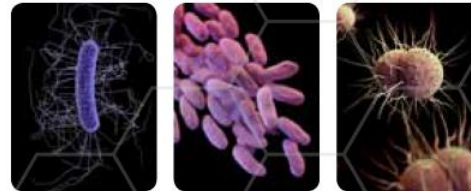
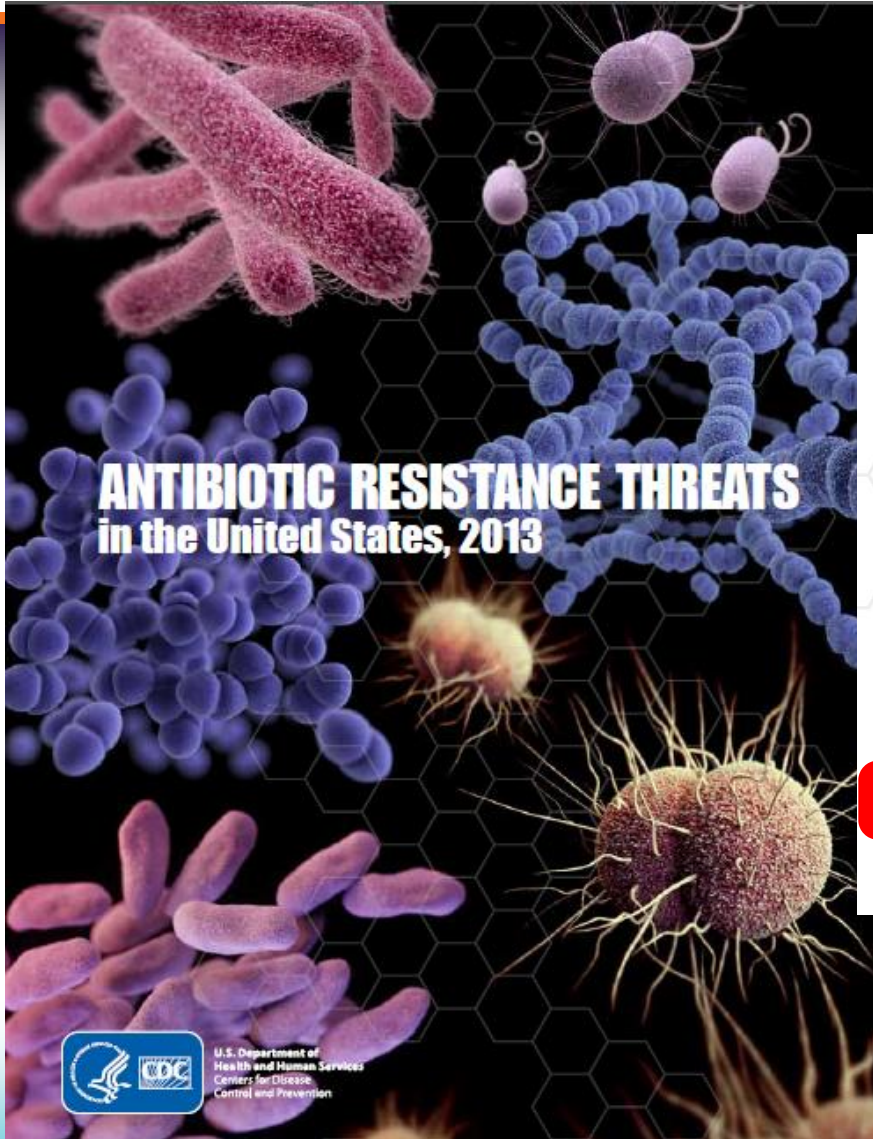
## ☐ İshal, PMK, salgınlar

## ☐ Sadece toksin A'yı saptayan kitlerle gösterilemez

# Mukozal harabiyet ve Psödomembranöz enterokolit



# *Clostridium difficile*: Önemi



THREAT LEVEL  
**URGENT**



These bacteria are immediate public health threats that require urgent and aggressive action.

## MICROORGANISMS WITH A THREAT LEVEL OF URGENT

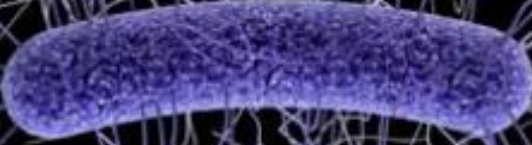
*Clostridium difficile*

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*



# CLOSTRIDIUM DIFFICILE



THREAT LEVEL  
**URGENT**



This bacteria is an immediate public health threat that requires urgent and aggressive action.



**250,000**  
INFECTIONS PER YEAR



**14,000**  
DEATHS



**\$1,000,000,000**

IN EXCESS MEDICAL COSTS PER YEAR



- Hastanede yatan/yatmış, tıbbi bakım alan, bakımevlerinde kalan veya antibiyotik tedavisi alan hastalar
- Hayatı tehdit eden ishal
- ABD'de 2000-2007 yılları arasında CDI bağlı ishallerde **%400 artış**

- Enfeksiyonların ~%50'si 65 yaş altı, ölümlerin %90'dan fazlası 65 yaş üstü bireylerde
- Diğer enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı doğal direnç
  - Florokinolonlar
- Kuzey Amerika ve Avrupa'da daha virülen bir suşun yayılması

# Epidemik *C. difficile* Ribotip O27 (BI/ NAP1)

*The* **NEW ENGLAND**  
**JOURNAL of MEDICINE**

ESTABLISHED IN 1812

DECEMBER 8, 2005

VOL. 353 NO. 23

An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*

L. Clifford McDonald, M.D., George E. Killgore, Dr.P.H., Angela Thompson, M.M.Sc.,  
Robert C. Owens, Jr., Pharm.D., Sophia V. Kazakova, M.D., M.P.H., Ph.D., Susan P. Sambol, M.T.,  
Stuart Johnson, M.D., and Dale N. Gerding, M.D.

- ❑ 2003 yılından itibaren Kanada, ABD ve Avrupa ülkelerinde
- ❑ Toksin A, toksin B ve Binary toksin pozitif
- ❑ *tcdC* geninde 18 bp delesyonu ve 117. pozisyonda delesyon
- ❑ Artmış toksin A ve toksin B üretimi
- ❑ Artmış sporlanma
- ❑ Florokinolonlara dirençli, metronidazol tedavisine yetersiz yanıt

## Genotipik özellikler

- ❑ PZR ribotip O27
- ❑ REA: Grup BI
- ❑ PFGE: NAP1 (North American PFGE)
- ❑ Toksin tipi: III

# Yeni Hipervirülan O78 Suşu

- ❑ O78 ribotipi tip O27'ye benzer şiddette CDBİ'ye neden olur
  - ❑ Daha genç yaşlarda
  - ❑ Sıklıkla toplum kaynaklı
  - ❑ Toksin A, toksin B ve Binary toksin pozitif
  - ❑ tcdC geninde 39 bp delesyonu ve 184. pozisyonda mutasyon

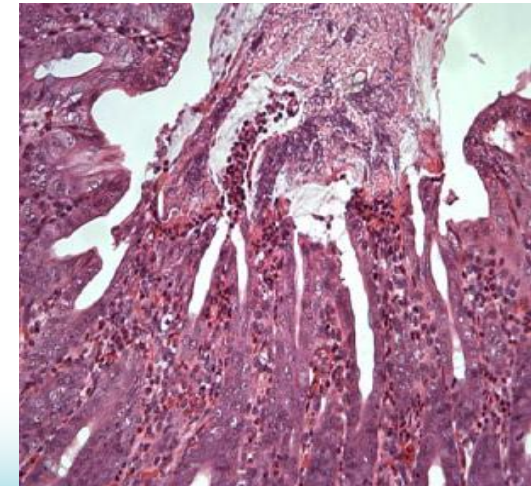
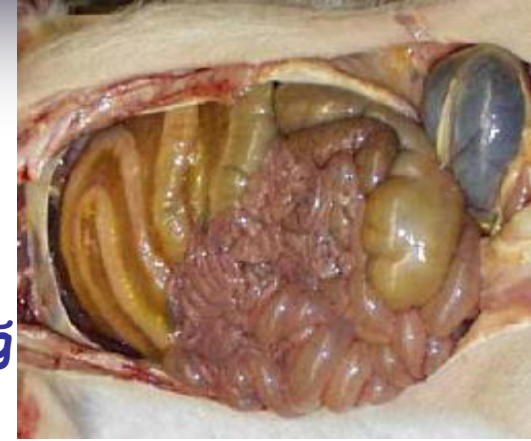
## Genotipik özellikler

- ❑ PZR ribotip O78
- ❑ Toksin tipi: V



## Besi Hayvanları ve Gıdalar

- ❑ At, tavşan, hamster, domuzlarda *C. difficile* varlığı
- ❑ Besi hayvanlarında *C. difficile*'ye bağlı salgınlar
  - ❑ Yenidoğan domuzlar
  - ❑ Sığırlar ve süt inekleri
- ❑ Perakende et ürünleri, hazır salatalar, çiğ süt ve çiğ sebzeler
- ❑ Kanada ve ABD'de perakende et ürünlerinde %20-40 oranında *C. difficile* varlığı
- ❑ Hollanda'da insan ve domuz O78 ribotip *C. difficile* suşlarının genetik olarak oldukça ilişkili olduğu tespit edilmiş olması kaynağın çevresel olabileceğini düşündürmüştür



Songer et al. Emerg Infect Dis 2009; 15: 819-821.  
Rodriguez-Palacios et al. Emerg Infect Dis 2009; 15: 802-805.

# *Clostridium difficile*: Erken Tanının Önemi

- ❑ Komplikasyonların ve bulaşın önlenmesi
- ❑ Etkin tedavi
- ❑ Çevreye yayılım ve salgınların engellenmesi

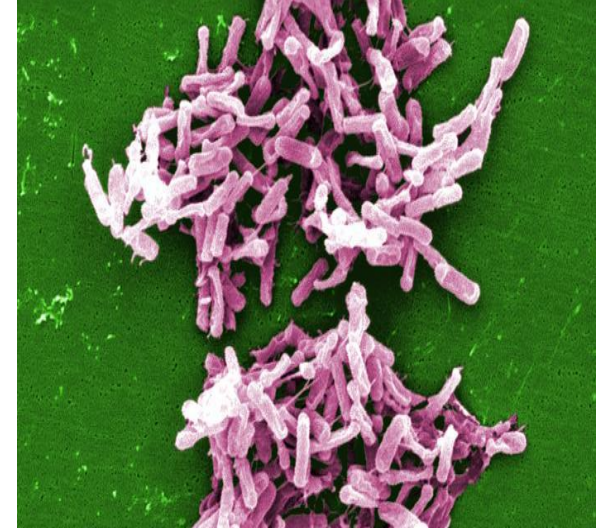
# Laboratuvar Tanı

## *C. difficile* : Kesin Tanı

- Dışkı incelemesinde toksin A ve/veya B'nin gösterilmesi
- Toksik *C. difficile* suşunun izole edilmesi

## *C. difficile* kimlerde test edilir?

- ❑ Hastanede yatan 2 yaş üzeri ishalleri hastalar
- ❑ Toplum kaynaklı 65 yaş üzeri ishalleri hastalar
- ❑ Kliniđi uyumlu olan toplum kaynaklı 65 yaş altı hastalar





# Dışkı Örneklerinin Alınması

- Sulu, şekilsiz taze dışkı!
- En az 5 ml (5-50 ml)
- Steril, geniş ağızlı, sızdırmaz vida kapaklı dışkı kabı
- Mümkünse tedavi öncesinde
- Örnekler hemen laboratuvara gönderilmeli ve çalışılmalı
- Örneklerin laboratuvara taşınması;
  - $\leq 1$  sa oda ısısında;  $\leq 48$  s  $+4^{\circ}\text{C}$ ;  $>48$  s kuru buz içinde
- Hemen çalışılmayacaksa  $\leq 48$  s  $+4^{\circ}\text{C}$ ;  $>48$  s  $-20^{\circ}\text{C}$  veya altında saklanmalı



# Laboratuvar Tanı Yöntemleri

## Toksin Testleri

- Hücre kültürü toksin nötralizasyon testi
- ELISA: Toksin A, Toksin B veya Toksin A+B
- Lateks aglütinasyon
- CIE

## Toksik *C. difficile* kültürü

## Antijen Testleri

- Glutamat dehidrogenaz (GDH)

## NAAT (Nükleik asit amplifikasyon testleri)

- PCR
- LAMP

# Laboratuvar Tanı Yöntemleri: Toksin Saptanması

## ❑ Hücre kültürü toksin nötralizasyon testi

❑ Altın standart!

❑ Toksin B saptanır

❑ Duyarlı ve özgül

İshalli hastalarda PCR veya toksijenik kültüre göre daha az duyarlı

❑ Tecrübe ve ekipman

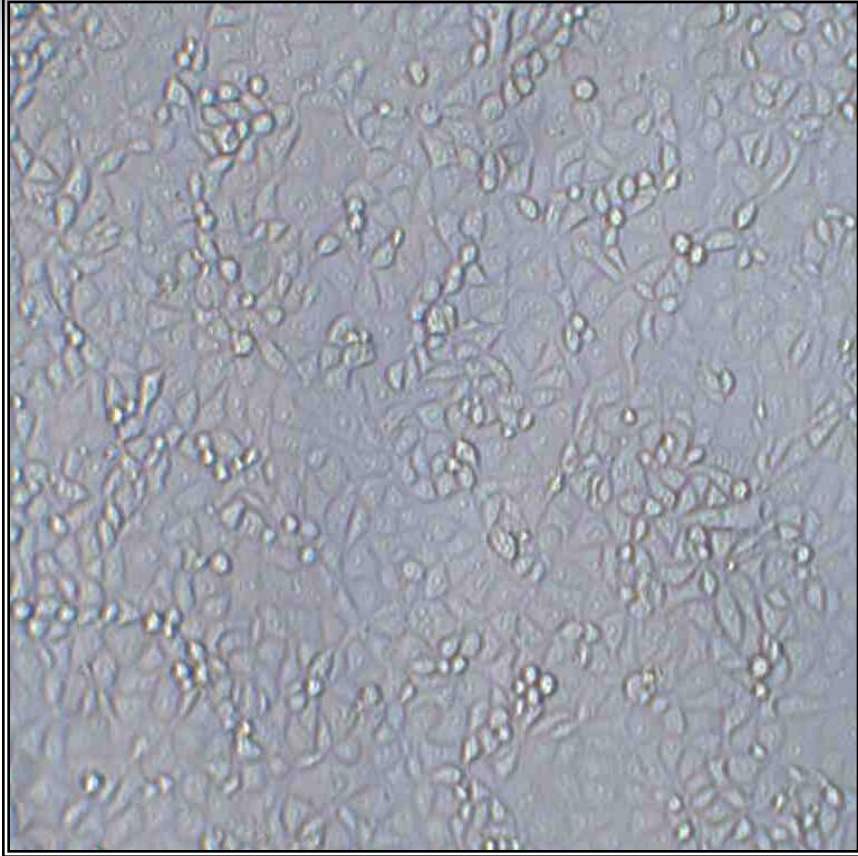
❑Pahalı

❑ 48 saatte sonuçlanır

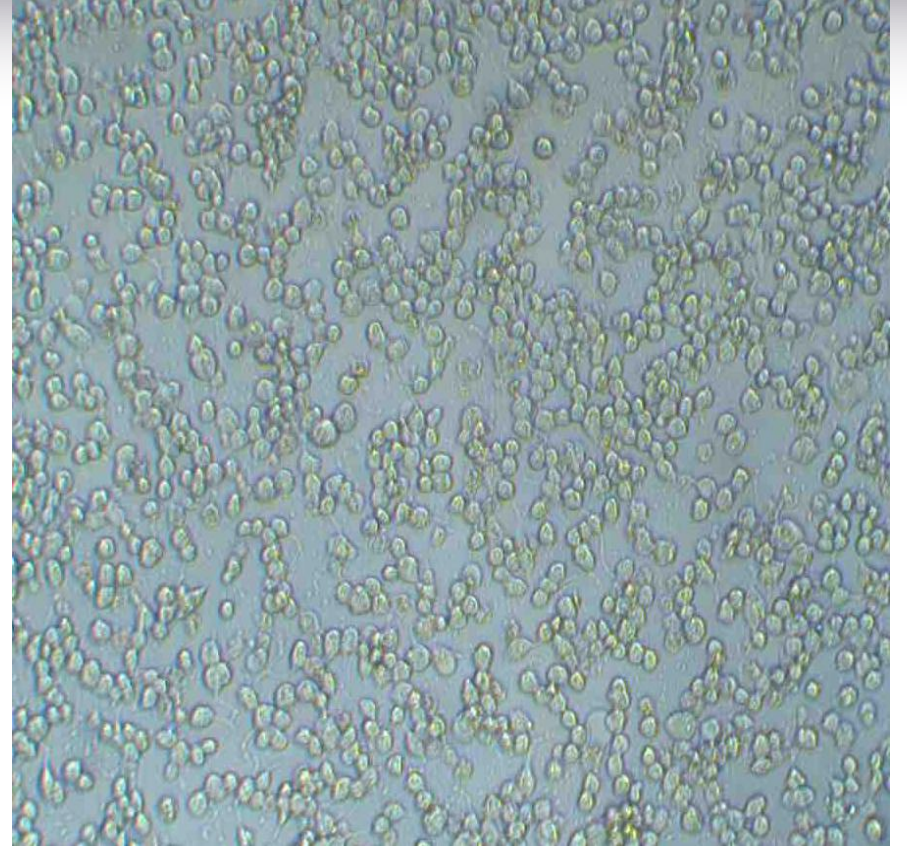
❑ Sitopatik etki incelenir

❑ Nötralizan antikorlar (anti-*C. sordellii* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar

# Toksin B'nin Vero Hücrelerine Sitopatik Etkisi



Normal Vero hücresi



Toksin B'ye bağlı sitopatik etki

# Laboratuvar Tanı Yöntemleri

## □ ELISA

- Toksin A+B, sadece toksin A
- Glutamat dehidrogenaz
- Duyarlılık ve özgüllük değişken

## □ İmmünokromatografik testler

- Duyarlılıkları düşük
- Toksin A+B ve GDH

## □ Lateks aglütinasyon testleri

- Duyarlılıkları düşük

## □ Counter immünoelektroforez (CIE)

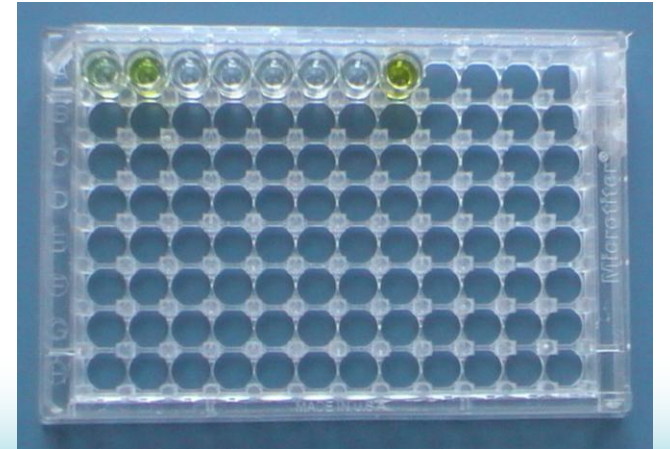
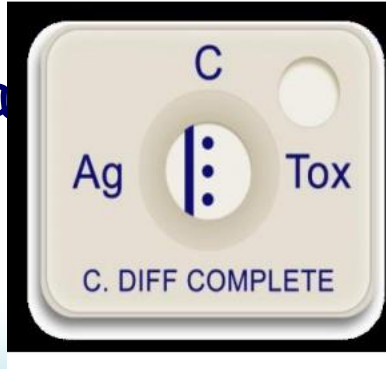
- Duyarlılık ve özgüllükleri çok düşük

# ELISA ve İmmünokromatografik testler

- Toksin A
- Toksin A+B
- Glutamat dehidrogenaz
- Duyarlılık: %32-99
- Özgüllük: %92-100
- PPD: %76-96
- NPD: %88-100



- Çabuk sonuç verir
- Kolay uygulanır
- Tek ya da çok sayıda örnek çalışılabilir
- Özgül
- Ucuz



## *Clostridium difficile* toksin testleri

- ❑ *Clostridium difficile* toksininin stabil olmaması
  - Oda ısısında degrade olması
  - Dışkı örneği alındıktan 2 saat sonra saptanamayabilir
  - Örnek uygun şekilde test edilmez veya test edilene kadar buzdolabında saklanmazsa yalancı negatif sonuçlar gözlenebilir
  
- ❑ Mutasyonlar
  - Toksin A-/ B+ suşlar
  - Binary toksin + suşlar



# Glutamat dehidrogenaz testi

- *Clostridium spp.* hücre yüzey proteini
- Dışkıda toksin A ve B'den daha dayanıklı
- Hızlı (<1 hr)
- Tüm pozitif örneklerde doğrulama gerekli
- Tek başına non-spesifik olduğundan toksin saptayan testler, PCR veya toksijenik kültür gibi testlerle birlikte iki aşamalı test algoritmaları kullanılmalıdır



## *C. difficile* kültürü

- ❑ Duyarlılığı yüksek
- ❑ Epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilir
- ❑ Geç sonuç verir (4 gün)
- ❑ Hücre kültürü nötralizasyon testi kadar özgül değil
- ❑ Suşların tiplendirilmesine olanak sağlar
- ❑ Toksik kültür
  - ❑ Toksin varlığı araştırılmalı
- ❑ Alkol şok veya Isı şok yöntemi
- ❑ Ekim öncesi besiyerlerinin anaerob ortamda indirgenmesi

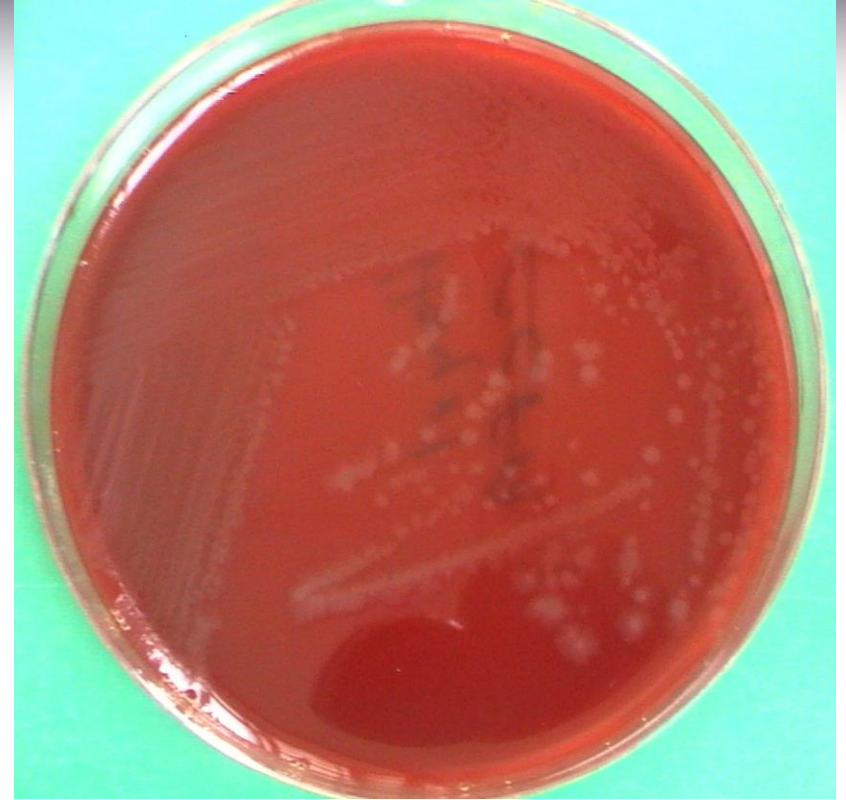
# Sikloserin Sefoksitin Fruktoz Agar (CCFA)

## İçerik:

- Proteose pepton
- Disodium hydrogen phosphate
- Potassium dihydrogen phosphate
- Magnesium sulphate
- Sodium chloride
- Fructose
- Agar

## Supplement:

- D- cycloserine
- Cefoxitin
- At kanı
- Sodyum taurokolat veya kolat ilavesi spor jermantasyonunu kolaylaştırarak izolasyon şansını artırır



*C. difficile* kolonilerinin CCFA besiyerindeki görünümü

# Alkol Şok Yöntemi

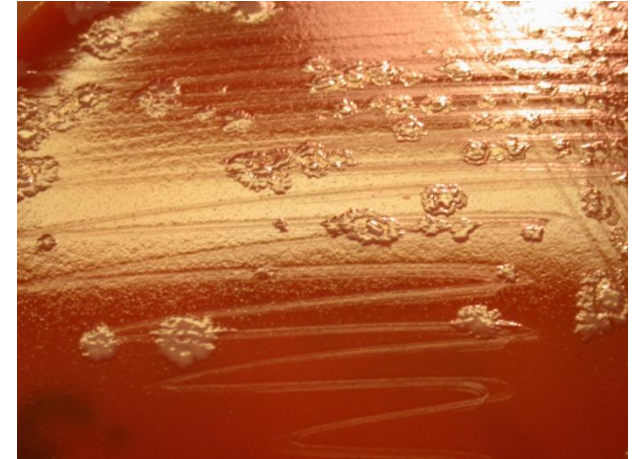
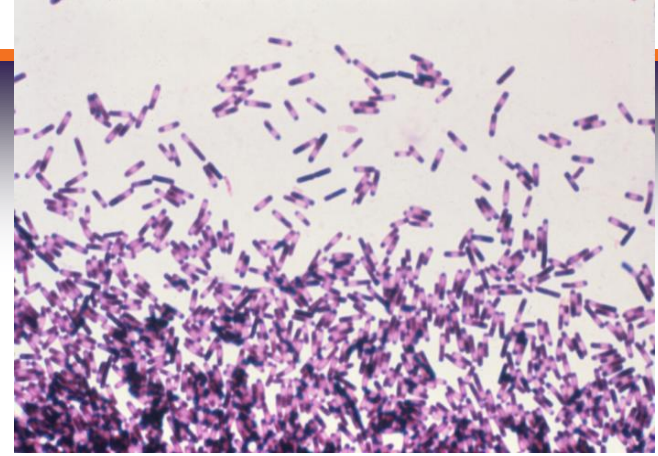
- ❑ *C. difficile*'nin seçici izolasyonu
  - ❑ 1:1 dışkı-absolu alkol süspansiyonu
  - ❑ Oda ısısında 30-60 dk
  - ❑ CCFA ve kanlı agara ekim
  - ❑ 35-37°C'de anaerob koşullarda 48-72 saat inkübasyon



*C. difficile* kolonilerinin kanlı agar besiyerindeki görünümü

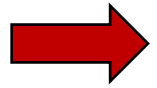
# İdentifikasyon Testleri

- ❑ Koloni morfolojisi
  - ❑ Değişik büyüklüklerde (1-5 mm), hemolizsiz, R veya S koloniler
  - ❑ Buzlu cam görünümünde
  - ❑ Sarımsı beyaz koloniler
- ❑ At dışkısına benzer koku
- ❑ Subterminal sporlu, Gram pozitif çomaklar
- ❑ 365 nm uv ışıkta yeşil-sarı floresans
- ❑ Lateks aglütinasyon testi



# Toksijenik Kültür

□ *C. difficile* suşu izole edilip, üreyen suştan toksin varlığının gösterilmesi

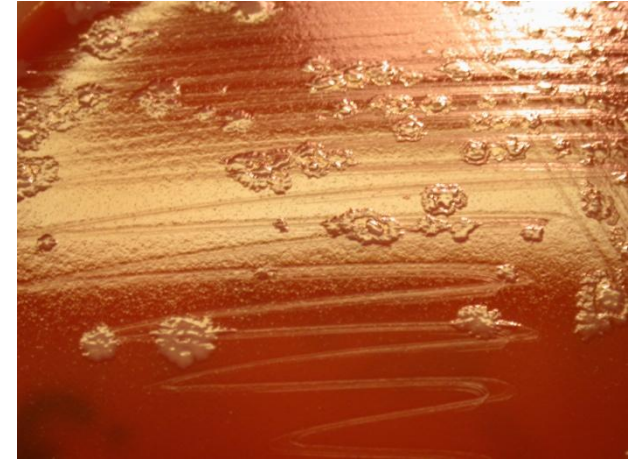
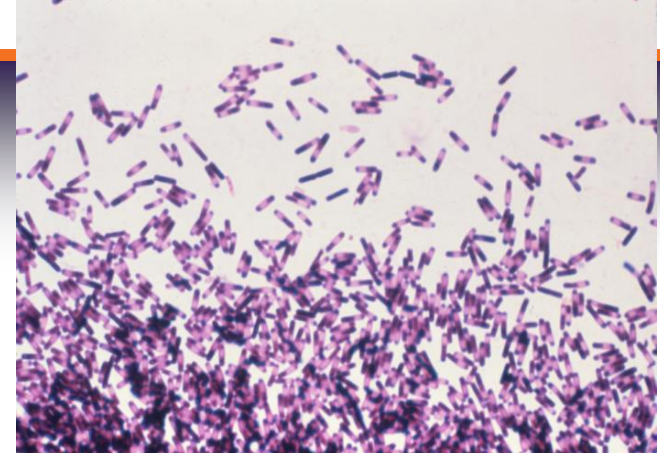


**TOKSİJENİK KÜLTÜR**

□ Beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde (BHI) 37C'de 24-248 saat inkübasyon sonrası toksin araştırması

□ Sitotoksin nötralizasyon kadar spesifik değil

□ Uzun sürede sonuçlanma (4 gün)



# Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

*Clostridium difficile*

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 3.0, valid from 2013-01-01

Disk diffusion criteria for antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* have not yet been defined and an MIC method should be used. If a commercial MIC method is used, follow the manufacturer's instructions.

Fluoroquinolones	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Moxifloxacin	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	1. Not used clinically. May be tested for epidemiological purposes only (ECOFF: WT ≤ 4 mg/L).

Glycopeptides	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Vancomycin	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Tigecycline	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	1. Not used clinically. May be tested for epidemiological purposes only (ECOFF: WT ≤ 0.25 mg/L).

Miscellaneous agents	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Daptomycin	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	1. Not used clinically. May be tested for epidemiological purposes only (ECOFF: WT ≤ 4 mg/L).
Fusidic acid	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2. Not used clinically. May be tested for epidemiological purposes only (ECOFF: WT ≤ 2 mg/L).
Metronidazole	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	3. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.
Rifampicin	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	4. Not used clinically. May be tested for epidemiological purposes only (ECOFF: WT ≤ 0.004 mg/L).

□ E test

□ MIC

# NAAT (Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri)

- In house veya ticari
- Toksin B/ Binary toksin
- Hızlı sonuç
  - 45 dk-3 saat



Test	Süre
Cepheid	45 dk
BD GeneOhm	75-90 dk
Gen Probe	3 sa
Meridian	45 dk



- Duyarlı ve özgül



# Tiplendirme Yöntemleri

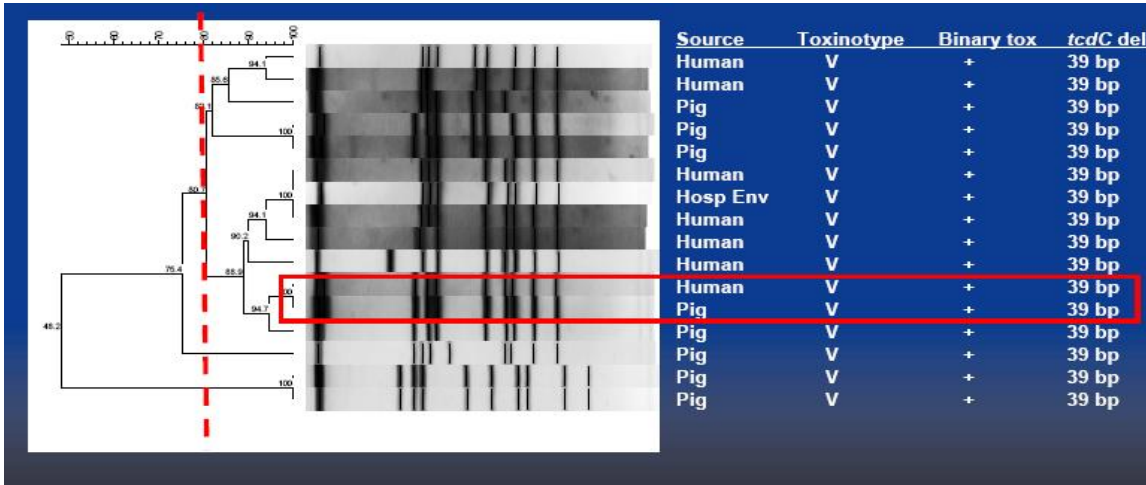
## ☐ Fenotipik

- ☐ Bakteriyofaj/ bakteriyosin tiplendirme
- ☐ Serotiplendirme

## ☐ Genotipik

### Band temelli

- ☐ PCR ribotiplendirme
- ☐ PFGE
- ☐ MLVA
- ☐ REA



### Sekans temelli

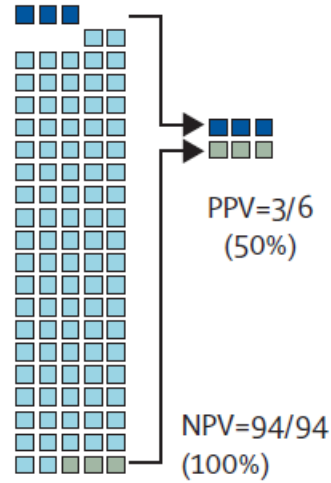
- ☐ MLST
- ☐ SNP tiplendirme

# CDI Tanısında Kullanılan Laboratuvar Testleri

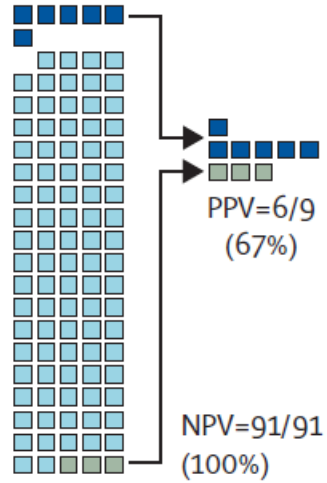
- Dışkıda toksin A ve B'yi saptayan *C. difficile* ticari kitleri hücre kültürü toksin testi ile karşılaştırılmış

Testler	Duyarlılık	Özgüllük
Meridian Premier	0·95 (0·86–0·97)	0·97 (0·95–0·98)
TechLab Tox A/B II	0·83 (0·82–0·85)	0·99 (0·98–1·00)
TechLab Tox A/B Quik Chek	0·84 (0·81–0·87)	1·00 (0·99–1·00)
Remel Xpect	0·82 (0·75–0·89)	0·96 (0·95–0·98)
Meridian Immunocard	0·90 (0·84–0·92)	0·99 (0·98–1·00)
BioMérieux VIDAS	0·76	0·93

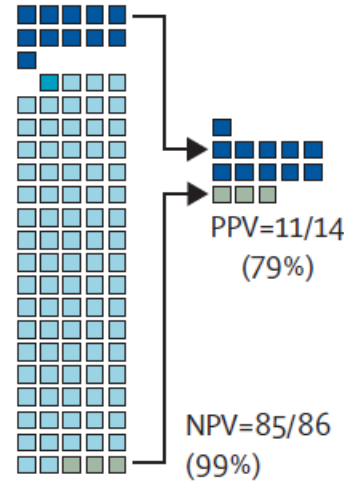
Prevalence 3%



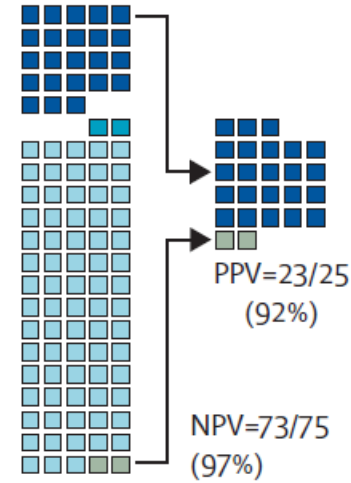
Prevalence 6%



Prevalence 12%



Prevalence 25%




■ True positive  
■ False negative

■ False positive  
■ True negative

$$\text{PPV} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

- Dışkıda toksin A ve B prevalansı nisbeten düşükse (<%10), testin PPV'si teste ve test edilen örnek sayısına bağlı olarak kabul edilemez düzeyde düşük (~%50)
- Tanıyı iyileştirmek için iki aşamalı test algoritmaları önerilmekte
  - Önce duyarlılığı yüksek, hızlı bir test ile tarama
  - Ardından pozitif örneklerin referans yöntemle doğrulanması

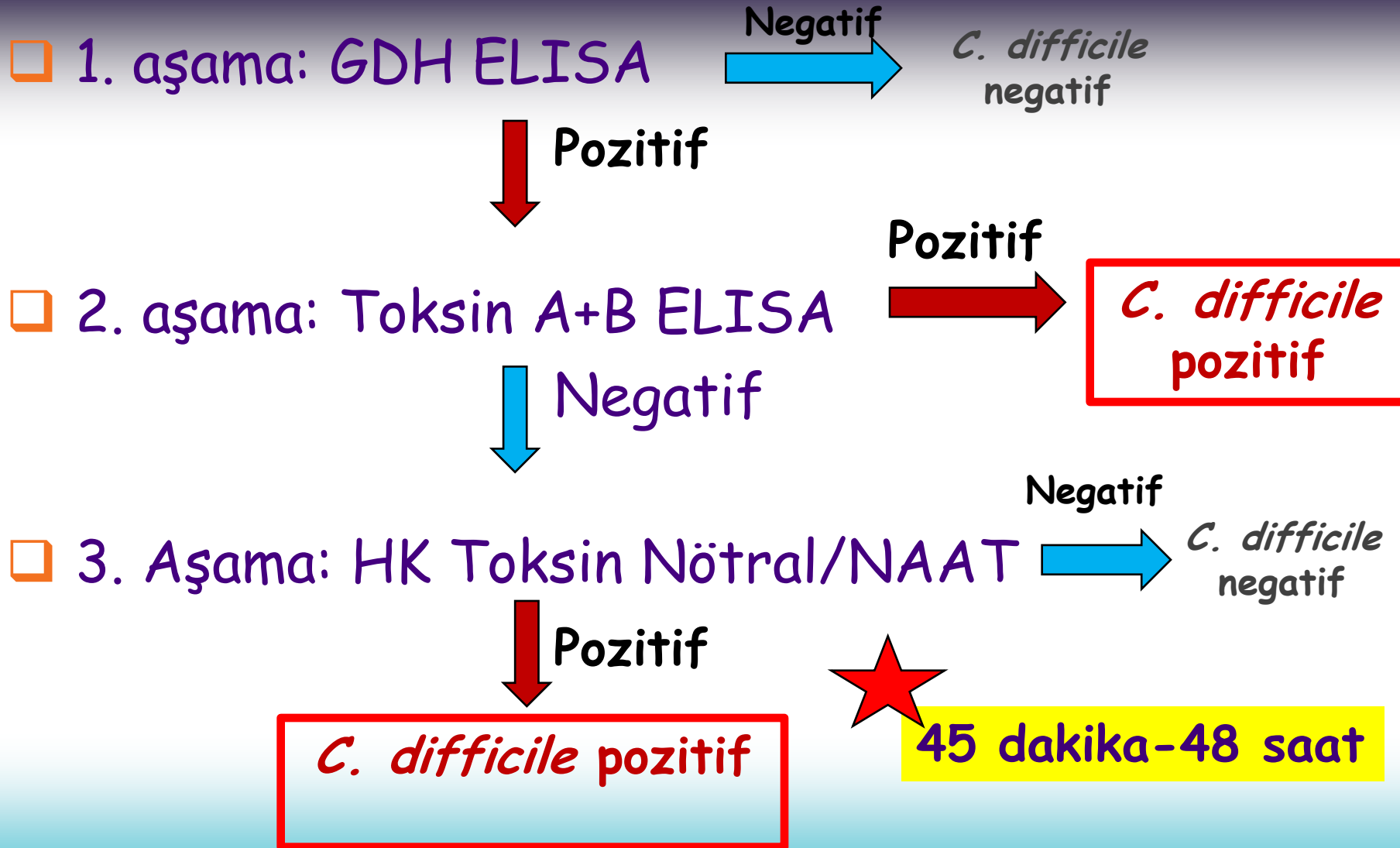
## *C. difficile* Test Algoritmaları

- ❑ *C. difficile* toksin ELISA tanıda tek başına yeterli değildir
- ❑ İki testin kombinasyonu:
  - ❑ 1. aşama: GDH ELISA veya NAAT  
  
Pozitif
  - ❑ 2. aşama: Toksin ELISA (veya Sitotoksin testi)

# Sonuçların Yorumlanması

GDH/ NAAT	Toksin ELISA	YORUM
Pozitif	Pozitif	<i>C. difficile</i> pozitif
Pozitif	Negatif	Potansiyel <i>C. difficile</i> taşıyıcısı
Negatif	Negatif	<i>C. difficile</i> mevcut değil (diğer patojenler)

## *C. difficile* Test Algoritmaları: Üç test kombinasyonu



# Laboratuvar alışmaları

# Avrupa *C. difficile* Enfeksiyon Sürveyi (ECDIS)

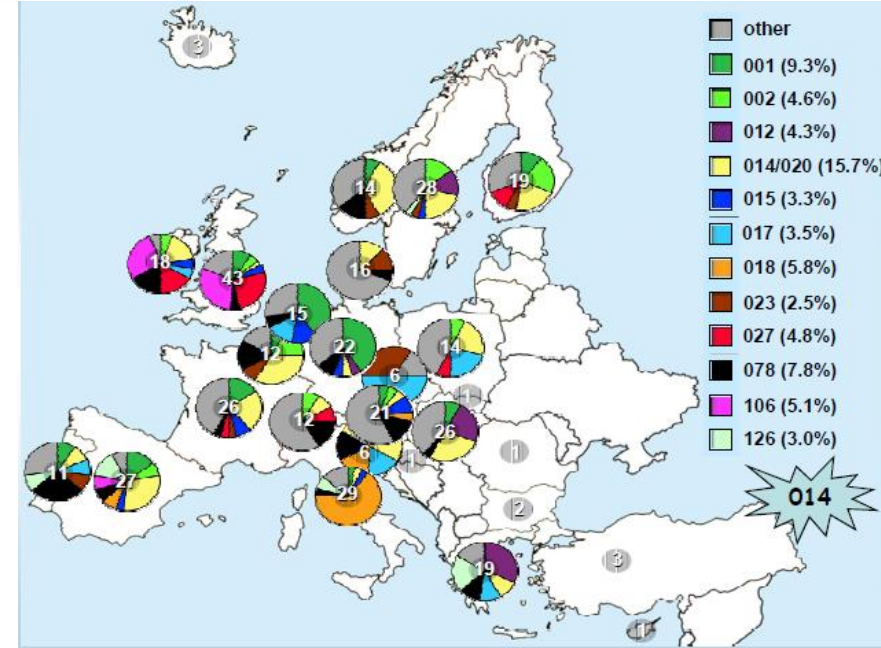
- ❑ Kasım 2008'de sürvey ve Şubat 2009'da takip çalışması
- ❑ 34 Avrupa ülkesinden 106 laboratuvar
- ❑ 2 yaş üzerinde CDBİ şüpheli hastanede yatan ya da ayaktan başvuran, klinik bulguları ve dışkıda toksin varlığı pozitif hastalar
- ❑ 484'ü takip edilen 509 hasta
- ❑ Ortalama yaş: 71
- ❑ CDBİ insidansı 10 000 hasta gününde ortalama 5.5 (0-36.3)
- ❑ 395 *C. difficile* suşunda 65 farklı ribotip
- ❑ En sık 014/020 (%16), 001 (%9), 078 (%8), 027 (%5)



# Avrupa *C. difficile* Enfeksiyon Sürveyi (ECDIS)

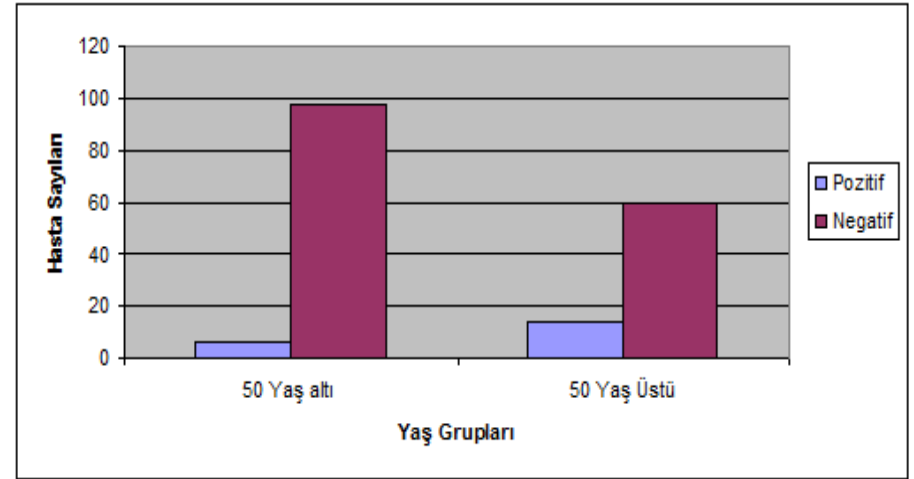
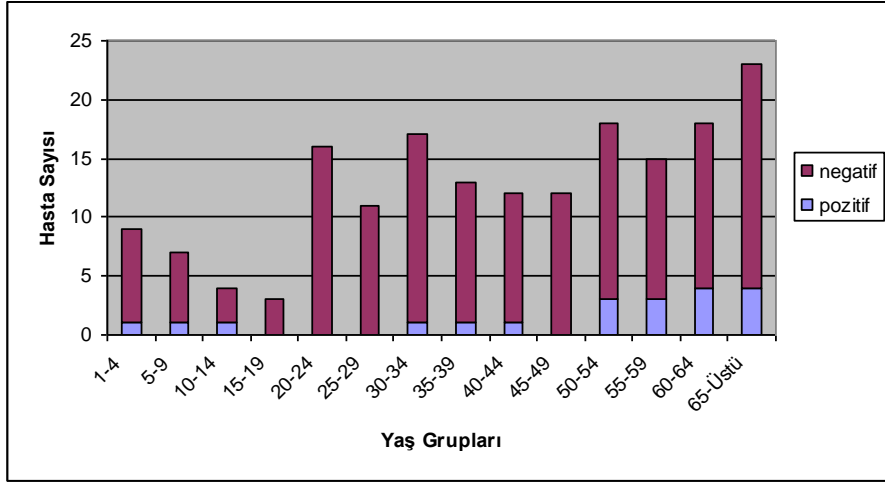
## Türkiye verileri

- Türkiye'den 3 ilden 5 hastane
- 105 CDBİ şüpheli hastanın 5'inde *C. difficile* toksin pozitifliği
- CDBİ insidansı 10 000 hasta gününde 0.1 (0-0.6)
- *C. difficile* suşları 014 ribotipine ait ve binary toksin negatif



# Türkiye'de *C. difficile* Enfeksiyonları

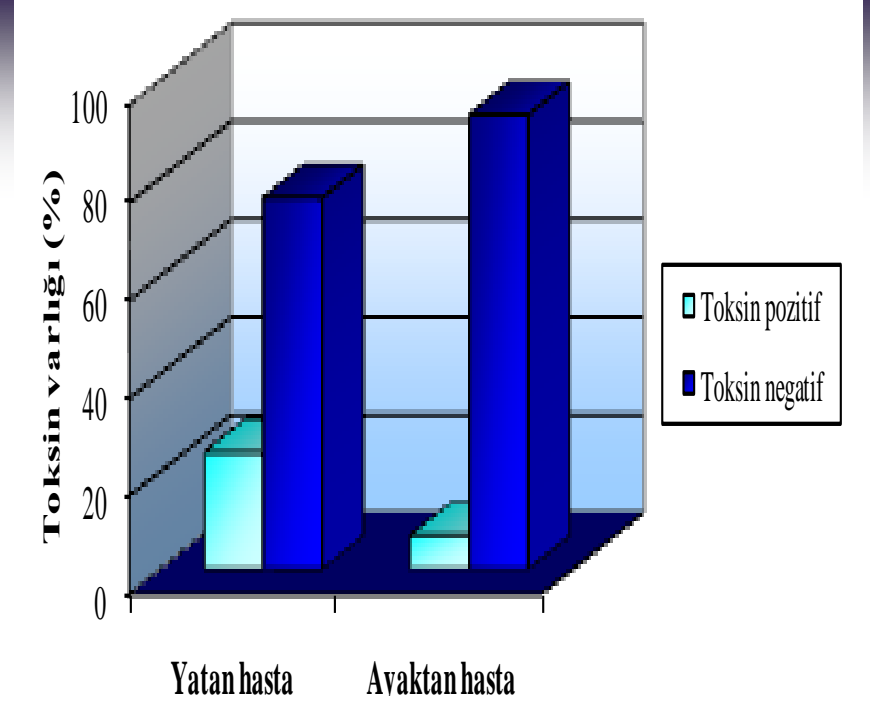
- 2005 yılında 11 hastane ve sağlık merkezi
- Yaş ortalaması:  $42.0 \pm 20.2$
- İstatistiki olarak, 50 yaş ve üzerinde CDBİ tanısı alma olasılığı anlamlı olarak birliktelik göstermektedir (OR: 3.81, 95% CI=1.28-11.83)



# Türkiye'de *C. difficile* Enfeksiyonları

- 2006-2007 yıllarında
- 72 CDBİ şüpheli hasta örneğinden 12'sinde (%16.7) toksin A/B ELISA ve toksijenik kültür yöntemleriyle toksin pozitifliği
- Hastaların biri dışında tümü hastane kaynaklı enfeksiyona sahip
- 12 hastadan beşi kemik iliği transplantasyon ünitesinde yatmaktaydı

Turan ve ark. 2nd Int. *C. difficile* Symposium 2007



- *C. difficile* toksin varlığı yatan hastalarda ayaktan hastalara göre 4.1 kat (% 95 GA=1.155-14.680) daha fazla izlenmiştir (p=0.020)

Turan ve ark. 2010

# Türkiye'de *C. difficile* Enfeksiyonları

Ankara'da 2006-2009 tarihleri arasında *C.difficile*'ye bağlı ishal şüpheli olup, hastanede yatan 89 hastadan ve çeşitli sağlık kuruluşlarına ayaktan başvuran 43 hastadan alınan toplam 132 gaita örneği incelenmiştir

**Tablo 8.** *C.difficile* tanı yöntemlerinin hücre kültürü testine göre geçerlilik test sonuçları

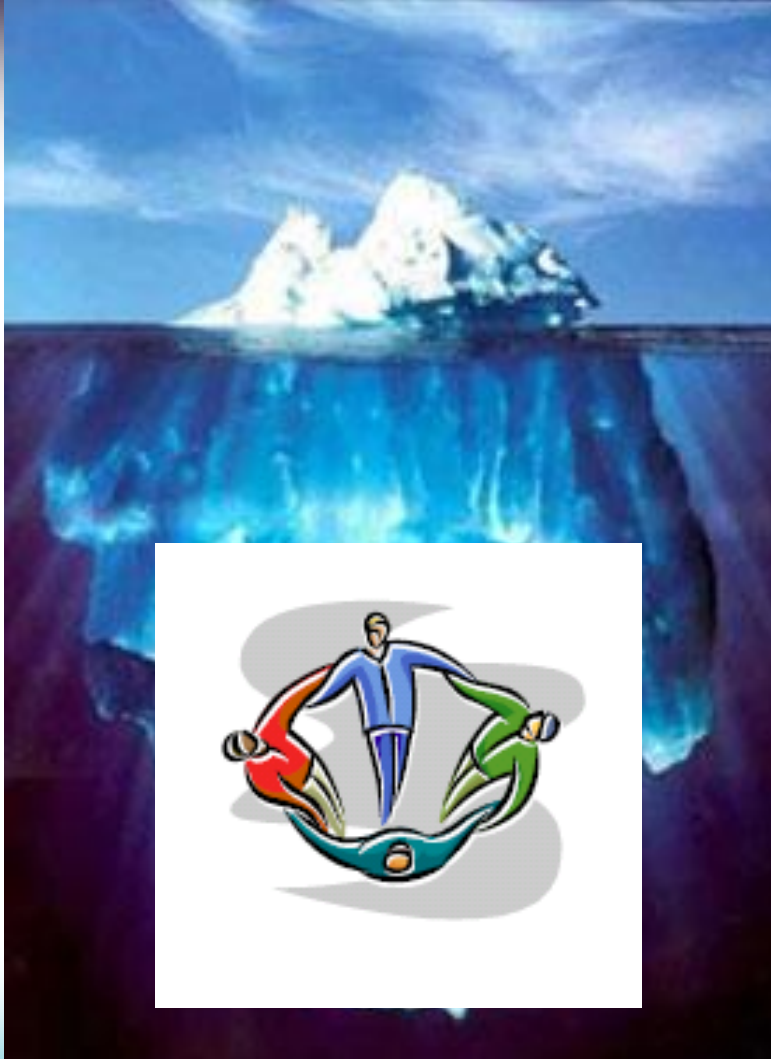
Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
RT-PZR	91.6	79.6	50.0	97.7
GDH	41.6	92.5	55.5	87.7
Toksijenik kültür	50.0	91.6	57.0	89.0

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

RT-PZR: ProGastro™ Cd Assay

# ÖZET

- ❑ *C. difficile* tanı yöntemleri her geçen gün gelişmektedir
- ❑ Tanıda tek başına yeterli bir test yoktur
- ❑ Enfeksiyonun düşük prevalanslı olduğu ülkelerde iki aşamalı testler kullanılabilir
- ❑ Moleküler testler ümit vaat etmekle birlikte günümüzde pahalıdır



**Teşekkürler...**

**E-posta: [belkislevant@hotmail.com](mailto:belkislevant@hotmail.com)**