

**Ankara'daki Çeşitli Merkezlerde Toksin Pozitifliği Saptanan
Dışkı Örneklerinden İzole Edilen
Clostridium difficile Kökenlerinin
Antimikrobiyal Duyarlılıkları ve Moleküler Karakterizasyonu**



Emrah Salman, Zeynep Ceren Karahan

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

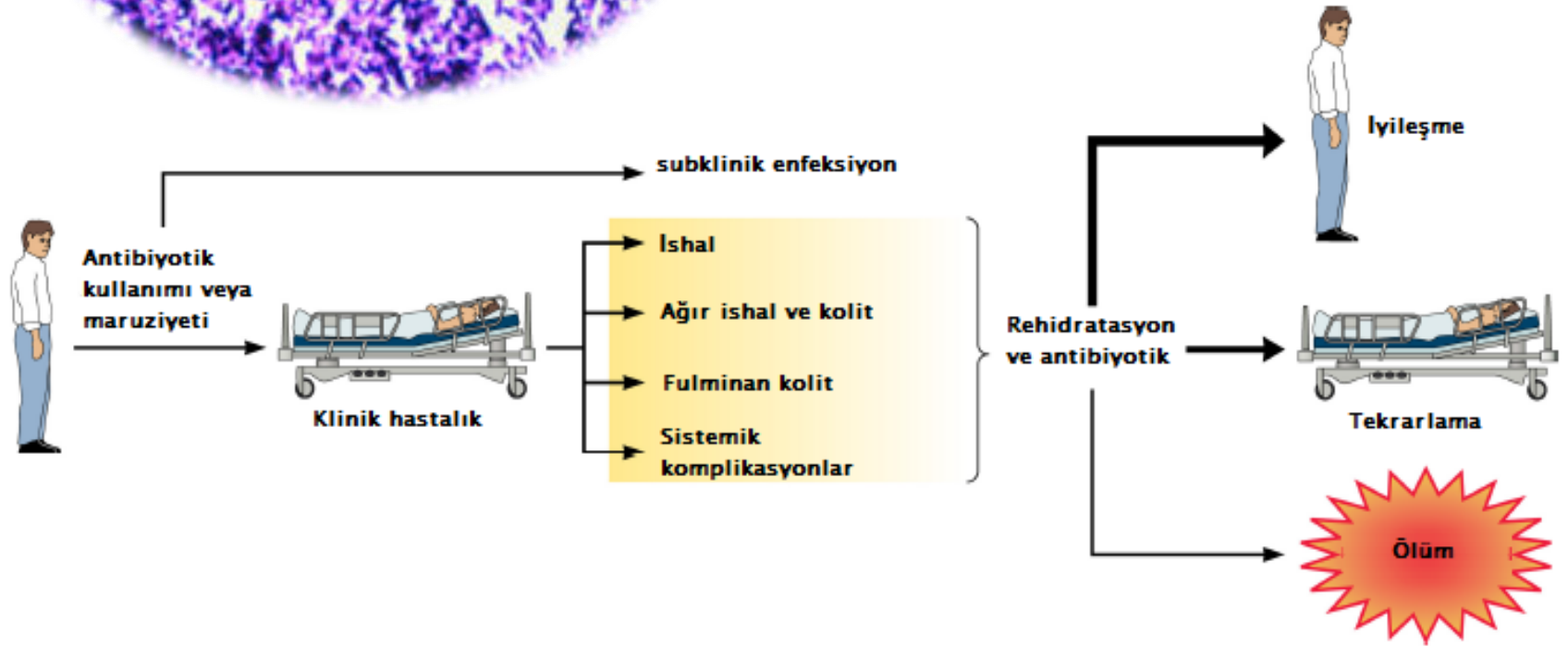
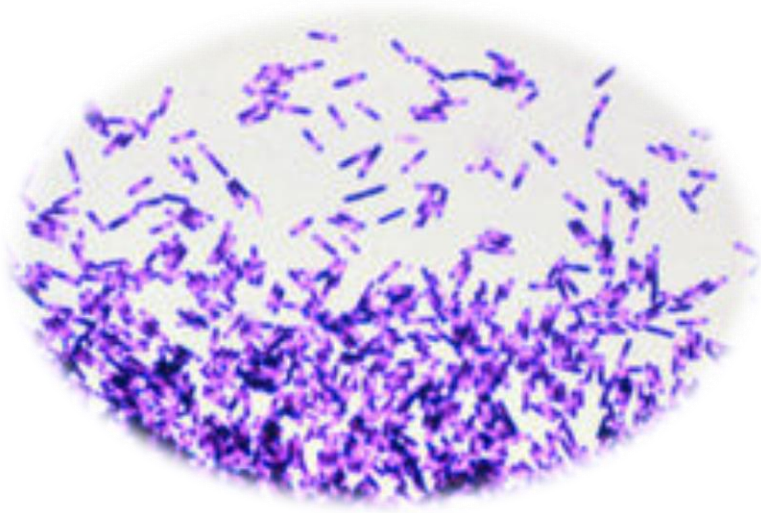
**3. Ulusal
Klinik Mikrobiyoloji
Kongresi-2015**



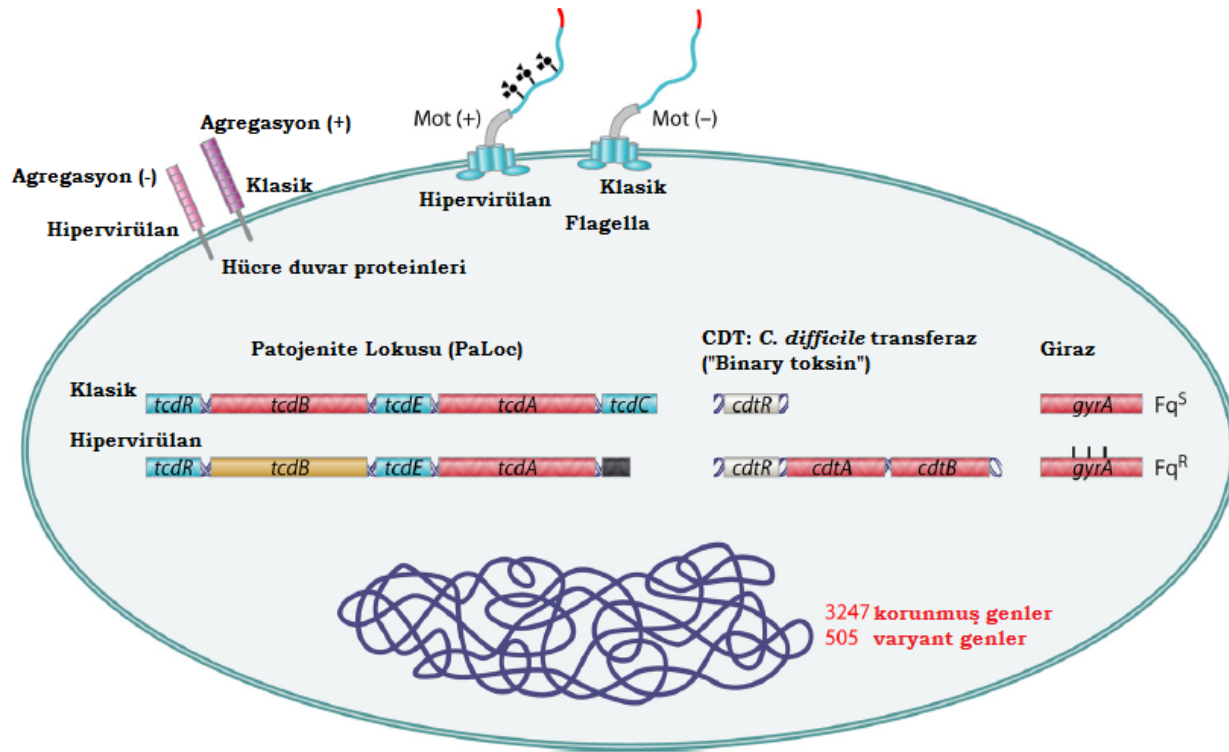
**18-22 Kasım 2015
Titanic Kongre Merkezi
Belek, Antalya**

Giriş

- ▶ Antibiyotik kullanımına bağlı ishal etkeni olan *Clostridium difficile*, nozokomiyal diyarenin en sık ve önde gelen sebebidir.
- ▶ Enfeksiyon kontrol önlemlerine ve tedavisindeki yeni seçeneklere rağmen, *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) insidansı ve ciddiyetinde kararlı ve sürekli bir artış söz konusudur.
- ▶ CDE, artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir.



- ▶ Hipervirülan *C. difficile* suşları (PZR ribotip 027 vb) hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlarda giderek artan sıklıkta izole edilmekte ve önemli salgınlara neden olmaktadır.



Amaç

- ▶ Antibiyotik ilişkili diyare tanısı ile laboratuvara gönderilen ve toksin pozitifliği saptanan dışkı örneklerinden izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinin;
 - Antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması
 - Toksin genlerinin PZR ile araştırılması
 - Sekans analizi ile *tcdC* geni delesyonlarının araştırılması
 - Olası hipervirülan suşların saptanması ve ribotiplendirmesinin yapılması

Materyal-Yöntem

- ▶ 01.09.2012- 31.10.2014 tarihleri arasında,
 - Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina ve Cebeci Hastaneleri ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastalardan
 - «Ankara Düzen Laboratuvarlar Grubu»na ayaktan başvuran hastalardan
- ▶ gönderilen örneklerden, toksin pozitifliği saptanan ve kültürde üretilen 61 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır

Materyal-Yöntem

- ▶ Toksin pozitifliği ELISA/PZR/immünkromatografik yöntemlerle saptanmıştır.
- ▶ *C.difficile* izolasyon ve identifikasyonu geleneksel yöntemler ve Crystal Anaerob Kit (BBL, A.B.D) kullanılarak gerçekleştirilmiştir
- ▶ Metronidazol, vankomisin, eritromisin, klindamisin ve moksifloksasin duyarlılıkları gradyent test (G Test) şeritleri kullanılarak belirlenmiştir^{1,2}.
- ▶ Toksin genleri (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB*) PZR yöntemiyle gösterilmiştir.
- ▶ *tcdc* geni delesyon ve tek nükleotit polimorfizmlerinin araştırılması için iki yönlü DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.
- ▶ PZR ribotipleme işlemi devam etmektedir.

Bulgular-Hasta Özellikleri

► 61 hastanın;

- Yaş ortalaması: 52,01 (min 3- max81)
- 26 E (%42), 35 K (%58)
- 38 (%62,3) yatan hasta, 23 (%37,7) ayaktan tedavi gören hasta
 - Yatan hastaların %91,8'i dahiliye servislerinde
 - %4,9'u yoğun bakım ünitelerinde
 - %3,3'ü cerrahi servislerde

Bulgular-Hasta Özellikleri

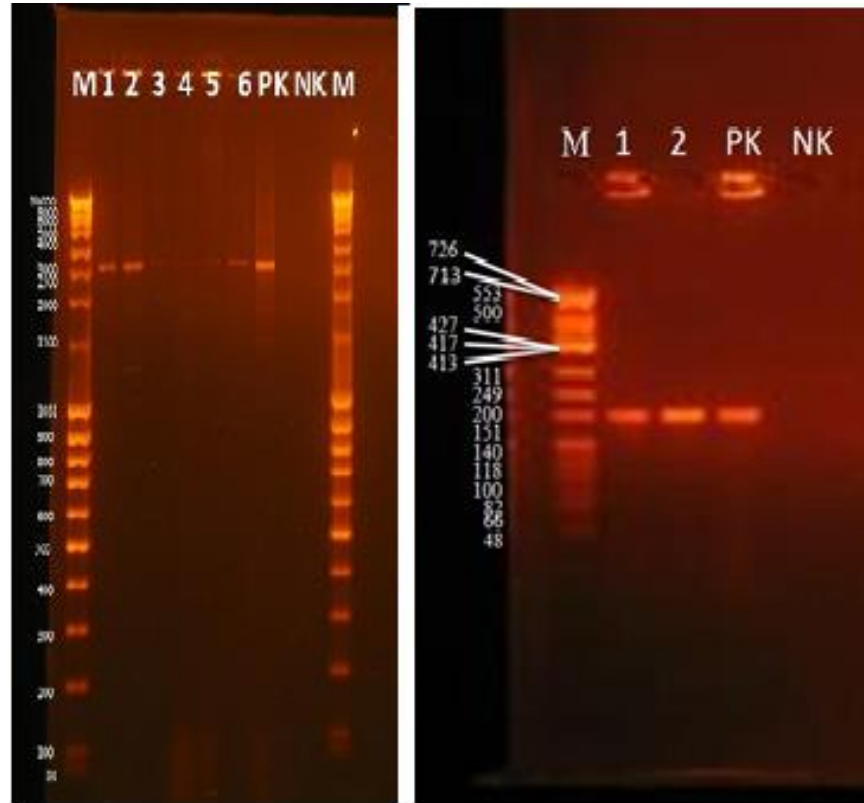
- ▶ 55'inde (%90,2) antibiyotik kullanım öyküsü var.
 - ▶ 18'inde (%32,7) sefalosporin
 - ▶ 15'inde (%27,3) karbapenem
 - ▶ 14'ünde (%25,4) penisilin grubu
 - ▶ 10'unda (%18,1) florokinolon
 - ▶ 9'unda (%16,3) aminoglikozid
 - ▶ 8'inde (%14,5) glikopeptid
- ▶ Yatan hastaların 13 (%34)'ünde malignite, 17 (%44)'sinde kronik hastalık mevcut

Bulgular-Antimikrobiyal Duyarlılıklar

- ▶ Suşların hepsi (% 100) vankomisine ve metronidazole duyarlı
- ▶ 18 izolat (% 29,5) klindamisine dirençli
- ▶ 7 izolat (% 11,5) eritromisine dirençli
- ▶ **3 izolatta (%5) moksifloksasin MİK değeri epidemiyolojik eşik değerin üzerinde ($>4\mu\text{g/ml}$)**
 - ▶ HÜTF’de yatan bir hasta
 - ▶ Düzen Laboratuvarına ayaktan başvuran iki hasta

Bulgular-*tcdA* ve *tcdB*

- Suşların hepsi *tcdA* ve *tcdB* (+)

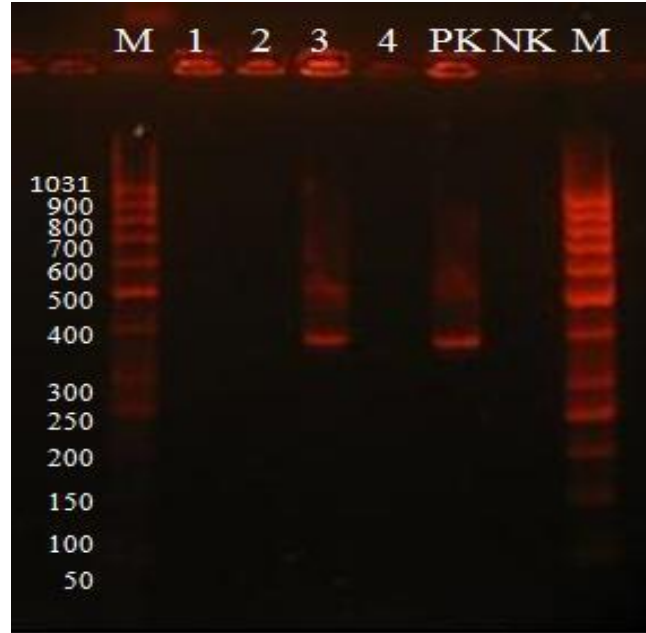


tcdA (solda) ve *tcdB* (sağda) PZR analizi.

M: Moleküler büyüklük belirteci, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

Bulgular-*cdtA* ve *cdtB*

- Bir izolatta (%1,6) «binary toksin» kodlayan *cdtA* ve *cdtB* genleri varlığı saptanmış ve sekans analizi ile doğrulanmıştır.

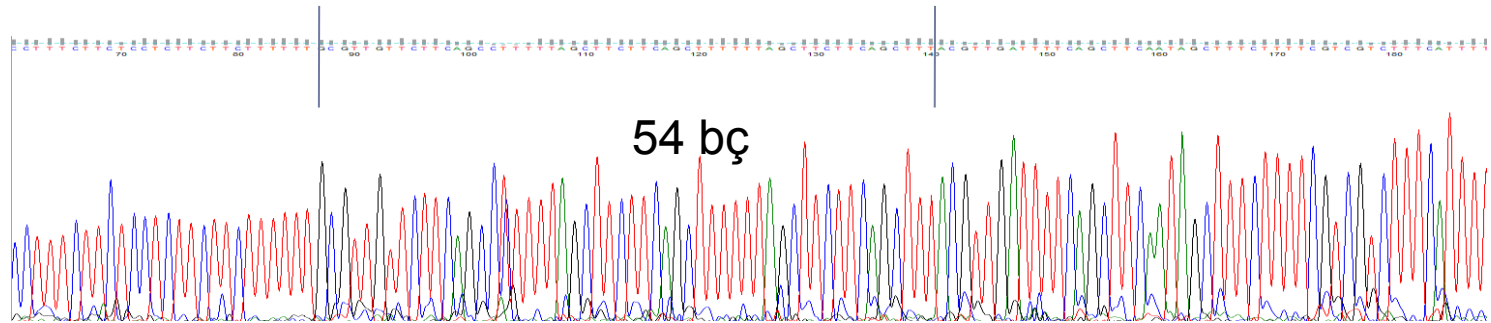


cdtA/cdtB PZR analizi

M: Moleküler büyüklük belirteci, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

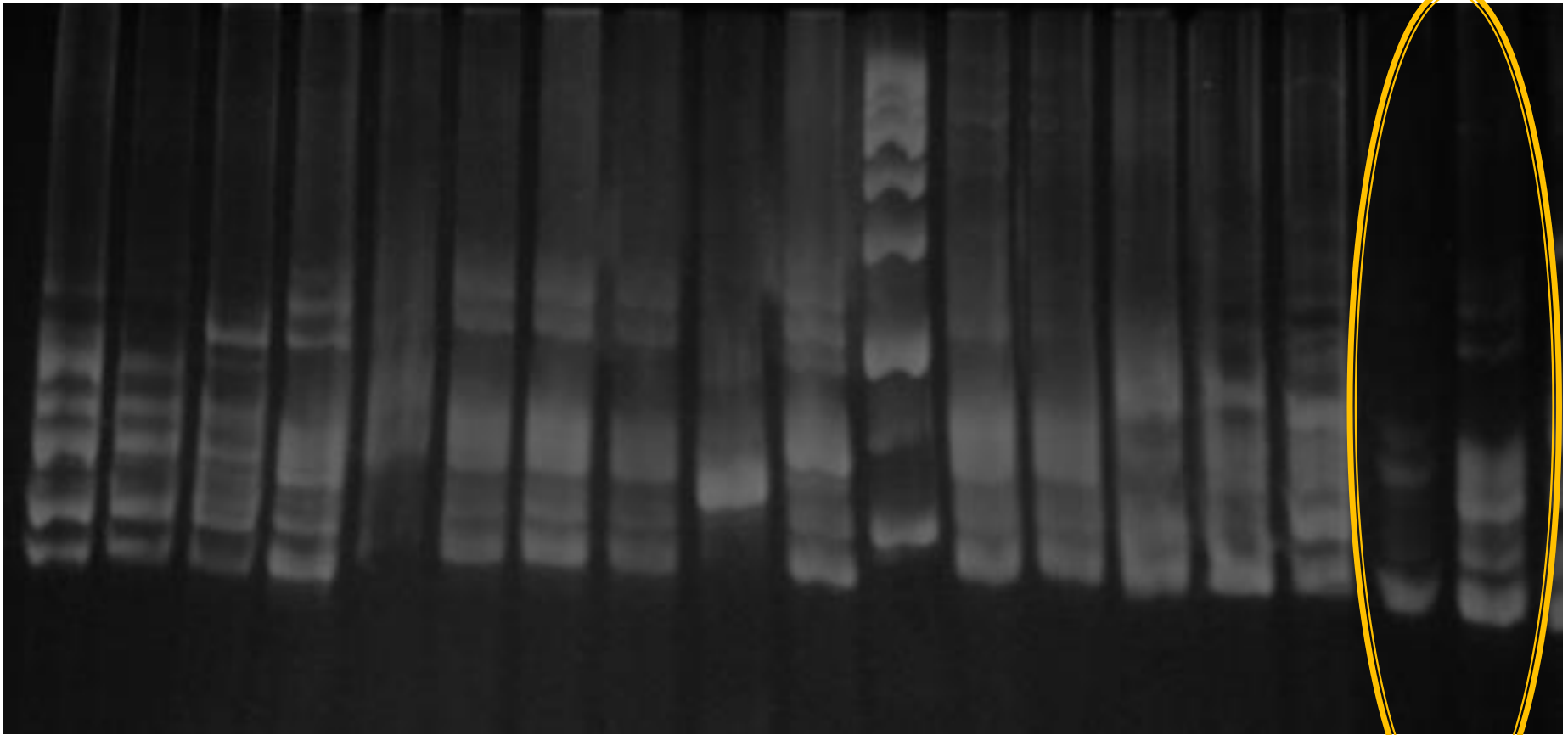
Bulgular-*tcdC* Geni Sekans Analizi

- ▶ 10 izolatta (%16,4) 148G/T (Ala→Ser) (GenBank 1843207)
- ▶ Bir izolatta (%1,6) 150T/C (Ala→Ala) (GenBank1843798)
- ▶ Bir izolatta (%1,6) 414 C/A (Asp→Glu) (GenBank 1843786)
- ▶ **Bir izolatta (%1,6) 105-122. aminoasitlerin budanmasına yol açan 54 bç'lik delesyon ve 378G/A (Glu→Glu) değişimi (GenBank 1843801)**



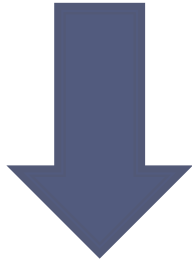
PZR ribotipleme

HVS 027PK

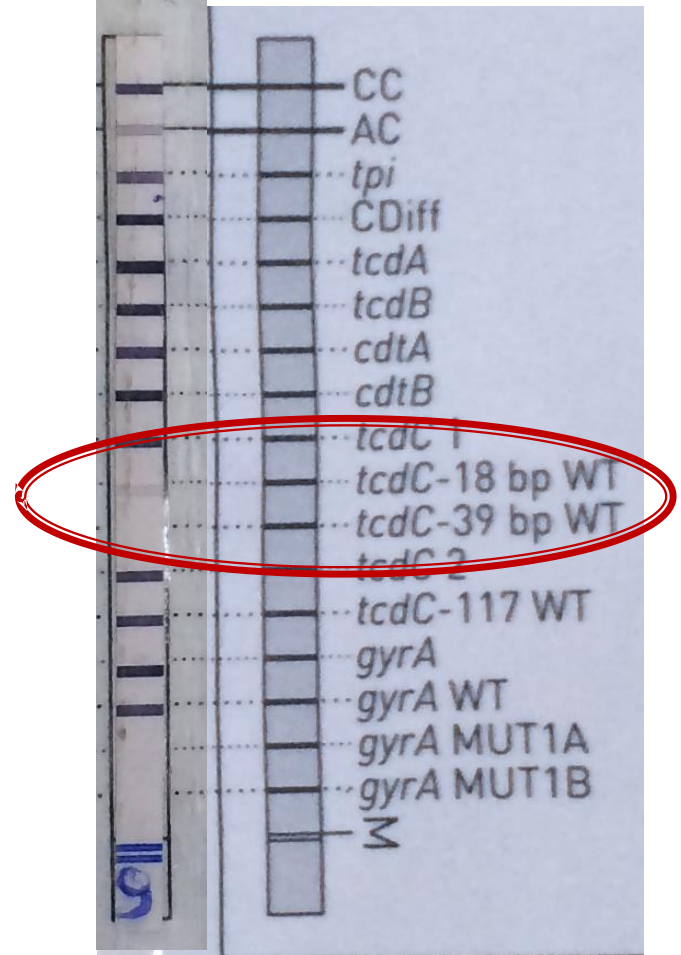


Bulgular-THSK

- Toksin A+B (*tcdA* ve *tcdB*) pozitif
- Binary toksin (*cdtA* ve *cdtB*) pozitif
- *tcdC* 18 ve 39 bç mutasyonu pozitif
- Moksifloksasine duyarlı (*gyrA* mt negatif)



- **Hipervirülan 027dışı *C. difficile* suşu**



GenoType Cdiff, Hain Lifescience, Almanya

Tartışma

- ▶ Türkiye dahil 14 Avrupa ülkesinin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, 354 toksijenik suşun % 24,3'ü varyant gene sahip, %17,2'sinde «binary toksin» gen ekspresyonu var (Türkiye izolatlarının hiçbirinde yok)¹
- ▶ Ergen ve ark.² ve Deniz ve ark.³ çalışmalarında «binary toksin» üreten suş saptamadı
- ▶ **Ülkemizden «binary toksin» pozitif kökenlerin varlığını tespit eden ilk çalışma**

1 Barbut et al. Clin Microbiol Infect 2007;13:1048-1057

2 Ergen EK, et al. Médecine et maladies infectieuses. 2009;39:382-7.

3 Deniz U, et al. Mikrobiyol Bul. 2011;45:1-10.

Sonuç

- ▶ Vankomisin ve metronidazol tedavide tercih edilebilir.
- ▶ İzolatların ~%30'u klindamisine dirençli!
- ▶ Kinolon direnci %5, ancak bunlar klasik tip!
- ▶ Varyant kökenler görülmeye başladı!
- ▶ Hipervirülan kökenler (?) görülmeye başlandı!
- ▶ Ribotipleme çalışmaları devam etmekte...

CLOSTRIDIUM DIFFICILE FARM

DON'T WORRY LADS, IT'S JUST ANOTHER
HEALTHCARE COMMISSION REPORT...
THEY'LL BE TALKING FOR AGES!