

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANTİBİYOTİK KULLANAN HASTALARDA
BAĞIRSAK FLORASININ İNCELENMESİ VE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOKSİN ARAŞTIRILMASI**

Hande KOSTUL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

MERSİN - 2012

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANTİBİYOTİK KULLANAN HASTALARDA
BAĞIRSAK FLORASININ İNCELENMESİ VE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOKSİN ARAŞTIRILMASI**

Hande KOSTUL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE TM (HK) 2010-5 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 208

MERSİN - 2012

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan *“Antibiyotik Kullanan Hastalarda Bağırsak Florasının İncelenmesi ve Clostridium difficile Toksin Araştırılması”* başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

31.05.2012

Tez Savunma Tarihi

Prof. Dr. Candan ÖZPÜRK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Nuran DELİALIOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi/Danışman

Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 31.05.2012 tarih ve 2012/152 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü COMERTÖZÜ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren ilgisini ve emeğini hiç eksik etmeyen, mesleki, bilimsel ve insani değerleriyle hayatıma çok şey katan ve çok önemli bir yeri olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, bu tezin seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda bana destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU başta olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a, Sayın Öğr. Gör. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını hiç esirgemeyen ve güler yüzüyle beni hep motive eden Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif ŞAHİN HORASAN'a, ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Necdet KUYUCU' ya teşekkür ederim.

İstatistik analizlerimin oluşturulmasında büyük yardımları olan başta Sayın Prof. Dr. Arzu KANIK olmak üzere Arş. Gör. Didem DERİCİ ve tüm Biyoistatistik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı hastanemizin tüm kliniklerine, tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında yanımda olan yerleri doldurulamaz dostlarıma, kendisinden çok şey öğrendiğim, yol göstericim, canım ağabeyim Ali Hadi GÖZÜTOK'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük katkı ve emekleri olan sevgili anneme ve babama,
Ve diğer yarım kardeşim Gözde KOSTUL'a sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Mikrobiyolojik Özellikler.....	4
2.3. Epidemiyoloji	5
2.4. Virülans ve Patogenez.....	7
2.4.1. Toksinler.....	7
2.4.1.1. Toksin A.....	8
2.4.1.2. Toksin B.....	9
2.4.2. Patogenez.....	9
2.4.3. Risk Faktörleri	12
2.5. Klinik.....	13
2.5.1. Asemptomatik Taşıyıcılık	13
2.5.2. Psödomembransız Kolit	14
2.5.3. Psödomembranöz Kolit	14
2.5.4. Fulminan Psödomembranöz Kolit.....	15
2.6. Klinik Tanı	15
2.6.1. Radyolojik İncelemeler	16
2.6.2. Endoskopik inceleme	17
2.6.2.1. Patolojik Değişiklikler	17

2.6.3. <i>Clostridium difficile</i> ' nin Laboratuvar Tanısı.....	18
2.6.3.1. Kültür	18
2.6.3.2. Toksin Aramaya Yönelik Testler	19
2.6.3.2.1. Doku Kültürü.....	19
2.6.3.2.2. Lateks Aglütinasyon Testleri	20
2.6.3.2.3. ELISA (Enzim Linked İmmunoassay).....	21
2.6.3.2.4. Moleküler Yöntemler	22
2.7. Tedavi.....	23
2.7.1. Relaps	24
2.8. Korunma.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	26
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	26
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	26
3.2.2. Kullanılan Besiyerleri.....	27
3.2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Testler.....	27
3.3. Örneklerin Alınması ve Ekimi	28
3.3.1. Mikroskopik İnceleme.....	28
3.3.2. Bakteriyolojik Kültür	28
3.4. <i>Clostridium difficile</i> Toksin A/B aranması	29
3.4.1. Test çalışma prensibi	29
3.4.1.1. Kit İçeriği	30
3.4.1.2. CDAB sribin içeriği	30
3.4.1.3. Testin Kalibrasyonu	31
3.4.2. Testin Çalışması	31
3.4.3. Sonuçlar ve Değerlendirme	31
3.5. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. difficile</i> 'nin patogenezi	11
Şekil 2.2. Bağırsak mukozasında psödomembranların görünümü	18
Şekil 2.3. ELISA yönteminin prensibi.....	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>C. difficile</i> 'ye bağlı ishal gelişimi için risk faktörleri.....	13
Çizelge 3.1. <i>C. difficile</i> Toksin A/B kitinin içeriği.....	30
Çizelge 3.2. <i>C. difficile</i> Toksin A/B kit striplerinin içeriği	30
Çizelge 3.3. <i>C. difficile</i> Toksin A/B test değerleri.....	32
Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyete göre dağılımları.....	33
Çizelge 4.2. Hastaların <i>C. difficile</i> toksin A/B sonuçları.....	33
Çizelge 4.3. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.....	34
Çizelge 4.4. <i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif ve negatif hastaların yattıkları kliniklere göre dağılımları.....	35
Çizelge 4.5. Çalışmadaki hastaların kültürlerinde izole edilen mikroorganizmaların dağılımı	36
Çizelge 4.6. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların hematolojik malignite sonuçları.....	36
Çizelge 4.7. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların nazogastrik tüp uygulaması sonuçları.....	37
Çizelge 4.8. Hastaların hastanede yattıkları süre içerisinde kullandıkları antibiyotikler	38
Çizelge 4.9. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların antiülser tedavi alıp almadıkları	39
Çizelge 4.10. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların lökosit ve CRP sonuçları.	39
Çizelge 4.11. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların lökosit ve CRP medyan değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	39
Çizelge 4.12. <i>C. difficile</i> toksin pozitif ve negatif hastaların yatış sürelerinin ve antibiyotik kullanma sürelerinin medyan değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	40

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABİ	Antibiyotiğe Bağlı İshal
ARDS	Akut Respiratuar Distress Sendromu
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CCFA	Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRP	C-Reaktif Protein
EHEC	Enterohemarojik <i>Escherichia coli</i>
ELFA	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzim Linked İmmunoassay
GDH	Glutamat Dehidrogenaz
Hep2	Human Epithelial hücreleri
HIV	Human Immunodeficiency Virus
PMK	Psödomembranöz Kolit
SLP	Surface-Layer Protein

ÖZET

Antibiyotik Kullanan Hastalarda Bağırsak Florasının İncelenmesi ve *Clostridium difficile* Toksin Araştırılması

Clostridium difficile ilişkili ishal özellikle hastanede yatan geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda ortaya çıkabilmektedir. Kendini sınırlayan hafif bir ishalden ağır seyirli psödomembranöz enterokolite kadar değişen bir klinik tablonun gelişmesi söz konusudur. *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyonlardan sorumlu en önemli antibiyotikler ampisilin, amoksisilin, klindamisin ve sefalosporinlerdir. Antibiyotik kullanımı dışında ileri yaş, gastrointestinal endoskopi ve cerrahi müdahale, kanser, böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar, immün sistemin baskılanması, nazogastrik tüpün varlığı, antiülser ilaç kullanımı, yoğun bakımda yatma, uzun süreli hastanede yatış risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Kesin tanı dışkıdan *C. difficile*'nin üretilmesi ve hücre kültüründe sitopatik etkiyi saptayarak toksin yapımının gösterilmesi ile konur. Ancak rutinde bu her zaman mümkün olmadığı için ELISA yöntemi ile toksinin gösterilmesi daha sık kullanılan bir yöntemdir.

Bu çalışmada Eylül 2010-Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan ve ishal gelişen 158 hastadan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örneklerinde Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemiyle *C. difficile* toksin A/B araştırılmıştır. Çalışmamızda; 18 (%11,4) hastada *C. difficile* toksin A/B pozitif olarak bulunmuş ve bu hastaların 15 (%83,3)'ünün beta laktam-beta laktamaz inhibitör grubu (penisilin, sefalosporin ve karbapenem) antibiyotik kullandığı görülmüştür. Toksin pozitif hastaların dışkı kültürlerinde ise bir tanesinde *C. albicans* ürerken 17 tanesinde normal bağırsak flora bakterilerinin ürediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; *C. difficile* hastanede yatan ve başta antibiyotik kullanan hastalarda gelişen ishallerde öncelikle akla gelmeli ve rutin laboratuvarlarda dışkıda toksin araştıran ELISA testleriyle toksin araştırılmasının yapılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik kullanımı, ishal, *C. difficile* toksin A/B, ELFA

ABSTRACT

Investigation of Intestinal Flora and *Clostridium difficile* Toxin at Patients on Antibiotics

Clostridium difficile associated diarrhea may especially occur in hospitalized patients receiving large spectrum antibiotics. It is possible to observe a clinical picture ranging from a mild self-limiting diarrhea to severe course of pseudomembranous enterocolitis. The most important antibiotics responsible for *C. difficile* infections are to ampicillin, amoxicillin, clindamycin, and cephalosporins. A part from the use of antibiotics, advanced age, gastrointestinal endoscopy and surgery, underlying diseases such as cancer and kidney failure; immune system suppression, the presence of a nasogastric tube, use of antiulcer drugs, intensive care unit treatment and long-term hospitalization are counted within risk factors. The definitive diagnosis is established producing *C. difficile* from the feces and demonstration of the toxin by determining the cytopathic effect in cell culture production. However this routine is not always possible so demonstration of the toxin with the ELISA method is more often used method.

In this study, toxin A/B were investigated with Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) method in stool specimens which sent to Department of Medical Microbiology Laboratory from 158 patients who developed diarrhea and hospitalized in various clinics of Mersin University School of Medicine between September 2010 - October 2011. In this study, *C. difficile* toxin A/B is found positive in 18 (11,4%) patients and 15 of these patients (83,3%) were used, beta-lactam-beta-Scroll lactamase inhibitor group (penicillins, cephalosporins, and carbapenems) antibiotics. In one of the stool cultures of toxin positive patients had *C. albicans* while normal intestinal flora bacteria were grown in the 17 of them.

As a result, *C. difficile* should be considered particularly for the hospitalized and diarrhea developed patients who used antibiotics first. Investigation of toxin with ELISA test while performing routine toxicological processing of stool in laboratories is recommended.

Keywords: Antibiotic use, diarrhea, *C. difficile*, toxin A/B, ELFA

1. GİRİŞ

Clostridium difficile antibiyotikle ilişkili ishal ve kolitin en önemli etkenidir ve hastalık hafif ve kendini sınırlayan ishalden, karakteristik şekli olan psödomembranöz kolit (PMK) tablosuna kadar ulaşabilmektedir. *C. difficile* patolojik değişiklikler ve klinikten sorumlu olan toksin A ve toksin B olmak üzere iki toksin oluşturmaktadır (1).

Clostridium difficile enfeksiyonu özellikle antimikrobiyallerle tedavi edilen hastalarda morbidite ve mortaliteden sorumlu ciddi bir sağlık sorunudur (2). Antibiyotiğe bağlı ishallerin %15-25'inden, PMK'li hastaların hemen hemen hepsinden sorumludur (3). Antibiyotik nedenli ishallerin diğer etkenleri olarak; *Clostridium perfringens* (A tipi), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxycota*, *Salmonella* ve *Candida* türleri bildirilmektedir (4). Antibiyotik kullanımı, florada değişiklik oluşturması ve dirençli bakterilerin seçilmesi, kolonizasyonun koruyucu etkisini ortadan kaldırması gibi etkilerinin dışında önemli oranda ishal gelişmesi riski de taşımaktadır (5). Antibiyotiğe bağlı ishal (ABİ) tanımında sorun yaratan bir nokta, olguların antibiyotik kullanımından saatler sonra başlayabileceği gibi iki-üç ay içinde de başlayabilmesidir. Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak değişmekle beraber, antibiyotik kullanımında ortalama %5-15 oranında ABİ bildirilmektedir. En sık belirlenen etken olan *Clostridium difficile* ancak olguların çok az bir kısmında (%10-20) saptanabilmekte ve çoğu olguda gerçek etken ya da mekanizma ortaya konamamaktadır. Bu konudaki ilk bilgilerin çoğu *Staphylococcus aureus* ile oluşmuş psödomembranöz kolit olguları ile sınırlı iken *C. difficile*'nin belirlenmesi ile olguların en önemli nedeni olarak bu bakteri ön plana çıkmıştır (5).

Clostridium difficile; Gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerob, uzun ve büyük basiller şeklinde görünen bir bakteridir (6). Bu bakteri sağlıklı insanların %3'ünün normal bağırsak florasında yer almaktadır (7, 8). *C. difficile* fekal oral yolla direk olarak bulaşabileceği gibi, yüzeylerdeki sporların alınmasıyla indirek olarak da bulaşabilmektedir (6). Bu bakteri iki çeşit toksin üretmektedir. Toksin A (308 kDa) ve toksin B (270 kDa) diye adlandırılan toksinler kromozomal bir gen olan 'tox' geninin kontrolü altındadır. Bu 'tox' geni bakterinin tüm suşlarında bulunmamaktadır (7).

Clostridium difficile ilişkili enterik hastalıklar hastanede yatan hastalarda yaygın olarak görülmektedir. Hastanede çalışanlar ve organizmayı taşıyan hastalar arasında yayılarak nozokomiyal enfeksiyon sonucu PMK gelişmektedir. Taşıyıcı hastaların sayısı ciddi ishal ve kolit olanlardan daha yüksektir. *C. difficile* aynı zamanda toplum kaynaklı vakalar olarak hastane dışında da sıklıkla bildirilmektedir. *C. difficile* vahşi hayvanlar gibi çeşitli evcil hayvanlarda da enfeksiyon yapmaktadır. Hayvanlar ve onların et ürünlerinde aynı serotiplerin bulunması insan enfeksiyonlarıyla ilişkili bulunmuş ve enfeksiyonun toplumda kazanılmasında etken olabileceği düşünülmüştür (9).

Clostridium difficile az sayıda sağlıklı bireyde ve hastanede yatan hastalarda, normal bağırsak florasının bir parçasıdır. Antibiyotik kullanımı normal bağırsak florasını değiştirmekte ve bu oldukça dirençli organizmaların aşırı üremesine yol açmakta ve hastayı *C. difficile* enfeksiyonuna karşı duyarlı hale getirmektedir. Hastalık, etkenin kolonda çoğalması ve toksinleri üretmesi ile meydana gelmektedir (10).

Clostridium difficile geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı hastanede kazanılmış ishalin en sık etkenidir. Antibiyotikler birinci risk faktörü olsa da konak faktörleri ve çevresel faktörler de hastalığın şiddetinde etkindir. *C. difficile* ilişkili ishal için tespit edilen birkaç risk faktörü bulunmaktadır. Bunlardan antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörüdür. Bunun dışında immünespresif ajanlar, proton pompa inhibitörleri ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar da *C. difficile* ilişkili ishal oluşumunda önemli risk faktörleridir (9).

Bu çalışmada hastanede yatan ve özellikle antibiyotik kullanımı sonucu ishal gelişen hastaların dışkıında *C. difficile* toksin A/B araştırılması ve bu hastaların *C. difficile* için muhtemel olan risk faktörlerinin; altta yatan malign hastalık, immünespresif ilaç, antiülser ve kanser tedavisi alıp almadığı, nazogastrik tüp kullanımı gibi faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Psödomembranöz kolit, ilk kez 1893 yılında Finney tarafından tanımlanmıştır. Mide tümörü nedeniyle ameliyat edilen bayan hastada, operasyonu takiben, ilerleyici ishal başlamış; hasta 15 gün sonra ölmüş, yapılan otopside bağırsaklarda psödomembranlar görülmüştür (3). Bakteri ise ilk kez 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından yenidoğan ve bir yaşına kadar olan bebeklerin dışkılarından izole edilmiş ve küçük yaşlarda kolonun normal flora üyesi olduğu bildirilmiştir. Fakat bakterinin PMK'le ilişkisi 1978 yılına kadar tespit edilememiştir (3, 11).

Hambre 1943 yılında hayvan modellerindeki toksisiteye dikkati çekmiştir. 1960'lı yıllardan sonra antibakteriyel ajanların yaygın kullanımına bağlı olarak, PMK olgularında artma görülmüştür (3). 1970'de PMK çalışmaları için en uygun hayvanın golden syrian hamster olduğu saptanmıştır. Bu hayvanlara oral veya parenteral olarak verilen farklı antibiyotiklerin ölümcül olabilen ağır enterokolit tablolarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bundan yola çıkılarak yapılan mikrobiyolojik araştırmalar bu hayvanların dışkılarında, *Clostridium sordelli* antitoksinini nötralize edebilen bir toksin oluşturan *C. difficile*'nin bulunduğunu göstermiştir (12). 1974 yılına kadar mukozal iskemi ve viral etkenler sorumlu tutulmuştur (3). 1974 yılında bakterinin sporlarının çevrede çok fazla bulunduğu ve bakteri toksinlerinin özellikleri tam olarak ortaya çıkmıştır (13, 14). PMK ile antibiyotik tedavisi arasındaki ilişkinin ortaya konmasından sonra, 1974 yılında birbiriyle bağlantılı üç tarihi çalışma yapılmıştır. Tedesco hastalığının anatomisini, Green hayvan modellerinde toksinin etkisini, Hafız ise basilin doğada yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir (3). Tedesco ve arkadaşları klindamisin kullanan 200 hastanın %20'sinde ishal, %10'unda PMK saptamış, böylece klindamisine bağlı ishal vakalarında endoskopik olarak PMK tespit etmiş ve bu hastaların dışkı kültürlerinde *C. difficile*'yi üreterek izole etmiştir (15, 16). Fakat kesin olarak PMK-*C. difficile* ilişkisi 1978'de Bartlett tarafından saptanmıştır (16). 1978 yılında antibiyotikle ilişkili PMK'in etkeni olarak *C. difficile*'nin ilk kez rapor edilmesinden sonra *C.difficile* enfeksiyonu yıllar içerisinde artış göstermiştir (17).

C. difficile'nin klinik önemi, 1970'li yılların ortalarına kadar anlaşılamamıştır. Bu organizma nadiren dışkı kültürlerinden izole edilmekteydi ve insan hastalıklarındaki rolü bilinmiyordu. Günümüzde yapılan sistematik çalışmalar, *C. difficile*'nin antibiyotik kullanımı ile ilişkili gastrointestinal hastalıklardan sorumlu olduğunu açıkça göstermektedir. Bu hastalıklar benign özellikte olup, kendiliğinden iyileşen ishalden, ciddi ölümcül PMK'e kadar ilerleyebilmektedir (10). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) raporuna göre *C.difficile* ile ilişkili ishal insidansı 100.000 kişide %31 iken, 2003 yılında 100.000 kişide %61 olarak saptanmıştır (18).

2.2.Mikrobiyolojik Özellikleri

C. difficile 0,5 µm eninde ve 3-5 µm boyunda, uçları yuvarlak, ince, uzun, düz, Gram pozitif basillerdir. Dokudan hazırlanan preparatlarda tek tek veya kısa zincirler halinde görülürken katı besiyerlerinde flamentöz yapıda görülebilmektedir. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanır. Ancak eski kültürlerde, bazen Gram negatif görülebilir. Kapsülsüz ve peritrik kirpikleri ile zayıf hareketlidir. Bakteri bedeninden daha geniş, oval, subterminal yerleşimli spora sahiptir. Spor nadiren terminal yerleşim gösterebilmektedir (3, 19).

Sporların en önemli özelliği bakteri hücre kalınlığından daha geniş olması ve bulunduğu yerde bakteriyi şişirmesidir. Buna göre mekik, davul tokmağı ve raket görünümü alırlar. Sporlar doğada oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır (19). Üreyebilmesi için karbondioksit (%10), hidrojen (%10) ve nitrojen (%80) bulunan ortama ihtiyaç gösteren zorunlu anaerob bir bakteridir. Her ne kadar 20°-45 °C'ler arasında üreyebilirse de, optimal üreme ısısı 30°-37 °C, pH: 7-7.2'dir. İlk izolasyonda içinde kan, serum, yumurta sarısı ve fruktoz bulunan besiyerlerine ihtiyaç gösterir. Agarlı besiyerlerinde 35 °C' de, 48 saatlik inkübasyon sonunda hafif kabarık, kenarları düzensiz, 1-3 mm çaplı koloniler meydana gelir (3). Kanlı agarda 24 saat inkübasyondan sonra 2 mm ve daha büyük, buzlu cam görüntüsünde, sarı renkli koloniler oluşturur (20). At kanı konmuş besiyerlerinde bazen hemoliz görülebilirse de, koyun ve insan kanlı agar besiyerlerinde hemoliz oluşmaz (3). Bakteri çoğu antibiyotiğe dirençli olduğundan dışkıdan ilk izolasyonunda, içinde çeşitli antibakteriyel ajanlar

bulunan selektif besiyerleri kullanılır. En sık kullanılan Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) besiyeridir. Bu besiyerinde 24 saat içinde oluşan koloniler 360 nm. ultraviyole ışık altında incelenirse, etrafının açık yeşilden sarıya kadar değişen bir hale ile çevrili olduğu görülür. Koloniler, 1-4 mm çapında, buzlu cam görünümünde, kenarları düzgün, hafif kabarıktır (3). *C. difficile* kanlı agarda spor oluştururken CCFA’ da spor oluşumu gözlenmez, fakat besiyerine %0,2 sodyum taurokolat katılırsa bakteriler spor oluşturabilir (3, 20). *C. difficile* glikoz, salisin ve mannitolu asit oluşturarak fermente eder. Maltoz, laktoz, sükröz, galaktoz, ksiloz ve gliserol’e etkisi yoktur. Nişastayı etkilemez, jelatin ve eskülini hidrolize eder. Triptofandan indol üretmez. Proteolitik değildir, lipaz ve lesitinaz aktivitesi yoktur (3).

2.3. Epidemiyoloji

Clostridium difficile, genellikle yaşamın ilk evrelerinde kolona yerleşmekte, bir yıl taşıyıcılık devam ettikten sonra üç yaşında kolondaki sayısı en alt seviyeye inmektedir (3). Sağlıklı erişkinlerin %0-3’ünde normal bağırsak florasında bulunmakla beraber yenidoğan döneminde bu oran %60-70’lere ulaşabilmektedir (20). Yenidoğanların dışkısında *C. difficile* toksin A/B miktarı çok yüksek oranda bulunmasına rağmen bunlarda enfeksiyon görülmemektedir. Bunun nedeni olarak da toksin A’nın bağlandığı epitel hücre reseptörünün ileri yaşlarda yani yaşla orantılı olarak üretildiği düşünülmektedir (7). Bunun yanında sütte bulunan Fetulin adı verilen bir glikoprotein çökümünde *C. difficile* toksinlerinin etkilerini önlediği; ayrıca bu toksinlerin, yapısal özellikleri yüzünden yenidoğanların intestinal mukozasına yapışamadıkları ileri sürülmektedir (21). Yenidoğanlardaki yüksek taşıyıcılık oranları sekizinci aydan sonra erişkinlerdeki oranlara inmektedir (22). Asemptomatik erişkin kişilerdeki konak direncinin nedeni henüz tespit edilememiştir (7). Toplumda asemptomatik kolonizasyon prevalansı %5’ten daha düşük oranda saptanırken, hastanede yatan hastalarda özellikle de yaşlı hastalarda asemptomatik kolonizasyon prevalansı %20-30’lara ulaşmaktadır (6). Kadınlarda ürogenital bölgede bakteri varlığı saptanabilmişse de yenidoğana bulaş açısından bu bulgunun önemi tam olarak bilinmemektedir (5).

C. difficile enfeksiyonu artan oranlarda bildirilmektedir. Hastanelerde özellikle yaşlı, altta yatan hastalığı olanlar ve kemoterapi gören hastalar artmış risk altındadır. İngiltere’de kronik bakım ünitelerinde %7, akut dahili bilimlerde yatan yaşlı hastalarda %14 ve kronik hasta bakım ünitelerinde yatan yaşlı hastalarda %20 oranında asemptomatik *C. difficile* taşıyıcılığı belirlenmiş ve bu hastaların ancak az bir kısmında semptomatik enfeksiyon saptanmıştır. Hastanelerde özellikle salgınlar olduğu, hastalar arasında sağlık personeli ve kontamine aletler ile yayılım olabileceği belirtilmektedir. Çevrede bakterinin sporlarının varlığı ile bulaşma olasılığı arasındaki bağlantı tartışılan bir konudur. Amerika Birleşik Devletleri’nde *C. difficile* enfeksiyonu oranı hastanede 1996’da 31/100.000 kişi iken 2003 yılında 61/100.000 kişi olmuş ve bu artışın özellikle 65 yaş üstü hastalarda çok daha belirgin olduğu bildirilmiştir (5). *C. difficile* A.B.D.’nde yılda 500.000’in üzerinde ishal olgusundan sorumlu tutulmakta ve 15.000 civarında ölüm görülmektedir. Ayrıca bu hastalığa bağlı maliyetin 1 milyar doları aştığı tahmin edilmektedir (23).

Dünyanın çeşitli ülkelerinden 2000’li yılların ilk yarısında, virülansı oldukça yüksek *C. difficile* 027/NAP1/BI kökenine bağlı, mortalite oranı yüksek ciddi salgınlar bildirilmiştir (24). Kanada, ABD ve Avrupa’da, 2003 yılında halk arasında ve hastanelerde *C. difficile*’nin oldukça virülan bu suşun (varyant toksin veya binary toksin pozitif) neden olduğu antibiyotikle ilişkili ishal epidemileri bildirilmiştir (10, 25).

Virülansı yüksek olan bu *C. difficile* 027/NAP1/BI suşlarının diğer bölgelere de yayıldığı ve tüm dünya için tehdit unsuru haline geldiği görülmektedir (25, 26). Bu suş; hastalığın çok şiddetli gelişmesi, yüksek mortalite oranı, artan tekrar etme riski ve birçok komplikasyondan sorumludur. Bu suşun artmış virülansı, enterotoksin ve sitotoksin üretimini düzenleyen gendeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Düzenleyici genin fonksiyonunu yitirmesi ile toksin üretiminde 16-23 kat artış meydana gelmektedir. *C. difficile*’nin bu yeni suşu başka bir toksin üretmektedir, bu ikili toksin (binary toxin) olup, bu suş için önemli bir ayırıcı özelliktir, ancak klinik önemi tam olarak bilinmemektedir. Birçok *C. difficile* izolatının aksine, bu suş florokinolon antibiyotiklere dirençlidir. Florokinolonlar halk arasında ve hastanelerde geniş çapta kullanıldığı için, bu uygulamanın bu virülan suşun seçimine neden olduğuna inanılmaktadır (10). Kanada’da salgınlara bağlı olarak 2002’den sonra 4 kat ve daha fazla *C. difficile* ilişkili ishal oranı rapor edilmiştir. Bu oran artışının ribotip

O27/NAP1/BI suşundan kaynaklandığı düşünülmüştür (27). Bu rapordan kısa bir süre sonra diğer yayınlar bu yeni ortaya çıkan suşun Amerika, İngiltere, İskoçya, İrlanda, Belçika, Fransa, Avusturya, İsviçre, Danimarka, Lüksemburg, Polonya ve Hollanda'da varlığını rapor etmiştir. Türkiye'de *C. difficile* O27'nin varlığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (28).

Toplum kaynaklı ABİ olgularında da *C. difficile*'nin önemli bir etken olarak akla gelmesi gerektiği fakat rutin araştırmalarda genelde gözden kaçabildiği belirtilmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada *C. difficile* olgularının %42'si toplum kaynaklı olarak bulunmuş ve en az yarısında son bir ayda hastanede yatış öyküsü olmadığı belirlenmiştir. Toplumda ABİ çok sık olmamakla beraber özellikle gastrik asiditeyi azaltan ilaçların kullanımının *C. difficile* ilişkili ishal olguları için önemli bir risk oluşturduğu, non-steroid anti-inflamatuar ilaçların etkisinin ise net olarak ortaya konamadığı bildirilmiştir (5).

2.4. Virülans ve Patogenez

C. difficile bazen bebek ve nötropenik hastalarda invazyona neden olabilirse de, aslında non invazivdir. Hastalık, basilin ürettiği ekzotoksinlerin etkisiyle olmaktadır. Tüm suşlar toksin üretmez, bu nedenle patojen olmazlar. Bunun yanında izole edilen *C. difficile* izolatlarının %75'inin toksijenik olduğu saptanmıştır (3).

2.4.1. Toksinler

C. difficile toksin A ve toksin B denilen iki farklı toksin üretmektedir. Hastalığı toksijenik *C. difficile* suşlarının meydana getirdiği bu toksinler yapmaktadır. İki ana toksin de %63 aminoasit sekans homolojisine sahiptir. Toksin A, 308 kDa molekül ağırlığında bir enterotoksin olup, major patojenik komponenttir. Toksin B ise 270 kDa ağırlığında, sitotoksik etkiye sahip kısımdır. Toksin A'da sitotoksik etkilidir, fakat toksin B'nin sitotoksik özelliği, toksin A'dan 100 ile 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Ayrıca etki mekanizmaları birbirine benzemektedir. Her iki toksinde protein yapısında

olup asitlere, proteolitik enzimlere ve ısıya duyarlıdır. Tripsin ve kemotripsin ile inaktive olurlar. RNAse, β -galaktosidaz ve lipazdan etkilenmezler (3, 6, 10, 14, 25).

Bu toksinler, endositoz yoluyla bağırsak epitel hücresine girdikten sonra hücrede aktin iskeletini etkileyip hücre ölümüne neden olurlar (25). Toksinler, aynı zamanda bazı sitokinlerin salgılanmasına, bunun sonucunda inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açarlar (25, 29). Suşların ürettiği toksin miktarı ile hastalığın şiddeti arasında ilişki olup olmadığı tartışmalıdır. Her ne kadar toksin üretmeyen suşlar hastalığa neden olmasa da, toksijenik her suşla da hastalık meydana gelmemektedir. Bunun, suşlar arasındaki farklardan, konaktaki toksin reseptörlerinin farklılığından ve immun yanıt farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (3).

2.4.1.1.Toksin A

Enterotoksin özellikte olan toksin A, nötrofiller için kemotaktik özellikte olup, sitokinlerin salınımı ile ileuma polimorfonükleer nötrofillerin infiltrasyonunu stimüle eder. Ayrıca hücreler arası sıkı bağlantının bozulmasına neden olan bir sitopatik etkiye sahiptir ve bu intestinal duvarda permeabilite artışı ve arkasından da ishal ile sonuçlanmaktadır (10).

Toksin A, enterosit membranı üzerinde bulunan glikoprotein reseptörlere bağlanarak, hücre içine girer. Fibriler aktini değiştirerek konak hücrede yuvarlaklaşmaya neden olur. Kolon mukoza hücreleri arasındaki bağlantılar kopar ve yaygın harabiyet gelişir. Sonuçta bağırsaktan lümene, proteinden zengin bir eksuda sızar. Oluşan harabiyet toksin B'nin mukoza hücrelerine penetre olmasını daha da kolaylaştırır (3).

Toksin A enterositler dışındaki diğer hücelere de etkilidir. Makrofaj ve mast hücrelerini aktive edip nötrofillerin mobilizasyonuna yol açar. Sonuçta mukoza hasarı ile birlikte etkilenen bağırsak segmenti içine nötrofiller hücum eder. Bu nedenle toksin A, kolera toksininin aksine monosit, nötrofil ve dökülmüş enterositler içeren proteinden zengin bir dışkılamaya sebep olur. Hemorojiye bağlı olarak dışkıda bazen kanda bulunabilmektedir (3).

2.4.1.2.Toksin B

Toksin B; toksin A'nın inflamasyona uğrattığı dokulara penetre olarak mukozada çok ciddi lezyonların gelişmesine neden olur (7). Toksin B'nin doku kültürü hücrelerini öldürücü etkisi yani sitotoksik özellikte olması toksin A'ya göre 100-1000 kat daha fazladır. Bağırsak mukoza hücrelerinde toksin B için spesifik reseptör bulunmamaktadır. Bu nedenle toksin B etkisini, toksin A mukoza hücrelerinde yeteri kadar harabiyet verdikten sonra gösterir (30, 31).

2.4.2. Patogenez

Clostridium difficile'nin hastalık oluşturması için ilk şart kolon florasının antibiyotikler veya antineoplastik ajanlarla baskılanmasıdır. Bunu takiben fekal-oral yolla bulaşan *C. difficile* ile gelişen kolonizasyonu, bakterinin çoğalması ve toksin salgılaması izler. Kolonize hastaların yaklaşık üçte birinde *C. difficile*, ishale sebep olan toksinler salgılar (6).

Toksin A, intestinal sıvı sekresyonunu indükleyen, mukozal permeabilitenin artışına ve mukozal inflamasyona yol açan bir enterotoksindir. Toksin A aynı zamanda kolon hattındaki epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantıların çözülmesine, toksin B'nin epitelyumdaki hücreler içerisine girmesine yardım eder (6).

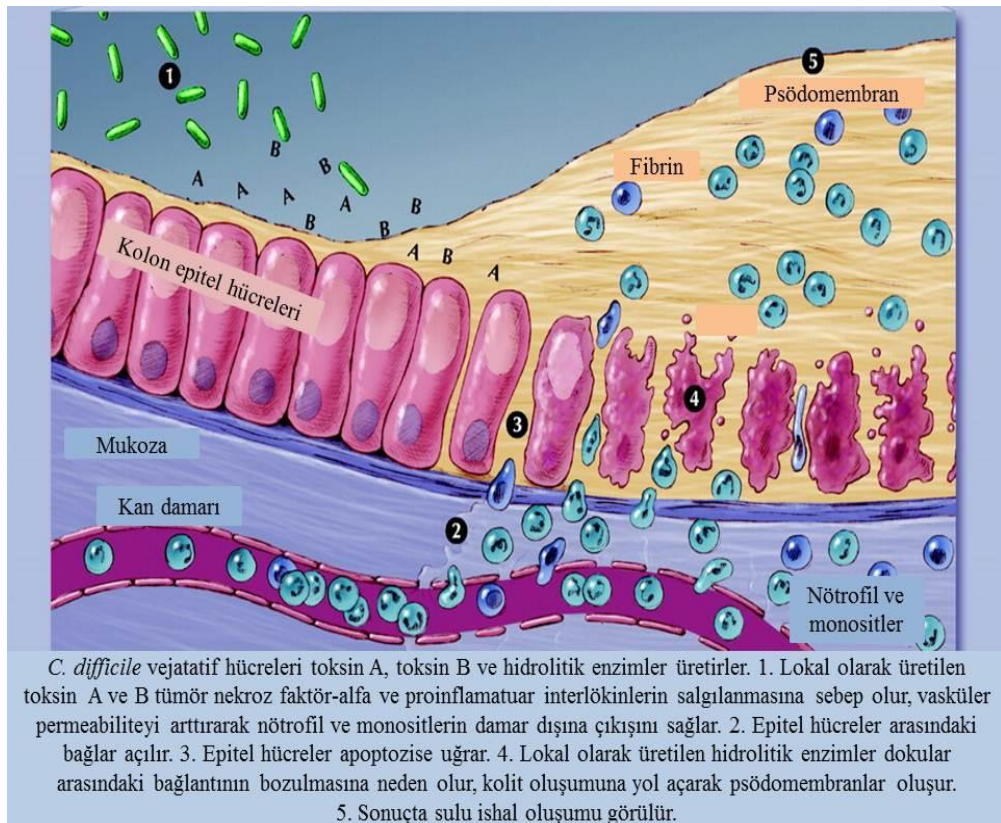
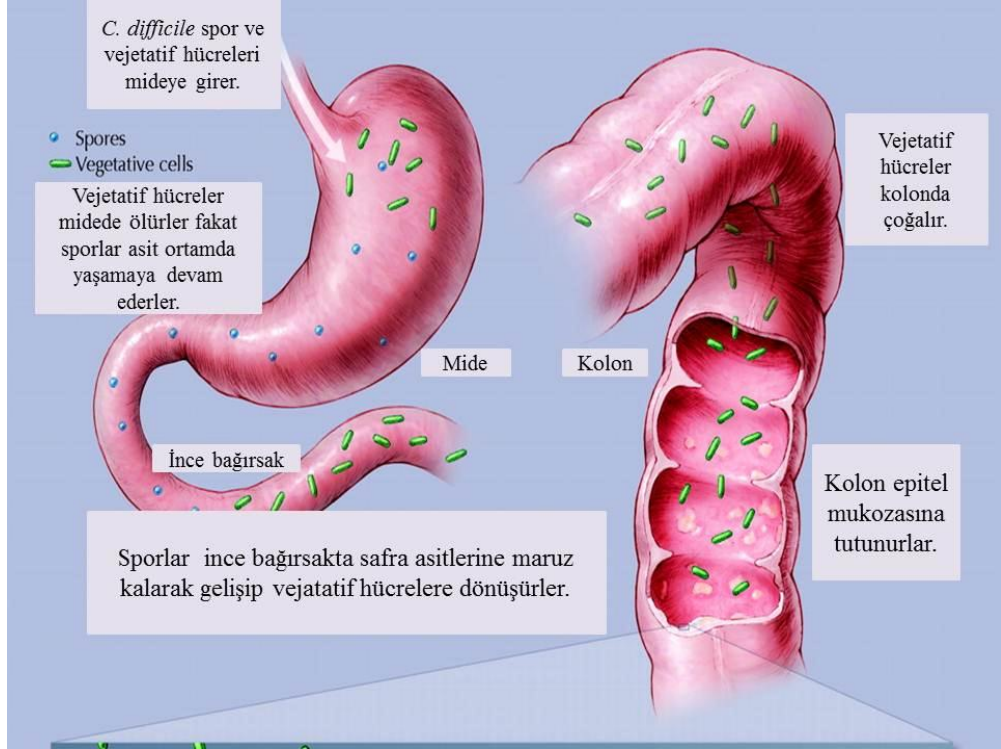
Toksin B, toksin A'dan 1000 kat daha sitotoksiktir, makrofaj kökenli TNF-alfa ve lipooksijenaz aracılığı ile nötrofillerin yoğun bir şekilde toplanmasını stimüle edici etkiye sahiptir (6).

Sonuçta her iki toksinin etkisiyle gelişen hemoraji, nekroz ve inflamasyon ile bağırsak lümenine sıvı ile birlikte protein sızması olur. İshal, toksin etkisi ile harap olan mukoza hücrelerinin sıvı absorpsiyonunu kontrol edememelerine bağlıdır (6) (Şekil 2.1.).

Her iki toksin hastalığın patogenezinde karşılıklı sinerjik etkileşim göstermesine rağmen, toksin A negatif izolatlar yine de hastalığa neden olabilmektedir. Ayrıca, toksinlerden biri veya her ikisinin üretilmesi, hastalığın gelişmesinde yalnız başına etkili görünmemektedir (örn; küçük çocuklarda *C. difficile* taşıyıcılığı ve yüksek toksin

seviyelerinin oldukça yaygın olmasına rağmen hastalığın gelişmesi nadirdir) (10). Önceleri toksin A'nın bağırsak epitelinde hasara yol açtıktan sonra toksin B'nin devreye girip etki edeceği bu yüzden toksin B'nin tek başına aktif olamayacağı düşünülmekteydi. Fakat son zamanlarda moleküler tekniklerin gelişmesi göstermiştir ki Toksin-A olmadan Toksin-B sitotoksik etkisini gösterebilmektedir (25, 29). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Toksin-B üreten suşlar tanımlanmış, bununla beraber başka varyant suşlar da tespit edilmiştir. Bazı suşlar yüksek miktarda Toksin-A ve Toksin-B salgılamaktadır, bunun nedeni olarak bu suşların toksin ekspresyonu üzerinde negatif etki yapan *tcdC* geninde herhangi bir bozukluk olduğu tespit edilmiştir. Virülansı çok yüksek olan ve hastane salgınlarına yol açan bu O27/NAP1/BI suşunun *tcdC* geninde delesyon olduğu, bunun sonucunda yüksek oranda Toksin-A ve Toksin-B salgıladığı belirlenmiştir. Aynı zamanda bu şus binary toksin denilen üçüncü bir toksin üretmektedir (25, 26).

Bakteriyel yüzey proteinleri (surface-layer protein, SLP), *C. difficile*'nin intestinal epitel hücrelerine bağlanmasında önemli olup, toksinlerin belirli yerlerde üretilmesine ve arkasından da doku hasarına neden olmaktadır (10).



Şekil 2.1. *C. difficile* 'nin patogenezi (11).

2.4.3. Risk Faktörleri

C. difficile'ye bağlı ishal gelişimi için birçok risk faktörü vardır. Bunlar; ileri yaş, altta yatan bir hastalığın olup olmadığı, endoskopi gibi gastrointestinal işlemler, nazogastrik tüpün varlığı, antiülser ilaç kullanımı, yoğun bakımda yatma, uzun süreli hastanede yatış, antibiyotik tedavisi ve çoklu antibiyotik tedavisi olarak belirlenmiştir (6, 32). Antimikrobiyal ajanlar, sitotoksik ilaçlar kolon florasını bozar ve çevrede bol olarak bulunan *C. difficile* sporlarının kolona yerleşimi için zemin hazırlar. Antibiyotikler çok sık kullanıldıkları için florayı bozan faktörlerin başında gelmektedir (33). *C. difficile* sporları oldukça dayanıklıdır, bu yüzden sporlar yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında bile varlığını sürdürebileceğinden, lümendeki antibiyotik konsantrasyonu *C. difficile* için inhibitör olan düzeyin altına indiğinde, normal flora tekrar üremeden, *C. difficile* hızla çoğalmaya ve baskın olmaya başlar (34).

Herhangi bir antibiyotik kullanımı sırasında ABİ gelişilsede bu konuda klindamisin ve sefalosporinler en riskli antibiyotiklerdir. Başta klindamisin olmak üzere sefalosporin, betalaktam/betalaktamaz inhibitör kombinasyonları ve penisilin grubu antibiyotik kullanımı *C. difficile* ilişkili ishal için önde gelen risk faktörleri olarak bildirilmiştir. Ampisilin, amoksisilin, eritromisin ve diğer makrolidler, penisilinaza dirençli penisilinler, tetrasiklinler ve kotrimoksazol ile daha sık tikarsilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktam, kloramfenikol, kinolonlar, rifampisin ile daha az ABİ oluştuğu belirtilmektedir. Parenteral aminoglikozidler, metronidazol, basitrasin ve glikopeptitler ile gelişen ABİ olguları da nadir de olsa bildirilmiştir (6, 14). Ayrıca hastada *C. difficile* enfeksiyonuna immünolojik duyarlılık varlığı, enfeksiyon gelişiminde rol oynayan bir başka faktördür. Toksin A'ya karşı IgG antikor varlığının, *C. difficile* enfeksiyonunun klinik bulgularının ve relapsın ortaya çıkmasını engellediği gösterilmiştir (6). Antineoplastik ajanlardan başlıca doksorubisin, sisplatin, siklofosfomid, 5-florourasil, klorambusil, metotreksat özellikle ABİ ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca amfoterisin-B, bazı antiviraller ile ABİ olguları olabilirken hiçbir ajanla ilişki kurulamayan ABİ olguları da saptanmıştır. Bu olgularda besin ve hayvancılık sektöründe kullanılan antibiyotiklerin etkisi tartışılmaktadır. Cerrahi profilaksi kısa süreli uygulansa bile dışkıda *C. difficile* toksini saptama olasılığını belirgin olarak arttırmakta ve ABİ nedeni olabildiği belirtilmektedir (5)

Çizelge 2.1. *C. difficile*'ye bağlı ishal gelişimi için risk faktörleri (5, 35)

Bireysel Faktörler	Girişimsel ve Çevresel Faktörler
<ul style="list-style-type: none">• İleri yaş	<ul style="list-style-type: none">• Endoskopi gibi gastrointestinal işlemler
<ul style="list-style-type: none">• Altta yatan hastalık	<ul style="list-style-type: none">• Nazogastrik tüp uygulaması
<ul style="list-style-type: none">• Uzun süre antibiyotik kullanımı	<ul style="list-style-type: none">• Yoğun bakım ünitesinde izlem
<ul style="list-style-type: none">• Çoklu antibiyotik tedavisi	<ul style="list-style-type: none">• Uzun süre hastanede yatış
<ul style="list-style-type: none">• Antiülser tedavi	<ul style="list-style-type: none">• Karın içi cerrahi tedavi
<ul style="list-style-type: none">• Antineoplastik ajan kullanımı	<ul style="list-style-type: none">• Bağırsakların mekanik temizliği

2.5. Klinik

Hastalık birden bire başlar. Sarı yeşilimsi olabilen sulu dışkı ishal görülebilir. Dışkıda kan tespit edilebilir. Buna karın ağrısı eşlik edebilir ve günde 8-10 bazen 20 kez dışkılama da görülebilir. Dışkıda irin görülmez. Bağırsak mukozasında nekroz, yabancı zarlar yani psödomembranlar ve kanamalar vardır (19).

C. difficile'ye karşı konağın cevabı çok değişik olabilir. Bakteri asemptomatik taşıyıcılıktan, psödomembransız kolit, PMK ve fulminan kolit'e kadar değişen klinik tablolara neden olabilir (3). Hastaların bu mikroorganizmaya karşı gösterdikleri farklı klinik tabloların nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat bu durumun şuşlar arasındaki farklardan, konaktaki toksin reseptörlerinin farklılığından ya da kişinin bakteriye gösterdiği immün yanıt farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (36).

2.5.1. Asemptomatik taşıyıcılık

Sağlıklı yenidoğanların yarısı veya daha fazlası, erişkinlerin %1'den azı asemptomatik taşıyıcıdır. Ancak bazı durumlarda antibiyotik tedavisi görenlerde kolonizasyon oranı %25'e kadar çıkmaktadır. Hastanede enfekte olmuş hastaların büyük kısmı asemptomatik olup çevreyi kontamine ederler. Suşlar toksin ürettiği halde bazı kimselerde neden asemptomatik taşıyıcılık, bazılarında hastalık meydana geldiği henüz anlaşılabilmiş değildir (3).

2.5.2. Psödomembransız kolit

Clostridium difficile'ye bağlı ishal olgularının çoğu bu tiptir. Hastalarda hafiften orta dereceye kadar değişen bir ishal vardır (3). Günde 10'dan fazla dışkılama ve dışkı mikroskopisinde lökosit ve eritrosit varlığı mevcuttur. Bulantı, kusma, ateş, dehidratasyon, lökositöz görölmektedir (37). Sistemik bulgu yoktur. Fizik muayenede alt kadranda hafif duyarlılık olabilir. Sigmoidoskopi bulguları normaldir. Antibakteriyel ajanın kesilmesi ile ishal sıklıkla son bulur. Bazı hastalarda psödomembransız kolit şiddetli ishal, kramp tarzında karın ağrısı ve distansiyonla karakterize olabilir. Ateş, bulantı-kusma, iştahsızlık ve kırıklık gibi genel enfeksiyon belirtileri tabloya eşlik edebilir. Dışkı çok sulu, mukoid, yeşil renkli ve pis kokuludur ve hastada lökositöz olabilir. Sigmoidoskopide yaygın veya düzensiz nonspesifik kolit bulguları vardır (3).

2.5.3. Psödomembranöz kolit

İshal, karında duyarlılık ve sistemik bulgularla karakterize bu formda, bağırsaklarda 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar bulunur. Plaklar fibrin, mukus, nekrotik mukozal hücreler ve nötrofillerden ibaret eritematöz bir yapı gösterir. Lezyonlu bölgelerin yanındaki doku normal veya hafif eritemlidir. Psödomembranlar tipik olarak rektum ve sigmoid kolona lokalizedir. Ancak %10 olguda proksimal kolonda olabilir ve sigmoidoskopide saptanamaz (3). Sistemik bulgularda dışkıda eritrosit ve lökosit saptanabilir (5). Dışkı mukuslu, sulu ve pis kokuludur ve kan bulunabilir (3). Bu hastalarda dışkı miktarı fazla ise ya da ilk üç gün içinde klinik tabloda düzelme olmazsa kolonoskopik inceleme akla gelmelidir. PMK genelde altta yatan hastalığı olan, immunsupresif olgularda ve yaşlılarda görülür. Sıklıkla PMK olguları tedavinin ilk günlerinde ortaya çıkmaktadır. Şiddetli karın ağrısı, ateş, lökositöz uyarıcı olmalıdır. Dışkıda bol lökosit ve eritrosit görülür. Tanı 2-10 mm çok sayıda psödomembranların görülmesiyle konulur (5). Tedavi edilmeyen olgularda ölüm görülebilir (3).

Ayrıca PMK'in, tekrarlayan ağır sepsis ve Akut Respiratuar Distress Sendromu (ARDS)' na neden olabileceği bildirilmiştir. Bağırsak perforasyonu oluşursa peritonit belirtileri de ortaya çıkabilmektedir (38).

Psödomembranöz kolit olgularına bazen kemoterapi, lökopeni, hematolojik malignite, ileus, iskemik kolit, Chron hastalığı, şok, kardiyovasküler hastalıklar, diklofenak gibi bazı ilaçlar, ağır metal intoksikasyonu, enterohemerojik *E. coli* (EHEC), *Shigella spp.* ve sitomegalovirüs enfeksiyonlarında da saptanabileceği unutulmamalıdır (5).

2.5.4. Fulminan psödomembranöz kolit

Nadir görülen bir formdur. Hastalarda letarji, ateş, taşikardi, şiddetli karın ağrısı mevcuttur. Toksik megakolon gelişirse dışkılama sayısı azalır veya hasta hiç dışkı çıkarmaz (3). Hastanın fizik muayenesinde akut karın bulguları mevcuttur (37). Karın palpasyonunda distansiyon vardır ve aşırı duyarlıdır. Ribaund fenomeninin varlığı, kolon perforasyonunun habercisidir. Peritonit tablosu oluşabilir. Perforasyona neden olabileceğinden sigmoidoskopi ve kolonoskopiden kaçınılmalıdır (3).

2.6. Klinik Tanı

C. difficile hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedenleri arasında yer almaktadır (39). *C. difficile* enfeksiyonlarının tanısı hastanın öyküsü, klinik belirtileri, laboratuvar testleri ve gerekirse de endoskopi ile konmaktadır (40, 41). *C. difficile*'ye bağlı ishal ve psödomembranöz kolitin tanısı; klinik bulguların yanında kültürde etkenin üretilmesine ya da dışkıda *C. difficile* antijeni ile toksinlerinin saptanmasına dayanmaktadır (39, 42). Anaerob kültürde *C. difficile*'nin üretilmesi en duyarlı tanı yöntemi olmasına rağmen maliyeti yüksek olduğundan bu yöntem salgın durumlarında tercih edilmektedir (43).

Toksin saptanmasında doku kültürü altın standarttır fakat uzun sürede sonuç vermesi, uygulama güçlüğü ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle şu anda rutin

laboratuvarlarda, ticari olan hızlı immünolojik testler kullanılmaktadır (42). Bazı immünolojik testler sadece toksin A'yı saptamaya yönelikken bazıları toksin A ve B'nin birlikte gösterilmesi amacıyla üretilmiştir. Son yapılan araştırmalara göre sadece toksin A'nın saptanmasına yönelik testlerin özgüllük ve duyarlılıkları daha düşük olduğundan, toksin A ve B'nin birlikte tespit edildiği testlerin tercih edilmesi önerilmektedir (42).

Antibiyotiğe bağlı ishal ister toplumda ister hastanede gelişsin ilk olarak dışkıının mikroskopik incelemesi yapılmalıdır. Dışkıda lökosit ve eritrosit varlığı hastalığın şiddeti hakkında fikir verebilir (5). Antibiyotik kullanmış olan ve ishal gelişen hastanın dışkı yaymasında lökosit görülmesi antibiyotiğe bağlı kolit olasılığını düşündürebilir, ancak bunun *C. difficile*'ye bağlı olduğunun gösterilmesi gerekir (40, 41). Bunun yanında yoğun maya hücresi varlığı *Candida* kaynaklı ishal olasılığını akla getirebilir. Ayrıca dışkıda gram başına *C. difficile* sayısının 10^4 - 10^5 gibi sayılarda bulunmasının tanı değeri vardır (19).

C. difficile tanısına yönelik laboratuvar testleri arasında toksinlerin sitotoksin testleriyle tanımlanması, ELISA, lateks testleriyle toksin A ve B'nin saptanması, kültürde bakteriyi üretmek gibi yöntemler bulunmaktadır (44).

2.6.1. Radyolojik İncelemeler

C. difficile enfeksiyonu tanısında abdominal radyografi ve bilgisayarlı tomografi yardımcı olmaktadır. Abdominal radyogramda kolon ve çekumdaki dilatasyonları, ince bağırsaktaki hava-su seviyesini görmek mümkündür. Bunun yanında bilgisayarlı tomografide ise kolondaki kalınlaşmalar ve katlanmalar görülebilmektedir. Ancak bunlar nonspesifik bulgular olarak kabul edilmektedir (45).

Kolon grafisi ileri derecede ağır hastalarda tehlikelidir ve uygulanması önerilmez. Erken devrede diğer nedenleri saf dışı bırakmak için yapılabilir. Düz karın grafisinde ödemli kolon görülebilir, bunun yanında komplikasyonlardan toksik dilatasyon ve perforasyon ortaya çıkarılabilir (14).

2.6.2. Endoskopik inceleme

Endoskopik incelemenin amacı ödemli ve ciddi inflamasyona sahip bölgelerdeki *C. difficile*'ye özgü psödomembranların gösterilmesidir. Hastalık tablosunda özellikle distal kolon tutulduğundan olguların büyük bir kısmında (%65-70) sigmoidoskopi yeterli olmaktadır. Olguların 1/3'ünde ise lezyonlar sağ kolonda yerleştiği için bunlarda kolonoskopi gerekmektedir. Endoskopik incelemenin PMK' de duyarlılığı %51, özgüllüğü yaklaşık %100 olduğu bildirilmektedir (37).

C. difficile enfeksiyon tanısı için gastrointestinal sistem endoskopisi pahalı, alet gerektiren, invaziv olması, duyarlılığının düşük olması, hasta için risk taşıması gibi nedenlerden dolayı daha çok özel durumlarda tercih edilmelidir (8, 45).

C. difficile ilişkili ishallerde endoskopi yapılmasını gerektiren durumlar şunlardır:

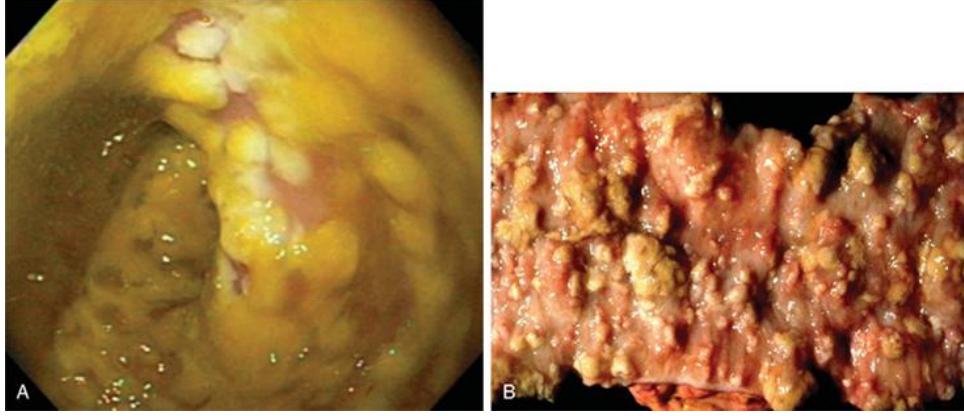
- 1) Hızlı tanı testlerine ihtiyaç duyuluyor ve mikrobiyolojik test sonuçları gecikecekse,
- 2) Hasta ileuslu ve dışkı örneği alınamıyorsa,
- 3) Endoskopik tanıyı gerektiren başka bir hastalık düşünülüyorsa (37, 45).

2.6.2.1. Patolojik Değişiklikler

Antibiyotikle ilişkili ishali olan hastalarda yapılan endoskopi muayenelerinde, normal mukozanın yanısıra, kızarıklık, ödem ve buna benzer birçok inflamasyon ya da en spesifik özellik olan psödomembranlı lezyonlar gözlenmektedir. PMK'te ise kabarıklık, sarımsı-beyaz renkte, büyüklükleri 5-10 mm arasında değişen plaklar saptanmaktadır. Yeni oluşan lezyonların üzeri beneklidir fakat bu hastalıkta şöyle bir durum vardır, psödomembranlar bir araya gelerek su toplamış bir görünüm oluştururlar ve geniş bir alana yayılırlar (1).

Histolojik çalışmalara göre tipik psödomembranların doğuşu, lamina propria oluşan kronik iltihaplı değişikliklerle oluşan yüzeysel ülserasyonlardır (Şekil 2.2.). Psödomembranın yapısını mürin, fibrin, inflamator hücreler ve ortama dökülmüş mukoza epitel hücreleri oluşturur. Psödomembran oluşumunda bağırsak mukozasında

invazyon yapmış olan bir bakteri ya da tipik olarak ortamda bulunan bir mikroorganizmayı sorumlu tutacak herhangi bir kanıt yoktur (1).



Şekil 2.2. Bağırsak mukozasında psödomembranların görünümü (46)

2.6.3. *Clostridium difficile*' nin Laboratuvar Tanısı

C. difficile ilişkili ishalin laboratuvar tanısı dışkı örneğinden kültür ile patojenin izolasyonu ve toksinin ya hücre kültüründe dışkı filtratının sitopatik etkisi ile ya da EIA ile doğrudan gösterilmesidir (47). Günümüzde *C. difficile* ilişkili ishalin tanısında birkaç metot bulunmaktadır. Bunlar Toksin A ve toksin A/B EIA, Glutamat dehidrogenaz (GDH) EIA ve immunokromotografik testler ile toksin A/B veya GDH tespiti ve doku kültür nötralizasyonu, toksijenik kültür ve toksin genlerinin PCR ile gösterilmesidir (48).

2.6.3.1. Kültür

Dışkı, içinde çeşitli antibakteriyel ajanlar ve at kanı bulunan Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) besiyerine ekilmelidir. CCFA besiyeri içine %0,1 sodyum taurokolat eklenmesi *C. difficile* izolasyonunu arttırır (3, 37). Cefoxitin

mannitol agar (kanlı/kansız) bu bakterinin izolasyonunda kullanılabilir başka bir selektif besiyeridir (37).

Ekim yapıldıktan sonra plaklar anaerob şartlarda 35-37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra 5-8 mm çaplı, kenarları düzgün veya düzensiz, hafif kabarık, yuvarlak, gri renkte, opak, buzlu cam görüntüsü veren ve 24-48 saatte nonhemolitik koloniler oluşmaktadır (3, 37, 45). Fakat bazı suşlar alfa-hemoliz yapabilmektedir. 48-72 saat geçtikten sonra bakterinin sporülasyonuna bağlı olarak merkezi beyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler oluşabilir (45). *C. difficile* kolonileri uzun dalga ultraviyole ışığı altında (366 nm dalga boyunda) incelendiğinde, sarı-yeşil floresans verirler (3, 45). Kolonilerin kendine has bir kokusu vardır (3). P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asitlerden dolayı tipik at veya fil dışkısı kokusu hissedilmektedir (45).

Kültür duyarlı bir yöntemdir fakat *C. difficile* kökenlerinin yaklaşık %25 kadarının toksin yapmamasından dolayı toksinojenik ve nontoksinojenik suşları birbirinden ayırt edememesi, kompleks oluşu gibi nedenlerle genellikle merkezi laboratuvarlarda uygulanmaktadır ve daha çok salgın zamanlarında epidemiyolojik açıdan önem kazanmaktadır (37, 45).

2.6.3.2. Toksin Aramaya Yönelik Testler

C. difficile enfeksiyonunun tanısı, klinik semptomları ile uyumlu hastaların dışkı örneklerinde enterotoksin ve sitotoksinin gösterilmesi ile doğrulanmaktadır. Bu amaçla doku kültürü, lateks aglütinasyon testleri, Enzim Linked İmmunoassay (ELISA) ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (10).

2.6.3.2.1. Doku Kültürü

Toksin A ve toksin B'yi kodlayan genlerdeki ortaklık nedeniyle bakteri her iki toksini birlikte sentezlemektedir. Her ne kadar antibiyotiğe bağlı ishalin oluşmasında toksin A'nın rolü daha önemliyse de günümüzde sitotoksin özellikteki toksin B'nin saptanması özgüllük açısından altın standart olarak kabul edilmektedir (3).

Dışkıda toksin A ve toksin B varlığının araştırılması için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilebilmesidir (49). Bu amaçla embriyonik akciğer fibroblast (MRC 5, WI-38) hücreleri, CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri, insan amniyon (FL) hücreleri, Hep2 (human epithelial) hücreleri, HeLa, Afrika yeşil maymun böbreği (Vero), intestinal fibroblast hücreleri gibi birçok hücre kullanılabilmektedir (45, 49).

Doku kültürüne homojen dışkı karışımının eklenmesiyle 10 pg'lık sitotoksin saptanarak sitopatik etkisi toksin A'ya göre daha fazla olan toksin B araştırılabilir (45, 49). Bunlardan her iki toksine de duyarlı olması açısından en çok Vero tercih edilmektedir (49).

Bu yöntemde sıvı dışkı örnekleri santrifüj edilir ve elde edilen süpernatant kısmı filtreden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen dışkı örneğinden bir miktar hücre kültürü kaplarına ilave edilir. Daha sonra bu kültürler 37°C'de 24-48 saat anaerobik kavanozlarda inkübe edilir ve inkübasyon sonrasında hücrelerde sitopatik etki (yuvarlaklaşma) olup olmadığı araştırılır (30, 45).

Fakat doku kültürü ile *C. difficile* toksin araştırmanın dezavantajları zaman alıcı olması, uzun sürede (2-3 gün) sonuç alınması, pahalı olması, standardizasyonun sağlanamamış olması, doku kültürü laboratuvarına gereksinim duyulması ve doğrulama için referans laboratuvarlarına gereksinimi olmasıdır. Altın standart yöntem olmasına rağmen tüm bu olumsuzluklardan dolayı çok fazla tercih edilmemektedir (45, 49).

2.6.3.2.2. Lateks Aglutinasyon Testleri

Toksin A ve Toksin B araştıran ticari, hızlı lateks aglutinasyon testleri bulunmaktadır. Ancak rutin kullanımda maliyeti yüksektir ve nontoksijenik antijenleri de saptayabildiği için yanlış pozitif sonuçlar alınmaktadır (9, 10).

Günümüzde alternatif bir tanı metodu olarak *C. difficile*'nin toksijenik ve toksijenik olmayan suşlarında bulunan yüzey proteini glutamat dehidrogenazın (GDH) gösterilmesini içeren testler geliştirilmiştir (50, 51). Yapılan bir çalışmada bu test sitotoksinite ile karşılaştırıldığında duyarlılığı yüksek, özgüllüğü düşük ve pozitif prediktif değeri zayıf bulunmuştur. GDH *C. difficile*'nin dışkı örneğinde varlığını

gösterir ancak toksin varlığı gösterilmedikçe hastalık etkeni olup olmadığı bilinemez. Bu testin ikili algoritmada negatif prediktif değeri (NPV) yüksek olduğu için ilk tarama testi olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir. Bu testin pozitif olması *C. difficile* ile kolonizasyon olduğunu gösterir. Genel olarak kabul edilen ikinci aşama testler EIA toksin testleri, hücre kültürü ile sitotoksitenin gösterilmesi ve toksin ve laktoferrin aranmasıdır (51).

2.6.3.2.3 Enzim Linked İmmunoassay (ELISA)

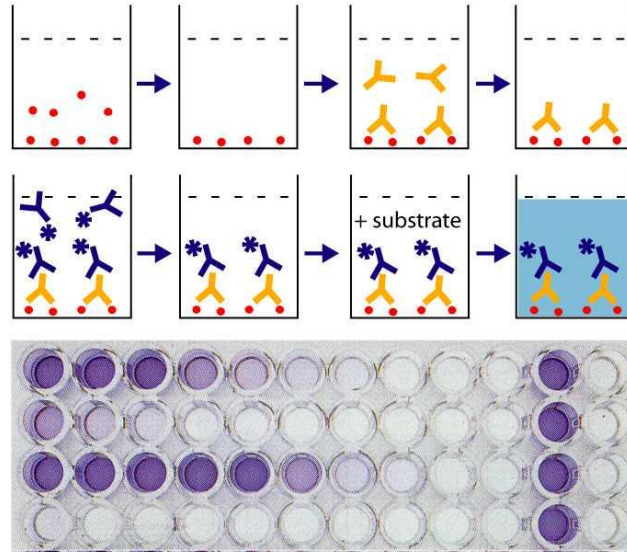
Sitotoksinlerin saptanmasında doku kültürlerinin dezavantajlarının olmasından dolayı başka testlere ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla daha hızlı, daha ekonomik ve özgüllüğü yüksek olan ELISA testleri tercih edilmektedir (45).

Dışkıdan *C. difficile* toksin araştıran ticari enzim immunoassay kitleri bulunmaktadır. Bunlar Remel, Meridian, TechLab ve VIDAS kitleridir ve bu kitlerle yapılan çeşitli çalışmalarda değişik duyarlılık ve özgüllükte oldukları tespit edilmiştir. Bu ELISA testlerinin çeşitli çalışmalardaki özgüllük ve duyarlılıklarının ortalaması; Meridian premier %95 ve %97, TechLab Tox A/B %83 ve %99, Remel Xpect %82 ve %96 VIDAS ile %76 ve %93 olarak bildirilmektedir (52).

ELISA testinde; spesifik (özgül) antikoruna hasta serumundaki diğer antikorlardan ayırmak ve yakalamak için bir plastik yüzey, boncuk veya filtre üzerinde tespit edilmiş bir antijen kullanılır. Enzime kovalent bağlı (örnek: horseradish peroksidaz, alkalin fosfataz, β -galaktosidaz) bir anti-human antikor ardında bağlanmış hasta antikorunu tespit eder. Uygun substratın enzim konversiyonuna cevap olarak üretilen ışık yoğunluğuna göre spektrofotometrik olarak ölçüm yapılır (Şekil 2.3.). O andaki spesifik antikor konsantrasyonu standart insan antikor solüsyonlarının reaktivitesinin karşılaştırılması ile değerlendirilebilir. ELISA yöntemleri ayrıca hasta örneklerindeki çözülebilen antijenlerin ölçümü için de kullanılabilir. Bu yöntemlerde çözülebilen antijen tespit edilmiş antikor tarafından yakalanır ve konsantre edilir, ardından enzimle işaretli başka bir antikorla tespit edilir. Daha sonra yine spektrofotometrik olarak ölçüm yapılır (53).

Fakat ELISA ile 100-1000 pg toksin A veya B tespit edilebildiği için %10-20 oranında bir yalancı negatiflik söz konusu olabilir (45). *C. difficile* toksin saptanmasında ELISA kullanılmasının avantajı sonuçları elde etmek için geçen sürenin yaklaşık 2- 2,5 saat olmasıdır. Dezavantajı ise maliyeti yüksektir ve bazı ELISA kitleri toksijenik ve non-toksijenik ayrımını tam olarak yapmamaktadır. Doku kültürüyle kıyaslandığında çoğu ELISA testleri % 80'den fazla duyarlılığa sahiptir (9).

Dışkıdan *C. difficile* toksin saptanmasında VIDAS *C. difficile* Toxin A&B kiti de kullanılmaktadır. Bu kit ile Enzyme –Linked Fluorescent Assay tekniği ile VIDAS cihazında çalışılmakta yaklaşık 75 dakikada sonuç alınmaktadır. Testin prensibi iki adım enzim immunoassay sandviç yöntemini ve floresan okuma içermektedir. Bu kit sitotoksin testi ile karşılaştırıldığı çalışmada duyarlık %89,8, özgüllük %96,7 olarak bulunmuştur (51).



Şekil 2.3. ELISA yönteminin prensibi (54)

2.6.3.2.4. Moleküler Yöntemler

Tanıma moleküler yöntemler de kullanılabilir. Bu amaçla DNA problemleri geliştirilmiştir. Toksikjenik gene yöneltilmiş primerlerle yapılan değişik Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli uygulamalar ile duyarlı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (37).

Bu yöntem bir enzim (polimeraz) aracılığıyla amplifikasyon sonucunda hasta örneklerindeki az miktardaki *C. difficile* DNA'sının saptanabilir hale getirilmesi esasına dayanmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu, toksin A veya B genlerini saptamada oldukça umut vaatetmektedir. Toksin A ve B genlerinin “nonrepeating” ve toksin B geninin “repeating” bölgelerine uygun çift primer seti kullanıldığında toksin A+/B+, toksin A/B+ ve toksin A/B suşlar birbirinden ayrılabilir. Maliyeti ve kompleks oluşu gibi nedenlerden dolayı rutin kullanımda çok tercih edilmemektedir (45). En önemli avantajı tanı için hızlı bir yöntem olmasıdır. En büyük dezavantajı ise uygun altyapı ve teknik deneyime ihtiyacın olmasıdır. Ayrıca bazen dışkıdaki inhibitör maddelerden dolayı çalışmada sorunlarla karşılaşılabilir (9).

2.7. Tedavi

C. difficile'ye bağlı ishal ve PMK tedavisinde ilk adım, mümkünse antibiyotik tedavisinin kesilmesi veya antibiyotik devamı kesinlikle gerekli ise düşük riskli antibiyotiklerle değiştirilmesi, hastanın dehidrate kalmasını önleyecek şekilde sıvı elektrolit replasmanıdır. Bu durumda antiperistaltik tedavi, toksin birikimi ile mukoza harabiyetini artırabileceğinden kullanılmamalıdır (3, 6).

C. difficile kommensal bir bakteri olduğundan büyük bir konak savunması ile karşılaşmaz. Normal flora dengesini yeniden sağlama ve devam ettirme ile iyi bir konak savunması sağlamak, eğer mümkünse sürekli akım halinde antibiyotik tedavisi yapılmalıdır (55).

Hafif olgularda çoğu zaman sıvı ve elektrolit replasmanı yeterli olurken, ağır olgular tedavi gerektirebilmektedir. Antibiyotik tedavisinde ilk seçilecek ilaç metronidazol'dür (oral, 4x250 mg/gün). Metronidazol tedavisine cevap vermeyen veya ilacı tolere edemeyen hastalarda, vankomisine (oral, 4x250 mg/gün) geçilmelidir (3). *C. difficile*'ye bağlı ishal vakalarında metronidazol veya vankomisin ile tedavi için endikasyonlar; *C. difficile* toksin testinin pozitif sonuçlandığı, kolit kliniğinin olduğu, ateş, lökositoz ve endoskopide karakteristik bulguların saptandığı, ciddi ishalin görüldüğü ve sebep olan ajanın kesilmesine rağmen ishalin devam ettiği veya esas

enfeksiyonun tedavisi için antibiyotik tedavisinin devam etmesinin gerekli olduğu vakalardır (6).

C. difficile'ye bağlı ishal kliniği çoğu durumda vankomisin veya metronidazole yanıt vermektedir, fakat tedaviye uyumdaki sıkıntılar, alternatif tanı, ileus veya toksik megakolon gelişmesi durumunda ilacın hedef alana ulaşmasında sorun olabileceğinden yetersiz tedavi cevabı gözlenebilir. İleus gelişen hastalar için antibiyotiğin kolon lümenine transportu oral vankomisinin daha yüksek dozları (günde 4 kere 500 mg) veya vankomisin ya da metronidazolün oral veya anal yolla uygulanması ile artırılabilir. Tedaviye cevapsız bazı ciddi vakalarda nadiren kolektomiye gidilebilir (6).

İdeal olarak *C. difficile* kolon lümenine sınırlı olduğundan, antibiyotik tedavisi oral olarak verilmelidir. Eğer intravenöz tedavi gerekli ise kolonda ilacın ulaşılan konsantrasyonları nedeni ile sadece metronidazol verilmesi etkin bulunmuştur. Tedaviden beklenen cevap, ateşin bir gün içerisinde, ishalin dört-beş günde düzelmesidir. Metronidazol gerek maliyetinin düşük olması, gerekse vankomisin kullanımının hastane kaynaklı vakalarda enterokoklarda vankomisin direncini potansiyel olarak indüklemeye riski nedeni ile ön planda tercih edilen tedavidir (6).

Semptomatik iyileşme 72 saat içinde görülmeye başlar. İshal ve enterokolit tablosu 10. günden sonra olguların %95'inde tamamen ortadan kalkar (3).

2.7.1. Relaps

Tedavinin tamamlanmasından sonra, hastaların %20-30 kadarında relapslar meydana gelebilmektedir, çünkü antibiyotikler *C. difficile*'nin sadece vejetatif formlarını öldürmektedir, sporlar ise antibiyotiklere dirençlidir. Aynı antibiyotik ile ikinci kez tedavi sıklıkla başarılıdır, ancak birden fazla relapslar bazı hastalarda bildirilmiştir. Organizma hastanelerde, özellikle enfekte hastalara yakın alanlarda (örn; yataklar, banyolar vb.) oldukça yaygın bulunduğu için hastalığı engellemek oldukça zordur. Bu sebeple organizma çevreyi aylarca kontamine edebilmekte ve nozokomiyal *C. difficile* salgınlarının başlıca kaynağı olabilmektedir (10).

Çalışmalar ve meta analizler özellikle son yıllarda klasik antibiyotik tedavilerinin yeterince etkin olmadığını ortaya koymaktadır. İlk öneri olarak sunulan

oral metronidazol kullanımı ile yeterli sonuç alınmadığı belirtilmekte ve yeni alternatif yaklaşımlar aranması gündeme getirilmektedir. Oral teikoplanin bu konuda etkili görülmektedir fakat glikopeptid direnci yönünden dikkatli olunması gereken bir antibiyotik olduğu unutulmamalıdır (5).

Tekrarlayan enfeksiyonlarda öneri ayakta uygulanan ilk tedavi kürünün yinelenmesidir. Bu olgularda anyon bağlayıcı reçineler (kolestiramin, kolestipol), probiyotikler (*Saccharomyces boulardii*, laktobasiller), intravenöz immunglobulin uygulaması ya da sağlıklı donör dışkı florasından oluşan karışımların nazogastrik yolla kullanımı başarılı sonuçlar verebilmektedir (5).

2.8. Korunma

C. difficile hastane ortamında sorun yaratacak önemli bir ishal etkenidir. *C. difficile*'ye bağlı ishalin gelişiminin önlenmesi amacı ile bağırsak florasının bozulmasına sebep olan antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması, yatan bir hastada *C. difficile* vakası saptandığı zaman çapraz enfeksiyonu önlemek amacı ile enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumun artırılması gereklidir (6).

Hastanelerde *C. difficile* kaynaklı ishal olgularında yayılma, temas izolasyonu önerileri, uygun çevre temizliği ve el yıkamaya uyum ile önlenebilmektedir. Hastanede klindamisin, üçüncü kuşak sefalosporinlerin kısıtlanması ve piperasilin-tazobaktam değişimi *C. difficile* ishallerini ve PMK olgularını önlemede etkili bulunmuştur. Antibiyotik tedavisi ile birlikte probiyotik uygulamasının (özellikle *S. boulardii*) ABİ oluşumunu önlediği birçok çalışma ve meta analizlerde gösterilmiş olmasına rağmen rutin kullanım için yeni çalışmalara gereksinim olduğu bildirilmektedir. Özellikle riskli, immunsupresif, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *S. boulardii* kullanımı sonrası fungemiler gelişebilme riski olduğu hatırlanmalıdır (5).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Bağırsak florasının incelenmesi ve *C. difficile* Toksin A ve Toksin B varlığının araştırılması amacıyla Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Eylül 2010 - Ekim 2011 tarihleri arasında çeşitli kliniklerde yatan ve ishal gelişen hastalardan gönderilen 158 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi.

Çalışma için demografik bilgileri içeren bir form hazırlandı. Hastanın yattığı klinik ve yatış süresi, kullandığı antibiyotikler ve süresi, antibiyotik kullanımının kaçınıcı gününde ishal geliştiği, ishal sıklığı, hematolojik malignite, nazogastrik tüp uygulaması, antiülser tedavisi alıp almadığı gibi bilgiler kaydedildi.

Bu tez çalışmasına, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 08/12/2011 tarihli ve 2011/76 sayılı kararı ile 'Etik Kurul Onayı' aldıktan sonra başlanmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Bakteri identifikasyon cihazı (VITEK, BioMérieux, USA)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert UE 600)
- Otoklav (Hirayama HA-300 M4)
- Hassas Terazî (Sartorius BL 310)
- Buzdolabı (Indesit)
- -80°C derin dondurucu (Heto Ultrafreeze)
- Pasteur fırını (Memmert UE 500)
- Vortex (NM- 110)

- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P 10-P100-F1000)
- Mikroskop (Olympus CX21)
- Enzyme-Linked Fluorescent Assay cihazı (VIDAS, BioMérieux, Fransa)

3.2.2. Kullanılan Besiyerleri

- Kanlı Agar besiyeri (BioMérieux, Fransa)
- Eosin Methylene Blue Agar besiyeri (BioMérieux, Fransa)
- Sabouraud Dextrose Agar besiyeri (Himedia, Hindistan)
- *Salmonella – Shigella* Agar besiyeri (Oxoid, İngiltere)
- Selenite F sıvı besiyeri (Oxoid, İngiltere)
- Kligler Iron Agar (BioMérieux, Fransa)
- Lysine Iron Agar (Himedia, Hindistan)
- Simmons Citrate Agar (Merck, Almanya)
- SIM Medium (Motility -Indole) Agar (Himedia, Hindistan)
- Üre Agar (Merck, Almanya)
- DNase besiyeri (Merck, Almanya)

3.2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Testler

- *C.difficile* Toxin A/B kiti (VIDAS, BioMérieux, Fransa)
- Lugol solüsyonu
- Kovaks ayırıcı
- Katalaz ayırıcı
- Oksidaz ayırıcı

3.3. Örneklerin Alınması ve Ekimi

Hastalardan tek kullanımlık temiz kaplar içerisine alınıp gönderilen taze dışkı örnekleri önce makroskopik daha sonra mikroskopik olarak incelendi. Makroskopik incelemede dışkıların kıvamına, kan ve mukus olup olmadığına bakıldı. Şekli dışkıları çalışmaya dahil edilmedi. Mikroskopik incelemede ise eritrosit, lökosit varlığı ve protozoon kist ve trofozoitleri araştırıldı.

Daha sonra dışkı örneklerinin bakteriyolojik kültürleri yapıldı. Dışkı örnekleri kanlı agar, Eosin Methylen Blue (EMB) agar, Salmonella-Shigella (SS) agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerlerine ekildi. Bir miktar dışkı örneği steril 2 ml'lik iki adet ependorf tüpe alınarak *C. difficile* Toksin A/B araştırılması yapılmaya kadar -80°C'de saklandı.

3.3.1. Mikroskopik inceleme

Bir miktar dışkı örneği bir damla serum fizyolojik ve bir damla lugolle muamele edilerek preparat hazırlandı. Mikroskopta lökosit, eritrosit, protozoon kist ve trofozoitlerinin bulunup bulunmadığı incelendi.

3.3.2. Bakteriyolojik Kültür

Gastroenterit etkeni olan *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* ve florada bulunan diğer aerobik bakterilerin ve mantarların değerlendirilmesi için örneklerin kanlı agar, EMB agar, SS agar, Selenit F sıvı besiyeri ve Sabouraud Dextrose agar besiyerlerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri etüvde 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kültürde üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojisi değerlendirilerek kolonilerden Gram boyama yapıldı ve mikroskopta incelendi. Gram pozitif bakterilerin identifikasyonunda katalaz, koagülaz ve eskülin hidrolizi testleri, Gram negatif enterik bakterilerin identifikasyonunda ise klasik biyokimyasal yöntemler kullanıldı. Bu amaçla üreyen kolonilerden kligler iron agar, lizin iron agar, sitrat, indol, üre ve hareket

besiyerlerine ekim yapılarak biyokimyasal özellikleri belirlenerek tanımlaması yapıldı. Gerektiğinde ise otomatize bakteri identifikasyon sistemi (VITEK, BioMérieux) kullanıldı. Glukoz pozitif, laktoz negatif, hareketsiz, lizin dekarboksilaz, sitrat ve üreaz negatif, H₂S ve gaz oluşturmeyan kolonilerin *Shigella* türleri olabileceği, glukoz pozitif, laktoz negatif, hareketli, lizin dekarboksilaz ve sitrat pozitif, H₂S ve gaz oluşturan kolonilerin *Salmonella* türleri olabileceği düşünüldü (56). Bu *Salmonella* ve *Shigella* düşünülen kolonilerden VITEK Gram negatif identifikasyon kartları ile tam otomatik bakteri identifikasyon cihazında (VITEK, BioMérieux) identifikasyon doğrulandı. Maya kolonilerinin germ tüp testi ile *Candida albicans* ve non-*albicans* ayrımı yapıldı.

3.4. *Clostridium difficile* Toksin A/B aranması

Dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A/B varlığının araştırılması için 1000335200 lot numaralı VIDAS *C. difficile* Toksin A/B kiti kullanılarak (bioMérieux, Fransa) Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemi ile VIDAS cihazında (BioMérieux, Fransa) firmanın önerdiği prosedüre göre çalışıldı.

3.4.1. Test çalışma prensibi

ELFA testinin prensibi; iki adım enzim immünoassay sandviç yöntemi ve bir floresan okuma şeklindedir.

3.4.1.1. Kit İçeriği

Çizelge 3.1.: *C.difficile* Toksin A/B kitinin içeriği

CDAB Stripleri	STR	Kullanıma hazır
CDAB katı faz	SPR	Kullanıma hazır. <i>C. difficile</i> tavşan poliklonal anti-toksin A ve fare monoklonal anti-toksin B antikorları ile kaplanmış.
1 Standart	S1	TRIS tamponlu salin içerisinde rekombinant <i>C. difficile</i> toksin A dilüsyonu 0.05 mol/l (pH 7.2)+BSA%5+koruyucular
1 Pozitif Kontrol Toksin A	C1	TRIS tamponlu salin içerisinde rekombinant <i>C. difficile</i> toksin A dilüsyonu 0.05 mol/l (pH 7.2)+BSA%5+koruyucular Test değer aralığı MLE kart'ta 'Control C1 (+) Test Value Range' ibaresini takiben belirtilmiştir.
1 Negatif Kontrol	C2	TRIS tamponlu salin 0.05 mol/l (pH 7.2)+BSA%5+koruyucular Test değer aralığı MLE kart'ta 'Control C2 (-) Test Value Range' ibaresini takiben belirtilmiştir.
1 Pozitif Kontrol Toksin B	C3	TRIS tamponlu salin içerisinde rekombinant <i>C. difficile</i> toksin B dilüsyonu 0.05 mol/l (pH 7.2)+BSA%5+koruyucular Test değer aralığı MLE kart'ta 'Control C3 (+) Test Value Range' ibaresini takiben belirtilmiştir.
1 Numune Dilüenti	R1	Kullanıma hazır. TRIS tamponlu salin 0.05 mol/l (pH 7.2) + Buzağı serumu %50+ deterjan+ koruyucular
1 MLE kart		Testi kalibre etmek için gerekli fabrika ana kalibrasyon bilgilerini içeren spesifikasyon kartı.

3.4.1.2. CDAB sribin içeriği

Çizelge 3.2.: *C.difficile* Toksin A/B kit striplerinin içeriği

Kuyu	Reaktifler
1	Numune kuyusu
2-3-4	Yıkama Solüsyonu: TRIS tamponlu salin 0.05 mol/l (pH 7.2)+deterjan+koruyucular (600 µl)
5	Konjugat: Dilüe biotin ile konjuge fare monoklonal anti- <i>C. difficile</i> toksin A antikor ve biotin ile konjuge fare monoklonal anti- <i>C. difficile</i> toksin B antikor+koruyucular (400 µl)
6	İzleyici: Alkalın Fosfataz işaretli streptavidin+TRIS tamponlu salin 0.05 mol/l (pH 6.0) +koruyucular (400 µl)
7-8-9	Yıkama Solüsyonu: TRIS tamponlu salin 0.05 mol/l (pH 7.2) +deterjan+koruyucular (600 µl)
10	Okuma küveti: 4-Metil-umbelliferil fosfat (0.6 mmol/l)+dietanolamin(0.62 mol/l ya da %6.6) pH 9.2+1g/l sodyum azid (300 µl)

3.4.1.3. Testin Kalibrasyonu:

Kalibrasyon, kitin içindeki standart kullanılarak, her yeni reaktif lotu açıldığında, ana lot bilgisi (MLE kart) girildikten sonra yapılmaktadır. Bu kalibrasyon 14 gün geçerlidir.

3.4.2. Testin Çalışması

Çalışma öncesi dışkı örnekleri otomatik pipet ile karıştırılarak homojenize edildi ve santrifüj tüpüne 200 µl iyi karışmış sıvı dışkı konuldu. Daha sonra otomatik pipet yardımıyla test kiti içinde bulunan numune dilüentinden (R1) 1000 µl tüpteki dışkı üzerine ilave edildi. Karışım homojen gözüken kadar vorteks yardımı ile karıştırıldı ve 5 dakika 9000 rpm' de santrifüj edildi.

Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin süpernatant kısmından kit striplerinin örnek kuyucuğuna 300 µl eklendi, stripler cihaza yerleştirildi ve testin çalışması başlatıldı. Testin tüm adımları cihaz tarafından otomatik olarak yapılmakta ve test yaklaşık olarak 75 dakika içerisinde tamamlanmaktadır.

3.4.3. Sonuçlar ve değerlendirme

Test edilen her numune için cihaz tarafından floresan okuma yapılarak Relative Fluorescence Value (RFV) değeri belirlendi.

Her numune için test değeri VIDAS cihazı tarafından aşağıdaki şekilde hesaplandı.

Test değeri= Hasta RFV/standart RFV

Test değerine göre değerlendirme aşağıdaki şekildedir;

Çizelge 3.3.: *C.difficile* Toksin A/B test değerleri

Test Değeri	Sonuç
< 0.13	Negatif
≥ 0.13 ila < 0.37	Ara Değer
≥ 0.37	Pozitif

3.5. İstatistiksel analiz

Kategorik veriler sayı ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. Çapraz tablo analizlerinde ki kare testi kullanılmış, anlamlı farklılık bulunan tablolarda ikili oran karşılaştırmaları yapılmıştır. Normal dağılıma uygun dağılım göstermeyen sürekli değişkenler medyan [çeyreklikler] şeklinde özetlenmiş ve grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testinden yararlanılmıştır. Risk faktörlerinin belirlenmesi amacıyla geriye dönük bir çalışma olduğu için risk katsayısı olarak odds oranı hesaplanmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Analizler MedCalc v. 12.2.1. ve SPSS 11.5. paket programlarında yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 158 hastanın 86 (%54,4)'sı erkek, 72 (%45,6)'si kadındı (Çizelge 4.1.). Bunların 84'ü 0-18 yaş grubu, 54'ü 19-64 yaş grubu ve 20'si 65 ve üzeri yaş grubunda idi

Çalışmamızda, *C. difficile* toksin A/B yönünden incelenen 158 dışkı örneğinin 18 (%11,4)'inde toksin A/B pozitif, 140 (%88,6)'ında negatif olarak tespit edildi (Çizelge 4.2.). Bunların yaş gruplarına göre dağılımında (Çizelge 4.3.); 16 (%88,8) toksin pozitif hastanın çocuk yaş grubunda, 2 (%11,2) hastanın yetişkin yaş grubunda olduğu tespit edildi. *C. difficile* toksin pozitif olanların yaşlarına göre dağılımı; 2'si 0-6 aylık, 7'si 6-12 ay, 1'i 5 yaş ve 6'sı 10-13 yaş arasında, yetişkin iki hasta ise 33 ve 56 yaşlarında idi. Yaş grupları arasında farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak için gruplar ikiye ayrılarak karşılaştırıldığında 0-18 yaş grubu ile 19-64 yaş grubu arasında *C. difficile* toksin pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,008$). 0-18 yaş grubunda olanlarda pozitiflik sayısı fazla olduğundan bir risk faktörü olabileceği düşünülmüş ve odds oranı hesaplanmıştır (OR=8,47 (1,87-38,22) $p=0,005$). 0-18 yaş arasında olanlar olmayanlara göre 8,47 kat daha fazla *C.difficile* toksin A/B'nin pozitif olması riski altındadır.

Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyete göre dağılımları

CİNSİYET	n	%
Erkek	86	54,4
Kadın	72	45,6
Toplam	158	100,0

Çizelge 4.2.: Hastaların *C. difficile* toksin A/B sonuçları

Toksin A/B	n	%
Negatif	140	88,6
Pozitif	18	11,4
Toplam	158	100,0

Çizelge 4.3.: *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş grupları	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
	n (%)	n (%)
0-18	16 (%88,9)	68 (%48,6)
19-64	2 (%11,1)	52 (%37,1)
≥65	0 (%0,0)	20 (%14,3)

İshal gelişen hastaların kliniklere göre dağılımını incelendiğinde; Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Enfeksiyon, Çocuk Hematoloji, Gastroenteroloji, Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yoğunlaştıkları, bunu Çocuk Onkoloji, Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi (ÇYBÜ), Çocuk Cerrahi, Enfeksiyon, Göğüs Hastalıkları, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Nefroloji kliniklerinin izlediği, en az örnek gelen kliniklerin ise Anesteziyoloji ve Reanimasyon, Çocuk Gastroenteroloji, Çocuk Kardiyoloji, Çocuk Nefroloji, Çocuk Nöroloji, Endokrinoloji, Genel Cerrahi, Göğüs Cerrahisi, Kardiyovasküler Cerrahi, Nöroloji, Romatoloji ve İmmünoloji, Psikiyatri ve Üroloji olduğu saptandı.

C. difficile toksin A/B pozitif ve negatif hastaların yattıkları kliniklere göre dağılımı Çizelge 4.4.'de verilmiştir. *C. difficile* toksin A/B pozitif hastaların çocuk hastalıkları kliniğinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Dışkı örneklerinin makroskobik incelemesinde; 18 pozitif örneğin 5'inin mukuslu olduğu, negatif olan 140 dışkının ise 40'nın mukuslu, 4'ünün kanlı ve 1'inin kanlı–mukuslu olduğu tespit edildi.

Dışkı örneklerinin mikroskobik incelemesinde; 18 pozitif örneğin 2'sinde eritrosit, 5'inde lökosit, birinde eritrosit ve lökosit, birinde *Entamoeba histolytica*, birinde maya hücresi görüldü. Toksin negatif olan 140 dışkının mikroskobik incelemesinde ise, 14'ünde eritrosit, 32'sinde lökosit, 20 örnekte hem eritrosit hem lökosit, 6'sında *E. histolytica* kist ve trofozoitleri, 1 tanesinde ise *Giardia intestinalis* kistleri ve 9'unda maya hücreleri görüldü.

Çizelge 4.4.: *C. difficile* toksin A/B pozitif ve negatif hastaların yattıkları kliniklere göre dağılımları

Klinikler	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
	n (%)	n (%)
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü		
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	6 (33,5)	23 (16,5)
Çocuk Enfeksiyon	3 (16,8)	17 (12,1)
Çocuk Hematoloji	2 (11,2)	10 (7,1)
Çocuk Onkoloji	1 (5,5)	4 (3)
Çocuk Gastroenteroloji	1 (5,5)	1 (0,7)
Çocuk Kardiyoloji	-	1 (0,7)
Çocuk Nefroloji	-	3 (2,1)
Çocuk Nöroloji	1 (5,5)	-
ÇYBÜ	1 (5,5)	5 (3,5)
Çocuk Cerrahisi	1 (5,5)	3 (2,1)
Dahili Bilimler		
Gastroenteroloji	1 (5,5)	11 (7,8)
Hematoloji	-	17 (12,1)
Onkoloji	-	16 (11,4)
Nefroloji	-	6 (4,2)
Endokrinoloji	-	1 (0,7)
Romatoloji ve İmmünoloji	-	2 (1,4)
Nöroloji	-	2 (1,4)
Enfeksiyon	-	4 (3)
Göğüs Hastalıkları	-	4 (3)
Psikiyatri	-	1 (0,7)
Cerrahi Bilimler		
Kadın Hastalıkları ve Doğum	-	4 (3)
Anesteziyoloji ve Reanimasyon	1 (5,5)	-
Genel Cerrahi	-	2 (1,4)
Göğüs Cerrahisi	-	1 (0,7)
Kardiyovasküler Cerrahi	-	1 (0,7)
Üroloji	-	1 (0,7)
Toplam	18 (100)	140 (100)

Yapılan dışkı kültürlerinde *C. difficile* toksin A/B negatif 128 (%91,4) hastada normal bağırsak flora bakterileri (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.* vb.), 9 (%6,4) hastada *Candida spp.* (6 hastada *C. albicans*, 3 hastada non-*albicans* üredi), 2 (%1,5) hastada *Salmonella spp.*, 1 (%0,7) hastada ise *Shigella spp.* ürediği görüldü. Toksin A/B pozitif hastaların sadece 1 (%5,5) tanesinde *C. albicans* ürerken, 17 (%94,5) hastada normal flora bakterileri üredi (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Çalışmadaki hastaların kültürlerinde izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Kültür Sonucu	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
	n (%)	n (%)
Normal flora bakterileri	17 (94,5)	128 (91,4)
<i>Candida spp</i> (7 <i>C.albicans</i> , 3 non-albicans)	1 (5,5)	9 (6,4)
<i>Salmonella spp.</i>	-	2 (1,5)
<i>Shigella spp.</i>	-	1 (0,7)
Toplam	18 (100)	140 (100)

Çalışmaya alınan hastaların *C. difficile* için risk faktörlerinden olan hematolojik malignitesinin ve nazogastrik tüp uygulamasının olup olmadığı araştırıldı. *C. difficile* toksin A/B negatif hastaların 46'sında hematolojik malignite ve 15'inde nazogastrik tüp olduğu, pozitif hastaların ise 4'ünde hematolojik malignite ve 4'ünde nazogastrik tüp uygulaması olduğu görüldü. (Çizelge 4.6. ve 4.7.)

Hematolojik malignite uygulaması ile *C.difficile* toksin A/B'nin pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (p=0,519) (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların hematolojik malignite sonuçları

Hematolojik malignite	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
	n	n	
VAR	4 (%22)	46 (%33)	0,519
YOK	14 (%78)	94 (%67)	

Nazogastrik tüp uygulaması ile *C.difficile* toksin A/B'nin pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (p=0,304) (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların nazogastrik tüp uygulaması sonuçları

Nazogastrik tüp uygulaması	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
	n	n	
VAR	4 (%22)	15 (%11)	0,304
YOK	14 (%78)	125 (%89)	

Toksin negatif hastaların 118 (%84,2)'inde altta yatan bir hastalığın varlığı belirlendi. Bu hastaların 46 (%32,8)'sında kanser, 14 (%10)'ünde böbrek yetmezliği, 12 (%8,6)'sinde anemi ve 46 (%32,8)'sında diğer hastalıklar (Kistik Fibrozis, Menenjit, Pnömoni, Akut Pankreatit, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, HIV, Ensefalit, Siroz, Hepatit, İmmün yetmezlik, Diyabet) mevcuttu.

Toksin pozitif hastaların 16 (%88,8)'sında altta yatan bir hastalığın varlığı belirlendi. Bunların 4 (%22,2)'ünde kanser, 12 (%66,6)'sinde diğer hastalıklar (1 Kistik Fibrozis,1 Menenjit, 1 Pnömoni, 1 Akut Pankreatit, 1 Chrohn hastalığı, 1 Wilson hastalığı, 1 Otizm, 1 FMF, 1 Kostman Sendromu, 1 Epilepsi, 1 Reflü, 1 Vaskülit) bulunmaktaydı.

Çalışmadaki hastaların hastanede yatış süreleri içinde aldıkları antibiyotiklere bakıldığında ilk sırayı sefalosporinler almakta onu karbapenemler takip etmekte daha sonra da sırayla florokinolonlar, penisilin, beta laktam+beta laktamaz inhibitörleri ve diğer antibiyotikler de bunları izlemektedir. *C. difficile* toksin A/B pozitif bulunan hastaların daha önce kullandığı antibiyotiklere bakıldığında 5 (%28,5)'inin penisilin grubu, 3 (%16,5)'ünün sefalosporin grubu, 3 (%16,5)'ünün karbapenem, 2 (%11,0)'sinin beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü, 1 (%5,5)'inin penisilin-sefalosporin ve 1 (%5,5)'inin sefalosporin-karbapenem kombinasyonu aldığı tespit edildi.

Penisilin almakla *C. difficile* toksin A/B'nin pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p=0,006$). Penisilin alanlar almayanlara göre 6,34 kat daha fazla *C. difficile* toksin A/B'nin pozitif olması riski altındadır (OR=6,34 (1,81-22,24) $p=0,004$).

Sefalosropin ($p=0,080$), karbapenem ($p=0,777$), beta laktam+beta laktamaz inhibitörü ($p=0,986$), penisilin-sefalosporin ($p=0,810$), sefalosporin-karbapenem ($p=0,808$) grubu antibiyotik almakla *C. difficile* toksin A/B pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Hastaların hastanede yattıkları süre içerisinde kullandıkları antibiyotikler

Antibiyotik grupları	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
	n (%)	n (%)	
Penisilin	5 (28,5)	8 (5,7)	0,006
Sefalosporin	3 (16,5)	57 (40,7)	0,080
Karbapenem	3 (16,5)	24 (17,2)	0,777
Beta laktam+beta laktamaz inh.	2 (11,0)	11 (7,8)	0,986
Penisilin-Sefalosporin	1 (5,5)	5 (3,5)	0,810
Sefalosporin-Karbapenem	1 (5,5)	10 (7,1)	0,808
Florokinolon	-	16 (11,5)	
Aminoglikozit	-	2 (1,5)	
Glikopeptit	-	1 (0,7)	
Nitroimidazol	-	5 (3,6)	
Antibiyotik öyküsü olmayan	3 (16,5)	1 (0,7)	
Toplam	18 (100)	140 (100)	

Çalışmamızdaki 158 hastanın toksin negatif olan 46'sı, toksin pozitif olan 4' ü olmak üzere toplamda 50 hastanın hastanede yattığı süre içinde kemoterapötik ajan kullandığı belirlendi.

Ayrıca hastaların antiülser tedavi alıp almadıkları incelenmiş, negatif hastaların 76'sı (48'i proton pompa inhibitörü, 20'si H₂ antagonist, 8'i proton pompa inhibitörü+ H₂ antagonist) bu tedaviyi aldığı, 64'ünün ise almadığı tespit edildi. Pozitif hastaların ise 8'inin (3'ü proton pompa inhibitörü, 3'ü H₂ antagonist, 2'si proton pompa inhibitörü+ H₂ antagonist) hastanede yattığı süre içinde antiülser tedavi aldığı, 10'unun almadığı saptandı. *C. difficile* toksin A/B'nin pozitifliği ile antiülser ilaç tedavisi alıp almama arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. (p=0,591) (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.9. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların antiülser tedavi alıp almadıkları

Antiülser tedavi	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
Alan	8 (%44)	76 (%54)	0,591
Almayan	10 (%56)	64 (%46)	

Diğer test sonuçlarına bakıldığında *C. difficile* toksin A/B pozitif hastaların %72,2'sinde normal, %22,2'sinde yüksek değerlerde lökosit varlığı, hastaların %55,5'inde yüksek, %33,3'ünde normal değerlerde C-reaktif protein (CRP) varlığı saptanmıştır (Çizelge 4.10.). Lökositin referans aralığı $4,5-11 \times 10^3 \mu\text{l}$, CRP'nin referans aralığı 0-5 mg/ml olarak alınmıştır. Lökosit değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,164$). CRP değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,038$). (Çizelge 4.11.). CRP toksin negatif hastalarda daha yüksektir. Bunun nedeninin hastaların altta yatan hastalıklarına bağlı olabileceği düşünüldü.

Çizelge 4.10. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların lökosit ve CRP sonuçları

		<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
		n (%)	n (%)
Lökosit	Düşük	1 (5,6)	37 (26,4)
	Yüksek	4 (22,2)	41 (29,3)
	Normal	13 (72,2)	62 (44,3)
Toplam		18 (100)	140 (100)
CRP	Düşük	-	1 (0,7)
	Yüksek	10 (55,5)	108 (77,2)
	Normal	6 (33,3)	24 (17,1)
	Bakılmamış	2 (11,2)	7 (5)
Toplam		18 (100)	140 (100)

Çizelge 4.11. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların lökosit ve CRP medyan değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
	Medyan[çeyreklikler]	Medyan[çeyreklikler]	
Lökosit	11115 [6030-15120]	8055 [3240-12790]	0,164
CRP	12,50[2,00-51,50]	45,00[9,75-145,75]	0,038

Toksin pozitif hastaların ortalama ishal sıklığı günde 6 kez olarak belirlendi. Yatış sırasında ortalama antibiyotik kullanma süresi ise 15 gün olarak saptandı. Hastaların dışkı örneklerinde antibiyotiğe başladıktan ortalama 6,6 gün (min 0- max 40 gün) sonra toksin A/B pozitif saptandı. Yatıştan sonra pozitiflik için geçen süre ise ortalama 10,4 gün (min 0-max 58 gün) olarak tespit edildi.

Yatış süresi normal dağılıma uygun bir dağılım göstermemektedir ($p < 0,001$). Yatış süreleri bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0,317$). Antibiyotik kullanım süreleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0,659$) (Çizelge 4.12.)

Çizelge 4.12. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların yatış sürelerinin ve antibiyotik kullanma sürelerinin medyan değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	p değeri
	Medyan[çeyreklikler]	Medyan[çeyreklikler]	
Yatış süresi	9,50 [4,00-28,50]	20,50 [9,75-37,75]	0,317
Antibiyotik kullanma süresi	11,00 [6,00-22,00]	11,00 [6,00-22,00]	0,659

5. TARTIŞMA

C. difficile antibiyotikle ilişkili ishal ve kolitin en önemli etkenidir ve hastalık spektrumu hafif ve kendini sınırlayan ishalden, karakteristik şekli olan psödomembranöz kolite kadar gitmektedir (1). Yapılan çalışmalarda, *C. difficile*'ye bağlı antibiyotik ile ilişkili ishal sıklığının %3,8 ile %27 arasında olduğu bildirilmektedir (8, 42).

İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yapılan bir çalışmada; hastanede yatan ve uzun süre antibiyotik tedavisi gören, psödomembranöz enterokolit semptomları olan 50 çocuğun dışkı örneğinin 12 (%24)'sinden *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir. Bu suşların 8 (%16)'inde enzim immünoassay (EIA) yöntemiyle toksin A pozitifliği elde edilmiştir (57). Boral'ın yaptığı bir çalışmada 1998-2000 yılları arasında *C. difficile* enfeksiyonu ön tanısıyla laboratuvara gönderilen 360 hastanın dışkı örneğinde "ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic)" kiti ile ELISA yöntemiyle %4,7 oranında toksin A varlığı saptanmıştır. Aynı çalışmada 2000-2002 yılları arasındaki 400 dışkı örneğinde "Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic)" kiti kullanılarak %12 oranında toksin A/B varlığı saptanmış olduğu bildirilmiştir. İkinci çalışmada toksin yüzdesinin artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve *C. difficile* toksin saptanmasında her iki toksini saptayan kitlerin kullanılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır (7). Aygün ve ark., 125 dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile %3,2 oranında *C. difficile* toksin A/B pozitifliği saptamışlardır (58). Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde; Eylül 2006-Ocak 2010 tarihleri arasında yatan ve ishali olan 633 hastanın dışkısında EIA testi ile toksin pozitifliği %4,7 (30/633) olarak tespit edilmiştir (25). Ercis ve ark. antibiyotiğe bağlı ishal veya PMK ön tanılı 726 hastanın dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *C. difficile* toksin varlığını araştırmışlar; bunların 62' sinde toksin A ve 6' sında toksin B olmak üzere toplam 68(%9,4) hastanın dışkı örneğinde pozitiflik saptamışlardır (42). Aygün ve ark. yaptıkları çalışmada, hastanede yatmayan ve son 3 ay içinde antibiyotik kullanım öyküsü olan 70 hastanın dışkı örneğinde ELISA yöntemi kullanarak 3 (%4,3)'ünde *C. difficile* toksin A/B pozitif tespit etmişlerdir (44). Altındış ve ark. yaptıkları çalışmada; antibiyotik kullanım öyküsü olan ishali, 45 poliklinik, 46 servis hastası toplam 91

hastanın 13 (%14,3)'ünde ELISA yöntemiyle toksin A/B pozitiflik saptamışlardır (33). Tunçcan ve ark., hastanede yatan ve antibiyotik kullanımı sonrası ishal gelişen 74 nötropenik hasta ile 75 nötropenik olmayan hastada ELISA yöntemiyle *C. difficile* toksin A/B varlığını araştırmış; nötropenik grupta %24,3 (n= 18), nötropenik olmayan grupta %21,3 (n= 16) olmak üzere toplam %22,8 (n= 34) oranında *C. difficile* toksin A/B pozitifliği bulmuşlar ve nötropenik grupta nötropenik olmayanlara göre enfeksiyonun daha erken geliştiğini saptamışlardır (59). Altuğlu ve ark., yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitesinde en az 3 gün kalan ve antibiyotik kullanımı sonucunda ishal gelişen 38 hastanın 7 (%18,4)'sinde 'Enzim-Linked Fluorescent Assay (ELFA)' yöntemiyle toksin A pozitif saptamışlardır (8).

Bizim çalışmamızda *C. difficile* Toksin A/B kiti ile (VIDAS, bioMérieux) ELFA yöntemi kullanılarak incelenen 158 dışkı örneğinin 18 (%11,4)' inde toksin A/B pozitif olarak tespit edilmiştir.

C. difficile'ye bağlı ishal oluşumunda en önemli risk faktörü antibiyotik kullanımıdır. Kullanılan antibiyotikler, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanedeki klinikler arasında bile çok değişiklik gösterebilmektedir (25). Herhangi bir antibiyotik kullanımı sırasında *C. difficile* ilişkili ishal gelişebilse de bu konuda klindamisin ve sefalosporinler en riskli antibiyotiklerdir. Başta klindamisin olmak üzere sefalosporin, betalaktam/betalaktamaz inhibitör kombinasyonları, penisilin ve karbapenem grubu antibiyotik kullanımı *C. difficile* ilişkili ishal için önde gelen risk faktörleri olarak bildirilmiştir (6, 60). İsveç'te beş büyük hastanenin yer aldığı bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol, piperasilin, sefalosporin ve klindamisin kullanımının *C. difficile* enfeksiyonu riskini arttırdığı görülmüştür (61). Ercis ve ark. yaptıkları çalışmada *C. difficile* 'ye bağlı ishalin, hastaların büyük bir kısmında (32/68) beta laktam-beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanımı sonucunda geliştiği, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) izlediğini saptamışlardır (42). Altındış ve ark. *C. difficile* toksin pozitif hastaların %84,6'sının ampicilin-sülbaktam, %7,7'sinin ise kotrimoksazol-SXT ve makrolid antibiyotik kullandığını belirlemişlerdir (33). Altuğlu ve ark., yaptıkları çalışmada toksin A pozitif bulunan hastaların beşinin üçüncü kuşak sefalosporin, birinin trimetoprim-sulfametoksazol ve birinin de siprofloksasin kullanmakta olduğunu saptamışlardır (8). Avustralya'da yapılan *C. difficile* ile ilişkili ishal olgularının incelendiği epidemiyolojik bir çalışmada;

3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının kontrol altına alınması ile *C. difficile* ilişkili ishal olgularının azaltılabileceği bildirilmiştir (62).

Çalışmamızda, *C. difficile* toksin A/B pozitif bulunan hastaların %28,5'inin penisilin grubu, %16,5'inin sefalosporin grubu, %16,5'inin karbapenem, %11,0'inin beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü antibiyotik kullandığı ve üç hastada ise antibiyotik kullanım öyküsünün bulunmadığı tespit edilmiştir.

C. difficile'ye bağlı ishalin oluşmasına neden olan diğer bir risk faktörü, altta yatan ciddi bir hastalığın varlığıdır. Kronik hastalığı olanların daha sık ve daha uzun süre hastanede yatırımları *C. difficile* ile kolonize olma ihtimalini artırmakta; kişiyi enfeksiyonlara açık hale getirmektedir (63). Ercis ve ark. yaptıkları çalışmada *C. difficile* toksin A/B pozitif tespit ettikleri olguların %52,9'unda altta yatan bir hastalığın olduğunu, bunları da kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı, böbrek yetmezliği ve kanser olarak bildirmişlerdir (42). Altuğlu ve ark.'nın çalışmasında toksin A pozitif bulunan hastalar operasyon geçirmek, politravma, vaskülit, solid tümör, organik fosfat zehirlenmesi, beyin içi kanaması, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi nedenlerden dolayı yoğun bakımda yatmakta olduğunu tespit etmişlerdir (8).

Çalışmamızda, *C. difficile* toksin A/B pozitif 18 hastanın 4 (%22,2)'ünde kanser, 12 (%66,6)'sinde kronik bir hastalık olmak üzere 16 (%88,8) hastada altta yatan herhangi bir hastalığı olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotiğe bağlı ishal olguları sıklıkla kendini sınırlama eğilimindedir. İshal genelde sulu ve mukusludur, genellikle kan bulunmaz. Sistemik bulgular yoktur ve genellikle dışkıda lökosit saptanmaz. Kolit olgularında ise sistemik bulguların yanısıra, dışkıda lökosit ve eritrosit bulunmaktadır (5). Gerding ve ark. *C. difficile*'ye bağlı ishal şüphesi olan örneklerle yaptıkları çalışmada toksin pozitif dışkıların %27'sinin mukus, %26'sının kan içerdiğini tesbit etmişlerdir (35).

Bizim çalışmamızda da; mikroskopik incelemede toksin pozitif 18 örneğin 2'sinde eritrosit, 5'inde lökosit, birinde eritrosit ve lökosit varlığı saptanırken 5 örneğin makroskopik görüntüsü de mukuslu olarak değerlendirilmiştir.

Antibiyotikle ilişkili ishal olan fakat *C. difficile* saptanamayan hastalarda, enterotoksin üreten *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Salmonella* ve *Shigella* gibi etkenlerin rolü olabileceği ifade edilmektedir (33). Altuğlu ve ark.'nın çalışmalarında; çalışmaya alınan 38 hastanın 21 tanesine bakteriyolojik

kültür yapılmış, sadece 1 tanesinde *Shigella flexneri* izole edilmiş. Toksin A pozitif hastaların hiçbirinde patojen bir bakteri saptanmamıştır (8). Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde yapılan çalışmada örneklere bakteriyolojik kültür yapılarak *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* varlığı araştırılmıştır. Fakat hiçbirinde bu bakterilere rastlanmamış hepsinde normal flora elemanlarının ürediği görülmüştür (44).

Çalışmamızda toksin negatif 140 hastanın dışkı kültüründe; 9 (%6,4)'unda *Candida* (6'sı *C. albicans*, 3'ü *non-albicans*), 2 (%1,5)'sinde *Salmonella spp.*, 1 (%0,7)'inde ise *Shigella spp.* ve 128 (%91,4)'inde ise normal flora bakterileri izole edildi. Toksin pozitif hastaların 1 (%5,5)'inde *C. albicans* ve 17 (%94,5)'sinde normal flora bakterileri üremiştir.

Dışkıda toksin A/B saptanabilmesi için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilmesidir. Her iki majör *C. difficile* toksinine duyarlı olması nedeniyle en çok tercih edilen Vero hücreleridir. Fakat doku kültürü laboratuvarına gereksinim gösteren, zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Bu yüzden Enzim immünassay yöntemi toksin A ve B'yi saptamada hızlı sonuç alınması ve doku kültürüne göre daha ucuz olması nedeniyle birçok merkezde tercih edilmektedir. Bu testlerin duyarlılığı %75-85 oranlarındadır (49).

A.B.D.'nde 5 yıllık sürede *C. difficile* testlerinin kullanımı değerlendirilmiş; buna göre, 2004 yılında laboratuvarların %42'si *C. difficile* toksin A ve B tanısında katı faz EIA'ı, %26'sı toksin A/B veya/ve GDH tanısında immunokromotografik testleri kullanmakta oldukları bildirilmiştir. Hızlı immunokromotografik testlerdeki gelişmelerden sonra 2008 yılında laboratuvarların %46'sı bu metodu kullanırken, %43'ünün hala EIA metodlarını kullanmakta olduğu tespit edilmiştir (48).

C. difficile sporları, kolonizasyon gelişmiş hastalardan ya da çevrelerindeki kişilerden, temas sonucunda alınabilmekte, çoğu zaman da hastane personelinin elleri aracılığıyla taşınmaktadır. Elle taşınma önemli bir bulaş şekli olarak düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, hastane personelinin lastik eldiven kullanması sonucunda *C. difficile*'ye bağlı ishallerde beş kat azalmanın görüldüğü belirtilmiştir. *C. difficile* ısıya dirençli sporları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmektedir (64).

Çalışmamızda, hastanede yatan ishal gelişen hastalarda %11,4 oranında *C. difficile* toksin A/B pozitifliği saptandı. Pozitif hastaların Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları kliniğinde yoğunlaştığı görüldü. Toksin pozitif bulunan hastaların %28,5'inin penisilin

grubu, %16,5'inin sefalosporin grubu, %16,5'inin karbapenem, %11,0'inin beta-laktam + beta- laktamaz inhibitörü antibiyotik kullandığı ve %25'inin malign bir hastalığının olduğu ve kemoterapötik ilaç aldığı ve %44,4'ünün anti ülser tedavi aldığı tespit edilmiştir. Toksin pozitif ve negatif hastalardaki incelediğimiz çeşitli risk faktörlerinden penisilin kullanımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur, diğerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

C. difficile, hastanede yatan ve başta antibiyotik kullanan hastalarda gelişen ishallerde öncelikle akla gelmelidir. Bunun yanında diğer risk faktörlerinin (malignite, kemoterapi, anti ülser ilaç kullanımı gibi) de hastalığın şiddetinde etkin olabileceği düşünülmelidir. Tanı için toksin oluşumunun gösterilmesi gereklidir. Toksin saptanmasında altın standart doku kültürüdür fakat uygulama güçlüğü, uzun sürede sonuç vermesi ve pahalı olması gibi nedenlerden dolayı rutin laboratuvarlarda kullanımı zordur. Bu nedenle dışkıda toksin araştıran ticari testler içinde duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan ELISA kitleri tercih edilebilir. Böylece toksin pozitif hastalar belirlenerek uygun tedavi alması sağlanır. Aynı zamanda enfeksiyon kontrol önlemleri alınarak *C. difficile*' nin hastane ortamında hastalar arasında yayılımı önlenmiş olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada hastanemizde *Clostridium difficile* ilişkili ishal sıklığını belirlemek için *C. difficile* toksin A/B varlığı ELFA yöntemiyle araştırıldı. Hastanede yatan ve ishal gelişen hastalarda %11,4 oranında pozitiflik tespit edildi. Bu oran yapılan diğer çalışmalardaki oranlarla uyumlu bulunmuştur. ELISA yönteminin kolay, hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasından dolayı bu enfeksiyonun tanısında ilk seçenek olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Ayrıca bu konu ile ilgili ülkemizde yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunduğundan bu çalışma ile *C. difficile* epidemiyolojisine katkıda bulunulacaktır.

C. difficile enfeksiyonları tüm dünyada hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan çok ciddi bir sağlık sorunudur. Bu enfeksiyonun erken tanısı, kontrolü ve önlenmesi için hızlı tanı konarak tedavi edilmeli ve gerekli enfeksiyon kontrol önlemleri uygulanmalıdır.

C. difficile' ye bağlı ishal olgularının değerlendirilmesinde toksin varlığının gösterilmesi, hastanın klinik bulgularıyla birleştirilmesi ve *C. difficile* enfeksiyonuna neden olan risk faktörleriyle birlikte değerlendirilmesi önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Bartlett JG.** *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea and Colitis. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. *Infectious Diseases*. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. **2004**:670-677.
2. **Venuto C, Butler M, Ashley ED, Brown J.** Alternative Therapies for *Clostridium difficile* Infections. *Pharmacotherapy*, **2010**; 30(12):1266–1278.
3. **Kıyan M.** Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:645-649.
4. **Özgüven V.** *Clostridium difficile*. Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları. Ankara: Pelikan Yayıncılık, **2006**:206-218.
5. **Aygün G.** Antibiyotiğe Bağlı İshaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**:1087-1093.
6. **Çaylan R.** Antibiyotikle İlişkili İshaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. **2008**:1060-1064.
7. **Boral ÖB.** *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2002**; 32:220-224.
8. **Altuğlu İ, Aydemir Ş, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Bilgiç A.** Antibiyotikle ilişkili nozokomiyal diyarelerde *Clostridium difficile* Toksin A araştırılması. *Turkish Journal of Infection*, **2001**; 15(4):495-497.
9. **Vaishnavi C.** Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol*, **2009**; 27:289-300.
10. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** *Clostridium difficile*. In: Başustaoğlu AC. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, **2010**:377-389.
11. **Poutanen SM, Simor AE.** *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, **2004**; 171(1):51-58.
12. **Aktuğlu Y.** Antibiyotik Sonrası Diyare (Psödomembranöz Kolit). İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Yaz İshalleri - Besin Zehirlenmeleri 8-9 Haziran **1998**, İstanbul, s. 163-176.

13. **Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB.** Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing Clostridia. *N Engl J Med*, **1978**; 298:531-534.
14. **Uzunismail H.** *Clostridium difficile* Diyaresi. *Endoskop Dergisi*, **1998**; 9(3):105-109.
15. **Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH.** Clindamycin-associated colitis: A prospective study. *Ann Intern Med*, **1974**; 81:429-432.
16. **Bartlett JG.** Pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated colitis. In Sleisenger, Fordtran. *Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders Company, 6th ed. **1998**:1633-1646.
17. **Navaneethan U, Venkatesh P, Shen B.** *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: Understanding the evolving relationship. *World J Gastroenterol*, **2010**; 16(39):4892-4904.
18. **Mallavarapu RK, Katner HP.** *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea and Colitis in the Hospitalized Patient. *Hospital Physician*, **2007**; 43(7):21-27.
19. **Bilgehan H.** *Clostridium difficile* In: Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 9. Basım, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, **1995**:361-363.
20. **Topçu AW, Söyletir G.** Antibiyotiğe Bağlı Kolitler (*Clostridium difficile* Koliti) In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **1996**:615-617.
21. **Libby JM, Wilkins TD.** Production of antitoxins to two toxins of *Clostridium difficile* and immunoloical comparison of the toxins by cross-neutralization studuies. *Infect Immun*, **1982**; 35:374-376.
22. **Özkan A.** Çocukluk Çağı Akut Gastroenterit Olgularında Etiyolojik Ajanların Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Adana **2005**.
23. **Levent B.** Dünyada ve Ülkemizde *Clostridium difficile* Enfeksiyonlarının Önemi ve Epidemiyolojisi. Panel 2. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi. Ankara, **15-19 Haziran 2010**:1-4.
24. **Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P.** ESCMID Study Group for Clostridium difficile; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, **2006**; 12(6):2-18.
25. **Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G.** Marmara Üniversitesi Hastanesinde Yatan İshalli Hastalardan İzole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(1):1-10.

26. **O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN.** *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*, **2009**; 136(6):1913-1924.
27. **Loo VG, Poirier L, Miller MA.** A predominantly Clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*, **2005**; 353:2442-2449.
28. **Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E, Sımrtaş M, Alver O, Heper Y, Özakın C, Bakker D, Ener B, Mıstık R, Helvacı S, Kuijper EJ.** Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Médecine et maladies infectieuses*, **2009**; 39:382-387.
29. **Poxton IR, McCoubrey J, Blair G.** The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, **2001**; 7(8):421-427.
30. **Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD.** *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. *Clin Microbiol Rev*, **1988**; (1)1:1-18.
31. **Salyers AA, Whitt DD.** Pseudomembranous Colitis. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. 1st Ed. Washington, D.C. : ASM Press. **1994**, p. 282-289.
32. **Akova M.** Antibiyotikle İlişkili İshalde Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. *ANKEM Derg*, **2004**; 18(Ek 2):80-81.
33. **Altındış M, Usluer S, Çiftçi İH, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe OC.** Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2007**; 41:29-37.
34. **Acuner İÇ, Gürol Y, Sönmezoğlu M.** Hastane Enfeksiyonları Tanısında Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler. Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bülten 5, **2011**.
35. **Usluer S.** Antibiyotiğe Bağlı Hastane ve Toplum Kökenli İshal Olgularında *Clostridium difficile* Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Afyon **2006**.
36. **Ovaran C, Çavuşlu Ş, Özsoy MF, Keskin K, Yenen OŞ.** Antibiyotiğe Bağlı Diyarelerde *Clostridium difficile* 'nin Yeri. *Klimik Derg*. **1996**, 9(1):15-17.
37. **Öztürk R.** Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve Tedavi. *Ankem Derg*, **2004**; 18(Ek 2):82-86.
38. **Palabıyıkoglu İ.** Yoğun Bakım Ünitesinde İnfeksiyon Patogenezi. *Yoğun Bakım Dergisi*, **2003**; 3(2):81-101.
39. **Çiftdoğan DY, Vardar F.** Enfeksiyon hastalıklarında hızlı tanı testleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **2009**; 52(3):159-166.

40. **Yassin SF, Young-Fadok TM, Zein NN, Pardi DS.** *Clostridium difficile*-Associated diarrhea and colitis. *Mayo Clin Proc*, **2001**; 76:725-730.
41. **Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB.** *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea. *Arch Intern Med*, **2001**; 161:525-533.
42. **Ercis S, Ergin A, Haşcelik G.** *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal olgularının 6 yıllık değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bült*, **2004**; 38:45-50.
43. **Bakır M.** Pediatrik Nozokomiyal İnfeksiyonlar Tanı Kriterleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **2005**; 9:27-46.
44. **Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K.** Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2003**; 33:39-41.
45. **Ardıç N.** *Clostridium difficile* İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. *Klinik Dergisi*, **2004**, 17(3):142-145.
46. Erişim:<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/gastroenterology/antibiotic-associated-diarrhea/> Erişim tarihi: 15.03.2012
47. **Delmée M.** Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect*, **2001**; 7: 411–416
48. **Schmidt ML, Gilligan PH.** *Clostridium difficile* testing algorithms: What is practical and feasible? *Anaerobe*, **2009**;15:270-273.
49. **Özinel MA.** Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak *Clostridium difficile*. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **2001**; 5:251-254.
50. **Nazlıgül Y, Gül C.** Nozokomiyal Diyare. *Güncel Gastroenteroloji*, **2006**; 10(3):225-229.
51. **Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M.** Comparison of Nine Commercially Available *Clostridium difficile* Toxin Detection Assays, a Real-Time PCR Assay for *C. difficile* tcdB, and a Glutamate Dehydrogenase Detection Assay to Cytotoxin Testing and Cytotoxigenic Culture Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **2009**;47(10): 3211–3217.
52. **Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, Krishna S.** Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis* **2008**; 8: 777–784

53. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Antikor ve Çözülebilir Antijen için İmmün Yöntemler. In: Başustaoglu AC. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, **2010**:169-175.
54. Erişim: http://virus.usal.es/web/demo_microali/enterotoxina/set.html Erişim tarihi: 12.02.2012
55. **Koçak BT.** Çocuk Kliniğine Gastroenterit Tanısıyla Yatırılan Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü. İstanbul **2008**.
56. **Bilgehan H.** Enterobacteriaceae. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 4. Baskı, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, **2004**:425-455.
57. **Büyükbaba Ö, Özkan E, Büğet E.** Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishali çocukların dışkılarında *Clostridium difficile* nin araştırılması. *KLİMİK Derg*, **1994**; 7:105-107.
58. **Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K.** Hastanede Yatarken Gelişen İshal Olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B Araştırılması. *Ankem Derg*, **2002**; 16(1):82-84.
59. **Tunçcan ÖG, Uluhan F, Karakuş R.** Antibiyotiğe Bağlı İshal Gelişen Nötropenik ve Nötropenik Olmayan Hastalarda *Clostridium difficile* Toksin Sıklığı ve Risk Faktörlerinin Analizi. *Mikrobiyol Bul*, **2008**; 42:573-583.
60. **Uzunismail H.** Psödomembranöz Kolit. *Endoskopi*. **2001**; 12(2):4-10.
61. **Wiström J, Norrby SR, Myhre EB.** Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother*, **2001**; 47(1):43-50.
62. **Thomas C, Stevenson M, Williamson DJ, Riley TV.** *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: Epidemiological Data from Western Australia Associated with a Modified Antibiotic Policy. *Clostridium difficile* Epidemiology CID, **2002**; 35:1457-1462.
63. **Barbut F, Petit JC.** Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. *Clin Microbiol Infect*, **2001**; 7(8):405-410.
64. **Beşirbellioğlu AB, Görenek L, Dizer U, Hacıbektaşoğlu A.** Gata Eğitim Hastanesi'nde Nozokomiyal *Clostridium difficile* Kolonizasyonu Sıklığı. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, **1997**; 1:158-162.

ÖZGEÇMİŞ

08.03.1986 tarihinde Kayseri ilinde doğdu. Liseyi Mersin’ de tamamladı. 2005 yılında Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitime başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.