

Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu Bulguları ile Başvuran Çocukların Boğaz Sürüntü Örneklerinde *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* ve *Corynebacterium pseudotuberculosis* Suşlarının Araştırılması*

Screening of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Throat Swab Specimens of Children with Upper Respiratory Tract Infections

Zeynep Gökçe GAYRETLİ AYDIN¹, Gönül TANIR¹, Selin NAR ÖTGÜN², Meral TURAN², Türkan AYDIN TEKE¹, Ayşe KAMAN¹, Selçuk KILIÇ³

¹ Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Ankara.

¹ Dr. Sami Ulus Obstetrics, Children Health and Diseases Research and Education Hospital, Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Ankara, Turkey.

² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı, Ankara.

² Public Health Institution of Turkey, National Respiratory Pathogens Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı, Ankara.

³ Public Health Institution of Turkey, National High Risk Pathogen Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 02.01.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.07.2017

* Bu çalışma, 10. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (5-9 Nisan 2017, Antalya)'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

ÖZ

Rutin difteri aşılama sürecinin başlamasını takiben dünyanın pek çok bölgesinde hastalığın görülme sıklığında belirgin bir azalma olmasına rağmen, yeni olguların ortaya çıkması toplumda toksijenik suşların dolaştığının bir göstergesidir. Difteri aşısı asemptomatik taşıyıcılığa ve nontoksijenik *Corynebacterium diphtheriae* kolonizasyonuna karşı koruyucu değildir. Ayrıca, nontoksijenik *C. diphtheriae* suşları ile invaziv

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Zeynep Gökçe Gayretli Aydın, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, 06080, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 305 6545 **E-posta (E-mail):** zggayretli@gmail.com

enfeksiyonların ortaya çıktığı ve nontoksijenik suşların toksijenik hale dönüşerek difteri hastalığına yol açtığı da bilinmektedir. Antitoksin düzeylerinin zamanla düşmesi ve erişkin aşılama programlarında oluşan aksamalar nedeniyle difteri salgınlarının ortaya çıkma riski bulunmaktadır. Ülkemizde rutin olarak toksijenik ve nontoksijenik *C.diphtheriae* süreyansı yapılmamaktadır. Bu çalışmada, ılımlı difteri ile karışabilecek üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) bulguları ile başvuran çocuklarda *C.diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* ve *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının varlığı araştırılarak, halk sağlığı uzmanları, mikrobiyologlar ve klinisyenler arasında bu mikroorganizmalar hakkında farkındalık yaratmak amacıyla mikrobiyolojik süreyans yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 1 Şubat 2016-22 Mart 2016 tarihleri arasında Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi çocuk polikliniklerine ÜSYE bulguları ile başvuran çocuklardan boğaz sürüntü örnekleri alınmıştır. Klinik örnekler, hastane laboratuvarında %5 koyun kanlı agara ekilmiş, uygun koşullarda inkübe edilen plaklar; A grubu beta-hemolitik streptokok (AGBHS) yönünden değerlendirilmiştir. Kültür plakları, *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* varlığının araştırılması amacıyla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarına gönderilmiştir. Üreme olan plaklardaki tüm koloniler steril eküvyon ile toplanarak triptik soy buyyon içinde 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve sistin-tellürit-kanlı agar (CTBA) ve %5 koyun kanlı agara ekim yapılmıştır. CTBA'da tellürit indirgeyen kolonilerden Tinsdale agara pasaj yapılmış; 37°C'de tam 24 saatlik inkübasyon sonrasında oluşan sistinaz pozitif özelliğe sahip, şüpheli koloniler seçilerek konvansiyonel yöntemler ve CoryneAPI (Biomeriueux, Fransa) sistemi ile tanımlanmıştır. İzole edilen *C.diphtheriae* suşlarının toksin üretip üretmediğini araştırmak amacıyla toksijenite testleri (ELEK, PCR) uygulanmıştır. Çalışmaya 260 (%52)'i kız, 240 (%48)'i erkek toplam 500 hasta dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortancası 76 ay (21 ay-213 ay) olarak tespit edilmiştir. Bir hasta dışında tüm hastaların tam aşı ve rapellerinin olduğu saptanmıştır. Hastaların 99 (%19.8)'ünde ateş, 263 (%52.6)'ünde boğaz ağrısı, 246 (%49.2)'sında öksürük, 113 (%22.6)'ünde burun akıntısı, 488 (%97.6)'inde tonsillerde hiperemi, 318 (%63.6)'inde tonsillerde hipertrofi, 123 (%24.6)'ünde tonsillerde kript, 5 (%1)'inde tonsillerin üzerinde membran varlığı gözlenmiştir. Hastaların 66 (%13.2)'sının boğaz kültüründe AGBHS üremesi saptanmıştır. Üç hastanın boğaz sürüntü örneklerinde *tox* geni taşımayan *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanmıştır. Hastaların hiçbirisinde *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* saptanmamıştır. *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanan hastaların ikisinin kız, birinin erkek olduğu ve hastaların fizik muayenesinde tonsillerinin hiperemik ve hipertrofik olduğu gözlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde düzenli olarak kesitsel çalışmalar yapılmasının veya rutin tarama programları uygulanmasının, unutulmaya yüz tutmuş bu mikroorganizma hakkında hem epidemiyolojik hem de mikrobiyolojik açıdan farkındalık yaratacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Difteri; çocuk; *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium ulcerans*; *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

Although a significant decrease has been reported in the incidence of diphtheria in many regions of the world following the routine diphtheria immunization programs, the emergence of new cases indicated that toxigenic strains are still circulating in the community. Diphtheria vaccine does not provide protection against asymptomatic carriage and colonization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. It is a known fact that invasive infections may arise from non-toxigenic *C.diphtheriae* strains that the non-toxigenic strains can become toxigenic strains leading to diphtheria. It is also known that there is a risk of diphtheria outbreaks due to decreased antitoxin level and inadequate adult immunization programs. In our country, there is no routine surveillance of toxigenic and non-toxigenic *C.diphtheriae*. In the present study we aimed to investigate the presence of *C.diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in children presenting with the symptoms of upper respiratory tract infections that might be confused with those moderate diphtheria, in order to highlight the requirement of microbiological surveillance and to create awareness about these microorganisms among public health experts, microbiologists and clinicians. Throat swab specimens were obtained from children who were admitted to the pediatric outpatient clinics, in Dr. Sami Ulus Obstetrics, Children Health and

Diseases Educational and Research Hospital, with upper respiratory tract infections between 1 February 2016-22 March 2016. The specimens were inoculated in 5% sheep blood agar plates. The plates that were incubated in appropriate conditions, were evaluated for Group A beta hemolytic streptococci. Subsequently, culture plates were sent to the Public Health Institution of Turkey, National Respiratory Pathogens Reference Laboratories for the investigation of the presence of *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* and *C.pseudotuberculosis*. The growth in each plate were collected with a sterile swab and inoculated in tryptic soy broth. Following 2 hours of incubation at 37°C, subcultures were inoculated in cystine-tellurite-blood agar (CTBA) and 5% sheep-blood agar plates; after an overnight incubation tellurite-reducing colonies were inoculated in Tinsdale agar plates. The suspected colonies with positive cystinase activity were identified by conventional methods and also with Coryne API (Biomerieux, France) systems. Toxicity tests (ELEK, PCR) were performed to investigate whether the *C.diphtheriae* strains were producing toxins. A total of 500 patients were involved in the study. Of these 260 (52%) were girls and 240 (48%) were boys with a mean age of 76 (range, 21-213) months. All patients except one were fully vaccinated with boosters. Most common presenting symptoms of the patients were fever (19.8%), sore throat (52.6%), cough (49.2%), tonsillar hyperemia (97.6%), presence of crypt (24.6%), and membrane over tonsils (1%). Group A beta-hemolytic streptococci were detected in the throat swab cultures of 66 (%13.2) patients. Genotypically toxin negative *C.diphtheriae* biovar *gravis* was identified in the throat swab cultures of 3 patients (2 girls and 1 boy). The tonsils were hyperemic and hypertrophic in all the patients with *C.diphtheriae* biovar *gravis*. *C.ulcerans* and *C.pseudotuberculosis* were detected in none of the patients. It is considered that similar regular cross-sectional studies or routine screening programs are expected to raise awareness about this forgotten microorganism both epidemiologically and microbiologically.

Keywords: *Diphtheria*; children; *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium ulcerans*; *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

GİRİŞ

Rutin difteri aşılmasının başlamasını takiben dünyanın pek çok bölgesinde hastalığın görülme sıklığında belirgin azalma olmasına rağmen, difteri olguları nadir de olsa bildirilmektedir. Difteri başta tonsiller, farenks, larenks ve burun olmak üzere deri ve konjunktivalar ile genital bölgede yerleşim gösterebilen akut bakteriyel bir hastalıktır. Difteri aerop, gram-pozitif bir bakteri olan *Corynebacterium diphtheriae*'nin toksijenik *gravis*, *mitis* veya *intermedius* biyotiplerinden biri ile ortaya çıkar. Toksin üreten diğer bazı *Corynebacterium* türleri de *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis* difteriye neden olabilir. Toksijenik olmayan *C.diphtheriae* suşlarının da difteri etkeni olabilmesine rağmen, toksik miyokardit ve toksik nörit hastalıklarına yalnızca toksin üreten suşlar neden olmaktadır¹.

Avrupa'da 2000 yılına kadar yerli difteri olgularının ortadan kaldırılması hedeflenmesine rağmen, halen Litvanya, Ukrayna ve Rusya Federasyonu başta olmak üzere bazı Avrupa ülkelerinde difteri olguları görülmeye devam etmektedir. Difterinin toplumdan yok edilme hedeflerine ulaşılamamasının en önemli nedeninin, aşılama ile kazanılan bağışıklığın zaman içinde azalmasına bağlı geliştiği olarak düşünülmektedir². Türkiye'de 1960'ların ortalarında sistematik bir aşılama programının uygulamaya konulması ile difteri insidansında çok hızlı bir düşüş izlenmiş, 1980'de 86 olgu ile yıllık en düşük sayıya ulaşılmıştır. Bu tarihten sonra ise, Avrupa'da kaydedilmiş olan iki epidemi (1982-1985 ve 1990-1995) Türkiye'yi de etkilemiş ve önceki yıllarla kıyaslandığında belirgin olgu artışı olmuştur. Ülkemizde, en son 2011'de kaydedilmiş bir erişkin difteri olgusu dışında,

2002'den bu yana hiç yeni olgu görülmemiştir³.

Aşılanmış toplumlarda yeni olguların ortaya çıkması toplumda toksijenik suşların do-laştığının göstergesidir. Böyle toplumlarda patojenin hiç aşılanmamış veya rapelsiz du-yarlı bireylere geçişinde asemptomatik taşıyıcılık durumu önemli bir rol oynar³. Toksi-jenik ve toksijenik olmayan suşlar ile, özellikle aşılı bireylerde psödomembran varlığı ile karakterize klasik tablonun gözlenmediği enfeksiyonlar gelişebilir. Streptokok farenjitine benzer bir tablo şeklinde ortaya çıkabilen bu tür ılımlı difteri olguları da duyarlı bireylere bulaşta rol oynayabilmektedir. Ayrıca nontoksijenik suşlar *tox* geni ile birlikte bakteriy-o-faj tarafından liyojenize olarak toksijenik forma dönüşebilirler. Difteri aşısı asemptomatik taşıyıcılığa ve nontoksijenik *C.diphtheriae* kolonizasyonuna karşı da koruyucu değildir⁴⁻⁶.

Çocukluk çağı rutin aşılama oranlarının yüksek olduğu, yeni difteri olgularının çok nadir görüldüğü ülkemizde, zamanla antitoksin düzeylerinin düşmesine ve erişkin aşıla-manın yetersiz oluşuna bağlı olarak difteri salgınlarının ortaya çıkma riski vardır. Ayrıca uluslararası seyahat ve göçmen hareketlerinde görülen artış da bulaş riskini artırmaktadır. Ülkemizde rutin olarak toksijenik ve nontoksijenik *C.diphtheriae* sürveyansı yapılmamak-tadır. Bu çalışmada, ılımlı difteri ile karışabilecek üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) bulguları ile başvuran çocuklarda *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* suşları-nın varlığı araştırılarak, halk sağlığı uzmanları, mikrobiyologlar ve klinisyenler arasında bu organizmalar hakkında farkındalık yaratmak amacıyla mikrobiyolojik sürveyans yapılması amaçlanmıştır.

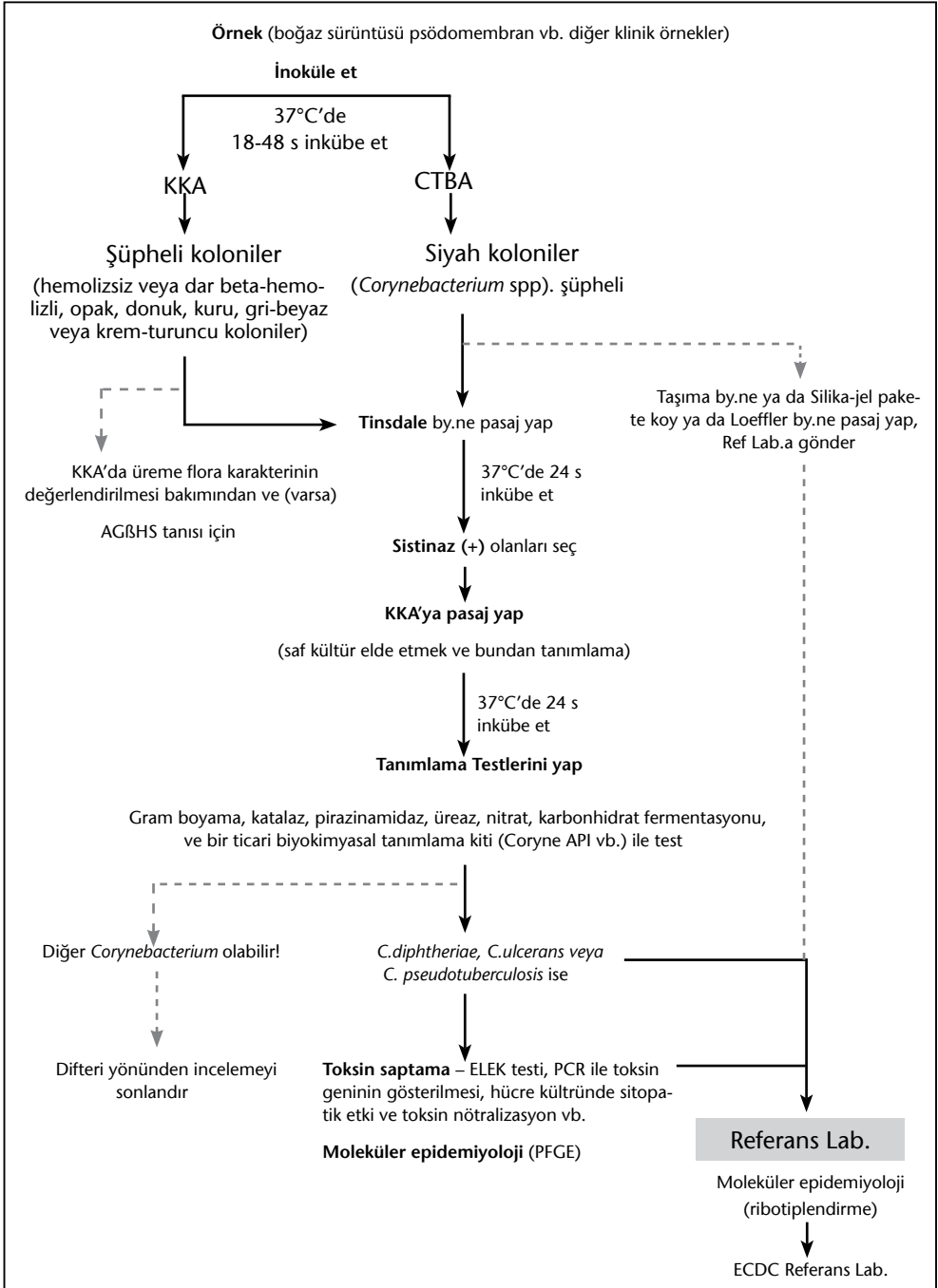
GEREÇ ve YÖNTEM

Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastane-si çocuk polikliniklerine 1 Şubat 2016-22 Mart 2016 tarihleri arasında ÜSYE semptomları ile başvuran 2-18 yaş arası 503 hastadan; *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* kolonizasyonunun araştırılması amacıyla tonsillofarenks sürüntü örnekleri alındı. Olgula-rın hiçbirisinin öyküsünde kronik hastalık, immünsüpresif tedavi kullanımı ve son 15 gün içinde antibiyotik kullanım öyküsü yoktu. Tüm olgularda difteri toksoidi içeren aşılar ile aşılanma öyküsü sorgulandı. Tonsillofarenks örneği almak için ağız içi ve farenks net ola-rak görülecek şekilde bir ışık kaynağı ile aydınlatıldı. Dile bir dil basacağı ile bastırılarak; steril rayon uçlu eküvyon çubuğu tonsiller üzerinde döndürülerek sürüntü örnekleri alın-dı. Bu işlem sırasında eküvyon çubuğunun yanak iç kısımları ve dile temas etmemesine özen gösterildi. Tonsiller üzerinde membran, beyaz noktalar ve/veya yangılı/hiperemik alanların varlığında eküvyon çubuğu özellikle bu kısımlara hafifçe bastırılıp döndürül-dü. Membran varlığında söz konusu membran kenarından kaldırdı; eküvyon çubuğu membranın altına itilerek derinde yerleşim gösteren bakterilerin alınması sağlandı. Klinik örnekler %5 koyun kanlı agara tek koloni ekim yöntemi ile ekildi, plaklar aerop koşullarda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün plaklar A grubu beta-hemolitik streptokoklar (AGBHS)'ın varlığı açısından incelendi. Plaklar, üçlü paketlenme esaslarına göre amba-lajlandıktan sonra hasta bilgileri ile birlikte kurye aracılığı ile oda ısısında Türkiye Halk

Tablo 1. *Corynebacteriumlar* için Biyokimyasal Tanımlamada Kullanılan Özellikler³

Mikroorganizma	CYS	PYZ	Nitrat	Üreaz	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Niğasta	Trehaloz	Jelatin eritme
<i>C. diphtheriae</i>										
var gravis	+	-	+	-	+	+	-	+	U	U
var mitis	+	-	+	-	+	+	-	-	U	U
var intermedius	+	-	+	-	+	+	-	-	U	U
var belfanti	+	-	-	-	+	+	-	-	U	U
<i>C. ulcerans</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	25°C'de +
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	25°C'de -
<i>C. pseudodiphthericum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	U	U
<i>C. xerosis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	U	U
<i>C. striatum</i>	-	+	+	-	+	-	+/-	-	U	U

CYS, Tinsdale besiyerinde sistinaz üretimi; bir gece inkübasyondan sonra karakteristik kahverengi hale ile çevrili siyah koloni oluşumu POZİTİF olarak değerlendirilir. PYZ, Pirazinamidaz aktivitesi; 4 veya 24 saatlik tüp testi; reaktif ekleme ile reaksiyon sonucu turuncu renk oluşumu POZİTİF olarak değerlendirilir. U, uygulanmaz.



Şekil 1. Difterinin tanısı için klinik örneklerin kültürlerinden izolasyon ve tanımlama akış şeması³
AGBHS: A grubu beta-hemolitik streptokok; PFGE: pulsed field gel electrophoresis; ECDC: European Center for Disease Prevention and Control; KKA: Koyun Kanlı Agar.

Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarına gönderildi. Gönderilen koyun kanlı agar plaklarındaki kolonilerin hepsi steril rayon uçlu eküvyonlar ile toplandı, eküvyonların her biri triptik soy buyyon içinde 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Takiben sistin-tellürit-kanlı agar (CTBA) ve %5 koyun kanlı agara tek koloni ekimi yapıldı; aerop koşullarda 37°C'de 18-48 saat süreyle inkübe edildi. CTBA'da tellüriti indirgeyen kolonilerden (periferinden merkeze doğru koyulaşan gri-siyah koloniler) Tinsdale agara pasaj yapıp 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından ortası kahverengi-siyah, çevresinde kahverengi hale yapmış sistinaz pozitif, şüpheli koloniler seçildi. Sistinaz pozitif bulunan bütün kolonilerden saf kültür elde etmek için %5 koyun kanlı agara pasaj yapıldı, 24 saat inkübe edildi. Saf kültürlerden Gram boyama yapıldı; katalaz, pirazinamidaz, üre hidrolizi, nitrat redüksiyonu ile glikoz, maltoz, sukroz ve nişasta fermentasyon testleri ile *Corynebacterium* (Biomerieux, France) uygulandı. *Corynebacterium*'ların biyokimyasal tanımlaması için kullanılan temel özellikler Tablo 1'de belirtildi³. *C.diphtheriae* olarak izole edilen suşların toksin üretilip üretilmediğini araştırmak amacıyla toksijenite testleri [ELEK, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)] yapıldı. Kalite kontrol suşları olarak *C.diphtheriae* variant gravis NCTC10648 (toksin üreten pozitif kontrol suşu), *C.diphtheriae* variant gravis NCTC3984 (zayıf toksin üreten pozitif kontrol suşu), *C.diphtheriae* variant mitis NCTC10356 (toksin üretmeyen negatif kontrol suşu) kullanıldı³. Test edilecek izolatın ve standart suşların taze pasajlarından laboratuvar yapımı ELEK besiyeri plağına ekim yapıldı. Özel filtre kağıdından hazırlanan ve 1000 IU difteri antitoksini emdirilmiş şeritler, ekim çizgilerine dik olacak şekilde (tam olarak 90° açı ile) yerleştirildi. Plaklar 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Ekim çizgilerine 45° açı ile karakteristik presipitasyon çizgilerinin oluşması test edilen izolatın toksin üreten köken olduğunu gösterdi. Söz konusu karakteristik presipitasyon çizgilerinin gözlenmemesi ise izolatın toksin üretmediğinin göstergesi olarak değerlendirildi³. Difteri toksin geninin 24 8bp'lik biyolojik olarak aktif bölgesinin (A fragmanı) ve A + B fragmanlarının varlığı PCR ile araştırıldı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarında Ulusal Mikrobiyoloji Standartları doğrultusunda uygulanmakta olan izolasyon ve identifikasyon yöntemini özetleyen akış diyagramı Şekil 1'de gösterildi³.

C.diphtheriae, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* risk grubu 2 organizmalardır. Bu nedenle laboratuvarında yapılan tüm incelemeler, biyogüvenlik düzeyi 2 olan laboratuvar şartlarında gerçekleştirildi³.

BULGULAR

Çalışmaya ÜSYE semptomları ile başvuran 2-18 yaş arası 503 hasta dahil edilmiştir. Hastane kayıt sisteminde verilerine ulaşamayan üç hasta çalışma dışı bırakılmıştır. Hastaların 260 (%52)'i kız, 240 (%48)'i erkek olarak tespit edilmiştir. Hastaların yaş ortancası 76 ay (21 ay-213 ay) olarak bulunmuştur. On dört hastanın yabancı uyruklu olduğu saptanmıştır. Dört yaş 5 aylık Suriyeli erkek çocuk dışında tüm hastaların tam aşı ve rapellerinin olduğu gözlenmiştir. Hiçbir hastaya Tdap (tetanoz, difteri, aselüler boğmaca) yapılmamıştır. Hastaların 99 (%19.8)'unda ateş, 263 (%52.6)'ünde boğaz ağrısı, 246

(%49.2)'sında öksürük, 113 (%22.6)'ünde burun akıntısı, 488 (%97.6)'inde tonsillerde hiperemi, 318 (%63.6)'inde tonsillerde hipertrofi, 123 (%24.6)'ünde tonsillerde kript, 5 (%1)'inde tonsillerin üzerinde membran varlığı gözlenmiştir. Hastaların 66 (%13.2)'sinin boğaz kültüründe AGBHS üremiştir. Boğaz sürüntü kültüründe AGBHS saptanan hastalar tedavi edilmiştir. Hastaların ÜSYE semptom süresi ortancası 2 gün (1-10 gün), ateş süresi ortancası 1 gün (0-7 gün) olarak saptanmıştır.

Üç hastanın boğaz sürüntü örneklerinde *tox* geni taşımayan *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanmıştır. *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanan hastaların 2 (%66.7)'sinin kız, 1 (%33.3)'inin erkek olduğu saptanmıştır. Bu hastaların yaşlarının; 181, 108 ve 76 ay olup hastaların üçünün de tam aşı ve rapeli olduğu gözlenmiştir. *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanan hastaların hepsinin muayenesinde tonsillerin hiperemik ve hipertrofik olduğu gözlenmiştir. Bir hastanın tonsillerinde kript olduğu saptanmıştır. Hastaların hiçbirinin tonsilleri üzerinde membran varlığı ve hiçbirinin boğaz kültüründe AGBHS üremesi saptanmamıştır. *C.diphtheriae* varyant *gravis* saptanan hastalarda ÜSYE semptom ve ateş sürelerinin sırasıyla 1.1 ve 3 gün olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Difteri toksoid aşısı ile yeterli toplumsal bağışıklamanın sağlanmadığı toplumlar da *C.diphtheriae* kolonizasyonuna bağlı olarak, difteri toksini klonal olarak bakterinin maksimum üremesini sağlayacak lokal doku değişikliği oluşturmaktadır. Böylece *C.diphtheriae*'nin aşısız bireylere bulaşı söz konusu olabilmektedir. Buna bağlı olarak özellikle antikor düzeyi düşmüş ve erişkin aşılması uygulanmamış bireylerde difteri hastalığı ortaya çıkabilmektedir^{7,8}. Dünyada rutin çocukluk çağı bağışıklamasının uygulandığı pek çok bölgede hastalığın görülme sıklığında belirgin azalma olmasına rağmen, halen dünyanın hemen her yerinden difteri olguları bildirilmektedir. Avrupa'da 1940'larda başlayan yaygın bağışıklama programları ile birçok ülkede difteri hastalığı hemen hemen eliminasyon noktasına gelmiştir. 1980'de tüm zamanların en düşük olgu sayısına ulaşılmış olmasına rağmen, 1982-1985 ve 1990-1995 yılları arasında Rusya ve Ukrayna başta olmak üzere özellikle eski Sovyet Cumhuriyetleri'nde iki epidemiy yaşanmıştır. 1980'lerin sonlarında tarihe karıştığı varsayılan ve gerek klinik özellikleri gerekse laboratuvar tanısı unutulmaya yüz tutmuş bir hastalık olarak değerlendirilen difteri, sonraki yıllarda gerek epidemiler gerek sporadik olguların görülmesine bağlı olarak tekrar gündeme gelmiştir^{2,6}. 2007-2008 yılları arasında Baltık ülkeleri (Estonya, Letonya, Litvanya), Kuzey Avrupa (Finlandiya), Batı Avrupa (İrlanda, İngiltere), Güney Avrupa (İtalya, Yunanistan) ve Doğu Avrupa (Bulgaristan, Türkiye)'dan 10 ülkenin katıldığı, "Diphtheria Surveillance Network (DIPNET)" tarafından koordine edilen yeni bir surveyans çalışmasında ÜSYE semptomları olan 26.821 hastanın boğaz sürüntü örneklerinde *C.diphtheriae* araştırılmıştır. İkiisi Letonya'dan, dördü Litvanya'dan, ikisi taşıyıcı, dördü difteri olgusu olmak üzere altı toksijenik *C.diphtheriae* suşu saptanmıştır. Bütün toksijenik suşlar biotip *gravis*, ribotiplendirme yapılamayan Litvanya suşu dışında hepsi Sankt-Petersburg moleküler tipi olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar böylece

1990’larda eski Sovyetler Birliği’nde dolaşan suşun halen dolaşımında olduğu sonucuna varmıştır. Bu çalışmaya dahil olan ülkemizdeki 12 merkezden gönderilen 2771 boğaz sürüntü örneğinde, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak toksijenik *C.diphtheriae* suşu saptanmamıştır². Bu sonucun toplumda aşılama oranının yüksek (%96) olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

C.diphtheriae toksijenik suşlarının günümüzdeki düşük insidansına rağmen, antikor düzeyi düşük veya aşısız olan bireyler eradike edilemeyen organizmanın rezervuarı haline gelmektedirler. Taşıyıcılarda yeterli sayıda toksijenik suş ortaya çıktığında enfeksiyonun duyarlı kişilere yayılması artmaktadır. Avrupa’da yapılan çalışmalar, difteri epidemisini önlemek için gereken antikor düzeyinin popülasyonda koruyucu eşiğin altında olduğunu ve yaşla ters orantılı olarak azaldığını göstermektedir⁹.

C.diphtheriae’nin majör virülans faktörü toksindir. Difteri toksoid aşısı faj aracılığı toksine karşı etkili, enfeksiyona ve toksijenik olmayan suşlara ise etkili değildir^{1,10}. Toksijenik *Corynebacteriae* enfeksiyonları çocukluk çağı aşılması ile üç doz DBT uygulanma oranı yüksek olan ülkelerde iyi kontrol edilmiş olmasına rağmen, bu ülkelere bazılarında toksijenik olmayan *C.diphtheriae* enfeksiyonları bildirilmiştir¹¹. DİPNET tarafından koordine edilen Avrupa süveyans çalışmasında, Bulgaristan, Finlandiya, Yunanistan, İrlanda, İtalya’da toksijenik olmayan organizma taşıyıcılığı bulunmazken, bu oran Türkiye’de %0.4 olarak saptanmıştır. ÜSYE semptomları olan 26.821 hastanın boğaz sürüntü örneklerinde toplam 28 (26 *C.diphtheriae*, bir *C.ulcerans*, bir *C.pseudotuberculosis*) nontoksijenik suş bulunmuştur. Bu çalışmada Türkiye’den gönderilen 2771 örnek arasında beşi biovar *mitis*, altısı biovar *gravis* olan 11 nontoksijenik *C.diphtheriae* suşu saptanmıştır². Çalışmamızda da benzer oranda *C.diphtheriae* izolatu saptanmakla birlikte; suşların tümü biovar *gravis* olarak tespit edilmiştir. 2003-2012 yılları arasında Londra’daki Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) referans laboratuvarında izole edilen 108 nontoksijenik *C.diphtheriae* biovar *mitis* suşu arasında beş adet “non-toxigenic *tox* gene-bearing (NTTB)” suşu saptanmıştır¹². Bu suşların, toplumda *tox* gen rezervuarı olarak ve spontan reversiyon veya farklı corynebakteriyofajlar arasında homolog rekombinasyon yoluyla toksijenik suşlara dönüşebilme potansiyeli ile difteri riskini arttırdığı düşünülmektedir. Çalışmamızda saptanan *C.diphtheriae* biovar *gravis* suşlarında *tox* geni olmadığından hiçbir NTTB olarak değerlendirilmemiştir.

C.diphtheriae’nin toksin dışında hastalığa yol açan adezin ve fimbrial proteinler gibi virülans faktörlerinin, toksijenik olmayan *C.diphtheriae*’ya bağlı enfeksiyonlardan sorumlu olduğu düşünülmüştür^{13,14}. Toksin üretimi olmadığında bile *C.diphtheriae*’nin bakteremi ve menenjit, endokardit, osteomyelit, septik artritis, hepatit ve periferik embolik hastalık gibi ciddi komplikasyonlara yol açtığı bildirilmiştir^{11,15-18}. Toksijenik olmayan suşlarla invaziv enfeksiyonlar için immün yetmezlik, diyabet, kronik karaciğer hastalığı, konjenital ya da kalp kapak hastalıkları, intravenöz ilaç alışkanlığı, alkolizm gibi risk faktörleri söz konusudur. Diş çürüklerinin de *C.diphtheriae*’ya bağlı invaziv enfeksiyon için giriş yolu olduğu düşünülmüştür^{11,19}. Organizmanın diğer önemli bir

giriş yeri de deridir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde *C.diphtheriae*'nin klasik kolonizasyon bölgesi deridir. Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda bakterinin kana geçtiği düşünülmektedir. Toksik olmayan suş ile invaziv enfeksiyon olgularında mortalite oldukça yüksektir (%36-41). Nontoksijenik suşlar ile ciddi solunum sistemi enfeksiyonları çok nadir olmakla birlikte immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkabilir. Literatürde nontoksijenik *C.diphtheriae* ile ilişkili nekrotizan epiglotit gelişen akut lenfoblastik lösemili 3 yaşında bir çocuk hasta ile afebril pnömoni gelişen 60 yaşında amiyotrofik lateral sklerozlu bir hasta bildirilmiştir¹³. Çalışmamızdaki boğaz sürüntü örneğinde toksijenik olmayan *C.diphtheriae* saptanan olgular, sadece ÜSYE semptomu olan sağlıklı çocuklardan oluşmaktaydı. Risk grubunda olmayan bu olgularda invaziv enfeksiyon gelişmemiştir.

Çocukluk çağı rutin aşılama programları hastalığın insidansında ve buna bağlı olarak da toksijenik *C.diphtheriae* rezervuarında azalmaya yol açmıştır. Ancak yaşla birlikte giderek azalan ve koruyucu düzeyin altına düşen serum difteri antitoksin düzeyleri ile nazofarenkste *Corynebacterium* taşıyıcılığı arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Beş yüz sağlıklı erişkinden alınan faringeal ve nazal sürüntü örneklerinin 93'ünde toksijenik olmayan *C.diphtheriae*'nin ürediği ve bu asemptomatik kişilerin serum difteri antitoksin düzeylerinin; difteriye karşı koruyucu olarak kabul edilen düzeyin altında olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubu olarak alınan, taşıyıcı olmayan 407 kişinin difteri antitoksin düzeyi difteriye karşı koruyucu olarak kabul edilen seviyede bulunmuştur²⁰. Tam aşı ve rapeli olan çocuk yaş grubunun içeren çalışmamızda toksijenik olmayan *C.diphtheriae* taşıyıcısının saptanması beklenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Kırk yaşın üstündeki bireylerde aşılama oranlarının bebek ve çocuklara göre daha az olması ve uygun pekiştirme aşı dozu ile yeterli immünite devamlılığının sağlanamaması, bu kişilerde taşıyıcılık kadar, difteri riskinin de artmasına neden olmaktadır. Erişkinlerde bağışıklığın devamlılığı için, her 10 yılda bir rapel aşılama gerekli olmaktadır¹⁹.

Sonuç olarak; nontoksijenik *C.diphtheriae* suşları ile kolonizasyonun, özellikle risk gruplarında ve immün sistemi baskılanmış kişilerde bakteriyemi ve invaziv enfeksiyonların ortaya çıkmasına yol açabilmesinin yanı sıra, bu suşların duyarlı kişilerde toksijenik suşlara dönüşerek difteriye yol açma potansiyeli kazanması da söz konusu olduğundan ülkemizdeki yüksek orandaki aşılama çalışmalarının sürdürülmesi ve erişkinlere de her 10 yılda bir pekiştirme aşılmasının yapılması büyük önem taşıdığı görülmektedir. Çalışma grubumuzda düşük bir oranda da olsa nontoksijenik *C.diphtheriae* kolonizasyonu bulunması; çalışmamıza benzer düzenli kesitsel çalışmaların ve rutin taramaların yapılmasının, unutulmaya yüz tutmuş bu organizma hakkında hem epidemiyolojik, hem mikrobiyolojik açıdan farkındalık yaratacağını düşündürmüştür. Çalışmamızda *tox* geni taşıdığı halde toksin üretmeyen ancak toksin üretme yeteneği kazanabilen NTTB suşu saptanmamasına rağmen, bu suşların Avrupa ülkelerinde dolaşımda olması da tarama çalışmalarının önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. MacGregor RR. *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtheria), pp: 2366-72. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, 8th ed., 2015. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Wagner KS, White JM, Neal S, et al. Members of the Diphtheria Surveillance Network, Efstratiou A. Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007-2008: a multicentre European study. Clin Microbiol Infect 2011; 17(4): 519-25.
3. Difterinin Mikrobiyolojik Tanısı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, Bakterioloji/ Mikrobiyolojik Tanımlama Cilt I. B-MT-02 Sürüm 1.1, 2014. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara. <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/bakterioloji/UMS-B-MT-02-Difteri.pdf>
4. Burkovski A. Diphtheria and its etiological agents. In: Burkovski A (ed). *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. 2014. Springer, Dordrecht.
5. Difteri Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi. 2003, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Ankara.
6. Begg N. Diphtheria: Manual for the management and control of diphtheria in the European region. Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO, 1994, Copenhagen.
7. Eskola J, Lumio J, Vuopio-Varkila J. Resurgent diphtheria--are we safe? Br Med Bull 1998; 54(3): 635-45.
8. Kolodkina V, Titov L, Sharapa T, Grimont F, Grimont PA, Efstratiou A. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus. BMC Infect Dis 2006 6: 129.
9. Divino-Goes KG, Moraes-Pinto MI, Dinelli MI, et al. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. Braz J Med Biol Res 2007; 40(12): 1681-7.
10. Daskalaki I. *Corynebacterium diphtheriae* pp: 754-59. In: Long S, Pickering L, Prober C (eds). Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases 4th ed, 2012. Elsevier Saunders, Philadelphia.
11. Zasada AA. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. Przegl Epidemiol 2015; 69(3): 439-44, 569-74.
12. Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxicogenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003-2012. Euro Surveill 2014; 19(22): 20819.
13. Lake JA, Ehrhardt MJ, Suchi M, Chun RH, Willoughby RE. A case of necrotizing epiglottitis due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. Pediatrics 2015; 136(1): e242-5.
14. Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1625-9.
15. Holthouse DJ, Power B, Kermode A, Golledge C. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: two cases and review of the literature. J Infect 1998; 37(1): 62-6.
16. El-Hazmi MM. Late-onset prosthetic valve endocarditis caused by nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. J Infect Dev Ctries 2015; 9(8): 905-9.
17. Rizvi M, Khan F, Raza A, Shukla I, Sabir AB. Emergence of coryneforms in osteomyelitis and orthopaedic surgical site infections. Australas Med J 2011; 4(7): 412-7.
18. Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. Braz J Med Biol Res 2008; 41(11): 986-91.
19. Fisher RG. *Corynebacterium* and *Rhodococcus*. pp: 1423-28. In: Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 7th ed, 2014. Saunders.
20. Bergamini M, Fabrizi P, Pagani S, Grilli A, Severini R, Contini C. Evidence of increased carriage of *Corynebacterium* spp. in healthy individuals with low antibody titres against diphtheria toxoid. Epidemiol Infect 2000; 125(1): 105-12.