

Akut gastroenteritli çocuklarda *Escherichia coli* O157 tanısında kromojenik besiyerinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve prevalansı

Prevalence and evaluation of a chromogenic medium for isolation of *Escherichia coli* O157 from children with acute gastroenteritis

Kenan DEĞERLİ¹, Semra KURUTEPE¹, Hörü GAZİ¹, Mete DEMİREL², Emel GÜLKAN¹, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

²Moris Şinasi Çocuk Hastanesi, Manisa

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada Ekim 2008-Ekim 2010 tarihleri arasında 0-5 yaş arası 339 akut gastroenterit olgusundan alınan dışkı örneklerinde *Escherichia coli* O157 prevalansı ve etkenin saptanmasında konvansiyonel besiyeri Sorbitol-MacConkey agar (SMAC) ile kromojenik besiyeri CHROMagar O157'nin etkinliği araştırılmıştır.

Yöntemler: Dışkı örnekleri SMAC, CHROMagar, Selenit F, *Salmonella-Shigella* (SS) ve MacConkey agara ekilmiştir. Tüm plaklar 35°C, aerobik ortamda 24-48 saat inkübe edilmiştir. SMAC besiyerinde oluşan şeffaf koloniler ve CHROMagar'da oluşan pembe-mor renkli şüpheli koloniler konvansiyonel ve yarı otomatize sistem ile ileri identifikasyon için seçilmiştir. *E. coli* olarak tanımlanan kolonilerde O157 antijeni Dry spot *E.coli* O157 Lateks Aglutinasyon testi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 339 dışkı örneğinin 14'ünde (%4.1) *Salmonella* spp ve 11'inde (%3,2) *Shigella* spp. ve 1'inde (0.3) *E. coli* O157 saptanmış olup, izole edilmiştir. *E. coli* O157 araştırılan 339 SMAC besiyerinin 14 (%3,8)'ünde, 339 CHROMagar besiyerinin 8 (%2,1)'inde şüpheli koloni saptanmıştır. Her iki besiyerinde 1 plakta *E. coli* O157 tanımlanmıştır. SMAC besiyerinde CHROM besiyerinin iki katına yakın (SMAC: 13 - CHROM: 7) yalancı pozitiflik saptanmıştır (p<0,05).

Sonuç: *E. coli* O157'nin rutinde kanlı diyaresi olan seçilmiş olgularda araştırılmasının ve tanısında kromojenik besiyerinin kullanımının uygun olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Gastroenterit, *Escherichia coli* O157, tamı, kromojenik besiyeri

ABSTRACT

Objective: Comparative performance status of CHROMagar O157 (CHROM) sorbitol-MacConkey (SMAC) media for the detection of *Escherichia coli* (*E.coli*) O157 in stool specimens isolated from 339 children under 5 years of age who presented with acute gastroenteritis between September 2008 and September 2010 was determined.

Methods: Stool specimens were inoculated onto Sorbitol-MacConkey agar (SMAC), CHROMagar O157, Selenit F, *Salmonella-Shigella* (SS) and MacConkey agars. All plates were incubated aerobically for 24 to 48 h at 35°C. Colorless colonies on the SMAC plate and mauve colonies on the CHROM plate were selected for further identification by conventional biochemical tests as well as by semi-automated system. Colonies confirmed to be *E.coli* were screened for O157 antigen by Dry spot *E.coli* O157 latex particle agglutination test.

Results: In 339 stool samples examined, *Salmonella* spp was isolated in 14 (4.1%), and *Shigella* spp. in 11 (3.2%), while *Escherichia coli* O157 was detected in only 1 (0.3%) sample. Suspect *E.coli* O157 stains grew on 8 CHROMagar (2.1%; 8/339) and 14 SMAC (14/339; 3.8%) plates. Rate of false positivity for colony picks from SMAC (n=13; 65%) media was almost 2-fold higher than that for CHROM (n=7; 35%).

Conclusion: Routine use of chromogenic media for the investigation of *E.coli* O157'nin in the selected cases with bloody diarrhea is deemed appropriate.

Key words: Gastroenteritis, *Escherichia coli* O157, diagnosis, chromogenic media

Alındığı tarih: 20.12.2011

Kabul tarihi: 14.01.2012

Yazışma adresi: Doç. Dr. Kenan Değerli, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı, 45010, Manisa

e-mail: kdegerli@yahoo.com

GİRİŞ

Gastroenteritler çocukluk yaş grubunun en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır ⁽¹⁾. Çocukluk yaş grubunda akut gastroenteritlerin en sık nedeni ise enfeksiyöz etkenlerdir ^(2,3). İnsanlarda ve hayvanlarda bağırsak florasının önemli bir parçasını oluşturan *Escherichia coli*'nin ishale neden olan türlerinden biri olan *E. coli* O157 ürettiği toksin nedeniyle verotoksijenik *E. coli* (VTEC) ya da Shiga benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmaktadır ⁽⁴⁻⁵⁾. *E. coli* O157 özellikle çocuklarda hafif ishalden şiddetli kanamalı ishal (hemorajik kolit) ve hemolitik üremik sendroma kadar değişen ciddi klinik tablolara neden olabilmektedir. *E. coli* O157 infeksiyonlarının artan sıklığı ve yol açtığı ciddi komplikasyonları nedeniyle Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention) 1993 yılında tüm dışkı örneklerinde ya da en azından kanlı olanlarda Sorbitol-MacConkey besiyeri (SMAC) kullanılarak *E. coli* O157 kültürünün yapılmasını önermiştir ⁽⁶⁾. Ülkemizde *E. coli* O157 infeksiyonunun sıklığına ilişkin verilerin yetersiz olması ve tanı testlerinin getirdiği ek maliyetler nedeni ile dışkıda *E. coli* O157 aranması için kullanılan yöntemler mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin uygulamaya girememiştir.

Bu çalışmada ishal nedeniyle başvuran 0-5 yaş arası çocuklarda *Escherichia coli* O157 prevalansı ve etkenin saptanmasında kromojenik besiyeri CHROMagar O157'nin etkinliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Ekim 2008- Ekim 2010 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji ve Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen 0-5 yaş arası gastroenterit nedeniyle başvuran tüm olguların dışkı örnekleri prospektif olarak inceleme-ye alınmıştır. Son üç gün içinde antibiyotik kullanmamış ve 24 saatten fazla akut ishal yakınması olan

toplam 339 olgunun dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm örnekler ait hasta bilgileri kaydedilmiştir. Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen dışkı örnekleri özel taşıyıcı dışkı kaplarında iki saat içerisinde laboratuvarımıza iletilmiştir. Kabul edilen tüm dışkı örneklerinin makroskopik ve direkt mikroskopik incelemesi yapılmış, kan ve lökosit varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen dışkı örnekleri *E. coli* O157 araştırılması için konvansiyonel besiyeri Sorbitol-MacConkey agar (SMAC) (BBL-Becton Dickinson, USA) ile kromojenik besiyeri olan CHROMagar O157 (BBL-Becton Dickinson, USA) eşzamanlı ekilmiştir. Aynı zamanda örnekler rutin dışkı kültürü için Selenit F, *Salmonella-Shigella* (SS) agar ve MacConkey agara ekimleri yapılarak, *Salmonella* ve *Shigella* enteropatojenleri araştırılmıştır. Tüm plaklar 35°C'de, aerobik ortamda 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Sorbitol-MacConkey besiyerinde oluşan şeffaf koloniler ve kromojenik besiyeri olan CHROMagar O157'de oluşan pembe-mor renkli koloniler *E. coli* O157 yönünden incelemeye alınmıştır. Şüpheli koloniler ileri identifikasyona alınarak konvansiyonel ve yarı-otomatize tanı sistemi (BBL Crystal GN, Becton Dickinson, ABD) ile *E. coli* açısından incelenmiştir ⁽⁷⁾. *E. coli* olarak tanımlanan suşlarda O157 antijeninin varlığı Dry spot *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon testi (Oxoid, İngiltere) ile araştırılmıştır. Dry spot *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon testi pozitif bakteriler *E. coli* O157 olarak tanımlanmıştır.

İstatiksel analiz; veriler SPSS for Windows version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programında Fisher'in ki-kare testi kullanılarak değerlendirilmiş, p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışma için Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan (0181/2008) onay alınmıştır.

BULGULAR

Akut gastroenterit semptomları bulunan 0-5 yaş arasındaki 339 olgunun 157'si (%46,3) kız, 182'si

(%53,7) erkek çocuk olarak kaydedilmiştir. Çalışmaya alınan 339 dışkı örneğinin 14'ünde (%4,1) *Salmonella* spp. ve 11'inde (%3,2) *Shigella* spp. ve birinde (0,3) *E. coli* O157 izole edilmiştir. İncelenen dışkı örneklerinin %15,3 (52)'ünde lökosit saptanırken, %7,1 (24)'inde ise dışkıda kan saptanmıştır. Lökosit saptanan örneklerin %26'sında *Salmonella* spp., %21,2 *Shigella* spp. ve %1,9 *E. coli* O157 izole edilirken, kanlı dışkı örneklerinde *Shigella* spp (%45,8) anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 1).

E. coli O157 araştırılan 339 SMAC besiyerinin 14 (%3,8)'ünde, CHROMagar besiyerinin 8 (%2,1)'inde şüpheli koloni saptanmıştır. İleri identifikasyonda SMAC besiyerinde ve CHROMagar besiyerinde 1 plakta *E. coli* O157 olarak tanımlanmış olup, her iki besiyerinde saptanan *E. coli* O157 suşu aynı hasta örneğinden izole edilmiştir. Yalancı pozitiflik oranı SMAC besiyerinde (%93-13/14) CHROMagar besiyerinden (%87-7/8) daha yüksek saptanmakla birlikte, anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak,

Tablo 1. CHROMagar ve SMAC besiyerinde şüpheli koloni oranları.

CHROMagar	SMAC by		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	6	2	8
Negatif	8	323	331
Toplam	14	325	339

Tablo 2. İzole edilen bakteriyel patojenlerin dışkıda lökosit ve kan varlığına göre değerlendirilmesi.

CHROMagar	Kan pozitif (n=24)		Lökosit pozitif (n=52)	
	N	%	N	%
<i>Salmonella</i> spp (n=14)	3	12,5	14	26,9
<i>Shigella</i> spp (n=11)	11	45,8	11	21,2
<i>E.coli</i> O157 (n=1)	1	4,2	1	1,9
*Etken saptanmayan	9	37,5	26	50,0
Toplam	24	100,0	52	100,0

*Etken saptanmayan: *Salmonella* spp, *Shigella* spp ve *E.coli* O157 etkenlerinin saptanmadığı örnekler

besiyerlerinin yalancı pozitiflik sayıları karşılaştırıldığında SMAC besiyerinde CHROM besiyerinin iki katına yakın (SMAC:13 - CHROM: 7) yalancı pozitiflik saptanmıştır ($p<0,05$).

TARTIŞMA

İshalli hastalıklar dünyanın her yanında yaygın olmakla birlikte, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde özellikle küçük çocuklar için son derecede önemli bir sağlık sorunu ve önde gelen bir ölüm nedenidir. Tüm dünyada her yıl 2.5 milyon civarında beş yaş altı çocuk ishalleri hastalıklar nedeniyle ölmektedir⁽⁸⁾. Dışkı kültürü ülkemizde rutin olarak genellikle *Salmonella*, *Shigella* ve bazı laboratuvarlarda *Campylobacter* türleri için yapılmakta olup, diğer mikroorganizmaları aramaya yönelik kültürler ise ancak özel durumlar için uygulanmaktadır⁽⁹⁾.

E. coli O157 gibi enterik patojenlerin dışkı örneklerinde saptanmasına yönelik kromojenik besiyerlerinin etkinliğinin araştırıldığı klinik çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada araştırılan 339 örneğin yalnızca birinde *E. coli* O157 saptanmış olup, bu suş her iki besiyerinden de izole edilmiştir. Koloni görünümüne göre yalancı pozitiflik oranı SMAC besiyerinde (%93-7/8) CHROMagar besiyerinden (%87-13/14) daha yüksek saptanmakla birlikte, anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak, besiyerlerinin yalancı pozitiflik sayıları karşılaştırıldığında SMAC besiyerinde CHROM besiyerinin iki katına yakın (SMAC:13 - CHROM: 7) yalancı pozitiflik saptanmıştır ($p<0,05$). Bu da ileri identifikasyon ve iş yükü artışına neden olmuştur. Kromojenik besiyerinde yalancı pozitiflik oranının düşük saptanmasının, içeriğinde bulunan potasyum tellürit, sefiksim ve sefsulodin diğer enterik bakterileri inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Church ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ yaptıkları bir çalışmada, rutin dışkı örneklerinde *E. coli* O157 saptanmasında BBLCHROMagar O157 besiyerinin SMAC besiyerine göre daha duyarlı bulunduğu bildirilmiştir. Diğer bir kromojenik O157 besiyerinin (O157 H7 ID-F; bioMe`rioux SA,

Marcyl'Etiole, France) *E. coli* O157 ve diğer STEC suşlarının izolasyonunda iyi performans gösterdiği bildirilmiştir⁽¹¹⁾.

Semptomatik hastalığın en çok çocuklarda ve yaşlılarda görüldüğü bildirilmektedir⁽¹²⁾. STEC ilişkili diyare prevalansının Avrupa'nın 11 ülkesinde 0.3-9.3 arasında olduğu, STEC ilişkili HÜS olgularının %63-97'sinin *E. coli* O157'ye bağlı olduğu bildirilmiştir⁽¹²⁾. McDonald ve ark.⁽¹³⁾, 6845 hastaya ait dışkı örneklerinin incelendiği bir çalışmada, *E. coli* O157 pozitifliği %0.4 oranında bildirilmiştir. Ülkemizde bu etkene yönelik yapılan çalışmalarda 0-15 yaş grubundaki akut gastroenterit olgularında *E. coli* O157 pozitifliği %0.2-3 arasında bulunmuştur⁽¹⁴⁻²⁰⁾.

STEC, hemen her yıl dünyanın farklı bölgelerinde salgınlara neden olmaktadır. Salgınlar kişiden kişiye yayılımın kolay olduğu okullar, uzun dönemli bakım kurumları ve günlük bakım merkezlerinde ortaya çıkmaktadır. Dünyadaki en büyük salgın 1996 yılında Japonya'da görülmüş ve 8000'nin üzerinde olgu rapor edilmiştir⁽²¹⁾. 2011 yılında ise Almanya'da başlayan salgın Avrupa'da en büyük, dünyada ise 2. en büyük salgındır. Almanya'da 2453 STEC, 782 HUS olgusu tespit edilmiş ve bunların 35'i kaybedilmiştir^(22,23). Büyüklüğüne ve virülansına göre, şimdiye kadar rapor edilmiş en ölümcül STEC salgınıdır. Bu salgında sorumlu suşun *E. coli* O104:H4 serotipi olduğu tespit edilmiştir⁽²⁴⁾. Avrupa ülkelerinde ise, biri ölümlü olmak üzere 36 HUS, 66 EHEC olgusu görülmüştür. ABD'de az da olsa olguya rastlanmış olup, 3 HUS (biri kesin, ikisi şüpheli), 2 şüpheli EHEC olgusu bildirilmiştir⁽²⁵⁾.

Sonuç olarak, ülkemizden bildirilen sonuçlara ve çalışma verilerimize dayanarak *E. coli* O157'nin çocukluk yaş grubundaki akut gastroenterit olgularında sık rastlanılan bir etken olmadığını düşündürmektedir. Ancak, son Avrupa salgını göz önüne alındığında farklı serotiplerin de etken olabileceği, bu nedenle kanlı diyaresi olan seçilmiş olgularda STEC araştırmanın gerekli olduğu düşünülmüştür. Kromojenik besiyerinin yalancı pozitiflik sayısının

SMAC besiyerine göre %50 daha az olması, buna bağlı olarak ileri identifikasyon gereksiniminin azaltılması bu besiyerinin rutin kullanım için uygun olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamız Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (No:2007-083) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kosek M, Bern C and Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ 2003;81:197-204. PMID:12764516 PMCID:2572419
2. Amieva MR. Important bacterial gastrointestinal pathogens in children: a pathogenesis perspective. Pediatr Clin North Am 2005;52(3):749-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2005.03.002> PMID:15925661
3. Armon K, Elliott E. Acute gastroenteritis. In: Moyer VA, Elliott EJ, Davis RL, Gilbert R, Klassen T, Logan S (eds). Evidence-based pediatrics and child health. 8th. BMJ Books, London 2000;(43):377-91.
4. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 1991;13(1):60-98. PMID:1765120
5. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 1998;352(9135):1207-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01267-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01267-7)
6. Kehl SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. J Clin Microbiol 2002;40(8):2711-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2711-2715.2002> PMID:12149318 PMCID:120634
7. Bopp CA. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th. ASM Press, Washington, DC 2003; 659-71.
8. Ryan MO, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin Pediatr Infect Dis 2005;16(2):125-36. <http://dx.doi.org/10.1053/j.spid.2005.12.008>
9. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. Clin Microbiol Infect 2007;13(5):516-24. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01692.x> PMID:17331124
10. Church DL, Emshey D, Semeniuk H, Lloyd T, Pitout JD. Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus Sorbitol-MacConkey Medium for Routine Detection of *Escherichia coli* O157 in a Centralized Regional Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol 2007;45(9):3098-310. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00426-07> PMID:17634298 PMCID:2045293

11. Bettelheim KA. Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. *J Appl Microbiol* 2005;99(2):408-10.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02603.x>
PMid:16033473
12. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34(3):229-43.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00031-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00031-0)
13. McDonald KL, O'Leary MJ, Cohen ML. *Escherichia coli* O157, an emerging gastrointestinal pathogen. *JAMA* 1998;259(24):3567-70.
14. Arslantürk A, Zarakolu P, Güvener E: Çocuk yaş grubu akut enterokolit olgularında etken olarak *Escherichia coli* O157:H7 serotipinin araştırılması. *KLİMİK Derg* 1997;10(3):122-4.
15. Kaleli İ, Şengül M, Özen N, Akşit F. Gastroenteritli olgularda *Escherichia coli* O157'nin araştırılması. *İnfeksiyon Derg (Turkish J Infect)* 1999;13(3):235-8.
16. Aydoğan S, Sünbül M, Leblebicioğlu H, Eroğlu C, Esen Ş. Akut ishallerde hastalarda *Escherichia coli* O157 ve *Aeromonas* türlerinin sıklığı. *Mikrobiyol Bült* 2001;35(4):525-30.
17. Taş E, Ardıç N. Akut gastroenteritli olgularda termofilik *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 ve Rotavirus sıklığı. *KLİMİK Derg* 2004;17:186-90.
18. Tolun V, Anđ-Küçükler M, Diren Ş, Anđ Ö. Diyarli hastalardan alınan dışkı örneklerinde verotoksijenik *coli* (VTEC)'lerin PCR yöntemi ile saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2001;31(2):174-7.
19. Ekşi F, Karşılıgil T, Bayram A. Çocukluk Yaş Grubu İshallerinde *Escherichia Coli* O157:H7'nin Araştırılması. *Van Tıp Dergisi* 2007;14(1):15-8.
20. Yazıcı V ark. Akut Gastroenteritli Olguların Dışkı Örneklerinde Bazı Bakteri ve Virüslerin Araştırılması. *Ankem Derg* 2009;23(2):59-65.
21. Michino H ark. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 1999;150(8):787-96.
PMid:10522649
22. Wadl M ark. HUS surveillance and laboratory team. Enhanced surveillance during a large outbreak of bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 2011;16(24).pii:1989.
23. Faber M ark. on behalf of the HUS investigation team. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveill* 2011;16(21). pii:19878.
24. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/publications2/a-public-health-review-of-the-enterohaemorrhagic-escherichia-coli-outbreak-in-germany>.
25. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/healthtopics/emergencies/international-healthregulations/news/news/2011/06/ehec-outbreak-update-15>.