

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ANKARA'DAKİ ÇEŞİTLİ HASTANELERDE DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE
TOKSİN POZİTİFLİĞİ SAPTANAN DIŞKI ÖRNEKLERİNDEN
ELDE EDİLEN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* İZOLATLARININ
TOKSİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI, PZR RİBOTİPLENDİRİMİ
VE RİBOTİPLER İLE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ORTAYA ÇIKARILMASI**

Dr.Emrah SALMAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

**ANKARA
2015**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ANKARA'DAKİ ÇEŞİTLİ HASTANELERDE DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE
TOKSİN POZİTİFLİĞİ SAPTANAN DIŞKI ÖRNEKLERİNDEN
ELDE EDİLEN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* İZOLATLARININ
TOKSİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI, PZR RİBOTİPLENDİRİMİ
VE RİBOTİPLER İLE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ORTAYA ÇIKARILMASI**

Dr.Emrah SALMAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
13L3330010 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA 2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN

Adı, Soyadı : Dr. Emrah SALMAN	Sınav tarihi: 18 / 12 / 2015
Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Z. Ceren KARAHAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Ankara'daki çeşitli hastanelerde değişik yöntemlerle toksin pozitifliği saptanan dışkı örneklerinden elde edilen *Clostridium difficile* izolatlarının toksin genlerinin araştırılması, PZR ribotiplendirimi ve ribotipler ile entimikrobiyal duyarlılıkları arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması

Tezin Niteliği: Ana Dal Uzmanlık Tezi Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: 1 2 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

Kabulüne

Reddine

Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

Oy birliği

Oy çokluğu

ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Prof. Dr. Zeynep Ceren Karahan

Jüri Başkanı

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Prof. Dr. Julide Sedy Coşmen

Jüri Üyesi

Baskent Üni. Tıp Fak. Anabilim/Bilim Dalı

Tıbbi mikrobiyoloji

Prof. Dr. A. Murat Akay

Jüri Üyesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında tüm bilgi ve desteğini veren, yardımları ile her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Zeynep Ceren Karahan'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, destek ve anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet Kıyan'a,

Bilgi ve anlayışlarını benden esirgemeyen Prof. Dr. Murat Özsan, Prof. Dr. Murat Aksoy, Prof. Dr. Aydın Karaarslan, Prof. Dr. Alper Tekeli, Prof. Dr. Devran Gerçekler, Prof. Dr. İştar Dolapçı, Prof. Dr. Fikret Şahin, Doç. Dr. Ebru Us ve Doç. Dr. Gülay Akarsu'ya,

Bu süre boyunca birlikte çalıştığım Anabilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşlarım ve personeline,

Tez çalışmamda değerlendirmek üzere *C .difficile* pozitif örnekleri toplamamda yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina ve Cebeci Hastaneleri Merkez Laboratuvarları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı ve Ankara Düzen Laboratuvarı çalışanlarına,

Hipervirülan suşun delesyon doğrulamasını büyük bir titizlikle ve hızla gerçekleştiren Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı sorumlusu Doç. Dr. Belkıs Levent'e,

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme, eşim Dr. Reyhan Bilici Salman'a ve minik kızıma teşekkür ederim.

Dr. Emrah Salman

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13L3330010 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA 2015

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	4
2.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri	5
2.4. Virülans Özellikleri	7
2.4.1. Spor Oluşturma Yeteneği	7
2.4.2. Flajella	8
2.4.3. Fibronektin Bağlayıcı Protein	8
2.4.4. Fimbria (Pilus)	8
2.4.5. Toksin üretimi	8
2.4.5.1. Toksin A (TcdA)	10
2.4.5.2. Toksin B (TcdB)	11
2.4.5.3. “Binary” Toksin (CdtA ve CdtB):	12
2.5. Patogenez	12
2.6. Risk Faktörleri	14
2.7. Klinik Özellikler	15
2.7.1. Asemptomatik Kolonizasyon	15
2.7.2. <i>C. difficile</i> İshali	15
2.7.3. <i>C. difficile</i> Koliti	16
2.7.4. Psödomembranöz Enterokolit	16
2.7.5. Fulminant <i>C. difficile</i> Enfeksiyonu	17
2.7.6. Rekürren <i>C. difficile</i> enfeksiyonu	17
2.7.7. Kolon Dışı Belirtiler	17
2.8. Epidemiyoloji	18
2.9. Tanı	20
2.9.1. Endoskopik İnceleme	21
2.9.2. Radyolojik İncelemeler	21

2.9.3. Laboratuvar Tanı.....	22
2.9.3.1. Mikroskopi.....	22
2.9.3.2. Kültür	23
2.9.3.3. Doku Kültürü Sitotoksiste Deneyleri.....	24
2.9.3.4. İmmürokromatografi Testleri	24
2.9.3.5. Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler	25
2.9.3.6. Moleküler Yöntemler	26
2.9.3.7. Kromatografik Yöntemler.....	27
2.9. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarında Tedavi.....	27
2.10. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarından Korunma.....	29
2.10.1. Antibiyotik Kullanım Politikası Oluşturulması	30
3. GEREÇ-YÖNTEM.....	33
3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi	33
3.1.1. Örnek Kabul Kriterleri.....	33
3.1.2. Örnek Red Kriterleri.....	34
3.2. Örneklerin Saklanması.....	34
3.3. Alkol Şok İşlemi ve Sporların Jerminasyonu	34
3.3.1. Gereç	34
3.3.1.1. “Brain Heart Infusion Broth” Temel Besiyeri Hazırlanması.....	34
3.3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	35
3.3.1.3. Araçlar	35
3.3.2. Yöntem	35
3.4. Anaerob Kültür	36
3.4.1. Gereç	36
3.4.1.1. Sikloserin Sefoksitin Fruktoz Agar Besiyerinin Hazırlanması	36
3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	36
3.4.1.3. Araçlar	36
3.4.2. Yöntem	37
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	37
3.5.1. Gereç	37
3.5.1.1. Besiyerleri.....	37
3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	38
3.5.1.3. Araçlar	38
3.5.2. Yöntem	38
3.6. İzolatlardan DNA eldesi	40

3.6.1. Gereç	40
3.6.1.1. Besiyerleri	40
3.6.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	40
3.6.1.3. Araçlar	40
3.6.2. Yöntem	40
3.7. Toksin Genlerinin İncelenmesi	41
3.7.1. Toksin A Geninin (<i>tcdA</i>) İncelenmesi.....	42
3.7.1.1. Gereç	42
3.7.1.1.1. Sarf Malzemeleri	42
3.7.1.1.2. Kimyasal Malzemeler.....	42
3.7.1.1.3. Araçlar	42
3.7.1.2. Yöntem	43
3.7.1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	43
3.7.1.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme.....	44
3.7.2. Toksin B Geninin (<i>tcdB</i>) İncelenmesi	44
3.7.2.1. Gereç	44
3.7.2.1.1. Sarf Malzemeleri.....	44
3.7.2.1.2. Kimyasal Malzemeler.....	45
3.7.2.1.3. Araçlar	45
3.7.2.2. Yöntem	46
3.7.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	46
3.7.2.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme.....	47
3.7.3. “Binary” Toksin Genlerinin (<i>cdtA</i> ve <i>cdtB</i>) İncelenmesi	47
3.7.3.1. Gereç	47
3.7.3.1.1. Sarf Malzemeleri.....	47
3.7.3.1.2. Kimyasal Malzemeler	48
3.7.3.1.3. Araçlar	48
3.7.3.2. Yöntem	49
3.7.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	49
3.7.3.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme.....	50
3.8. <i>tcdC</i> Geni Dizi Analizi	50
3.8.1. Gereç	50
3.8.1.1. Sarf Malzemeleri.....	50
3.8.1.2. Kimyasal Malzemeler	50
3.8.1.3. Araçlar	51

3.8.2. Yöntem	52
3.8.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	52
3.8.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme	53
3.8.2.3. İki Yönlü DNA Dizi Analizi.....	53
3.9. PZR Ribotiplendirmesi	53
3.9.1. Gereç	53
3.9.1.1. Sarf Malzemeleri.....	53
3.9.1.2. Kimyasal Malzemeler	53
3.9.1.3. Araçlar	54
3.9.2. Yöntem	55
3.9.2.1. İzolatlardan DNA eldesi	55
3.9.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	55
3.9.2.3. Elektroforez ve Görüntüleme	56
4. BULGULAR	58
4.1. Toksin Pozitif <i>C. difficile</i> İzolatları	58
4.2. <i>C. difficile</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının G-test Yöntemi ile Değerlendirilmesi ..	59
4.2.1. Vankomisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi	59
4.2.2. Metronidazol için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi.....	59
4.2.3. Moksifloksasin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi	60
4.2.4. Klindamisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi.....	61
4.2.5. Eritromisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi.....	62
4.3. <i>C. difficile</i> İzolatlarının PZR ile Toksin Genlerinin İncelenmesi	63
4.3.1. Toksin A (<i>tcdA</i>) Geni İncelenmesi	63
4.3.2. Toksin B (<i>tcdB</i>) Geni İncelenmesi	64
4.3.3. “Binary” Toksin Genleri (<i>cdtA</i> ve <i>cdtB</i>) İncelenmesi	65
4.3.4. <i>tcdC</i> Geninin Dizi Analizi	65
4.3.5. PZR Ribotipleme Bulguları	67
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
ÖZET	80
SUMMARY	82
KAYNAKLAR	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri

ADP: Adenozin difosfat

AÜTF: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

BHIS: Brain Heart Infusion Supplement

BKA: Brucella Kanlı Agar

BD: Becton Dickonson

BT: Bilgisayarlı tomografi

CCFA: Cycloserine-Cefoxitine Fructose Agar

CHO: Çin hamsteri ovaryumu hücreleri

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CDC: Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi

CdtA: Binary toksin A

CdtB: Binary toksin B

CMA: Cycloserine-Mannitol Agar

CMBA: Cycloserine-Mannitol Kanlı Agar

CO₂: Karbondioksit

DEAE: Dietilaminoetil,

DLG: Düzen Laboratuvarlar Grubu

DNA: Deoksiribonükleik asit

dH₂O: Distile su

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ECOFF: Epidemiyolojik eşik (cut off) değer

ECDC: Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi

EIA: Enzim immünassay

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FTS: Fizyolojik tuzlu su
GDH: Glutamat dehidrogenaz
GİS: Gastrointestinal sistem
GLC: Gaz likit kromatografisi
G-test: Gradient test
g: Gram
H₂: Hidrojen
H₂S: Hidrojen sülfür
HÜTF: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
IL: İnterlökin
kDa: Kilodalton
LAMP: İlmiğe dayalı izotermal amplifikasyon
Mg: Magnezyum
µm: Mikrometre
MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon
ml: Mililitre
mm: Milimetre
mmol: Milimol
MRC-5: İnsan fetal akciğer fibroblastları
NAP1: Kuzey Amerika pulsed field tip 1
N₂: Azot
PBS: Fosfat tamponlu tuzlu su
PME: Psödomembranöz enterokolit
PNL: Polimorf nüveli lökosit
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REA: Restriksiyon Endonükleaz Analizi
Taq: *Thermus aquaticus*

TcdA: Toksin A

TcdB: Toksin B

TNF- α : Tumor nekroz faktörü- alfa

UV: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Gram boyalı preparatta izlenen <i>C. difficile</i> basillerinin görünümü	5
Şekil 2. 2. <i>C. difficile</i> koloni morfolojisi.....	6
Şekil 2. 3. Psödomembranöz enterokolit	16
Şekil 3. 1. CCFA besiyerinde izlenen <i>C. difficile</i> kolonileri.....	37
Şekil 3. 2. <i>C. difficile</i> G test örneği.....	40
Şekil 4. 1. <i>tcdA</i> PZR görüntüsü.....	63
Şekil 4. 2. <i>tcdB</i> PZR görüntüsü.....	64
Şekil 4. 3. <i>cdtA</i> ve <i>cdtB</i> PZR görüntüsü.....	65
Şekil 4. 4. <i>tcdC</i> PZR görüntüsü.....	66
Şekil 4. 5. <i>tcdC</i> genine ait DNA dizi analizi görüntüsü	67
Şekil 4. 6. PZR ribotiplendirme jel görüntüsü	68
Şekil 4. 7. “Binary” toksin üreten izolatın hibridizasyon temelli bir yöntemle doğrulanması	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1: Duyarlılık kategorileri için kabul edilen eşik değerler	39
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve ampikon büyüklükleri	41
Tablo 4.1: Vankomisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı	59
Tablo 4.2: Metronidazol için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı	60
Tablo 4.3: Moksifloksasin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı	61
Tablo 4.4: Klindamisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı	62
Tablo 4.5: Eritromisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı.....	63
Tablo 4.6: <i>tcdC</i> geninin DNA dizi analizi bulguları	67
Tablo 4.7: Hasta ve izolatların özellikleri	69

1. GİRİŞ

Clostridium difficile gram-pozitif, spor oluşturan anaerobik bir basildir. Fekal oral yolla kişiden kişiye veya çevreden kişiye bulaşmaktadır. İlk olarak 1935 yılında sağlıklı bebeklerin dışkı florasından izole edilmiş ve izolasyonun zor olmasından dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiş; 1978 yılına dek antibiyotikle ilişkili diyare ve psödomembranöz enterokolit için etken olarak gösterilememiştir (Ciaran ve Lamont , 2008).

Günümüzde nozokomiyal diyarenin en sık sebebi olan *C. difficile*, sağlıklı erişkinlerin %5'inin, infantların %30-70'inin dışkılarında bulunmaktadır (Fekety ve Shah, 1993; Khanna ve Pardi, 2010). *C. difficile* ile enfekte yatan hastaların çoğunluğu asemptomatik taşıyıcılardır ve hastane koşullarında *C. difficile*'nin sürekli mevcudiyetini sağlayan sessiz taşıyıcı konumundadırlar (Khanna ve Pardi, 2010).

Enfeksiyon kontrolündeki gelişmelere ve *C. difficile* enfeksiyonu tedavisindeki yeni seçeneklere rağmen, *C. difficile* enfeksiyonu insidansında kararlı ve sürekli bir artış söz konusudur ve bu durum artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Loo ve ark., 2005). *C. difficile* enfeksiyonu epidemiyolojisindeki bu değişiklikler, dünyada gittikçe yaygınlaşan ve acil bir sorun haline gelen hipervirülan *C. difficile* suşlarının yayılımı ve enfeksiyonun tanı yöntemlerinin gelişmesiyle ilişkilidir.

Hipervirülan *C. difficile* suşları, 2000 yılı öncesine dek Amerika Birleşik Devletleri'ndeki(A.B.D) *C. difficile* kökenlerinin%1'inden azını oluşturmaktaydı (McDonald ve ark., 2005). Toksinotip III olarak karakterize edilen bu kökenler, toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB)'nin üretimi için negatif düzenleyici olan *tcdC* geninde 117. pozisyonda 18 baz çiftlik bir delesyon ile karakterizedir (Freeman ve ark., 2010). Bu çerçevede kayma mutasyonu prematür bir stop kodonu oluşturmaktadır. Hipervirülan (epidemik) *C. difficile* suşları birim zamanda daha fazla toksin üretmek yerine daha uzun süreler boyunca toksin üretimini sürdürmektedir ve bu durum fonksiyonel negatif regülasyon mekanizmasının yokluğundan kaynaklanmaktadır (Freeman ve ark., 2006).

Hipervirulan kökenlerin bir diğer önemli özelliği “binary” toksin denilen diğer bir toksini de üretmeleridir. Bu toksinin *C. difficile* enfeksiyonu patogenezindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Geric ve ark., 2006). Yakın zamanlı bir araştırmada bildirildiğine göre “binary” toksin, intestinal epitelyal hücrelerin hücre yüzeylerinde yoğun ağ örgüsü oluşturan mikrotübül çıkıntılarını indüklemekte ve yine bu sayede bakteriyel hücrelerin bağırsak epiteline tutunmasını artırmaktadır (Schwann ve ark., 2009). Yine bu epidemik suşlarda florokinolanlara azalmış duyarlılık gözlenmektedir (Freeman ve ark., 2010). Bu suş profili, restriksiyon endonükleaz analizi (REA) grup BI, Kuzey Amerika Pulsed Field tip-1 (NAP 1) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ribotip 027 (B1/NAPI/027) olarak bildirilmektedir (Killgore ve ark., 2008).

C. difficile'nin ciddi enfeksiyon ve salgın oluşturma yeteneğine ait farkındalığın artması ve *C. difficile* enfeksiyonu sürveyansındaki gelişmelere rağmen, enfeksiyonun araştırılması halen çoğu ülkede değişkenlik göstermektedir. Avrupa'daki *C. difficile* ribotip 027 nedeniyle oluşan erken salgınları takiben, Avrupa Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC) konularında uzman bir ekip hazırlamıştır. ECDC çalışma grubu *C. difficile* enfeksiyonu vaka tanımlamaları ve sürveyans için öneriler sunmuştur (Kuijper ve ark., 2006). Sürveyans için benzer öneriler ayrıca ABD Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'nin çalışma grubu tarafından da hazırlanmıştır (McDonald ve ark., 2007).

C. difficile enfeksiyonuna olan ilginin artması sonucunda bildirilen *C. difficile* enfeksiyonu insidanslarındaki artış olmuştur. Epidemiyolojideki güvenilir verileri artırmanın önemli bir yolu *C. difficile* enfeksiyonunun laboratuvar tanısındaki farklı yaklaşımları değerlendirmektir (Eastwood ve ark., 2009). *C. difficile*'yi saptamada farklı hedef ve kombinasyonlar mevcuttur (bakteri glutamat dehidrogenazları, toksinler ve toksin genleri) ve seçilen laboratuvar yöntemine göre enfeksiyonun ölçülen insidansı değişmektedir (Planche ve ark., 2008). Tanısal yaklaşımdaki yeniliklere de bağlı olarak iki binli yıllardan itibaren *C. difficile* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, klinik tablo ve risk faktörleri tanımında önemli değişiklikler olmuştur. 2007 yılında yapılan bir araştırmada, 11 Avrupa Birliği ülkesi ve İsviçre'de 027 ribotipinin en etkili ribotip olduğu ve 027 prevalansının ülkeler arasında %11-

100 arasında değiştiği vurgulanmıştır (Kuijper ve ark., 2007). Ardından *C. difficile* ribotip 027, 16 Avrupa ülkesinde salgınlara, Danimarka, İsveç, Norveç, Macaristan, Polonya, Avusturya ve İspanya gibi ülkelerde ise sporadik olgulara neden olmuştur (Freeman ve ark., 2010). Görüldüğü gibi, *C. difficile* enfeksiyonları Avrupa ülkeleri için artan boyutlarda bir sorun halindedir.

Ülkemizi de Avrupa ülkeleri ile birlikte değerlendirecek olursak, bu enfeksiyonların ülkemiz için de sorun oluşturması son derece yüksek bir ihtimaldir. Ülkemizde, anaerob bakteriyoloji konusunda yapılan çalışmalar az olduğundan, *C. difficile* enfeksiyonları da bu kapsamda göz ardı edilmiştir. Ülkemizde, *C. difficile* enfeksiyonları ve epidemiyolojisi ile ilgili çok merkezli çalışma bulunmamaktadır. Buna karşılık; çeşitli boyutlardaki farklı merkezlerden kendi verilerine ait bildirimler içeren çalışmalar yıllar içerisinde yayınlanmıştır (Tunçcan ve ark., 2008; Deniz ve ark., 2011; Ulger ve ark., 2011; Ayaracı ve ark., 2012). Bu çalışmalarda saptanan *C. difficile* enfeksiyonları farklı değişkenler göz önüne alınarak değerlendirilmiş olup, çok değerliş sonuçlara ulaşılmıştır. Genel olarak bakıldığında çalışmalara dahil edilen hastalar arasında *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyon saptanması oranı %7,9 ile %22,8 arasında değerlişmekte olup, en sık saptanan risk faktörleri; antibiyotik kullanımı (genellikle beta laktam / beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları), ileri yaş ve altta yatan kronik/ağır hastalıklar olarak saptanmıştır (Tunçcan ve ark., 2008; Deniz ve ark., 2011; Ulger ve ark., 2011; Ayaracı ve ark., 2012). Sonuç olarak; *C. difficile* enfeksiyonlarının ülkemizde halen bir sorun olup olmadığı konusunun daha sağlıklı irdelenebilmesi için çok merkezli iyi planlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak, eldeki veriler ve Avrupa ülkelerindeki endişe verici epidemiyolojik gelişmelerin ışığında, ülkemizdeki *C. difficile* sorununun buz dağının görünen yüzü olduğunu söylemek mümkündür. Bazı durumlarda son derece ölümcül seyredebilen bu enfeksiyonlar ile ilgili kısa vadedeki en önemli yaklaşım, risk faktörlerinin iyi bilinmesi yanında klinik bazında hastalık ile ilgili bilinçli olmaktır.

Bu çalışmada, antibiyotik ilişkili diyareli hastalardan etken olarak izole edilen *C. difficile* kökenlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması, toksin genlerinin tespiti, PZR ribotiplendirmenin yapılması ve izolatlar içerisinde hipervirülen suşların varlığı araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

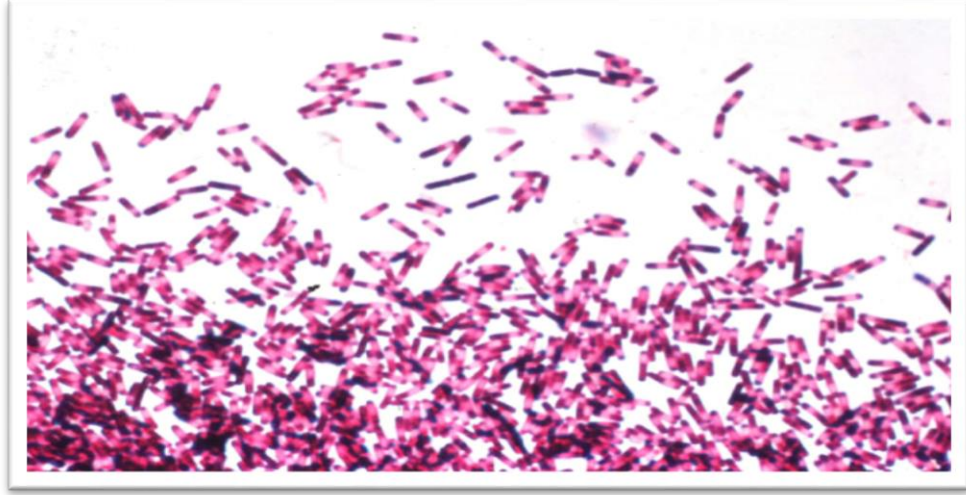
2.1. Tarihçe

Psödomembranöz enterokolit (PME) ilk olarak 1893 yılında Finney tarafından tanımlanmıştır. Tanımlanan bu ilk vaka, peptik ülser nedeniyle bir mide operasyonu geçiren ve operasyon sonrasında şiddetli ishal gelişen bir hastadır. Hastanın yapılan postmortem incelemesinde, kolonda difteri basili üretilemeyen, difterik görünümde psödomembranlar saptanmış ve “difterik kolit” olarak tanımlanmıştır. Bu dönemde etkenin *Staphylococcus aureus* olduğunu savunan görüşler olmuştur (Donald, 2000; Özinel 2001). 1935 yılında ilk olarak yenidoğanlarda “*Bacillus difficilis*” adı ile gram pozitif anaerobik basillere rastlanılmıştır (Kelly ve ark., 1994). 1950 ile 1970’li yıllar arasında antibiyotik kullanımındaki artışa paralel olarak antibiyotik ilişkili ishal/kolit daha çok gözlenmeye başlamıştır (Kelly ve ark., 1998). 1978 yılında ilk olarak PME ve antibiyotik ilişkili ishal tanımlanmış, vakaların çoğunda *C. difficile* etken olarak tespit edilmiştir. 1979 yılında *C. difficile*’ye bağlı PME’nin ilk basamak tedavisi olan vankomisin uygulanmıştır. İngiltere Sağlık Güvenliği Komitesi, PME’nin en sık nedeni olarak belirlenen klindamisin ve linkomisinin kullanımını kısıtlamışlardır. 1980’li yıllardan itibaren ABD, *C. difficile*’yi en önemli nozokomiyal ishal etkeni olarak tanımlanmıştır. 1989-1992 yıllarında klindamisinin yoğun kullanılması ile klindamisin dirençli (J suşu) suşlar ABD hastanelerinde salgınlar yapmıştır. *C. difficile* BI/NAPI/027 ilk defa 1980’li yıllarda identifiye edilmiş, fakat 2002 yılının sonunda Kanada’nın Quebec kentindeki salgınlarda epidemik bir suş olarak gözlenmiştir (Pépin ve ark., 2005). Eş zamanlı olarak ABD’de altı eyaletteki çeşitli hastanelerde *C. difficile* BI/NAP1/027 salgınları bildirilmiştir (Warny ve ark., 2005). 2003-2005 yılları arasında daha şiddetli, standart tedaviye dirençli ve tekrarlayan relapslarla seyreden *C. difficile* enfeksiyonları bildiriminde artış olmuştur (Pépin ve ark., 2005)

2.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

C. difficile, 0,5 µm en ve 3-5 µm boyunda, peritriş kirpikleri ile zayıf hareketli, kapsülsüz, uçları yuvarlak, ince, uzun, düz, gram pozitif basillerdir (Bilgehan, 2009;

Kıyan, 1999). Bakteri, bedeninden daha geniş, oval, subterminal yerleşimli spora sahiptir. Spor nadir olarak terminal yerleşim göstermektedir. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanır ancak eski kültürlerde bazen gram negatif görülebilmektedirler (Kıyan, 1999). Katı besiyerlerinden hazırlanmış olan preparatlarda filamantöz şekilde dokudan hazırlanmış olan preparatlarda tek tek veya kısa zincirler halinde görülürler. Eninden geniş olan sporlar nedeniyle bakterinin şekli bozulmakta ve sporlar bakteriye adeta raket görünümünü kazandırmaktadır (Şekil 2.1) (Burnham ve Carroll, 2013).



Şekil 2. 1. Gram boyalı preparatta izlenen *C. difficile* basillerinin görünümü

(<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Clostridium.htm>.

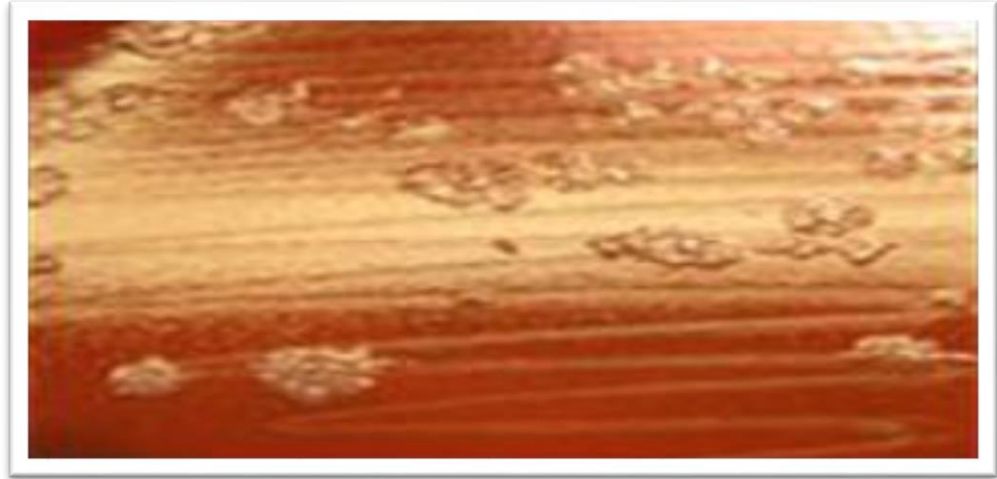
Erişim tarihi: 02/12/2015).

2.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Zorunlu anaerob bir bakteri olan *C. difficile*, basit besiyerlerinde üreyebilir ancak; içinde kan, früktoz ve yumurta bulunan besiyerlerinde daha kolay ürer. Dışkı gibi kontamine örneklerden bakterinin izole edilmesinde içinde çeşitli antimikrobiyal ajanlar bulunan “Cycloserine-Mannitol Agar (CMA)”, “Cycloserine-Mannitol Kanlı

Agar (CMBA)”, “Cycloserine-Cefoxitine-Fructose Agar (CCFA)” gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Optimal üreme sıcaklığı 37°C olup pH 7-7,2’de iyi ürer.

Uygun besiyerlerinde 48 saat anaerobik şartlarda inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında S veya R tipi koloniler oluşturmaktadır. Koyun ve insan kanı içeren besiyerlerinde hemoliz oluşturmazken at kanında nadiren hemoliz oluşturur (Brazier ve ark., 2002). İndikatörlü (nötral kırmızısı içeren) CCFA besiyerinde; 48 saatlik inkübasyondan sonra oluşan *C. difficile* kolonileri, 360 nm’lik ultraviyole (UV) ışığı altında incelendiğinde açık yeşilden sarıya kadar değişebilen renkte bir halka ile çevrili, 3 mm veya daha büyük çaplı, filamentöz kenarlı olup buzlu cam görünümündedir (Kachrimanidou ve Malisiova, 2011).



Şekil 2. 2. *C. difficile* koloni morfolojisi

(<http://www.wales.nhs.uk/sites3/page.cfm?orgid=379&pid=13577>. Erişim tarihi: 02/12/2015).

C. difficile’nin antibiyotikle ilişkili ishale neden olduğunun anlaşılmasından sonra çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunu arttırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Dışkının 70-80 °C’lik su banyosunda 20 dakika tutulmasının veya örneğin 1:1 oranında saf etil alkol ile karıştırılmasından sonra oda sıcaklığında en az 45 dakika bekletilmesinin kontaminant çoğu bakteriyi öldürdüğü

ve *C. difficile* izolasyonunu önemli derecede arttırdığı saptanmıştır (Balaban ve ark., 2001; Carson ve ark., 2013). Sodyum taurokolatın *C. difficile* sporlarının vejetatif forma geçmesini kolaylaştırdığı ve CCFA besiyerine %0,1-0,2 oranında saf sodyum taurokolat eklenmesinin özellikle de çevresel kaynaklardan alınan örneklerdeki az sayıdaki *C. difficile*'nin saptanmasında faydalı olduğu bildirilmiştir (Foster ve Riley, 2012).

Tirozinli besiyerinde üretildiğinde tirozini metabolize ederek L-tirozin'den p-krezol açığa çıkarırlar. Sonuç olarak besiyerinde spesifik krezol kokusu (at veya fil gübresine benzer) oluştururlar (Koneman, 2006). *C. difficile*, %2 nişastalı sıvı besiyerinde anaerob atmosferde spor oluşturur. Sporların varlığı bu besiyerinin 80 °C'de 20 dakika tutulmasından sonra kanlı agara pasaj yapıp anaerob atmosferde, 37 °, 24 saat süre ile inkübe edilmesi sonucu bakterilerin üremesi ile gösterilmektedir (Ciarán ve ark., 2008).

C. difficile katalaz, üreaz, lesitinaz ve lipaz aktivitesi göstermez. Bazı suşlar jelatini ve eskülünü hidrolize eder. Hidrojen sülfür (H₂S) ve indol oluşturmaz. Çoğu köken glukoz, manitol, mellibioz ve melesitozu asit oluşturarak fermente ederken, bazı suşlar salisin, ksiloz, sorbitol ve trehaloza da etki edebilir. Laktoz, sükroz, maltoz, arabinoz, glisin, rafinoz, ramnoz üzerine etkisi yoktur (Koneman, 2006).

2.4. Virülans Özellikleri

2.4.1. Spor Oluşturma Yeteneği

C. difficile uygun olmayan koşullar altında spor oluşturmaktadır. *C. difficile*'nin vejetatif şekilleri ısı, eter ve alkol gibi fiziksel ve kimyasal etkenlere dayanıksız oldukları halde sporları oldukça dirençlidir ve oda sıcaklığında tutulan kontamine materyalde enfeksiyöz özelliğini yaklaşık olarak 5 ay korumaktadır. Sporlar enfeksiyöz olup hastalığın geçişinde önemli role sahiptir (Awad ve ark., 2014).

2.4.2. Flajella

Flajella konak invazyonu ve kolonizasyon için gerekli olan önemli bir virulans faktörüdür. En iyi karakterize edilen iki *C. difficile* flajellar proteini, major flajellin yapısal monomer olan FliC ve FliD'dir. Flajella oluşumu ayrıca biyofilm üretimi ile de ilişkilendirilmektedir (Awad ve ark., 2014).

2.4.3. Fibronektin Bağlayıcı Protein

C. difficile, 68 kDa'luk manganez bağlayıcı bir protein olan fibronektin bağlayıcı protein (Fbp68) üretir. İn-vitro olarak yapılan çalışmalar Fbp68'in fibronektin, fibrinojen ve vitronektini içeren ekstraselüler hücre matris proteinlerine bağlanmakta rol oynadığını göstermiştir (Hennequin ve ark., 2003).

2.4.4. Fimbria (Pilus)

Bazı *C. difficile* suşları fimbriaya sahipken diğerleri değildir. Saptandıklarında 4-9 nm çapında ve 6 µm uzunlukta olup polar orijinlidirler. Yapılan bir çalışmaya göre fimbria içermeyen suşların da *C. difficile* enfeksiyonu oluşturması nedeniyle bu mikroorganizmanın patogenezinde fimbria oluşumunun önemli olamayabileceği düşünülmüştür (Taha ve ark., 2007).

Tip IV pili hücre yüzeyinde üretilmekte ve konak kolonizasyonu ile *C. difficile* hastalık patogenezinde önemli rol oynamaktadır. T4P genlerinin (*pilA1* ve *pilB1*) inaktivasyonu pilus formasyonunu bozmakta ve hücre agregasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (Bordeleau ve ark., 2015).

2.4.5. Toksin üretimi

Bakterinin en önemli virülans faktörü toksin üretme yeteneğidir. *C. difficile* tarafından salgılanan toksinler ile kolera toksini ve *E.coli*'nin ısıya duyarlı enterotoksini gibi diğer bakteriyel toksinler arasında bazı ortak özellikler söz

konusudur. Kolera ve *C. difficile* toksinleri için ana hedef, konak hücrelerdeki mikroflamanlardır ancak fonksiyonel ve yapısal önemli değişiklikler söz konusudur (Kelly ve ark., 1994). Antibiyotiğe bağlı ishal patogenezinde rol oynayan toksijenik suşlarda, klinik tabloda sorumlu, protein yapısında iki tip toksin belirlenmiştir (Carter ve ark., 2010): Toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB).

TcdA ve TcdB; patojenik lokus (*PaLoc*) olarak isimlendirilen genom bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır. Bu bölge, TcdA ve TcdB'nin sentez ve düzenlenmesini sağlayan *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olmak üzere beş gen içermektedir. Patojenik olmayan *C. difficile* izolatları ise patojenik lokus gen bölgesine sahip değildir (Johnson, 2009). TcdA'nın molekül ağırlığı 308 kDa, TcdB'ninkini ise 270 kDa olarak belirlenmiştir (Barrasso ve ark., 1990). Yapılan dizi analizi çalışmaları TcdA ve TcdB arasında yapısal bakımdan %63 oranında benzerlik olduğunu ancak aminoasit dizilimi açısından önemli farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur (Chaves-Olarte ve ark., 1997). Hem TcdA hem de TcdB'nin C-terminal uçlarında yer alan 21-50 aminoasit uzunluğundaki tekrarlayıcı yapıların, bu moleküllere immünodominant özellik kazandırdığı, ligand domeni olarak işlev gördüğü, konak hücre yüzeyindeki toksin bağlayıcı molekülleri tanıdığı ve toksinlerin değişik hücre içi aktivitelerden sorumlu olduğu görüşü öne sürülmüştür (Chaves-Olarte ve ark., 1997). İki toksin arasında yüksek derecede benzerlik olmasına rağmen TcdA veya TcdB'ye karşı elde edilen antitoksinlerin özgül olduğu ve aralarında çapraz reaksiyonlar görülmediği bulunmuştur (Von Eichel-Streiber ve ark., 1992). Her iki toksin de potansiyel sitotoksik aktivite gösterir ve hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive eder (Johnson, 2009). Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekreteruar tipte ishal oluşmasına yol açmaktadır (Johnson, 2009).

Toksin üretiliminin regülasyonunda iki önemli protein bulunmaktadır; TcdR'nin toksin gen ekspresyonunda önemli bir alternatif sigma faktörü olduğu, TcdC'nin ise negatif bir düzenleyici olduğu belirtilmiştir. TcdC, gen ekspresyonu için gerekli olan kor RNA polimeraz ile TcdR arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini göstermektedir. Bu nedenle TcdC anti-sigma faktör olarak bilinmektedir.

TcdE'nin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerden toksin salınımında etkili olduğu düşünülmektedir (Lyras ve ark., 2009).

Hipervirülen izolatlar, TcdA ve TcdB haricinde, aktine özgül bir ADP riboziltransferaz olan "binary" toksin (CDT) isimli üçüncü bir toksin üretmektedirler (Johnson ve ark., 2009). Bu toksin, PaLoc dışında CdtLoc olarak isimlendirilen CDT lokus bölgesinde bulunan *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanmaktadır. *cdtA*, toksinin enzimatik komponentini (CDTa), *cdtB* ise toksinin bağlanma komponentini (CDTb) kodlamaktadır (Carter ve ark., 2007). Hastalık oluşumunda bu toksinin rolü henüz tam olarak anlaşılmış değildir. Çalışmalar, "binary" toksinin kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerinin dış yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermektedir. Bu bulgular "binary" toksinin daha şiddetli hastalık oluşumunda önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu düşündürmektedir (Johnson, 2009).

2.4.5.1. Toksin A (TcdA)

Enterotoksisite, sitotoksisite, tavşan eritrositlerinde hemaglutinasyon gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Hücre yüzeyindeki karbonhidrat yapısındaki özgül reseptörlere bağlanabilmektedir (Kuehne ve ark., 2010). Enterosit yüzeyindeki reseptörlerin yenidoğanlardaki toksin bağlama kapasiteleri çok düşüktür. Hayatın ilk üç haftasında yapısal olgunluğa erişmekte ve bebek 30-40 günlük olduğunda toksin bağlama kapasitesi erişkinlerdeki düzeye gelmektedir (Cerquetti ve ark., 1995). Bu durum sağlıklı yenidoğanlarda toksijenik *C. difficile* suşlarının sık olarak izole edilmesine rağmen hastalığın görülmemesini açıklamaktadır. *C. difficile*'nin yenidoğanların normal bağırsak florasının bir üyesi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Kelly ve ark., 1994).

Toksin A hemen hemen tüm hücre tipleri için toksiktir. PME'nin ilk semptomu olan ve bağırsak mukoza hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu oluşan diyarenin sorumlusu büyük olasılıkla TcdA'dır (Kuehne ve ark., 2010). Bu toksinin enterositleri direkt olarak etkilemediği, enterositlerin altındaki mikrovaskülariteye sahip endotel tabakasına ulaşarak kemotaktik etkiyle bölgeye polimorf nüveli

lökositlerin (PNL) göçünü uyardığı ve PNL'ler tarafından oluşturulan lipooksijenaz ürünlerinin klor sekresyonunu uyarması sonucu bunların sekonder doku hasarına neden olduğu öne sürülmüştür (Kuehne ve ark., 2010). Toksin, inflamasyon bölgesine göç eden PNL'leri yok edebilmektedir. TcdA mukoza hücrelerini doğrudan öldürebildiği gibi monosit, PNL ve makrofaj gibi sitokin üreten hücrelere bağlanarak antijenik stimülasyon sonucunda bu hücrelerin çözünür mediatör salgılaması sonuculokal doku hasarına da neden olabilir. TcdA insan kan grubu antijenleri olan I, X, Y içeren birçok farklı reseptörlere de bağlanabilmektedir. X antijenleri PNL'lerin yüzeyinde bol miktardadır (Kuehne ve ark., 2010).

2.4.5.2. Toksin B (TcdB)

Primer olarak sitotoksiteden sorumlu olup sitotoksik etkisi toksin A'ya kıyasla 1000 kat daha fazladır (Chaves-Olarte ve ark., 1997). Toksinin sitotoksik etkisi, hücre iskeletinin bozulması sonucu hücrenin yuvarlaklaşması ile sonuçlanan filamentöz aktin depolimerizasyonu ile olmaktadır. TcdB'nin aktin polimerizasyonunda rol alan proteinler üzerine dolaylı bir etkisinin de olabileceği düşünülmektedir (Carter ve ark., 2010).

Toksin A ve B kompleks bir etkiye sahip olup, iyon dengesiyle birlikte hücre morfolojisini değiştirmektedir (Carter ve ark., 2012). TcdB'nin değişik tip bağırsak hücrelerinde protein sentezini inhibe ettiği saptanmıştır (Pothoulakis ve ark., 1986). Daha sonra bu etkinin sadece bağırsak hücrelerinde değil, inflamasyonda önemli rol oynayan fagositik hücrelerde de görüldüğü ancak mononükleer hücrelerin canlı kaldığı belirtilmiştir (Siffert ve ark., 1993).

Yapılan çalışmalara göre toksin A yokluğunda toksin B'nin karakteristik *C. difficile* semptomlarını oluşturduğu gözlenmiştir. Toksin B de toksin A gibi güçlü bir enterotoksin olarak gösterilmiştir. Toksin B ciddi intestinal epitel hasarı, artmış mukozal geçirgenlik, artmış nötrofil birikimi ve doku hasarı ile birlikte inflamatuvar bir yanıt ile karakterizedir (Savidge ve ark., 2003).

2.4.5.3.“Binary” Toksin (CdtA ve CdtB):

1987 yılında bazı *C. difficile* suşları tarafından üçüncü bir toksin olan “binary” toksinin üretildiği bildirilmiştir (Popoff ve ark., 1988). 2000’li yıllardan itibaren bu toksini salgılayan suşlar özellikle yaygın hale gelmiştir (McDonald ve ark., 2005). Toksinin bağlanma aktivitesinden sorumlu olan CdtB ve enzimatik aktiviteden sorumlu olan CdtA’yı kodlayan genlerin 1997 yılında dizi analizi gerçekleştirilmiştir (Perelle ve ark., 1997). Ardından geni barındıran 6,2 kb’lık bir bölge identifiye edilmiştir ve “*cdt* lokus” veya “*CdtLoc*” olarak adlandırılmıştır (Carter ve ark., 2007). Bu bölge her iki toksin genini de içermektedir ve aynı zamanda adenozin difosfat (ADP) ribozile edici toksin ailesine ait regülatör proteini de kodlamaktadır. Bu toksin ailesinin diğer üyeleri *Clostridium botulinum* C2 toksin, *Clostridium perfringens* iyota toksin, *Clostridium spiroforme* toksin ve *Bacillus cereus* vejetatif proteinleridir (Barth ve ark., 2004). CdtA biyolojik olarak aktif ve “ADP ribozil transferaz” aktivitesine sahipken CdtB konak hücrelere bağlanmaktan ve sitozole enzimatik komponentin translokasyonundan sorumludur. Çalışmalar, “binary” toksinin kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerinin dış yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. Bu bulgular “binary” toksinin daha şiddetli hastalık oluşturmasında önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu ayrıca rekürren hastalıklarda rol oynadığı düşündürmüştür (Johnson, 2009). Çeşitli klinik çalışmalar, artmış mortalite ile ilişkisini ortaya çıkarmıştır ancak daha ileri analizlere gereksinim vardır (Johnson, 2009).

2.5. Patogenez

C. difficile’nin patogenezinde ilk adım normal intestinal floranın bozulmasıdır. *C. difficile*’ye karşı korumada bağırsak florası kolonizasyon bariyeri olarak rol almaktadır (Bartlett, 2006). *C. difficile* sporları ile endojen veya ekzojen kontaminasyonun ardından sporlar jermine olmakta ve vejetatif *C. difficile* formları çoğalmaktadır (Johnson, 2009).

C. difficile spor formunda konağa girdikten sonra aside dirençli olduğu için mideyi geçer ve ince bağırsağa gelir. Burada jermineasyon süreci başlar ve metabolik

olarak aktif form olan vejetatif hücre formuna geçer. Çeşitli yüzey yapıları ve adhezinleri ile özellikle de anaerobik çevrenin daha uygun olduğu inen kolon epitelyum hücrelerine tutunur ve konak hasarı ve hastalığa neden olur (Johnson, 2009).

Kolonizasyondan sonra ikinci adım *C. difficile* enfeksiyonlarında temel virulans faktörleri olan geniş klostridial sitotoksin ailesinin iki üyesi olan TcdA (enterotoksin) ve TcdB (sitotoksin) salgılanmasıdır. Her iki toksin de potansiyel sitotoksik aktivite gösterir ve hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive eder (Johnson, 2009). Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekretuar tipte ishal oluşmasına yol açmaktadırlar (Johnson, 2009).

Toksin A, insan intestinal epitel hücrelerinden interlökin-6 (IL-6) ve IL-8; insan monositlerinden IL-1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımından sorumludur (Sun ve ark, 2009). Bununla birlikte TcdB sitotoksik etkiler gösterir ve virülans için esansiyel rol oynamaktadır (Kuehne ve ark., 2014). Önceki çalışmalarda TcdA'nın *C. difficile* enfeksiyonu oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmekteyken, yapılan deneysel hayvan çalışmalarında TcdA negatif ve TcdB pozitif *C. difficile* izolatlarının da ciddi bir hastalık tablosu meydana getirdikleri görülmüştür (Johnson, 2009). Bu çalışmalar, TcdB'nin TcdA gibi enterotoksin etkisi gösterdiğini ve hastalık oluşumunda esas faktör olduğunu düşündürmüştür (Johnson, 2009).

C. difficile ile karşılaşma neticesinde naif B hücrelerin immunglobulin (Ig) sentezleyen plazma hücreleri ve spesifik hafıza B hücrelerine matürasyonunu sağlayan IL-10 ve IL-4 gibi spesifik sitokinler salgınmaktadır (Ryan ve ark., 2011). Bu olay yenidoğan döneminde gerçekleşir ve sağlıklı erişkinlerin %50-70'i *C. difficile* toksinlerine karşı serumlarında saptanabilir düzeyde IgG ve IgA antikorları taşır (Sanchez-Hurtado ve ark., 2008). Kolonizasyon sırasında *C. difficile* toksinleri ve yüzey proteinlerine karşı yüksek IgG yanıtı *C. difficile* enfeksiyonu gelişimine karşı koruyucudur (Pechine ve ark., 2005). Ancak, komorbidite ve ağır veya sistemik *C. difficile* enfeksiyonu enfeksiyonuna sahip hastalarda benzer antikor düzeylerine

rastlanması bu korunmanın kesin olmadığını ortaya koymaktadır. Sonuçta konak faktörleri immün korumada ayrıca öneme sahiptir ve kolonizasyonun sonuçlarını öngörmeye önemlidir (Kyne ve ark., 2000).

2.6. Risk Faktörleri

C. difficile enfeksiyonu gelişiminde hastanede yatış, ileri yaş ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörleridir. Özellikle klindamisin, geniş spektrumlu sefalosporin veya florokinolon grubu antibiyotiklerin kullanılması bunların içinde en önemli risk faktörü olarak bilinmektedir (Simor, 2010). Retrospektif bir çalışmada 1364 *C. difficile* enfeksiyonu hastasının tanı almadan önceki iki ay içinde bir sefalosporin türevi aldıkları gözlenmiştir (Pepin ve ark., 2004). Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer fakültatif anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmakta ve baskın hale geçen *C. difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksin salgılamaktadır (Leclair ve ark., 2010). Aztreonam gibi kolon florasındaki mikroorganizmaları etkilemeyen antibiyotiklerin kullanılması *C. difficile* enfeksiyonu için risk teşkil etmemektedir. Piperasilin-tazobaktam gibi antibiyotikler ise çoğu *C. difficile*'ye karşı etkili olduklarından daha az sıklıkla antibiyotik ile ilişkili ishale yol açmaktadır (Bilgehan, 2009).

İleri yaş (≥ 65 y) *C. difficile* enfeksiyonu için önemli risk faktörlerinden biridir. Bu durumun genel olarak yaşlılıkla birlikte toksinlere karşı bağışık sistemde zayıflamaya bağlı geliştiği düşünülmektedir. Altta yatan hastalıklar ve uzamış hospitalizasyon özellikle yaşlıları duyarlı kılmaktadır ve bu tip hastalarda kolonizasyon oranları %73'e ulaşmaktadır (Bilgehan, 2009). Hastanede bir hafta yatan hastalarda *C. difficile* ile kolonize olma oranı %15 iken, üç hafta kalan hastalarda bu oran %45'e yükselmektedir (Leclair ve ark., 2010).

Bu risk faktörlerinin dışında, proton pompa inhibitörü kullanılması, immünsüpresyon, tüp ile beslenme, inflamatuvar bağırsak sendromu, kronik karaciğer hastalığı ve son dönem böbrek yetmezliği de *C. difficile* enfeksiyonu gelişimi için risk faktörlerindedir (McCollum ve ark., 2012). Metotreksat gibi immünsüpresif ilaçların kullanılması da *C. difficile* enfeksiyonu gelişimi ile ilişkili

bulunmuştur (Keven ve ark., 2004). İmmünsüpresif ilaç alan hastalar debilize hale gelmektedir ve sonuçta TcdA'ya karşı etkin bir IgG antikor yanıtı oluşmamaktadır (Kyne ve ark., 2001). *C. difficile* sporları gastrik aside dirençlidir. Proton pompa inhibitörlerinin *C. difficile* enfeksiyonu gelişimine nasıl yol açtığı hususunda net bir görüş olmamakla birlikte gastrik asit baskılayıcı ajanların gastrik pH'yı artırarak *C. difficile*'ye karşı kolonizasyon bariyerini azaltabildiği düşünülmektedir (Dial ve ark., 2005).

2.7. Klinik Özellikler

Antibiyotik tedavisi esnasında veya tedavi sonlandıktan sonraki sekiz hafta içinde antibiyotik ile ilişkili ishal semptomları oluşabilmektedir (Koneman, 2006). Hastalık asemptomatik kolonizasyondan, orta derece ishal, fulminant kolit ve hatta ölüme kadar giden klinik tablolar ile ortaya çıkabilmektedir (Barnett, 2012).

2.7.1. Asemptomatik Kolonizasyon

Asemptomatik kolonizasyonda kolon *C. difficile* ile kolonizedir, ancak ishal gibi klinik bulgular meydana gelmemektedir. Yapılan kültürde toksin pozitif *C. difficile* üremesi olmaktadır. Özellikle hastanelerin yüksek riskli bölümlerinde yatan ve antibiyotik alan hastaların %10-16'sı *C. difficile* ile kolonize olabilmektedir (Bignardi, 1998).

2.7.2. *C. difficile* İshali

Sıklıkla karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette ishal görülmektedir. Halsizlik ve ateş nadir de olsa görülebilmektedir. Antibiyotik tedavisi esnasında, kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra oluşmaktadır. En önemli laboratuvar bulguları hipalbuminemi ve lökositozdur (Bignardi, 1998).

2.7.3. *C. difficile* Koliti

Psödomembranöz olmasa da klinik ciddi seyredabilmektedir. Hastalarda hafif ve orta şiddette karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık ve sulu ishal mevcuttur. Sigmoidoskopide özgül olmayan yaygın veya yama tarzında psödomembransız eritematoz kolit tablosu görülebilmektedir (Bignardi, 1998).

2.7.4. Psödomembranöz Enterokolit

C. difficile kolitinin klasik tipi olarak bilinmektedir. *C. difficile* kolitinden daha ağır seyreder; hastalarda şiddetli ishal ile birlikte sağ veya sol alt kadranda yoğun bir rahatsızlık hissi mevcuttur. Hastaların endoskopik muayenelerinde genellikle kolon proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı şeklinde ve kolorektal mukoza boyunca psödomembran dağılımları görülebilmektedir (Şekil 2.3). Laboratuvar bulgusu olarak lökosit sayısı 20.000/mm³ üzerinde, albumin seviyesi ise 3,0 g/dl veya daha az olarak görülmektedir (Vaishnavi, 2010).



Şekil 2. 3. Psödomembranöz enterokolit

(<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4166/kjg.2010.56.6.387&vmode=PU>
BREADER.Erişim tarihi: 02/12/2015)

2.7.5. Fulminant *C. difficile* Enfeksiyonu

Bu tablo ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüm gibi ciddi komplikasyonla seyredabilmekte ve *C. difficile* enfeksiyonu olan hastaların %2-3'ünde görülebilmektedir (McCollum ve Rodriguez, 2012). Hastalar birkaç saat gibi kısa bir zaman içinde veya haftalar içinde fulminant *C. difficile* enfeksiyonu tablosuna girebilir. Burada hastanın yaşı, altta yatan başka hastalıkları, bağışıklık sisteminin durumu ve bakterinin toksin sentezleme yeteneği etkili olmaktadır. Hastalarda ishal, alt kadran veya yaygın karın ağrısı ile birlikte şişkinlik mevcuttur. Bazı hastalarda yüksek ateş, üşüme ve titreme belirtileri görülebilmektedir. Zayıf prognozlu hastalarda peritonit belirtisi olabilecek şiddetli karın ağrısı veya 50.000/mm³ üzerinde lökosit seviyesi veya 5 mmol/l üzerinde laktat seviyesi mevcuttur. Hastalığın kontrol altına alınmasında erken tanı ve tedavi büyük önem arz etmektedir (Bignardi, 1998).

2.7.6. Rekürren *C. difficile* enfeksiyonu

Metronidazol veya vankomisin ile tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkması, rekürren *C. difficile* enfeksiyonu olarak isimlendirilir. *C. difficile* enfeksiyonu olan hastaların %20'sinde nüks görülmektedir. Birinci nüksten sonra olguların %40'ında ikinci, ikinci nüks oluşan hastaların %60'ında üçüncü nüks meydana gelmektedir. Nüks olguları, orijinal köken veya farklı kökenler ile ortaya çıkabilmektedir (McCollum ve Rodriguez, 2012). Antiasit kullanılması, antibiyotik kullanmaya devam etme ve ileri yaş, rekürren *C. difficile* enfeksiyonu gelişiminde risk faktörü olarak bilinmektedir (McCollum ve Rodriguez, 2012).

2.7.7. Kolon Dışı Belirtiler

C. difficile enfeksiyonlarında kolon dışında dolaşım sistemi enfeksiyonu, yara ve eklem enfeksiyonu gibi klinik tablolar da meydana gelebilmektedir. Ayrıca irritabl

barsak hastalığı ve reaktif artrit gibi reaktif veya postenfeksiyöz sendromlar oluşmaktadır (Bignardi, 1998).

2.8. Epidemiyoloji

Son yıllarda *C. difficile* enfeksiyonu; ABD, Kanada ve çoğu Avrupa ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Miller ve ark., 2010). Bakteri %2-3 oranında sağlıklı kişilerin, %40-60 oranında da hastanede doğmuş olan yenidoğanların kolon florasında metabolik inaktif spor formunda bulunmaktadır. İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabilmektedir (Kuijpers ve ark., 2008). 2000'li yılların başlarında *C. difficile* enfeksiyonu epidemiyolojisi dramatik olarak değişmiştir. Hastalığın sadece insidansı değil, şiddeti de artmıştır. Kanada'da 1991 ile 2003 yılları arasında *C. difficile* enfeksiyonu insidansı her 100.000 kişide 35,6 olgudan 156,3 olguya çıkmıştır. Kasım 2004 ile Nisan 2005 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışmada insidansın her 1000 hastada 4.6 olgu olduğu bildirilmiştir (Gravel ve ark., 2009). ABD'de de aynı şekilde artan bir *C. difficile* enfeksiyonu insidans ve hastalık şiddeti bildirilmiştir. Bu oranlar 1996 ile 2003 yılları arasında neredeyse iki katına çıkmıştır (Freeman ve ark., 2010). Hem Kanada hem de ABD'de epidemik izolat olarak bilinen ribotip 027 en sık izole edilen ribotip olmuştur. Ribotip 027 diğer izolatlardan 16-23 kat daha fazla TcdA ve B salgılamaktadır ve üçüncü toksin olan "binary" toksin üretmektedir. Şu ana kadar A.B.D'nin 40 eyaletinden ve Kanada'dan ribotip 027 nedeni olgular ve salgınlar bildirilmiştir (Freeman ve ark., 2010). Ribotip 027 haricinde ABD'de ribotip 106 ile oluşan *C. difficile* enfeksiyonu ve salgınları da artan sıklıkta bildirilmeye başlanmıştır (Ananthakrishnan, 2011).

2005 yılında Avrupa *C. difficile* Çalışma Grubu tarafından 14 ülke ve 38 hastanenin katılımı ile, ishal olan ve toksijenik kültür sonucu pozitif olan hastaların yer aldığı bir çalışma yapılmıştır. On dört ülke arasında 10.000 hastada *C. difficile* enfeksiyonu insidansının 0,13 ile 7,1 olgu arasında değiştiği ve ortalama insidansın her 10.000 hastada 2,45 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 354 toksijenik *C. difficile* izolatu tanımlanmış, bu izolatların 66 farklı ribotipe sahip olduğu ve %6'sını ribotip 027'nin oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada ülkeler arasında da farklı ribotiplerin yaygın olduğu saptanmıştır. Almanya'da 168 ve 001, İngiltere'de 077,

Fransa'da 014, İrlanda'da 017 ve 156, Hollanda'da 027, İtalya'da 020, Polonya'da 017, İspanya'da 001, İsviçre'de 002 en yaygın izole edilen ribotipler olmuştur. Türkiye'de izole edilen sekiz izolat ribotip 001 olarak bildirilmiştir (Barbut ve ark., 2007). 2007 yılında yapılan bir araştırmada, 11 Avrupa Birliği ülkesi ve İsviçre'de 027 ribotipinin en sık ribotip olduğu ve ribotip 027 prevalansının ülkeler arasında %11-100 arasında değiştiği vurgulanmıştır (Kuijper ve ark., 2007). *C. difficile* 027, 16 Avrupa ülkesinde salgınlara, Danimarka, İsveç, Norveç, Polonya, Macaristan, Avusturya ve İspanya gibi ülkelerde ise sporadik olgulara yol açmıştır (Freeman ve ark., 2010). 2008 yılında 34 Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan çalışmada *C. difficile* enfeksiyonu insidansının ortalama her 10.000 hasta gününde 4,1 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 65 farklı ribotip bulunmuş ve en sık olarak ribotip 014/020 (%16), 001 (%9), 078(%8) ve 027 (%5) izole edilmiştir (Bauer ve ark., 2011). Son dönemlerde ribotip 027 Avusturalya, Singapur, Hong Kong, Kore, Japonya ve Kosta Rika'dan bildirilmiştir (Tschudin-Sutter ve ark., 2012). Diğer bazı ülkelerde de farklı ribotipler yaygın olarak bildirilmiştir. Kore'de yapılan çalışmada ribotip 018 (%26.4), İran'da ribotip 078 (%21), Hong Kong'da ribotip 002 (%10,1) en sık olarak bildirilen ribotipler olmuştur (Kim ve ark., 2013; Jalali ve ark., 2012; Cheng ve ark., 2011).

Hastane kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra toplum kaynaklı *C. difficile* tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır. ABD'de her yıl 100.000 kişide 6,9 ile 46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu tespit edilmektedir. Retrospektif bir çalışmada Kuzey Carolina'da toplum kaynaklı *C. difficile* oranının 2005 yılında %20 olarak tahmin edildiği ve bu oranın Avrupa ve Kanada'da benzer olduğu bildirilmiştir (O'Donoghue ve ark., 2011).

Türkiye'de *C. difficile* enfeksiyonu ile ilişkili durumun halen bir sorun olup olmadığı konusunda yeterli bilgi yoktur. Çünkü iyi planlanmış çok merkezli bir çalışma henüz yapılmamıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada hastane kökenli ishallerin %43'ünde etken olarak *C. difficile*'yi saptanırken, *C. difficile* enfeksiyonu insidansı 1000 hasta gününde 0,6 olarak bildirilmiştir (Ergen ve ark., 2009). Cerrahpaşa Üniversitesinde 16 aylık periyotta nozokomial ishalleri 226 hastanın incelenmesinde *C. difficile* TcdA veya B pozitiflik oranını %5,5 olarak tespit edilmiştir (Aygün ve ark., 2005). Marmara Üniversitesi'nde 18 aylık periyotta

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 saptanmıştır (Deniz ve ark., 2011). Uludağ Üniversitesinde üç yıllık periyotta 87 olguda (%4,8) toksin pozitif bulunmuş ve toksin pozitif olgu sayısının yıllara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Olguların %77'sinin yatan hastalar olduğu ve yatan hastalarda pozitifliğin %5,4 olduğu tespit edilmiştir. *C. difficile*'ye bağlı ishal insidansı, 1000 hastanede yatış günü için 0,07 ve 1000 hasta kabulü için 0,5 olarak saptanmıştır (Ayarıcı ve ark., 2012).

2.9. Tanı

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonu olanların kontrol altına alınmasında ve hasta takibinde önemlidir. *C. difficile* enfeksiyonu tanısı, klinik özellikler ve laboratuvar testleri ile konmaktadır. Sadece TcdA ve/veya TcdB üreten izolatların da hastalık yapma yeteneğinin olması nedeniyle dışkı örneklerinden toksinlerin tespit edilmesi tanıda önemli bir kriterdir. Hastanede antibiyotik ile ilişkili ishal gelişen hastaların yaklaşık %30'unda neden CDE olduğu için eğer uygun tanı testleri varsa, tanı testi yapmadan ampirik tedavi uygulanması uygun değildir (Cohen ve ark, 2010). Hastalarda iki gün içinde günde üç şekilsiz ishal olması klinisyenlere *C. difficile* enfeksiyonu varlığını düşündürmelidir (Gerding, 1995).

Hücre kültürü sitotoksisite yöntemi ve toksijenik kültür *C. difficile* enfeksiyonu tanısında referans yöntemlerdir. Ancak her iki yöntem de uzun zaman almakta, uzman teknik personel ve özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Bu nedenle de çoğu laboratuvar, duyarlılığı düşük olmasına rağmen bunların yerine glutamat dehidrojenaz (GDH) ve toksinleri tespit eden enzim temelli immunolojik yöntemleri tercih etmektedir. Son dönemlerde ise direkt olarak klinik örnekten etkeni tanımlayan gerçek zamanlı PZR yöntemleri geliştirilmiş durumdadır (Crobach ve ark., 2009).

2.9.1. Endoskopik İnceleme

İnvaziv, pahalı ve uzman gerektiren bir yöntemdir. Endoskopik incelemede eritemli, ödemli, ciddi inflamasyonlu zeminde, özgül psödomembranlar görülür. Yüzeiden kabarık 2-10 mm çapında normal mukoza ile çevrili lezyonlar tipiktir; ciddi olgularda lezyonlar plaklar oluşturmak üzere birleşir. Histopatolojik incelemede plakların fibrin, mukus, nekrotik epitel hücreleri ve lökositlerden oluştuğu görülmektedir. Daha hafif seyirli olgularda plak oluşumu görülmez; sadece yaygın mikroskobik kolit saptanmaktadır (Bartlett, 2002). Genellikle distal kolon tutulduğundan olguların çoğunda (%65-70) sigmoidoskopi yeterli olmaktadır. Olguların 1/3'ünde lezyonlar sağ kolonda yerleşir, bu durumda kolonoskopi uygulanması gerekmektedir (Bartlett, 2004).

2.9.2. Radyolojik İncelemeler

Direkt radyolojik incelemeler genelde özgül olmayan bulgular vermektedir. Kolutlu olgularda direkt grafide distansiyonla birlikte belirgin ödem ve haustraların görüntüsünün bozulmuş olduğu saptanmaktadır (Bartlett, 2002). Kontrastlı kolon grafisinde aşırı mukus salınımından dolayı tanısall bulgu genelde elde edilemez; bazı olgularda plaklara bağlı yuvarlak dolma defektleri görülebilir. Hava kontrastlı çalışmalar daha fazla bulgu verir ama perforasyon riski nedeniyle tercih edilmemektedir (Kirkpatrick ve ark., 2001). Bilgisayarlı tomografide (BT)'de kolonla sınırlı değişiklikler saptanmaktadır. Kolonda 4 mm'den fazla kalınlaşma, kolon duvarında nodüler haustral kalınlaşma (akordiyon bulgusu), başka bir nedenle izah edilemeyen batın içi sıvı BT ile rastlanılan değişikliklerdir. Değişiklikler fokal veya pankolonik olabilir. BT'nin duyarlılığı %52-88, özgüllüğü %48-93, pozitif prediktif değeri %88, negatif prediktif değeri %67 olarak tespit edilmiştir (Kirkpatrick ve ark., 2001; Boland ve ark., 1994).

2.9.3. Laboratuvar Tanı

C. difficile ilişkili ishal seyrinde lökositöz saptanabilir (ortalama 15.000/mm³). Özellikle yaşlı ve düşkün hastalarda ishal aşırı protein kaybına, hipoalbuminemiye, kolesterol ve transferrin düşüklüğüne neden olabilir. Bu hastaların dışkısında alfa-1 antitripsin yüksek düzeydedir (Brazier, 1998). Sekretuar veya kanlı, mukuslu olabilen dışkı makroskopik ve mikroskopik olarak incelenir. Dışkıda anlamlı sayıda lökosit %40-50, laktoferrin pozitifliği %60-80 olguda saptanır; lökosit saptanmasının özgüllüğü %92 düzeyindedir (Manabe ve ark., 1995; Bulusu ve ark., 2000).

C. difficile toksinleri ısıya duyarlı olduğundan toksin tayini yapılacaksa dışkının laboratuvara buz içinde gönderilmesi gereklidir. Laboratuvarda çalışılana dek geçen süre 2-3 gün olacaksa dışkı buzdolabında, daha uzun olacaksa -70°C'lik derin dondurucuda saklanmalıdır; çünkü daha yüksek sıcaklıklarda zamanla toksin azalmaktadır. İshali olmayanlarda yani şekilli dışkıda toksin araştırılması önerilmemektedir (Allen ve ark., 2003; Öztürk, 2004). *C. difficile* tanısında duyarlılıkları farklı olan değişik klinik mikrobiyolojik yöntemler kullanılır: Mikroskopik incelemeler, kültür, sitotoksisite veya immünolojik yöntemlerle TcdA/B aranması, moleküler metotlar, kromotografik teknikler bunlar arasındadır (Spencer, 1998;Wilkins, 2003). Aşağıda bu yöntemler özetlenmiştir, ancak günümüzde en sık kullanılan yöntem immünolojik yöntemlerle dışkıda TcdA/B varlığının araştırılmasıdır.

2.9.3.1. Mikroskopi

Dışkının Gram boyamasında, floranın değiştiğini gösteren baskın Gram pozitif basiller görülebilir; ancak duyarlılık ve özgüllük kısıtlıdır (Brazier, 1998). Direkt floresan antikor yönteminin toksin araştırılan testlerle %92 uyumlu olduğu saptanmış; ancak aynı yöntemle sağlıklı kişilerde de %62 oranında pozitif sonuç bulunmuştur. Yalancı pozitifliğin nedeni florada *C. difficile* ile ortak antijenlere sahip *Clostridium bifermantas/Clostridium sordelii* varlığıdır (Fekety, 1997).

2.9.3.2. Kùltür

Floralı klinik örneklerin at kanlı CCFA besiyerine ekilerek kùltürü yapılır; bu besiyerinin orijinal formülünde önerilen yumurta sarısı yerine günümüzde kan kullanılmaktadır (Delme'e, 2001). Sefoksitin mannitol agar (kanlı/kansız), kullanılabilir diğer bir selektif besiyeridir. Kan katılan sefoksitin mannitol agarda bakteriyi üretme şansı diğer seçeneklere göre en yüksektir. Sefoksitin yerine seçici antibiyotik olarak moksolaktam ve norfloksasin kullanılması daha başarılı bulunmuştur (üreme %20 oranında artmış, kontaminantların üremesi %30 oranında azalmıştır) (Bartlett, 2004).

Selektif besiyerlerine ekimin yanında alkol veya ısı şokuyla spor seleksiyonu tekniği de kullanılmaktadır; eşit miktardaki dışkı ile etanolün bir saat muamelesi sonrasında beyin kalp infüzyon (BHI) agara ekim yapılır. Besiyerine safra tuzları (sodyum kolat ve taurokolat) ilavesi jermantasyonu hızlandırıp, alkol şokuna maruz kalan dışkı ve çevre örneklerinde *C. difficile* üreme oranını arttırmaktadır (Brazier, 1998).

C. difficile, CCFA besiyerinde, materyal ekiminden 24 saat sonra 2 mm çaplı, buzlu cam görüntüsü veren, sarımsı-beyazımsı renkli koloniler oluşturur; bu besiyerinde spor oluşmaz. Kùltürün duyarlılığı yüksektir (%89-100), ancak kökenlerin yaklaşık %25 kadarı toksin yapmamaktadır; bu nedenle üretim sonrasında toksin bakılmadığı durumlarda tek başına kùltürde üreme ile hastalık tanısı için karar verilmemesi gerekmektedir. Ayrıca, kùltürün sonuçları ancak üç-beş gün içinde alınmaktadır, pahalıdır; bu nedenle rutin tanıda yeri yoktur. Kùltür, tiplendirme yapılmak istenen epidemiyolojik çalışmalarda (salgın durumlarında) ve antibiyogram yapılmak istenirse gereklidir (Bartlett, 2004). Besiyerinde üreme sonrasında kolonilerin oluşturduğu özel koku ve 365 nm UV altında yeşil-sarı floresan vermesi, kanlı seçici besiyerinde ileri identifikasyon için önemli kriterlerdir (Kaufman L ve Weaver H., 1960). Somatik lateks aglütinasyon kitleri izole edilen bakterinin identifiye edilmesinde hızlı sonuç verir; ancak *C.bifermentans*, *C.sordellii* ve *Clostridium glycolicum* ile çapraz reaksiyon sorunu dikkate alınmalıdır. Kromotografik analiz de ileri bir tanımlama yöntemidir (Brazier ve ark., 1998 ve Fekety,1997).

Prolinaminopeptidaz varlığını açığa çıkaran disk metodu da ön tanı için önemli katkı sağlamaktadır (Fekety, 1997).

2.9.3.3. Doku Kültürü Sitotoksiste Deneyleri

Doku kültüründe toksin tayini ve *C. difficile* veya *C. sordellii* antitoksinleri ile nötralizasyon işlemi günümüzde tanıda altın standarttır. Yapılan çalışmalarda yöntemin duyarlılığı %67-100, özgüllüğü %85-100 olarak tespit edilmiştir (Brazier, 1998; Fekety, 1997). Değişik hücre kültürleri [Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri; Vero, MRC-5 (insan fetal akciğer fibroblastları), Çin hamsteri ovaryumu hücreleri (CHO), bağırsak fibroblastları, fare adrenal hücreleri vb.] üzerine dışkı filtratının veya üremiş bakteri filtratının eklenmesi ile hücreler üzerine toksinin sitopatik etkisi araştırılmaktadır. Bu yöntemle 10 pg kadar TcdB varlığı saptanabilmektedir. Ticari kiti bulunmakla birlikte yöntemin tam bir standardizasyonu henüz sağlanabilmiş değildir. Antibiyotikle ilişkili ishalde doğrudan dışkı sitotoksin nötralizasyon işleminde %15-38 olguda yalancı negatif sonuç alınmaktadır (Bartlett, 2004).

Sitotoksiste deneyinin yapıldığı hücre tipi ve dışkının sulandırım oranı yöntemin duyarlılığını etkilemektedir (Bartlett,2004;Wilkins ve Lyerly, 2003). Ayrıca, örnek nakli ve saklama esnasında toksinin inaktivasyonu, %20 olguda negatif sonuç alınmasına neden olmaktadır (Bartlett, 2004). Yalancı pozitif sonuçlar antibiyotik kullanmış, ama ishali olmayan olgularda görülür. Ayrıca, iyileşmiş hastalarda da pozitif sonuç alınmaktadır, bu nedenle tedavinin etkinliğini izlemede faydalı değildir. Pahalı olması, yöntemin 24-48 saat inkübasyon gerektirmesi, hücre kültürü yapılmasına ihtiyaç olması ve yorumlamada tecrübeli bir mikrobiyoloğa gereksinim göstermesi testin olumsuz yanlarıdır (Brazier, 1998;Fekety, 1997).

2.9.3.4. İmmüno-kromatografi Testleri

Bu kaset testlerle taze veya dondurulmuş dışkı örneklerinde *C. difficile* Toksin A ve Toksin B varlığı kalitatif olarak tayin edilmektedir. Süzme, filtrasyon ve santrifüj işlemlerini gerektirmemektedir. Bu testlerde konjüгат ile sulandırılan dışkı

örneği kasete damlatılır ve yaklaşık 15-20 dakika içerisinde sonuç alınır. Dışkıda *C. difficile* tanı testlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, testlerin duyarlılık oranları % 87-95,7, özgüllük oranları % 98,7-100, pozitif prediktif değeri % 97,2-100 ve negatif prediktif değeri % 96,3-98,7 oranlarında bulunmuştur (Miendje Deyi ve ark., 2008). Etkenin nozokominal enfeksiyonların önemli bir nedeni olduğu göz önüne alınırsa, bu hızlı tanı testi olguların erken tespiti ile erken tedavi ve bulaşın önlenmesine yönelik önlemlerin alınmasına olanak sağlamaktadır.

2.9.3.5. Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler

İlk kez 1984 yılında *C. difficile* TcdA veya TcdB'yi tespit etmek için kullanılmıştır (Laughon ve ark, 1984). Referans yöntem ile karşılaştırıldıklarında hızlı, teknik olarak kolay ve düşük maliyetli oldukları için ABD'deki laboratuvarların %90'dan fazlasında kullanılmaktadırlar (Cohen ve ark., 2010). EIA ile yapılan çalışmalarda, referans yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığın düşük, özgüllüğün ise duyarlılıktan daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar, EIA testlerinin duyarlılıklarını %31-99, özgüllüklerini %65-100 arasında bildirmektedir (Eastwood ve ark., 2009; Crobach ve ark., 2009; Turgeon ve ark., 2003).

C. difficile toksinleri dışında, hem toksin oluşturan hem de oluşturmayan *C. difficile* suşlarının ürettiği metabolik enzim olan GDH'yı tespit eden EIA testleri de mevcuttur (Garimella ve ark., 2012). Çoğu laboratuvar ilk basamağında GDH testi olan iki basamaklı algoritmayı kullanmaktadır. Bu algoritmada ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise takibinde toksin testi yapılması gerekmektedir. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise, ya hasta toksijenik olmayan bir *C. difficile* taşımakta veya toksin testi yalancı negatif sonuç vermektedir. Her iki test de pozitif ve hasta da semptomatik ise *C. difficile* enfeksiyonu tanısı konulmaktadır (Carroll ve ark., 2011). Şu an piyasada hem GDH, hem de toksini tespit eden ve 30 dakikada sonuç veren "C. Diff Quick Chek Complete (Techlab, ABD)" kiti mevcuttur. 192 dışkı örneği ile yapılan bir çalışmada, C. Diff Quick Chek Complete testinin GDH komponentinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %95,8 ve %89,6, toksin komponentinin duyarlılık ve özgüllüğü

ise sırasıyla %79,2 ve %100 olarak bulunmuştur (Vasoo ve ark., 2014). Bir başka çalışmada, 200 dışkı örneği *C. Diff Quick Chek Complete* testi ile araştırılmış ve her iki testin birlikte duyarlılığının %70,8 ve özgüllüğünün %97,4 olduğu bildirilmiştir (Selvaraju ve ark., 2011).

2.9.3.6. Moleküler Yöntemler

Tanıda moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Bu amaçla kültürde üretim sonrası bakteriyi tanımlamak için geliştirilen DNA problemleri %100 duyarlılıkla, %96,7 özgüllükle *C. difficile*'yi tanımlayabilmektedir (Brazier, 1998). Kültür gereksinimi olmadan doğrudan dışkıdan PZR ile çalışmak da mümkündür. Toksin genlerini hedef alan primerler ile yapılan değişik PZR temelli uygulamalarla duyarlılığı yüksek ve özgül (%83-100) sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Brazier, 1998; Delme'e, 2001; Arzese ve ark., 1995). PZR, sitotoksinite deneyi ile %99 uyumludur (Belanger ve ark., 2003).

Günümüzde PZR ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) temelli yöntemler kullanılmaktadır. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA); BD-GeneOhm Cdiff (BD, Franklin Lakes, New Jersey), Prodesse ProGastro Cd (Gen-Probe, Inc. San Diego, CA), Cepheid GeneXpert *C. difficile* (Cepheid, Sunnyvale, CA) ve Illumigene *C. difficile* (Meridian Diagnostics, Inc., Ohio) yöntemleri için onay vermiştir. Bu yöntemlerden ilk üçü gerçek zamanlı PZR temelli ve toksin B'yi tespit eden yöntemlerdir (Carrol ve ark., 2011). Yöntemlerin duyarlılıkları %77,3-100, özgüllükleri ise %93-100 arasında, işlem süresi 29 dakika ile 4 saat arasında değişmektedir (Johnson, 2009; Carroll, 2011; Stamper ve ark., 2009).

FDA tarafından onaylanmış dördüncü yöntem, LAMP temelli Illumigene yöntemi olup, diğerlerinden farklı olarak toksin A'yı tespit etmektedir. PZR ile karşılaştırıldığında, basit, hızlı, özgül ve ucuz bir yöntemdir. LAMP teknolojisinde uygun primerlerin kullanımı ile DNA amplifikasyonu belirli bir sıcaklıkta (60-65°C), termal döngü cihazı gerektirmeden olmaktadır. Ortamda bulunan polimeraz enzimi ile çift zincir DNA'lar pirofosfat iyonları oluşturmakta, oluşan pirofosfat iyonları ortama ilave edilen manganez ile reaksiyona girerek, floresan metal indikatörü olan

kalsein yardımıyla görünür hale gelmektedir. 30-60 dakikada oluşan renk değişikliği basit bir türbidimetre ile veya çıplak gözle tespit edilebilmektedir. Illumigene yönteminin duyarlılığı %93,3-95,2, özgüllüğü ise %96,6-99,7 arasında değişmektedir (Boyanton ve ark., 2012; Bruins ve ark., 2012).

2.9.3.7. Kromotografik Yöntemler

Dışkıda uçucu bileşikler; gaz sıvı kromatografisi (GLC), gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi kullanılarak araştırılabilir (Probert ve ark., 2004). GLC ile dışkı *C. difficile* için özgül kalıp (izovalerik asit, izokaproik asit veya p-krezol) saptanarak tanı konulabilir. Yöntem sitotoksin ve kültür sonuçları ile %61 uyumlu bulunmuştur (Fekety, 1997). Araştırmacılar GLC'nin *C. difficile* için iyi bir tarama metodu olabileceğini belirtmiştir; ancak yöntem pahalıdır (Fekety, 1997). Solid faz mikro ekstraksiyon ile elde edilen gaz bileşimi, gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi kullanılarak da analiz edilmektedir. Uçucu gazların özgül kalıbı *C. difficile* ilişkili ishal tanısına katkı sağlar; indolsüz furan türleri *C. difficile* için özgüldür. Yöntemle hızlı sonuç alınır; ayrıca rotavirüs ve diğer enterik virüslerin ve *Campylobacter spp.*'nin tanısı için de uygundur ama kromatografi-kütle spektroskopisi cihazı gerektirmektedir (Probert ve ark., 2004).

2.9. *C. difficile* Enfeksiyonlarında Tedavi

C. difficile enfeksiyonları, öncelikle gastrointestinal sistem (GİS) olmak üzere pek çok sistemi etkileyebilmektedir. Bakteriyemi sepsis sendromu, karaciğer, dalak ve pankreas apseleri, peritonit ve kemik-eklem enfeksiyonları tanımlanmıştır (Garcia-Lechuz ve ark.,2001; Jacobs ve ark., 2001). GİS'i tutan *C. difficile* enfeksiyonları ise, hafif bir karın ağrısından fulminan psödomembranöz enterokolite kadar uzanan geniş bir aralıkta yer almaktadır. *C. difficile* enfeksiyonları en sık gözlenen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir ve özellikle hastanede yatan yaşlı popülasyonda artmış morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Ayrıca, *C. difficile*'nin yol açtığı antibiyotikle ilişkili ishaller hastaların %10-25'inde, metronidazol ya da vankomisin tedavisine karşın bir veya birden fazla nüks görülebilmektedir (Fekety, 1997).

C. difficile enfeksiyonlarının tedavisi, söz konusu enfeksiyonun şiddetine, tutulum yerine, nüks durumuna ve konak faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. Tedavide en önemli adım, kullanılmakta olan antibiyotiğin kesilmesidir. Hafif ve orta şiddette enfeksiyonların önemli bir bölümü antibiyotiğin kesilmesine ve destekleyici tedaviye iyi yanıt vermektedir. Fakat daha ağır enfeksiyonlarda ve altta yatan hastalığı olanlarda buna ek olarak oral metronidazol ya da vankomisin tedavisi gerekmektedir. Basitrasin, teikoplanin ve fusidik asit gereğinde kullanılabilir diğer seçeneklerdendir (Fekety, 1997). Metronidazol *C. difficile*'ye in-vitro olarak çok etkili olmasının yanı sıra vankomisinden de ucuzdur. Bu nedenle tedavi başlanacak hastalarda ilk olarak metronidazol seçilmelidir. Her iki ilacın da başlangıç tedavisi 10-14 gündür. Hastaların %80-90'ında her iki antibiyotikle yapılan başlangıç tedavisine klinik yanıt alınsa da metronidazol ile %5-16, vankomisin ile %16-33 oranlarında nüks görülmektedir (Garcia-Lechuz ve ark., 2001; Ondedonk ve ark.,1995). Relaps büyük olasılıkla *C. difficile* sporlarının persistansına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu hastaların tedavisinde aynı ilaçlar azaltılan dozlarda daha uzun süreler boyunca uygulanmaktadır (Malnick ve Zimhony., 2002; Bergogne-Berezin,2000).

Fidaksomisin, *C. difficile*'ye etkili yeni bir geniş spektrumlu makrolid antibiyotiktir. FDA, Mayıs 2011 tarihinde fidaksomisin *C. difficile* nedenli ishallerin tedavisinde kullanımına onay vermiştir. Tedavi maliyeti yüksek olmasına rağmen, yüksek riskli gruptaki hastalarda rekürent *C. difficile* enfeksiyonu oranını düşürdüğü için önemli bir antibiyotiktir (Kelly., 2012). Halen *C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde kullanılan mevcut antibiyotiklerin aksine, fidaksomisin *C. difficile*'ye karşı bakterisidal aktivite gösterir ancak *Bacteroides spp.* dahil kolon florasına etkisi çok azdır. Bu etki spektrumu *C. difficile* enfeksiyonu'li hastalarda fidaksomisin tedavisi altında iken kolon florasının daha hızlı restorasyonuna izin verebilir (Tannock ve ark., 2010).

Antibiyotik tedavisine ek olarak relapsla seyreden hastalarda toksin bağlayıcı etkileri olması nedeniyle kolestiramin ve kolestipol gibi anyon bağlayan reçineler kullanılmaktadır (Malnick ve Zimhony., 2002; Kyne ve Kelly, 2001). Nüks gözlenen hastalarda bakteri toksinine karşı IgG düzeylerinin düşük olması sebebi ile

intravenöz immünglobulin uygulanması rekürrensleri önleyebildiği gibi ağır kolit hastalarında da tedavi edici etki göstermektedir (Kyne ve Kelly, 2001). Son yıllarda tedavi adına denenen bir diğer tedavi yöntemi probiyotiklerin kullanılmasıdır (Malnick ve Zimhony., 2002; Bergogne-Berezin., 2000).

C. difficile enfeksiyonlu hastaları tedavi ederken farkında olunması gereken diğer önemli prensipler ise şunlardır (Loo ve ark., 2011):

1. Klinik olarak anlamlı diyaresi olanlar arasında sadece şekilsiz dışkı örnekleri olanlar *C. difficile* açısından test edilmelidir.
2. *C. difficile* enfeksiyonu açısından yüksek riske sahip olan hastalara profilaktik antimikrobiyal tedavisi verilmemelidir (ör. metronidazol veya vankomisin).
3. Asemptomatik *C. difficile* taşıyıcıları tedavi veya dekolonize edilmemelidir. Dekolonizasyon için antimikrobiyal tedavi efektif değildir.
4. Tedavi ile semptomlar düzeliyor iyileştikten sonra yeniden *C. difficile* enfeksiyonu semptomları veren hastalar dışında *C. difficile* testi tekrar edilmemelidir. Klinik olarak tedavi edilen hastaların çoğunun dışkısında toksijenik *C. difficile* kökenlerinin haftalar boyunca kalmaya devam ettiği akılda tutulmalıdır.

2.10. *C. difficile* Enfeksiyonlarından Korunma

Çocuk ve erişkinlerde *C. difficile* enfeksiyonu sıklığında artış görülmekle birlikte yaşlılarda orantısız bir artış söz konusudur (Zilberberg ve ark., 2008). Pediatrik hastalarda *C. difficile* enfeksiyonunun değişen epidemiyolojisi hakkındaki veriler sınırlıdır ve infantlar arasındaki asemptomatik taşıyıcılık ile birlikte diyareli çocuklardaki diğer patojenlerin varlığı da şaşırtıcıdır (Feghaly ve ark., 2013). Toplum kökenli *C. difficile* enfeksiyonu önceki yıllara göre daha sıklaşmıştır öyle ki bugün, *C. difficile* enfeksiyonunun %50'sinden fazlası toplum kökenli başlangıca sahiptir. Hastaneye kabul sırasında *C. difficile* enfeksiyonu olan kişiler hastanede yatmakta olan kişiler için bir risk oluşturmaktadır (Campbell ve ark.,

2006). *C. difficile* enfeksiyonu hastanede yatış süresini 2,8 ile 5,5 gün arasında artırmaktadır (Dubberke ve Olsen, 2012). *C. difficile* enfeksiyonu mortalitesi ABD’de yaklaşık olarak %5-10 arasında değişmektedir ve her yıl yaklaşık olarak 14.000-20.000 ölüme yol açmaktadır (Hall ve ark., 2012). *C. difficile* enfeksiyonunun önlenmesi ile ilişkili çalışmaların çoğu tek merkezlidir. *C. difficile* ile maruziyeti önleyen yöntemler şunlardır (Boyce ve Pittet, 2002).

- a) Hastalar arasında ekipman paylaşımı yapılmamalı, eğer zorunluysa ekipman temizlenip dezenfekte edilmelidir.
- b) Hastaya ve çıkartılarına eldivenle temas edilmelidir.
- c) Eğer mümkünse *C. difficile* enfeksiyonlu hastaların özel odalara alınması gereklidir.
- d) Hastalıkları kontrol ve önleme merkezi (CDC) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kılavuzlarına göre odaya girmeden önce ve odadan çıktıktan sonra el hijyeni koşullarına dikkat edilmesi son derece önemlidir. Alkol bazlı el hijyeni yerine su ve sabunla el hijyeninin sağlanması önerilmektedir. Uygun el yıkama tekniklerinin kullanımına özen gösterilmelidir.
- e) 1:10 oranında su ile sulandırılmış sodyum hipokloritle hasta odalarının dekontaminasyonu önerilmektedir.
- f) Sağlık çalışanları eğitilmelidir.

2.10.1. Antibiyotik Kullanım Politikası Oluşturulması

Antibiyotik kullanımı kuşkusuz *C. difficile* enfeksiyonu gelişimini en fazla etkileyen faktördür. Özellikle kolonun normal florasını baskılayan ve *C. difficile*'nin toksin üretimini arttıran başlıca antibiyotikler klindamisin, sefalosporinler ve ampisilindir (Lesna ve ark., 1996). Son dönemlerde üçüncü kuşak sefalosporinlerin *C. difficile* enfeksiyonu gelişimini ciddi boyutta uyardığı gösterilmiştir. Bu risk beta-laktamaz inhibitörlü geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerle kıyaslanacak olursa oldukça yüksektir. Hastane ortamında düzenli olarak uygulanabilen temel antibiyotik kullanım politikasının oluşturulması ve bunun kontrolü gereklidir (Lesna ve ark., 1996). Florokinolon kullanımının da *C. difficile* enfeksiyonu enfeksiyonuna

predispozan bir faktör olduğu gösterilmiştir (Margaret ve ark., 2003). Kanada’da Yip ve ark. (2001) tarafından yapılan vaka kontrol çalışmasında, siprofloksasin kullanımının nozokomiyal *C. difficile* ile ilişkili hastalıkta güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiş, özellikle *C. difficile*’nin endemik olduğu hastanelerde kinolonların dikkatli kullanılması önerilmiştir (Yip ve ark., 2001).

Uygulanan antibiyotik politikasında;

- ✓ Antibiyotik kullanım rehberi bulunmalı,
- ✓ Mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından antibiyotik duyarlılık sonuçları kısıtlı bildirilmeli,
- ✓ Klinisyenlere yönelik eğitim programlarını içermeli,
- ✓ Gereğinden fazla ilaç reçete edilmemeli,
- ✓ Antibiyotik kullanımları öngörülen zamanda sonlandırılmalı,
- ✓ Özel durumlarda enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanı tarafından hastanın konsülte edilmesi sağlanmalı,
- ✓ Gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılmalı,
- ✓ Mümkün olduğunca dar spektrumlu antibiyotik kullanımına özen gösterilmeli,
- ✓ *C. difficile* enfeksiyonlarını arttıran belirli antibiyotik kullanımları sınırlandırılmalı,
- ✓ Cerrahi profilakside antibiyotik kullanımının kontrol altına alınması sağlanmalı,
- ✓ Düzenli reçete kontrolleri ile antibiyotik kullanımları mümkün olan en erken sürede sonlandırılmalıdır (Settle ve ark., 1998).

Bulaşın önlenmesindeki zorluklar nedeniyle kontrol önlemleri aynı zamanda klinik hastalığın azaltılmasını da hedeflemektedir. Bu önlemlerin içerisinde en iyi sonuç alınan *C. difficile*’nin kolonize olduğu hastalarda hastalık tablosuna neden olabilen antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması ya da kontrol altına alınmasıdır. Yapılan çalışmalarda klindamisin kullanımının kısıtlandığı riskli hasta gruplarında *C. difficile* enfeksiyon oranlarında ciddi azalmaların görülmüş olması antibiyotik

kullanımının kontrol altına alınmasında sağlanan başarılı sonuçları ön plana çıkarmıştır. Hastane ortamında bakterinin yüksek oranda çevresel kontaminasyonu, çalışanların elleri ile mikroorganizmanın taşınması ve asemptomatik taşıyıcıların varlığı sorunun aktif sürveyans ve kontrol programlarına rağmen giderek arttığını göstermektedir (Climo ve ark., 1998).

Yukarıda anılan bilgiler ışığında bu çalışmada, Eylül 2012 ve Kasım 2014 tarihleri arasında Ankara'daki çeşitli merkezlerden toplanan toksin pozitif dışkı örneklerinden izole edilen *C. difficile* suşlarının vankomisin, metronidazol, moksifloksasin, klindamisin ve eritromisine karşı duyarlılıkları araştırılmış, toksin gen profilleri belirlenmiş, olası hipervirülan suşların tanımlanmasını sağlamak üzere *tcd* genindeki mutasyonlar dizi analizi ile araştırılmış ve PZR ribotipleme ile 027 varlığı incelenmiştir.

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi

Bu çalışmaya Eylül 2012 ve Kasım 2014 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) İbn-i Sina ve Cebeci Hastaneleri ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Hastanesinde yatan hastalara ait dışkı örnekleri ile Ankara Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda (DLG) değerlendirilen (klinik/poliklinik) hastalara ait dışkı örneklerinde çeşitli (immünkromatografi/ELISA/PZR) yöntemlerle toksin pozitifliği saptanan izolatlar dahil edilmiştir.

Toksin pozitifliği Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen dışkı örneklerinde immünkromatografi yöntemleriyle, Düzen Laboratuvarlar Grubu'ndan gelen dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen dışkı örneklerinde ise TcdB PZR ile değerlendirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 24 toksin pozitif dışkı örneği, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinden 30 toksin pozitif dışkı örneği ve Düzen Laboratuvarlar Grubundan 37 toksin pozitif dışkı örneği toplanmıştır. Örnekler temiz, su geçirmez ve ağzı sıkı kapatılmış temiz bir kaba alınmıştır. Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik kurul karar no:03-104-13).Çalışmada BAA-1870 (ribotip 027), ATCC 700057 VE ATCC 9689 standart suşları kullanılmıştır.

3.1.1. Örnek Kabul Kriterleri

1. Sıvı veya şekilsiz dışkı örnekleri (Bristol Stool Chart tip 5–7)
2. Son 6 hafta içerisinde antibiyotik tedavisi veya kemoterapi alma öyküsü olan hastalar
3. Antibiyotik ile ilişkili ishalden klinik olarak şüphelenilen hastalar

3.1.2. Örnek Red Kriterleri

1. 2 yaş altı çocuklar
2. Şekli ve katı dışkı örnekleri
3. Rektal sürüntü örnekleri
4. Kolonoskopik sıvı örnekleri

Örnekler kurumadan, alındıktan sonra en geç 4 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Hemen çalışılmayacak örnekler +4°C’de saklanmış ve örnek alınımından itibaren en geç 72 saat içerisinde anaerob kültür işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin kullanılmayan kısımları -20°C’de aşağıdaki prosedüre uygun olarak saklanmıştır. Saklanan örnekler daha sonra gerektiği takdirde anaerob kültür işlemine alınmıştır.

3.2. Örneklerin Saklanması

Örnekler -20°C’de fizyolojik tuzlu su (FTS) ve fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içerisine alınarak saklanmıştır. Bu amaçla, iki adet mikrosantrifüj tüpüne yüzer µl steril PBS ve bir adet mikrosantrifüj tüpüne 100 µl steril FTS konulup her birine dışkı örneğinden yaklaşık olarak 1 ml konularak -20°C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3. Alkol Şok İşlemi ve Sporların Jerminasyonu

3.3.1. Gereç

3.3.1.1. “Brain Heart Infusion Broth” Temel Besiyeri Hazırlanması

“Brain heart infusion broth” temel besiyeri (Himedia, İtalya) 18,5 g tartılmış ve dH₂O ile 500 ml’ye tamamlanmıştır. İçerisine %0,5 maya özütü (Oxoid, ABD), %0,1 sistein (Merck, Almanya), %0,1 taurokolat (Difco, ABD) ve 0,45 g glisin (Sigma, ABD) eklenmiştir. Ardından otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra bu karışım alkol şoku işleminde kullanılmıştır.

3.3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Brain Heart Infusion Broth temel besiyeri (Himedia, İtalya)

Etanol (Sigma-Aldrich, ABD)

Maya özütü (Oxoid, İngiltere)

Sistein (Merck, Almanya)

Taurokolat (Difco, İngiltere)

Glisin (Sigma, ABD)

3.1.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Otokolav (Nüve, Türkiye)

Anaerob jar (Oxoid, İngiltere)

Anaerob gaz poşeti (Oxoid, İngiltere)

Anaerob indikatör (Oxoid, İngiltere)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.3.2. Yöntem

Alkol şok işlemi şu şekilde uygulanmıştır: 1 ml dışkı örneği ile 1 ml %95 etanol karıştırılıp, vortekslenip oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiştir. Ardından 2500xg'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant kısmı atılıp dipteki sediment, hazırlanan BHI sıvı besiyeri ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 48-72 saat anaerob koşullarda (%85 N₂, %10 H₂ ve %5 CO₂) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra anaerob kültür işlemine geçilmiştir.

3.4. Anaerob Kùltür

3.4.1. Gereç

3.4.1.1. Sikloserin Sefoksitin Fruktoz Agar Besiyerinin Hazırlanması

George ve ark.'nın (1979) geliştirdiği CCFA besiyeri hazırlanmıştır. Bu amaçla, CCFA toz besiyeri (Oxoid, ABD) 34,5 g tartılmış, 0,5 g taurokolat eklenmiş ve 500 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. 50-55°C'ye soğutulduktan sonra %7 oranında defibrine koyun kanı ilave edilmiş, karıştırılarak steril petri kaplarına dök÷lmüştür.

3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

CCFA temel besiyeri (Oxoid, ABD)

Taurokolat (Difco, ABD)

Defibrine koyun kanı (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)

3.4.1.3. Araçlar

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Et÷v (Heraus, Almanya)

Anaerob jar (Oxoid, İngiltere)

Anaerob gaz poşeti (Oxoid, İngiltere)

Anaerobindikatör (Oxoid, İngiltere)

Anaerob identifikasyon kiti (BBL, ABD)

3.4.2. Yöntem

Ekim yapılan CCFA plakları 35 °C'de, anaerob koşullarda (%85 N₂, %10 H₂ ve %5 CO₂) 48-72 saat süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.1). Kolonilerden *C. difficile* identifikasyonu, geleneksel yöntemler (koloni morfolojisi, karakteristik koku, mikroskopik görünüm) ve anaerobik identifikasyon kiti (BBL Crystal, ABD) ile biyokimyasal reaksiyonları değerlendirilerek tanımlanmıştır.



Şekil 3. 1. CCFA besiyerinde izlenen *C. difficile* kolonileri

3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

3.5.1. Gereç

3.5.1.1. Besiyerleri

Mueller-Hinton agar (MHA)

Hemin ve Vitamin K1 ile Desteklenmiş Brucella kanlı agar (BKA)

MHA Besiyerinin Hazırlanması: MHA (Merck, Almanya) temel besiyeri 22 g tartılmış ve 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, 50-55°C'ye soğuduktan sonra steril petri plaklarına dökülmüştür.

Hemin ve Vitamin K1 ile Desteklenmiş Brucella Kanlı Agar(BKA) Besiyerinin Hazırlanması: BKA (Fluka, Hindistan) 21,5 g tartılmış ve 500ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, 50-55°C'ye

soğutulup %5 defibrine koyun kanı ilave edildikten sonra steril petri plaklarına dökülmüştür.

3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Mueller-Hinton Agar temel besiyeri (Merck, Almanya)

Brucella Kanlı Agar temel besiyeri (Fluka, Hindistan)

Defibrine koyun kanı (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)

Vankomisin Gradient-test (G-test) şeridi (Liofilchem, İtalya)

Metronidazol G-test şeridi (Liofilchem, İtalya)

Moksifloksasin G-test şeridi (Liofilchem, İtalya)

Eritromisin G-test şeridi (Liofilchem, İtalya)

Klindamisin G-test şeridi (Liofilchem, İtalya)

3.5.1.3. Araçlar

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Etüv (Heraus, Almanya)

Anaerob jar (Oxoid, İngiltere)

Anaerob gaz poşeti (Oxoid, İngiltere)

Anaerobindikatör (Oxoid, İngiltere)

Phoenix Spec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD)

3.5.2. Yöntem

Toksin pozitifliği saptanan 91 klinik örnekten anaerobik kültür ile üretilen 61

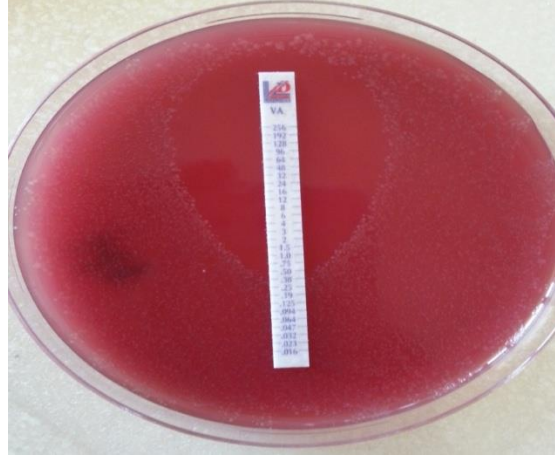
C. difficile izolatının metronidazol, moksifloksasin, vankomisin, eritromisin ve klindamisine antimikrobiyal duyarlılıkları G-test şeritleri kullanılarak incelenmiştir. BKA besiyerinde üreyen kolonilerden steril SF içinde 1 McFarland standardına uygun olarak, Phoenix Spec Nephelometer (BD, A.B.D) nefelometre cihazı kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan BKA besiyerine eküvyonla yoğun ekim yapılmıştır. Hemin ve vitamin K1 ile desteklenmiş BKA (Fluka, Hindistan) üzerine yayılmış, G-test şeritleri yerleştirilmiş ve anaerobik atmosferde 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Klindamisin dışındaki antimikrobisyonların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini, 24 sonra inhibisyon elipsinin skalayı kestiği yerden okunarak yapılmıştır. Klindamisin için MİK tayini ise 48 saat sonra belirlenmiştir. MİK değerlerinin yorumlanarak duyarlılık kategorilerinin belirlenmesi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (“Clinical and Laboratory Standards Institute”, CLSI M100-S25 ve CLSI M100-S17) kılavuzları ve Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST 2015, versiyon 5.0) tarafından önerildiği üzere tablo 3.1’de gösterilen eşik değerler dikkate alınarak yapılmıştır (Şekil 3.2). Antimikrobiyal duyarlılık testi için *C. difficile* ATCC 700057 ve ATCC 9689 suşu kalite kontrolü için kullanılmıştır.

Tablo 3. 1. Duyarlılık kategorileri için kabul edilen eşik değerler

Antibiyotik	S (MİK, µg/ml)	I (MİK, µg/ml)	R (MİK, µg/ml)
Metronidazol ¹	≤2	-	>2
Moksifloksasin ¹	≤4	-	>4
Vankomisin ¹	≤2	-	>2
Eritromisin ²	2	4	8
Klindamisin ³	2	4	8

¹EUCAST 2015, versiyon 5.0, ²CLSI M100-S17, 2007, ³CLSI M100-S25, 2015



Şekil 3. 2. *C. difficile* G test örneği

3.6. İzolatlardan DNA eldesi

3.6.1. Gereç

3.6.1.1. Besiyerleri

Brucella Kanlı Agar(BKA)

3.6.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

DNeasy virus mini kit v 2.0 (Qiagen, ABD)

3.6.1.3. Araçlar

DNeasy one X-Large advanced (Qiagen, ABD)

3.6.2. Yöntem

Suşlardan DNA ekstraksiyonu hazır ticari kit (DNeasy virus mini kit v 2.0, Qiagen, ABD) kullanılarak otomatize sistemde (DNeasy one X-Large advanced, Qiagen, A.B.D) üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.10-20 koloni bakteri, 400 µl steril distile su içinde süspanse edilmiştir. Vortekslenip ardından 56,2 µl tampon ve 3,8 µl carrier RNA ile birlikte işleme tabi tutulmuştur. Otomatize sistemde işlem sonunda, PZR işlemlerinde kullanılmak üzere 60 µl DNA elde edilmiştir.

3.7. Toksin Genlerinin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan primer dizileri ve amplicon büyüklükleri tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3. 2. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve amplicon büyüklükleri

Hedeflenen gen bölgesi	Primer	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Amplicon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>TcdA</i>	NKV011	TTTGTATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC	2535	Pinto ve ark., 2003
	NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA		Pinto ve ark., 2003
<i>TcdB</i>	NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	204	Van den Berg ve ark., 2004
	NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT		Van den Berg ve ark., 2004
<i>CdtA</i>	cdtAfw	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	353	Goncalves ve ark., 2004
	cdtArev	AGGATTATTACTGGACCATTTG		Goncalves ve ark., 2004
<i>CdtB</i>	cdtBfw	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	493	Goncalves ve ark., 2004
	cdtBrev	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC		Goncalves ve ark., 2004
<i>TcdC</i>	tcdCF-17	AAAAGGGAGATTGTATTATGTTTTTC	475	Persson ve ark., 2008
	tcdR+462	CAATAACTGAATAACCTTACCTTCA		Persson ve ark., 2008
16S-23S rRNA	Ribo-F	CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG	Muhtelif	O'Neill ve ark., 1996
	Ribo-R	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC		O'Neill ve ark., 1996

3.7.1. Toksin A Geninin (*tcdA*) İncelenmesi

3.7.1.1. Gereç

3.7.1.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange scientific, Belçika)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20µl, 200µl, 1000µl (Ratiolab, Almanya)

Pudrasız lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.7.1.1.2. Kimyasal Malzemeler

DreamTaq DNA Polimeraz (Thermo, Almanya)

10X DreamTaq Tamponu (Thermo, Almanya)

10 mM MgCl₂ (Thermo, Almanya)

dNTP Karışımı (Jena Bioscience, Almanya)

NKV011 ve NK9 primerleri (Thermo, Almanya) (Tablo 3.2)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromür (Applichem, Almanya)

1X Loading Dye Solution (Thermo, Almanya)

Mass Ruler SM0403 DNA Ladder, ready to use, 90-10000 bp (Thermo, Almanya)

3.7.1.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Etidyum bromid (Applichem, Almanya)

Elektroforez tankı (Sunrise, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV transillüminatör (Vilber -LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)

Fotoğraf makinası (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.7.1.2. Yöntem

3.7.1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Toksin A geninin saptanması amacıyla tablo 3.2’de gösterilen NKV011 ve NK9 primer dizileri kullanılmıştır (Pinto ve ark., 2003). Reaksiyon karışımı 30 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmış olup PZR reaksiyonu için karışımın içeriği ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

tcdA geni PZR için reaksiyon karışımı

dH ₂ O	_____	toplam hacme tamamlayacak şekilde
Dream Taq Tamponu	_____	3 µl
dNTP	_____	200µM
NKV011	_____	0,6 pmol
NKV9	_____	0,6 pmol
Dream Taq polimeraz	_____	1U
DNA	_____	3 µL
<hr/>		
Toplam Hacim		30 µl

tcdA geni için PZR döngüleri:

Başlangıç denatürasyonu.....	94 °C’ de 5 dakika	
Denatürasyon aşaması	95 °C’ de 20 saniye	} 30 döngü
Primer yapışması (annealing).....	60 °C’ de 2 dakika	
Son uzama.....	74 °C’ de 5 dakika	

PZR analizi sonucunda *tcdA* pozitif suşlar 2535 bç’lik amplikon ile gösterilmiş; *tcdA* negatif suşlar 1700-1800 bç’lik delesyonlar göstereceğinden yaklaşık 700-800 bç’lik amplikonlar elde edilmiştir.

3.7.1.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme

Amplikonların analizi %1 agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Boyama için agarın içerisine etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5’lik stok solüsyonundan 2µl ilave edilmiştir.

Üç saat 100 V elektrik akımı altında elektroforez uygulandıktan sonra, 312 nm’de UV transillüminatör (Vilber–LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile elde edilen bantlar değerlendirilmiştir. Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir.

3.7.2. Toksin B Geninin (*tcdB*) İncelenmesi

3.7.2.1. Gereç

3.7.2.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Steril filtrelı pipet uçları 10 µl, 20µl, 200µl, 1000µl (Ratiolab, Almanya)

Pudrasız lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.7.2.1.2. Kimyasal Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Thermo, Almanya)

10X PZR Tamponu (KCL içeren) (Thermo, Almanya)

10 mM MgCl₂ (Thermo, Almanya)

dNTP Karışımı (Jena Bioscience, Almanya)

NK104 ve NK105 primerleri (Thermo, Almanya) (Tablo 3.2)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromür (Appllichem, Almanya)

1X Loading Dye Solution (Thermo, Almanya)

ΦX174 D A/*Hinf*I Marker, 48-726 bp (Fermentas, Litvanya)

3.7.2.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler-Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Sunrise, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV tansillüminatör (Vilber -LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)

Fotoğraf makinası (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.7.2.2. Yöntem

3.7.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Toksin B geninin saptanması amacıyla tablo 3.2’de dizisi gösterilen NK104 ve NK105 primer dizileri kullanılmıştır (VandenBerg ve ark. 2004). Reaksiyon karışımı 30 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmış olup PZR reaksiyonu için karışımın içeriği ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

tcdB geni PZR için reaksiyon karışımı

dH₂O_____toplam hacme tamamlayacak şekilde

10x PZR tamponu_____3 µl

dNTP_____200µM

MgCl₂_____2,5 mM

NK104_____1pmol

NK105_____1 pmol

Taq polimeraz_____1 U

DNA_____3 µL

Toplam Hacim_____30 µl

tcdB geni için PZR döngüleri:

Başlangıç denatürasyonu.....	94 °C' de 5 dakika	} 35 döngü
Denatürasyon aşaması	95 °C' de 20 saniye	
Primer yapışması (annealing).....	55 °C' de 2 dakika	
Son uzama.....	74 °C' de 5 dakika	

Reaksiyon sonunda 204 bç'lik ampikon tespit edilen suşlar *tcdB* geni pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.7.2.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme

Ampikonların analizi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Boyama için agarın içerisine etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5'lik stok solüsyonundan 2µl ilave edilmiştir.

Bir buçuk saat 100 V elektrik akımı altında elektroforez işlemi uygulandıktan sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber–LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile elde edilen bantlar değerlendirilmiştir. Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir.

3.7.3. “Binary” Toksin Genlerinin (*cdtA* ve *cdtB*) İncelenmesi

3.7.3.1. Gereç

3.7.3.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Pudrasız lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.7.3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Thermo, Almanya)

10X PZR Tamponu (Thermo, Almanya)

10 mM MgCl₂ (Thermo, Almanya)

dNTP Karışımı (Jena Bioscience, Almanya)

cdtAfw, cdtArev, cdtBfw, cdtBrev primerleri (Thermo, Almanya) (Tablo 3.2)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromür (Applichem, Almanya)

1X Loading Dye Solution (Thermo, Almanya)

Gene Ruler DNA Ladder, ready to use, 50-1000 bp (Thermo, Almanya)

3.7.3.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler-Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Sunrise, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV transilliminator (Vilber –LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)

Fotoğraf makinası (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.7.3.2. Yöntem

3.7.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

“Binary” toksin genlerinin (*cdtA* ve *cdtB*) saptanması amacıyla tablo 3.2’de gösterilen *ctdAfw*, *ctdArev*, *ctdBfw* ve *ctdBrev* primer dizileri kullanılmıştır (Goncalves ve ark., 2004). Reaksiyon karışımı 25 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmış olup multipleks PZR reaksiyonu için karışımın içeriği ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

cdtA ve *cdtB* geni PZR için reaksiyon karışımı

dH ₂ O	_____	toplam hacme tamamlayacak şekilde
10x Taq tamponu +KCl	_____	2,5 µl
dNTP	_____	200µM
MgCl ₂	_____	1,5 mM
CdtAfw	_____	0,15 µM
CdtArev	_____	0,15 µM
CdtBfw	_____	0,15 µM
CdtBrev	_____	0,15 µM
Taq polimeraz	_____	1 U
DNA	_____	3 µL
Toplam Hacim	_____	25 µl

cdtA ve *cdtB* geni için PZR döngüleri:

Başlangıç denatürasyonu	94 °C’ de 6 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması	94 °C’ de 50 saniye	
Primer yapışması (annealing)	47 °C’ de 40 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72°C’ de 50 saniye	
Son uzama	72 °C’ de 3 dakika	

Multipleks PZR analizinde *cdtA* geni tespiti için *cdtAfw* ve *cdtArev*; *cdtB* tespiti için, *cdtBfw* ve *cdtBrev* primerleri kullanılarak sırasıyla 353 ve 493 bp'lik ampliconlar elde edilmiştir.

3.7.3.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme

Ampliconların analizi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Boyama için etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5'lik stok solüsyonundan 2 µl ilave edilmiştir.

İki saat 100 V elektrik akımı altında elektroforez uygulandıktan sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber–LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile elde edilen bantlar değerlendirilmiştir. Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir.

3.8. *tcdC* Geni Dizi Analizi

3.8.1. Gereç

3.8.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Pudrasız lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.8.1.2. Kimyasal Malzemeler

DreamTaq DNA Polimeraz (Thermo, Almanya)

10X DreamTaq Tamponu (Thermo, Almanya)

10 mM MgCl₂ (Thermo, Almanya)

dNTP Karışımı (Jena Bioscience, Almanya)

tcdCF-17 ve tcdR+462 (Thermo, Almanya) (Tablo 3.2)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromür (Applichem, Almanya)

1X Loading Dye Solution (Thermo, Almanya)

Gene Ruler DNA Ladder, ready to use, 50-1000 bp (Thermo, Almanya)

3.8.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler-Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Sunrise, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV tansillüminatör (Vilber-LourmatTFX-20.M [ETX-20 M], Fransa)

Fotoğraf makinası (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.8.2. Yöntem

3.8.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR ile amplifikasyonda *tcdCF-17* ve *tcdR+462* primer dizileri kullanılmıştır (Persson ve ark. 2008). Reaksiyon karışımı 25 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmış olup PZR reaksiyonu için karışımın içeriği ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

***tcdC* geni PZR için reaksiyon karışımı**

dH ₂ O	toplam hacme tamamlayacak şekilde
10X Dream Taq Tamponu	3 µl
dNTP	260µM
TcdC F	0,2 µM
TcdC R	0,2 µM
Taq polimeraz	1,25 U
DNA	2 µL
<hr/>		
Toplam Hacim		25 µl

***tcdC* geni için PZR döngüleri:**

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 3 dakika
Denatürasyon aşaması	94 °C' de 45 saniye
Primer yapışması (annealing)	52 °C' de 1 dakika
Sentez (uzama) aşaması	75°C' de 80 saniye
Son uzama	75 °C' de 5 dakika

30 döngü

Reaksiyon sonunda 475 bç'lik amplikon tespit edilmiştir.

3.8.2.2. Elektroforez ve Görüntüleme

Amplikonların analizi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Boyama için etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5'lik stok solüsyonundan 2µl ilave edilmiştir.

İki saat 100 V elektrik akımı altında jel elektroforezi uygulandıktan sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber–LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile elde edilen bantlar değerlendirilmiştir. Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir.

3.8.2.3. İki Yönlü DNA Dizi Analizi

Elde edilen PZR ürünü temizlendikten sonra tcdR primeri kullanılarak DNA dizi analizine tabi tutulmuştur (Persson ve ark., 2008). DNA dizi analizi için hizmet alımı yapılmıştır (Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji; Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer, ABIPRISM).

3.9. PZR Ribotiplendirmesi

3.9.1. Gereç

3.9.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Pudrasız lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.9.1.2. Kimyasal Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Thermo, Almanya)

10X PZR Tamponu (Thermo, Almanya)

10 mM MgCl₂ (Thermo, Almanya)

dNTP Karışımı (Jena Bioscience, Almanya)

Ribo f ve ribo r primerleri (Thermo, Almanya)

Metaphor agaroz (Prona, E.U)

Chelex-100 (Sigma, ABD)

Etidyum bromür (Applichem, Almanya)

1X Loading Dye Solution (Thermo, Almanya)

TBE tamponu (Thermo, Almanya)

Gene Ruler DNA Ladder, ready to use, 100-1000 bp (Thermo, Almanya)

3.9.1.3. Araçlar

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (Hvd, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler-Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Kuru ısıtıcı blok (Hvd, Avusturya)

Soğutuculu dikey elektroforez (Biolab,Türkiye)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV tansillüminatör (Vilber -LourmatTFX-20.M [ETX-20 M], Fransa)

Fotoğraf makinası (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.9.2. Yöntem

3.9.2.1. İzolatlardan DNA eldesi

0,5 g Chelex-100 (Sigma, ABD) üzerine 10 ml dH₂O eklenmiş ve %5'lik(w/v) Chelex-100 süspansiyonu elde edilmiştir. 10-20 koloni bakteri, 100 µl %5'lik Chelex-100 içinde süspansiyon edilmiştir. Ardından 95°C kuru ısıtıcı blokta 10 dakika kaynatılmıştır. 15000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır.

3.9.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR ile amplifikasyonda tablo 3.2'de gösterilen Ribo-F ve Ribo-R primerleri kullanılmıştır (O'Neill ve ark., 1996). Reaksiyon karışımı 100 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmış olup PZR reaksiyonu için karışımın içeriği ve koşulları aşağıda gösterilmiştir.

PZR ribotiplendirimi için reaksiyon karışımı

dH ₂ O	toplam hacme tamamlayacak şekilde
10x Taq tamponu(KCl)	10 µl
dNTP	200µM
MgCl ₂	9 mM
Ribo-F	1 µM
Ribo-R	1 µM
Taq polimeraz	2 U
DNA	10 µL
Toplam Hacim	100 µl

Ribotiplendirme için PZR döngüleri:

Başlangıç denatürasyonu.....	94 °C' de 3 dakika	} 35 döngü
Denatürasyon aşaması	94 °C' de 1 dakika	
Primer yapışması (annealing).....	55 °C' de 1 dakika	
Sentez (uzama) aşaması.....	72°C' de 1 dakika	
Son uzama.....	72 °C' de 5 dakika	

C. difficile 16S rRNA geni geninin 1445-1466. ile 23S rRNA geninin 1-20. bazları arasında kalan bölge literatürde tanımlandığı şekilde amplifiye edilmiştir (O'Neill ve ark., 1996). Elde edilen 100 µl'lik PZR ürünü 75°C'de yaklaşık 90 dk tutularak hacmi 20 µl'ye indirilmiştir.

3.9.2.3. Elektroforez ve Görüntüleme

%2 w/v metafor agaroz hazırlamak için, ısıtmadan önce agarozun TBE tamponunda kalması sağlanmıştır. Bunun için tartılan agarın üzerine soğuk TBE 0,5X eklenmiş ve ısıtıcılı karıştırıcıda 15 dakika agarozun karışması sağlanmıştır. Daha sonra agaroz, mikrodalga fırında orta güçte iki dakika ısıtılmıştır. Hafifçe çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Yüksek güçte 1-2 dakika veya kaynayanaya dek ısıtılmıştır. Agarozun tamamen karışması için çalkalanmış ve ilk ağırlığına ulaşması için TBE eklenmiştir. 60°C'ye soğuyunca camları önceden ısıtılmış vertikal elektroforez sistemine dökülmüştür.

Elektroforez işlemi, 8°C'de altı saat süreyle ve 300 volt akımda gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında jel, 25 µl etidyum bromid içeren 500 ml distile su ile 20 dakika boyanmıştır. Sonrasında jel 400 ml distile su içerisinde 45 dakika 2-3 kere suyu değiştirilerek yıkanmıştır ve böylece DNA'ya bağlanmamış boya uzaklaştırılmıştır.

UV transilluminatör (Vilber–LourmatTFX–20.M (ETX–20 M), Fransa) altında bantlar görüntülenmiş ve fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile çekilerek kaydedilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Toksin Pozitif *C. difficile* İzolatları

Sporların vejetatif hale geçmesi için yapılan jermantasyon aşamalarında AÜTF Hastaneleri'nden alınan 30 toksin pozitif dışkı örneğinden 22'si başarılı olurken, HÜTF'den alınan 24 toksin pozitif dışkı örneğinden 16'sı, DLG'den alınan gelen 37 toksin pozitif dışkı örneğinden 23'ü başarılı olmuştur. Vejetatif forma geçerek kültürde üretilen 61 *C. difficile* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. DLG'den alınan örnekler için hasta verisi sınırlı olduğundan bunlar "poliklinik" izolatı olarak kabul edilmiş, AÜTF ve HÜTF'den alınan örnekler ise "yatan hasta" izolatı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 61 hastanın yaş ortalaması 52,01 olarak hesaplanmıştır. Hastaların 26'sı (%42) erkek, 35'i(%58) kadındır.

Hastaların yattığı kliniklere göre dağılımına bakıldığında yoğunluğun dahili servislerde olduğu (%92,1); bunu yoğun bakım üniteleri(%5,2) ve cerrahi servislerin (%2,7) izlediği görülmüştür.

Yatan hastaların 13'ünde (%34)'ünde altta yatan malignite, 17'sinde (%44) kronik hastalık (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, böbrek yetmezliği, diyabet, ülseratif bağırsak hastalığı) mevcuttur. Sekiz (%22) hastada altta yatan başka bir risk faktörü belirtilmemiştir.

C. difficile izole edilen hastaların antibiyotik kullanımları sorgulandığında; ulaşılabilen hastaların 55'inde (%90,1) antibiyotik kullanma öyküsü belirtilmiştir. Hastaların 36'sında (%65) tekli, 19'unda (%35) ikili antibiyotik kullanımı mevcuttur. Kullanılan antibiyotikler içerisinde 18'inde sefalosporinler, 15'inde karbapenem grubu antibiyotikler, 14'ünde penisilin grubu antibiyotikler, onunda florokinolonlar, dokuzunda aminoglikozidler ve sekizinde glikopeptidler bulunmaktadır.

Hasta ve klinik izolatlara ait özellikler toplu olarak tablo 4.7'de verilmiştir.

4.2. C. difficile İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının G-test Yöntemi ile Değerlendirilmesi

4.2.1. Vankomisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Suşların vankomisin için MİK değeri EUCAST (2015, versiyon 5.0) kriterlerine göre değerlendirilmiş, hepsi $\leq 1,5$ $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve duyarlı olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1: Vankomisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı

	MİK Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)									
	n(%)									
	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,50	0,75	1	1,5	≥ 2
AÜTF İzolatları	-	2 (9,1)	4 (18,2)	11 (50)	3 (13,6)	2 (9,1)	-	-	-	-
HÜTF İzolatları	-	-	3 (18,75)	2 (12,5)	9 (56,25)	2 (12,5)	-	-	-	-
DLG İzolatları	-	-	3 (13)	11 (48)	4 (17,4)	4 (17,4)	-	-	1 (4,3)	-
TOPLAM	-	2 (3,2)	10 (16,3)	24 (39,3)	16 (26,2)	8 (13,1)	-	-	1 (1,6)	-

4.2.2. Metronidazol için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Suşların metronidazol için MİK değeri EUCAST (2015, versiyon 5.0) kriterlerine göre değerlendirilmiş, hepsi $\leq 0,75$ $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve duyarlı olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 2:Metronidazol için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı

	MİK Değerleri (µg/ml)							
	n(%)							
	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,50	0,75	≥1
AÜTF İzolatları	1 (4,5)	1 (4,5)	8 (36)	4 (18,2)	6 (27,2)	2 (9,1)	-	-
HÜTF İzolatları	1 (6,25)	2 (12,5)	3 (18,75)	5 (31,25)	2 (12,5)	3 (18,75)	-	-
DLG İzolatları	-	-	6 (26,1)	6 (26,1)	3 (13)	7 (30,4)	1 (4,3)	-
TOPLAM	2 (3,2)	3 (4,9)	17 (27,8)	15 (24,5)	11 (18)	12 (19,6)	1 (1,6)	-

4.2.3. Moksifloksasin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Suşların moksifloksasin için MİK değeri EUCAST (2015, versiyon 5.0) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

DLG'ye ayaktan başvuran iki hastaya ait izolat ile HÜTF Hastanesinde yatan bir hastaya ait izolatta moksifloksasin için epidemiyolojik eşik değer (ECOFF)32 µg/ml olarak belirlenmiş ve bu üç izolat (%4,9) moksifloksasine dirençli(≥4 µg/ml)olarak kabul edilmiştir. Kalan izolatlar için ECOFF değeri ≤4 µg/ml olup duyarlı olarak değerlendirilmişlerdir. Sonuçlar tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 3: Moksifloksasin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı

	MİK Değerleri (µg/ml)									
	n(%)									
	≤0,19	0,25	0,38	0,50	0,75	1	1,5	2-24	32	≥48
AÜTF İzolatları	-	-	4 (18,2)	8 (36,4)	9 (40,9)	1 (4,5)	-	-	-	-
HÜTF İzolatları	-	-	1 (6,25)	2 (18,75)	7 (43,75)	4 (25)	-	-	1 (6,25)	-
DLG İzolatları	-	2 (8,6)	2 (8,6)	11 (47,8)	3 (13)	2 (8,6)	1 (4,3)	-	2 (8,6)	-
TOPLAM	-	2 (3,2)	7 (11,4)	21 (34,4)	19 (31,1)	7 (11,4)	1 (1,6)	-	3 (4,9)	-

4.2.4. Klindamisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Suşların klindamisin için MİK değerleri CLSI (2015; M100-S25) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. HÜTF’de yatan bir (%1,6) hastaya ait örnekte MİK değeri >256 µg/ml olarak belirlenmiş ve dirençli kabul edilmiştir. AÜTF Hastanelerinden alınan beş, HÜTF Hastanesinden alınan dört ve DLG’den alınan sekiz olmak üzere toplam 17 (%27,8) hastaya ait örnekte MİK değeri 2-8 µg/ml arasında olup orta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Kalan izolatlar için MİK değeri ≤ 2 µg/ml olup duyarlı olarak değerlendirilmişlerdir. Sonuçlar tablo 4.4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. 4: Klindamisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı

	MİK Değerleri (µg/ml)											
	n (%)											
	≤0,25	0,38	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8-256	>256
AÜTF İzolatları	-	-	-	-	6 (27,3)	6 (27,3)	5 (22,7)	3 (13,6)	1 (4,5)	1 (4,5)	-	-
HÜTF İzolatları	-	-	1 (6,25)	3 (18,75)	1 (6,25)	3 (18,75)	3 (18,75)	1 (6,25)	3 (18,75)	-	-	1 (6,25)
DLG İzolatları	-	1 (4,3)	-	2 (8,7)	5 (21,7)	2 (8,7)	5 (21,7)	2 (8,7)	6 (26,1)	-	-	-
TOPLAM	-	1 (1,6)	1 (1,6)	5 (8,1)	12 (19,6)	11 (18)	13 (21,3)	6 (9,8)	10 (16,3)	1 (1,6)	-	1 (1,6)

4.2.5. Eritromisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Suşların eritromisin için minimum inhibitör konsantrasyonları CLSI (2007; M100-S17) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. AÜTF Hastanelerinde yatan bir ve HÜTF Hastanesinde yatan bir olmak üzere toplam iki (%3,2) hastaya ait izolatta eritromisin için MİK değeri >256 µg/ml olarak belirlenmiş ve dirençli kabul edilmiştir. AÜTF Hastanelerinde yatan hastalara ait iki ve DLG'den alınan üç hasta örneğinden izole edilen toplam beş (%8,1) izolatın MİK değeri 2-8 µg/ml arasında tespit edilmiş ve orta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Kalan izolatlar için MİK değerleri ≤2 µg/ml olup duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar tablo 4.5'te gösterilmiştir.

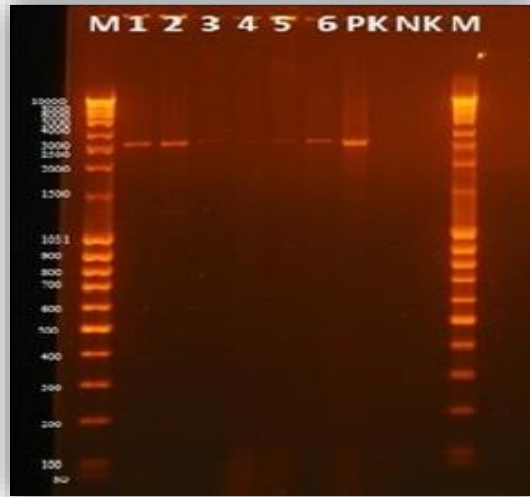
Tablo 4. 5:Eritromisin için G-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri dağılımı

	MİK Değerleri (µg/ml)											
	n (%)											
	≤0,19	0,25	0,38	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	6-256	>256
AÜTF İzolatları	-	1 (4,5)	-	2 (9,1)	2 (9,1)	4 (18,2)	7 (31,8)	3 (13,6)	-	2 (9,1)	-	1 (4,5)
HÜTF İzolatları	-	-	2 (12,5)	-	-	4 (25)	5 (31,25)	4 (25)	-	-	-	1 (6,25)
DLG İzolatları	-	-	-	1 (4,3)	-	4 (17,4)	7 (30,4)	8 (34,8)	3 (13)	-	-	-
TOPLAM	-	1 (1,6)	2 (3,2)	3 (4,9)	2 (3,2)	12 (19,6)	19 (31,1)	15 (24,5)	3 (4,9)	2 (3,2)	-	2 (3,2)

4.3. *C. difficile* İzolatlarının PZR ile Toksin Genlerinin İncelenmesi

4.3.1. Toksin A (*tcdA*) Geni İncelenmesi

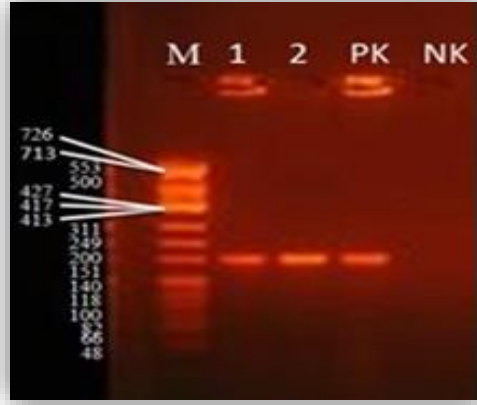
Toplam 61 *C. difficile* suşunun hepsinde (%100) *tcdA* geni varlığı saptanmıştır. Örnek analiz görüntüsü şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4. 1. *tcdA* PZR görüntüsü. 1-6: Hasta izolatları, PK: BAA-1870, NK: Negatif kontrol, M:Moleküler büyüklük belirteci, Mass Ruler SM0403 DNA Ladder, ready to use, 90-10000 bp (Thermo, Almanya)

4.3.2. Toksin B (*tcdB*) Geni İncelenmesi

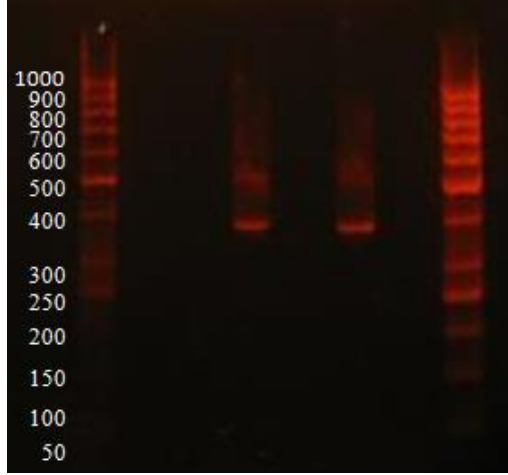
Toplam 61 *C. difficile* suşunun hepsinde (%100) *tcdB* geni varlığı saptanmıştır. Analiz görüntüsü şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4. 2. *tcdB* PZR görüntüsü. 1,2: Hasta izolatları, M:Moleküler büyüklük belirteci, PK: BAA-1870, NK: Negatif kontrol. Φ X174 D A/*Hinf*I Marker, 48-726 bp (Fermentas, Litvanya)

4.3.3. “Binary” Toksin Genleri (*cdtA* ve *cdtB*) İncelenmesi

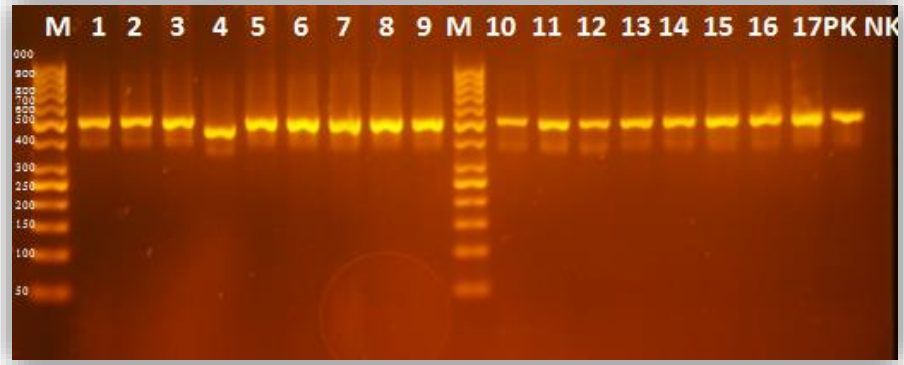
Toplam 61 *C. difficile* suşunun birinde (%1,6) *cdtA* ve *cdtB* geni varlığı saptanmıştır. Diğer izolatların hiçbirinde *cdtA* ve *cdtB* genlerine ait bant tespit edilmemiştir. Analiz görüntüsü şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4. 3: *cdtA* ve *cdtB* PZR görüntüsü. 1-4: Hasta izolatları, PK: BAA-1870, NK: Negatif kontrol, M:Moleküler büyüklük belirteci, Gene Ruler DNA Ladder, ready to use, 50-1000 bp (Thermo, Almanya)

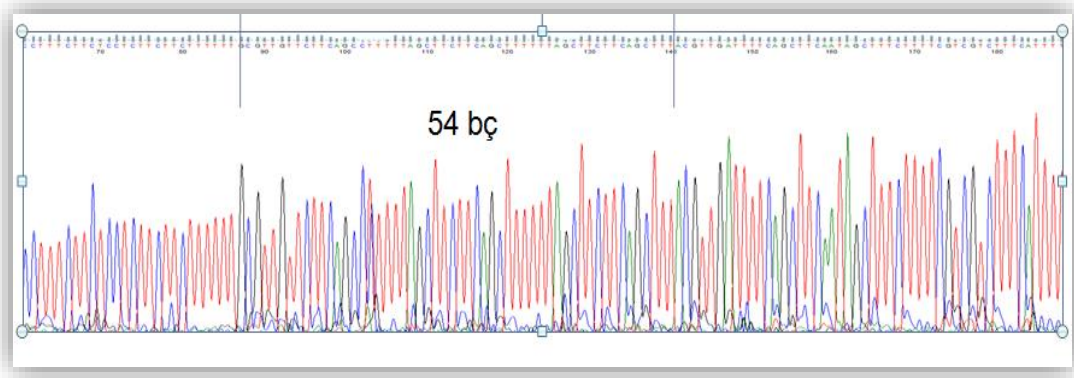
4.3.4. *tcdC* Geninin Dizi Analizi

Tüm izolatlarda *tcdC* geni PZR ile amplifiye edilmiş (şekil 4.4) ve amplifiye edilen gen bölgesi iki yönlü DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Toplam 61 *C. difficile* suşundan aynı zamanda “binary” toksin pozitifliği de tespit edilen bir izolatta (%1,6) 54 baz çiftlik bir delesyon, bu ve ayrıca 12 (%19,6) izolatta daçeşitli tek nükleotit polimorfizmleri saptanmıştır. Delesyon saptanan izolat ve tek nükleotit polimorfizmi saptanan izolatlar gen bankasına erişim numaralarıyla birlikte girilmiştir.



Şekil 4.4. *tcdC* PZR görüntüsü. 1-17: Hasta izolatları, M:Moleküler büyüklük belirteci, PK: BAA-1870, NK: Negatif kontrol, Gene Ruler DNA Ladder, ready to use, 50-1000 bp (Thermo, Almanya)

On (%16,4) izolatta 148.pozisyonda guanin→timin değişimi neticesinde 49. pozisyonda alanin→serin değişimi gerçekleşmiştir (GenBank 1843207) . Bir izolatta (%1,6) 150. pozisyonda timin→sitozin değişimi gerçekleşmiş, bu değişim aminoasit değişikliğine neden olmamıştır (nonsens mutasyon) (GenBank1843798). Bir izolatta (%1,6) 414. pozisyonda sitozin→adenin değişimi sonucu 138.pozisyonda asparajin→glutamin değişimi gerçekleşmiştir (GenBank 1843801). “Binary” toksin genleri de pozitif bulunan bir izolatta (%1,6) 313-366.nükleotitler arasında kalan 54.bç’lik bölgenin delesyonu sonucunda 105-122.aminoasitlerin budanmıştır. Yine bu izolatta 378.pozisyonda guanin→adenin değişikliği gözlenmiş, ancak bu değişim aminoasit değişikliğine neden olmamıştır (nonsens mutasyon) (GenBank 1843798).DNA dizi analizi görüntüsü şekil 4.5’te verilmiş, sonuçlar tablo 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4. 5: *tcdC* genine ait DNA dizi analizi görüntüsü.

Bir izolatta tespit edilen delesyon bölgesi, bu bölgede mutasyon gözlenmeyen örneğin dizisi üzerinde gösterilmiştir.

Tablo 4. 6: *tcdC* geninin DNA dizi analizi bulguları

	Delesyon n(%)	Tek nükleotit polimorfizmleri n(%)			
	$\Delta 54^*$	G148T	T150C	C414A	G378A*
AÜTF İzolatları	-	3 (%4,9)	-	1 (%1,6)	-
HÜTF İzolatları	-	4 (%6,5)	-	-	-
DLG İzolatları	1 (%1,6)	3 (%4,9)	1 (%1,6)	-	1 (%1,6)
TOPLAM	1(1,6)	10(16,3)	1(1,6)	1(1,6)	1(1,6)

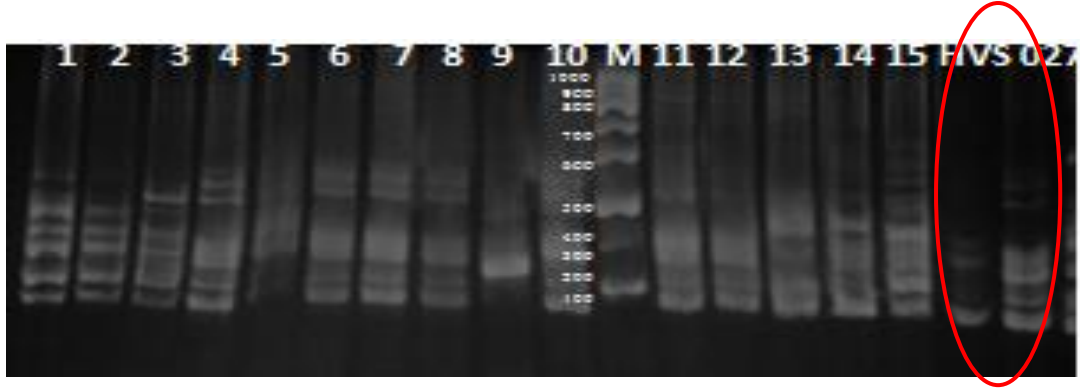
* $\Delta 54$ ve G378A değişimleri aynı izolata aittir.

4.3.5. PZR Ribotipleme Bulguları

DLG'den alınan ve "binary" toksin genleri pozitifliği yanısıra *tcdC* geninde 54 bç. delesyon saptanan izolat hipervirülen bir suş olarak kaydedilmiştir. Bu izolat moksifloksasine duyarlı (MİK=0,5 µg/ml) olarak bulunmuştur. Ribotip 027 pozitif kontrol suşu ile birlikte yapılan PZR ribotiplemede pozitif kontrol ile karşılaştırılan bu izolataın ribotip 027 olmadığı saptanmış, doğrulama için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmiştir.

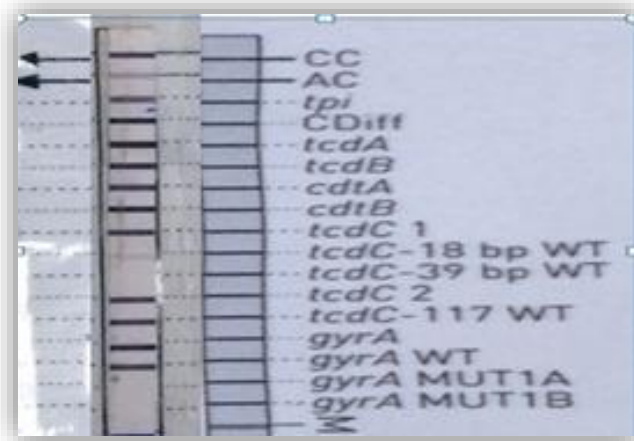
Diğer izolatların PZR ribotiplemesi yapıldığında klasik ribotipler olduğu tespit edilmiş, izolatlara ait ribotip görüntülerinin mevcut ribotip kütüphanesinde

bulunan ribotiplerle karşılaştırılması için kütüphane erişimi olan yurt dışında bir kuruma gönderilmesi planlanmıştır. Ribotipleme çalışmasına ait jel görüntüsü şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4. 6: PZR ribotiplendirme jel görüntüsü; 1-15: Hasta izolatları, M: Moleküler büyüklük belirteci, HVS, hipervirülan suş; 027 pozitif kontrol

“Binary” toksin üretimi ve *tcdC* geninde delesyon taşıması nedeniyle bu çalışmada “Hipervirülan” olarak tanımlanan izolat (No:46) Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarında hibridizasyon temelli bir yöntemle (GenoType Cdiff, Hain Lifescience, Almanya) değerlendirilmiş ve izolatın “binary” toksin üretimi doğrulanmıştır. İzolat, “ribotip 027 dışı hipervirülan bir suş” olarak raporlanmıştır (Şekil 4.7). Bu izolat bugüne kadar Türkiye’de yapılan çalışmalarda tespit edilen ilk hipervirülan kökendir.



Şekil 4. 7: “Binary” toksin üreten izolatın hibridizasyon temelli bir yöntemle doğrulanması

Tablo 4. 7: Hasta ve izolatların özellikleri

No	Tanı	Antibiyotik kullanımı	Antibiyotik Duyarlılıkları (MİK, µg/ml)					Moleküler Karakterizasyon				<i>tcdC</i> Analizi
			VA	MTZ	MOX	E	CD	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	
1	Febril nötropeni	PIP/TZB+AK	0,125	0,125	0,75	0,50	1,5	+	+	-	-	-
2	İdrar yolu enfeksiyonu	MEM+GN	0,19	0,38	0,50	1	2	+	+	-	-	-
3	Peritonit	SAM+AK	0,25	0,19	0,50	1,5	1	+	+	-	-	G414T
4	Febril nötropeni	MEM+AK	0,25	0,25	0,75	4	1	+	+	-	-	-
5	İdrar yolu enfeksiyonu	İPM+GN	0,38	0,38	0,38	>256	4	+	+	-	-	-
6	Pnömoni	CRO	0,25	0,38	0,75	1	3	+	+	-	-	-
7	Ülseratif kolit	CİP	0,19	0,38	0,50	1,5	1,5	+	+	-	-	-
8	Peritonit	PIP/TZB	0,19	0,094	0,38	0,75	1,5	+	+	-	-	-
9	Diyabetik ayak	ETP	0,25	0,19	0,50	1,5	3	+	+	-	-	-
10	Tonsillit	AMC	0,125	0,25	0,38	0,75	1,5	+	+	-	-	-
11	İdrar yolu enfeksiyonu	-	0,25	0,25	0,75	2	3	+	+	-	-	-
12	Sepsis	VA+İPM	0,50	0,50	0,38	1,5	2	+	+	-	-	-
13	Febril nötropeni	CES	0,25	0,25	0,75	4	1	+	+	-	-	-
14	Pnömoni	CRO	0,25	0,38	0,75	1,5	1,5	+	+	-	-	-
15	Crohn	-	0,19	0,19	1	1,5	6	+	+	-	-	-
16	Ülseratif kolit	-	0,25	0,19	0,50	1	1	+	+	-	-	C148A
17	Crohn	CİP	0,38	0,38	0,75	0,25	2	+	+	-	-	C148A
18	Malignite	MEM+CİP	0,50	0,50	0,75	2	2	+	+	-	-	C148A
19	Febril nötropeni	PIP/TZB+AK	0,25	0,19	0,50	1	1	+	+	-	-	-
20	Ülseratif kolit	CİP	0,25	0,19	0,50	1,5	1,5	+	+	-	-	-
21	Osteomyelit	SAM	0,25	0,19	0,50	0,50	1	+	+	-	-	-
22	Malignite	CRO+VA	0,38	0,19	0,75	2	2	+	+	-	-	-
23	Sepsis	İPM+TEC	0,38	0,25	0,50	1	1,5	+	+	-	-	C148A
24	Malignite	İPM+VA	0,50	0,50	0,75	1	0,75	+	+	-	-	-
25	Pnömoni	MOX	0,38	0,25	1	1,5	1,5	+	+	-	-	-

No	Tanı	Antibiyotik kullanımı	Antibiyotik Duyarlılıkları (MİK, µg/ml)					Moleküler Karakterizasyon				tcdC Analizi
			VA	MTZ	MOX	E	CD	tcdA	tcdB	cdtA	cdtB	
26	Febril Nötropeni	PIP/TZB+AK	0,38	0,50	0,75	2	2	+	+	-		C148A
27	Malignite	ETP+CİP	0,25	0,125	0,50	0,38	0,50	+	+	-	-	C148A
28	Sepsis	İPM+TEC	0,38	0,094	0,75	0,38	0,75	+	+	-	-	-
29	Primer peritonit	TEC	0,38	0,25	0,75	2	2	+	+	-	-	-
30	Febril nötropeni	İPM+TEC	0,50	0,50	0,75	1	0,75	+	+	-	-	-
31	İdrar yolu enfeksiyonu	FEP+CİP	0,19	0,19	0,50	1,5	3	+	+	-	-	-
32	Osteomyelit	PIP/TZB	0,38	0,125	1	1,5	1	+	+	-	-	C148A
33	İdrar yolu enfeksiyonu	CAZ+İPM	0,19	0,38	0,75	1,5	4	+	+	-	-	-
34	Sepsis	İPM+TEC	0,38	0,38	1	2	4	+	+	-	-	-
35	Lenfoma	ETP	0,25	0,19	0,38	>256	>256	+	+	-	-	-
36	Yumuşak doku enf.	SAM	0,19	0,19	>32	1	4	+	+	-	-	-
37	Kolanjit	CRO	0,38	0,25	0,75	2	2	+	+	-	-	-
38	İdrar yolu enfeksiyonu	İPM+GN	0,38	0,25	1	1,5	1,5	+	+	-	-	-
39	*	CRO	0,25	0,75	1,5	2	0,75	+	+	-	-	-
40	*	LEV	0,50	0,50	0,50	1,5	4	+	+	-	-	-
41	*	SAM	0,38	0,38	0,75	1,5	3	+	+	-	-	-
42	*	CXM	0,38	0,50	1	2	2	+	+	-	-	-
43	*	AMX	0,38	0,50	1	2	3	+	+	-	-	C148A
44	*	CFM	0,25	0,38	0,75	1,5	1,5	+	+	-	-	-
45	*	CXM	0,25	0,38	0,50	3	2	+	+	-	-	-
46	Kronik ishal	CİP	0,25	0,25	0,50	1,5	1,5	+	+	+	+	Δ54+G378A
47	*	AMX	1,5	0,50	0,50	2	2	+	+	-	-	C148A
48	*	CXM	0,25	0,25	0,50	2	4	+	+	-	-	-
49	*	MOX	0,19	0,19	0,38	0,50	2	+	+	-	-	-
50	*	CFM	0,25	0,19	0,50	1,5	1	+	+	-	-	-

No	Tanı	Antibiyotik kullanımı	Antibiyotik Duyarlılıkları (MİK, µg/ml)					Moleküler Karakterizasyon				<i>tcdC</i> Analizi
			VA	MTZ	MOX	E	CD	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	
51	*	CRO	0,38	0,25	0,50	2	0,75	+	+	-	-	C148A
52	*	GN	0,50	0,50	0,25	2	2	+	+	-	-	-
53	*	CXM	0,25	0,19	0,75	1	1	+	+	-	-	-
54	*	SAM	0,25	0,25	>32	1	1	+	+	-	-	-
55	*	-	0,50	0,50	0,25	1	0,38	+	+	-	-	A150G
56	*	CFM	0,19	0,25	>32	1	4	+	+	-	-	-
57	*	AMC	0,25	0,19	0,38	1,5	1	+	+	-	-	-
58	*	CFM	0,25	0,19	0,50	1,5	1	+	+	-	-	-
59	*	-	0,19	0,25	0,50	2	4	+	+	-	-	-
60	*	CTX	0,25	0,19	0,50	3	4	+	+	-	-	-
61	*	-	0,50	0,50	0,50	3	4	+	+	-	-	-

*DLG hastaları olup altta yatan hastalıklar bilinmemektedir. Kısaltmalar: VA: Vankomisin, TEC: Teikoplanin, PIP/TZB: Piperasilin tazobaktam, AK: Amikasin, MEM: Meropenem, GN: Gentamisin, SAM: Ampisilin sulbaktam, IPM: İmipenem, CRO: Seftriakson, CİP: Siprofloksasin, ETP: Ertapenem; AMC: Amoksisilin klavulonik asit, CES: Sefoperazon sülbaktam, AMX: Amoksisilin, MOX: Moksifloksasin, FEB: Sefepim, CAZ: Seftazidim, LEV: Levofloksasin, CXM: Sefuroksim.

5. TARTIŞMA

C. difficile'ye bağlı ishal oluşumunda antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörüdür. *C. difficile* enfeksiyonlu hastalarda kullanılan antibiyotikler, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanede servisler arasında bile farklılık göstermektedir (Poxton ve ark., 2001). Kinolonlar, linkozamidler, karbapenemler, 2–4. kuşak sefalosporinler, *C. difficile* enfeksiyonu için yüksek riskli, beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları ise orta riskli antibiyotiklerdir (Mullane ve ark., 2011). Macaristan'da yapılan bir çalışmada, en sık olarak beta-laktam grubu antibiyotiklerin, ikinci olarak da kinolon kullanımının *C. difficile* enfeksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Urban ve ark., 2002). İsveç'te beş büyük hastanenin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol, piperasilin, sefalosporinler ve klindamisin kullanılmasıyla *C. difficile* enfeksiyonu riskinin arttığı gösterilmiştir (Wiström ve ark., 2001).

Ülkemizde Erciş ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, PME'li 68 hastanın 32'sinin (%47,1) beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarını kullandığı, 12'sinin (%17,6) aminoglikozid ve 8'inin (%11,8) sefalosporin kullandığı bildirilmiştir. Deniz ve ark.'nın (2011) yaptıkları çalışmada, toksijenik *C. difficile* izole edilen 36 hastanın 28'inde (%77,8) beta-laktam grubu (penisilin, sefalosporin ve imipenem) antibiyotik kullanım öyküsü olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda ise *C. difficile* izole edilen hastaların antibiyotik kullanımları sorgulandığında; ulaşılabilen hastaların 55'inde (%90,1) antibiyotik kullanma öyküsü bulunmaktadır. Antibiyotik kullanan hastaların 36'sında (%65) tekli, 19'unda (%35) ikili antibiyotik kullanım öyküsü mevcuttur. Kullanılan antibiyotikler içerisinde 18 hastada (%29,5) sefalosporin, 15'inde (%24,5) karbapenem grubu antibiyotikler, 14'ünde (%22,9) penisilin grubu antibiyotikler, onunda(%16,3) florokinolonlar, dokuzunda (%14,7) aminoglikozidler ve sekizinde (%13,1) glikopeptidler yer almaktadır.

Metronidazol ve vankomisin *C. difficile* enfeksiyonlarının standart tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Her iki antibiyotiğin eşit etkiye sahip olduğu, her ikisinin kullanımında %15 - 35 oranında nüks gerçekteştiği bildirilmiştir. Pahalı olması, sadece ağızdan alındığında etkinliğini göstermesi ve vankomisine dirençli enterokokların seçilmesine yol açması nedeniyle vankomisin tedavide ilk seçenek olmamakta, metronidazolün kullanılması daha çok tercih edilmektedir (Huang ve ark., 2009). Bazı merkezlerde tedavide

metronidazolün kullanılması sırasında klinik yanıtızlıklar söz konusu olmuştur. Peláez ve ark. (2002) %6,3 oranında metronidazole dirençli bakteri saptamışlardır. İsrail’de yapılan bir çalışmada ise %2 oranında direnç bildirilmiştir (Bisharaa ve ark.,2006). Ancak, klinik yanıt ile in-vitro duyarlılık testleri arasında her zaman tam bir uyumluluk görülmemektedir. Uyumsuzluk, duyarlılık testlerinde serum ilaç konsantrasyonlarına göre kırılma noktası değerlerinin esas alınmasına bağlanabilir. Nitekim, antibiyotiklere yanıt vermeyen olgularda üretilen kökenlerin antibiyotiklere in-vitro duyarlı oldukları görülmüştür. Bu olgularda dışkıdaki metronidazol miktarının daha fazla belirleyici olduğu savunulmuş, ishalin şiddetine göre 1 g dışkıda 0,8 ile 24,2 µg arasında değişen antibiyotik düzeyleri bulunduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2009). Vankomisine dirençli tek köken 1991 yılında Polonya’da disk diffüzyon yöntemiyle yapılan çalışmada görülmüştür (Dworczyński ve ark., 1991). İlk yüksek vankomisin MİK düzeyine sahip *C. difficile* kökeni ise 1996’da tanımlanmıştır (Wong ve ark., 1999). Daha sonra Peláez ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada %3,1 oranında azalmış duyarlılık oranı bildirilmiştir. O zamandan günümüze azalmış duyarlılığa sahip kökenlerin sayısında yavaş ama gittikçe yükselen bir artış söz konusudur. İskoçya’da Mutlu ve ark.(2007), MİK değeri 4 mg /L olan kökenlerin sıklığının 1999 - 2000 yıllarında %2,7 iken, 2005 yılında %21,6’ya yükseldiğini göstermişlerdir. Kökenlerimizde metronidazole ve vankomisine direncin görülmemesi ve düşük MİK aralıklarına sahip olmaları yüz güldürücüdür.

Ackerman ve ark. (2003) *C. difficile* izolatlarında eritromisin direncini Macaristan’da %27; Spigaglia ve ark. (2011) Belçika, Fransa, Almanya, İngiltere, Yunanistan, Macaristan, İrlanda, İtalya, Polonya, İspanya, İsveç, İsviçre, Hollanda ve Türkiye’nin de aralarında olduğu çeşitli Avrupa ülkelerinde %48 ve Pituch ve ark. (2006) Polonya’da %49 olarak saptamıştır. Çin’de Huang ve ark.(2010) ise %85,3 olarak saptamıştır. Aynı çalışmalarda klindamisin direnci sırasıyla %36, %48, %49 ve %88,1 olarak saptanmıştır (Ackerman ve ark., 2003, Spigaglia ve ark., 2011, Pituch ve ark., 2006, Huang ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda eritromisin direnci %11,5; klindamisin direnci %29,5 olarak saptanmış olup bu oranlar diğer ülkelerdeki direnç oranından düşüktür.

C. difficile izolatlarında moksifloksasin direnci çeşitli araştırmalarda %12-61,8 arasında bildirilmiştir. Direnç oranları Avrupa ülkelerinde %12-20,1 sıklığında iken, Güney Kore ve Çin’de bu sıklık %42 ve %61, 8 olarak tespit edilmiştir (Ackerman ve ark.,2003, Spigaglia ve ark. 2011, Kim ve ark.,2010, Huang ve ark., 2010). Ülkemizde *C. difficile* izolatlarında

moksifloksasin direnci hakkında veri yoktur. Bizim çalışmamızda moksifloksasin direnci %4,9 olarak saptanmış olup diğer ülkelerdeki direnç oranından düşüktür.

Şaşmaz ve ark.(2002) birinci basamağa başvuran hastaların kayıtlarını inceledikleri çalışmada, hastalara en sık akut solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulduğu (% 32,4) ve başlıca penisilinlerin (% 56,1), makrolitlerin (% 21,9) ve sefalosporinlerin (% 11,5) reçete edildiğini saptamışlardır. İstanbul'da birinci basamakta çocuklarda antibiyotik kullanımını araştırıldığı bir başka çalışmada, 25 hekimin reçeteleri incelenmiş ve çocuklarına solunum yolu enfeksiyonu tanısı konan 352 ebeveynle yüz yüze görüşülmüştür. Bu çalışmaya göre üst solunum yolu enfeksiyonlarında en sık kullanılan antibiyotikler beta-laktamaz inhibitörlü penisilinler (% 38,8), sefalosporinler (% 16,4), penisilinler (% 11,9) ve makrolitler (% 11,2); alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık kullanılan antibiyotiklerse beta-laktamaz inhibitörlü penisilinler (% 52,4), makrolitler (% 20,6), penisilinler (% 9,5), sefalosporinler (% 4,8) olarak belirlenmiştir (Akici ve ark., 2004). Solunum yolu enfeksiyonu dışındaki enfeksiyonlarda da durum farklı değildir. Canbaz ve ark.'nın (2002) Samsun'da sağlık ocaklarında üriner sistem enfeksiyonlarında (ÜSE) antibiyotik kullanımını araştırdıkları çalışmada sekiz sağlık ocağı bölgesindeki 381 ÜSE ve 48 üretrit (429 ürogenital enfeksiyon) tanısı alan hasta incelenmiştir. En sık reçete edilen antibiyotiklerse ko-trimoksazol, kinolonlar ve gentamisin olarak belirlenmiştir. Karabay ve ark.(2008) Türkiye'de 2001- 2006 yılları arasında en sık tüketilen antibiyotiklerin sırasıyla penisilinler, sefalosporinler, makrolidler, linkozamidler, florokinolonlar ve tetrasiklinler olduğunu bildirmiştir. Uygunsuz ve gereksiz antibiyotik kullanımı dirençli suşların ortaya çıkması yanında ciddi ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Uygunsuz kullanılan antibiyotiklerle oluşacak yan etkiler ve tedavi başarısızlıklarından korunmak için de antibiyotiklerin akılcı kullanılması özendirilmelidir (Pechere, 2001). Görüldüğü gibi Türkiye'de eritromisin, klindamisin ve florokinolonların kullanımı oldukça yaygındır. İzolatlarımızda eritromisin, klindamisin ve moksifloksasine karşı göreceli olarak daha yüksek direnç bulunması bu durumla ilişkilendirilebilir.

Her geçen gün dünyanın çeşitli ülkelerinden virülansı yüksek ve antibiyotiklere daha dirençli *C. difficile* kökenlerine bağlı yeni hastane salgınları ve yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (Barbut ve ark., 2007). İzolatların epidemiyolojik analizlerin yapılabilmesi ve antibiyotiklere duyarlılık durumlarının saptanabilmesi için, kültür yapılması ve bakterilerin izole edilerek değerlendirilmesi gereklidir. Rutin tanıda ise kültür dışı yöntemler hızlı sonuç vermesi ve kullanım kolaylığı açısından tercih edilmektedir. Bu nedenle, direnç oranlarının belirlenmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesi ancak araştırma yapılması ile mümkün

olmaktadır. Mevcut veriler en azından şimdilik ülkemizde, *C. difficile*'ye bağlı ishal tedavisinde en fazla kullanılan metronidazol ve vankomisine karşı bir direnç tehlikesi olmadığını göstermektedir. Ancak, kökenlerimiz ülkemizde sık kullanılan antibiyotikler olan klindamisin ve eritromisine görece dirençli bulunmuştur. Çalışmaların son derece kısıtlı olduğu ülkemizde verilerimizin, diğer çalışmalara da ışık tutacağına inanıyoruz.

Ülkemizde yapılan ve *C. difficile* toksin varlığını araştıran çalışmalar farklı oranlarda toksin pozitifliği belirlemişlerdir. Büyükbaba ve ark. (2003) İmmunoCard Toksin A (Meridian Diagnostic) kullanarak yaptıkları bir çalışmada 360 hastanın dışkı örneğinde toksin A varlığını % 4,7, daha sonra ELISA yöntemiyle yaptıklarında ise 400 hastada Toksin A/B varlığını %12 olarak saptamışlardır. Aygün ve ark. (2002) ise hastalarının dışkı örneklerinde, ELISA yöntemiyle toksin A/B pozitiflik oranını % 3,2 bulmuşlardır. Altındış ve ark. (2007) 91 hastanın 13'ünde (%14,3) toksin A/B'yi pozitif olarak belirlemişlerdir. Marmara Üniversitesi'nde Söyletir ve ark.'nın (1996) yapmış oldukları çalışmada, *C. difficile* kolonizasyon oranı % 6,9 (14/202) bulunmuştur. Daha sonra 2006-2008 yılları arasında Deniz ve ark.'larının (2011) gerçekleştirdikleri çalışmada ise 633 hastaya ait dışkı örneğinin 30'unda (%4,7) "ImmunoCard Toxins A&B EIA" kiti ile toksin A/B tespit edilmiştir. Aynı zamanda çalışmaya alınan tüm dışkı örneklerine toksijenik kültür uygulanmış, hastaların 50'sinden *C. difficile* üretilmiş, ve bu kökenlerin 36'sında (%5,7) toksin A ve toksin B genleri tespit edilmiş, "binary" toksin geni bulunmamıştır (Deniz ve ark., 2011). Bizim çalışmamıza sadece toksin pozitif bulunan dışkı örnekleri alındığından tüm enfeksiyöz ishallerdeki sıklığı araştırılmamıştır.

Son yıllarda pek çok dünya ülkesinde *C. difficile* enfeksiyonu artışına paralel olarak hastanelerde, *C. difficile* ribotip 027/ NAP1/BI ve *tcdA-/tcdB+* gibi birtakım varyant izolatlarla bağlı salgınlar da yüksek oranda görülmeye başlanmıştır. Yüksek mortaliteye neden olan bu hipervirülan kökenlerin sıklığı ülkeler arasında değişmektedir (McDonald ve ark., 2005; Cohen ve ark., 2011; Bauer ve ark., 2011). Şu ana kadar ülkemizden varyant kökenlerin ve "binary" toksin pozitif kökenlerin varlığını bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 14 Avrupa ülkesinin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, toksijenik 354 suşun % 24,3'ünün varyant gene sahip olduğu ve bu toksijenik kökenlerin %17,2'sinde "binary" toksin gen ekspresyonu sergileyen suşlar olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmaya ülkemizden gönderilen izolatların hiçbirinde bu genlere rastlanmamıştır (Barbut ve ark., 2007). Uludağ Üniversitesi'nden Ergen ve ark.(2009) tarafından gerçekleştirilen, hastane kaynaklı ishallerde yapılan araştırmada *C. difficile*

enfeksiyonu hastalarına ait izolatlarda “binary” toksin pozitifliği saptanmamıştır. Aynı şekilde, Marmara Üniversitesi’nde Deniz ve ark. (2011) yaptığı çalışmada, *C. difficile* izolatlarının hiçbirinde “binary” toksin genine veya varyant gene rastlanmamıştır. “Binary” toksin prevalansı farklı çalışmalarda % 6-23 arasında bildirilmiştir (Persson ve ark., 2008; Geric ve ark., 2003; Pituch ve ark., 2005; Kim ve ark., 2010; Goncalves ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda “binary” toksin prevalansı % 1,6 olarak saptanmış olup ülkemizdeki ilk “binary” toksin izole edilen suş olma niteliğini taşımaktadır. Bu köken, DLG’den alınan bir dışkı örneğinden izole edilmiş, hipervirülan olduğunun Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından doğrulanmasından sonra hasta özellikleri araştırılmıştır. İzolat, Tokat’ta özel bir hastaneye 18.06.2013 tarihinde ishal şikayetiyle ayaktan başvuran 85 yaşındaki erkek hastaya aittir. Hastanın anamnezinde bir ay önce kronik ishal nedeniyle hastaneye yatış öyküsü bulunmaktadır. Lökositozu olmayan hastaya siprofloksasin ve metronidazol başlanmış, ancak iyileşme olmaması üzerine hastaya kolonoskopi yapılmıştır. Kolonoskopide kolonda ülser ile uyumlu bulgulara rastlanılmıştır. Aynı dönemde DLG’ye (19.06.2013 tarihinde) gönderilen dışkı örneğinde *C. difficile* toksin pozitifliği tespit edilmiştir. Hastaya oral vankomisin tedavisi başlanmış ve hastada semptomlar düzelmiştir.

tcdC geni iki major *C. difficile* toksini olan toksin A ve toksin B’nin negatif regülatörüdür ve bu genin inaktivasyonu baskılamının ortadan kalkmasına bağlı olarak daha ağır enfeksiyonlara ve epidemik salgınlara neden olmaktadır. Bu gendeki defektler artmış toksin ekspresyonuna neden olmakta ve bu durum, suşlardaki göreceli olarak yüksek patojeniteyi açıklamaktadır. *tcdC* geninde bugüne kadar çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında 18, 39 veya 54 bç.’lik delesyonlar; 117.pozisyonundaki tek baz çifti delesyonu sonucu meydana gelen prematür stop kodonu oluşumu; 10 ve 17. pozisyonlardaki adeninler arasında tek baz delesyonu ve sonuçta meydana gelen çerçeve kayması mutasyonu; 184. pozisyonunda sitozin→timin değişimi ile stop kodonunun oluşumu örnek olarak verilebilir (Persson ve ark., 2008). Bu çalışmada Persson ve ark. (2008) 54 bç.’lik delesyona dört suşta (%10,2) rastlamıştır. Bu mutasyonlar çerçeve kayması şeklindedir ve bizim çalışmamızda gösterilen 54 baz çiftlik mutasyondan farklıdır. Yine Fenner ve ark.’nın (2008) yaptıkları çalışmada 102 toksijenik izolatın 19’unda (%18,7) *tcdC* geninde 18 bç. delesyon, sekizinde (%7,8) 39 bç. delesyon ve birinde (%1) 54 bç. delesyon saptanmıştır; çerçeve kayması şeklinde olan ve prematür stop kodonu oluşumuna yol açan bu 54 bç. mutasyon bizim çalışmamızda gösterilen 54 bç.’lik mutasyondan farklıdır. Öte yandan, Bouvet ve Popoff’un (2008) yaptıkları çalışmada 57 toksijenik izolat arasından 23’ünde (%40,3) *tcdC* geninde 39

bç. delesyon, dokuzunda (%15,7) 18 bç. delesyonla birlikte 117.pozisyonda delesyon, altısında (%10,5) 54 bç. delesyon, üçünde (%5,2) 18 bç. delesyon ve ikisinde (%3,5) 36 bç. delesyon saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen 54 bç. delesyon çalışmamızda saptanan ile aynı olup 313-366. pozisyondaki nükleotitler arasındadır. Bizim çalışmamızda *tcdC* geni dizi analizi sonucunda bir izolatta (%1,6) 313-366. pozisyondaki nükleotitlerin delesyonu ile 105-122. aminoasitlerin budanmasına yol açan 54 baz çiftlik delesyon tespit edilen izolatta aynı zamanda G 378A değişimi (Glu→Glu) de saptanmıştır. Elde edilen dizi Gen bankasına 1843798 erişim numarasıyla kaydedilmiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na gönderilen bu izolat referans laboratuvar tarafından da doğrulanmış ve “binary” toksin üreten ribotip 027 dışı bir hipervirülan *C. difficile* suşu olduğuna karar verilmiştir.

Çalışmamızda ayrıca on izolatta (%16,4) G148T (Ala→Ser), bir izolatta T150C (Ala→Ala) ve bir izolatta C414A değişimi (Asp→Glu) saptanmıştır. Elde edilen diziler Gen bankasına sırasıyla 1843207, 1843786 ve 1843801erişim numaralarıyla kaydedilmiştir. Bu değişikliklerden G148T daha önce de bildirilmiş olmakla birlikte, diğerlerine ait veriye rastlanmamıştır (Curry ve ark., 2007).

Ekim 2003 ve Haziran 2004 arasında İngiltere’de bilinen ilk ribotip 027 salgını Stoke Mandeville Hastanesi’nde meydana gelmiştir. 174 vakayı içeren bu salgında 19 ölüm (%11) vakası bildirilmiştir (Smith, 2005). 2005 yılında Avrupa *C. difficile* çalışma grubunun yaptığı bir çalışmaya göre tüm toksijenik izolatlar arasında ribotip 027 sıklığı %6 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ribotip 027 İrlanda, Belçika ve Hollanda’dan bildirilmiştir (Barbut ve ark., 2007). 2007 yılındaki artmış surveyans çalışmaları ve ribotipleme çalışmaları neticesinde *C. difficile* enfeksiyonu enfeksiyonu insidansı ve ribotip 027 görülme sıklığı artmıştır. On bir Avrupa Birliği ülkesini etkilemiş ve ribotip 027’nin hastanelerde görülme oranları %11 (İskoçya) ile %100 (İrlanda) arasında değişmiştir. Ancak bu çalışmalarda surveyans yöntemleri arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir (Kuijper ve ark., 2007). Bir yıl sonra Temmuz 2008’de Belçika, Almanya, Finlandiya, Fransa, İrlanda, Luksemburg, Hollanda, İsviçre ve İngiltere’de salgınlarla seyreden ve 16 Avrupa ülkesini de içine alan bir *C. difficile* ribotip 027 salgını görülmüştür (Kuijper ve ark., 2008).

C. difficile ribotip 027 salgınları Avrupa dışında Amerika kıtasında da meydana gelmiştir. 2001-2004 yılları arasında Kanada’da yapılan bir çalışmada ribotip 027 hastane izolatlarının Montreal, Alberta ve İngiliz Columbia’sında sırasıyla %75,2, %7,4 ve %5,9’unu oluşturmuştur. Her üç bölgede de ribotip 027’nin yaygın ribotip olduğu saptanmıştır

(MacCannell ve ark., 2006). 2006-2009 yılları arasında ABD'den 25 eyalet ve 45 farklı bölgeden değerlendirilen *C. difficile* enfeksiyonu vakalarında izolatların %54'ü *C. difficile* ribotip 027 olarak saptanmıştır, ayrıca eyaletlerin %80'inde ve hastanelerin %82'sinde ribotip 027'ye rastlanmıştır (Cheknis ve ark., 2009).

C. difficile ribotip 027 oldukça virulan ve öldürücüdür. Danimarka'da yapılan bir çalışmada elde edilen verilere göre, ribotip 027 yüksek mortaliteli *C. difficile* enfeksiyonlarında tek başına anahtar rol üstlenmemektedir. Öyle ki “binary” toksin üreten ribotip 027 dışı suşlar da ribotip 027 suşlarına benzer şekilde 30 günlük mortalite ile ilişkili bulunmuştur. 193 toksin A, toksin B ve “binary” toksin ürettiği saptanan ribotip 027 suşu; 72 toksin A, toksin B ve “binary” toksin ürettiği saptanan ribotip 027 dışı suş ve 212 toksin A, toksin B üreten “binary” toksin üretmeyen *C. difficile* suşu değerlendirildiğinde, 30 günlük mortalite “binary” toksin üreten suşlarda %28 iken, toksin A ve B üreten fakat “binary” toksin üretmeyen suşlarda %17 olarak saptanmıştır. Ribotip 027 olmaksızın “binary” toksin üreten suşlarda sadece toksin A ve B üreten suşlara göre yaş, cinsiyet ve coğrafik alana göre düzeltilmiş tahmini rölatif risk %60 daha fazla olarak bildirilmiştir (Bacci ve ark., 2011).

Bizim çalışmamızda yapılan PZR ribotipleme neticesinde *C. difficile* ribotip 027'ye rastlanmamıştır ancak “binary” toksin üreten hipervirulan bir suş tespit edilmiştir. Bu nedenle etkenin epidemiyolojisini anlamak ve hipervirulan suşların kaynağı ve yayılımını belirleyebilmek için ülkemizde çok merkezli çalışmaların yapılması gereklidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Suşların hepsi vankomisin ve metronidazole duyarlı bulunmuştur. Önemli bir hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olan bu anaerob bakteri için birinci seçenek tedavi ajanlarına direnç tespit edilmemiştir.
2. Hipervirülan suşların önemli bir özelliği olan florokinolon direnci üç hastada (%4,9) tespit edilmiş, bu suşların hepsi klasik tip *C. difficile* suşu olarak tanımlanmıştır.
3. Suşların %70,5'i klindamisine, %88,5'i ise eritromisine duyarlı bulunmuştur. Bu iki antimikrobiyal Avrupa Birliği EUCAST kriterleri içerisinde bu mikroorganizma için değerlendirilmemektedir. Eritromisin 2007 yılından sonra ABD CLSI kriterlerinden çıkartılmıştır, ancak klindamisin hala bir alternatif olarak yer almaktadır. Ancak çalışmalarda direnç oranları belirtildiğinden çalışmamızda da duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Tedavi seçeneği olarak öncelikle düşünülmemeleri yerindedir.
4. Suşların hepsi beklendiği üzere toksinojenik bulunmuştur .
5. Toplam 61 *C. difficile* suşunun birinde (%1,6) “binary” toksin kodlayan *cdtA* ve *cdtB* geni varlığı saptanmıştır. Bu izolat ülkemizde saptanan ilk “binary” toksin pozitif hipervirülan kökendir.
6. *tcdC* geni dizi analizi sonucunda “binary” toksin ürettiği tespit edilen bir izolatta (%1,6) 105-122. aminoasitlerin budanmasına yol açan 54 bç'lik delesyon ve 378G/A değişimi (Glu→Glu) saptanmıştır. On izolatta (%16,4) 148G/T (Ala→Ser), bir izolatta 150T/C (Ala→Ala) ve bir izolatta 414 C/A değişimi (Asp→Glu) saptanmıştır. Elde edilen diziler Gen bankasına 1843798, 1843207, 1843786 ve 1843801 erişim numaralarıyla kaydedilmiştir. Bu değişikliklerden G148T daha önce de bildirilmiş olmakla birlikte, diğerlerine ait veriye henüz rastlanmamıştır.
7. Avrupa ülkelerinde yaygın olarak bulunan ribotip 027 suşuna rastlanmamıştır. Ancak tüm dünyada yaygın olarak bulunan *C. difficile* ribotip 027 için ülkemiz gerek popülasyonun yaşlanması gerekse de yaygın global göç nedeniyle risk altındadır. Çok merkezli ve kapsamlı çalışmaların yapılması ve surveyans çalışmalarının devam etmesi gerekmektedir.

ÖZET

Ankara'daki Çeşitli Hastanelerde Değişik Yöntemler ile Toksin Pozitifliği Saptanan Dışkı Örneklerinden Elde Edilen *Clostridium difficile* İzolatlarının Toksin Genlerinin Araştırılması, PCR Ribotiplendirimi ve Ribotipler ile Antimikrobiyal Duyarlılıkları Arasındaki İlişkinin Ortaya Çıkarılması

Clostridium difficile günümüzde en yaygın nozokomiyal enfeksiyonlardan birisidir. Yüksek düzeyde toksin üreten hipervirülan *C. difficile* suşları (PZR ribotip 027) daha yüksek sporlanma oranı ve florokinolonlara direnç ile karakterizedir. *C. difficile* PZR ribotip 027 nedeniyle oluşan enfeksiyon ayrıca daha yüksek morbidite ve mortalite, komplikasyonlar ve relaps oranları ile seyretmektedir. *C. difficile* PZR 027 veya oldukça patojenik suş etkilenmemiş bir ülkeye giriş yapmışsa, ağır bir *C. difficile* bir salgınına yol açmadan önce identifiye edilmelidir aksi takdirde kolektomilere, ölümlere ve sağlık servislerinde olağanüstü maliyetlere neden olabilmektedir. Etkilenmemiş ülkelerde riski azaltmak ve gelecek salgınların sonuçlarını hafifletmek için kanıta dayalı bir yaklaşım ile etkenin araştırılmasına yönelik sürveyans çalışmaları uygulanmalıdır. Bu amaçla Ankara'daki çeşitli hastanelerde (AÜTF ve HÜTF hastaneleri) yatan ve ishal şikayeti olan hastalardan *C. difficile* enfeksiyonu şüphesi ile özel laboratuvara (DLG) gönderilen dışkı örnekleri toplanmıştır. Dışkı örneklerinden *C. difficile* izolasyonunu takiben elde edilen kökenlerden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve antimikrobiyal duyarlılıkları ve toksin genleri varlığı araştırılmıştır.

Suşların hepsinin vankomisin ve metronidazole duyarlı olduğu saptanmıştır. Üç izolatın moksifloksasin için MİK değerleri $>4\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve dirençli kabul edilmiştir. Bir izolat klindamisine dirençli bulunurken (MİK değeri $>256\ \mu\text{g/ml}$), iki izolatın eritromisin direnci (MİK değeri $>256\ \mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir. On yedi izolatın klindamisin için MİK değeri $2-8\ \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve orta duyarlı kabul edilmiştir. Beş izolatın eritromisin için MİK değeri $2-8\ \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve orta duyarlı kabul edilmiştir.

Suşların hepsi *tcdA* ve *tcdB* genleri pozitif bulunmuştur. Altmış bir *C. difficile* suşunun birinde(%1,6) *cdtA* ve *cdtB* genleri tespit edilmiştir. *tcdC* geninde *C. difficile* PZR ribotip 027 için tanımlanmış delesyon ve diğer nadir tek nükleotit polimorfizmlerinin varlığının araştırılması için iki yönlü DNA dizi analizi gerçekleştirilmiş ve birinde 54 bç'lik bir delesyon saptanmıştır. Ayrıca 12 suşta çeşitli tek nükleotid polimorfizmleri saptanmıştır. Değerlendirilen suşlar içerisinde PZR ribotip 027'ye rastlanılmamıştır ancak ülkemizde ilk hipervirülan suş tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, antimikrobiyal direnç, gradyent test, toksin genleri, ribotip

SUMMARY

Molecular Characterization of Toxin Genes in *Clostridium difficile* Isolates from Toxin Positive Stool Samples Obtained by Different Methods from Several Hospitals in Ankara and Association Between PCR Ribotypes and Antimicrobial Susceptibility Among *Clostridium difficile* Isolates

Clostridium difficile infection is one of the most common hospital-acquired infections. Hypervirulent strains of *C. difficile* which produce toxins at high levels (PCR ribotype 027) and are characterized by a high sporulation ratio and higher resistance rates for fluoroquinolones. Infections caused by *C. difficile* PCR ribotype 027 also have higher morbidity and mortality, more complications and relapses. If highly pathogenic strains of *C. difficile* such as ribotype 027 arise in a country, it should be identified before causing a severe outbreak. Otherwise it can lead to the serious morbidities such as colectomies, increase in mortalities and remarkable costs in health services. To reduce the risk in the unaffected countries and mitigate the consequences of future outbreaks, surveillance activities should be implemented in order to investigate the factors through evidence based medicine.

In this study fecal samples were collected from inpatients hospitalized at different hospitals in Ankara (Ankara University School of Medicine and Hacettepe University School of Medicine) and from who applied to a Private Laboratory (Düzen Laboratory Groups) in Ankara. After isolating *C. difficile* from fecal samples, DNA of the isolates were extracted. Antimicrobial susceptibility and presence of toxin genes were investigated.

All of the strains were found to be susceptible to vancomycin and metronidazole. Three strains had a minimum inhibitory concentration (MIC) of >4 $\mu\text{g/ml}$ and were resistant to moxifloxacin. One strain had a minimum inhibitory concentration (MIC) of >256 $\mu\text{g/ml}$ and was resistant to clindamycin also two strains had a minimum inhibitory concentration (MIC) of >256 $\mu\text{g/ml}$ and were resistant to erythromycin. Seventeen isolates had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2-8 $\mu\text{g/ml}$ and were intermediate to

clindamycin also five strains had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2-8 µg/ml and were intermediate to erythromycin.

All of the strains were found to carry *tcdA* and *tcdB* genes. On the other hand, only one *C. difficile* strain (1.6%) was found to carry the “binary” toxin (*cdtA* and *cdtB*) genes in 61 strains.

Bi-directional DNA sequence analysis was performed on the amplified *tcdC* gene in order to investigate the presence of deletion which defines the PCR ribotype 027 strains and other rare single nucleotide polymorphisms. One *C. difficile* strain was found to carry a 54 bp deletion also 12 strains were found to carry various single nucleotide polymorphisms. In the evaluated strains, PCR ribotype 027 wasn't detected but there was the first hypervirulent strain in Turkey.

Key Words: *Clostridium difficile*, antimicrobial resistance, gradient test, toxin genes, ribotype.

KAYNAKLAR

Ackermann G, Degner A, Cohen S, Silva, Rodloff A. Prevalence and association of macrolide–lincosamide– streptogramin B (MLS_B) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51: 599–603.

Akici A, Kalaca S, Ugurlu MU, Oktay S: Prescribing habits of general practitioners in the treatment of childhood respiratory-tract infections. European Journal of Clinical Pharmacology 2004;60:211-6.

Allen SD, Emery CL, Lysterly DM. Clostridium. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press. 2003:835-856.

Altundiş M, Usluer S, Çiftçi Hİ, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe CO. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 2007;41:29-37.

Ananthkrishnan AN. *Clostridiumdifficile* infection: epidemiology, risk factors and management. Nature Reviews Gastroenterology &Hepatology 2011; 8: 17-26.

Arzese A, Trani G, Riul L, Botta G.Rapid polymerase chain reaction method for specific detection of toxigenic *Clostridiumdifficile*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 1995;14:716-719.

Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes 2014;5:579-593.

Ayarcı A, Özakın C, Oral B, İlbaşı A, Sınırtaş M, Sığırlı D ve Akalın H. İshalli Olgularda *Clostridium difficile* Toksin Pozitifliğinin Retrospektif Analizi. Türk Mirobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2012; 42:10-15.

Aygun G, Yılmaz M, Yasar H, Aslan M, Polat E, Midilli K, Ozturk R, Altas K. Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? The Journal of Hospital Infection 2005; 60:283-5.

Aygün G, Aslan M, Yağar H, Altaş K. Hastanede Yatarken Gelişen İshal Olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B Araştırılması. Ankem Dergisi 2002; 16:82-84.

Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerging Infectious Disease* 2011;17:976-982.

Balaban N, Karahan ZC, Koca Y, Güvener E: *Clostridium difficile*ye bağlı infeksiyonların tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2001; 35: 211.

Barbara G, Johnson S, Gerding D, Grabnar M, Rupnik M. Frequency of Binary Toxin Genes among *Clostridium difficile* Strains That Do Not Produce Large Clostridial Toxins. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 5227–5232.

Barbut F, Mastrantonio P, Delmée 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. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13: 1048-57.

Barnett JS. *Clostridium difficile*: a new look at an old but increasingly deadly infection. *Journal of the American Academy of Physician Assistants* 2012; 25: 32-6.

Barrasso L. A, Wang S. Z, Phelps C. J, Johnson J.L, Wilkins T. D. Nucleotide sequence of *C. difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. *Medical Microbiology and Immunology* 1990;179:271-279.

Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004; 68:373- 402.

Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Annals of Internal Medicine* 2006;145:758–64.

Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England Journal of Medicine* 2002;346:334-339.

Bartlett JG. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infectious Diseases* 2004;2:670-677.

Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ; ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011; 377: 63-73.

Bélangier SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 2:41-47.

Bergogne-Berezin E. Treatment and prevention of Antibiotic Associated diarrhea. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000;16:521-526.

Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *The Journal of Hospital Infection* 1998;40:1-15.

Bisharaa J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samrac Z. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2006; 54: 141–144.

Boland GW, Lee MJ, Cats AM, Gaa JA, Saini S, Mueller PR. Antibiotic-induced diarrhea: Specificity of abdominal CT for the diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Radiology* 1994;191:103-106.

Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier LC, Tamayo R, Burrus V. Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 2015;197:819-832.

Bouvet P.J.M, Popoff M.R. Genetic Relatedness of *Clostridium difficile* Isolates from Various Origins Determined by Triple-Locus Sequence Analysis Based on Toxin Regulatory Genes *tcdC*, *tcdR*, and *cdtR*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 3703–3713.

Boyanton BL Jr, Sural P, Loomis CR, Pesta C, Gonzalez-Krellwitz L, Robinson-Dunn B, Riska P. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50: 640-645.

Boyce JM, Pittet D; Society for Healthcare Epidemiology of America, Association for Professionals in Infection Control, and Infectious Diseases Society of America. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and reports* 2002;51:1–45.

Brazier JS, Duerden BI, Hall V, Salmon JE, Hood J, Brett MM, Brett M, McLauchlin J, George RC. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from infections associated with

the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. *Journal of Medical Microbiology* 2002;51:985-989.

Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;41:29-40.

Bruins MJ, Verbeek E, Wallinga JA, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, Bloembergen P. Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 2012; 31: 3035-3039.

Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology* 2000;95:3137-3141.

Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26:604-630.

Büyükbaba B. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2003;32: 220-224.

Campbell RJ, Giljahn L, Machesky K, Cibulskas-White K, Lane LM, Porter K, Paulson JO, Smith FW, McDonald LC. *Clostridium difficile* infection in Ohio hospitals and nursing homes during 2006. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2009;30:526–533.

Canbaz S, Peksen Y, Tefvik Sunter A, Leblebicioglu H, Sunbul M: Antibiotic prescribing and urinary tract infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002;20:407-411.

Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual Review of Microbiology* 2011; 65: 501-21.

Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. *Anaerobe* 2011; 17: 170-4.

Carson KC, Boseiwaqa LV, Thean SK, Foster NF, Riley TV. Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens – a comparison of chromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. *Journal of Medical Microbiology* 2013;62:1423-1427.

Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. *Gut Microbes* 2010; 1: 58–64.

Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends in Microbiology* 2012;20:21-29.

Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI. . Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *Journal of Bacteriology* 2007;189:7290–7301.

Cerquetti M, Luzzi I. , Caprioli A. , Sebastianelli A, Mastrantonio P. Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1995;14: 598-603.

Chaves-Olarte E, Weidmann M, Eichel-Streiber C, Thelestam M. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1997;100:1734–1741.

Chekis, A. K., W. E. Zukowski, L. A. Petrella, K. J. Nagaro, S. P. Sambol, I. Figueroa, L. Q. Li, E. Perdue, S. P. Gelone, S. Johnson, and D. N. Gerding. 2009. Prevalence of REA types of *Clostridium difficile* from U.S. hospitals (2006-2009), abstr. K-2075. Abstr. 49th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, San Francisco, CA.

Cheng VC, Yam WC, Lam OT, Tsang JL, Tse EY, Siu GK, Chan JF, Tse H, To KK, Tai JW, Ho PL, Yuen KY. *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011; 30: 1371-1381.

Ciaran P, LaMont J. *Clostridium difficile*. More difficult than ever. *The New England Journal of Medicine* 2008;359:1932-1940.

Climo MW, Israel DS, Wong ES, Williams D, Coudron P, Markowitz SM. Hospital-wide restriction of clindamycin: Effect on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and cost. *Annals of Internal Medicine* 1998;128:989-995.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth Informational Supplement, CLSI Document M100-S25, CLSI, Wayne PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement, CLSI Document M100-S17, CLSI, Wayne PA.

Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2010; 31: 431-55.

Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15: 1053-66.

Curry S.R, Marsh J.W, Muto C.A, O'Leary M.M, Pasculle A.W, Harrison L.H. *tcdC* Genotypes Associated with Severe TcdC Truncation in an Epidemic Clone and Other Strains of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 215–221.

Delme'e M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection* 2001;7:411-416.

Deniz U, Ulger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Investigation of toxin genes of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitalized patients with diarrhoea at Marmara University Hospital. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2011;45:1-10.

Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *The Journal of the American Medical Association* 2005;294: 2989–2995.

Dubberke ER, Olsen MA. Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55:88–92.

Dworczyński A, Sokół B, Meisel-Mikołajczyk F. Antibiotic resistance of *Clostridium difficile* isolates. *Cytobios* 1991; 65: 149-153.

Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* *tcdB*, and a

glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:3211–3217.

Ercis, S., Ergin, A., Hascelik, G., Six years evaluation of *Clostridium difficile* associated diarrhea, *Mikrobiyoloji Bülteni* 2004;38:45-50.

Ergen EK, Akalin H, Yilmaz E, Sinirtaş M, Alver O, Heper Y, Ozakin C, Bakker D, Ener B, Mistik R, Helvaci S, Kuijper EJ. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2009;39:382-387.

European committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. 2015. Erişim adresi: [<http://www.eucast.org>] . Erişim tarihi: 27/11/2015.

Feghaly RE, Stauber JL, Tarr PI, Haslam DB. Viral co-infections are common and are associated with higher bacterial burden in children with *Clostridium difficile* infection. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2013;57:813–816.

Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *The American Journal of Gastroenterology* 1997;92:739-750.

Fekety R, Shah AB. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Journal of the American Medical Association* 1993;269: 71–75.

Fenner L, Frei R, Gregory M, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease at University Hospital Basel including molecular characterisation of the isolates 2006-2007. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 2008;27:1201-1207.

Foster NF, Riley TV. Improved recovery of *Clostridium difficile* spores with the incorporation of synthetic taurocholate in cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA). *Pathology* 2012;44:354-356

Freeman J, Bauer M.P, Baines S.D, Corver.J, Fawley W.N, Goorhuis B, Kuijper E.J, Wilcox M.H. The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;23:529-549.

Freeman, J., Fawley W.N, Baines S, Wilcox M. Measurement of toxin production by *Clostridium difficile*. Lancet 2006;367:982–983.

García-Lechuz JM, Hernangómez S, Juan RS, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. Clinical Microbiology and Infection 2001;7:453-457.

Garimella PS, Agarwal R, Katz A. The utility of repeat enzyme immunoassay testing for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review of the literature. Journal of Postgraduate Medicine 2012; 58: 194-198.

Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J Jr. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Infection Control and Hospital Epidemiology 1995; 16: 459-477.

Geric, B, Carman R.J, Rupnik M, Genheimer C.W., Sambol S, Lyerly D.M., Gerding D.N, Johnson S. Binary toxin-producing, largeclostridial toxin negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. Journal of Infectious Disease and Therapy 2006; 193:1143–1150.

Giannasca PJ, Warny M. Active and passive immunization against diarrhea and colitis. Vaccine 2004;22:848-856.

Goncalves C, Decré D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile* Journal of Clinical Microbiology 2004;42:1933-1939.

Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D, Kelly S, Boyd D, Mulvey M, The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. Clinical Infectious Diseases 2009; 48: 568-76.

Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999–2007. Clinical Infectious Diseases 2012;55:216–223.

Hennequin C, Janoir C, Barc MC, Collignon A, Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 2003; 149:2779-2787.

<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4166/kjg.2010.56.6.387&vmode=PUBREADE>
R.Erişim tarihi: 02/12/2015.

<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Clostridium.htm>. Erişim tarihi: 02/12/2015).

<http://www.wales.nhs.uk/sites3/page.cfm?orgid=379&pid=13577>. Erişim tarihi: 02/12/2015.

Huang H, Weintraub A, Fang H, Wu S, Zhang Y, Nord C. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 2010; 16: 633-635.

Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 34: 516–522.

Jacobs A, Barnard K, Fishel R. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:88-101.

Jalali M, Khorvash F, Warriner K, Weese JS. *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. *BMC Research Notes* 2012; 21: 159.

Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *The Journal of Infection* 2009; 58: 403-410.

Kachrimanidou M, Malisiovas N. *Clostridium difficile* Infection: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Microbiology* 2011; 37: 178–187.

Karabay O, Hosoglu S. Increased antimicrobial consumption following reimbursement reform in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61: 1169 –1171.

Kauffman, L. & Weaver, R. H. Use of neutral red fluorescence for the identification of colonies of clostridia. *Journal of Bacteriology* 1960; 79: 292–294.

Kelly CP, Pothoulakis C, Lamount JT. *Clostridium difficile* colitis. *The New England Journal of Medicine* 1994; 330: 257-262.

Kelly CP, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. Annual Review of Medicine 1998; 49: 375-390.

Kelly CP. Current strategies for management of initial *Clostridium difficile* infection. Journal of Hospital Medicine 2012; 7:5-10.

Keven K, Basu A, Re L, Tan H, Marcos A, Fung JJ, Starzl TE, Simmons RL, Shapiro R. *Clostridium difficile* colitis in patients after kidney and pancreas-kidney transplantation. Transplant Infectious Disease 2004; 6: 10–14.

Khanna S, Pardi DS. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 2010;4:409-416.

Kıyan M. Anaerop, sporlu, Gram pozitif bakteriler. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:624-649.

Killgore, G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost H, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg J, Kato H, Sambol S, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding D.N, McDonald L. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. Journal of Clinical Microbiology 2008;46:431–437.

Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin MG, Kim MN, Shin HB, Uh Y, Lee H, Lee K. Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. Korean Journal of Laboratory Medicine 2010;30:491-497.

Kim J, Kang JO, Kim H, Seo MR, Choi TY, Pai H, Kuijper EJ, Sanders I, Fawley W. Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in a tertiary-care hospital in Korea. Clinical Microbiology and Infection 2013; 19: 521-527.

Kirkpatrick ID, Greenberg HM. Evaluating the CT diagnosis of *Clostridium difficile* colitis: Should CT guide therapy? American Journal of Roentgenology. 2001;176:635-639.

Koneman EW. Identification of Anaerobic Bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda M, Schreckenberger PC, Winn WC. (eds). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Sixth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 2006:933-993.

Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 2010;467:711-713.

Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;209:83-86.

Kuijper, EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2006;2:2–18.

Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Schneider F, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Barbut F, Delmée M, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Akerlund T, Poxton IR, Tüll P. Update of *Clostridium difficile* associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 2007; 12: 1-2.

Kuijper, E. J., F. Barbut, J. S. Brazier, N. Kleinkauf, T. Eckmanns, M. L. Lambert, D. Drudy, F. Fitzpatrick, C. Wiuff, D. J. Brown, J. E. Coia, H. Pituch, P. Reichert, J. Even, J. Mossong, A. F. Widmer, K. E. Olsen, F. Allerberger, D. W. Notermans, M. Delme'e, B. Coignard, M. Wilcox, B. Patel, R. Frei, E. Nagy, E. Bouza, M. Marin, T. Akerlund, A. Virolainen, J. Julkunen, O. Lyytikäinen, S. Kotila, A. Ingebretsen, B. Smyth, P. Rooney, I. R. Poxton, and D. L. Monnet. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 2008;13: 31.

Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *Lancet* 2008; 371: 1486-1488.

Kyne L., Warny M., Qamar A., Kelly C. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *New England Journal of Medicine* 2000; 342: 390–397.

Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357: 189–193.

Kyne L, Kelly CP. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Gut* 2001;49:152-153.

Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *Journal of Infectious Diseases* 1984; 149: 781-788.

Leclair MA, Allard C, Lesur O, Pepin J. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care Medicine* 2010; 25: 23-30.

Lesna M, Parham DM. Mortality due to *C. difficile* colitis in elderly people has been underestimated. *British Medical Journal* 1996;312:778.

Loo VG, Bourgault A, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost E, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Béliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *The New England Journal of Medicine* 2011;365:1693–1703.

Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman M, Michaud S. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England Journal of Medicine* 2005;353:2442-2449.

Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 2009;458:1176-1179.

MacCannell, D. R., T. J. Louie, D. B. Gregson, M. Laverdiere, A. C. Labbe, F. Laing, and S. Henwick.. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44:2147–2152

Malnick SDH, Zimhony O. Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *The Annals of Pharmacotherapy* 2002;36:1767-1775.

Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Bartlett JG. *Clostridium difficile* colitis: An efficient clinical approach to diagnosis. *Annals of Internal Medicine* 1995;123:83-84.

McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2012; 10: 581-592.

McDonald, L. C, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kutty P.K, the *Ad Hoc Clostridium difficile* Surveillance Working Group. Recommendations for surveillance of

Clostridium difficile-associated disease. Infection Control and Hospital Epidemiology 2007;28:140–145.

McDonald, L. C, Killgore G.E, Thompson A, Owens R.C, Kazakova S.V, Sambol S.P, Johnson S, Gerding D.N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. The New England Journal of Medicine 2005;353:2433–2441.

Miendje Deyi VY, Vandenberg O, Mascart G, Gning S, Retore P, Douat N, Dediste A. Diagnostic value of five commercial tests for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. Clinical Laboratory 2008;54:9-13.

Miller M, Gravel D, Mulvey M, Taylor G, Boyd D, Simor A, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D, Kelly S. Health Care-Associated *Clostridium difficile* Infection in Canada: Patient Age and Infecting Strain Type Are Highly Predictive of Severe Outcome and Mortality. Clinical Infectious Diseases 2010;50:194-201.

Mullane KM, Miller MA, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Sears PS, Shue YK, Louie TJ, Gorbach SL. Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. Clinical Infectious Diseases 2011; 53: 440–447.

Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. Journal of Medical Microbiology 2007;56: 921–929.

O'Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. Current Opinion in Gastroenterology 2011; 27: 38-47.

O'Neill GL, Ogunsola FT, Brazier JS, Duerden BI. Modification of a PCR ribotyping method for application as a routine typing scheme for *Clostridium difficile*. Anaerobe 1996; 2: 205-209.

Oğuz F, Uysal G, Daşdemir S, Oskovi H, Vidinlisan S. The role of *Clostridium difficile* in childhood nosocomial diarrhea. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2001;33:731-733.

Ondedonk AB, Allen SD. Clostridium Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology 1995;6:574-586.

Özinel MA. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak *Clostridium difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 251-254

Öztürk R. Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve tedavi. ANKEM Dergisi 2004;18:82-86.

Pechere JC: Patients' interviews and misuse of antibiotics. Clinical Infectious Disease 2001;33:170-173.

Pechine S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M., Delmee M, Collignon A. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. Journal of Medical Microbiology 2005; 54: 193–196.

Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002;46:1647-1650.

Pépin J, Valiquette L and Coseette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. Canadian Medical Association Journal 2005;173:1037-1042.

Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. Canadian Medical Association Journal 2004; 171:466–472.

Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. Infection and Immunity 1997;65:1402-1407.

Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clinical Microbiology and Infection 2008;14:1057-1064.

Pinto L.J, Alcides A.P, Ferreira E.O, Avelar K, Sabra A, Domingues R and Ferreira C. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. Journal of Medical Microbiology 2003; 52, 1095–1099.

Pituch H, Rupnik M, Obuch-Woszczatyński P, Grubesić A, Meisel-Mikołajczyk F, Luczak M. Detection of binary-toxin genes (cdtA and cdtB) among *Clostridium difficile* strains

isolated from patients with *C. difficile*-associated diarrhoea (CDAD) in Poland. Journal of Medical Microbiology 2005;54:143-147.

Pituch H, Brazier J, Woszczatyński P, Wultańska D, Meisel-Mikołajczyk F, Łuczak M. Prevalence and association of PCR ribotypes of *Clostridium difficile* isolated from symptomatic patients from Warsaw with macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) type resistance. Journal of Medical Microbiology 2006;55:207–213.

Planche, T., A. Aghaizu, R. Holliman, P. Riley, J. Poloniecki, A. Breathnach, S. Krishna. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. The Lancet. Infectious Diseases 2008; 8:777–784.

Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P. Actin-specific ADPribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infecton and Immunity 1988; 56: 2299–2306.

Pothoulakis C. , Tradafilopoulos G. ,Clark M., Franzblau C. , Lamont J. T. *Clostridium difficile* cytotoxin inhibits protein synthesis in fibroblasts and intestinal mucosa. *Gastroenterology*1986;91:1147-1153.

Poxton, I.R., McCoubrey, J., Blair, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*.Clinical Microbiology and Infection 2001; 7:421–427.

Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhea. Gut 2004;53:58-61.

Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, Dowling JK, Draper E, O'Reilly V, McCarthy C, O'Brien J, Ní Eidhin D, O'Connell MJ, Keogh B, Morton CO, Rogers TR, Fallon PG, O'Neill LA, Kelleher D, Loscher CE. A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. PLoS Pathogens 2011;7:6.

Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'Brien M, Anton PM, Pothoulakis C. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology 2003;125:413–420.

Sanchez-Hurtado K., Corretge M., Mutlu E., McIlhagger R., Starr J., Poxton I. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 717–724.

Schutze GE, Willoughby RE; Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics. *Clostridium difficile* infection in infants and children. *Pediatrics* 2013;131:196-200.

Schwann C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W, Wehland J, Aktories K. *Clostridium difficile* CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens* 2009;5: 10.

Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, Nguyen A, Jackson MA, Selvarangan R. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pediatric stool samples: an evaluation of Quik CheckComplete Antigen assay, BD GeneOhm CdiffPCR, and ProGastro Cd PCR assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 71: 224-229.

Settle CD, Wilcox MH, Fawley WN, Corrado OJ, Hawkey PM. Prospective study of the risk of *Clostridium difficile* diarrhoea in elderly patients following treatment with cefotaxime or piperacillin tazobactam. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1998;12:1217-1223.

Siffert JC, Baldacini O, Kuhry JG, Wachsmann D, Benabdelmoumene S, Faradji A, Monteil H, Poidron P. Effects of *Clostridium difficile* toxin B on human monocytes and macrophages: Possible relationship with cytoskeletal rearrangement. *Infection and Immunity* 1993;61: 1082-1090.

Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. *Journal of the American Geriatrics Society* 2010; 58: 1556-1564.

Smith, A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveillance* 2005; 10: 6.

Söyletir G, Eskitürk A, Kilic G, Korten V, Tozun N. *Clostridium difficile* acquisition rate and its role in nosocomial diarrhea at a university hospital in Turkey. *European Journal of Epidemiology* 1996; 12: 391-394.

Spencer RC. The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;41:21-27.

Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, Brazier JS, Barbut F, Delmée M, Kuijper E, Poxton IR; European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Fluoroquinolone resistance in

Clostridium difficile isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe
Journal of Medical Microbiology 2008;57:784-789.

Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD)†Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011;66:2227-2234.

Stamper PD, Babiker W, Alcabasa R, Aird D, Wehrlin J, Ikpeama I, Gluck L, Carroll KC.
Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in clinical stool specimens. Journal of Clinical Microbiology 2009; 47: 3846-3850.

Sun X, He X, Tzipori S, Gerhard R, Feng H. Essential role of the glucosyltransferase activity in *Clostridium difficile* toxin-induced secretion of TNF-alpha by macrophages. Microbial Pathogenesis 2009;46:298–305.

Şaşmaz T, Buğdaycı R, Kurt AÖ, Tezcan H: Mersin’de bir merkez sağlık ocağında akut solunum yolu enfeksiyonları için reçete edilen antibiyotiklerin incelenmesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;3:185-190.

Taha S, Johansson O, Rivera Jonsson S, Heimer D, Krovacek K. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2007; 30:163-174.

Tannock GW, Munro K, Taylor C, Lawley B, Young W, Byrne B, Emery J, Louie T. A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin. Microbiology 2010; 156, 3354–3359.

Tschudin-Sutter S, Widmer AF, Perl TM. *Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease. Current Opinion in Infectious Diseases 2012; 25: 405-411.

Tunçcan Ö, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda *Clostridium difficile* toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi. Mikrobiyoloji Bülteni 2008; 42: 573-583.

Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, Carlson L, Miller P, Ulness B, Cent A, Ashley R, Larson A, Coyle M, Limaye AP, Cookson BT, Fritsche TR. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 667-670.

Ulger N, İlki A, Akgül Ö, Söyletir G. Antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from Marmara University Hospital. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2011;1:162-165.

Urban, E., Tusnadi, A., Terhes, G., Nagy, E., Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary. *Journal of Hospital Infection*. 2002; 51: 175-178.

Warny M., Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, and McDonald L.C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005; 366:1079–1084.

Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: After 20 years, still challenging. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:531-534.

Wiström J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granström G, Lagergren L, Englund G, Nord CE, Svenungsson B. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 47: 43-50.

Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1999;34: 1–6.

Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *The Journal of Research in Indian Medicine* 2010; 131: 487-499.

Van den Berg RJ, Claas EC, Ouyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, Kuijper EJ. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1035-1041.

Vasoo S, Stevens J, Portillo L, Barza R, Schejbal D, Wu MM, Chancey C, Singh K. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 2014;47:75-78.

Von Eichel-Streiber C. , Layfenberg-Feldmann R. , Saringen S. , Schulze J. , Sauerbon M. Comparative sequence analysis of the *Clostridiumdifficile* toxin A and toxin B. *Molecular and General Genetics* 1992;233:260-268.

Yılmaz R, Çevik A, Ünal S. *Clostridium difficile* infeksiyonları. *Flora Dergisi* 2000;5:11-12.

Yip C, Loeb M, Salama S, Moss L, Olde J. Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infection Control of Hospital Epidemiology* 2001; 22:572-575.

Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Growth and geographic variation in hospitalizations with resistant infections, United States, 2000–2005. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14:1756–1758.