

Marmara Üniversitesi Hastanesinde Yatan İshalli Hastalardan İzole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Araştırılması*

Investigation of Toxin Genes of *Clostridium difficile* Strains Isolated from Hospitalized Patients with Diarrhoea at Marmara University Hospital

Umut DENİZ¹, Nurver ÜLGER¹, Burak AKSU¹, Melda KARAVUŞ², Güner SÖYLETİR¹

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul.

² Marmara University Faculty of Medicine, Department of Public Health, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, 19. ESCMID Kongresi (16-19 May 2009, Helsinki, Finland)'nde poster (P781) olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 31.08.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.11.2010

ÖZET

Toksijenik *Clostridium difficile* kökenleri kendiliğinden iyileşen ishalden, yaşamı tehdit eden kolite kadar değişen antibiyotikle ilişkili hastalıklara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonların patogeneğinde, bakteri tarafından üretilen toksin A ve toksin B büyük rol oynamaktadır. Ancak son yıllarda, bazı ülkelerde, virülansı yüksek yeni *C. difficile* kökenlerine (varyant toksin veya *binary* toksin pozitif) bağlı, antibiyotik ile ilişkili ishal epidemileri tanımlanmıştır. Bu çalışmada, hastanemizde yatan ishalli hastalardan izole edilen *C. difficile* kökenlerinin toksin gen profillerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Eylül 2006-Mart 2008 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan, ishali olan 633 hastanın dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Tüm örneklerde *C. difficile* toksin varlığı, ticari bir enzim immünoassay (ImmunoCard Toxins A&B EIA; Meridian Diagnostics, Belçika) kiti ile araştırılmıştır. Örneklerin kültürü sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA; BioMerieux, Fransa) kullanılarak anaerob koşullarda yapılmış; izolatlar, klasik yöntemlerle ve Rapid ID 32A (BioMerieux, Fransa) kiti ile tanımlanmıştır. Dışkı örneklerinden izole edilen *C. difficile* kökenlerinin toksin üretimi "Triage *C. difficile* Panel" (Biosite Diagnostics, İtalya) ve "ImmunoCard Toxins A&B EIA" (Meridian Diagnostics, Belçika) ticari kitleri ile; toksin A (*tcdA*), toksin B (*tcdB*) ve *binary* toksin (*cdtA* ve *cdtB*) genleri ise "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmamızda, 26'sı erkek ve yaş ortalaması: 35.9 ± 27.6 yıl (yaş aralığı 2-> 65 yıl) olan 50 (%7.9) hastanın dışkı örneğinden *C. difficile* üretilmiştir. İzole edilen tüm kökenlerde (n= 50), "Triage *C. difficile* Panel" kiti ile gluta-

İletişim (Correspondence): Dr. Nurver (Toprak) Ülger, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa Kampüsü, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 216 414 4732, **E-posta (E-mail):** nurverulger@yahoo.com

mat dehidrogenaz enzimi pozitif bulunmuş, aynı kit ile bunların 28 (%56)'inde toksin A varlığı da saptanmıştır. Doğrudan dışkı örneklerine uygulanan EIA testi ile toksin pozitiflik oranı %4.7 (30/633) olarak saptanmış, buna karşın *C.difficile* izolatlarından (n= 50) hazırlanan kültür filtratlarında aynı yöntemle toksin pozitifliği %5.7 (36/633) olarak bulunmuştur. Buna göre, EIA kitinin dışkı örneklerinde toksini belirleme açısından duyarlılığının %85.7 olduğu belirlenmiştir. Kültür filtratlarında toksin pozitifliği saptanan 36 kökenin hepsinde PCR ile toksin A ve toksin B genlerinin (*tcdA+*/*tcdB+*) varlığı tespit edilmiştir. İzolatlar arasında varyant kökenlere (*tcdA-*/*tcdB+*) veya *binary* toksin genine sahip kökenlere rastlanmamıştır. Çalışmamızda ayrıca, toksijenik *C.difficile* izole edilen hastaların %77.8 (28/36)'inin beta-laktam grubu (penisilin, sefalosporin ve imipenem) antibiyotik kullanım öyküsü olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, hastanemizde yatan ishalleri hastalara ait *C.difficile* izolatlarının toksin gen profilleri ile ilgili olarak elde edilen bulgularımız, gerek hastanemizin gerekse ülkemizin veri tabanları için bir kaynak oluşturacaktır. Şu an için varyant kökenler veya *binary* toksin genine sahip kökenlerle ilgili bir risk mevcut olmamakla birlikte, ileride oluşabilecek salgınların kontrolünde bu tip araştırmaların sürdürülmesi ve izolatların özelliklerinin izlenmesinin önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Clostridium difficile*; toksin A; toksin B; *binary* toksin.

ABSTRACT

Toxigenic *Clostridium difficile* strains cause a spectrum of antibiotic-associated diseases ranging from self-limited diarrhea to severe life-threatening colitis. Pathogenesis primarily involves the action of two important cytotoxins, namely toxin A and toxin B. However, epidemics of *C.difficile-associated* disease due to the novel, highly virulent strains of *C.difficile* (binary toxin positive and toxin A variant) have been recognised in hospitals of some countries. The aim of this study was to investigate the toxin gene profiles of *C.difficile* strains isolated from hospitalized patients with diarrhea. The stool specimens collected from 633 inpatients at Marmara University Hospital, Istanbul, Turkey, between September 2006-March 2008, were included to the study. The presence of *C.difficile* toxins in the samples has been screened by a commercial enzyme immunoassay kit (ImmunoCard Toxins A&B EIA; Meridian Diagnostics, Belgium). Stool samples were also cultivated on cycloserin-cefoxitin-fructose agar (CCFA; BioMerieux, France) at anaerobic conditions, and the isolates were identified by conventional methods and Rapid ID 32A (BioMerieux, France) system. Toxin production of *C.difficile* strains isolated from stool cultures have been detected by commercially available "Triage *C.difficile* Panel" (Biosite Diagnostics, Italy) and "ImmunoCard Toxins A&B EIA" (Meridian Diagnostics, Belgium) kits. In-house polymerase chain reaction (PCR) was performed to investigate the presence of genes for toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*) and binary toxin (*cdtA* and *cdtB*). Stool specimens from 50 (7.9%) patients (age range: 2-> 65 years; mean age: 35.9 ± 27.6 years; 26 were male) yielded *C.difficile* in culture. All of 50 isolates were found positive for glutamate dehydrogenase enzyme and 28 (56%) were found positive for toxin A with "Triage *C.difficile* Panel" kit. Toxin positivity rate was detected as 4.7% (30/633) with EIA test performed in stool samples directly, however this rate was 5.7% (36/633) in culture filtrates of the isolates (n= 50), with the same test. Since EIA test yielded false negative results in six samples, the sensitivity of this test was estimated as 85.7% by means of the detection of toxin in direct stool samples. All of the 36 toxin-producing *C.difficile* isolates were found positive for toxin A and toxin B genes (*tcdA+*/*tcdB+*), however there were neither variant strains (*tcdA-*/*tcdB+*) nor binary toxin gene positive isolates among tested bacteria. Our results have also indicated that 77.8% (28/36) of patients who harbored toxigenic *C.difficile* strains have the history of beta-lactam antibiotic (penicillin, cephalosporin and imipenem) use. It was thought that the data of this study would constitute a database on the toxin gene profiles of *C.difficile* in hospitalized patients with diarrhea both in our hospital and Turkey. The current data have indicated that for the time being there were no risk for isolates producing new toxin variants or binary toxin, however, continuous monitoring of such *C.difficile* strains is of crucial importance in order to detect the emergence of those strains and establish necessary control and preventive measures.

Key words: *Clostridium difficile*; toxin A; toxin B; *binary* toxin; Turkey.

GİRİŞ

Anaerop, sporlu, gram-pozitif bir bakteri olan *Clostridium difficile* kökenlerinin, antibiyotikle ilişkili ishale neden oldukları ilk kez 1977 yılında gösterilmiştir¹. *C.difficile* enfeksiyonlarının yakından takip edildiği ülkelerde, 1990'lı yıllarda bu enfeksiyonların insidansında bir artışın başladığı, 2006 ve 2007 yıllarında artış oranının en üst seviyeye ulaştığı belirlenmiştir². Bazı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde salgınlara yol açan, ağır seyirli enfeksiyonlara neden olan endemik kökenler tanımlanmıştır. Virülansı yüksek bu *C.difficile* 027/NAP1/BI kökenlerinin diğer bölgelere de yayıldığı ve tüm dünya ülkeleri için tehdit oluşturduğu görülmektedir³.

Antibiyotikle ilişkili ishale neden olan *C.difficile* kökenleri, Toksin-A (Tox-A) ve Toksin-B (Tox-B) olarak adlandırılan iki farklı toksin üretmektedir. Etki mekanizmaları benzer olan bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücrelerine girmekte ve hücrede aktin iskeletini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Toksinlerin, aynı zamanda birtakım sitokinlerin salgılanmasına, böylece inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açtıkları da anlaşılmıştır⁴. Önceleri, Tox-A'nın bağırsak epitelinde zedelenme oluşturduğu, ardından Tox-B'nin etkisini gösterdiği, dolayısıyla Tox-B'nin tek başına aktif olamayacağı düşünülmekte iken, moleküler tekniklerin gelişmesiyle, Tox-A olmaksızın Tox-B'nin sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır⁴. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, sadece Tox-B üreten kökenler tanımlanmış, bunun yanı sıra başka birtakım varyant kökenler de bildirilmiştir. Bazı kökenlerin fazla miktarda Tox-A ve Tox-B salgıladığı, bunlarda toksin ekspresyonu üzerinde negatif regülasyon yapan *tcdC* geninde bozukluk olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli ülkelerde hastane salgınlara yol açan virülansı yüksek 027/NAP1/BI kökeninin, *tcdC* geninde delesyon olduğu, buna bağlı olarak yüksek düzeyde Tox-A ve Tox-B salgıladığı belirlenmiştir. 027/NAP1/BI kökeninin aynı zamanda *binary* toksin (B-Tox) olarak tanımlanan üçüncü bir toksin ürettiği de gösterilmiştir³. B-Tox üreten *C.difficile* kökeni ilk kez 1988 yılında Popoff ve arkadaşları⁵ tarafından psödomembranöz kolitli bir hastadan izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda B-Tox'ın, aktine özgül ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahip olduğu, aktin monomerinin ADP ribozillenmesini sağlayarak hücre iskeletinde bozulmaya neden olduğu anlaşılmıştır. Farklı bir gen; *CDT* ile eksprese olan B-Tox, *C.difficile* kökenlerinde tek başına bulunabildiği gibi, diğer toksin A ve B salgılayan veya varyant kökenlerde de bulunabilmektedir.

Bu çalışmada, hastanede yatan ishalleri hastaların dışkı örneklerinden izole edilen *C.difficile* kökenlerinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle Tox-A, Tox-B ve B-Tox genleri incelenmiş, kökenlerin toksin profili belirlenmiş ve varyant gen veya *binary* toksin genleri taşıyıp taşımadıkları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Etik Kurulu tarafından 02.05.2008 tarih ve B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/302 sayılı karar ile onaylanan bu çalışmaya, Eylül 2006-Mart 2008 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına toksin incelemesi isteği ile gönderilen dışkı örnekleri dahil edildi. Kültür için, dışkı örnekleri gerek doğrudan, gerekse alkol şok işlemi uygulandıktan sonra siklozerin-sefoksitin-fruktoz agara (CCFA; BioMerieux,

Fransa) ekildi ve anaerob ortamda inkübasyona bırakıldı⁶. Ard arda gönderilen dışkı örneklerinden üretilen aynı hastaya ait *C.difficile* izolatlarından birisi çalışmaya alındı; iki yaş altındaki hastalara ait örnekler çalışma dışında tutuldu.

İzole edilen kökenler, geleneksel yöntemler (koloni morfolojisi, karakteristik kötü koku, mikroskopik görünüm) ve Rapid ID 32A (BioMerieux, Fransa) kiti ile biyokimyasal reaksiyonları değerlendirilerek tanımlandı⁶. Aynı zamanda Tox-A varlığını da saptayan, bakteri yapısında bulunan glutamat dehidrogenaza karşı özgül antikorları içeren ticari bir kit (Tri-age *C.difficile* Panel; Biosite Diagnostics, İtalya) kullanılarak *C.difficile* tanısı doğrulandı.

Toksin varlığı, ticari bir enzim immunoassay (EIA) kiti ile hem doğrudan dışkı örneklerinden hem de bakteri kültür filtratından, üretici firmanın (ImmunoCard Toxins A&B, Meridian Diagnostics, Belçika) önerilerine göre araştırıldı. Bakteri kültür filtratının hazırlanması için, izole edilen *C.difficile* kökenleri beyin-kalp-infüzyon sıvı besiyerine (BHIB; Becton Dickinson, Almanya) ekildi ve anaerob ortamda beş gün inkübe edildi. Elde edilen kültürlerin 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj sonrasında üst sıvısı alınarak çalışıldı⁷.

Toksin genlerinin saptanması için, *C.difficile* kolonisinden alınarak, 200 µl, DNAaz-RNAaz içermeyen suda, McFarland 1 (3×10^8 kob/ml) bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon 20 dakika 95°C'de ısıtıldıktan sonra iki dakika 10.000 rpm'de çevrilerek, bakteri DNA'sının bulunduğu üst sıvı kullanıldı⁸. Uygun primerler kullanılarak PCR ile toksin genlerinin (*tcdA*, *tcdB*, *CdtA* ve *CdtB*) varlığını araştırıldı^{9,10} (Tablo I). Pozitif kontrol olarak, toksin A ve B üreten NCTC 11223 (Prof. Dr. M. Yücesoy; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir) ve *binary* toksin üreten HU 25591 (Prof. Dr. E. Nagy; Szeged Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Enstitüsü, Macaristan'dan temin edilmiştir) *C.difficile* kökenleri kullanıldı. Elde edilen PCR ürünleri, etidyum bromür eklenmiş %2'lik agaroz jelde yürütülerek oluşan bantlar değerlendirildi.

Örneklerinden *C.difficile* üretilen hastaların laboratuvar bulguları [kanda polimorfonükleer lökosit (PMNL) sayısı, dışkıda lökosit varlığı] ve risk faktörleri (ishal öncesi antibiyotik kullanma öyküsü, altta yatan hastalık varlığı, kemoterapi öyküsü) derlenerek elde

Tablo I. *C.difficile* Toksin Genlerine Özgül Primerler ve Reaksiyon Koşulları

Primer (Kaynak no)	DNA dizisi (5' → 3')	Reaksiyon koşulları
<i>tcdA</i> R (9)	GGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCATCAGGT	95°C'de 20 saniye, 56°C'de 2 dakika,
<i>tcdA</i> Fw (9)	CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT	72°C'de 1 dakika → 35 döngü
<i>tcdB</i> R (9)	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	74°C'de 5 dakika → 1 döngü
<i>tcdB</i> Fw (9)	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	
<i>CdtA</i> R (10)	AGGATTATTTACTGGACCATTTG	94°C'de 45 saniye, 52°C'de 1 dakika,
<i>CdtA</i> Fw (10)	TGAACCTGAAAAGGTGATG	75°C'de 80 saniye → 35 döngü
<i>CdtB</i> R (10)	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC	
<i>CdtB</i> Fw (10)	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	

edilen verilerle birlikte değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede Pearson's X^2 ve Fisher's exact testleri uygulandı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 633 dışkı örneğinden toplam 50 (%7.9) *C.difficile* kökeni izole edilmiştir. Örneklerinden *C.difficile* izole edilen 50 hastanın yaş ortalaması 35.94 ± 27.67 yıl olup 26 (%52)'si erkek, 24 (%48)'ü kadındır. Hastaların 20 (%40)'si çocuk (2-18 yaş), 30 (%60)'u ise erişkin (19-> 65 yaş) yaş grubuna dahildir. Olguların 22 (%44)'si dahili bilimler, 20 (%40)'si çocuk hastalıkları, 6 (%12)'si cerrahi bilimler, 2 (%4)'si ise yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardır.

İzole edilen tüm kökenlerde ($n = 50$), "Triage *C.difficile* Panel" kiti ile glutamat dehidrogenaz enzimi pozitif bulunmuş, aynı kit ile bunların 28 (%56)'inde Tox-A varlığı da saptanmıştır.

Dışkı örneklerinin doğrudan EIA testi ile çalışılması sonunda, toksin pozitifliği %4.7 (30/633) olarak tespit edilmiştir. Dışkı örneğinde toksin pozitif bulunan ve kültür filtratında toksin saptanmayan örnek olmazken, dışkı örneğinde toksin saptanmayan hastaların altısından elde edilen izolatlarda (kültür filtratında) toksin pozitif bulunmuştur. Dolayısıyla çalışmamızda, EIA testi, hem dışkıdan hem de izole edilen *C.difficile*'nin kültür filtratlarından toksin varlığını araştırmak için kullanılmış, 6 (%16.6) hastanın dışkı örneğinde yalancı negatiflik saptanmıştır. Buna göre EIA kitinin, dışkı örneklerinde toksini belirleme açısından duyarlılığı %85.7, seçiciliği %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise %99 olarak hesaplanmıştır.

Her iki ticari kit ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, Tox-A'yı tespit eden "Triage *C.difficile* Panel" (Biosite Diagnostics, İtalya) ile 28 izolat pozitif bulunmuş, aynı izolatlar "ImmunoCard Toxins A&B" (Meridian Diagnostics, Belçika) kiti ile de pozitif saptanmıştır. Sonuçlardaki bu farklılıktan yola çıkarak; ilk kitin saptayamadığı ancak ikinci kit ile pozitif saptanan iki kökenin varyant kökenler (Toksine A negatif/Toksine B pozitif) olabileceği varsayımında bulunulmuştur.

Toksine genlerini saptamaya yönelik yapılan PCR testinde, 36 (%72) hastadan izole edilen kökenlerde hem Tox-A hem de Tox-B genlerinin varlığı tanımlanmış, B-Tox ise hiçbir kökende saptanamamıştır. EIA kitiyle pozitif bulunan kökenler ($n = 30$), PCR ile de toksine A ve B genleri açısından pozitif bulunmuştur. Bunun yanı sıra "Triage *C.difficile* Panel" kiti ile toksine saptanamayan sekiz kökende de PCR ile *tcdA* geni belirlenmiş, dolayısıyla Tox-A varyant kökenlerine rastlanmamıştır.

Hasta bilgileri, antibiyotik kullanımı ile ilişkili ishal gelişimi yönünden irdelendiğinde, beta-laktam grubu antibiyotiklerin öne çıktığı gözlenmiş, bunu florokinolonlar ve aminoglikozidler izlemiştir. Hastaların 28'inde tek, 17'sinde çoklu (11'inde ikili, altısında ise üçlü) antibiyotik kullanımı söz konusu iken, beş hastada herhangi bir antibiyotik kullanım öyküsü saptanamamıştır. Toksik ve nontoksik kökenlerin üretildiği hastalar, lökositöz ve risk faktörlerinin varlığı gibi diğer sorgulanan değişkenler açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo II).

Tablo II. Toksikjenik Olan ve Olmayan Kökenlerin Üretildiği Hastaların Klinik ve Epidemiyolojik Verilerinin Karşılaştırılması

Değişkenler	Toksijenik (n= 36) Sayı (%)	Toksijenik olmayan (n= 14) Sayı (%)	OR (%95 CI)	p*
Laboratuvar bulguları				
Kan PMNL sayısı > 20.000 mm ³	4 (11)	2 (14)	0.75 (0.12-4.64)	1.00
Dışkıda lökosit varlığı	19 (53)	4 (29)	0.44 (0.11-1.69)	0.34
Risk faktörleri				
Kemoterapi	11 (31)	4 (29)	1.10 (0.28-4.28)	1.00
Antibiyotik tedavi öyküsü				
Penisilin	10 (28)	5 (36)	0.69 (0.18-2.57)	0.73
Sefalosporin	9 (25)	6 (43)	0.44 (0.12-1.63)	0.30
İmipenem	9 (25)	3 (21)	0.37 (0.02-6.38)	0.48
Florokinolon	8 (22)	3 (21)	1.04 (0.23-4.69)	1.00
Aminoglikozid	8 (22)	2 (14)	1.20 (0.21-6.80)	0.70
Altta yatan hastalık				
Kanser	19 (53)	4 (29)	1.33 (0.38-4.62)	0.75
Kronik hastalık**	12 (33)	6 (43)	0.44 (0.12-1.56)	0.32

* Fisher's exact testi ile saptanmıştır.
** Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, böbrek yetmezliği, böbrek transplantasyonu, diyabet, ülseratif bağırsak hastalığı.
OR: Odds Ratio, PMNL: Polimorfonükleer lökosit.

TARTIŞMA

Ülkelere ve merkezlere göre değişiklik göstermekle beraber, son dönemlerde *C. difficile* enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir¹¹⁻¹⁴. Bu artışta, mikroorganizmanın virülansındaki farklılıklar ve uygulanan antibiyotik tedavisindeki değişikliklerin önemli rolü vardır¹¹. Özellikle 2000'li yılların ilk yarısında, dünyanın çeşitli ülkelerinden virülansı yüksek *C. difficile* O27/NAP1/BI kökenine bağlı, mortalite oranı yüksek salgınlar bildirilmiştir¹².

Hastanede yatan ishalleri hastaların dışkı örneklerinden *C. difficile* izolasyonu, izolatların toksin üretiminin saptanması ve PCR ile toksin genlerinin araştırılmasının amaçlandığı bu çalışmada, 2006-2008 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen 633 hastaya ait dışkı örneğinin 50 (%7.8)'sinden *C. difficile* üretilmiş ve kökenlerin 36 (%72)'sının toksijenik olduğu saptanmıştır. 1996 yılında hastanemizde yapılan benzer çalışmada da, *C. difficile* ile kolonizasyon oranı %6.9 (14/202) olarak saptanmış, bu kökenlerin %71.4'ünde toksin pozitifliği bulunmuştur¹⁵. Elde ettiğimiz sonuçlar, hastanemizde yapılan önceki çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

C. difficile'ye bağlı ishal oluşumunda en önemli risk faktörlerinden birisi antibiyotik kullanımınıdır. Kullanılan antibiyotikler, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı

hastanede servisler arasında bile farklılık göstermektedir⁴. Macaristan'da yapılan bir çalışmada, en sık beta-laktam grubu antibiyotiklerin, ikinci olarak da kinolon kullanımının *C.difficile* enfeksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir¹⁶. İsveç'te beş büyük hastanenin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol, piperasilin, sefalosporin ve klindamisin kullanılmasıyla *C.difficile* enfeksiyonu riskinin arttığı gösterilmiştir¹⁷. Ülkemizde Erçis ve arkadaşları¹⁸ tarafından yapılan çalışmada, psödomembranöz kolitli 68 hastanın büyük çoğunluğunun (n= 32) beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları kullandığı, bunu aminoglikozid (n= 12) ve sefalosporin (n= 8) kullanan hastaların izlediği bildirilmiştir¹⁸. Altındiş ve arkadaşlarının¹⁹ 2007 yılında yaptığı çalışmada ise, *C.difficile* izolasyon oranı %14.3 (13/91) olarak saptanmış; hastaların %84.6 (11/13)'ünün ampicilin/sulbaktam kullandığı belirtilmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda, toksijenik *C.difficile* izole edilen hastaların büyük çoğunluğunun (28/36) beta-laktam grubu (penisilin, sefalosporin ve imipenem) antibiyotikleri kullandıkları görülmüştür (Tablo II).

C.difficile'ye bağlı ishallerin gelişmesinde rol oynayan diğer bir risk faktörü, altta yatan ciddi hastalıkların varlığıdır. Kronik hastalığı olanların daha sık ve daha uzun süre hastanede yatırmaları, genelde yaşlı ve düşkün olan bu tip hastaların temel kişisel temizliklerini yeterince yapamamaları *C.difficile* ile kolonize olma olasılığını artırmakta; kişiyi enfeksiyonlara açık hale getirmektedir²⁰. Buchner ve arkadaşlarının²¹ çalışmasında, kanser, kemoterapi, solunum yolu enfeksiyonları ve böbrek yetmezliği gibi çeşitli hastalıkların *C.difficile* enfeksiyonları riskini artırdığı gösterilmiştir. Wroblewska ve arkadaşlarının²², 1998-2002 yılları arasında hastanede yatan yetişkin hastalarda yaptıkları çalışmada, toksin pozitif *C.difficile* izolatlarının en fazla hematoloji/onkoloji servislerinde (%51) görüldüğü bildirilmektedir. Çalışmamızda da, toksijenik *C.difficile* üretilen hastaların 19'unda kanser, 12'sinde kronik hastalık olmak üzere %86'sında altta yatan hastalık mevcuttur.

Son yıllarda pediatri servislerinde de *C.difficile* enfeksiyonu görülme sıklığında artış olduğu bildirilmekte ve bu hasta grubunun da yakından izlenmesi önerilmektedir²³. Hastanemizde, dışkı örneğinden *C.difficile* üretilen hastaların 20 (%40)'sinin pediatri servislerinde yatan hastalar olduğu izlenmiş ve bunların da %45'inde malignite, %20'sinde ise kalıtsal bir defektin varlığı saptanmıştır. Dolayısıyla, hastanede uzun süre yatmayı gerektiren hastalıkların bulunması nedeniyle pediatri servisinin de *C.difficile* yönünden daha sıkı takip edilmesi gerekmektedir.

Yıllar içinde *C.difficile*'de toksin üretimini araştıran farklı yöntemler geliştirilmiş; önceleri sadece Tox-A'yı daha sonraları toksin A ve B'yi birlikte saptayan kitler hazırlanmış ve referans olarak kabul edilen sitotoksinite yöntemi ile karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu yöntemlerin duyarlılıkları %66-93, özgüllükleri ise %89-99 arasında bildirilmektedir²⁴. Çalışmamızda, dışkı kültürlerinde üretilen *C.difficile* kökenlerinin 28 (%56)'i, Tox-A'yı saptayan "Triage *C.difficile* Panel" ile, 36 (%72)'sı ise her iki toksini de saptayan "ImmunoCard Toxins A&B EIA" kiti ile pozitif bulunmuştur. "Triage *C.difficile* Panel" kitiyle negatif bulunan sekiz kökende, PCR yöntemiyle Tox-A geninin saptanması, kitin duyarlılığının düşük olmasına bağlanmış ve bu testlerin fenotipik olarak varyant kökenlerin ayırımında yeterli olamayacağını düşündürmüştür.

Çalışmamızda "ImmunoCard Toxins A&B EIA" kiti ile 633 dışkı örneğinin 30'unda toksin varlığı saptanmıştır. Dışkı kültürlerinden izole edilen *C.difficile* kökenlerinde yine aynı kit ile toksin yapımı araştırıldığında, dışkı örneklerinin negatif saptanmasına karşın altı kökende toksin pozitif bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda, rutin incelemelerde dışkı örneklerinde toksin bulunmamasına karşın, izole edilen *C.difficile* kökenlerinde toksin pozitifliğinin saptanabildiği ve bu durumun dışkı örneğinin nakli sırasında, ısı değişikliği veya fekal proteolitik enzimlerin etkisiyle toksin yapısındaki bozulmadan kaynaklanabileceği vurgulanmaktadır^{25,26}. Bizim çalışmamızda, *C.difficile* kültür filtratında toksin pozitifliğinin, doğrudan dışkı örneklerinde saptananlara göre daha fazla olması, rutinde EIA analiziyle beraber dışkıda *C.difficile* kültürünün yapılması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Ancak anaerob kültür yöntemleri, zahmetli ve zaman alıcı olması ve özel donanım gerektirmesi nedeniyle birçok laboratuvarında uygulanmamaktadır. Bu nedenle, klinisyenle iyi bir iletişim kurularak dışkı örneğinin uygun şekilde alınıp, laboratuvara en kısa sürede nakledilmesi sağlanmalı, gerektiğinde örnek tekrar alınmalı ve böylece toksinin saptanma olasılığı artırılmalıdır.

Bazı *C.difficile* kökenlerinin klasik olarak bilinen Tox-A (*tcdA*) ve Tox-B (*tcdB*) dışında *binary* toksin (B-Tox) salgıladıkları bildirilmiştir¹⁰. B-Tox varlığının saptanması için geliştirilmiş ticari bir kit henüz mevcut değildir. Toksin A ve B'nin negatif olduğu, ancak hücre kültüründe sitotoksik etkinin gözlemlendiği durumlarda B-Tox'dan kuşkululamakta ve tanıya gitmek için PCR ile B-Tox geni (*Cdt A* ve *Cdt B*) araştırılmaktadır. PCR yöntemi, *tcdA*, *tcd B*, *Cdt A* ve *Cdt B* genlerine sahip kökenlerin yanı sıra *tcdA-/tcdB+* gibi birtakım varyant kökenleri de belirleyebilir²⁶. Polonya'da yapılan bir çalışmada, 58 toksijenik *C.difficile* kökeninin 41'inde *tcdA+/B+* genleri saptanmış; bunların 5 (5/58; %8.6)'inde aynı zamanda B-Tox geni de bulunmuş; diğer 17 kökende ise *tcd A-/B+* şeklinde gen varyantları tespit edilmiştir²⁷. Fransa'da, enfeksiyon etkeni toksijenik *C.difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırıldığı çalışmada, B-Tox prevalansı %6 (22/369) olarak saptanmış, bu 22 kökenin aynı zamanda *tcdA* ve *tcdB* geni de taşıdığı bildirilmiştir²⁸. Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 14 Avrupa ülkesinden 38 hastanenin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, 2005 yılında iki aylık zaman diliminde 411 ishali hastadan üretilen *C.difficile* kökenleri incelenmiştir²⁹. Bunlardan 354'ü toksijenik olup, %24.3'ü varyant gene sahip bulunmuştur. B-Tox geni, toksijenik kökenlerin %17.2'sinde tespit edilmiş, bu geni taşıyan kökenlerin hepsinde aynı zamanda toksin A-/B+ varyant genleri de gözlenmiştir²⁹. Hastanemizden gönderilen kökenler de dahil olmak üzere, Türkiye'den izole edilmiş kökenler içerisinde varyant köken ve B-Tox genine sahip bakteriye rastlanmamıştır.

Bizim yaptığımız bu çalışmada, izole edilen 50 kökenin, PCR ile toksin geni saptanan 36'sinin hepsinde *tcdA* ve *tcdB* geni birlikte bulunmuş; hiçbirinde varyant gen veya B-Tox genine rastlanmamıştır. Ancak yine de, toksin araştırılması isteği ile laboratuvara gelen dışkı örneklerinin, gerek yalancı negatifliğin önüne geçmek gerekse epidemiyolojik ve antibiyotiklere duyarlılık durumlarını saptayabilmek için kültürünün rutin olarak yapılması ve bakterilerin özelliklerinin yakından takip edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır. *C.difficile* için yeni ortaya çıkabilecek epidemik kökenlerin saptanması, oluşabilecek değişikliğin zamanında tespit ve kontrol edilmesi açısından kökenlerin toksin genotiplerinin bilinmesi önemlidir. Sonuçlarımızın hastanemiz için bir veri tabanı oluşturacağına ve ülkemizde *C.difficile* toksin genleriyle ilgili yapılacak çalışmalarda kaynak teşkil edeceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46(Suppl 1): S4-11.
2. Pearson A. Historical and changing epidemiology of healthcare-associated infections. J Hosp Infect 2009; 73(4): 296-304.
3. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology 2009; 136(6): 1913-24.
4. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2001; 7(8): 421-7.
5. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1988; 56(9): 2299-306.
6. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Wexler HM, Finegold SM (eds), Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease, pp: 133-41. In: Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 1993, 5th ed. Star Publishing Company, California, USA.
7. Yücesoy M, McCoubrey J, Brown R, Poxton RI. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. Clin Microbiol Infect 2002; 8(7): 413-8.
8. Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2178-82.
9. Kato N, Ou CY, Kato H, et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(1): 33-7.
10. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000; 186(2): 307-12.
11. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: past and present perspectives. Gut Microbes 2010; 1(1): 58-64.
12. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 6): 2-18.
13. Gilca R, Hubert B, Fortin E, Gaulin C, Dionne M. Epidemiological patterns and hospital characteristics associated with increased incidence of *Clostridium difficile* infection in Quebec, Canada, 1998-2006. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31(9): 939-47.
14. Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerg Infect Dis 2007; 13(9): 1417-19.
15. Soyletir G, Eskitürk A, Kilic G, Korten V, Tozun N. *Clostridium difficile* acquisition rate and its role in nosocomial diarrhoea at a university hospital in Turkey. Eur J Epidemiol 1996; 12(4): 391-4.
16. Urban E, Tusnadi A, Terhes G, Nagy E. Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary. J Hosp Infect 2002; 51(3): 175-8.
17. Wiström J, Norrby SR, Myhre EB, et al. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. J Antimicrob Chemother 2001; 47(1): 43-50.
18. Ercis S, Ergin A, Hascelik G. Six years evaluation of *Clostridium difficile* associated diarrhea. Mikrobiyol Bul 2004; 38(1-2): 45-50.
19. Altindis M, Usluer S, Ciftci H, Tunc N, Cetinkaya Z, Aktepe OC. Investigation of the presence of *Clostridium difficile* in antibiotic associated diarrhea patients by culture and toxin detection methods. Mikrobiyol Bul 2007; 41(1): 29-37.
20. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect 2001; 7(8): 405-10.
21. Buchner AM, Sonnenberg A. Medical diagnoses and procedures associated with *Clostridium difficile* colitis. Am J Gastroenterol 2001; 96(3): 766-72.
22. Wroblewska MM, Swoboda-Kopec E, Rokosz A, Nurzynska G, Bednarska A, Luczak M. Detection of *Clostridium difficile* and its toxin A (tcdA) in stool specimens from hospitalised patients. Pol J Microbiol 2005; 54(2): 111-5.

23. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *Pediatrics* 2008; 122(6): 1266-70.
24. Alfa MJ, Swan B, VanDekerkhove B, Pang P, Harding GK. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: comparison of Triage *C.difficile* panel, EIA for Tox A/B and cytotoxin assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43(4): 257-63.
25. Bouza E, Pelaez T, Alonso R, Catalan P, Munoz P, Creixems RM. "Second-look" cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. *J Hosp Infect* 2001; 48(3): 233-7.
26. Rupnik M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(8): 417-20.
27. Pituch H, Rupnik M, Obuch-Woszczatynski P, Grubescic A, Meisel-Mikolajczyk F, Luczak M. Detection of binary-toxin genes (*cdt A* and *cdt B*) among *Clostridium difficile* strains isolated from patients with *C.difficile*-associated diarrhoea (CDAD) in Poland. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 2): 143-7.
28. Gonçalves C, Derce D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 1933-9.
29. Barbut F, Mastrantonio P, Delme M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I; European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(11): 1048-57.