

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

80187

KÖPEK VE KEDİ GAITALARINDAN CLOSTRIDIUM DIFFICILE  
İZOLASYONU VE TOKSİN-A SAPTANMASI

Ali ERDEMOĞLU  
Uzman Veteriner Hekim

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

T 80187

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ömer AKAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA-1997

**İÇİNDEKİLER**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	i
<b>KABUL VE ONAY YAZISI</b>	ii
<b>ÖNSÖZ</b>	iii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. GENEL ÖZELLİKLERİ	3
1.2. EPİDEMİYOLOJİ	5
1.3. VİRULENS FAKTÖRLERİ	10
1.4. PATOGENEZİS	14
1.5. LABORATUVAR TANI	23
1.5.1. GAİTADAN C.DIFFICILE TANI YÖNTEMLERİ	24
1.5.2. GAİTADAN TOKSİN SAPTANMASI	28
1.6. TEDAVİ	32
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	34
2.1. ÖRNEK ALMAK İÇİN KULLANILAN GEREÇLER	34
2.2. ANAEROBİK ORTAMIN SAĞLANMASI	35
2.3. BESİ YERLERİ	35
2.4. REFERANS SUŞ	37
2.5. SOLUSYON VE REAGENTLAR	38
2.6. API-20 A SİSTEM	39
2.7. VIDAS SİSTEM	40
2.8. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON	41
2.9. TOKSİN A VARLIĞININ SAPTANMASI	44
<b>3. BULGULAR</b>	45
3.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON SONUÇLAR	45
3.2. TOKSİN A ANTİJEN BULGULARI	46
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	48
<b>5. ÖZET</b>	58
<b>6.SUMMARY</b>	59
<b>7.KAYNAKLAR</b>	60

**ii. KABUL VE ONAY YAZISI**

Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez savunma tarihi:17/10/1997**



**Prof.Dr. Mustafa KAHRAMAN**

**Uludağ Üniversitesi**

**Jüri Başkanı**



**Prof.Dr.Serdar DİKER**

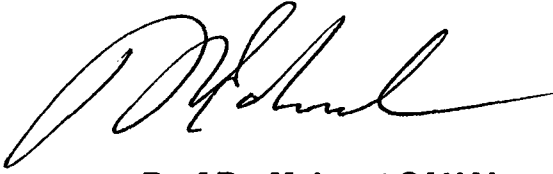
**Ankara Üniversitesi**

**Raportör**



**Prof.Dr. Ömer AKAY**

**Ankara Üniversitesi**



**Prof.Dr. Mehmet ŞAHAL**

**Ankara Üniversitesi**



**Prof.Dr. Müjgan İZGÜR**

**Ankara Üniversitesi**

### iii.ÖNSÖZ

İzolasyonu oldukça zor ve anaerob bir bakteri olan *Clostridium difficile* (*C.difficile*)'in hayvanlardan elde edilmesine yönelik oldukça az araştırma gerçekleştirilmiştir (Berry ve Levett, 1986). Ayrıntılı çalışmalar; deve, öküz, eşek, at, tay, kedi, köpek, piliç gaitalarından, Antarktik fok, neonatal tavşan, domuz ve geyiklerin gastrointestinal sistemlerinden izole edilmesi üzerine yapılmıştır (Green, 1974; Princewelt ve Agba, 1982; Borriello ve ark., 1983; Levett, 1986; Riley ve ark., 1991b; Perrin ve ark., 1993).

*C.difficile*'in tay, hamster ve kobaylar hariç diğer hayvan türlerindeki patojenik fonksiyonu tam olarak saptanamamıştır (Borriello ve Barclay., 1985; Berry ve Levett, 1986; Mitchell ve ark., 1987; Weber ve ark., 1989). Ev hayvanlarında *C.difficile* taşıyıcılığı hakkında fazla araştırma olmadığından, hayvanlardaki hastalık potansiyeli ve organizmanın hayvandan insana geçişi tam olarak bilinmemektedir (Bartlett, 1990).

Bu çalışmanın amacı, evcil hayvan (kedi ve köpek) gaitalarından *C.difficile*'i izole etmek ve gaitada toksin-A varlığını saptamaktır. Çalışma ülkemizde hayvanlar üzerinde yapılan ilk araştırma olmasından dolayı özellik taşımaktadır.

## 1. GİRİŞ

*C.difficile*, sağlıklı, yetişkin insan ve hayvanlarda kolon mikroflorasında yer alan bir bakteridir (Wilson, 1993). Mikroorganizma, yerleşik flora kazanılmadan önce, yeni doğanlarda, gnotobiyotik hayvanlarda ve antibiyotik tedavisi görmüş hayvan ve insanlarda sayısını artırıp kolon mikroflorasını kontrolü altına alabilmektedir (Borriello ve ark., 1983; Corthier ve ark., 1985; Weber ve ark., 1989).

*C.difficile*'in rezervuarı olarak pek çok kaynak gösterilmektedir (Pothoulakis ve ark., 1993). Ancak, insanlarda infeksiyon kaynağının endojen (taşıyıcılık) veya eksojen (çevresel kontaminasyon) ya da her ikisinin de olabileceği bildirilmektedir (Lyerly ve ark, 1985). *C.difficile*'in ev hayvanları tarafından (özellikle kedi ve köpek ) fekal taşıyıcılığının yaygın olduğu ve ev hayvanları aracılığıyla infeksiyonların olabileceği bazı yayınlarda bildirilmiştir (Borriello ve ark., 1983; Bartlett., 1990).

*C.difficile*'in evcil hayvanlarda bulunuşu ve bu mikroorganizmanın hayvanlardan insanlara bulaşması konusundaki bilgiler oldukça sınırlıdır (Lyerly ve ark., 1988b). Borriello ve arkadaşları (1983) ev hayvanlarının *C.difficile*'nin geçici potansiyel taşıyıcıları olduklarını, Riley ve arkadaşları (1991) ise çalışmalarında hayvanlardaki gastrointestinal *C.difficile* taşıyıcılığının antibiyotik kullanımı ile doğru orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

*C.difficile* özellikleri yeni belirlenen bir etken olmakla birlikte meydana getirdiği hastalık çok eskiden beri bilinmektedir (Pothoulakis ve LaMont, 1993). Johns Hopkins hastanesinde cerrah olan Doktor William OSLER tarafından 1892'de 22 yaşındaki kadın hastaya, gastrik tümör rezeksiyonu

yapılmış ve ameliyat sonu diare görülen hasta tedavi edilmeye çalışılmış, ancak hasta 15.ci günde ölmüştür. Ölen hastaya yapılan otopside kolonda difterik membranlara benzer psödomembranlar görülmüştür. İlk defa 1893 yılında Dr. Finney tarafından bildirilen bu olgu *C.difficile*'nin yapmış olduğu hastalık hakkındaki ilk yayındır (Bartlett, 1994).

Yeni doğanların normal barsak florasının bir etkeni olan bu mikroorganizma zor (difficult) izole edildiğinden 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından *C.difficile* olarak isimlendirilmiştir (Pothoulakis ve ark., 1993). Smith ve King (1962) klinik örnekler üzerinde *C.difficile*'in toksinlerini ve bu toksinlerin birbiriyle olan ilişkilerini, Hafız ve O'eklay (1976) ise bu mikroorganizmanın doğada oldukça yaygın olduğunu, çeşitli hayvanların (sığır, at, maymun ve deve) gaitalarında bulunduğu kadar toprak, kum ve çamurda da varlığının saptandığını, bir çok suşunun özellikle letal toksin ürettiğini ve suşlar arasındaki toksin üretiminin suş varyasyonlarına göre değiştiğini bildirmişlerdir.

*C.difficile*'in sitopatik toksininin etkilerini ilk kez Green tarif etmiştir (Pothoulakis ve LaMont, 1993). Larson ve Welch (1993) psödomembranöz kolit (PMK)'li hastaların gaitalarından sitopatik etkili toksinleri izole etmişlerdir. Hafız ve O'eklay (1976) *C.difficile*'i hayvanların gaitalarından izole ederek *C.difficile*'in letal toksini üzerinde çalışmışlar ve letal toksin üretimi ile türler arasında varyasyonlara göre kantitite farkı olduğunu bildirmişlerdir. Rifkin ve Chang *C.difficile* toksinlerinin, *Clostridium sordelli* antitoksinleri tarafından nötralize edildiğini bildirmişlerdir (Rifkin ve ark., 1977; Chang ve ark., 1979).

Son yapılan çalışmalar, toksin-A ve toksin-B'nin etki mekanizmaları arasında sistematik bir bağlantı olmadığını, gastrointestinal sistemde miktarlarının aynı ya da yaklaşık olarak eşit olduğunu ve doku kültürlerindeki sitopatik etkilerinin ise ters olduğunu göstermiştir (Bartlett., 1994). *C.difficile*

antibiyotiğe bağlı diare ve kolitlerin nedenidir (Redmond ve ark., 1985; Bartlett, 1986). Hastalığın Őiddeti ile mikroorganizmanın elde edilme sıklığı doğru orantılıdır (Clabots ve ark., 1992). 1977-1981 yılları arasında insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda antibiyotik kullanan PMK'li hastalarda *C.difficile* toksin pozitifliği % 97, sağlıklı yeni doğanlarda % 27, sağlıklı yetişkinlerde ise toksin oranı % 0 ve antibiyotik kullanan diareli hastalarda ise *C.difficile* toksin pozitiflik oranı % 50-75 arasında olduğu saptanmıştır (Pothoulakis ve LaMont 1993; Bartlett, 1992).

### 1.1. Genel Özellikleri

*C.difficile*, Clostridium cinsinde bulunan Gram pozitif, sporlu, obligat anaerobik bir mikroorganizmadır. Etken, 0.5-1.9 x 3.0-16.9 µm boyutlarında, peritrik flagellaları ile hareketli, sporlu ve kapsülsüzdür. Spor subterminal bir lokalizasyon gösterir. Ender olarak bazı suşları terminal spordur. Bakteri pH 5,0-5,5, 25°C-45°C (optimal 30°C - 37 °C) ısı derecelerinde ürer. DNA'daki G + C oranı % 28'dir.

Etkenin üretilmesi için değişik besi yerlerinden yararlanılmaktadır. Bakteri, taze at kanlı agar veya okolata agar besiyerinde kolaylıkla üreyebilir. Katı ortamlarda yuvarlak, S tipinde, konveks, gri veya beyaz, 2-5 mm. apında koloniler oluşturur. Kolonilerindeki at veya fil gübresi kokusu tipiktir. Bu koku yardımı ile tanımak oldukça kolaydır. Eğer agar ortama yüksek konsantrasyonda konulursa etkenin koloni morfolojilerinde farklılaşmalar görülebilir, bu nedenle ortamdaki agar miktarı % 1.5'u geçmemelidir. Tüm suşlar Vit. K<sub>1</sub> ve Hemin içeren ortamlarda, 48 saatlik bir inkübasyon sonunda, ultraviole (UV) ışınları altında, donuk yeşil floresans verir. Ancak koloni morfolojilerinin tam olarak incelenebilmesi için daha uzun süreli inkübasyon gerekebilir. Özellikle nemli ortamlarda yayılma tarzındaki üreme, *C.tetani* ve *C.septicum* hariç, diğer Clostridia türlerinde de görülebilir.

Bu yayılma, iyi kurutulmuş veya gliserol içeren ortamlarda önlenabilir. Agar miktarının artırılması, yayılma tarzındaki üremeyi engellemekle birlikte koloni morfolojisi; hemoliz, proteoliz, antimikrobiyallere karşı oluşan zon çapının değişimi gibi değişikliklere de neden olur. Etken sıvı besi yerlerinde homojen bir bulanıklık ve dipte koyu bir tortu oluşturur. Etken peritrik flagellası ile aktif hareket etmektedir. Ancak hareket, bu etkenin identifiye edilmesinde önemli bir kriter değildir. Çünkü mikroorganizmanın besi yerinde kolaylıkla inaktif hale geçmesi veya flagellalarını kaybetmesi sonucu hareketsiz de gözükabilir. Bu nedenle anaerob kültürlerin rutin incelenmesinde, hareket muayenesi gerekli bir işlem değildir. Ayrıca çoğu anaeroblar, serbest oksijen varlığından etkilenerek hareketlerini kaybedeceğinden, hareket muayenesi tercih edilmez. En uygun hareket muayenesi, aktif üremenin olduğu, 4-10 saatlik sıvı kültürlerden yapılır.

*C.difficile*; glukoz, mannoz, fruktoz ve mannitolden asit oluşturur. Maltoz, laktoz, sukroz, arabinoz, rafinoz, rhamnoz ve galaktoza etki etmez. Nişasta ve jelatini ayrıştırmaz. İndol ve nitrat negatiftir. Laktozlu, yumurta sarılı, süt agarda lesitinaz-C ve lipaz aktiviteleri negatiftir. Sakkarolitik fakat non-proteoliktir. %0.5 glukoz ihtiva eden pişirilmiş et ortamlarında; asetik, propiyonik, butirik, izo-butirik, valerik, izo-valerik, iso-kaproik asit ve tyrosin'den para krezol meydana getirir. Ara ürün olarak p-hidroksifenil asetik asit ortaya çıkar. *C.difficile* isokaproik ve valerik asit oluşturabilen ender Clostridium türlerinden biridir. Bu özelliklerinden yararlanılarak *C.difficile* gaz kromatografi ile kolaylıkla identifiye edilebilir. *C.difficile*'in oluşturduğu hemolizinler tüm hayvan eritrositlerine aynı aktiviteyi göstermezler. Hemoliz; anaerobiozisin derecesi (oksijen labil hemolizinler), sıcak-soğuk hemolizin etkisi, eritrosit kaynağı, toksin aktivitatörlerinin (Florid iyonları) varlığı veya yokluğu, agar konsantrasyonları (hemolizinin diffüze olmasını etkiler) gibi faktörlerle ilişkili olmakla birlikte, bazı suşları alfa hemoliz yapar (Cato ve ark., 1986).



## 1.2. Epidemiyoloji

*C.difficile* infeksiyonun kaynağı konusunda değişik açıklamalar yapılmakta, hastalığın endojen ve/veya eksojen (evcil hayvanlar, çevresel kontaminasyon) kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Kim ve ark., 1981; Borriello ve ark., 1983; Pothoulakis ve LaMont, 1993; Schuller ve ark., 1995). Değişik hayvan türleri *C.difficile*'nin rezervuarları arasında gösterilmekte, köpek ve kedi gibi ev hayvanları bu açıdan ön sırada yer almaktadır (Borriello ve ark., 1983; Levett, 1986; Weber ve ark., 1989; Bartlett, 1994).

Bu mikroorganizma antibiyotik tedavisi gören hayvanlardan ve doğal cansız ortamlardan sıkça elde edilmesine rağmen, önemli serotipleri memeli hayvanlar dışında izole edilememiştir. Ancak etken az da olsa doğal çevreye yayılmıştır ve toprakta çoğalma özelliğine sahiptir (Bartlett , 1994). Mikroorganizmanın bir diğer majör orijini hastane ortamıdır. Organizma sıklıkla hastane zeminlerinden, yataklardan ve bu organizma ile bulaşık hastaların kullandıkları banyolardan, tuvaletlerden, yataklardan, çarşaflardan da izole edilmiştir. Organizma büyük olasılıkla el kontaminasyonu yolu ile yayılmaktadır (Bennett ve ark., 1989; Clabots ve ark., 1992; Brazier, 1993; Bowen ve ark., 1995).

*C.difficile*'in doğadaki dağılımını incelemek için özellikle topraktan, deniz suyundan ve hayvansal atıklardan çalışmalar yapılmıştır. *C.difficile* sık olmamakla beraber sağlıklı hayvanların (kedi, deve, at, eşek, hamster, yılan, piliç, su kuşları ve domuz) gastrointestinal sisteminden izole edilmiştir. *C.difficile*'nin ev hayvanları tarafından (özellikle kedi ve köpek) fekal taşıyıcılığının yaygın olduğu ve ev hayvanları vasıtasıyla infeksiyon olabileceği bildirilmiştir (Green, 1974; Borriello ve ark., 1983; Lyerly ve ark.,

1988b; Weber ve ark., 1989; Riley ve ark., 1991a; Perrin ve ark., 1993; Beier , 1994).

*C.difficile*, yerleşik flora oluşmadan önce, yeni doğanlarda, gnotobiyotik hayvanlarda ve antibiyotik tedavisi görmüş hayvan ve insanlarda yerleşik barsak florasında popülasyonunu artırıp kolon mikroflorasını kendi kontrolüne alabilmektedir. Hayvanların pek çoğunun gastrointestinal sisteminden *C.difficile* izole edilebilir. Toksinleri ile hastalık yapan *C.difficile*'nin hamster ve kobaylar hariç hayvanlarda patojenik rolü tam olarak saptanamamıştır (Onderdonk ve ark., 1980; Bartlett, 1990; Clabots ve ark., 1992; Whittier ve ark., 1993).

*C.difficile* infeksiyonlarının kontrolü ve önlenmesi laboratuvarlarda izole ve identifiye edilen suşların tiplendirilmesi ile mümkündür. Çapraz infeksiyonlarda artan sporadik olguları izolatlar olmadan ayırt etmek mümkün değildir (Brazier, 1995).

Ancak bu yaklaşımların hiç biri epidemilerin kontrolünde tam bir başarı sağlamamaktadır. Çünkü asemptomatik taşıyıcılar salgın bölgelerinde oldukça fazla bir popülasyon oluştururlar. Bu durumu değerlendirmek için toksin ölçümlerinden çok, gaita kültürlerinin yapılmasında yarar vardır. Çünkü kültür aynı zamanda epidemiyolojik araştırmalar için daha fazla suş tiplemesine de yol açar. Bir çok tiplendirme metodu (Çizelge 1) olmasına karşılık gaita örneklerinden *C.difficile* kültürünün çok zor olması tipleme çalışmalarını zorlaştırmaktadır (Brazier, 1995).

Epidemiyolojik araştırmalarda, çok çeşitli tiplendirme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler; Elektroforetik protein profilleri (SDS-PAGE), serotiplendirme, pyrolysis-moss spektrometre (PYMS) ve DNA genomu çalışmaları lokal seviyelerde belirtilen salgınların taranmasına olanak tanımıştır. Bu metodların bir çoğu sadece referans merkezlerinde

yapılmaktadır. Bununla beraber rutin teşhis laboratuvarlarında basit antibiyogramlardan yararlanılmaktadır (Delme ve ark., 1985; Tabaqchali, 1990; Boondeekhun ve ark., 1993; Magee ve ark., 1993; Brazier ve ark., 1994; Costas ve ark., 1994a). Tiplendirme yöntemleri dünyada bir kaç merkezde uygulanmaktadır. *C.difficile* için ortak bir tiplendirme yöntemi olmadığından her çalışma grubunun kendine has bir yöntem ve isimlendirme şeması vardır (Brazier ve ark., 1994). Epidemiyolojide kullanılan yöntemler;

Antibiyotik duyarlılık testleri, *C.difficile* suşları arasındaki farklılıkları gösterir. Epidemiyolojik çalışmalarda sınırlı değerdedir (Dzink ve Bartlett, 1980; Wust ve ark.,1982; Tabaqchali ve ark., 1984; Tabaqchali, 1990; Brazier, 1993).

İlk olarak Sell ve arkadaşları (1983) tarafından geliştirilen ve epidemiyolojik araştırmalarda başarıyla uygulanmakta olan Bakteriyofaj ve

**Çizelge 1: *C.difficile*' nin tiplendirmesinde kullanılan yöntemler\*.**

Tiplendirme metodu	tip sayısı	Epithets
SDS-PAGE	9	A, B, C, D, E, W, X,Y, Z
Radio-PAGE	8	A, B, C, D, E, F, G, H
REA	13 veya 24	A-H, J-N,P-Z,VEYA A-H,J-N,P
RFLP	8-10	I-VIII
Serotiplendirme	6 veya 11	A-I,K,X VEYA I-VI
Bakteriyosin tiplendirme	31	A-T
Faj tiplendirme	5 veya 9	1-2,6-10 VEYA 1-5
Immunoblotting	7 veya 17	1-7, 9-18 VEYA a-g
Plasmid tiplendirme	20	1A-G, 2A-I, 3A, 4A-C
PCR ribotiplendirme	14	D-R

\*Brazier, (1993).

RFLP;Restriction fragment length polymorphism

SDS-PAGE; Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis.

REA; Restriction Enzym Assay

bakteriyosin duyarlılık testleri ile *C.difficile'* nin 40 farklı tipi olduğu gösterilmiştir (Bernabeu ve ark., 1991).

*C.difficile'*nin yüzey ve hücre proteinlerinin değişik preparasyonları SDS-PAGE yöntemi ile farklı elektroforetik protein profillerine bağlı epidemiyolojik markırlar olarak kullanılmıştır. SDS-PAGE analizi, basit bir yöntem olup bir çok laboratuvarında *C.difficile* suşlarının ayırt edilmesinde uygulanmaktadır (Tabaqachali ve ark., 1986; Tabaqachali ve ark., 1987; Costas ve ark., 1994a; Costas ve ark., 1994b).

Immunoblotting ve Immunoelektroforesis yöntemlerinden *C.difficile'*nin immunolojik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler bakteriyi tanımlama için yararlı olmaktadır. Serogruplandırma yöntemleri, tavşan anti serumlarının kullanılması ile yapılan aglütinasyon testleridir. Delmee ve arkadaşları (1985) 6 absorbe antiseruma dayalı olarak hızlı bir aglütinasyon metodu geliştirmişlerdir. Bazı serogruplar homojendir, fakat diğerleri özellikle sero grup A heterojendir ve en az 12 farklı elektroforetik modeldeki suşları içermektedir. A<sub>1</sub>, A<sub>8</sub>, C, F, G, H ve K suşları patojen serotiplerdir. Serotipleme, epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak uygulanmaktadır. Standart ayırıcıların olmayışı nedeniyle laboratuvarların immünolojik sonuçlarını, farklı anti serumlar kullanarak karşılaştırmak zordur (Brazier ve ark., 1994).

Epidemiyolojide genetik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Plazmid analizlerini ilk uygulayanlar Wust ve arkadaşları (1982) olmuştur. Kuijper ve arkadaşları (1987) ile Wilson ve arkadaşları (1988) ribozomal RNA proplarını uygulamaya geçirmişlerdir Plazmid analiz yöntemi spesifik plazmid modellerini barındıran suşları izlemede yararlı olabilir. Fakat uygulama alanı sınırlıdır. Çünkü *C.difficile* suşlarının sadece % 30-60'ı plazmid taşımaktadır. Ayrıca *Restriction endonuclease finger printing* yöntemi de kullanılmaktadır.

Yöntem yararlı ve tanımlayıcı olmasına karşılık, test hem komplike ve hem de zaman alıcıdır (Clabots ve ark., 1993; Cartwright ve ark., 1995; Collier ve ark., 1996).

Moleküler yöntemlerde spesifik DNA propları, örneğin spesifik proteinler, toksinler ve antibiyotik direnç gen propları epidemiyolojik markırlar olarak kullanılmaktadır. <sup>35</sup>S methionine ile işaretlenmiş SDS-PAGE yöntemi ile 9 ayrı tipte suş gözlenmiştir. Bunlar;A, B, C, D, E, W, X, Y ve Z'dir. Son zamanlarda suş spesifik protein bantları farklı 6 ek tip daha identifiye edilmiştir (Muldrow ve ark., 1982; Tabaqchali ve ark., 1984; Delme ve ark., 1986; Tabaqchali ve ark., 1986; Tabaqchali ve ark., 1987; Gurtler, 1993; Martirosain ve ark., 1995). Bacterial restriction endonuclease analysis (BRENDA) yöntemi, çeşitli tiplerin suşları arasında görülen ayırımları ortaya koymaktadır (Wren ve Tabaqchali, 1987). *C.difficile* tipleri ile yapılan çalışmalar, tip-A, tip-F ve tip- Y'nin toksin üretmediğini, tip-E ve tip-W'nin hayli yüksek titrelerde toksin ürettiğini, tip-X'in ise değişken olduğunu, tip-G ve tip-H'in ise nosokomiyal infeksiyonlara neden olduğunu göstermiştir. *C.difficile* toksin-A'nın sadece hamster hücrelerinde toksijenik etki göstermesine karşılık tavşan eritrositlerini aglütine etmesi karakteristik özelliklerindedir (Bartlet, 1986; Wren ve ark., 1987; Rolfe ve Song, 1993; Tabaqchali, 1990).

Şu anda her bir tiplene metodunda çok fazla tip ve tanımlayıcı özellikler, *C. difficile* identifikasyonu için kullanılmakta ve tiplene çalışmaları halen bir çok merkezde birbirinden bağımsız ve habersiz olarak devam etmektedir. Çeşitli tipler arasındaki benzerlik hakkında çok az bilgi vardır. Yapılan araştırmalar, aynı tiplene metodlarından yararlanan farklı merkezler tarafından kullanılan isimlendirmelerde benzerlik olmadığını göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda saptanan bir çok bakteriyel patojen, infeksiyonun yayılmasını izlemede önemli rol oynamıştır. Aslında dünya çapında adlandırma ve tiplendirme metodları üzerinde standart bir

konsensusa ulaşılmıştır. Örneğin; *Salmonella* tiplemesi, flagellar H antijenlerine ve somatik O aglutinasyonuna dayanır. *Staphylococcus aureus* tiplemesi, bakteriyofaj gruplarının (universal) litik reaksiyonları temeline dayanır. Ancak yeni bir patojen olan *C.difficile* suşlarının tanımlanmasında ve en iyi şekilde tiplendirilmesinde çeşitli ülkelerdeki araştırmacıların herbiri farklı tipleme yöntemleri geliştirmiştir. Çeşitli ülkelerde bu amaç için belli merkezler kurulmuştur (Brazier ve ark., 1994).

Çalışmaya katılan her merkez kendi sahip olduğu metodu kullanarak [(radio- polymorphism (RFLP), genomik DNA analizleri, modifiye PCR ve pyrolysis mass spectrometry (PYMS) yöntemleri ile)] diğer gruplar tarafından tanımlanmış olan referans kökenleri tiplendirmeye devam etmektedirler. İzole edilen *C. difficile* suşları ülke orijini, major metod tipi, sub tip ve toksijenik olup olmaması gibi parametrelerden yararlanılarak tiplendirilmektedir. Bu parametrelerden; Ülke orijini, izolatin kaynağının o ülkede olduğunu tarifler (Örn: UK, AUS, BELG, USA). Major tip; tiplendirmede kullanılan yöntemi ifade eder; tiplendirilen suş kullanılan metod ve arabik rakamlarla listelenir. Serotip I, radio-PAGE tip2 gibi. Sub tip; Aynı majör tip kökenleri arasındaki farklılığı gösterir. Roma rakamıyla listelenir I, II, III. Toksik olup olmaması; toksin A (enterotoksin) ve toksin B üretme yeteneğini gösterir. Sitotoksin (+) veya (-), (A) veya (B) ya da bilinmiyorsa (?) ile işaretlenir. Örneğin; UK/ Radio PAGE Tip I/ subtip/ N/A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>, BELG serotip 3/ subtip II/ A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>, USA/western blot tip 4/subtip I/ A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>, veya (AUS/REA-Hind tip 2/subtipVI/ A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>) (Brazier, 1995).

### 1.3. Virulens Faktörleri

*C.difficile*'nin en önemli virulens faktörleri toksinleridir. *C.difficile*'nin iki tane ekzotoksini vardır. Doku kültüründe her ikisi de sitotoksik etki yapar.

Çalışmalar genellikle toksin-B üzerinde yoğunlaşmıştır. Toksin-B, sitopatik etkili olup standart hücre kültürlerinde hücrenin sitopatik değişikliklerinden sorumludur. Toksin-A zayıf sitopatik etkili olup, tavşanlarda ileus kıvrımlarında (ileus luplarında) sıvı toplanmasına ve hamsterlerde mide sekresyonunu artırarak diarelere neden olmaktadır (Pothoulakis ve LaMont, 1993; Pothoulakis ve ark., 1993). Toksin-B tavşanların ve hamsterlerin ince barsaklarında ve kolonlarında herhangi bir intestinal lezyon oluşturmaz. Doğal olarak meydana gelen hastalıkta toksin-B'nin önemli bir biyolojik aktivitesi bu güne kadar gösterilemediğinden tüm klinik teşhisler toksin-A'ya yöneliktir. PMK'e neden olan toksin-A ve toksin-B'nin fiziko-kimyasal ve biyolojik aktiviteleri tam ve detaylı olarak çizelge 2'de gösterilmiştir. Toksin-A geni 2710 aminoasidin kodladığı 400.000-600.000 kilo dalton (kD) ağırlığında ve toksin-B, 2366 aminoasidin kodladığı 360.000-500.000 kD ağırlığındadır (Taylor ve ark., 1981; Lyerly ve ark., 1988b; Borriello ve ark., 1990; Pothoulakis ve La Mont, 1993).

Her iki toksinin hayvanlara intra peritoneal verildiğinde letal etkili olduğu görülmüştür. Bu toksinler 37°C'de aktif oldukları halde 56°C'de inaktive olurlar. Her iki toksin inaktif peptitlere sahip olan çok sayıda enzim (proteaz, tripsin, kemotripsin, papain, proteinaz-K, S.aureus V-8 proteaz) içerir. Bu enzimler normalde sindirim sisteminin inaktif enzimleri olup *C.difficile* toksinleri ile aktif hale geçerler. Her iki toksin aynı zamanda oksidasyondan da sorumludurlar. N-bromosuccinimide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KO<sub>2</sub> ve bağlı O<sub>2</sub>'de olduğu gibi oksidasyon yapan ajanların etkisi ile antijenik yapıları değişir ve sitotoksik aktiviteleri azalır. Dithiothreitol gibi redüktan ajanlar bu oksidanların inaktivasyonunu minimal düzeye düşürür. Toksinler yüksek miktarda hidrofobik amino asitlere ve düşük miktarda sülfür içeren amino asitlere bağlı olarak bulunurlar (Lyerly ve ark., 1988b). İmmünolojik araştırmalar, Toksin-A aktivitesinin toksin-B antiserumu, toksin-B'nin sitotoksik aktivitesinin ise toksin-A antiserumunca nötralize edilemediğini göstermiştir. Enzyme

Immuno Assay (EIA) ile her iki toksin arasında kros reaksiyon olmadığı görülmüştür (Lyerly ve ark., 1988b).

**Çizelge 2:** *C.difficile* toksinlerinin genel özellikleri\*.

ÖZELLİK	TOKSİN-A	TOKSİN-B
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	400.000 - 600.000 kD.	360.000 - 500.000 kD.
İNTESTİNAL HÜCRELERE ETKİSİ	SIVI SEKRESYONU, İNFLAMASYON, GEÇİRGENLİK ARTIŞI, MUKOZA NEKROZU, VİLLUS HARABİYETİ	HİÇ BİRİ
HÜCRESEL ETKİLER	NÖTROFİLLERDE KEMOTAKSİS, HÜCRE İÇİ Ca VE SİTOKİN SALINIMI	SİTOKİN SALINIMI
RESEPTÖRLER	ENTEROSİT VE DİĞER HÜCRELERDE BULUNUR	ENTEROSİTTE BULUNMAZ. DİĞER HÜCRELERDE BULUNUR

Çeşitli yöntemlerle toksin-A'nın hemagglütinasyon ve sitotoksin aktiviteleri incelendiğinde; saf toksin-A'nın sitotoksin zengin-hemagglütinasyon zengin ve sitotoksin zengin-hemagglütinasyon fakir sub ünitler içerdiği görülmüştür (Rhin, 1984; Pothoulakis ve ark., 1986). Toksin-A'nın daha etkin olduğu bildirilmektedir (Mitchell ve ark., 1986;). PMK oluşumunda Toksin-A ve toksin-B sinerjistik etkilidirler (Larson ve ark., 1977; Lyerly ve ark., 1985; Levett, 1986; Borriello ve ark., 1987; Just ve ark., 1995).

Toksin-B'nin sitotoksik etkisi ile ilgili pek çok çalışma olmasına karşılık toksin-A ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Toksin-A'yı kodlayan en büyük gen kısmının 14,3 kD, en küçük gen kısmının 0,3 kD olduğu, klonlanmış ürünlerden hiçbirisinin toksisite ve enterotoksitesinin olmadığı ancak tavşan eritrositlerini hemagglütine edebileceği bildirilmiştir (Borriello ve ark., 1990). Bannow ve arkadaşları (1984) enterotoksik fakat hemorajik ve

\* Borriello ve ark., (1990); Pothoulakis ve ark., (1993).



stabil olmayan farklı bir *C.difficile* proteinini tanımladılar. O zamandan beri bir çokaraştırıcı benzer toksik maddeleri kendi çalışmalarında bulmuşlardır. Örneğin Giuliano ve arkadaşları (1988) *sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)* yöntemi ile toksin-A dan farklı 45.000 kD molekül ağırlığında nonhemorajik bir enterotoksin saptamışlardır. Bu proteinin *anion-exchange fast-protein liquid chromatography (FPLC)* metodu ile analizi yapılarak toksin-A'dan farklı olduğu ve toksin-B' yi kapsayan bir grup proteinle kontamine olduğu gösterilmiştir (Lyerly ve ark., 1988b; Rhin ve ark., 1988). Daha sonraki benzer çalışmalar, *C.difficile*'nin majör faktörleri olan toksin-A ve toksin-B'ye ilaveten bir grup virulans faktörü daha olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu faktörler; adhezyon (Borriello ve ark., 1988b), kapsül üretimi (Dailey ve Schloemer, 1988), hidrolitik enzim üretimi (Steffen ve Hentges, 1981; Popoff ve Dodin, 1985), yüksek molekül ağırlıklı toksin-A ve B'den farklı tavşan bağırsağında elektriksel potansiyel değişikliğine neden olan bir protein (Justus ve ark., 1982), bazı *C.difficile* suşlarında saptanan ve hücre aktinini kovalent olarak modifiye eden Actin spesifik ADP -riboziltransferazdır (Popof ve ark., 1988).

Adhezyon, çoğu patojen etkenler için konak hücrelerde büyük bir virulans faktörüdür. Barsak mukozasına bağlanabilme yeteneği ile invivo toksin üretimi arasında intrensik farklılıklar vardır. Fimbriaların hücrelere bağlanma kabiliyeti açık değildir. Fimbria ile toksin üretimi ve hastalık oluşturma arasında bir korelasyon varlığı gösterilememiştir (Borriello ve ark., 1988b).

Kapsül, önemli bir virulans faktörüdür. Son çalışmalar *C.difficile*'nin fagositozu için opsonizasyonun önemli olduğunu göstermiştir (Opsonizasyon ile olan ilişki bakterinin yüzeyinde bulunan antifagositik bir faktöre bağlıdır). Hücre yüzey karbonhidratlarının uzaklaştırılmasının fagositoza etkisi yoktur. Bu sonuçlar kapsülün antifagositik faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu

açından PMK'de görülen iri polimorf nükleer hücre infiltrasyonunun *C.difficile* üzerine olan etkisinin az oluşu ilginçtir. Bu polimorf nükleer hücrelerin fonksiyonlarından biri toksinin yıkımı olabilir (Dailey ve Schloemer, 1988).

*C.difficile*'nin ürettiği hidrolitik enzimler hakkında az sayıda çalışma vardır. Hafiz ve O'akley (1976) çalıştıkları *C.difficile* suşlarını (21 izolat) hiyaluronidaz aktivitesi yönünde inceleyerek tümünün pozitif olduğunu ve hiyaluronidaz miktarının ise suşlara göre değiştiğini, Steffen ve Hentges (1981) çalıştıkları *C.difficile* suşlarının hiyaluronidaz, condroidin-4-sulfataz, jelatinaz ve kollogenez pozitif, heparinaz, fibrinolizin, lesitinaz ve lipaz negatif, Popoff ve Dodin (1985) sağlıklı yeni doğan bebeklerden izole ettikleri *C.difficile* suşlarının nöraminidaz aktivitesinin negatif olduğunu bildirmişlerdir. Bu virulans faktörlerinin *C.difficile* infeksiyonlarında ne ölçüde etkili oldukları henüz tam olarak bilinmemektedir (Pothoulakis ve LaMont, 1993).

#### 1.4. Patogenezis

*C.difficile*, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan patojen bir etkidir. Özellikle insanlarda kolon mukozasında sarımsı-beyaz, 1-3 mm çapında plaklar ya da psödomembranların bulunduğu kalın barsak enflamasyonu ile karakterize, antibiyotiğe bağlı PMK'in en önemli etkenidir (Borriello ve ark., 1988b; Pothoulakis ve LaMont., 1993; Larson ve Welch, 1993). Antibiyotik kullanımına bağlı olmayan enteritlere de neden olduğu çeşitli kaynaklarda bildirilmektedir (Kim ve ark., 1981). Düşük oranlarda sağlıklı yetişkinlerin gastrointestinal florasında da bu mikroorganizmaya rastlanılmaktadır. Özellikle yeni doğanların gaitalarında yoğun olarak bulunmakta ve yüksek

düzyeyde toksin-A ve B üretmektedir (Larson ve ark., 1982; Kelly ve LaMont, 1994; Montero ve ark., 1995).

*C.difficile*'nin hastalık oluşturmada rol oynayan faktörler; kolon lumenindeki bakteri popülasyonunun kontrolünden sorumlu mekanizmaların bozulması, endojen (yerleşik flora tarafından) veya eksojen *C.difficile* kaynağının oluşturulması, organizmanın potansiyel olarak toksin, özellikle toksin-A üretme yeteneğine sahip olması ve konağın yaşa bağlı olan direnci, önemli faktörlerdir (Bartlett, 1985).

Oral olarak verilen *C.difficile* deney hayvanlarında hastalık oluşturmaz. Ancak herhangi bir antibiyotik ile kombine verildiğinde kolon florasının bozulması ile toksin üretimi için gerekli şartlar olduğundan letal kolit oluşur (Bartlett, 1990). İn vitro çalışmalar organizmanın vejetatif formlarının logaritmik üreme döneminde aşırı miktarda toksin-A ve toksin-B sentezlediklerini göstermiştir. Kolon florasını en fazla etkileyen antibiyotikler ampisilin, klindamisin ve sefalosporinlerdir. Ancak bu durum bir süper infeksiyon şeklinde değerlendirilmemelidir. Çünkü *C.difficile* antibiyotiklere oldukça duyarlıdır (Bartlett, 1992).

Kolon florasının baskılanmasına bağlı olarak gelişen enterik diarenin oluşmasından sorumlu ajan olarak kolondan saptanan *C.difficile* ve toksin-A üretimi gösterilmektedir. Kolon florasında etkili olan antibiyotiklerin (amoksisilin, ampisilin, sefalosporin, klindamisin vb.) çok sık kullanılmaları sonucu özellikle Bacterioidesler ortamdan kaldırılarak kolondaki yerleşik florasını bozmaktadırlar (Tvede ve Rask-Madsen, 1989). Yaklaşık olarak tüm ilaçlar (kansere kemoterapisinde kullanılanların bazıları) barsaklarda etkinliğini gösterirler. Hamsterlerde yapılan çalışmalarda sülfonamidler özellikle komplikasyon oluşturan ajan olarak gösterilmiştir. *C.difficile*'nin vejetatif formlarının uzun süre toksin-A ve B üretimine neden olduğu in vitro

çalışmalarla gösterilmiştir (Bartlett, 1994). Sağlıklı yetişkinlerin % 3'ü ve hastaların % 10-20'si bu organizmayı normal flora komponenti olarak vücutlarında barındırırlar. Geniş olarak doğaya yayılmış olan mikroorganizmanın konak tarafından nasıl (endojen/eksojen), kazanıldığı tam olarak bilinmemektedir (Viscidi ve ark., 1981; Bartlett, 1990; Allen ve ark., 1995).

Yaşa bağlı duyarlılık, değişken olup bugüne kadar açıklanamamıştır. Sağlıklı yeni doğanlarda hem *C.difficile* ve hem de toksininin yüksek taşıyıcılık oranlarını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Kolonizasyon sıklığı oldukça değişkendir (Montero ve ark., 1995). Hastalığa neden olan suşlar genellikle yeni doğan bebeklerin barındırıldıkları ünitelerde bulunur. Daha da önemlisi yeni doğanlar organizmayı barındırırlar ve toksinli ya da toksinsiz bir kaç kolonizasyon sürdürebilirler (Viscidi ve ark., 1981). Ancak 6-12 ayda yerleşik floranın oluşması ile prevalans oranı düşer. Daha büyükler antibiyotiklere daha sık maruz kalmalarına rağmen çok seyrek olarak hastalanırlar. Yetişkinlerin ise daha duyarlı olmalarının sebepleri henüz tam olarak bilinmemektedir (Bacon ve ark., 1988).

İnsan ve hayvanlarda hastalığın gelişip gelişmeyeceğini belirleyen majör faktörler; *C.difficile* populasyonunun büyüklüğüne, kolonizasyon yapan suşların toksijenitesine, diğer mikroorganizmaların varlığına, toksin aktivitesine ve toksin oluşumuna olan etkilerine, konağın duyarlılığına ve suşların kolon epiteline adhere (yapışma ) olma özelliklerine bağlıdır. Normal kolon florası hazır besinleri sınırlayarak *C.difficile* populasyonunun boyutunu belirler. Eğer *C.difficile* kolonda kolonize olmamışsa ya da sadece çok az bir popülasyon meydana getirebiliyorsa, o zaman konakçı hastalanmaz. *C.difficile* populasyonunun boyutu kolon mikroflorası tarafından kontrol edilmektedir. Hayvanlarda *C.difficile*'nin mikroekolojisi hakkında bilinenler aynı derecede insanlar için de geçerlidir (Wilson , 1993). İnsan kolon yerleşik florası 30 cinse ait 400-500 tür bakteriden oluşur. Kolon

mikroflorasının % 90'dan fazlasını anaerob mikroorganizmalar oluşturur. Yetişkinlerde kolonun ekolojik mikroflorası; *Bacterioides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Coprococ*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* ve *Lactobacillus*'lardan oluşur. Kolon florasının kompozisyonu bireyden bireye anlamlı olarak farklıdır. Kemirici florası, çokça tür kompozisyonu düzeyinde insanlarla eşit olmamasına rağmen, anaerobik kompleks, stabil ve genellikle (normal olarak ) *C.difficile*' sızdır (Wilson , 1993).

Memelilerde ekolojik mikroflora zamanla meydana gelir. Kolonda gerçek yerleşik mikroflora oluşuncaya kadar bir grup mikroorganizma diğerine egemen (diğerini baskılar) olur. *C.difficile*, doğumdan sonraki ilk bir kaç ay boyunca konağa kolaylıkla kolonize olur (Viscidi ve ark.,1981; Valenzuel ve ark., 1995). Yeni doğanlar, yüksek titrelerdeki *C.difficile* toksini varlığına rağmen asemptomatik olarak kalırlar. Yerleşik mikrofloranın oluşması ile, *C.difficile*'nin popülasyonu azalır. İnsanlarda olduğu gibi, genç hayvanlar da toksinlere duyarsızdır. Detaylı çalışmalar, hayvanların yerleşik kolon florasının tam olarak gelişmesini 2 hafta içinde tamamladığını göstermiştir (Rolfe ve laconis, 1983).

Kemirgenlerde kolon florası tam olarak oluştuğundan sonra kolonizasyon direnci oluşur. Yerleşik olmayan mikroorganizmalar kolona çok yüksek miktarlarda verildiklerinde kolonize olamazlar. Bu fenomen Bohnhoff ve arkadaşları ile Freter tarafından 1950 yılında saptanmıştır (Rolfe, 1984). *C.difficile*, yenidoğan hayvanlarda çok kolay kolonize olabilir, flora olgunlaşınca bakteri yok olur. Yerleşik flora tam olarak oluşmadıkça, patojenin kendi kendine yerleşemeyeceği görülmüştür. Bununla birlikte antibiyotik uygulamalarına bağlı olarak hayvanlarda ani olarak *C.difficile* kolonizasyonu oluşur (Wilson, 1993).

*C.difficile*'nin Cr<sup>S1</sup> ile işaretlenmiş vejetatif formları ve sporları hamsterlere oral yolla verildiğinde; sporlarının mide asiditesinden etkilenmediği vejetatif formlarının büyük çoğunluğunun ise mide asiditesine bağlı olarak öldüğü, ancak % 1'lik bir bölümünün ince barsaklara geçtiği görülmüştür. İnce barsaklara geçen bakterinin vejetatif formları ve olgunlaşan sporları sekumda ilk 1-2 saat içinde logaritmik olarak çoğalarak kısa sürede safra asitlerinin etkisi ile bölgeye kolonize olurlar (Wilson ve ark., 1985). *C.difficile* germ free farelerin sekumunda da kolonize olur. Hamsterlere göre farelerin relativ olarak toksine dirençli oldukları görülmüştür. Konvansiyonel farelerin veya hamsterlerin sekumundaki *C.difficile* farelere inoküle edildiğinde sadece toksijenik suşların 2 hafta içinde total olarak elimine edildikleri saptanmıştır (Wilson ve Freter, 1986).

Yerleşik floranın mutlak kontrolü altında olan *C.difficile* popülasyonu yerleşik flora tarafından log<sub>9</sub> düzeyindeki bir kuvvetle suprese edilmektedir (Wilson, 1993). Toksik olmayan *C.difficile* suşlarının patojen suşlar üzerinde antagonist etkisi vardır. Yeni organizmalarla kolonizasyonu engellemek için, laboratuvar koşullarında tutulan ve bir doz antibiyotik verilen hamsterler, nontoksijenik *C.difficile* suşları ile kolonize olduklarında ve sonradan letal toksijenik suşlar ile karşılaştıklarında mortalite oranları belirgin bir şekilde düşer. Nontoksijenik suşların yokluğunda toksijenik suşlar ancak % 1'lik bir popülasyon kurabilir. Sadece nontoksijenik suşların kendi kendine yerleşmesine izin verildiğinde ise, (bir süre sonra toksijenik kökenlerin supresyondan kaçabilmelerine rağmen) supresiv etki oluşturduğu görülmüştür (Borriella ve Barclay, 1985; Seal ve ark., 1987). Tvede ve Rask-Madsen (1989) insan kolon florasından rastgele izole edilen 10 izolat ile insandaki *C.difficile*'nin tam olarak suprese edildiğini bildirmişlerdir. İnsan florasındaki mikroorganizmaların supresiv Clostridialarla uyumlu olmalarının gerekçesi henüz tam olarak açıklanmamıştır. Bazı bakteri suşlarının *C.difficile* suşlarındaki toksin seviyelerini etkilediği bildirilmiştir (Corthier ve ark., 1985; Torres ve ark., 1992).

Kolonizasyon direncini açıklayan çok sayıda teori vardır. Kolon ekosisteminin modern anlayışı Freter ve arkadaşları (1983) tarafından belirtilmiştir. Kolon ekosistemi devamlı-akıcı bir kültür olarak görev yaparak karışık florayı korumaktadır. Freter ve arkadaşlarının (1983) teorisine göre; bir sistemdeki bakteriler birbirleriyle primer olarak yarışır. Eğer bakteri popülasyonu aynı besinler için sınırlanmıyorsa, aynı anda beraber yaşarlar. Eğer bunun tersi işliyorsa, sadece biri uzun süre yaşar. Bu etki sonucu her mikroorganizmanın substrat affinitesine, çoğalma oranına ve bakterinin sayısal miktarına göre değişmekle birlikte besinlerden yavaş yavaş yararlanabilen bir mikroorganizma hücre duvarına yapışarak diğerleri ile kolonizasyonunu devam ettirebilir. Kompleks kolon yerleşik florası, ortamdaki gerekli bütün besinleri azaltarak, toksik ortam yaratarak, fazla miktarda hidrojen sülfid ve sekonder yağ asitleri üreterek ve logaritmik üreme fazını uzatarak patojenlerin epitel hücrelerine ya da barsak mukozasına invazyon olmaksızın kolonda bir popülasyon oluşturmalarına izin vermez (Lee ve Gemmell, 1972). Uçucu yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonlarda varlığı ile aynı anda var olan sekal içerikteki *C.difficile*'nin ortadan kaybolması Rolfe ve Song (1993) tarafından saptanmıştır. Ancak *C.difficile*'nin kendisi de çok miktarda bütirat içeren uçucu yağ asitlerini kopyalarcasına üretmesine rağmen, bütirik asidin kolon florasında patojenin yok olmasını nasıl sağladığı henüz tam olarak bilinmemektedir (Wilson, 1993).

Nörotoksin üreten bu bakterinin sıvı kültürlerinin süpernatantı domuz veya tavşanlara verildiğinde onları öldürür (Bongaerts ve Lyerly, 1994). Ancak her şeye rağmen bu bakterinin antibiyotiğe bağlı kolitlerdeki önemi uzun yıllar gözden kaçmıştır (Bartlett, 1990).

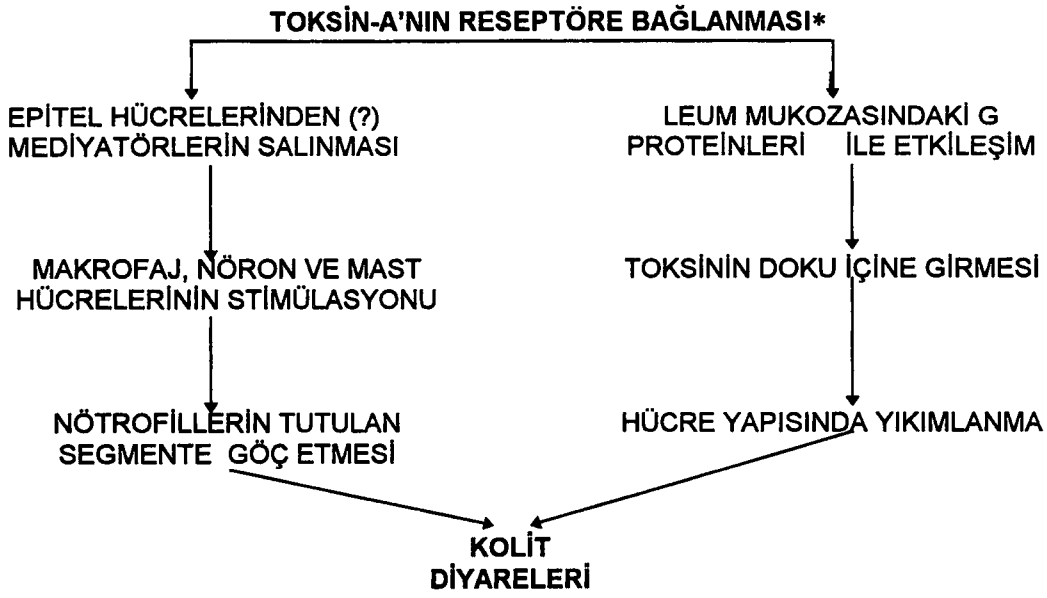
*C.difficile* toksinleri ile hastalık yapan bir patojendir. Toksin-A ve B'nin yapısı ve fonksiyonel özellikleri (Çizelge 2)'de gösterilmiştir (Borriello ve ark., 1990; Pothoulakis ve LaMont, 1993). Enterotoksin olan toksin-A patojenik faktördür, toksin-B ise sitotoksin özelliğindedir. Kemirgenlerin

barsaklarında toksin-B'ye duyarlı reseptörler olmadığından bu hayvanlar toksin-B'ye dirençlidirler. İnsan barsaklarının bu toksinlere duyarlılığı tam olarak bilinmemekle birlikte her iki toksinin insan barsak hücrelerini etkilediği yapılan deneylerden anlaşılmıştır (Bongaerts ve Lyster, 1994).

Patogeneizde ilk aşama toksin-A'nın duyarlı olduğu (Şekil 1) reseptörüne bağlanmasıdır. Tavşanlarda toksin,  $\alpha$  bağı galaktoz içeren glikoprotein yapısındaki fırçamsı reseptöre bağlanır (Tedesco, 1982; Pothoulakis ve ark., 1991). Reseptör, toksin-A için özgüldür, toksin B'yi ya da kolera toksinini bağlamaz (Eglow ve ark., 1992). Reseptörün toksin bağlama kapasitesi ve biyolojik yanıtı doğumun ilk haftaları çok zayıftır, yaşamın ilk üç haftasında giderek artar ve yaşamın 5-6.ncı haftalarında erişkinlerdeki düzeye ulaşır. Düşük toksin bağlama aktivitesi *C.difficile* ile kolonize olmuş yeni doğanların neden hastalanmadığını açıklamaktadır (Donta ve Myers, 1982; Freter ve ark., 1983).

Toksin-A özgül reseptöre bağlandıktan sonra hücre içine girer. 1-2 saatlik latent periyottan sonra hücre yapısında değişiklikler başlar, aktin filamentleri depolimerize olur, hücrelerin birleşim yerlerindeki bağlar gevşeyerek transepitelyal permeabilite artar (Hect ve ark., 1988; Moore ve ark., 1990). Aktin içeren filamentlerin çözülmesi ile birlikte daha sonra hücrelerde yuvarlaklaşma ortaya çıkar. Toksin-B inoküle edilen fibroblast doku hücrelerinde de benzer yapısal değişiklikler görülür (Wedel ve ark., 1983; Pothoulakis ve ark., 1986; More ve ark., 1990; Mahida ve ark., 1996). Toksin-A'nın bir diğer farklı özelliği ise barsaklarda makrofaj ve mast hücrelerinin aktivasyonunu sağlayıp nötrofilleri harekete geçirerek akut inflamatuvar bir reaksiyon başlatmasıdır.





**Şekil 1.** Toksin-A enterit fizyopatolojisi.

İnflamatuvar yanıtın başlatılması oldukça karışık bir süreçtir, trombosit aktivatör faktör, prostaglandin, lökotrien B<sub>4</sub>, lökotrien C<sub>4</sub>, histamin, interlökin-1, interlökin-8 ve değişik inflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla başlar (Pothoulakis ve ark., 1988; Triadafilopoulos ve ark., 1989; Linevski ve ark., 1990; Miller ve ark., 1990). Toksin-A'ya bağlı intestinal inflamasyonla birlikte, nötrofiller tutulan barsak segmentine hücum ederek mukoza hücrelerinde yıkımlara neden olur. Hücre yıkımı genelde villusların uçlarında daha belirgindir. Daha yüksek toksin konsantrasyonlarında tavşan ve kobay ileumlarında yoğun nekro-inflamatuvar ve hemorajik enterit ortaya çıkar (Triadafilopoulos ve ark., 1989). Kolera toksininin neden olduğu proteinden zengin ancak içinde hücre bulunmayan sekresyon sıvısına karşılık toksin-A'nın neden olduğu sekresyon proteince zengin olup nötrofil, monosit ve ölü enterik mukoza hücrelerini içerir (Kelly ve LaMont, 1994).

\*Pothoulakis ve ark., 1993

Insanlarda görülen *C.difficile*'nin neden olduğu PMK ile hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan PMK'in lezyonları arasında bazı farklılıklar vardır. Temel fark insanlardaki hastalıkta kolonik psödomembran odaklarındadır (Triadafilopoulos ve ark., 1989). Toksinin lümen içi sıvıya karışıp tüm bağırsağı etkilemesi beklenirken, bunun tersine tipik psödomembranların kısmen normal kolon mukozası ile çevrelendiği ve keskin kenarlı sınırlarla ayrıldığı görülür. Çünkü lezyonun görüldüğü bölümlerde toksin reseptörleri ya yoğun olarak bulunmakta ya da bu bölgelerde *C.difficile* mikrokolonilerinin daha fazla tutunmasına bağlı olarak salgıladıkları toksinler özellikle buraları etkilemektedir (Price ve Davies, 1977).

Psödomembranlar tüm kolonu tutabilirse de en çok rektosigmoid bölgede bulunur. Yapılan bir çalışmada psödomembranların % 77.3'ünün anüsten 0-25 santimetre uzaklıkta, % 13.6'sının 25-60 santimetre uzaklıkta. % 9.1'nin ise 60 santimetreden daha uzakta bulunduğunu göstermiştir (Tedesco ve ark., 1978). Kolon histolojik olarak incelendiğinde, psödomembranların (nekrotik atıklar, mukus ve inflamatuvar hücrelerin mukoza yüzeyine doğru akmasına bağlı olarak) volkan görünümündeki lezyonlardan oluştuğu görülür. Psödomembranların altındaki tabakada glandüler yapı bozulmuştur ve oldukça yoğun nötrofil birikimi göze çarpar. Hastalık özellikle epitel dokuyu ve lamina propria'yı tutar (Mahida ve ark., 1996). Tanının geçiktiği ciddi olgularda kolon mukozasının tüm katları psödomembranlar tarafından tutulur. Perforasyon, abse formasyonu, vasküler trombüsler PMK'in cerrahi müdahalelerinde veya otopsi örneklerinde görülebilen geç komplikasyonlarıdır (Bogomoletz, 1976).

### 1.5. Laboratuvar Tanı

*C.difficile*'ye bağlı hastalıkların teşhisinde farklı görüşler vardır. Koch postülatları paralelinde, bakteriyel patojenler kültürel metotlar ile izole edilmelidir. *C.difficile*'nin patogenezis ve epidemiyolojisinin anlaşılmasından sonra patojenin izolasyonu ile ilgili bilgiler artmıştır. Bazı araştırmacılar sadece toksinleri ile hastalık yapan *C.difficile*'nin teşhisinde kültürel izolasyondan ziyade gaitadan toksinin doku kültürü ile gösterilmesinin hızlı bir teşhis yöntemi olduğunu savunmaktadırlar. Ancak toksinleri ile hastalık yapan diğer patojenlerin (*Shigella spp*, *Vibrio spp*. vb.) saptanmasında gaitadan neden toksin aranmadığı sorusu ise yanıtız kalmaktadır (Brazier, 1993). *C.difficile*'nin tanısında kullanılan tanı yöntemleri Çizelge-3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3: *C.difficile* tanısında kullanılan testler.**

TESTİN TİPİ	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
DOKU KÜLTÜRÜ	YÜKSEK SENSİTİVİTE VE SPESİFİTEYE SAHIPTİR	1-3 GÜN SÜRER, PAHALIDIR.
RILT		PAHALIDIR, LABORATUVAR HAYVANI VE CERRAHI MÜDAHALE GEREKTİRİR.
PCR	KISA SÜRELİDİR	TOKSİJENİK VE NONTOKSİJENİK SUŞ AYIRIMI YAPILAMAZ
EIA	HER İKİ TOKSİN ÇALIŞILIR	İYİ SPESİFİTE, ORTA SENSİTİVİTE
DIA	TEST 1 SAAT SÜRER	YETERİNCE DEĞERLENDİRİLMEMİŞTİR
TOKSİN-A VE TOKSİN-B ELISA	ÇOK DUYARLI VE ÖZGÜL, YAKLAŞIK 4 SAAT SÜRER, ÖZEL CİHAZLARA GEREKSİNİM YOKTUR	HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN DAHA AZ DUYARLIDIR VE PAHALIDIR
ELFA	ÇOK DUYARLI, ÖZGÜL VE KOLAY UYGULANIR	SADECE TOKSİN A ÇALIŞILIR FAZLA PAHALI DEĞİLDİR
LATEKS AGLÜTİNASYON	DIŞKI ÖRNEKLERİ İÇİN UYGULANIR, 3 SAATTE SONUÇ ALINIR	TOKSİJENİK-NONTOKSİJENİK SUŞLARI SAPTANDIĞINDAN, YALANCI (+) VE (-) SONUÇLAR VEREBİLİR
ANAEROBİK KÜLTÜR	PORTÖRLER İDENTİFİYE EDİLEBİLİR.	3-5 GÜN SÜRER, TOKSİJENİK VE NONTOKSİJENİK SUŞLAR SAPTANIR. PAHALIDIR.

SDS-PAGE; Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis.

RILT:Rapid ileal loup test.

DIA; Dot Immunobinding Assay

### 1. 5. 1. Gaitadan *C. difficile* tanı yöntemleri

1. İzolasyon ve identifikasyon (kültür),
2. Lateks testi,
3. Gaz-likit kromatografi,
4. Çabuk enzimatik sistemler,
5. Nükleik asit prop teknikleri,
6. Polimeraz Zincir Raeksiyonu (PCR).

### 1. 5. 1. 1.Gaitadan *C.difficile'* nin İzolasyon ve İdentifikasyonu (kültür)

*C.difficile'* nin izolasyonunda ilk zamanlar p-krezol içeren sıvı (broth) besi yerleri kullanılmıştır. George ve arkadaşları (1979), *Cefoxitin-Cycloserine Fructoze agarı* (CCFA) geliştirene kadar neomisin ve sodyum azidli , kanamisinli ve klindamisinli seçici agarlar aşamalı olarak kullanılmıştır. Gaita örneklerinin direkt olarak inoküle edildiği CCFA'nın bileşiminde *Cycloserine* (500mg/L), *Cefoxitin* (16 mg/L), *Fructose*, nötral red indikatörü ve yumurta sarısı vardı (Brazier, 1993). 10 yıldan fazla bir süre *C.difficile* izolasyonunda mükemmel bir besi yeri olarak kullanılan CCFA 'da sikloserin ve sefoksitin konsantrasyonlarının çok yüksek olmasına bağlı olarak bir çok *C.difficile* suşunun inhibe olduğunun anlaşılması üzerine bu antimikrobiyal ajanların konsantrasyonlarının yarı dozlarını içeren modifikasyonları yapılmıştır. Sefoksitin yerine, mannitol, siprofloksasin, neomisin, gentamisin v.b. antibiyotikler ile %0,2 p-cresol içeren diğer modifiye seçici besi yerleri (CCFA ve yumurta sarısı ilave edilerek *Cycloserine-Cefoxitine-Egg yolk* (CCEY) agar gibi ) geliştirilerek İngiltere başta olmak üzere Avrupa'da kullanılmıştır. (Willey ve Bartlett, 1979; Levett, 1985).Gaita örneklerinin alkol ile işleme tabi tutulduktan sonra kanlı agara yapılan sub kültürlerin izolasyonda en etkin yöntem olduğu saptanmıştır (Bartley ve Dowell, 1991;Clabots ve ark., 1991; Aspinall ve Hutchinson, 1992).

Barsaklarda yaygın bulunan diğer *Clostridialar* (*C.perfringens*, *C.bifermentans* ve *C.sordelli*) lesinitaz pozitif, *C.difficile* lesitinaz ve lipaz negatif olduğundan egg-yolk agar ortamının kullanılması avantajdır (Brazier, 1993). p-hidroksifenilasetik asit besi yerine ilave edilerek modifiye CCFA'da bir metabolit olan p-krezol üretimini zenginleştirip *C.difficile* gaz kromatografi yöntemleri ile kolayca saptanır (Philips ve Rogers, 1981). *C.difficile* kolonileri ultraviyole (UV) ışığı altında (366 nm dalga boyunda) CCFA üzerinde sarı flöresan verir. Ancak nötral red içeren CCFA üzerinde diğer anaerob bakterilerin de flöresan verdikleri unutulmamalıdır (Cato ve ark., 1986; Bowman ve Riley, 1988).

Gaita örnekleri ısı (70°C'de en az 15 dakika ) ve alkol (saf alkol ile eşit miktarlarda ) ile işleme tabi tutulduğunda içindeki *C.difficile*'nin vejetatif formlarının yok olmasına karşılık sporlarının etkilenmediği Borriello ve Honour (1981) tarafından saptanmıştır. Çeşitli araştırma grupları gaita örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA üzerine yapılan sub kültürlerin *C.difficile* izolasyon oranlarında artışlara neden olduğunu yayınlarında bildirmişlerdir (Bartley ve Dowell, 1991; Hanff ve ark., 1993; Buogo ve ark., 1995). Besi yerlerine safra tuzları, sodyum kolat veya saf sodyum taurokolat (%0.1 lik) katılması vejetatif formları indükleyerek sporulasyonu artırır (Wilson ve ark., 1982). Ancak saf sodyum taurokolat çok pahalı olduğundan onun yerine daha ucuz ve hemen hemen aynı etkinlikte sodyum deoksikolat veya kolik asidin sodyum tuzları kullanılabilir (Mundy ve ark., 1995).

p-hidroksifenilasetik asit koloninin kendine has tipik kokusunu (at veya fil gaita kokusu) artırır. Lize edilmiş at veya koyun kanı sarı zemine karşı kolonial flöresansın tanımlanmasını kolaylaştırır, yumurta sarısı süspansiyonu lesitinaz üreten *Clostridia*'ları elimine etmede, kolik asidin sodyum tuzu ise sporulasyonu artırmak için besi yerine katılmaktadır. Fruktoz ve nötral kırmızısı katılmaz. Çünkü fruktoz fermentasyonu *C.difficile*

için ayırt edici karakteristik değildir. Nötral kırmızısı koloni flöresanı ile karıştır (Brazier, 1995). *C.difficile* için zenginleştirici kültürlerin diagnostik değerleri hakkında bazı tartışmalar vardır. Sitotoksinin saptanamadığı durumlarda bile az miktarda dahi olsa bu organizma gaitada bulunabildiğinden izolasyon için zenginleştirme metotlarına gereksinim duyulabilir (Buchanan, 1984; O'farrel ve ark., 1984; Riley ve ark., 1987).

İngiltere referans anaerob ünitesi, katı besi yerlerinden izole edilen *C.difficile*'in izolasyonunun rutin olarak Clostridia çalışması yapılmayan laboratuvarlarda halen bir sorun olduğunu ileri sürmektedir. *C.difficile* kolonileri tipik olarak, gri, opak, 24-48 saatte non-hemolitikdir. Fakat bazı suşları alfa hemoliz yapar. İnkübasyondan 48-72 saat sonra sporulasyona bağlı olarak merkezi beyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler gelişebilir. Lesitinaz üretmeyen *C.glycalicum*'un koloni morfolojisi *C.difficile*ye benzer. *C.difficile*'nin koloni morfolojisi inkübasyon süresine ve besi yerindeki agar miktarına bağlı olarak değiştiğinden organizmanın tanımlanmasında diğer özellikleri oldukça önemlidir. Değişebilen bu koloni morfolojisine rağmen deneyimle karakteristik koloni kokusu (at veya fil gaita kokusu) ile kolaylıkla tanınabilir. *C.difficile*'nin sarı-yeşil flöresansı identifikasyonda yararlı olmasına rağmen, diğer bazı *Clostridialar* (*C.innocuum*, *C.novyi* A, *C.cadaveris*, *C.scatologenes*) ile *Fusobacterium* genus'unun bazı türlerinin de benzer flöresansı yaptığı bildirilmiştir. Yanlış identifikasyonlardan kaçınmak için ayırt edici özelliklerinden ( koloniel koku, Ultraviole altında 366 nm dalga boyunda flöresan.özellikler birleştirilerek) yararlanılabilir (Cato ve ark. 1986; Bowmann ve Riley, 1988; Brazier, 1993).

#### 1.5.1.2. Lateks aglütinasyon testi

*C.difficile* gaitadan lateks aglütinasyon testleri ile direkt olarak tespit edilebilir. Bu testlerde esas amaç toksin-A'nın saptanmasıdır. *C.difficile*'nin identifikasyonunda kullanılan lateks aglütinasyon kitleri hızlı sonuç

vermektedir. Ancak kullanılan lateks partikül aglütinasyon antikorlarının bazı *Clostridialar* (*C.sordellii* ve *C.bifermentans* gibi) tarafından üretilen yüzey karbonhidrat antijenleri (glutamate de hydrogenase ) ile çapraz (kros) reaksiyon verdiği için düşük spesifiteye ve *C.difficile* taşıyıcılarının identifikasyonunda düşük pozitif prediktiv değere sahiptir (Bowman ve ark., 1986; Bennet ve ark., 1989; Freter ve ark., 1983; Kelly ve ark., 1992; Willis ve ark., 1992; Brazier, 1993).

### **1.5.1.3. Gaz likit kromatografi**

Bu anaerobik bakteriler metabolizmaları sonucu uçucu spesifik (örneğin; isokaproik asit, isovalerik asit veya p-krezol gibi) metabolitler oluştururlar. Gaz likid kromatografi yöntemi ile, söz konusu metabolitler saptanarak, *C.difficile*'nin kesin tanımlayıcı identifikasyonu yapılmaktadır. Basit, hızlı ve çok güvenilir diagnostik bir testtir (Levet, 1984; Kristjansson ve ark., 1994; Nonhoff ve ark., 1995).

### **1.5.1.4. Çabuk enzimatik sistemler**

Bakteriyel enzimlerin saptanması esasına dayanan bu sistemlerle *C.difficile*'nin hızlı bir şekilde identifikasyonu yapılabilir. Bu otomatize sistemlerin, sensitivite ve spesifitelerinin çok yüksek (%96) olduğu saptanmıştır. Bu tip çalışan sistemlerden biride API-20A'dır (Gresser ve ark., 1984; Karacewski, 1985; Head ve Ratnam, 1988; Summanen ve ark., 1988; Peiffer ve Cox, 1993; Samore ve ark., 1994a; Allen ve ark., 1995; Anderson ve ark., 1995; Fontana ve ark., 1995; King ve Phillips, 1996).

### **1.5.1.5. Nükleik asit prop tekniği**

İdentifikasyon amacıyla bir çok araştırmada kullanılmıştır (Heard ve ark., 1986; Samore ve ark., 1994b)

### 1.5.1.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu günümüzde oldukça sınırlı alanlarda kullanılmakla birlikte oldukça az (0,5 gram) miktardaki gaitadan çok düşük sayıda (5-10 adet) bulunan *C.difficile*' nin tanısında yararlanılabilecek en iyi diagnostik yöntemdir. Tüm diğer yöntemlerden 100 kat daha duyarlı olmasına rağmen tek dezavantajı toksijenik ve non toksijenik suşları ayırt edememesidir (Wren ve ark., 1990; Gumerlock ve ark., 1991; Gurtler, 1993; Collier ve ark., 1996).

### 1.5.2. Gaitadan Toksin-A ve Toksin-B Tanı Yöntemleri

Gaita örneklerinde *C.difficile*' nin tanısında yardımcı olan toksin-A ve B çeşitli yöntemlerle saptanır. Bu yöntemler toksinlerin biyolojik (Toksin-A ve B'nin letal etkilerini, toksin-B'nin sitotoksik ve toksin-A'nın enterotoksik aktivitelerini) aktivitelerini araştıran testlerdir. Bu yöntemlerde spesifik toksin antikoları kullanılarak antijen araştırılır (Brazier, 1993). Toksin, hastalığın varlığı ile paralellik göstermez. Sağlıklı yeni doğanlarda yüksek oranda toksin-A veya B bulunabilir. Bazı yetişkinlerde toksin-A barsaklarda pseudomembranlar olmaksızında bulunabilir. Tüm bu nedenlerden ötürü *C.difficile* toksinin araştırılması klinik bulgular ile birlikte değerlendirildiğinde anlamlı olur (Knobel ve ark., 1996). Toksijenik suşlar genellikle her iki toksini de sentezler. Diagnostik amaçlarla sitotoksinin gösterilmesi toksijenitenin kanıtıdır. Çevre sıcaklığında bırakılan kültür pozitif olguların  $\approx$ %20'sinde toksinler preteolitik olarak inaktive olur. Kültür pozitif örnekler mutlak surette toksin üretmezler. Çünkü kültür yöntemleri ile nontoksijenik suşlar da izole edilir (Levett ve Philips, 1985; Wren ve ark., 1990). + 4°C'de saklanan ve toksin pozitif gaita örneklerinde toksin-A 52 gün ve toksin-B 58 gün stabil olarak kalmaktadır. + 22°C'de 5 gün saklanan örneklerin sitotoksin aktivitesinde ise log.2 düzeyinde bir azalma olmaktadır (Brazier, 1993).



Dondurulan gaitalar sitotoksik aktivitelerini %99 oranında kaybettikleri için dondurulup çözülen gaita örneklerinde bu yöntemlerle toksinler çalışılmaz (Lyerly ve ark., 1988a). Bazı yazarların belirttiği gibi doku kültür yöntemleri yaklaşık % 100 sensitiv olduğu için eğer yapılabilirse önceliklidir (Viscidi ve ark., 1981; Brazier, 1993; Mattia ve ark., 1993). Gaitadan toksin tanı yöntemleri;

- 1-Doku kültürü,
- 2-Kounterimmünoelektroforesis,
- 3-Lateks aglütinasyon testi,
- 4-Enzyme Immuno Assay.

#### 1.5.2.1. Doku kültürü

Günümüzde dışkı örneklerinde 10 pgr'lık sitotoksin saptayabilen doku kültürleri toksinlerin varlığının belirlenmesinde en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, *human epithelial cells (HeP2)*, *Chinese hamster ovary (CHO, KI) cells*, *human embryonic lung fibroblasts (MRC 5, WI-38) cells*, *human amnion cells (FL)* ve *Africa green monkey kidney cells (Vero)* vb. hücreler kullanılmaktadır (Sullivan ve ark., 1982; Lyerly ve ark., 1988b). Hücrelerdeki sitopatik etkinin spesifitesi *C.sordelli* antiserumu nötralizasyonu ile gösterilir. Doku kültürleri ile toksin-B saptanmasında nonsitopatik etki görülebilir. Bu etki gaitadaki viral ajanlar veya bir başka bakteri türünün (Örneğin, *C.perfringens*) toksini nedeniyle olabilir. Toksin-B taramaları sırasında görülen bu nonsitopatik etki toksin-A taramalarında bugüne kadar bildirilmemiştir. Bu nedenle toksin taramalarında genellikle Toksin-A çalışılır (Murray ve Weber, 1983; Manabe ve ark., 1995).

Sıvı dışkı örnekleri santrüfüje edildikten sonra elde edilen süpernatant filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar fibroblastların ya da diğer hücre türünün üretildiği saydam hücre kültürü

kaplarına eklenir. 37°C'de 24-48 saat anaerob inkübasyondan sonra, ışık mikroskopunda sitopatik (yuvarlaklaşma) etki aranır. Sonuç pozitif veya negatif olarak saptanır. Normal gaita örnekleri çalışmaya uygun olmadığından rutin işlemlerde en az on hatta yüz kez dilüe edilmiş gaitalardan nonspesifik toksisite titreleri araştırılır (Lyerly ve ark., 1988b). Yapılan çalışmalarda *C.sordellii* antitoksininin *C.difficile* toksinlerini nötralize ettiği saptanmıştır (Cato ve ark., 1986). Nötralizasyonun sonunda log.2 veya log.3 arasında değişen değerlerde sitotoksisite aktivitesi belirlenir (Lyerly ve ark., 1988b). *C.sordellii* antiserumu, hücre kültürlerinde *C.difficile* toksini araştırılırken, doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Sitotoksin titreleri rutin yapılmaz, ancak tedavinin etkinliğini izlemek için yapılmaktadır (Bartlett, 1994). Doku kültürünün dezavantajı uzun sürede (2-3 gün) sonuç alınması, pahalı olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve doğrulama için referans laboratuvarlarına gereksinimi olmasıdır. Bu yüzden pratik bir yöntem değildir (Manabe ve ark., 1995).

#### **1.5.2.2. Lateks aglütinasyon testi**

Basit ve çabuk bir şekilde *C.difficile*'nin ürettiği toksin-A'nın tanısı için 1986 yılında piyasaya sunulmuştur (Brazier, 1993). Lyerly ve Wilkins (1986) tarafından toksin tanısında kullanılan bu kitlerin daha sonra test reaktif proteinlerinin, dışkıda bulunan glutamat dehidrogenaz sentezleyen diğer anaerob bakterilerle de reaksiyon verdiği anlaşıldığı üzerine artık gaitadan *C.difficile* varlığının saptanmasında da kullanılmaktadır (Delmee ve ark., 1985; Delme ve ark., 1992; Brazier, 1993). Kullanım kolaylığı ve çabuk sonuç vermesine karşılık duyarlılığının ve özgüllüğünün yetersiz olmasından dolayı toksin çalışmalarında rutin kullanıma pek girmemiştir (Dipersio ve ark., 1991; Kelly ve ark., 1992; Riederer ve ark., 1995).

### 1.5.2.3. Enzyme immunoassay (EIA)

Çalışma prensibi aynı firmaları farklı çeşitli (Örneğin;The primer kit, Vitek, Difco vb.). ticari kitler vardır. EIA prensibine göre çalışılan bu kitler, güvenilir, çok kısa sürede (2-3 saat) sonuç vermelerine karşı test birim maliyetleri oldukça yüksektir. Ancak doku kültürü yapamayan laboratuvarlar için bu kitler *C.difficile'* ye bağlı diyarelerin hızlı tanısında yardımcı olmaktadır (DeGirolami ve Hanff, 1992; Delmee ve ark., 1992; Shanholtzer ve ark., 1992; Perrin ve ark., 1993; Forward ve ark., 1994; Manabe ve ark., 1995; Knobel ve ark., 1996).

Geçtiğimiz yıllarda hızla gelişen hızlı immunoassay yöntemler bu gün neredeyse hücre kültürlerinin yerini alacak düzeye gelmiştir. Günümüzde direkt gaitadan *C.difficile'* nin tanısında kullanılan ve hızlı sonuç alınan testlerden biride *Enzyme Linked Fleuresans Assay (ELFA)* prensibine göre çalışan *Vitek Immuno Diagnostic Assay Clostridium C.difficile toksin-A (Vidas CDA.)*(*BIO MERIEUX SA FRANCE*)dır. Vidas CDA, gaita örneklerinde *C.difficile* toksin-A antijenlerini araştıran ve 2.5 saat içinde sonuç veren bir testtir. Hızlı bir laboratuvar testi olan Vidas CDA'nın sensitivitesi ve spesifitesi oldukça güvenilirdir. Çalışmalarda katı ve sıvı gaita örnekleri kullanılabilir. Vidas CDA'da, saflaştırılmış monoklonal veya poliklonal fare anti *C.difficile* toksin-A antikorlarının kullanılması ile toksin-A saptanır. Doku kültürü kadar duyarlı olmasa da Vidas CDA, süratli bir şekilde uygulanabilmesi, diğer tekniklerden oldukça daha az karmaşık olması, kullanım kolaylığı, duyarlılığı ve düşük maliyeti sayesinde tercih edilen bir laboratuvar yöntemi olmuştur (Shanholtzer ve ark. 1992; Barbutt ve ark., 1993; Knapp ve ark., 1993; Mattia ve ark., 1993; Whittier ve ark., 1993; Riederer ve ark., 1995; Schleupner ve ark., 1995).

## 1.6. Tedavi

Bir çok enterik patojen gibi *C.difficile*'nin neden olduğu hastalık spektrumu asemptomatik taşıyıcılıktan, hayatı tehdit eden kolitise kadar değişir. Hastalık sadece kolonda patolojik değişiklikler yapar. İnce barsaklardaki değişiklikler ancak tomografi veya otopsi ile gözlenir.

Enterit semptomlarının süresi ve şiddeti arttıkça organizmada (*C.difficile* toksin saptama sıklığının artmasına paralel olarak) patolojik değişikliklerde artar. Sık olarak görülen bulgular; abdominal kramplar, ateş ve lökositosis, yüksek protein kaybına bağlı hipoalbuminemi, toksik megakolon, sıvı elektrolit dengenin bozulması ile birlikte ilaç kullanım bozukluğuna bağlı olarak bir kaç haftada ya da aylar içinde gelişen kronik diaredir. Ekstra kolon belirtileri olağan dışıdır. Seyrek olarak poliartritis olguları da görülebilir. Sistemik olarak verilen toksin-A ve toksin-B deney hayvanlarında letal etki gösterir. Tedavi edilmeyen olgularda hastalığın süresi oldukça değişkendir (Bartlett, 1992). Tüm *C.difficile* suşları; penisilin, ampisilin, vankomisin, rifampisin, ve metranidazol'e duyarlıdır. Klindamisin, sefalosporin, tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisin'e duyarlılık değişken olup aminoglikozitlere dirençlidirler. *C.difficile* infeksiyonları tedavisinde metronidazol ve vankomisin tedavide eşit etkinliğe sahiptir. Ancak vankomisin oral olarak verildiğinde absorbe olmadığından kalın barsaklarda anlamlı bakterisidal konsantrasyonlara ulaştığı için metranidazole göre tedavide daha avantajlıdır (Bartlett, 1994; Schuller, 1995). Tüm hastaların tedaviye verdikleri yanıt izlenememesine rağmen vankomisin ve metronidazol tedavisi alanların çoğunda hastalık nükseder ve komplikasyonların tanısı konulabilir. Nükslerin sıklığı tedavi için seçilen antibiyotiklerin dozuna ve tedavide kullanılma sürelerine ve bu ilaçların (metranidazol, vankomisin, basitrasin vb) etkilerine bağlı olduğunu düşündürmektedir (Dzink ve Bartlett, 1980; Wust ve ark.,1982; Tabaqchali ve ark., 1984; Tabaqchali, 1990; Brazier, 1993; Bartlett, 1994).

Epidemilerin kontrolünde portörlerin eradikasyonu belki arzu edilebilir. Fakat vankomisin ve diğer antibiyotikler ile organizmanın elimine edilemediği görülmektedir. Çünkü bir çok çalışma ile hastaların, gaitalarındaki vankomisin düzeyleri MIC değerinden 100 kat fazla olmasına karşılık mikroorganizmayı gaitalarında barındırdığını göstermiştir. Antibiyotiklerin sporlar üzerine antibakteriyel etkisi olmadığından mikroorganizma, konak çevresindeki yaşamını sporulasyonla devam ettirmektedir (Fekety ve ark., 1981; Gerding ve ark., 1986; Bartlett, 1990).



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Haziran 1995 ve Eylül 1996 tarihleri arasında değişik yerleşim birimlerinden tedavi kurumlarına (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve özel veteriner klinikleri) getirilen enteritisli 32 köpek ve 19 kedi ile enteritissiz 52 köpek ve 30 kedi, özel üretim ve satış kuruluşlarından (özel üretim çiftlikleri ve pet shoplar) alınan enteritisli 48 köpek ve 7 kedi, enteritissiz 66 köpek ve 12 kedi'den alınan toplam 198 köpek ve 68 kedi gaita örneği (Çizelge-4) *C.difficile* izolasyonu ve *C.difficile* toksin-A varlığı yönünden incelenmiştir.

**Çizelge 4.** Köpek ve kedi gaita örneklerinin alındıkları kurumlara ve enteritis durumlarına göre dağılımı.

Örnek alınan kurum	Köpek			Kedi		
	Enteritisli	Enteritissiz	Toplam	Enteritisli	Enteritissiz	Toplam
Tedavi kurumları	32	52	84	19	30	49
Üretim ve satış kurumları	48	66	114	7	12	19
Toplam	80	118	198	26	42	68

### 2.1. Örnek Almak İçin Kullanılan Gereçler

Ağzı kapaklı plastik gaita kapları, gaita örneklerinin alınmasını takiben laboratuvara getirmek üzere, pamuk uçlu swaplar ve plastik enjektörler ise, diareli hayvanlardan örnek alınması amacıyla kullanıldı.

## **2.2. Anaerobik ortamın sağlanması**

Anaerobik ortamın sağlanmasında (BBL Gas Pak System ve Oxoid AN 25 Sistem) anaerobik jar sistemleri kullanıldı.

### **2.2.1 BBL Gas Pak Sistem (BBL Microbiology Systems, Cockeysville)**

Jar içerisinde anaerobik ortam (% 85 N<sub>2</sub>, % 5 H<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub>), indikatörlü Anaerobik Gas jeneratör paketleriyle sağlandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, 10 ml su ilave edilerek aktive edilen Anaerobik Gas jeneratör paketleri, jar içerisine konuldu. Daha sonra çabucak jar kapağı kapatılarak etüve konuldu.

### **2.2.2. Oxoid AN 25 Sistem (Oxoid Inc., Columbia)**

2.5 litrelik hacime sahip jar içerisinde anaerobiosiz'in sağlanması amacıyla Anaero Gen jeneratör paketleri kullanıldı. Alüminyum paket içerisinde bulunan ikinci paket, birinci paketin açılmasını takiben süratli bir şekilde jar içine yerleştirildi. Jarın kapağı kapatılarak etüve konuldu. Aktivasyon için su ilavesine gereksinim göstermeyen bir sistemdir.

## **2.3. Besiyerleri**

### **2.3.1. Katı Besiyerleri**

#### **2.3.1.1. Cycloserine Cefoxitine Fructoze Agar (CCFA)**

Bu besi yerinin hazırlanmasında *C.difficile Agar Base (Oxoid CM 601)* ve *C.difficile selective supplement (Oxoid SR 096E)*'den yararlanıldı.

**C.difficile Selective Agar Base(Oxoid CM 601)**

	g/L _____
Proteose Peptone	40,0
Disodium Hydrogen Phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,0
Fructose	6,0
Potassium Dihydrogen Phosphate(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,0
Sodium Chloride	2,0
Magnesium Sulphate (MgSO <sub>4</sub> )	0,1
Agar	20,0
Distile su	1000 ml.
De fibrine At kanı	70 ml.

**C.difficile Selective Supplement (Oxoid SR096E)**

Cycloserine	250 mg/L.
Cefoxitine	8 mg/L.

CCFA, 1000 ml distile su içerisinde eritildi, pH 7.5 ±0.2'e ayarlandı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 45-50°C'ye kadar soğuması beklendi. Bu sıcaklık derecesinde besiyeri üzerine 2ml distile su içinde eritilen *C.difficile* supplement ve 70 ml steril defibrine at kanı ilave edildi. Steril petrilere 20-25 ml döküldü. Daha sonra, besiyerlerinin katılaşması beklenecek koyu renkli plastik torbalar içerisinde ağzı sıkıca kapatıldı ve buzdolabında +4°C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

**2.3.1.2. Eosin Metilen Blue Agar (EMB)****2.3.1.3. Salmonella Shigella Agar (SS)****2.3.1.4. Defibrine koyun kanlı agar**

Bu besi yerleri ısı ile muamele işleminin gaita örneklerinde bulunan bakterilerin vejetatif formlarının tam olarak inhibe olup olmadıklarının



anlaşılabilir olması için kontrol amaçlarıyla hazırlandı ve kullanılıncaya kadar + 4°C'de saklandı.

### 2.3.2. Sıvı besiyerleri

#### 2.3.2.1. Zenginleştirilmiş Tiyoglikolatlı Buyyon

%0.1 sodyum taurokolat katılımı ile elde edilen bu besi yeri gaita örneklerinin taşınmasında, saklanması ve sporulasyonun artırılması amacıyla kullanıldı.

#### 2.3.2.2. API-20A ortamı

İdentifikasyonda kullanılan bu besi yeri identifikasyon kiti ile birlikte verilmekte ve 6 ml kapalı cam ampuller içinde bulunmaktadır.

	<u>g/L</u>
Trypticase	5,0 g
Yeast extract	5,0 g
Sodium chloride	2,5 g
L-tryptophane	0,2 g
L-cystine	0,4 g
Sodium sulphite	0,1 g
Hemin	0,01 g
Vitamin K3	0,01 g
De mineralize su	1000 ml
pH	7,0-7,2

### 2.4. Referans Suş

Çalışmada pozitif kontrol olarak *C.difficile* ATCC 9689 (Oxoid) kullanıldı.

## 2.5. Solüsyonlar ve Reagentlar

### 2.5.1. Sodyum taorucholat (*Sigma Chemical Corp.*)

%0,1'lik solusyonu hazırlandı sporulasyonun arttırılması amacıyla tiyoglükonatlı buyyonda kullanıldı.

### 2.5.2. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

% 3'lük solusyonu *C.difficile* suşlarının katalaz aktivitelerinin saptanmasında kullanıldı.

### 2.5.3. EHR reagent (BIOMERIEUX SA, Marcy-l'Etoile, France)

<i>Ethanol</i>	82,0 ml
Hidroklorik asit	6,67 g
<i>Paradimethylaminobenzaldehyde</i>	900 mg
Distile su	11,3 ml

### 2.5.4. BCP reagent (BIOMERIEUX SA, Marcy-l'Etoile, France)

<i>Bromocresol purple</i>	200 mg
Distile su	100 ml

### 2.5.5. XYL reagent (BIOMERIEUX SA, Marcy-l'Etoile, France)

<i>Xylene</i>	5 ml.
---------------	-------

### 2.5.6. Sample Treatment Reagent (BIOMERIEUX)

Gaita örneklerinin sulandırılmasında kullanıldı.

## 2.6. API Sistem ( Analytical Profile Index, BIO MERIEUX)

Otomatik inokülatör, okuyucu, dansitometre ve bilgi işlem ünitelerinden oluşan bu otomatize sistem, anaerobik koşullarda izole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı.

Anaerobların biyokimyasal identifikasyonunda kullanılan kolay ve çabuk sonuç veren aynı anda 21 test yapabilen hızlı bir sistemdir. Bakterinin diğer özellikleri, koloni morfolojisi ve Gram boyama ile yapılır. Tam ve doğru identifikasyonlar için performansı yüksek bir yöntemdir. İdentifikasyon çizelgesinden yararlanılarak (Çizelge 5) cihaza gereksinim olmadan da identifikasyon yapmak mümkündür. Cihaz test sonuçlarını hafızasında kayıtlı

**Çizelge 5.** API-20A'da *C.difficile*'nin çeşitli biyokimyasal özellikleri.

İndol	Üre	Glikoz	Mannitol	Laktöz	Sükröz	Maltoz	Salisin	Ksilitöz	Aralbinoz	Jelatin	Eskülün	Gliseroz	Selenoz	Mannoz	Meleroz	Rafinöz	Sorbitol	Ramnoz	Trehaloz	Katalaz
-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

olan bilgiler ile karşılaştırarak bakterinin identifikasyonunu yapar. Api 20 A, dehidrat substrat içeren sitriplerden oluşmuştur. Bu sitripler üzerine bakteri süspansiyonu ilave edilir. Bakterinin inkübasyonu ile oluşan metabolitlerin, inkübasyon sonunda eklenen reagentlere etkisiyle meydana gelen renk değişikliğinin gözlenmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonlar değerlendirilerek sonuçların okunması ve yorumlanması gözle veya optik okuyucularla yapılarak

---

D; Değişken

identifikasyon yapılır. Diagnostik amaçlar için steril koşullarda ve oda ısısında çalışılmalıdır. İnokulumun hazırlanması için üretilmiş olan koloniler steril swaplar ile alınarak API-20A medyuma ilave edilir. Final konsantrasyonu McFarland 4'e ayarlanır. API-20 A striplerine ekimler yapılarak 35-37 °C'de rutubetli ve anaerob ortamda 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda striplerdeki her mikrotüp üzerine birer damla BCP ve EHR reagent ilave edilir. Mikrotüplerde görülen sarı/gri-sarı renk değişikliği testlerin pozitif olduğunu gösterir. İndol testi için IND kuyucuğuna xylene reagent'ı konur üzerine bir damla mineral yağ damlatılır. 2-3 dakika içinde mikrotüpte görülen kırmızı renk (negatif) testin pozitif olduğunu gösterir. Katalaz testi ise % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yapılır ve mikrotüplerde hava kabarcıklarının görülmesi pozitif olarak değerlendirilir.

## 2.7. VIDAS Sistemi

Gaita örneklerinden *C.difficile*nin toksin-A antijenini araştıran ELFA yöntemine göre çalışan ve 2.5 saat sonra değerlendirme yapan otomatik bir sistemi içerir.

### 2.7.1. Vidas CDA Strip

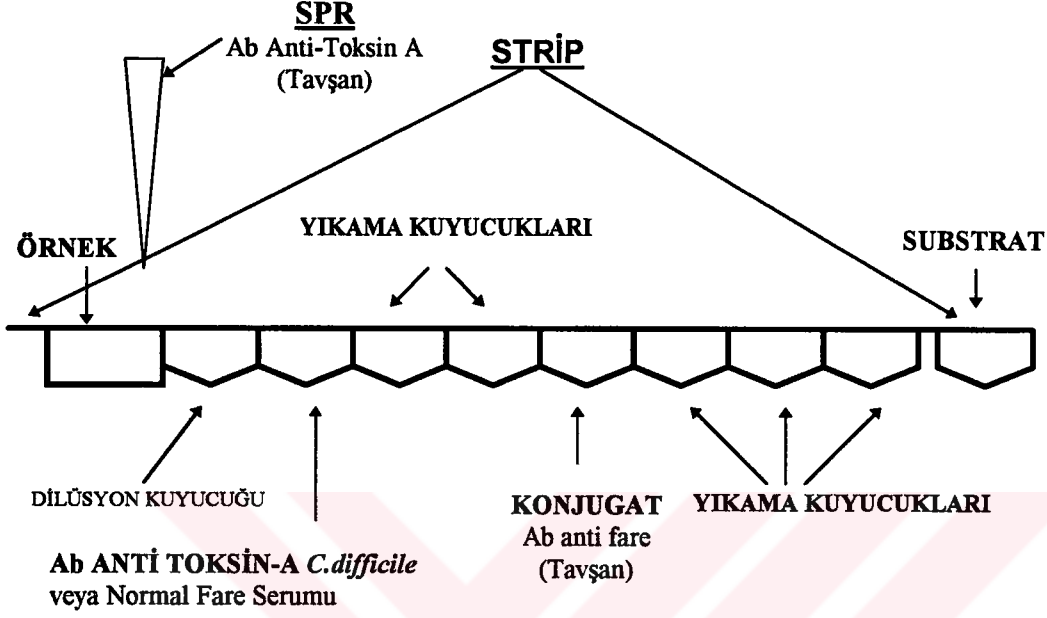
Gaita örneklerinin konulduğu, dilusyonun yapıldığı , monoklonal fare anti toksin-A antikoru ile kaplı, yıkamaların gerçekleştirildiği, anti tavşan antikoru içeren konjugat bulunduran, tekrar yıkamaların yapıldığı ve substrat içeren 10 adet kuyucuktan (Şekil 2) meydana gelmiştir.

### 2.7.2. Solid-phase receptacle (SPR) kartuş

Polistren monoklonal tavşan anti-*C.difficile* antikoru ile kaplanmış ve otomatik pipetlemeyi sağlayan steril kartuşlardır.

### 2.7.3. Pozitif ve negatif kontrol serumları

Kontrol olarak kullanılan serumlardır.



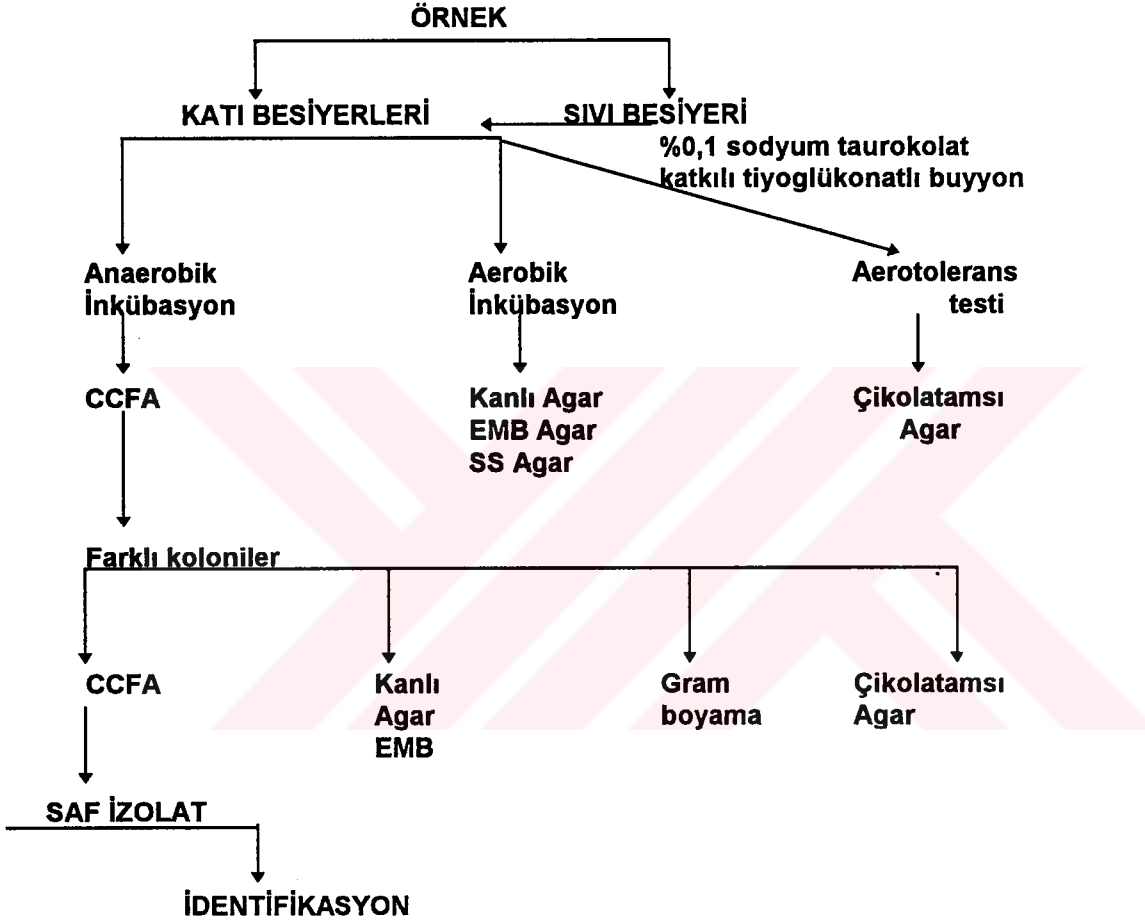
**Şekil 2.** C.difficile toksin-A (CDA) strip bölümleri ve SPR kartuşu.

### 2.8. İzolasyon ve İdentifikasyon

Her gaita örneğinden gaita kaplarına iki adet alındı. Gaita kaplarına alınamayan sıvı gaita örnekleri ise swap veya plastik enjektörle alındı ve iki saat içinde laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen iki adet gaita örneğinden bir tanesi toksin-A çalışılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklamaya alındı. Diğer örneğin ise %0.9'luk serum fizyolojik içerisinde süspansiyonu yapıldı.

Laboratuvara getirilen gaita örneklerinden hazırlanan süspansiyonlar önce vejetatif formda bulunan bakterilerin inaktivasyonu için + 70°C'de 15 dakika ısıtıldı ve sporulasyon oluşumu için %0.1 sodyum taurokolat içeren tiyoglukonatlı buyyona alınarak + 4°C'de 24 saat tutuldu. Daha sonra öze ile

steril kabinde *C.difficile* yönünden defibrine at kanlı CCFA agar'a, ısı ile muamele işleminin diğer bakterileri inhibe ettiğini anlaşılabilir olması için EMB agar ve SS agar'a primer ekimleri (Şekil 3) yapıldı. İnokülasyon işlemleri tamamlandıktan sonra EMB agar ve SS agar besi yerleri 37°C'de 18-24 saat normal etüvde, CCFA agar zaman



**Şekil 3.** Gaitadan *C.difficile* nin izolasyonu ve identifikasyonu.

kaybedilmeden anaerobik koşullar oluşturularak anaerobik jar içerisine konuldu ve kapağı çabucak kapatılarak normal etüv içinde 37°C'de 24-72 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda ekim yapılan plaklar gözlenerek üremenin olup olmadığı kontrol edildi. Anaerobik jar ortamında üreyen kolonilerden bir miktar alınarak aerotolerans testi için; birer adet kanlı agar ve EMB agar'a ekimler yapılarak aerobik atmosfer koşullarında 37°C'de 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Yukarıda belirtilen inkübasyon sürelerinin

sonunda, aerobik ve anaerobik ortamlarda inkube edilen plaklar incelenerek ayrı ayrı değerlendirildi. Anaerobik koşullarda inkube edilen at kanlı CCFA agarda üreyen bütün farklı koloni tiplerinin detaylı tanımlaması ve aerotolerans testleri yapıldı. CCFA besiyerlerinde anaerobik koşullarda ürediği halde aerobik koşullarda üremeyen bakterilerin koloni morfolojileri, anaerobik besiyerlerindeki üreme özellikleri ile karşılaştırıldı.

Her farklı koloninin, Gram boyama işlemini takiben at kanlı CCFA agar, EMB agar ve koyun kanlı agara ikinci kültürleri (pasaj) yapıldı. Birinci kültür işleminde olduğu gibi CCFA agar anaerobik ortam şartlarında, EMB ve koyun kanlı agar aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Pasajlarda herhangi bir üreme olmaması halinde, zenginleştirilmiş tiyoglikolatlı besiyerinden ikinci subkültürler yapılarak yeniden değerlendirildi. Anaerobik koşullarda CCFA besi yerinde en az 8-10 koloni oluşturan bakterilerin makroskopik koloni özellikleri değerlendirilerek kaydedildi. Üreme saptanan her plaktaki farklı koloniden Gram boyama yöntemi ile preparatlar hazırlandı. Bu preparatlarda, izole edilen etkenlerin mikroskopik morfolojileri incelendi.

İzolasyonu yapılan izolatların, bakteriyel preforme enzimlerin tespitine dayalı standardize API-20A stripleri kullanılarak kesin identifikasyonları yapıldı. At kanlı CCFA agarda saf kültürü elde edilen bakteri kolonilerinden, 6 ml'lik medium süspansiyonu içerisinde, Mc Farland 4 no'lu bulanıklığına eşit bakteriyel süspansiyonlar hazırlandı. Sonra herbir kuyucuğa 100 µl olmak üzere tüm kuyucuklara aynı pipet yardımıyla bakteri süspansiyonu konuldu. 37°C'de 18-24 saat anaerob ve rutubetli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her mikrotüp üzerine birer damla BCP ve EHR reagent ilave edildi. IND kuyucuğuna xylen reagent'ı kondu ve üzerine mineral yağdan 1 damla konularak indol testi, CAT kuyucuğuna ise bir damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak katalaz testi yapıldı. IND kuyucuğunda 2-3 dakikada kırmızı renk (negatif), Cat kuyucuğunda hava kabarcıklarının görülmesi ve diğer kuyucuklarda ise sarı/gri-sarı renk görülmesi testlerin pozitif olduğunu

gösterdi. Renk değişiklikleri identifikasyon tablosu (Çizelge 5) ile karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar ile mikroorganizmanın önceden kayıt edilen (48-72 saatte üreyen, 3 mm büyüklüğünde, karakteristik at gaitası kokulu, ultraviyole lambası altında yeşil floresans veren , Gram boyama ile Gram pozitif ve sporlu basil görünümünde ve çevresinde sarı hale oluşturan koloniler) özellikleriyle birlikte değerlendirilerek kesin identifikasyon yapıldı.

## 2.9. Toksin-A Varlığının Saptanması

Sıvı gaita örneklerinden 1 ml, katı gaita örneklerinden 0.5 gram alındı. Örneklerin üzerine 3 ml. TRIS buffer salin ilave edildi. Vortekste 3 dakika karıştırıldı. Homojenizasyon sağlandıktan sonra 25°C'de 5 dakika 12.000 g'de santrifüj edildi. Üst sıvıdan 300 µl alındı ve çalışılmak üzere toksin-A striplerine konuldu. Strip ve SPR uçları cihaza yerleştirildi (SPR uçlarının aynı zamanda otomatik pipetleme görevi vardır). Eğer çalışılan örnekte toksin-A bulunuyorsa, tüm toksin-A antiijenleri Strip içindeki fare monoklonal anti *C.difficile* toksin-A antikoru ile kaplı SPR duvarına bağlanır. Yıkama işlemlerinden sonra monoklonal anti fare antikoru fosfat konjugat ile işleme girer. Fosfataza bağlanan konjugat pozitif sonuçlarda substratı hidrolize eder. Son yıkamadan sonra ortamda toksin-A bulunuyorsa 4-methylumbelliferyl phosphate floresan üretir. 2.5 saat içinde elde edilen sonuçlar;

<130 Negatif,

>131 <235 arası şüpheli ve

>236 pozitif olarak değerlendirildi.



### 3. BULGULAR

Çeşitli kurum ve kuruluşlardan 1995-1996 yıllarında toplam 198 köpek ve 68 kediden toplanan (Çizelge 4) gaita örneklerinden izole ve identifiye edilen *C.difficile* ile gaita örneklerinden saptanan toksin-A antijen sayıları ve oranları ayrı ayrı Çizelge 6, 7, 8 ve 9'da gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular iki grup altında toplandı.

#### 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Elde edilen veriler dışkı örneklerinin enteritisli ve enteritissiz oluşlarına göre köpek ve kediler için ayrı ayrı değerlendirildi. Kontrol besi yerlerinde üreme olmadı.

Köpek gaita örneklerinden (Çizelge 6) yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında; tedavi kurumlarından alınan enteritisli köpeklerden alınan 32 gaita örneğinin 12'sinde (%38), enteritissiz köpeklerden alınan 52 dışkı örneğinin 14'ünde (% 27) toplam 84 köpek gaita örneğinin 26'sında (%31) *C.difficile* izole ve identifiye edildi.

**Çizelge 6.** Köpek gaitalarından izole edilen *C.difficile* suş sayıları ve oranları.

Örnek alınan kurum	Enteritisli	Enteritissiz	Genel Toplam
Tedavi kurumları	12/32 (% 38)	14/52 (% 27)	26/84 (% 31)
Üretim ve satış kurumları	21/48 (% 44)	20/66 (% 30)	41/114 (% 36)
Genel toplam	33/80 (% 41)	34/118 (% 29)	67/198 (% 34)

Üretim ve satış kuruluşlarındaki enteritisli köpeklerden toplanan 48 gaita örneğinin 21'inde (% 44) enteritissiz köpeklerden alınan 66 dışkı

örneğinden 20 (% 30) olmak üzere toplam 114 gaitanın 41'inde (% 36) *C.difficile* tanımlandı.

Enteritisli köpeklerden alınan 80 gaitanın 33'ünde (% 41), enteritissiz köpeklerden alınan 118 gaita örneğinin 34'ünde (% 29) toplam 198 köpek gaita örneğinden 67 (% 34) *C.difficile* suşu izole ve identifiye edildi.

Kedi dışkılarından yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında; tedavi kurumlarındaki 19 enteritisli kediden alınan gaita örneğinden 6 (% 32), enteritissiz kedilerden alınan 30 dışkı örneğinin 8'inde (% 27) toplam 49 kedi gaita örneğinin 14 (% 29) tanesinde *C.difficile* izole ve identifiye edildi. Üretim ve satış kuruluşlarındaki enteritisli kedilerden alınan 7 gaita örneğinin 3 tanesinde (% 43), enteritissiz kedilerden alınan 12 dışkıdan 4 (% 33) olmak üzere toplam 19 kedi gaita örneğinin 7 tanesinde (% 37) *C.difficile* suşu tanımlandı. Enteritisli 26 kedi dışkı örneğinin 9'unda (% 35), enteritissiz 42 kedi gaita örneğinden 12 (% 29) toplam 68 kedi gaita (Çizelge 7) örneğinin 21'inde (% 31) *C.difficile* izole ve identifiye edildi.

**Çizelge 7.** Kedi gaitalarından saptanan *C.difficile* sayıları ve oranları.

Örnek alınan kurum	Enteritisli	Enteritissiz	Genel Toplam
Tedavi kurumları	6/19 (% 32)	8/30 (% 27)	14/49 (% 29)
Üretim ve satış kuruluşları	3/7 (% 43)	4/12 (% 33)	7/19 (% 37)
Genel toplam	9/26 (% 35)	12/42 (% 29)	21/68 (% 31)

### 3.2. Toksin-A antijen bulguları

Köpek gaitalarında (Çizelge 8) yapılan toksin A saptama çalışmalarında; tedavi kurumlarından alınan enteritisli köpeklerden alınan 32 gaitadan 7 (% 22), enteritissiz köpeklerden alınan 52 gaitadan 9 (% 17) ve toplam 84 köpek gaita örneğinin 16'sında (% 19) toksin-A antijen pozitifliği saptandı.Özel üretim ve satış kuruluşlarından alınan enteritisli 48 köpek gaita örneğinin 15 tanesinde (% 31), enteritissiz köpeklerden alınan 66 gaita örneğinin 15'inde

(% 23) ve özel üretim ve satış kuruluşlarından alınan toplam 114 köpek gaitasının 30'unda (% 26) toksin-A antijen pozitifliği saptandı. Bu kurum ve kuruluşlardan enteritisli köpeklerden alınan toplam 80 gaitanın 22 tanesinde (% 28), enteritissiz köpeklerden alınan 118 gaita örneğinin 24 tanesinde (% 20) ve çalışmaya alınan 198 köpek dışkı örneğinin 46 tanesinde (%23) toksin-A antijeni saptandı.

**Çizelge 8.** Köpek gaitalarından saptanan toksin A antijeni sayıları ve oranları.

Örnek alınan kurum	Enteritisli	Enteritissiz	Genel Toplam
Tedavi kurumları	7/32 (% 22)	9/52 (% 17)	16/84 (% 19)
Üretim ve satış kuruluşları	15/48 (% 31)	15/66 (% 23)	30/114 (% 26)
Genel toplam	22/80 (% 28)	24/118 (% 20)	46/198 (% 23)

Kedi dışkılarından yapılan toksin A antijen (Çizelge 9) çalışmalarında; tedavi kurumlarından alınan enteritisli 19 kedi gaitasının 4 tanesinde (% 21), özel üretim ve satış kuruluşlarından alınan 7 enteritisli kedi gaita örneğinin 2'sinde (% 29), tedavi kurumlarından alınan enteritissiz 30 kedi gaitasının 8'inde (% 27), özel üretim ve satış kuruluşlarından alınan 12 kedi gaita örneğinin 4'ünde (% 33), enteritisli kedilerden toplanan 26 gaitanın 6'sında (% 23), enteritissiz 42 kedi dışkısının 12 tanesinde (% 29) toksin-A antijeni pozitif olarak saptandı.

**Çizelge 9.** Kedi gaitalarından saptanan toksin A antijeni sayıları ve oranları.

Örnek alınan kurum	Enteritisli	Enteritissiz	Genel Toplam
Tedavi kurumlar	4/19 (% 21)	8/30 (% 27)	12/49 (% 25)
Üretim ve satış kuruluşları	2/7 (% 29)	4/12 (% 33)	6/19 (% 32)
Genel toplam	6/26 (% 23)	12/42 (% 29)	18/68 (% 27)

Tedavi kurumlarından toplanan 49 kedi gaita örneğinin 12'sinde (% 25), özel üretim ve satış kuruluşlarından alınan 19 kedi dışkısının 6'sında (% 32) çalışmaya alınan toplam 68 kedi dışkı örneğinin 18 tanesinde (% 27) toksin A antijeni pozitif bulundu.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada köpek ve kedilerden toplanan gaita örneklerinden *C.difficile*'nin izolasyonu için CCFA besiyeri identifikasyon için API 20A, toksin A antijeni araştırılmasında VIDAS CDA testi kullanıldı.

*C.difficile*'nin evcil hayvanlarda bulunuşu, meydana getirmiş olduğu hastalıklar ve mikroorganizmanın hayvandan insana geçişi konusundaki bilgiler çok sınırlıdır (Borriello ve ark.1983). Ülkemizde evcil hayvanlarda *C.difficile* ile ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması bizi bu konuda araştırmaya yöneltti.

*C.difficile* rezervuarı olarak pek çok kaynak bildirilmesine rağmen infeksiyon kaynağının epidemiyolojik öneme sahip olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. *C.difficile*'nin çevresel dağılımı özellikle toprak, deniz ve hayvan atıklarında bir kaç çalışma ile incelenmiştir. *C.difficile* sık olmamakla birlikte sağlıklı hayvanların (kedi, deve, at, eşek, piliç, hamster, yılan, domuz vb) gastrointestinal sisteminden izole edilmiştir. *C.difficile*'nin ev hayvanları tarafından (özellikle kedi ve köpek) fekal taşıyıcılığının yaygın olduğu ve ev hayvanlarının infeksiyon kaynağı olabileceği bazı yayınlarda bildirilmiştir (Borriello ve ark., 1983; Lyerly ve ark., 1985; Riley ve ark., 1987; Weber ve ark., 1989; Perrin ve ark., 1993).

*C.difficile*'nin izolasyon çalışmalarında bugüne kadar çeşitli besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerine sikloserin ve sefoksitin gibi antibiyotikler katılmıştır. Ancak çeşitli araştırmacılar sikloserin yerine diğer bir takım

antibiyotikler (gentamisin, ciprofloksasin vb.) ilave ederek modifiye CCFA besi yerleri hazırlamışlardır. George ve arkadaşları (1979)'nın geliştirdiği CCFA besi yerindeki antibiyotik konsantrasyonlarının (sikloserin 500 mg/L. ve sefoksitin 16 mg/L ) yüksek olması *C.difficile*'yi baskılayarak diğer bakterilerin çoğalmasını hızlandırıyordu. Levett (1985)

CCFA besiyerinde sikloserin'in 250 mg/L. ve sefoksitin'in 8 mg/L. konsantrasyonlarının fekal örneklerdeki *C.difficile* izolasyon oranında % 30'luk artışlara neden olacağını bildirmiştir. Bunun üzerine sikloserin ve sefoksitin konsantrasyonları azaltılarak yeniden düzenlenmiş ve günümüzde izolasyon çalışmalarında bu yeni (250 mg/L. sikloserin, 8 mg/L. sefoksitin) konsantrasyonlar kullanılmaktadır (Bartley ve Dowell, 1991; Clabots ve ark., 1991; Aspinall ve Hutchinson, 1992; Niyogi ve Pal, 1992). Bu nedenle çalışmada CCFA besiyerinde antibiyotiklerin bu son konsantrasyonları kullanıldı. Çünkü bu konsantrasyonlar diğer anaeroblari baskılayıp *C.difficile*'nin üremesini hızlandırmaktadır. Ayrıca gaita örneklerinin ısı ve alkol ile işleme tabi tutulması ortamdaki bakterilerin vejetatif formlarını öldürmekte ve spor formlarının ise ortamda kalmasına olanak sağlamaktadır (Borriello ve Honour, 1981; Wilson ve ark., 1982; Bartley ve Dowell, 1991; Marler ve ark., 1992). Besiyerlerine sodyum taurokolat katılması sporulasyonu hızlandıran izolasyonu artıran bir diğer faktör (Marler ve ark., 1992; Hanff ve ark., 1993; Mundy ve ark., 1995) olduğundan bu çalışmada bakteri populasyonunu azaltmak için 70°C'de 15 dakika ısıtılan gaita örneklerinde *C.difficile*'nin izolasyonunda 250 mg/L sikloserin ve 8 mg/L sefoksitin içeren % 7 defibrine at kanlı CCFA agar ve sporulasyonu artırmak amacıyla %0.1 sodyum taurokolatlı tiyoglukonat besiyeri kullanıldı.

Literatür araştırmalarında toksin saptama çalışmalarında doku kültürlerinin kullanıldığı görüldü (Sullivan ve ark., 1982; Lyerly ve ark., 1988b; Bartlett, 1994; Manabe ve ark., 1995). Ancak otörlerin doku kültürlerinin referans laboratuvarlarında ve kalifiye personel gözetiminde

yapılmasını tavsiye etmelerinden dolayı çalışmada doku kültürü yerine toksin-A varlığını saptamada duyarlılığı ve özgüllüğü doku kültürüne yakın olması nedeniyle ELFA yöntemi ile çalışan (Shanholtzer ve ark., 1992; Barbut ve ark., 1993; Knoop ve ark., 1993; Mattia ve ark., 1993) VIDAS CDA testinden yararlanıldı.

Çalışmaya alınan 198 köpek gaitasından 67 (% 34), 68 kedi gaitasından ise 21 (% 31) *C.difficile* suşu izole ve identifiye edildi. En çok *C.difficile* izolasyon ve identifikasyonu üretim ve satış kurumlarından toplanan enteritisli köpek (% 44) ve kedi (% 43) gaitalarından (Çizelge 6 ve 7) gerçekleştirildi. Çeşitli araştırma sonuçları ile çalışmadan elde edilen bulgular çizelge 10'da toplu halde gösterilmiştir.

Weber ve arkadaşları (1989) gaita örneklerine herhangi bir işlem (alkol veya ısı ile muamele) uygulamaksızın ve besi yerine zenginleştirici katkı maddeleri (sodyum taurokolat ilave edilmesi gibi) katmadan Colombia agar besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmalarında enteritissiz köpeklerden % 9,3 , enteritissiz kedilerden % 9, enteritisli köpeklerden % 2,7; enteritisli kedilerden ise % 6,7 oranında *C.difficile* izole edildiğini bildirmişlerdir. Weber ve arkadaşları (1989) enteritissiz köpek ve kedilerden daha fazla *C.difficile* izole etmelerine karşılık bu çalışmada enteritisli köpek ve kedilerden daha fazla *C.difficile* izole edildi.

Struble ve arkadaşları (1994) zenginleştirilmemiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış gaita örneklerinde selektif besi yerlerini kullanarak 152 köpekten % 18,4 oranında *C.difficile* izole ettiklerini yayınlamışlardır.

**Çizelge 10.** Köpek ve kedi gaitalarından izole ve idantifiye edilen *C.difficile* ve toksin-A antijeni dağılımı

Kaynak Adı	KÖPEK		KEDİ	
	<i>C.difficile</i> (%)	Toksin-A(%)	<i>C.difficile</i> (%)	Toksin-A(%)
Weber ve ark. 1989	2,7♣-9,3♣♣	28,5	6,7♣-9♣♣	11,1♣- 20,0♣♣
Struble ve ark., 1994	18,4	50,0		
Perrin ve ark., 1993	94,3♣-42,9♣♣	67,5♣-50♣♣		
Emeruwa 1989	62,4♣-34,2♣♣	48,5♣-27,3♣♣		
Buogo ve ark., 1995	46	61,5		
Borriello ve ark., 1983	21		30	
Dordoni ve ark., 1993	27		33	
O'neil ve ark., 1993	39		39	
Riley ve ark., 1991a	39,5	28,6	38,1	
<b>Bu</b>	<b>41♣-29♣♣</b>	<b>28♣ - 20♣♣</b>	<b>35♣-29♣♣</b>	<b>23♣ 29♣♣</b>
<b>Çalışma</b>	<b>34♦</b>	<b>23♦</b>	<b>31♦</b>	<b>27♦</b>

Bu çalışmada saptanan değerler Weber ve arkadaşları (1989) ile Struble ve arkadaşlarının (1994) bulmuş olduğu değerlerden yüksektir. Çünkü gaita örneklerinin ısı ile işleme tabi tutulması, sodyum taurokolat katkılı zenginleştirilmiş besiyerinin kullanılması izolasyon oranlarını artırmaktadır (Borriello ve Honour, 1981; Wilson, 1982; Bartley ve Dowell, 1991; Marler ve ark., 1992; Hanff ve ark., 1993; Mundy ve ark., 1995).

Borriello ve arkadaşları (1983) potansiyel infeksiyon kaynağı olarak düşünülen ev hayvanlarının taşıdığı *C.difficile*'yi ortaya çıkarmak amacıyla yaptıkları çalışmada; köpeklerde % 21 ve kedilerde % 30 oranında *C.difficile*

izolasyonu bildirmişlerdir. Kedilerde saptanan izolasyon oranları Borriello ve arkadaşlarının (1983) oranları ile uyumludur.

Kronik ve tekrarlayan enteritisi olan köpeklerden % 27, kedilerden ise % 33 oranında *C.difficile* izole edildiğini bildiren çalışma (Dordoni ve ark.; (1993) sonuçları ile bu çalışmada saptanan izolasyon oranlarının benzer olduğu görüldü.

Buogo ve arkadaşları (1995) 77 yavru ve 14 anne köpek üzerinde yaptıkları bir çalışmada % 46 oranında *C.difficile* izolasyonu saptamışlardır. Çalışmaya alınan köpekler yaş gruplarına göre ayrılmamış olmakla birlikte benzer sonuçlar saptandı.

Emeruwa (1989) Nijeryanın farklı bölgelerindeki evcil hayvanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada enteritisi olanlarda % 62,4, enteritissizlerde ise % 34,2 oranlarında *C.difficile* izole edildiğini yayınlamışlardır. Enteritisi köpeklerden elde edilen izolasyon oranlarının Emeruwa (1989)'nin sonuçları ile uyumsuz olmakla birlikte enteritissizlerdeki oranların uyumlu olduğu gözlemlendi.

O'Neill ve arkadaşlarının (1993) evde beslenen kedi ve köpeklerin % 39'dan fazlasının gastrointestinal kanallarında *C.difficile*'nin rezervuarlığını yaptığını özellikle evcil hayvanlardan izole edilen *C.difficile*'nin insanlar için önemli bir risk oluşturabileceğini ileri süren sonuçları ile bu çalışmada evcil hayvanlardaki izolasyon sonuçlarının benzer olduğu saptandı.

İki ayrı bölgede bulunan Veteriner kliniklerinde tedavi gören kedi ve köpeklerden gastrointestinal *C.difficile* taşıyıcılığını kedilerde % 38,1 ve



köpeklerde % 39,5 olarak bildiren Riley ve arkadaşlarının (1991a) sonuçları ile saptanan sonuçların uyumlu olduğu görüldü.

Perrin ve arkadaşları (1993) 10 haftalık köpeklerde *C.difficile*'nin potansiyel patojenitesini ve portörlüğünü saptamayı amaçladıkları çalışmalarında; yavruların % 94,3'ünde, annelerin % 42,9'unda *C.difficile* izole edildiğini, hayatlarının ilk 10 haftasında sağlıklı yeni doğan köpeklerin yaklaşık % 35,2'sinde *C.difficile* izole edildiğini, yayınlarında bildirmişlerdir. Bu çalışmada yavru-yetişkin ayırımı yapılmamış olmakla birlikte köpekler için bulunan değerlerin Perrin ve arkadaşlarının (1993) yetişkin köpekler için bulmuş olduğu değerler arasında olduğu görüldü.

*C.difficile* sıklığı ile hayvanların yaşı ve antibiyotik ve/veya kortikosteroid kullanımı arasındaki ilişkiyi araştıran Borriello ve arkadaşları (1983) bir yaştan üzerindeki köpek gaitalarında *C.difficile* izolasyon oranlarının, 12 ayın altındaki köpeklere göre daha yüksek olduğunu, kedilerde ise yaş gurupları arasında hemen hemen aynı oranlarda olduğunu, antibiyotik ve/veya kortikosteroid tedavisi görenlerde izolasyon oranlarının daha yüksek olduğunu raporlarında bildirmişlerdir. *C.difficile*'nin izolasyon oranı antibiyotik alanlarda (çoklukla penisilin-streptomisin kombinasyonu) , almayanların 2 katıdır. Antibiyotik tedavisi *C.difficile* kolonizasyonu veya infeksiyonu için esas predispozan faktör olduğundan, hayvanlarda görülen bu durum insanlardakine benzemektedir (Weber ve Kroth, 1992). Tedavi kurumlarına getirilen kedi ve köpeklerin antibiyotik ve/veya kortikosteroid tedavisi altında olmaları, özel üretim ve satış kuruluşlarında genellikle 1 yaş altındaki kedi ve köpeklerden örneklerin alınmış olması bu çalışma sonuçlarının Borriello ve arkadaşları (1989) ile Weber ve Kroth (1992)'un düşünceleriyle uyumlu olduğu çalışmada antibiyotik kullanan (enteritisli) köpek ve kediler ile özel üretim ve satış yapılan kuruluşlardan enteritisli ve enteritissiz olanlardan daha çok *C.difficile* izole edilmesinden ve toksin A saptanmasından anlaşılmıştır.

Literatürde ülkemizde evcil hayvanlar üzerinde yapılan benzer çalışmalar olmadığından yerli kaynaklarla karşılaştırma yapılamadı.

Çalışılan 198 köpek dışkısının (Çizelge 8) 46 tanesinden % 23 oranında, 68 kedi gaitasının (çizelge 9) 18 tanesinden % 27 oranında VIDAS CDA testi ile toksin A antijen pozitifliği saptandı. Bu çalışmanın ve çeşitli araştırmaların toksin A sonuçları çizelge 10'da gösterilmiştir.

Weber ve arkadaşları (1989) doku kültüründe yapılan sitotoksin testleri ile köpeklerden izole edilen *C.difficile* suşlarının % 28,5, enteritisli kedilerden izole edilen *C.difficile* suşlarının %11,1 ve enteritissizlerden izole edilen *C.difficile* suşlarının % 20,0 oranında sitotoksin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Enteritissiz kedilerden daha yüksek oranda saptanan toksin pozitifliği sonuçları ile köpek gaitalarından saptanan toksin A sonuçlarının Weber ve arkadaşlarının (1989) sonuçları ile benzer olduğu görüldü.

Struble ve arkadaşları (1994) izole edilen *C.difficile* suşlarının PCR ile % 50'sinin sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir. Bu oran sonuçlarımızdan daha yüksektir. Ancak polimeraz zincir reaksiyonun (PCR) günümüzde tüm diğer tanı yöntemlerinden 100 kat daha duyarlı olmasına rağmen kullanım alanlarının sınırlı olması, toksijenik ve non toksijenik suşları ayırt edememesi (Wren ve ark., 1990; Gumerlock ve ark., 1991; Gurtler, 1993; Collier ve ark., 1996) Struble ve arkadaşlarının (1994) bildirdiği sonuçların yüksek olması nontoksijenik suşların çalışmaya dahil edilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Buogo ve arkadaşları (1995) yenidoğan sağlıklı yavrularda izole edilen suşların doku kültürü testleri ile % 61,5'nin toksijenik olduğunu bildiren sonuçları ile bu çalışma sonuçları uyumsuzdur. Çünkü yeni doğanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Nijeryada farklı bölgelerdeki enteritisli ve enteritissiz evcil hayvanlardan alınan gaita örneklerinden izole edilen *C.difficile* suşlarının doku kültürü toksin deneylerinden enteritislielerde % 48,5 olan taşıyıcılık oranının enteritissizlerde % 27,3 olduğunu bildiren Emeruwanın (1989) sonuçları ile benzer olduğu görüldü. Çünkü bu çalışmada da enteritissiz gaita örneklerinde aynı oranlarda, enteritisli köpek gaitalarından ise daha fazla oranda toksin A saptandı.

Riley ve arkadaşları (1991a) iki ayrı bölgede bulunan Veteriner kliniklerinde tedavi gören kedi ve köpeklerden gastrointestinal *C.difficile* taşıyıcılığı için yapılan çalışmada; hayvanlar arasındaki *C.difficile* taşıyıcılık oranının kliniklere göre % 61 ile %17,5 arasında değiştiğini, izole edilen *C.difficile* suşlarındaki toksin-A antijen oranlarının bölgelere göre % 54-% 25 arasında değişmekle birlikte genel olarak % 50 olduğu ve doku kültürü testleri ile *C.difficile* izole edilen suşların % 28.6'sının sitotoksik olduğunu bildirdikleri çalışmada saptanan sonuçlar ile bu çalışma sonuçları arasında benzerlik olduğu saptandı.

Perrin ve arkadaşları (1993) 10 haftalık köpeklerde *C.difficile*'nin potansiyel patojenitesini ve portörlüğünü saptamayı amaçladıkları çalışmalarında; yavrulardan izole edilen suşların % 67, annelerden izole edilenlerin ise % 50,0 oranında toksijenik olduğunu doku kültürü testleri ile saptadıklarını, portörlük oranının ise % 67 olduğunu bildirerek yeni doğan köpeklerin toksijenik *C.difficile*'yi yüksek oranda taşıyabileceğini ve insanlar için belirgin infeksiyon potansiyeli olabileceğini ileri sürmektedirler. VIDAS CDA test ile bulmuş olduğumuz sonuçların Perrin ve arkadaşlarının (1993) sonuçlarından farklı olması toksin saptamada kullanılan test yönteminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Literatür araştırmalarında ülkemizde evcil hayvanlar üzerinde yapılan benzer çalışmalar bulunamadığından yerli kaynaklarla karşılaştırma yapılamadı.

Saptanmış olan sonuçlar literatür bilgileri ile uyumlu olmakla birlikte izolasyon ve toksin oranları arasında farklılıklar olduğu izelge 10'da görülmektedir. Bu farklılıkların; çalışmaya alınan hayvanların yaş gruplarına, antibiyotik tedavi durumlarına, toplu halde barındırılma ve izolasyonda kullanılan kültür tekniklerinden (kullanılan besiyerlerinin bileşimi, çalışma sırasında örneklere uygulanan işlemler vb.) kaynaklanabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Borriello ve Honour, 1981; Wilson, 1982; Bartlet, 1986; Lyerly ve ark., 1988a; Bartley ve Dowell, 1991; Marler ve ark., 1992; Hanff ve ark., 1993; Mundy ve ark., 1995).

Borriello ve arkadaşları (1983) insanlarda görülen *C.difficile* infeksiyonlarının ev hayvanlarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Son bulguların işığında *C.difficile* daha çok yaygın enteritiserle ilişkilidir. Ve *C.difficile* nedenli diare tekrarları farklı bir suş ile çevrenin kontamine olması ve *C.difficile*'nin farklı özellik gösteren suşlarından kaynaklanmaktadır ki ; konu ile ilgili araştırmalar evcil hayvanların rezervuar olduklarını, veteriner kliniklerinde saptanan yüksek taşıyıcılığın normal olduğunu ve bunun yüksek seviyede çevresel kontaminasyona bağlı geçici bir durum olduğu görüşünde birleşmektedirler.

Yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar farklılık gösterse bile evcil hayvanların *C.difficile* infeksiyonu oluşumunda potansiyel risk faktörü olarak göz önünde bulundurulmaları gerekmektedir.

İnsanlar için patojen olabilecek enterotoksik *C.difficile* suşları için izolasyon oranları köpeklerde ve kedilerde çeşitli araştırmalarda farklı olarak

bildirilmiştir. Bugüne kadar yapılan araştırma sonuçları insan *C.difficile* infeksiyonlarının ev hayvanları aracılığıyla gelişebileceğini; ancak yapılan özel çalışmalarla *C.difficile*'nin kedilerde ve köpeklerde tıpkı insanlarda olduğu gibi enterik patojen etkeni olarak anlam taşıyıp taşımadığı henüz kesin olarak ortaya konulamamıştır. Fakat ev hayvanları *C.difficile*'yi gaitalarında taşıyabilirler veya aynı zamanda enterotoksik olanları yayabilirler. Ayrıca *C.difficile* toplumsal diarelerin yaygın bir sebebi olabilir. Bu nedenle insan *C.difficile* infeksiyonlarının epidemiyolojisinde, evcil hayvanların münferit durumlarda rol oynayabilecekleri unutulmamalıdır.



## ÖZET

### **Köpek ve Kedi Gaitalarından *C.difficile* İzolasyonu ve Toksin A Saptanması**

Bu çalışmada evcil hayvanlardan *C.difficile* izolasyonu ve toksin A'nın saptanması ülkemizde ilk defa yapıldı. *C.difficile*'nin izolasyonu için 198 köpek (80'i enteritisli, 118'i enteritissiz) ve 68 kedi (26'sı enteritisli, 42'si enteritissiz) gaita örneği *Cycloserine-Cefoxitene Fruktoze Agar (CCFA) (Oxoid)* besi yerine ekildi. İzole edilen bakterilerin kesin identifikasyonu *Analytical Profile Index (API-20A) (BIO MERIEUX)* ile yapıldı. Toksin-A saptanması *Enzym Linked Fluorescent Assay (ELFA)* yöntemiyle *Vitek Immuno Diagnostik Assay Clostridium difficile toxin-A (Vidas CDA.) (BIO MERIEUX)* ile yapıldı

Köpeklerden toplanan dışkı örneklerinin (80'i enteritisli, 118'i enteritissiz) enteritisli olanların 33'ünden (% 41) ve enteritissizlerin 34'ünden (% 29) *C.difficile* izole edildi. Enteritisli olanların 22'sinden (% 28) ve enteritissizlerin 24'ünden (% 20) toksin A antijeni saptandı. 198 köpek gaita örneğinden toplam 67 tanesinden (% 34) *C.difficile* izole edildi, 46 tanesinden (% 23) ise toksin-A antijeni saptandı.

Benzer olarak kedilerden alınan dışkı örneklerinin (26'sı enteritisli, 42'si enteritissiz) enteritisli olanların 9'undan (% 35) ve enteritissiz olanların 12'sinden (% 29) *C.difficile* izole edildi. Yine enteritisli kedilerin 6'sından (% 23) ve enteritissizlerin 12'sinden (% 29) toksin A saptandı. Çalışılan toplam 68 kedi dışkı örneğinin 21'inden (% 31) *C.difficile* izole edildi, 18'inden (% 27) toksin-A antijeni saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** *Clostridium*, *Clostridium difficile*, Kedi, Köpek, Toksin-A,

## SUMMARY

### Isolation of *Clostridium difficile* From Dog and Cat Faeces and Detection of Toxin A

In this study, isolation of *C.difficile* from domestic animals and detection of toxin A were managed for the first time in our country. Faecal samples of total of 198 dogs, composed of 80 with and 118 without enteritis, and 68 cats, composed of 26 with and 42 without enteritis, were inoculated on *Cycloserine-Cefoxitine Fructose Agar (CCFA)* for the isolation of *C.difficile*. The isolates were identified with the aid of *Analytical Profile Index (API-20A) (BIO MERIEUX)*. The detection of toxin-A was carried out by *Vitek Immuno Diagnostic Assay Clostridium difficile toxin-A (Vidas CDA) (BIO MERIEUX)* test which works according to the *Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)*.

Among the faecal samples obtained from dogs with (80 individuals) and without (118 individuals) enteritis, *C.difficile* was isolated from 33 (41 %) and 34 (29 %) samples, and toxin A antigen was detected in 22 (28 %) and 24 (20 %) samples, respectively. Totally, among 198 dog faecal samples tested, *C.difficile* was isolated from 67 (34 %) and toxin A antigen was detected in 46 (23 %) samples.

Similarly, among the faecal samples obtained from cats with (26 individuals) and without (42 individuals) enteritis, *C.difficile* was isolated from 9 (35 %) and 12 (29 %) samples, and toxin A was detected in 6 (23 %) and 12 (29 %) samples, respectively. Totally, among 68 cat faecal samples tested, *C.difficile* was isolated from 21 (31 %) and toxin A antigen was detected in 18 (27 %) samples.

**Key Words:** Cat, *Clostridium*, *Clostridium difficile*, Dog, Toxin-A

---

**KAYNAKLAR**

- ALLEN, S. D., SIDERS, J. A., RIDDELL, M. J., FILL, J. A., and WEGENER, W. S. (1995). Cellular fatty acid analysis in the differentiation of *Clostridium* in the clinical microbiology laboratory. *Clin. Infect. Dis.*, 20 : 198-201.
- ANDERSON, J., KORVER, J., and LUCHSINGER, I. (1995). Use of fatty acid analysis (microbial identification system) for the identification of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.*, 20 : 202-205.
- ASPINALL, S. T. and HUTCHINSON, D. N. (1992). New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *J. Clin. Pathol.*, 45 : 812-814.
- BACON, A. E., FEKETY, R., SCHABERG, D. R. and FAIX, R. G. (1988). Epidemiology of *Clostridium difficile* colonization in newborns: results using a bacteriophage and bacteriocin typing system. *J. Infect. Dis.*, 158 : 349-354.
- BANNOW, Y., KOBAYASHI, T., KONO, H., WATANABE, K., VENO, K. and NOZAWA, Y. (1984). Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and J-2) from *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.*, 6 : 11-20.
- BARBUT, F., KAJZER, C., PLANAS, N. and PETIT, J. C. (1993). Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 31 : 963-967.
- BARTLETT, J. G. (1985). Treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Gastroenterology*, 89 : 1192-1195.
- BARTLETT, J. G. (1986). Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev. Infect. Dis.*, 6 : 235-241.
- BARTLETT, J. G. (1990). *Clostridium difficile* : Clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.*, 12 : 243-251.
- BARTLETT, J. G. (1992). Antibiotic associated diarrhoea. *Clin. Infect. Dis.*, 15 : 573-581.
- BARTLETT, J. G. (1994). *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin. Infect. Dis.*, 18 : 265-272.
-



- BARTLEY, S. L. and DOWELL, V. R., Jr. (1991). Comparison of media for the isolation of *Clostridium difficile* from fecal specimens. *Lab. Med.*, 22 : 335-338.
- BEIER, R. (1994). Bacteriological studies on the occurrence of *Clostridium difficile* and *Salmonellas* in Horses. *J. Vet. Diag. Invest.*, 6 : 323-327.
- BENNETT, R. G., LAUGHON, B. E., MUNDY, L. M. (1989). Evaluation of a latex agglutination test for *Clostridium difficile* in two Nursing home outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 27 : 889-893.
- BERNABEU, A. INIESTA, A. and LUENGO, M. F. (1991). Relation between isolation of bacteriophages from *Clostridium difficile* and cytotoxicity of the strains. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 9 : 289-291.
- BERRY, A. P. and LEVETT, P. N. (1986). Chronic diarrhoea in dogs associated with *Clostridium difficile* infection. *Vet. Rec.*, 118 : 102-103.
- BOGOMOLETZ, W. V. (1976). Fibrin thrombi, a cause of clindamycin-associated colitis?. *Gut*, 17 : 483-487.
- BONGAERTS, G. P. and LYERLY, D. M. (1994). Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. *Microb. Pathol.*, 17 : 1-12.
- BOONDEEKHUN, H. S.; GURTLER, V.; O. D. D, M. L.; WILSON, V. A. and MAYALL, B. C. (1993). Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin gene in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.*, 38 : 384-387.
- BORRIELLO, S. P., and BARCLAY, F. E. (1985). Protection of hamsters against *Clostridium difficile* iliocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *J. Med. Microbiol.*, 19 : 339-350.
- BORRIELLO, S. P. and HONOUR, P. (1981). Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *J. Clin. Pathol.*, 34 : 1124-1127.
- BORRIELLO, S. P., HONOUR, P., TURNER, T and BARCLAY, F. (1983). Household pets as a reservoir for *Clostridium difficile* infection . *J. Clin. Pathol.*, 36 : 84-87.
- BORRIELLO, S. P., KETLEY, J. M., MITCHELL, T. J., BARCLAY, F. E., WELCH, A. R., PRICE, A. B. and STEPHEN, J. (1987). *Clostridium difficile* a spectrum of virulence and analysis of putative virulence determinants in the hamster model of antibiotic-associated colitis. *J. Med. Microbiol.*, 24 : 53-64.
-

- BORRIELLO, S. P., BARCLAY, F. E., REED, P. J. WELCH, A. R. and BURDON., D. W. (1988a). Analysis of latex agglutination test for *Clostridium difficile* toxin A (D-1) and differentiation between *Clostridium difficile* toxins A and B and latex reactive protein. *J. Clin. Pathol.*, 40 : 573-80.
- BORRIELLO, S. P., WELCH, A. R., BARCLAY, F. E. and DAVIES, H. A. (1988b). Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.*, 5 : 191-196.
- BORRIELLO, S. P., DAVIES, H. A., KAMIYA, S and REED, P. J. (1990). Virulence factors of *Clostridium difficile*. *Rev. Infect. Dis.*, 12: 185-191.
- BOWEN, K. E.; MCFARLAND, L. V.; GREENBERG, R. N.; RAMSEY, M. M.; RECORD, K. E.; and SVENSON, J. (1995). Isolation of *Clostridium difficile* at a university hospital: a two- year study. *Clin. Infect. Dis.*, 20: 261-262.
- BOWMAN, R. A. and RILEY, T. J. (1988). Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* -associated diarrhoeae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7: 476-484.
- BOWMAN, R. A., ARROW, S. A., and RILEY, T. V. (1986). Latex particle agglutination for detecting and identifying *Clostridium difficile*. *J. Clin. Pathol.*, 39 : 212-214.
- BRAZIER, J. S. (1993). Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 16 : 228-233.
- BRAZIER, J. S. (1995). An international study on the unification of nomenclature for typing *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.*, 20 : 325-326.
- BRAZIER, J. S., DELMEE, M., TABAQCHALI, S., HILL, L. R., MULLIGAN, M. E. and RILEY, T. V. (1994). Proposed unified nomenclature for *Clostridium difficile* typing. *Lancet*, 343 : 157-165.
- BUCHANAN, A. G. (1984). Selective enrichment broth culture for detection of *Clostridium difficile* and associated cytotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 20 : 74-76.
- BUOGO, C., BURNENS, A. P., PERRIN, J. and NICOLET, J. (1995). Presence of *Campylobacter* spp. *Clostridium difficile*, *C. perfringens* and *Salmonella* in some litters of puppies and adult population of dogs. *Schweizer Arch. Tierheilkunde.*, 137 : 165-171.
- CARTWRIGHT, C. P., STOCK, F. BEEKMANN, S. E., WILLIAMS, E. and GILL, V. J. (1995). PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 33 : 184-197.
-

- CATO, E. P., GEORGE, W. L. and FINEGOLD, S.M. (1986). *Clostridium difficile*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 : 1165-1166.
- CHANG, T. W., LAUERMANN, M. and BARTLETT, J. G. (1979). Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.*, 140 : 765-770.
- CLABOTS, C. R.; BETTIN, K. M.; PETERSON, L. R. and GERDING, D. N. (1991). Evaluation of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and cycloserine-cefoxitin-fructose broth for recovery of *Clostridium difficile* from environmental sites. *J. Clin. Microbiol.*, 29 : 2633-2635.
- CLABOTS, C. R., JOHNSON, S., OLSON, M. M., PETERSON, L. R. and GERDING, D. L. (1992). Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J. Infect. Dis.*, 166 : 561-567.
- CLABOTS, C. R., JOHNSON, S., BETTIN, K. M., MATHIE, P. A., MULLIGAN, M. E., SCHABERG, D. R., PETERSON, L. R. and GERDING, D. N. (1993). Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. *J. Clin. Microbiol.*, 31 : 1870-1875.
- COLLIER, M. C., STOCK, F., DEGIROLAMI, P. C., SAMORE, M. H. and CARTWRIGHT, C. P. (1996). Comparison of PCR-based approaches to molecular epidemiologic analysis of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 34 : 1153-1157;
- CORTHER, G. DUBOS, F. and RAIBAUD, P. (1985). Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 250-252.
- COSTAS, M., HOLMES, B., GANNER, M., O.N, S. L.; HOFFMAN, P. N.; WORSLEY M. A.; PANIGRAHI, H. (1994a). Identification of outbreak-associated and other strains of *Clostridium difficile* by numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns. *Epidemiol. Infect.*, 113 : 1-12.
- COSTAS, M., HOLMES, B., ON, S.L., GANNER, M., KELLY, M. and NATH, S. K. (1994b). Investigation of an outbreak of *Clostridium difficile* infection in a general hospital by numerical analysis of protein patterns by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 32 : 759-765.
- DAILEY, D. C., and SCHLOEMER, R. H. (1988). Cloning and expression of secreted antigens of *Clostridium difficile* in *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 56 : 1655-1657.
-

- DEGIROLAMI, P. C. and HANFF, P. A. (1992). Multicenter evaluation of a new enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* enterotoxin A. *J. Clin. Microbiol.*, 30 : 1085-1088.
- DELMEE, M., HOMEL, M. and WAUTERS, G. (1985). Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.*, 21 : 323-327.
- DELMEE, M., LAROCHE, Y., AVESANI, V., and CORNELIS, G. (1986). Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 991-994.
- DELMEE, M., MACKEY, T. and HAMITOU, A. (1992). Evaluation of a new commercial *Clostridium difficile* toxin-A enzyme immunoassay using diarrhoeal stools. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11 : 246-249.
- DIPERSIO, J. R., VARGA, F. J., CONWELL, D. L., KRAFT, J. A., KOZAK, K. J. and WILLIS, D. H. (1991). Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *J. Clin. Microbiol.*, 29 : 2724-2730.
- DONTA, S. T. and MYERS, M. G. (1982). *Clostridium difficile* toxin in asymptomatic neonates. *J. Pediatr.*, 100 : 431-434.
- DORDONI, E., TAGLIABUE, S. and RUFFO, G. (1993). Pet animals as carriers of some zoonoses. *Arch. Vet. Italiano.*, 1 : 14-17.
- DZINK, J. and BARTLETT, J. G. (1980). In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhoea or colitis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 17 : 695-698.
- EGLOW, R., POTHOUKAKIS, C., ITZKOWITZ, S., JACOBOWITZ, E., O'KEANE, C. J., GONG, D., XU, Y. L., WALKER, W. A. and LaMONT, J. T. (1992). Diminished *Clostridium difficile* toxin-A sensitivity is associated with decreased toxin-A receptor. *J. Clin. Invest.*, 90 : 822-829.
- EMERUWA, A. C. (1989). Nigerian domestic animals and soil as reservoir for *Clostridium difficile*. *Bull. Anim. Helt. Produc.*, 37 : 235-240;
- FEKETY, R., KIM, K. H. and BROWN, D. (1981). Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital. *Environ. Am. J. Med.*, 70 : 906-911.
- FONTANA, C., JEZZI, T., TESTORE, G. P. and DAINELLI, B. (1995). Differentiation of *Clostridium difficile*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, and *Clostridium perfringens* from diarrheal stool by API ZYM and API LRA oxidase test. *Microbiol. Immun.*, 39 : 231-235.

- FORWARD, K. R.; DALTON, M. T.; KERR, E.; PAISLEY, N. and COOPER G. (1994). Comparison of TechLab Clostridium difficile Tox-A Enzyme Immunoassay and Bartels Prima System Toxin-A EIA. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 20 : 1-5.
- FRETER, H., BRICKNER, H., BOTNAY, M., CLEVEN, D. and ARANKI, A. (1983). Mechanisms that control bacterial populations continuous -flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect. Immun.*, 39 : 676-685.
- GEORGE, W. L., SUTTER, V. L., CITRON, D. and FINEGOLD, S. M. (1979). Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.*, 9 : 214-219.
- GERDING, D. N., OLSON, M., PETERSON, L. R., TEASLEY, D. G. and GEBHARD, R. (1986). Clostridium difficile associated diarrhea and colitis in adults: a prospective case-controlled epidemiologic study. *Arch. Intern. Med.*, 146 : 95-100.
- GIULIANO, M., PIEMONTE, F., MASTRANTONIO, S. and GIANFRILLI, P. (1988). Production of an enterotoxin different from toxin A by Clostridium difficile. *FEMS Microbiol. Lett.*, 50 : 191-194.
- GREEN, R. H. (1974). The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. *J. Biol. Med.*, 47 : 166-181.
- GRESSER, M. E., SHANHOLTZER, D. N., GERDING, C. R., GARRET, D. N. and PETERSON, L. R. (1984). Evaluation of the 24-h API 20A anaerobe system for identification of Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.*, 19 : 915-916.
- GUMERLOCK, P. H., TANG, Y. J., MEYERS, F. J and SILVA, J. Jr. (1991). Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of Clostridium difficile in human feces. *Rev. Infect. Dis.*, 13 : 1053-1060.
- GURTLER, V. (1993). Typing of Clostridium difficile strains by pcr-amplification of variable length 16s-23s rDNA spacer regions. *J. Gen. Microbiol.*, 139 : 3089-3097.
- HAFIZ, S. and O'AKLEY, C. I. (1976). Clostridium difficile: Isolation and characteristics. *J. Med. Microbiol.*, 9 : 136-140.
- HANFF, P. A., ZALEZNIK, D. F., KENT, K. C., RUBIN, M. S., KELLY, E., COTE, J. and ROSOL-DONOGHUE, J. (1993). Use of heat shock for culturing Clostridium difficile from rectal swabs. *Clin. Infect. Dis.*, 16 : 245-247.

- HEAD, C. B. and RATNAM, S. (1988). Comparison of API ZYM system API AN-Ident, API 20A, minitek anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 26 : 144-146.
- HEARD, S. R., RASBURN, B., MATTHEWS, R. C., and TABAQACHALI, S. (1986). Immunoblotting to demonstrate antigenic and immunogenic differences among nine standard strains of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 384-387.
- HECT, J. R., POTHOUKAKIS, C., LaMONT, J. T. and MADARA, J.L. (1988). *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.*, 82: 1516-1524.
- JUST, I.; SELZER, J.; WILM, M.; VON EICHEL-STREIBER, C.; MANN, M.; and TORRES, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 375 : 500-503.
- JUSTUS, P. G., MARTIN, J. L., GOLDBERG, D. A., TAYLOR, N. S. and BARTLETT, J. G. (1982). Myoelectric effects of *Clostridium difficile* motility-altering factors distinct from its cytotoxin and enterotoxin in rabbits. *Gastroenterology*, 83 : 836-842.
- KARACHEWSKI, N. O., BUCH, E. L. and WELLS, C. L. (1985). Comparison of PRAS II Rapid II ANA, and API 20 A systems for identification of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 21 : 122-126.
- KELLY, W. F.; WAIT, K. J. and GILLIGAN, P. H. (1992). Evaluation of the latex agglutination test for detection of *Clostridium difficile*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116 : 517-520.
- KELLY, C. K. and LA MONT, J. T. (1994). *Clostridium colitis*. *N. Engl. J. Med.*, 330 : 257-262.
- KIM, K. H., FEKETY, Y. R., and BATTS, D. H. (1981). Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect., Dis.* 143 : 42-50.
- KING, A. and PHILLIPS, I. (1996). Evaluation of the API 20A system for the identification of the *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2 : 115-122.
- KNAPP, C. C. SANDIN, R. L. HALL, G. S. LUDWIG, M. D. RUTHERFORD, I. and WASHINGTON, J. A. (1993). Comparison of Vidas *Clostridium difficile* toxin-A assay and premier *Clostridium difficile* toxin-A assay to cytotoxin-B tissue culture assay for the detection of toxins of *Clostridium difficile*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 6 : 7-12.

- KNOBEL, H.; SALVADO, M. and SEGURA, C. (1996). Clostridium difficile and diarrhea associated with the use of antibiotics in the origin of nosocomial and community-acquired diarrhea. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, 14 : 96-100.
- KNOOP, F.C. OWENS, M. and CROCKER, I. C. (1993). Clostridium difficile: clinical disease and diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6 : 251-265.
- KRISTJANSSON, M., SAMORE, M. H., GERDING, D. N., DEGIROLAMI, P. C., BETTIN, K. M., KARCHMER, A. W. and ARBEIT, R. D. (1994). Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of Clostridium difficile strains. *J Clin Microbiol.*, 32 :1963-1969.
- KUIJPER, E. J., OUDBIER, J. H., STUIFBERGEN, W. N. and ZANEN, H. C. (1987). Application of whole -cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of Clostridium difficile-induced diarrhea. *J.Clin. Microbiol.*, 25 : 751-753.
- LARSON, H. E., PARRY, J. V., PRICE, A. B., DAVIES, D. R., DOLBY, J. and TYRELLI, D. A. (1977). Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.* 1 : 1246-1248.
- LARSON, H. E., BARCLAY, F. E., HONOUR, P. and HILL, I. D. (1982). Epidemiology of Clostridium difficile in infants. *J. Infect. Dis.*, 146 : 727-733.
- LARSON, H. E. and WELCH, A. (1993). In-vitro and in-vivo characterisation of resistance to colonisation with Clostridium difficile. *J. Med. Microbiol.*, 38 : 103-108.
- LEE, A. and GEMMELL, E. (1972). Changes in the mouse intestinal microflora during weaning: role of volatile fatty acids. *Infect Immun.*, 51 : 1-7.
- LEVETT, P. N. (1984). Detection of Clostridium difficile in faeces by direct gas liquid chromatography . *J.Clin.Pathol.*, 37 : 117-119.
- LEVETT, P. N. (1985). Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of Clostridium difficile from fecal specimens. *J. Clin. Pathol.*, 38 : 233-234.
- LEVETT, P. N. (1986). Clostridium difficile in habitats other than the human gastrointestinal tract. *J. Infect.*, 12 : 253-266.
- LEVETT, P. N. and PHILLIPS, K. D. (1985). Gas chromatographic identification of Clostridium difficile and detection of cytotoxin from a modified selective medium. *J. Clin. Pathol.*, 38 : 82-85.
-

- LINEVSKY, J., BECKER, S. and POTHOUKAKIS, C. (1990). Clostridium difficile toxin-A stimulates release of mast cell mediators in rabbit ileal loops. *Gastroenterology*, 98 : 459-467.
- LYERLY, D. M., SAUM, K. E., McDONALD, D. K. and WILKINS, T. D. (1985). Effect of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.*, 47 : 349-352.
- LYERLY, D. M. and WILKINS, T. D. (1986). Commercial latex for Clostridium difficile toxin A does not detect toxin A. *J. Clin. Microbiol.*, 23 : 622-623.
- LYERLY, D. M., BALL, D. W., TOTH, J. and WILKINS, T. (1988a). Characterization of cross reactive proteins detected by culturette brand rapid latex test for Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.*, 26 : 397-400.
- LYERLY, D. M., HOWARD, C. K. and WILKINS, T. D. (1988b). Clostridium difficile it's diseases and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1 : 1-18.
- MAGEE, J.T., BRAZIER, J. S., RIBEIRO, C. D., HILL, D. W., GRIFFITHS, A., HOSEIN, I. K., D. A COSTA, C., SINCLAIR, A. J. and DUERDEN, B. I. (1993). An investigation of nosocomial outbreak of Clostridium difficile by polylys mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.*, 39 : 345-351.
- MAHIDA, Y. R., MAKH, S., HYDE, S., GRAY, T. and BORRIELLO, S. P. (1996). Effect of Clostridium difficile toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut*, 38 : 337-347.
- MANABE, Y. C., VINETZ, J. M., MOORE, R. D.; MERZ, C., CHARACHE, P. and BARTLETT J. G. (1995). Clostridium difficile colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann. Intern. Med.*, 123 : 835-840.
- MARLER, L.M., SIDERS, J. A., WOLTERS, L.C., PETTIGREW, Y., SKITT B. L. and ALLEN, S. D. (1992). Comparison of five cultural procedures for isolation of Clostridium difficile from stools. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 514-516.
- MARTIROSIAN, G., KUIPERS, S., VERBRUGH, H., VAN BELKUM, A., and MEISEL-MIKOLAJCZYK F. (1995). PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for typing strains of Clostridium difficile from a polish maternity hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 33 : 2016-2021.
- MATTIA , A.R., DOERN, G.V., CLARK, J., HOLDEN, J., WU, L., FERRARO, M.J. (1993). Comparison of four methods in the diagnosis of Clostridium difficile disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12 : 882-886.



- MILLER, PD., POTHOUKAKIS, C. and BEAKER, TR. (1990). Macrophage-dependent stimulation of T cell depleted spleen by Clostridium difficile toxin-A and calcium ionophore., *Cell. Immunol.*, 126 : 155-162.
- MITCHELL, T. J., KATLEY, J. M., HASLAM, S. C., STEPHEN, J., BURDON, D. W., CANDY, D. C. A and DANIEL, R. (1986). Effect of toxin A and B of Clostridium difficile on rabbit ileum and colon. *Gut.*, 27 : 78-85.
- MITCHELL, T. J., KATLEY, J. M., BURDON, D. W., CANDY, C. D. A. and STEPHEN, J. (1987). Biological mode of action of Clostridium difficile toxin A: a novel enterotoxin. *J. Med. Microbiol.*, 23 : 211-219.
- MONTERO, M. E. V., LOBOS, T., VALENZUELA, A., ROOS, O., PIEMONTE, P. and GIGLIO, S. (1995). Prevalence of Clostridium difficile among healthy Chilean infants: evaluation by commercial enzyme immunoassay versus. *Clin. Infect. Dis.*, 20 : 259-260.
- MOORE, R., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J. T., CARLSON, S. and MADARA, J. L. (1990). Clostridium difficile toxin A increases intestinal permeability and induces Cl<sup>-</sup> secretion. *Am. J. Physiol.*, 259 : 165-172.
- MULDROW, L. L., ARCHIBOLD, E. R., and SEEHY, R. J. (1982). Survey of the extra-chromosomal gene pool of Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.*, 16 : 637-690.
- MUNDY, L. S.; SHANHOLTZER, C. J.; WILLARD, K. E.; GERDING, D.N.; PETERSON, L. R. (1995). Laboratory detection of Clostridium difficile. A comparison of media and incubation systems. *Am. J. Clin. Pathol.*, 13 : 52-56.
- MURRAY, P. R. and WEBBER, C. J. (1983). Detection of Clostridium difficile cytotoxin in HEp2 and CHO Cell Lines. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1 : 331-333.
- NIYOGI, S. K. and PAL, S. C. (1992). Comparison of selective media for optimal recovery of Clostridium difficile from diarrhoeal stools. *J. Med. Res.*, 95 : 181-183.
- NONHOFF, C., STRUELENS, M. J., and SERRUYS, E. (1995). Evaluation of gas-liquid chromatography (GLC) for rapid detection of Clostridium difficile in fecal specimens. *Acta. Clin.*, 50 : 76-80.
- O'FARRELL, S., WILKINS, M., NASH, J. Q. and TABAQCHALI, S. (1984). A selective enrichment broth for the isolation of Clostridium difficile. *J. Clin. Pathol.*, 37 : 98-99.

- O'NEILL, G., ADAMS, J. E., BOWMAN, R. A. and RILEY, T. V. A (1993). Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals their environments. *Epidemiol. Infect.*, 2 : 257-264.
- ONDERDONK, A. B., CISNEROS, R. L. and BARTLETT, J. G. (1980). *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Infect. Immun.*, 28 : 277-282.
- PEIFFER, S. and COX, M. (1993). Enzymatic reactions of *Clostridium difficile* in aerobic and anaerobic environments with the RapiD-ANA II identification system. *J. Clin. Microbiol.*, 31 : 279-282.
- PERRIN, J., BUOGO, C., GALLUSSER, A., BURNENS, A. P. and NICOLET, J. (1993). Intestinal carriage of *Clostridium difficile* in neonate dogs. *Vet. Med. B.*, 40 : 222-226.
- PHILLIPS, K. D. and ROGERS, P. A. (1981). Rapid detection and presumptive identification of *Clostridium difficile* by p-cresol production on a selective medium. *J. Clin. Pathol.*, 34 : 642-644.
- POPOFF, M. R. and DODIN, A. (1985). Survey of neuraminidase production by *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium difficile* strains from clinical and non-clinical sources. *J. Clin. Microbiol.*, 22 : 873-876.
- POPOFF, M. R., RUBIN, E. J., GILL, D. M. and BOQUET, P. (1988). Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect. Immun.*, 56 : 2299-2306.
- POTHOULAKIS, C., BARONE, L. M., ELY, R., FARIS, B., CLARK, M. E., FRANZBLAU, C. and LaMONT, J. T. (1986). Purification and properties of *Clostridium difficile* toxin-B. *J. Biol. Chem.*, 261 : 1316-1321.
- POTHOULAKIS, C., SULLIVAN, R., MELNIC, D. A., TRIADAFILOPOULOS, G., GADENNE, S. S., MESHULAM, T. and LaMONT, J. T. (1988). *Clostridium difficile* toxin A stimulates intracellular calcium release and chemotactic response in human granulocytes. *J. Clin. Invest.*, 81 : 1741-1745.
- POTHOULAKIS, C., LaMONT, J. T., EGLOW, R., GAO, N., RUBINS, J. B., THEOHARIS, T. C. and DICKEY, B. F. (1991). Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A : Evidence for a receptor-coupled G-protein. *J. Clin. Invest.*, 88 : 119-125.
- POTHOULAKIS, C. and LaMONT, T. J. (1993). *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gast. Clin. N. Amer.*, 3 : 623-637.
- POTHOULAKIS, C., KELLY, C. P., JOSHI, M. A., GAO, N., O'KEANE, C. J., CASTAGLIUOLO, I. and LaMONT, J. T. (1993). *Saccharomyces boulardii*

inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*, 104 : 1108-1115.

PRICE, A. B., and DAVIES, D. R. (1977). Pseudomembranous colitis. *J. Clin. Pathol.*, 30 : 1-12.

PRINCEWELL, T. J. T. and AGBA, M. I. (1982). Examination of bovine faeces for the isolation and identification of *Clostridium* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 52 : 97-102.

REDMOND, S. C., KETLEY, J. M., MITCHELL, T. J. and STEPHEN, J. (1985). Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, 58 : 237-250.

RIHN, B., SCHEFTE, J. M., GIRARDOT, R. and MONTEIL, H. (1984). A new purification procedure for *Clostridium difficile* enterotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124 : 690-695.

RIHN, B., BISSERT, F., GIRARDOT, R., SCHEFTEL, J. M., NGUYEN, V. K. and MONTEIL H. (1988). Fast Protein Purification of *Clostridium difficile* cytotoxin. *J. Chromatogr.*, 428 : 408-414.

RIEDERER, K. M., LAWSON, P., HELD, M. S., PETRYLKA, K., BRISKI, L. E. and KHATIB, R. (1995). Diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhea: comparison of three rapid methods employing different markers for detection. *Can. J. Microbiol.*, 41 : 88-91.

RIFKIN, G. D., FEKETY, F. R. and SILVA, J. Jr. (1977). Antibiotic-induced colitis. Implication of a toxin neutralised by *Clostridium sordellii* antitoxin *Lancet*, 26 : 103-1106.

RILEY, T. V., BRAZIER, J., HASSAN, H., and WILLIAMS, K. (1987). Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. *Epidemiol. Infect.*, 99 : 355-359.

RILEY, T. V., ADAMS, J. E., O'NEILL, G. L. and BOWMAN, R. A. (1991a). Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiol. Infect.*, 3 : 659-665.

RILEY, T. V., WETHERALL, F., BOWMAN, R. A., MOGYOROSY, J. and GOLLEDGE, C. L. (1991b). Diarrheal disease due to *Clostridium difficile* in general practice. *Pathology*, 23 : 346-349.

ROLFE, R. D. (1984). Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, 45 : 185-191.

- ROLFE, R. D. and IACONIS, J. P. (1983). Intestinal colonization of infant hamsters with *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, 42 : 480-486.
- ROLFE, R. D. and SONG, W. (1993). Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clin. Infect. Dis.*, 16 : 219-227.
- SAMORE, M. H., BETTIN, K. M., DEGIROLAMI, P. C., CLABOTS, C. R., GERDING, D. N. and KARCHMER A. W. (1994a). Wide diversity of *Clostridium difficile* types at a tertiary referral hospital. *J. Infect. Dis.*, 170 : 615-621.
- SAMORE, M. H., DE GRILAMI, P. C., TLUCKO, A., LICHTENBERG, A., MELVIN, Z. A. and KARCHMER, A. W. (1994b). *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin. Infect. Dis.*, 18 : 181-187.
- SCHLEUPNER, M. A. GARNER, D. C. SOSNOWSKI, K. M. SCHLEUPNER, C. J. BARRETT, L. J. HIRSCH, D. and GUERRANT, R. L. (1995). Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbant assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J. Clin. Microbiol.*, 33 : 1755-1759.
- SCHULLER, H., SAHA, V., KINGSTON, J., EDEN, T. and TABAQCHALI, S. (1995). Investigation and management of *Clostridium difficile* colonisation in a pediatric oncology unit. *Arch. Dis. Child.*, 72 : 219-222.
- SEAL, D., BORRIELLO, S. P., BARCLAY, F. E., WELCH, A. and BONYCASTLE, M. (1987). Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea by administration of a nontoxigenic strain. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6 : 51-53.
- SELL, T. L., SCHABERG, D. R. and FEKETY, F. R. (1983). Bacteriophage and bacteriocin typing schema for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 17 : 1148-1152.
- SHANHOLTZER, C. J., WILLARD, K. E., HOLTER, J. J. OLSON, M. M. GERDING, D.N. and PETERSON, L. R. (1992). Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *Clostridium difficile* culture and cytotoxin and latex tests. *J. Clin. Microbiol.*, 30 : 1837-1840.
- SMITH, L. D. S. and KING, E. O. (1962). Occurrence of *Clostridium difficile* infections of man. *J. Bacteriol.*, 84 : 65-67.
- STEFFEN, E. K. and HENTGES, D. J. (1981). Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.*, 14 : 153-156.
- STRUBLE, A. L., TANG, Y.J., KASS, P. H., GUMERLOCK, P. H., MADEWELL, B. R. and SILVA, J.Jr. (1994). Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a
-

- period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J. Vet. Diag. Invest.*, 6 : 342-347.
- SULLIVAN, N .M., PELLETT, S. and WILKINS, T. D. (1982). Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, 35 : 1032-1040.
- SUMMANEN, M. J., LEE, T. D., ROSENBLANT, J. E. and CONTEZAC, J. M. (1988). Evaluation of the RapID ANA and API 20A for identification of anaerobic bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7 : 771-775.
- TABAQCHALI, S. (1990). Epidemiologic markers of *Clostridium difficile*. *Rew. Infect. Dis.*, 12 : 192-199.
- TABAQCHALI, S., HOLLAND, D., O'FARRELL, S., and SILMAN, S. (1984). Typing scheme for *Clostridium difficile*: Its application in clinical and epidemiological studies. *Lancet*, 1 : 935-938.
- TABAQCHALI, S., HOLLAND, D., O'FARRELL, S., and SILMAN, S. (1986). Method for the typing of *Clostridium difficile* based on polyacrylamide gel electrophoresis of <sup>32</sup>S-methionine labelled proteins. *J. Clin. Microbiol.*, 23 : 197-199.
- TABAQACHALI, S., SILMAN, R., and HOLLAND, D. (1987). Automation in clinical microbiology : a new approach to identifying microorganism by automated pattern matching of proteins labeled with <sup>32</sup>S-methionine. *J. Clin. Pathol.*, 40 : 1070-1087.
- TAYLOR, N. S., THORNE, G. M., BARTLETT, J. G. (1981). Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, 34 : 1036-1043.
- TEDESCO, F. J. (1982). Treatment of recurrent antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 77 : 220-221.
- TEDESCO, F. J. MARKHAM, R., GURWITH, M., CHRISTIE, D., and BARTLETT, J. G. (1978). Vancomycine for antiotic-associated pseudomembranous colitis. *Lancet*, 2 : 226-228.
- TORRES, J., CAMORLINGA-PONCE, M. and MUNOZ, O. (1992). Sensitivity in culture of epithelial cells from rhesus monkey kidney and human colon carcinoma to toxins A and B from *Clostridium difficile*. *Toxicon*, 30 : 419-426.
- TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., WEIS, R., GIAMPAOLO, C. and LaMONT, J. T. (1989). Comparative study of *Clostridium difficile* toxins A and Cholera toxin in rabbit ileum. *Gastroenterology*, 97 : 1186-1192.
-

- TVEDE, M. and RASK-MADSEN, J. (1989). Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet*, 2 : 1156-1160.
- VALENZUEL, A., MONTERO, M. E. LOBOS, T. VALENZUELA, A. ROOS, O. RODRIGUEZ, L. PIEMONTE, P. and SOLEDAD, G. M. (1995). Prevalence of *Clostridium difficile* among healthy chilean infants: evaluation by commercial enzyme immunoassay versus standard cytotoxin assay. *Clin. Infect. Dis.*, 20 : 259-260.
- VISCIDI, R., WILLEY, S. and BARTLETT, J. G. (1981). Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various population. *Gastroenterology*, 81 : 5-9.
- WEBER, A., KROTH, P. and HEIL, G. (1989). Occurrence of *Clostridium difficile* in faeces of dogs and cats. *J. Vet. Med. B.*, 36 : 568-576.
- WEBER, A. und KROTH, K K. (1992). Vorkommen und Bedeutung von *Clostridium difficile* bei. *Tieren Vet.*, 4 : 14-19.
- WHITTIER, S. SHAPIRO, D. S. KELLY, W. F. WALDEN, T. P. WAIT, K. J. MCMILLON, L. T. GILLIGAN, P. H. (1993). Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 31 : 2861-2865.
- WILLEY, S. H. and BARTLETT, J. G. (1979). Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 10 : 880- 884.
- WILLIS, D. H., KRAFT, J. A., LYERLY, D. M., BARROSO, L. A. and WILKINS, T. D. (1992). Confirmation that the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* is glutamate de hydrogenase. *J. Clin. Microbiol.*, 30 : 1363-1364.
- WILSON, K. H. (1993). The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.*, 16 : 214-218.
- WILSON, K. H., KENNEDY, M. J and FEKETY, F. R. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 15 : 443-446.
- WILSON, K. H., SHEAGHREN, J. N. and FRETER, R. (1985). Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster. *J. Infect. Dis.*, 151 : 355-361.
- WILSON, K. H. and FRETER, R. (1986). Interactions of *Clostridium difficile* and *E.coli* with microflora in continuous-flow cultures and gnotobiotic mice. *Infect. Immun.*, 54 : 354-358.
-

- WILSON, K. H., BLITCHINGTON, R., HINDENACH, B. and GREENE, R. C. (1988). Species-specific oligonucleotide probes for rRNA of *Clostridium difficile* and related species. *J. Clin. Microbiol.*, 26 : 2484-2488.
- WREN, B. W., and TABAQCHALI, S. (1987). Restriction endonuclease DNA analysis of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 25 : 2402-2404.
- WREN, B. W., HEARD, S. R., and TABAQCHALI, S. (1987). Association between production of toxins A and B and types of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Pathol.*, 40 : 1397-1401.
- WREN, B., CLAYTON, C. and TABAQCHALI, S. (1990). Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Lancet*, 335 : 423-438.
- WUST, J., SULLIVAN, N. M., HARDEGGER, U. and WILKINS, T. D. (1982). Investigation of and outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J. Clin. Microbiol.*, 16 : 1096-1101.



INSTITUTIONAL LIBRARY  
UNIVERSITY OF TORONTO

## ÖZGEÇMİŞ

1953 yılında Elbistanda doğdum. İlk öğrenimimi Beştepe köyü İlkokulunda Ortaöğrenimimi Elbistan Mükrimin Halil Lisesinde tamamladım . 1973 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim. 1978 yılında mezun oldum. Aynı yıl Kars Et ve Balık Kurumunda Veteriner Hekimi olarak göreve başladım. 1980 yılında Hava Kuvvetleri Komutanlığı Köpek Üretim ve Eğitim Merkezinde ( KÜVEM) muvazzaf Veteriner Hekimi subayı olarak görev aldım. 1985 yılında Hava Kuvvetleri Komutanlığı Sağlık Daire Başkanlığı Veteriner Gıda Kontrol Şube Müdürlüğüne tayin oldum. 1987 yılında GATA K.İğında açılan Mikrobiyoloji Uzmanlık öğrenciliği sınavını kazanarak aynı yıl GATA K.İği Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimine başladım. 1990 yılında uzmanlık eğitimini tamamlayarak aynı Anabilim Dalı Başkanlığında Mikrobiyoloji uzmanı olarak görev yaptım. 1994 yılında 600 yataklı Hava Hastanesi Bakterioloji Servis Şefliğine (Etimesgut), 10 Ekim 1996 yılında kendi isteğimle GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji servisine (İstanbul) tayin oldum. 1993 yılında Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü'nün Doktora sınavını kazanarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. Halen hem aynı bölümde doktora eğitimine hemde GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji servisindeki görevime devam etmekteyim. Evli ve iki çocuk sahibiyim.

1996