



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Hematolojik Malignansili Hastalarda Gelişen Diyare Olgularında *Clostridium difficile* Toksinlerinin Araştırılması**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehdi MESKİNİ HEYDARLOU**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. GÜL DURMAZ**

**2015**





**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Hematolojik Malignansili Hastalarda Gelişen Diyare Olgularında *Clostridium difficile* Toksinlerinin Araştırılması**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MEHDİ MESKİNİ HEYDARLOU**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. GÜL DURMAZ**

**proje no: 2014-567**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Mehdi MESKİNİ HEYDARLOU'nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Hematolojik Malignansili Hastalarda Gelişen Diyare Olgularında *Clostridium difficile* Toksinlerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih  
27 / 07 / 2015

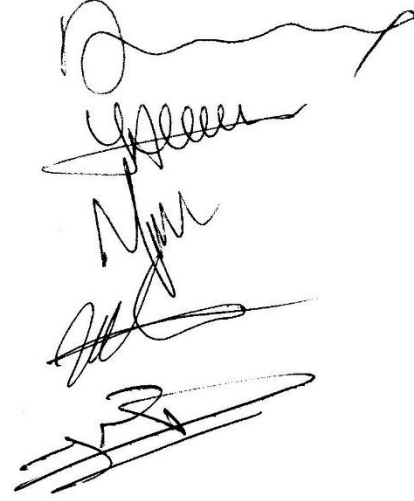
Üye: Prof.Dr. Gül DURMAZ

Üye: Prof.Dr. Yurdanur AKGÜN

Üye: Prof.Dr. Tercan US

Üye: Prof.Dr. Nihal DOĞAN

Üye: Prof.Dr. İlhan ÖZGÜNEŞ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu'nun 31/07/2015 tarih ve 1056/4926 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## Özet

*Clostridium difficile*, asemptomatik taşıyıcılık, ılımlı diyare, psödomembransız kolit, psödomemranöz kolit (PMK), fulminant kolit/toksik megakolon gibi çok çeşitli klinik tablolara neden olabilen insan gastrointestinal sistem mikrobiyota üyesi, gram pozitif, sporlu anaerob çomakçıktır. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrası kolonda bulunan *C. difficile* suşları ekolojik avantaj kazanıp çoğalmakta ve toksin sentezleyerek ishale neden olmaktadır. Son 20 yılda gerek hastane, gerekse toplum kaynaklı *Clostridium difficile* enfeksiyonlarının insidans ve mortalitesinde belirgin bir artış olduğu göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hastanesi Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde terapötik veya proflaktik amaçlı geniş spekturumlu antibiyotik kullanımı sonrasında ishal gelişen hastaların dışkıında toksijenik *C. difficile* varlığının iki farklı immündaagnostik ve bir moleküler test kullanarak araştırılması amaçlanmıştır. Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerde yatan ve diyaresi olan 82 hastanın dışkı örnekleri incelenmiştir. Dışkı örnekleri kapaklı, sızdırmaz transport dışkı kaplarında bir saat içinde mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) ve toksin A ve B saptamada EIA yöntemi (TECH LAB, Inc.) , toksin B genini saptamada ise real-time PCR yöntemi (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) kullanılmıştır.

Elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edildi. Dokuz hastada yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B ) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalancı negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun tcdB geninde gerçekleşen mutasyon veya sadece toksin B/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünüldü.

Sonuçlarımıza göre GDH EIA testinin güvenilir bir tarama testi olarak riskli hasta gruplarında ilk test olarak uygulanması ve GDH pozitifliği durumunda ise toksin A ve B saptayan immündaagnostik testler veya toksin B genini saptayan moleküler testlerden biriyle sonucun doğrulanması uygun bir yaklaşım olacaktır.

**Anahtar sözcükler:** *Clostridium difficile*, toksin A, toksin B, diyare, tanısal test,

## Summary

*Clostridium difficile*, the member of human gastrointestinal system microbiota, is a gram-positive, spore-forming anaerobic bacilli. It is present in the gastrointestinal tract in asymptomatic carriers, though; it can cause a variety of clinical features such as: mild diarrhea, non-pseudomembranous colitis, pseudomembranous colitis (PMC), and fulminant colitis/toxic megacolon. Following the useage of broad spectrum antibiotics, *C. difficile* strains gain benefit of ecological advantage and start to multiply and produce toxins leading to diarrhea. In the last 20 years, nosocomial and community acquired *C. difficile* infections showed significant increasing incidence and mortality rates.

Our study is aimed to investigate toxigenic *C. difficile* in diarrheal stool specimens collected from in-patients of Eskişehir Osmangazi University Hospital Hematology and Oncology departments who receive broad spectrum antibiotics for prophylactic or therapeutic purposes. Using two different methods; toxigenic *C. difficile* was investigated using by immunodiagnostic and molecular tests. During the period between January-June 2015, 82 diarrheal specimens were collected in suitable stool containers and sent to microbiology laboratory within an hour. EIA method (TECH LAB, Inc.) was used to detect the presence of glutamate dehydrogenase enzyme and toxins A plus B. Also, real-time PCR (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) was used to detect toxin B gene.

Fifty six samples were negative in all three tests performed. However; nine specimens were positive in at least two diagnostic tests performed. Three samples were positive by EIA (GDH, toxins A and B) while these specimens were negative by the molecular test. The negative result could be false negative due to *tcdB* gene mutation, or it could be due to toxin B/binary toxin producing strain.

According to our results, GDH EIA is a reliable initial screening test to be applied in high risk patients. Though, it would be an appropriate approach to verify GDH EIA positive results by performing either immuno diagnostic tests which detect toxin A and B or toxin B gene based molecular tests.

**Key words:** *Clostridium difficile*, toxins, toxin B, diarrhea, diagnostic tests

## İçindekiler

Kabul ve Onay sayfası .....	iv
Özet .....	v
Summary.....	vi
Tablo Dizini .....	x
Şekil Dizini .....	xi
Simge ve Kısaltmalar Dizini .....	xii
1. Giriş ve Amaç .....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Tarihçe .....	3
2.2. Mikrobiyolojik özellikler .....	5
2.3. Virulans faktörleri .....	7
2.3.1. Ekzotoksinler .....	7
2.3.1.1. Toksin A .....	7
2.3.1.2. Toksin B .....	8
2.3.1.3. <i>Binary</i> toksin .....	11
2.3.2. Diğer virülans faktörleri .....	11
2.4. Patogenez .....	12
2.5. Epidemiyoloji .....	14
2.6. Risk Faktörleri .....	15
2.7. Klinik .....	16
2.7.1. Asemptomatik Kolonizasyon .....	16
2.7.2. <i>Clostridium difficile</i> Diyaresi .....	17
2.7.3. <i>Clostridium difficile</i> Koliti .....	17

2.7.4. Psödomembranöz Kolit .....	17
2.7.5. Fulminant psödomembranöz kolit .....	18
2.7.6. Rekürent CDE .....	18
2.8. Tanı .....	18
2.8.1.Kültür .....	19
2.8.2. İmmünohistokimyasal Testler .....	20
2.8.2.1. Lateks Aglütinasyon .....	20
2.8.2.2. EIA .....	20
2.8.3. Moleküler Yöntemler .....	21
2.8.4. Hücre Kültürü Sitotoksinite, Toksik kültür, sitotoksin nötralizasyon yöntemleri.....	21
2.9. Tedavi .....	22
2.10. Korunma .....	23
3. Gereç ve yöntemler .....	24
3.1. Gereçler .....	24
3.1.1 Glutamat dehidrogenaz EIA malzemeleri .....	24
3.1.2 <i>C. difficile</i> toksin A/B EIA malzemeleri .....	24
3.1.3 Real-time PCR malzemeleri .....	24
3.1.4 Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri .....	24
3.2. Yöntemler .....	26
3.2.1 Glutamat dehidrogenaz antijenin EIA yöntemi ile saptanması...26	
3.2.2 Toksin A ve B'nin EIA yöntemi ile saptanması .....	27
3.2.3 Toksin B'nin Real-time PCR yöntemi ile saptanması .....	27
3.2.4 İstatistiksel analiz .....	28
3.2.5 Etik kurul onayı .....	28



4. Bulgular .....	29
5 .Tartışma .....	33
6. Sonuç ve öneriler .....	37
Kaynaklar Dizini .....	38
Ek-1: Hasta onay formu.....	48

## **Tablo Dizini**

Tablo 1: <i>C. difficile</i> ile ilişkili diyarelerde risk faktörleri .....	16
Tablo 2: CDE saptanan hastalara ait demografik bilgiler .....	29
Tablo3: GDH EIA testi sonuçları .....	30
Tablo 4 : Toksin A ve B EIA testi sonuçları.....	30
Tablo 5: Real-time PCR testi sonuçları.....	31
Tablo 6: GDH EIA, toksin A ve B EIA, Real-time PCR sonuçları.....	31
Tablo 7: GDH EIA yönteminin Real-time PCR yöntemine göre değerleri.....	32
Tablo 8: Toksin A ve B EIA yönteminin PCR yöntemine göre değerleri.....	32

## **Şekil Dizini**

şekil 1: (A) Psödomembranöz kolit. (B) Normal kolon biopsisi .....	3
Şekil 2: Toksinlerin mukoza hücreleri üzerine etkisi .....	9
Şekil 3: Toksin A ve B domenlerinin ABCD modeli .....	10
Şekil 4: Toksinlerin ökaryot hücreler üzerinde etkisi .....	13
Şekil 5: Patojenik lokus genom diyagramı .....	13

## **Simge ve Kısaltmalar Dizini**

CCFA: Cikloserin Cefoksitin Fruktoz Agar

CDE: *Clostridium difficile* enfeksiyonu

EIA: Enzim immunoassay

ELFA: Enzim Linked Fluorescent assay

FDA: Food and Drug Administration

NAP-1: North American pulsotype 1

GDH: Glutamat dehidrogenaz

LAMP: Loop-mediated izotermal amplifikasyon

NAA: Nükleik asit amplifikasyon

NPD: Negatif Prediktif Değer

PMK: Pseudo Membranöz Kolit

PPD: Pozitif Prediktif Değer

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

UV: Ultraviyole

nm: Nanometre:

CMA: Cycloserine –Mannitol agar

CMBA: Cycloserine Mannitol Kanlı agar

PNL: Polimorf nüveli lökosit

CDC: Centers for Disease Control

Hep2: İnsan epidermoid karsinoma hücreleri

CHO: Chinese Hamster Ovary hücreleri

MRC 5, WI-38: İnsan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri

Vero: Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri

PCR: Polymerase Chain Reaction

ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ASM: American Society For Microbiology

## 1.Giriş ve Amaç

*C. difficile* gram pozitif, sporlu, zorunlu, anaerop bir bakteridir. Bu bakteri sağlıklı insanların barsak mikrobiyotasında %3 bulunma oranına sahiptir. Çeşitli sebeplerle hastanede yatan hastaların barsak mikrobiyotasında bulunma oranı %7-11'e kadar artabilmektedir. *C. difficile* kolonizasyonu ve enfeksiyonu önlemede barsak mikrobiyotasının rolünün önemli olduğu bilinmektedir. Sağlıklı insanlar, kolon mikrobiyotasının bu kuruyucu etkisi sebebiyle *C.difficile* enfeksiyonlarına (CDE) karşı dirençlidir. Fakat geniş spektrumlu antibiyotik özellikle klindamisin, penisilin, sefalosporin ve immünsupresif ilaçlar ile maruziyet sonucunda bu etkene karşı olan kuruyucu bariyer ortadan kalkar. *C. difficile* çoğalması nedeniyle hastalık meydana gelebilir.

*C. difficile*, normal bireylerin gastrointestinal sistem mikrobiyotasının stabil bir üyesidir. Yenidoğanlarda %60-70 oranında kolonize olabilmektedir. Yenidoğanlarda bakterinin fazla miktarda kolonize olduğu ve toksin ürettiği halde bu gurupta psödomembranöz kolitin nadir olarak görülmesinin sebebini; bu dönemde barsak epitel hücrelerinin toksine duyarlı olmaması ve uygun reseptörlerinin olmadığı kanısını düşündürmektedir. İleriyeyen yaşlarda intestinal sistem mikrobiyotasını oluşturan bakteri türlerinin *C. difficile* suşlarını inhibe ettiği özellikle anaerop mikrobiyotayı oluşturan *Eubacteria*, *Bifidobacteria* ve *Bacteroides* türlerinin *C. difficile*'nin kolonizasyonunu tamamen engellediğini göstermiştir.

Nozokomiyal enfeksiyonlar içinde önemli bir orana sahip olan *C. difficile*, antibiyotik ile ilişkili ishal ve kolitin yaklaşık %15-25 lik oranla önemli etkenidir. Pseudomembranöz kolitlerin (PMK) ise %99'undan sorumludur. Ancak antibiyotik kullanımının yanısıra uzun süre hastanede yatış, ileri yaş, proton pompa inhibitörü gibi antiülser ilaçların, antineoplastik ve immünsüpresiflerin kullanılması, radyasyon, nazogastrik tüpler, barsak temizliği ve karın içi cerrahi gibi gastrointestinal girişimler de CDE oluşması için risk faktörlerdir. Sadece toksijenik suşlar *C. difficile* CDE patogenezine neden oldukları bilinmektedir. *C. difficile* patojenite lokusunda (Paloc) bulunan *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından kodlanan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) hastalığın patogenezinden sorumludur. Bazı ülkelerde hastane salgınlarına neden olan, enzimatik ve bağlayıcı komponentlerinin *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlandığı toksin A ve B'den farklı, "*binary toksin*" üreten suşlar bildirilmiştir.

Bu alışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hastanesi Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde terapötik veya proflaktik amaçlı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında ishal gelişen hastaların dışkısında toksijenik *C. difficile* varlığının iki farklı immündaagnostik ve bir moleküler test kullanarak araştırılması amaçlanmıştır. Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerde yatan ve 82 diyaresi olan hastanın dışkı örnekleri incelenmiştir. Dışkı örnekleri kapaklı, sızdırmaz transport dışkı kaplarda bir saat içinde mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Glutamat dehidrogenaz enzimi ve toksin A ve B saptamada EIA yöntemi (TECH LAB, Inc.), toksin B genini saptamada ise real-time PCR (BD GeneOhm™ Cdiff Assay) yöntemi kullanılmıştır.

Elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edildi. Dokuz hastada yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B ) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalancı negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun *tcdB* geninde gerçekleşen mutasyon veya sadece toksin B/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünöldü.

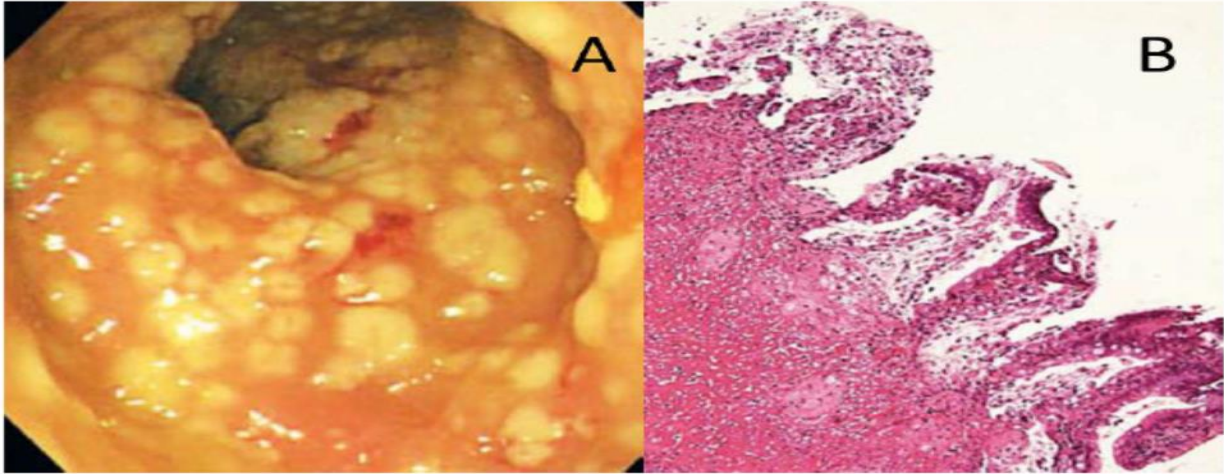
CDE laboratuvar tanısı, hem hasta hem de bakterinin hastane içi yayılımının önlenmesi açısından önemlidir. Standartlar, sulu veya yarı katı dışkı örneklerinin önce GDH testi yapılması sonra da doğrulamak için toksijenik kültür veya hücre kültürü sitotoksisite yöntemi yapılmasını önermektedir.

## 2.Genel Bilgiler

### 2.1.Tarihçe

*C. difficile* ilk defa 1935 yılında yenidoğan çocukların dışkı mikrobiyotası araştırıldığında tanımlandı. Kültür ortamında zor üretilmesi nedeniyle *Bacillus difficile* olarak isimlendirildi. Yenidoğan bebeklerin dışkı kültürlerinden sık izole edilmesi nedeniyle yeni doğan mikrobiyota üyesi olarak kabul edildi. Laboratuvar hayvanlarında hastalık oluşturması, bakterinin hayvan vücudunda toksin oluşturduğunu düşündürdü. Yeni doğanlarda bu toksini üreten bakterilerin taşıyıcılığının herhangi bir hastalık oluşturmaması, *C. difficile* tarafından üretilen toksinin insan için patojen olmadığı kabul edildi (Snyder ve diğ., 1937). Bakterinin 1978 yılına kadar toksinlerinin PMK, ishal, kolit ve ölüme sebep olduğu kanıtlanamadı (Bartlett ve diğ., 1978).

PMK ilk defa cerrahi sonrası bir komplikasyon olarak 1893 'de Finney tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra 1983 yılında Penner ve Bernheim tarafından enterokolitli 40 olguda, otopsi sonrası hastalık tanımlanmıştır (Anand,Glatt,1993). PMK, kolonun mukozal yüzeyi üzerinde gelişen psödomembranlar (multipil sarı lekeler) ile karakterizedir (şekil 1; Nelson ve diğ., 1994).



şekil 1: (A) Psödomembranöz kolit. (B) Normal kolon biopsisi



Kolon bezleri nekrotik ve iltihaplı olabilir. Submukoza'da artan vaskülatuar ve inflamatuvar hücreler nedeniyle su kaybı ve ishal ortaya çıkabilmektedir (Nelson ve diğ., 1994). Pseudomembran, bakteri toksinlerine yanıt olarak normal kolon mukoza hücrelerin yerini alan bir kabuk olarak kabul edilir (Bartlett ve diğ., 1978).

PMK 1950 yılına kadar seyrek görülürken antibiyotiklerin, yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte görülme sıklığı artmış ve yüksek mortaliteye sahip olduğu anlaşılmıştır (Bartlett ve diğ., 1978). 1960'lı yıllarda anaerobları hedef alan yeni antibiyotikler geliştirilmiştir. Klindamisin'in safra atılımı nedeniyle bağırsak enfeksiyonları özellikle anaerobların neden olduğu enfeksiyonlar için yaygın olarak kullanılması sonucu gelişen şiddetli diyare ve progresif PMK, bu ajanın yan etkisi olarak kabul edilmiştir. Klindamisin sonrası gelişen bu ishal için "klindamisin kolit" adı verilmiştir. Daha sonra aynı klinik tablonun diğer geniş spektumlu antibiyotiklerin kullanılması ile de gelişmesi nedeniyle adı antibiyotik ilişkili ishal olarak değiştirildi (Bignardi ve diğ., 1998).

*C. difficile* 'nin PMK ve antibiyotik kullanımı ile ilişkisi anlaşıldıktan sonra, ishale sebep olan toksinin bulunması için çalışmalar başlatılmıştır. İlk olarak *Clostridium sordelli* antitoksini kullanılarak toksin B'nin nötralize edilmesi ile toksin B ve daha sonra toksin A bulunmuştur. Toksinlerin saflaştırılması ve hayvan deneyleri ile toksin B'nin letal ve hemorajik etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Toksinin B'nin deney hayvanlarının interasellüler bölgeye enjekte edildiği zaman laboratuvar hayvanların çekum mukozasında ödeme sebep olduğu anlaşıldı. Toksin A'nın eşit miktarda aynı yoldan laboratuvar hayvanlarına enjekte edildiğinde fetal etki göstermediği fakat fokal hemorojiye neden olduğu anlaşılmıştır (Lyerly ve diğ., 1986).

Daha sonra yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar toksin A'nın CDE hastalığından sorumlu olduğunu düşündürmüştür. Bu amaçla saflaştırılmış toksin A intragastrik yoldan verildiği zaman CDE patolojisine benzer sonuç izlenmiştir. Ancak toksin B'nin aynı yoldan tek başına verildiği zaman hiç bir etki gözlenmemesi, toksin B'nin etkili olabilmesi için toksin A'nın varlığına gereksimin duyulduğu şeklinde yorumlanmıştır (Al-Barrak ve diğ., 1999).

Ancak 1998 yılında *C. difficile* toksin A-\B+ olan suş bir salgından sorumlu olarak bulundu ve giderek artan oranlarda izole edilmeye başlandı. Son zamanlarda yapılan deneylerden elde edilen bilgiler ışığında her iki toksinin de CDE patolojisinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Voth ve diğ., 2005), (Lyras ve diğ., 2009).

Doğal şartlarda toksin A+\B- suş şimdiye kadar izole edilmemiş ancak 2009 yılında yapılan bir çalışmada laboratuvar koşullarında toksin A+\B- mutant suşlar elde edilmiştir. Hayvan deneylerinde bu mutant suşların hamster üzerinde hafif CDE patolojisi gösterdiği gözlenmiştir. Bu araştırma sunucunda toksin B'nin *C. difficile* hastalığı için gerekli olduğu ve toksin A sinerjisine ihtiyaç olmadığı ortaya çıkmıştır (Woo ve diğ., 2005).

## 2.2. Mikrobiyolojik özellikler

*C. difficile* Clostridiaceae ailesi ve Clostridium genusunun üyesidir. Zorunlu anaerob, sporlu, peritriş flagellalı gram pozitif çomakçık olup yaşlı kültürlerde gram negatif boyanma eğilimindedir (Johnson, E. A. 1999). Clostridium genusu yüz elliden fazla türe sahiptir. Genellikle bu genusun üyeleri insanlar ve hayvanlar için patojendirler. Patojenik olan bu türler ekzotoksin oluşturarak insanlara ciddi zararlar verdikleri için iyi tanımlanmışlardır (Akan., 1993).

*C. difficile* suşları tipik olarak vejetatif formları kanlı agar besiyerinde 37°C' ısıda inkübe edildiği zaman 2-8 µm boyunda ve 0.5 eninde görülmektedir. Katı besiyerinden ise hazırlanan preparatlarda filamantöz şekilde, fakat dokudan hazırlanan prepratlarda tek tek veya kısa zincirler halinde görülürler. Sporların çapları bakteri eninden geniş olduğu için bakterinin şeklini bozar ve adeta bakteriye raket görünümünü kazandırır. Adi besiyerlerinde üreyebilir, ancak içinde kan, fruktoz ve yumurta sarısı bulunan besiyerlerinde daha kolay ürerler (Woo ve diğ., 2005; Akan , 1993; Bilgehan., 1995; Murray ve diğ., 2010).

Optimal üreme ısısı 37°C, pH 7-7,2'dir. Uygun besiyerlerinde 48 saat inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında S tipi koloniler oluşturur. koloniler genellikle büyük, gri, düzgün kenarlı, besiyerine yayılmış şekildedirlerdir. Anaerobik kuşullarda 37°C ısıda enkübe edildikleri zaman buzlu cam şeklinde görülmektedirler. Koloniler Cikloserin Cefoksitin Fruktoz Agar (CCFA) besiyerinde ekim yapıldığı zaman ultraviyole ışığı altında sarı renkte floresan yaparlar. Kanlı agar plaklarında 48 saat inkübasyon sonrası kloniler açık yeşil renkte görülmektedirler (Ondedonk ve diğ., 1995; Bilgehan ., 1994).

*C. difficile* ile enfekte olan hastaların İshal örnekleri at gübresi kokusuna benzer bir kokuya sahiptir. Bu kokunun nedeni izo-valerik asid, izo-kaproik asid ve p-kresol üretmesidir. Bu bakterinin kontamine örneklerden izole edilmesi için kullanılan ve içinde çeşitli antimikrobiyal maddeler bulunduran

Cycloserine-Mannitol Agar (CMA), Cycloserine-Mannitol kanlı Agar (CMBA), Cycloserine-Cefoxitine-Egg Yolk Agar (CCFA) gibi selektif besiyerleri kullanılır. İnsan ve koyun kanı kullanılmış besiyerlerinde hemoliz yapmaz ancak at kanı kullanılan besiyerlerde nadir olarak hemoliz yapabilir. Virulan olan suşlarda kapsül oluşumu görülür (Kıyan., 2005; Summanen., 1993).

*C. difficile*'nin antibiyotikle ilişkili ishale neden olduğunun anlaşılmasından sonra çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunu arttırmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Dışkının 70-80° C'lik benmaride 20 dakika tutulmasının veya 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırıldıktan sonra oda ısısında en az 45 dakika bekletilmesinin kontaminant çoğu bakteriyi öldürdüğü ve *C. difficile* izolasyonunu önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir (Kıyan, 2005; Knoop ve diğ.; Ondedonk ve diğ., 1995).

*C. difficile* katalaz, üreaz, lesitinaz ve lipaz aktivitesine sahip değildir. Bazı suşlar jelatini ve eskulini hidrolize eder. H<sub>2</sub>S ve indol oluşturmaz. Çoğu suş glikoz, mannitol, mellibioz ve melesitozu asit oluşturarak fermente ederken, bazı suşlar salisin, ksiloz, sorbitol ve trehaloza da etki edebilir. Laktoz, sükroz, maltoz, arabinoz, glisin, rafinoz, ramnoz üzerine etkisi yoktur (Kıyan, 2015; Koneman, 1992; Phillips ve diğ., 1981).

*C. difficile* suşlarının peritriş flajellaları yardımıyla hareket ederek kolon mukoza hücrelerine yapıştıkları düşünülmektedir. Kötü çevre koşulları ve strese yanıt olarak 2.0 µm boy ve 1.1 µm eninde spor formları oluşturur. Sporlar sanitasyon ajanları ve çevre temizleyicilere son derece dirençli olması nedeniyle, sporların *C. difficile* suşlarının hastadan başka hastaya yayılmasında önemli rolleri vardır. Oda ısısında tutulan kontamine materyalde enfeksiyöz özelliğini yaklaşık 5 ay korumaktadır (Stubbe, 2000).

Genellikle gastrointestinal sistemde bulunan diğer normal mikrobiyota üyeleri *C. difficile*'yi inhibe ederek hastalık oluşturmamasını önler. Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine maruz kalan hastalarda mikrobiyotanın bozulması sonucu *C. difficile* çoğalarak gastrointestinal hastalık yapabilir. Bu bakterinin özelliği çevre şartlarına dayanıklı ve yıllarca canlı kala bilir olmasıdır. Bulaş fekal-oral yolla gerçekleşmektedir, Hastane aletleri ve sağlık çalışanları aracılığıyla bulaşlar görülmektedir (Vonberg, 2008).

## 2.3. Virulans faktörleri

### 2.3.1. Ekzotoksinler:

Bakteri kromozom kontrolünde 3 ekzotoksin sentezlemektedir.

#### 2.3.1.1. Toksin A

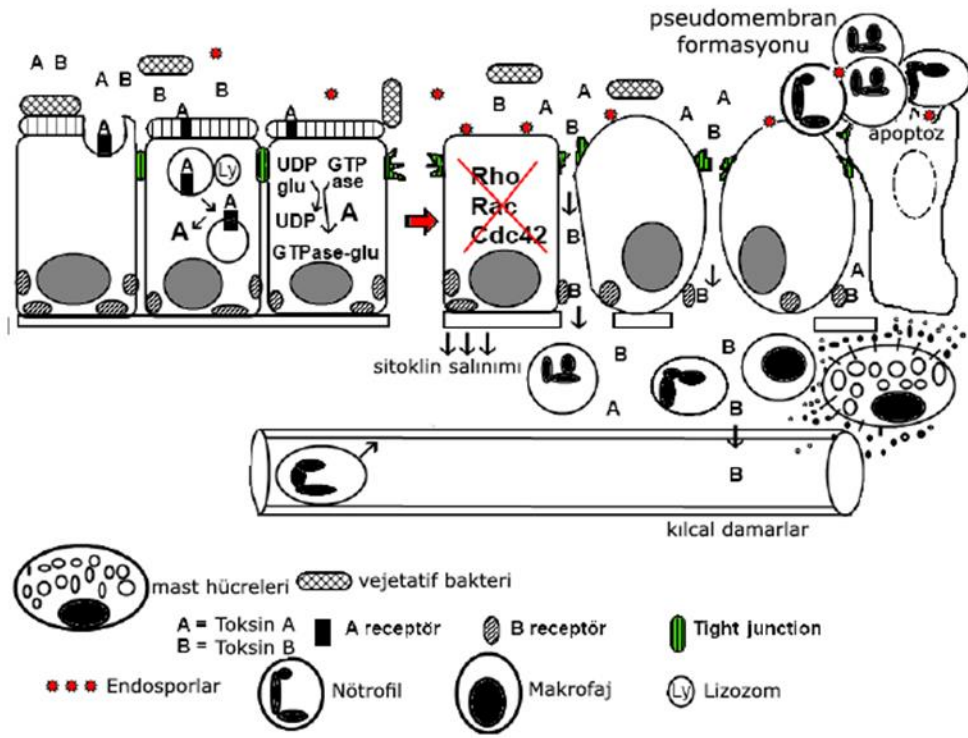
Toksin A enterotoksin, sitotoksik, tavşan eritrositlerinde hemaglutinasyon gibi özelliklere sahiptir ve konak hücre yüzeyindeki glikoprotein yapısındaki özgül reseptörlere bağlanmaktadır (Wolfhagen ve diğ., 1994). Fibriler aktini değiştirerek konak hücrede yuvarlaklaşmaya neden olur. Kolon mukoza hücreleri arasındaki bağlantılar kopar ve yaygın harabiyet ortaya çıkar. Sonuçta, bağırsaktan lümen proteinden zengin bir eksuda sızar. Oluşan harabiyet toksin B'nin mukoza hücrelerine penetre olmasını daha da kolaylaştırır (Kıyan, 2005). Toksin A ve B'nin saflaştırılması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Sullivan ve ark. (Sullivan ve diğ., 1982) DEAE ion-exchange chromatography yöntemi ile toksin A'nın 440-500 kDa molekül ağırlığında olduğunu ileri sürmüşlerdir. Barrossco ve ark. (Barrasso ve diğ., 1990), toksin A'nın molekül ağırlığını 308 kDa olarak bildirmişlerdir. PMK'in ilk semptomu olan ve bağırsak mukoza hücrelerinde ortaya çıkan hasar sonucu oluşan diyarenin nedeni yüksek olasılıkla toksin A'dır (Salyers, 1994).

Toksin A nötrofiller için kemotaktik özellikte olup, sitokinlerin salınımı ile ileuma polimorfonükleer nötrofillerin infiltrasyonunu uyarır. Ayrıca hücreler arası sıkı bağlantının bozulmasına neden olarak sitopatik etki yapar ve bu bağırsak duvarında permeabilite artışı ve ishale neden olur (Murray, 2010)(şekil 2). Enterosit yüzeyindeki reseptörler doğumda henüz olgunlaşmamış olup toksin bağlama kapasiteleri çok düşüktür. Hayatın ilk üç haftasında yavaş yavaş yapısal olgunluğa erişir ve bebek 30-40 günlük olduğunda toksin bağlama kapasitesi erişkinlerdeki düzeye gelir. Bu durum sağlıklı yenidoğanlarda toksijenik *C. difficile* suşlarının, sık olarak (%60-70) izole edilmesine rağmen hastalığın görülmemesini açıklamaktadır (Jones, 2013). Toksin A, enterositler dışındaki diğer hücreler üzerine de etki gösterebilmektedir. Makrofaj ve mast hücrelerini aktive edip, nötrofillerin hareketine neden olmaktadır. Toksin A insan kan grubu antijenleri olan I, X, Y içeren birçok farklı reseptörlere de bağlanabilmektedir. X antijenleri PNL'lerin yüzeyinde bol miktarda bulunmaktadır (Tabaqchalli,1995; Salyers,1994; Gilbert, 1987; Bartlett,1992).

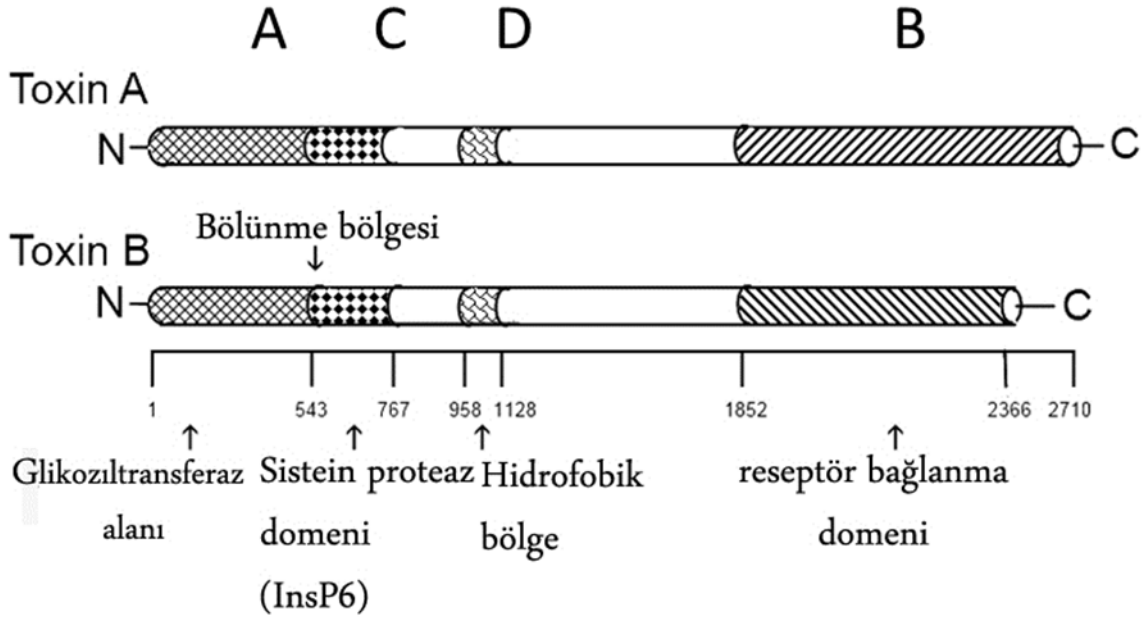
*C. difficile* tarafından salgılanan toksinler kolera toksini ve *E.coli'nin* ısıya duyarlı enterotoksini gibi diğer bakteriyel toksinlerle bazı ortak özelliklere sahiptir. Kolera ve *C. difficile* toksinleri için ana hedef konak hücrelerdeki mikroflamanlardır (Salyers, 1994; Hatheway, 1988).

### **2.3.1.2. Toksin B**

Toksin B bir çok memeli hücrelerinde apoptozu indükleyen bir sitotoksindir. Toksin B'nin sitotoksik etkisi hücre iskeletinin bozulması sonucu hücrenin yuvarlaklaşması ile sonuçlanan filamentöz aktin depolimerizasyonu ile olur. Sullivan ve ark. (Sullivan ve diğ,1982) DEAE ion-exchange chromatography yöntemi ile toksin B'nin 360-470 kDa molekül ağırlığında olduğunu ileri sürmüşler, Barrossco ve ark. (Barrasso ve diğ., 1990), toksin B'nin molekül ağırlığını 270 kDa olarak bildirmişler. Toksin B'nin sitotoksik etkisi toksin A'ya göre 100-1000 kat daha fazladır. Kolon mukoza hücrelerinde toksin B için spesifik reseptör bilinmemektedir ancak epitel hücrelerin bazoterale tarafında ve bir çok ökaryotik hücrede reseptörlerinin olduğu bilinmektedir.



**Şekil 2: Toksinlerin mukoza hücreleri üzerine etkisi**



**Şekil 3: Toksin A ve B domenlerinin ABCD modeli**

### 2.3.1.3. Binary toksin

İlk olarak 1988 yılında Popoff ve ark. PMK'lı bir hastadan izole etiklerini açıklamışlardır. (Popoff ve diğ., 1988; Perelle ve diğ., 1997; Stubbs ve diğ., 2006). Bu kökenin (CD 196), aktin spesifik ADP-ribozil transferaz ürettiği ve *C.perfringens'in* I-toksin'ine aktivite yönünden, *C.botulium* ADP-ribozil transferaz C3 (Aktories ve diğ.,1987) ve *Clostridium spiroforme* toksinine (CST) (Simpson ve diğ., 1989). yapısal benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

Toksin protein yapısında 2 alt biriminden oluşmuştur (cdtA ve cdtB), enzimatik komponent cdT a (48 kDa) ve bağlanma komponenti cdT b (99 kDa) olarak adlandırılmıştır. Bağlanma komponenti, hücre yüzey reseptörüne sahiptir. Enzimatik komponent, hücre içinde aktinin ADP'sinin ribozillenmesini katalizleyerek hücre iskeletinin bozulmasına sebep olmaktadır (Rupnik ve diğ.,2003; Gonçalves, 2004). Sitotoksik etkisi, Vero hücrelerinde yuvarlaklaşma ve aktin flamanında depolarizasyon varlığıyla gösterilebilir. *Binary* toksin geninin tanımlanması, *C.difficile* izole edilen semptomatik hastalarda bazı nontoksijenik A-/B- kökenlerin oluşturduğu ciddi kliniği açıklamaya yardımcı olmuştur. Bu toksine sahip kökenlerin prevalansı çeşitli çalışmalarda %1.6-%5.5 olarak bildirilmekte olup bu toksinin patogenezdaki rolü hala araştırılmaktadır(Rupnik ve diğ.,2003; Gonçalves, 2004).

### 2.3.2. Diğer virülans faktörleri

*C. difficile* suşları toksin üretimi yanısıra hidrolitik ve proteolitik enzimler, fimbrialar, ve kapsül dahil olmak üzere virülans faktörlerine sahiptir (Seddon ve diğ., 1992; Borriello ve diğ.,1998; Janoir ve diğ., 2007). Hidrolitik ve proteolitik enzimlerin konak hücrenin parçalanmasında ve bakterinin kolon epiteline yapışarak, kolonize olmasında yardımcı oldukları düşünülmektedir. Bu enzimlerin aynı zamanda barsakta bulunan bakterilerin üremesi için gerekli besinlerin açığa çıkmasında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (Seddon ve diğ., 1990,; Janoir ve diğ., 2007).

Fimbria varlığı *C.difficile* suşlarının yaklaşık üçte birinde gösterilmiş olup bakterinin kolon muzokasına adhere olmasında rolü vardır (Borriello ve diğ.,1990). Polisakkarit kapsül ise nötrofiller tarafından opsonizasyonu önler ve konakda virülansı artırmaktadır.

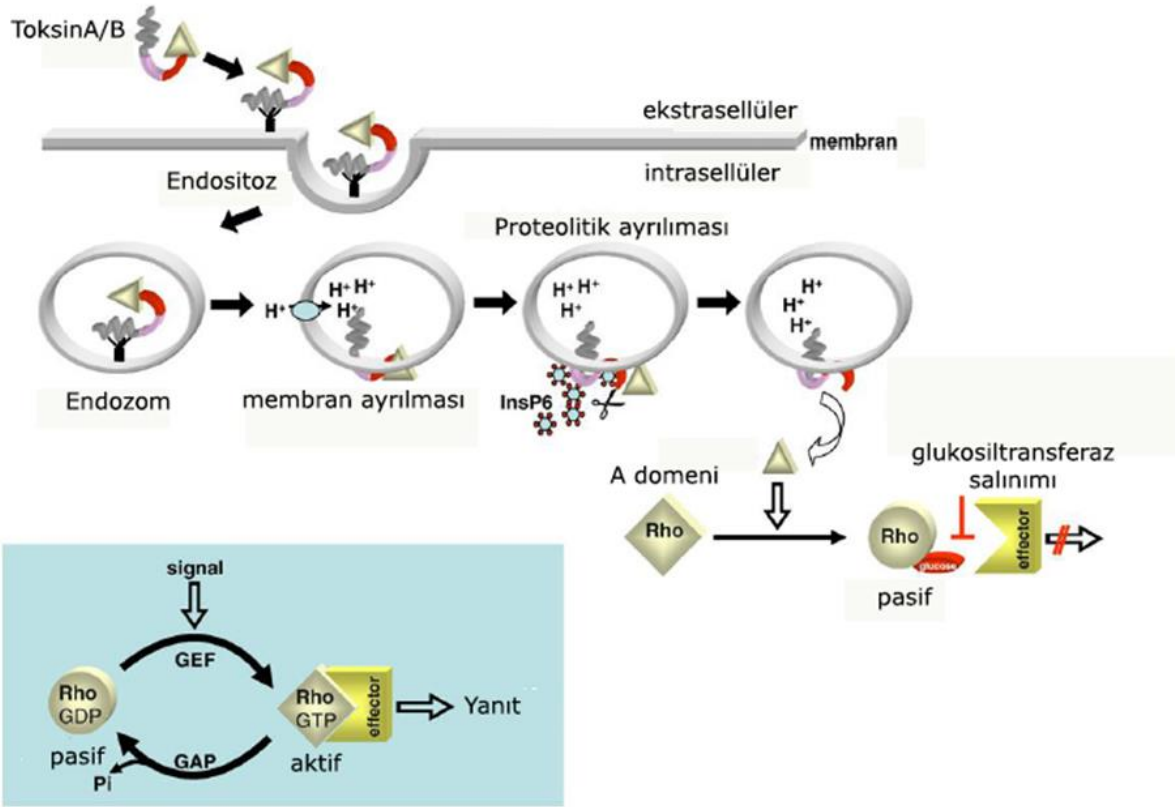


## 2.4. Patogenez

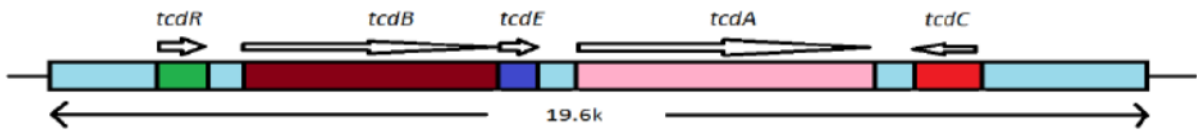
*C. difficile*'nin yapmış olduğu hastalıkta ürettiği A ve B toksinlerinin hastalık patogenezinde önemli rolleri vardır. İki toksin de ısıya dayanıklı ve yüksek ağırlıklı moleküle sahip proteinlerdir. Bu bakteri ADP-ribolize eden toksin benzeri diğer toksinleride olduğu belirtilmiştir ve invitro olarak bazı ekstarselüler enzimleri ilerleyen araştırmalarla anlaşılmıştır. Ancak, bunların hastalığın patogenezinde rolleri hezüz tam olarak belirlenmemiştir (Poxton, 2001; Rupnik ve diğ., 2001). Bunlara ek olarak flajellar proteinler, yüzey proteinleri ve yüzey adezinlerinin bakteri kolonizasyonunda rol oynadığı düşünölmektedir (Giannasca ve diğ.,2004).

Ana virölans faktörleri klostridial toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)dir. Bu toksinler hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerinin glikozilasyon ile inaktive ederler. Ras ve Rho proteinlerinin inaktive olması sonucunda hücre iskeletinin bozulmasına, hücreler arasındaki bağlarının kopmasına ve permabilite artışı ile birlikte sekretuar ishal oluşumuna neden olmaktadır (şekil 2). Toksin A ve B sentezi bakteri kromozomundaki patojenik lokus genom bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır (şekil 3). Bu bölge *tcdA*, *tcdB*, *tcdC* ve *tcdR* ve *tcdE* genlerini içermektedir. Patojenik lokus genomünün görevi toksin A ve toksin B'nin sentez ve düzenlenmesini sağlamaktadır. Patojenik olmayan *C. difficile* suşları patojenik lokus gen bölgesine sahip değillerdir. (Johnson ve diğ.2009).

*TcdR* regülator bölge olup toksin gen ekspresyonunda önemli bir alternatif sigma faktörüdür. *Tcd* negatif bir düzenleyicidir ve *tcdC*, gen ekspresyonu için gerekli olan korRNA polimeraz ile *TcdR* arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini göstermektedir. Bu nedenle *tcdC* anti-sigma faktör olarak bilinmektedir. *TcdE*'nin işlevleri henüz tam olarak bilinmemekte ve hücrelerden toksin salınımında etkisi olduğu düşünölmektedir (Carter ve diğ., 2012).



Şekil 4: Toksinlerin ökaryot hücreler üzerinde etkisi (Belyi and Aktories 2010)



Şekil 5: Patojenik lokus genom diyagramı (Voth et al .2005)

## 2.5. Epidemiyoloji

*C. difficile* enfeksiyonları antibiyotik ilişkili diyarelerin %10-15' inden sorumludur. Taşıyıcılık oranları büyük farklılık göstermektedir. Bakteri %2-3 oranında sağlıklı kişilerin, %40-60 oranında da hastanede doğmuş olan yenidoğanların kolon florasında bulunabilmektedir. İnsanlar bakteriyi veya sporları asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabilirler. 2000'li yılların başlarında CDE epidemiyolojisi dramatik olarak değişmiş, hastalığın sadece insidansi artmakla kalmayıp mortalitesi de önemli ölçüde artmıştır. *C. difficile* esas olarak hastane enfeksiyonlarına neden olmakla birlikte, hastane dışı enfeksiyon da yapabilmektedir. Ancak, hastane dışı enfeksiyonların epidemiyolojisi çok iyi bilinmemektedir (Kuipers ve diğ., 2008).

Mikroorganizmanın insana geçişi fekal- oral yol ile olur. *C. difficile* sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak bulunur ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur (Kuipers ve diğ., 2008). Kedi, köpek, at, eşek, inek, deve gibi birçok hayvanın kolon florasında olmakla birlikte, insana bulaşta hayvan rezervuarlarının önemi yoktur (Balows ve diğ., 1991; Knoop ve diğ., 1993). Salgınlar sırasında yenidoğan servislerindeki küvözlerden, yoğun bakım servislerinin yer döşemesi, havalandırma tesisatları, banyo küveti, lavabo ve tuvalet taşı gibi yerlerden alınan örneklerden, hasta odalarındaki nevresim, mobilya yüzeyi ve telefon tuşları yanında stetoskop, termometre ve hastane personelinin ellerinden yapılan kültürlerde *C. difficile* izole edilmiştir (Ananthakrishnan ve diğ., 2011; Kuipers ve diğ., 2008; Gravel ve diğ., 2008; Freeman ve diğ., 2010). Taşıyıcılık oranları sağlık personeli, hastanede yatan ve antibiyotik alan altta yatan ciddi hastalıkları olan hastalarda daha yüksektir. (Giannasca ve diğ., 2004; Barbut ve diğ., 2001). Uzun süreli hastanede yatan hastaların yaklaşık üçte birinde asemptomatik *C. difficile* taşıyıcılığı saptanmıştır (Simor ve diğ., 2002). Hastane kaynaklı enfeksiyonların yanında toplum kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonları tüm dünyada gösterilmeye başlamıştır. ABD'de her yıl 100.000 kişide 6.9-46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu saptanmaktadır. Retrospektif bir çalışmada Kuzey Carolina'da toplum kaynaklı *C. difficile* oranının 2005 yılında %20 olarak tahmin edildiği ve bu oranın Avrupa ve Kanada'da benzer olduğu bildirilmiştir (McCollum ve diğ., 2012)

Hem Kanada hem de ABD’de epidemik izolat olarak bilinen ribotip 027 en sık izole edilen ribotiptir. Ribotip 027 diğer izolatlardan 16-23 kat daha fazla toksin A ve B salgılamaktadır ve üçüncü toksin olan binary toksin oluşturmaktadır. Şu ana kadar çok sayıda ABD’nin 40 eyaletinden ve Kanada’dan ribotip 027 nedenli olgular ve salgınlar bildirilmiştir. Ribotip 027 haricinde ABD’de ribotip 106 ile oluşan CDE ve salgınları artan oranda bildirilmeye başlamıştır (Ananthakrishnan ve diğ.,2011).

## **2.6. Risk Faktörleri**

İleri yaş, hastanede yatış ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Klindamisin, geniş spektrumlu üçüncü kuşak sefalosporinler ve florokinolonların kullanılması en yaygın risk faktörü olarak bilinmektedir (O’Donoghue ve diğ., 2011). Kullanılan antibiyotiklere bağlı kolon mikrobiyotası buzularak, diğer anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmakta ve baskın hale geçen *C.difficile* sporları vejetatif forma dönüşerek toksin salgılamaktadır (Leclair ve diğ., 2010). Kolon mikrobiyotaya üyelerini etkilemeyen aztrenom gibi dar spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı CDE için risk oluşturmamaktadır (McCollum DL ve diğ.,2012). Aminoglikozidler hariç diğer antibiyotiklerin asemptomatik kolonizasyon oluşturma riski mevcuttur (Johnson ve diğ., 2011).

Genel olarak yaşlılıkla birlikte immün sistemde zayıflamaya bağlı olarak da enfeksiyon geliştiği düşünülmektedir ayrıca hastanede bir hafta yatan hastalarda *C. difficile* ile kolonize olma oranı %15 iken, üç hafta kalan hastalarda bu oran %45’e çıkmaktadır (Leclair MA ve diğ., 2010). Bu üç risk faktörü haricinde, proton pompa inhibitörü kullanılması, inflamatuvar bağırsak sendromu, immün süpresyon, tüp ile beslenme, kronik karaciğer hastalığı ve son, dönem böbrek yetmezliği ve hamilelik de CDE gelişimi için risk faktörlerindedir.

Tablo 1: *C. difficile* ile ilişkili diyarelerde risk faktörleri

***C. difficile* enfeksiyonu için risk faktörleri**

- İleri yaş
- Genetik olarak düşük immün yanıt
- Antibiyotik kullanımı
  - Klindamisin
  - Sefalosporin
  - Florokinolon
- Hastanede uzun yatış süresi
- Sağlık yardımı alanlar
- İnvaziv girişim ve cerrahi yapılan hastalar
- Mide tüpü taktıran hastalar
- Proton pompa inhibitörü kullanma

## 2.7. Klinik

CDE asemptomatik taşıyıcılık, kendini sınırlayan ishal, şiddetli ishal, PMK, toksik megakolon, hatta ölüme kadar giden birçok klinik tabloya yol açmaktadır. Klinik tabloda görülen bu farklılıklar, suşlar arasındaki farklılardan, konaktaki toksin reseptörlerinin farklılığından ya da kişinin bakteriye gösterdiği immün yanıt farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Antibiyotik ile ilişkili diyare semptomları antibiyotik tedavisi sırasında veya tedavi sonlandıktan sonraki sekiz hafta içinde ortaya çıkabilmektedir (Ovaran ve diğ., 1996; Simor ve diğ., 2010).

### 2.7.1. Asemptomatik Kolonizasyon

Aseptomatik olarak *C. difficile* ile kolonize olan bireylerde klinik tablo oluşmamaktadır. Yapılan dışkı kültürde toksin pozitif *C. difficile* üremesi olmaktadır. Özellikle hastanelerin yüksek riskli bölümlerinde yatan (Onkoloji, Yoğun Bakım Üniteleri gibi) ve antibiyotik alan hastaların %10-16'sı *C. difficile* ile kolonize hale gelebilmektedir (Johnson ve diğ., 2009).

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 etmektedirler.

Asemptomatik taşıyıcılar toksin A'ya karşı yüksek antikor titrelerine sahiptirler ve antibiyotiklere maruz kaldıklarında şiddetli semptomlar göstermezler (Salcedo ve diğ., 1997). Toksin spesifik antikorlar hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak toksin A ve B'nin bağlanmasını ve hastalığın oluşumunu engellemektedirler (Kelly ve diğ., 1992).

### **2.7.2. *Clostridium difficile* Diyaresi**

Genellikle karın ağrısı eşliğinde hafif veya orta derecede seyreden ishal şeklinde görülmektedir. Halsizlik ve ateş nadir olarak görülmektedir. Antibiyotik tedavisi esnasında, kısa bir süre sonra veya 8 hafta sonraya kadar oluşabilmektedir. En önemli laboratuvar bulguları lökositöz ve hipotalbüminemidir (Johnson ve diğ., 2009).

### **2.7.3. *Clostridium difficile* Koliti**

*C. difficile* enfeksiyonları içinde en sık karşılaşılan klinik tablodur. Hastalarda hafif ve orta şiddette karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık ve sulu ishal şeklinde vardır. Sigmoidoskopide özgül olmayan yaygın veya yama tarzında psödomembransız eritematöz kolit tablosu görülebilmektedir. Günde 10'dan fazla dışkılama görülebilmektedir ve antibakteriyel ajanın kesilmesi ile ishal sıklıkla son bulmaktadır (Johnson ve diğ., 2009).

### **2.7.4. Psödomembranöz Kolit**

*C. difficile* kolitinin klasik tipi olarak bilinmektedir. *C. difficile* kolitinden daha ağır seyreder; hastalarda şiddetli ishal ile birlikte sağ veya sol alt kadranda yoğun bir rahatsızlık hissi vardır. Klinik olarak daha belirgin ishal, karında duyarlılık ve sistemik bulgularla karakterize olan 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 kolonda lokalizedir. Dışkıda eritrosit ve lökosit saptanabilir. Beyaz kan hücresi sayısı 20.000/µl üzerinde albümin seviyesi ise 3.0 g/dl veya daha az olarak izlenmektedir. Tedavi edilmeyen olgularda ölüm görülebilir (Vaishnavi ve diğ., 2010).

### **2.7.5. Fulminant psödomembranöz kolit**

Daha az görülen bir formdur. Hastalarda letarji, ateş, taşikardi, şiddetli karın ağrısı mevcuttur (McCollum ve diğ., 2012). Toksik megakolon gelişirse dışkılama sayısı azalır veya hasta hiç dışkı çıkaramaz. Fizik muayenede akut karın bulguları mevcuttur. Kolon perforasyonu, peritonit tablosu hatta ölümlerle sonuçlanabilir (Doing KM ve diğ., 2012). Zayıf prognozlu hastalarda peritonit belirtisi olabilecek şiddetli karın ağrısı veya 50.000/µl üzerinde beyaz kan hücre sayısı veya 5 mmol/l üzerinde laktat saptanmaktadır. Hastalığın kontrol altına alınmasında erken tanı ve tedavi büyük önem taşımaktadır.

### **2.7.6. Rekürent CDE**

Rekürrent CDE vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkması tablosu olarak adlandırılır. CDE'li hastalarda %20 oranında rekürrent görülmektedir. Olguların %40'ında ikinci rekürrent, %60'ında üçüncü rekürent görülebilmektedir. Antibiyotik kullanımının devam etmesi, antiasit kullanılması ve ileri yaş rekürrent CDE gelişimi için önemli risk faktörleri olarak bilinmektedir. Yara, eklem enfeksiyonları ve bakteremi, gibi klinik tablolar da oluşabilmektedir. (McCollum DL ve diğ., 2012).

## **2.8. Tanı**

Hastane kaynaklı CDE'lerinin kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından doğru, güvenilir ve hızlı tanı testlerinin uygulanması gereklidir. Bu etkenin tanısı , klinik bulgular ve laboratuvar testleri temelinde olmaktadır. Sadece toksijenik suşların patojen olması nedeniyle dışkı örneklerinden toksin aranması önemlidir.

Antibiyotik ile ilişkili nozokomiyal ishal gelişen hastaların yaklaşık %30'unda neden CDE olduğu için tanısız testler yapılmadan empirik tedavi uygulanması uygun değildir (Cohen SH ve diğ., 2010). Hastalarda 36 saatte en az altı kez sulu ishal, 48 saat içinde sekizin üzerinde şekilsiz ishal veya iki gün için günde üç kez şekilsiz ishal olması klinisyenlere CDE varlığını düşündürmelidir (Gerding ve diğ., 1995).

CDE tanısı için referans yöntemler hücre kültüründe sitotoksisite testi ve toksijenik kültürdür. Ancak her iki yöntem de uzun zaman almakta, uzman teknik personel ve özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Bu nedenle duyarlılığı düşük olmasına rağmen bunların yerine glutamat dehidrojenaz

(GDH) ve toksinleri tespit eden enzim temelli immünolojik yöntemleri tercih etmektedir. Son zamanlarda ise direkt olarak dışkıdan etkeni tanımlayan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi geliştirilmiştir (roll KC ve diğ., 2011).

Laboratuvara tanı için gönderilen dışkı örnekleri temiz, kapaklı ve kuru bir kaptaki ve herhangi bir sıvı eklenmeden gönderilmelidir. Toksin araştırma testi için rektal sürüntü tavsiye edilmemesine rağmen ishali olmayan ileuslu hastalarda örnek olarak kullanılabilir. Genellikle semptomlar başladığı zaman alınan bir veya iki dışkı örneği tanı için uygundur. Eğer birinci örnek negatif ise ikinci bir örnek ile testin tekrarlanması faydalı olabilir. Üç farklı dışkı örneğinin test edilmesi pozitiflik olasılığını %10 civarında artırmasına rağmen maliyeti yükselttiğinden dolayı tavsiye edilmemektedir (Doing ve diğ.,2012; Cohen ve diğ.,2010).

### **2.8.1. Kültür**

CDE tanısında kullanılan yöntemlerden biri kültürdür. Bu bakteri için kültür çok duyarlı ama spesifik değildir çünkü toksin üretilmediği zamanda da mikroorganizma kolonizasyonu saptanır. Buna ek olarak olumlu bir sonuç almakda birkaç gün sürer. Bu nedenle izolat toplamak sadece epidemiyolojik araştırma için kullanılır.

Agar plaklarının ekim yapılmadan önce anaerobik koşullarda bekletilmesi bakterinin üremesini artırmaktadır. *C. difficile* kanlı agar besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında, hemolizsiz, at dışkısı kokusunda , sarı-yeşil renkte floresan veren 2 mm çapında koloniler oluşturmaktadır

*C. difficile* kültürü için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında seçici besiyeri olarak genellikle sikloserin, sefoksitin, ve fruktoz içeren CCFA besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerine lizozim ve taurakolat eklenmesi ile sporların vejetatif forme dönüşümü üretimi arttırılmaktadır. Besiyerinde anaerob ortamda 24-48 saat inkübasyon sonunda düz yüzeyli, sarı, buzlu cam görünümünde ve etraflarında sarı hale bulunan koloniler oluşturur. Neutral red indikatörlü CCFA besiyeri , wood lambası ışığında incelendiği zaman yaklaşık 3 mm çapında ve altın sarısı renginde floresan veren koloniler görülmektedir.

Kolonilerin P-krezol, volatil yağ asitleri ve izokaproik asitlerden dolayı kendilerine has at ahırı kokusunu andıran kokusu vardır. Gram boyalı preparatlarda tipik olarak gram-pozitif veya bazen gram negatif, sporlu çomakçık olarak görülmektedir.



CCFA dışında sikloserin mannitol kanlı agar (CMBA) ve çeşitli kan ürünlerinin ilavesi ile hazırlanan CCFA'lar da *C. difficile* izolasyonu için kullanılmaktadır. Dışkı örneklerinin ısı veya alkolle muamele edilmesi ile *C. difficile* izolasyon oranında artış sağlanabilmektedir. İzole edilen *C. difficile* suşlarının toksijenik olup olmadığı toksijenik kültür yöntem, hücre kültürü sitotoksitesi ile saptanmaktadır (rroll ve diğ., 2011).

## **2.8.2. İmmünoagnostik Testler**

### **2.8.2.1. Lateks Aglütinasyon**

*C. difficile* suşlarında bulunan glutamat dehidrogenazı da saptamaktadır. Glutamat dehidrogenaz enzimi bakteri metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu enzim immünojenik olup memeli hücreleri ve diğer bakterilerde bulunabilmektedir.

Bu nedenle yalancı pozitiflik oranı yüksektir. Tarama testi olarak uygun olup pozitif sonuçların doğrulanması gereklidir. (Huovinen ve diğ., 1990; Knoop ve diğ., 1993).

### **2.8.2.2. EIA**

Dışkı örneklerinde toksin aramaya yönelik geliştirilmiştir ve ilk olarak toksin A veya toksin A ve B'yi tespit etmek için kullanılmıştır. Bu yöntem referans yöntemine göre daha kolay, hızlı, düşük maliyetli olması nedeniyle birçok laboratuvar rutin olarak kullanılmaktadır. Altın standart yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %60-81 ve özgüllüğü %91-99 olarak Eastwood ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Dışkı örneklerindeki 100-1000 pg oranındaki toksin miktarını saptayabildiği için yalancı negatiflik oranı yüksektir.

Toksinler dışında, toksin oluşturan ve oluşturmeyen tüm suşların ürettiği metabolik enzim olan GDH'yi saptayan EIA testleride mevcuttur. Bir çok laboratuvar iki basamaklı algoritmayı kullanmaktadır. İlk basamak GDH testi pozitif olan örnekler toksin testi yaparak tanı konulmaktadır. GDH testi negatif ise ileri bir test yapılması önerilmemektedir (Laughon ve diğ., 1984; Crobach ve diğ., 2009; Eastwood ve diğ., 2009).

### 2.8.3. Moleküler Yöntemler

Nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleri *C. difficile* tanısında son dönemlerde sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde PCR ve loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) temelli yöntemler kullanılmaktadır (Johnson ve diğ., 2009; Doing ve diğ., 2012)

Polimeraz Zincir reaksiyonu klinik örneklerdeki az miktardaki *C. difficile* DNA'sının polimeraz enzimiyle amplifikasyonu sonucunda saptanabilir hale getirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu amaca uygun olan DNA problemleri geliştirilmiştir. Toksik genin suşların toksin gen bölgesini içeren primerler kullanılarak farklı PCR temelli uygulamalar yapılarak duyarlılık artırılmaktadır. Bu yöntemde uygun çift primer seti kullanıldığı zaman toksin A+/B+, toksin A-/B+, toksin A-/B-, binary toksin + suşlar birbirinden ayırt edilebilmektedir (Carroll ve diğ., 2011; Stamper ve diğ., 2009).

BD-GeneOhm Cdiff yönteminde manuel DNA ekstraksiyonu sonunda Cepheid SmartCycler cihazı ile amplifikasyon işlemi yapılmakta ve iki saat sonunda sonuç alınmaktadır. ABD'deki laboratuvarlarda en çok çalışılan moleküler testtir. Duyarlılığı %84-96, özgüllüğü ise %94-99 arasında değişmektedir (Johnson ve diğ., 2009). Bu yöntemin DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve PCR işlemlerinin hepsi kartuş içerisinde gerçekleşir ve en büyük avantajı 30 dk-2 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesidir. Moleküler yöntemlerin zahmetli olmaları yanısıra, tecrübeli eleman ve uygun alt yapı gerektirmeleri dezavantajları olarak sayılmaktadır. Loop-loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemi PCR dan farklı olarak toksin A'yı tespit etmekte ve DNA'yı çoğaltmak için gerçek zamanlı PCR teknolojisi kullanılmamaktadır. PCR ile karşılaştırıldığında, basit, hızlı, özgül ve ucuz bir yöntemdir. LAMP teknolojisinde uygun primerlerin kullanımı ile DNA amplifikasyonu belirli bir ısı altında (60-65°C), termal döngü cihazı gerektirmeden gerçekleştirilmektedir. Amerikan Mikrobiyoloji Cemiyeti CDE tanısında tek başına NAA yöntemlerinin kullanılmasını önermektedir (Boyanton ve diğ., 2011; Bruins ve diğ., 2011).

### 3.8.4. Hücre Kültürü Sitotoksinite, Toksik gen kültür ve sitotoksin nötralizasyon Yöntemleri

*C. difficile* toksin varlığını araştırmada dışkı örneklerinde 10 pg'lik sitotoksin miktarlarını saptayabilen doku kültürleri altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem ile toksin B'nin 1.0 pg miktarı tespit edilebilir. Toksin

varlığının *C. difficile* veya çapraz reaksiyon veren *Clostridium sordellii* antitoksini ile doğrulanması gerekmektedir. Sitotoksin tespitinde Vero, Hep 2, HeLa ve MRC-5 akciğer fibroblast hücre kültürleri kullanılmaktadır. Özgüllüğü>%97, duyarlılığı %75-85 arasında olmasına rağmen, pahalı, zaman alıcı olması ve iyi gelişmiş laboratuvar gerektirdiğinden rutin laboratuvarlar tarafından tercih edilmemektedir(Simor ve diğ., 2010).

Toksijenik kültür yönteminde taze dışkı ısı ve alkol ile yapılan işlem sonrası, selektif sikloserin sefoksitin fruktoz anaerobik agar besiyerine ekim yapılır. Oluşan koloniler Wood ışığı lambası altında incelenir. Floresan veren koloniler alınıp ve beyin kalp infüzyon buyyona pasaj yapıldıktan sonra 24 saat 35-37°C'de inkübe edilir. Bu kültür invitro toksin araştırılması için kullanılır. Üreyen suşların toksin yayıp yapmadığı kontrol edilmelidir. Yapılan araştırmalar bu yöntemin sitotoksin nötralizasyon kadar spesifik olmadığını göstermektedir.

Son zamanlarda ise yapılan sitotoksin nötralizasyon yöntemi 10 pg'lik sitotoksin düzeylerini saptayabilen bir yöntemdir. Sıvı dışkı örnekleri santrifüj edilir ve süpernatant filtrelerden geçirilir. Daha sonra dilue edilerek hücre dizilerinin üzerine eklenir. Hücre dizileri 37°C de 24-48 saat anaerob inkübasyondan sonra ışık mikroskopunda sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Hücre dizilerine nötralizan antikolar (anti-*C.sordellii* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar.

## **2.9. Tedavi**

Bu bakteri normal mikrobiyota üyesi olduğundan çok fazla konak savunması ile karşılaşmaz. Bu nedenle tedavide en önemli girişim hastalığa sebep olan antibiyotiğin kesilmesidir. Orta şiddetteki olguların %25 inde 48 saat içinde semptomlarda azalma görülmektedir. Tedavi esnasında hastalara sıvı ve elektrolit desteği verilmelidir. Eğer antibiyotik devam zorunluğu varsa klindamisin, sefalosporinler veya geniş spektrumlu penisilin dışındaki antibiyotiklerin tercih edilmesi önerilmektedir ve Antiperistaltik ajanlardan kaçınılması gerekmektedir. Diğer önemli husus bu hastalarda enfeksiyonun diğer hastalara bulaşmamasına dikkat edilmesidir. Bu hastalarda temasta olan doktor ve hemşireler her temastan sonra ellerin su ve sabunla yıkamaları gerekir.

Hafif şiddetli hastalarda sıvı ve elektrolit takviyesi yeterlidir. Ancak şiddetli hastalarda tedavi gerekmektedir. Ancak bazı yayınlarda hafif ve orta şiddetli

olgularda başlangıç tedavisi olarak 500mg metronidazol günde üç kez, 10-14 süreyle gün kullanılması önerilmektedir. Metronidazol intoleransı veya alerjisi olanlar, hamile veya emziren kadınlar ile şiddetli enfeksiyonu olan hastalarda, 125 mg vankomasini günde dört kez 10-14 oral olarak kullanmaktadır.

hastanın durumu ciddi ve komplike ise, 500mg vankomisin günde dört kez oral yoldan veya nazogazstrik tüp artı 500mg intra venuz Metronidazol her sekiz saatte bir verilmelidir ( Moyenuddin ve diğ., 2002, Kelly ve diğ., 2012).

FDA 2011 yılında yeni bir geniş spektrumlu makrolid olan fidaksomisin'in *C. difficile* nedeni ishallerin tedavisinde kullanılmasına izin vermiştir. Bu antibiyotik ile tedavi maliyeti bakımından pahalı olmasına rağmen, yüksek riskli hastalarda rekürrent *C. difficile* enfeksiyon oranını düşürdüğü için önerilmektedir. Fidaksomisin günde iki defa 200mg oral olarak 10 gün süreyle uygulanmalıdır.( Kelly ve diğ., 2012)

Antibiyotik tedavisine alternatif olarak, probiyotikler ve mikrobiyota transferi, uygulanabilmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda probiyotiklerin kullanılmasının kolon mikrobiyotasının ekolojik dengesini sağlayarak CDE önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Fekal transplantasyon kolon mikrobiyotasını tamir ve düzenlemek amacıyla sağlıklı vericilerden alınarak uygulanmaktadır. *C. difficile* kolonizasyonunda immün yanıt önemli olduğu için intravenöz immünoglobulinlerde tedavi amaçlı olarak uygulanabilmektedir.

## **2.10. Korunma**

*C. difficile* nozokomiyal bir etken olması sebebi ile barsak mikrobiyotasını bozulmasına sebep olan antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması önemlidir. Antibiyotik kullanıldığı zaman dar spekturumlu antibiyotiklerin tercih edilmesi ve bu etkenin bir hastada saptandığı zaman çapraz enfeksiyonu önlemek için enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumun artırılması gereklidir. Hastanelerde temas izolasyonu, uygun çevre temizliği ve el yıkama ile *C. difficile* kaynaklı ishaller önlenebilmektedir (Çaylan,2008).

Son olarak bu hastalar ile yakın temasta olan hastane çalışanları ve hasta yakınlarının el yıkama konusunda bilinçlendirilmesi, hasta bakımı sırasında eldiven takılması, rektal ve enterik girişimlerin mümkün olduğu kadar tek kullanımlık aletler ile yapılması ve hasta odalarının dezenfektanlarla temizlenmesi, diğer koruma örnekleri olarak sayılabilir ( Salyers ve diğ., 1994).

## **3- Gereç ve yöntem**

### **3.1. Gereçler**

#### **3.1.1 Glutamat dehidrogenaz EIA malzemeleri**

- ❖ Diluent solüsyon
- ❖ Konjugat
- ❖ Substrat
- ❖ Yıkama solüsyonu
- ❖ Pozitif kontrol
- ❖ EIA plağı
- ❖ Stop solüsyon

#### **3.1.2 *C. difficile* toksin A/B EIA malzemeleri**

- ❖ Diluent solüsyon
- ❖ Konjugat
- ❖ Substrat
- ❖ Yıkama solüsyon
- ❖ Pozitif kontrol
- ❖ EIA plakları
- ❖ Stop solüsyon

#### **3.1.3 Real-timePCR malzemeleri**

- ❖ Örnek tamponu
- ❖ Lizis tüpü
- ❖ Ana karışım
- ❖ Kontrol DNA
- ❖ Seyreltici

#### **3.1.4 Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri**

- ❖ Tek kanallı otomatik pipetler (eppendorf)
- ❖ Etüv (Nüve)
- ❖ -20°C dondurucu (Panasonic)
- ❖ -70°C dondurucu (OPERON)
- ❖ Vorteks (IKA.MS3)
- ❖ Termal döngü cihazı (Smart Cyclers)

- ❖ Isıtma bloğu (HLC)
- ❖ Santrifüj (SIGMA)
- ❖ Steril ubuk
- ❖ Plastik tüpler
- ❖ Süporlar
- ❖ Pastör pipeti
- ❖ Eldiven
- ❖ Spektrofotometre (BIO-TEK) ELx800
- ❖ Otomatik yıkama cihazı (BIO-TEK) ELx50
- ❖ Deney tüpü
- ❖ EIA plakları
- ❖ Pipet uçları
- ❖ Dışkı kabı

### **3.2. Yöntemler**

Bu çalışma örneklerin Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında toplanmıştır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde yatan, terapötik veya proflaktik olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonrasında diyare gelişen hastalar çalışma gurubuna alınmıştır. Hastanın adı-soyadı, yaşı, cinsiyeti, altta yatan hastalığı, kortikosteroid kulanıp kulanmadığı, kullandığı antibiyotikler, antibiyotik kullanımının kaçınıcı gününde ishal geliştiği, anket formu ile toplanmıştır (Ek-1). Hastalardan alınan dışkı örnekleri verilen temiz, kuru ve kapaklı, dışkı kapları içinde 1 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. Dışkı örnekleri 2 steril endorf tüplerine alınarak biri EIA testlerinde kullanmak üzere -20°C'de, diğeri moleküler test için -70°C'de saklandı.

#### **3.2.1. Glutamat dehidrogenaz antijenin EIA yöntemi ile saptanması**

Dışkı örneklerinde GDH aranmasında C. DIFF CHEK™- 60 TECHLAB, Inc. kiti kullanılmıştır. Teste başlamadan önce EIA kiti ve dışkı örnekleri oda ısısına getirildi ve üretici firma önerileri doğrultusunda test yapıldı. Endorf tüplerine etiketleme yapıldıktan sonra her birine 200µl diluent solüsyon konuldu. Yumuşak ve sıvı örneklerden 50µl eklenip 10sn vortekslendi. 5000 rpm'de 10dk santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. kit prospektüsünde belirtildiği şekilde işleme tabi tutulmuştur.

EIA plağına örnek sayısı kadar ve pozitif negatif kontroller için birer damla (50µl) konjugat konuldu ve kuyucukların tanımı yapıldı.

EIA plağının A kuyucuğuna 1 damla (50µl) pozitif kontrol ve B kuyucuğuna ise bir damla diluent negatif kontrol için konuldu. Diğeri kuyucuklara hazırlanmış örneklerden 100 er µl ilave edildi. Plakların ağız kapatıldıktan sonra 37°C de 50dk süre ile inkübe edildi. Süre bitiminde kuyucuklar otomatik yıkama aleti (BIO-TEK) EL×50 kullanılarak 5 kez yıkandı. Daha sonra 2 damla (100µl) substrat her kuyucuğa eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Süre bitiminde stop solüsyonu ile reaksiyon durduruldu kuyucuklar 450nm dalga boyunda BIO-TEK EL×800 cihazında okutuldu. Absorbans değeri 0.120'den düşük olan örnekler negatif, yüksek çıkan örnekler ise pozitif olarak kabul edildi.

### 3.2.2 Toksin A ve B'nin EIA yöntemi ile saptanması

örneklerde toksin A+B varlığı C. DIFFICILE TOX A/B II™ TECHLAB, Inc. Kiti kullanılarak araştırıldı. Teste başlamadan önce EIA kiti ve dışkı örnekleri oda ısısına getirildi. Ependorf tüplerine etiketleme yapıldıktan sonra her birine 200µl diluent solüsyon konuldu. Yumuşak ve sıvı örneklerden 50µl eklendi. Tüpler 10 sn vortekslenip, 5000 rpm'de 10dk santrifüj edildi ve süpernatantlar ayrılarak kit prospektüsünde belirtildiği şekilde işleme alındı.

Test işleminde EIA plağındaki kuyucuklara örnek sayısı kadar ve pozitif, negatif kontrol için birer damla (50µl) konjugat konuldu ve kuyucukların tanımı yapıldı. EIA plağının A kuyucuğuna 1 damla (50µl) pozitif kontrol ve B kuyucuğuna 1 damla diluent negatif kontrol için konuldu.

Hazırlanmış hasta örneklerde 100 er µl diğer kuyucuklara ilave edildi. Plakların ağzı kapatıldıktan sonra 37°C 'de 50dk süre ile inkübe edildi. Süre bitiminde kuyucuklar otomatik yıkama aleti (BIO-TEK) ELx50 kullanarak 5 kez yıkandı. Daha sonra 2 damla (100µl) substrat her kuyucuğa eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Süre bitiminde stop solüsyonu ile reaksiyon durdurulduktan sonra plak 450nm dalga boyunda BIO-TEK ELx800 cihazında okutuldu. Absorbans değeri 0.120'den düşük olan örnekler negatif, yüksek çıkan örnekler ise pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.2.3 Toksin B 'nin Real-time PCR yöntemi ile saptanması

Dışkı örneklerinde *C. difficile*'ye ait toksin B genini saptayan BD GeneOhm™ Cdiff Assay kiti kullanıldı. Teste başlamadan önce dışkı örnekleri ve kit oda ısısına getirildi.

Ependorf tüpündeki örnekler 15sn boyunca yüksek hızda vortekslenildikten sonra bir stril eküvyon örnek tüpüne batırılarak örnek alındı. Eküvyon bir örnek tamponu tüpüne yerleştirilerek ve fazla kısmı kırıldı ve tüpün kapağı kapatıldı. Tüp yüksek devirde 1dk vortekslendi.

Örneği seyretmek için örnek tamponunun 40µl bir tüpe aktarıldı. Daha sonra bu solüsyondan 10µl lizis tüpüne aktarılıp 5dk vortekslendi. Lizis tüpü kısa süre santifüje edildikten sonra 7dk 95°C lik ısı bloğunda bekletildi. Daha sonra lizatlar buz üzerine konuldu. Ana karışım tüpüne de 225µl örnek tamponu eklenerek buz üzerinde bekletildi. Smart Cycler tüpleri soğutma bloğu üzerinde yerleştirildikten sonra rekonstitüsyon yapılmış 25µl ana karışım tüplere ilave



edildi. Her lizize uğratılmış 3µl miktarda bu tüplere eklendi ve tanımları yapıldı.

3µl kontrol DNA bir tüpe pozitif kontrol için ve 3µl 3rnek tamponu negatif kontrol için diğer bir tüpe aktarıldı. Smart Cyclers tüpleri 5-10 Sn santrifüj edildi. Tüplere alete yüklenmeden 3nce Smart Cyclers soğutma bloğu üzerinde tutuldu. BD Gene ohm cdiff protokolü ile bir çalışma hazırlandıktan sonra Smart Cyclers tüpleri 1-core modülüne yerleştirildi ve çalışma başlatıldı ve sonuçlar bir saat sonra kaydedildi.

### **3.2.4 İstatistiksel analiz**

Veriler SPSS 21.0 (Stastical Programme Social Sciences) bilgisayar programında ki-kare testi ile yorumlanmıştır.

### **3.2.5 Etik kurul onayı**

KADEB-F.05-R.02 protokol no'lu çalışmamız, Üsküdar Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenerek, 2015/003 sayılı yazısı ile onaylanmıştır.

## 4. Bulgular

Çalışmamızda Ocak-Haziran tarihleri arasında Hematoloji ve Onkoloji kliniklerinde antibiyotik kullanımı sonrasında diyare gelişen 82 dışkı örneği incelendi. Dokuz'unda (%10.97) en az 2 diagnostik testle pozitif sonuç alındı. *C. difficile* enfeksiyonu saptanan hastalara ait demografik veriler tablo 2'de görülmektedir.

**Tablo 2: CDE saptanan hastalara ait demografik bilgiler**

Hasta No	Cinsiyet	Yaş (Yıl)	Altta yatan Hastalık	Kullandığı antibiyotik	İshal başlama süresi (Gün)	İshal süresi (Gün)
1	kadın	3	Akut lösemi + Nötropenik	Trimethoprim/sulfamethoxazole	3	6
2	Erkek	83	Lösemi + Diabetes Mellitüs	Piperasin/ Tazobaktam Meropenem Trimethoprim/sulfamethoxazole	13	7
3	Erkek	64	Lösemi + Diabetes Mellitüs	metronidazol	4	5
4	kadın	60	lösemi + Diabetes Mellitüs	Piperasin/ Tazobaktam Ertapenem	7	2
5	kadın	25	Lenfoma	Teikoplanin	5	4
6	kadın	41	Lösemi + Diabetes Mellitüs	Meropenem Vankomisin AmfoterisinB	7	7
7	kadın	4	Lenfoma	Piperasin/ Tazobaktam	4	3
8	Erkek	62	Lenfoma	Piperasin/ Tazobaktam Meropenem Vankomisin	15	16
9	Erkek	59	Rektum neoplazmı	Seftriakson	6	13

Çalışmaya dahil edilen 82 örnekte GDH EIA testi örneklerin 26'sında (%31.7) pozitif ve 56'sında (%68.3) ise negatif olarak saptandı. GDH EIA sonuçları Tablo 3'de görülmektedir. GDH EIA testinde pozitif bulunan 26 örnekten 17 sinde diğer iki testle negatif sonuç alındı ve bu örnekler değerlendirme dışı bırakıldı.

**Tablo 3: GDH EIA testi sonuçları**

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Pozitif</b>	26	31,7
<b>Negatif</b>	56	68,3
<b>Toplam</b>	82	100,0

Toksin varlığı araştırılması için kullanılan toksin A ve B EIA test sonuçlarına göre, 82 örnekten 8'i (%9.8) pozitif ve 74'ü (%90.2) negatif olarak belirlendi (Tablo 4).

**Tablo 4: Toksin A ve B EIA testi sonuçları**

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Pozitif</b>	8	9,8
<b>Negatif</b>	74	90,2
<b>Toplam</b>	82	100,0

Real-time PCR metoduyla, 82 örnekten 6'sı (%7.3) pozitif ve 76'sı (%92.7) negatif olarak saptandı (Tablo 5).

**Tablo 5: Real-time PCR testi sonuçları**

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Pozitif</b>	6	7,3
<b>Negatif</b>	76	92,7
<b>Toplam</b>	82	100,0

Elli altı (%89.02) hasta dışkısında her üç testle de negatif sonuç elde edildi. Dokuz (%10.97) hastada ise yapılan diagnostik testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç(%3.65) hasta örneğinde ise EIA (GDH, toksin A ve B ) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı (Tablo 6).

**Tablo 6: GDH EIA, toksin A ve B EIA, Real-time PCR sonuçları.**

<b>GDH antijen EIA Testi</b>	<b>Toksin A ve B EIA Testi</b>	<b>Real-time PCR Testi</b>	<b>N</b>
+	-	-	17
+	+	+	5
+	+	-	3
+	-	+	1
-	-	-	56
<b>Toplam</b>			<b>82</b>

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek test olan Real-time PCR testi ile diğer metodların sonuçları (EIA GDH ve toksin A ve B EIA) karşılaştırıldı.

GDH EIA yönteminin real-time PCR yöntemine göre duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 96.1, pozitif prediktif değerleri (PPD) % 66.7 ve negatif prediktif değerleri (NPD) %100 olarak belirlendi (Tablo 7).

**Tablo 7: GDH EIA yönteminin Real-time PCR yöntemine göre değerleri**

GDH EIA yönteminin real-time PCR yöntemine göre duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri	
Duyarlılık	%100
Özgüllük	%96.1
PPD	%66.7
NPD	%100

Toksin A ve B yönteminin real-time PCR yöntemine göre duyarlılığı % 83.3, özgüllüğü % 96.1, PPD % 62.5 ve NPD %98.6 dir (Tablo 8).

**Tablo 8: Toksin A ve B EIA yönteminin PCR yöntemine göre değerleri**

Toksin A ve B EIA yönteminin real-time PCR yöntemine göre duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri	
Duyarlılık	%83.3
Özgüllük	%96.1
PPD	%62.5
NPD	%98.6

## 5. Tartışma

*C. difficile* dünyada hem nozokomiyal, hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilen önemli bir sağlık sorunudur. Bu bakteriye bağlı enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir ( Wiström ve diğ., 2001; Redelings ve diğ., 2007). ABD, Kanada ve Avrupa ülkelerinde son 10 yılda CDE insidansında 2-4 misli artış olduğu bildirilmiştir (Redelings ve diğ., 2007; Elixhauser ve diğ., 2008). Farklı nedenlerle gerek terapötik gerekse proflaktik olarak kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterilere etki yapmamakta ve normal mikrobiyota üyeleri arasındaki ekolojik dengeyi de bozmaktadırlar. Antibiyotik kesildikten sonra barsak mikrobiyotasına yaptığı etki 8 hafta kadar sürebilmekte ve bu süre içinde *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir.

CDE'lerinin gelişiminde ileri yaş, kullanılan ilaçlar (antibiyotik, antiperistatik, immün süpresif, antineoplastik, vb.) yapılan girişimler (lavman, nazogastrik tüp), altta yatan ciddi hastalıklar (kanser, AIDS, böbrek yetmezliği), hastanede kalış süresi gibi farklı risk faktörleri rol oynayabilmektedir. CDE enfeksiyonlarının tanımı dışkıda genellikle toksin veya toksin geni araştırılması temeline dayanılmaktadır.

Çalışmamızda 82 immüdüşkün hastada CDE oranı %10.97 (9/82) olarak saptandı. Ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda CDE saptanma oranları %3.2-19.2 arasında değişmektedir. Çalışmamızda CDE saptadığımız 9 hastanın hepsi malignansili olup ayrıca 4 hastada D.M mevcuttu. Bu hastaların 4'ü Piperasin\Tazobaktam almaktaydı ve diyare oluşumu en erken 3. günde gerçekleşti.

Türkiye'de *C. difficile* toksin pozitifliğini hedefleyerek yapılan araştırmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Büyükbaba ve ark. (Büyükbaba,2003) 1998-2000 yılları arasında toksin A'ı saptayan immunocard (Meridian Diagnostic) yöntemi ile 360 hastanın dışkı örneğinde %4.7 oranında toksin A varlığını göstermişlerdir. Daha sonra 2000-2002 yılları arasında yaptıkları *C. difficile* diyaresi şüphesi ile gönderilen 400 dışkı örneğinde toksin A ve B varlığı EIA testi (Meridian diagnostic) kullanarak toksin varlığını %12 olarak saptamışlardır.

Aygün ve ark. (Aygün ve diğ., 2002) ise hastaların dışkı örneklerinde, ELISA (Rbbiopharm Germany) yöntemi kullanarak 125 hastaya ait dışkıda toksin B varlığını %3,2 olarak bildirmişlerdir.

Altındış ve ark (Altındış ve diğ., 2007) tarafından yapılan 91 toplum kaynaklı ve hastanede yatan hastaların 13'ünde (%14.3) toksin A/B varlığı gösterilmiştir.

2006-2008 yılları arasında Deniz ve ark.'nın (Deniz ve diğ.,2011) yaptıkları çalışmada ise 663 hastaya ait olan dışkı rneğinde "Immuno Card Toxins ABD EIA" kiti kullanılarak toksin A ve B oranı %4.7 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda tüm dışkı örneklerinde toksijenik kültür yöntemi uygulanmış ve hastaların 50 tanesinin dışkısından *C. difficile* retilmiş ve bu suşların 36'sında (%5.7) toksin A ve B genleri tespit edilmiştir.

Lale ve ark.2010 yılında Gazi niversitesi'nde yaptıkları çalışmada ise, 592 ishalleri hastada *C. difficile* toksin pozitifliğinin %24 olarak saptamışlardır. En sık olarak Hematoloji ve Onkoloji nitesinde %38 oranı ile *C. difficile* toksin A ve B pozitifliği bildirmişlerdir.

Wroblewska ve ark. (Wroblewska ve diğ., 2005) 1998-2002 yılları arasında yaptıkları araştırmada hastanede yatan yetişkin hastalardan alınan 4414 dışkı örneğinde, 1308 (%29.3) rnekten *C. difficile* kültür pozitifliği saptamışlardır. Hastanede yatan hastalar arasında en fazla pozitiflik oranına sahip olan klinikler hematoloji ve onkoloji (%8.3 oranı) olarak belirlenmiştir. Kültürü pozitif olan örneklerin 847'sinde (%19.2) toksin A varlığı saptanmıştır.

Avusturalya'daki 2002 yılında yapılan bir araştırma tüm dünyadaki hastanelerde son 20 yılda *C. difficile* ilişkili diyare insidansının arttığını göstermektedir. Bu çalışmada 3.kuşak sefalosporinlerin kullanımının kontrol altına alınması ile, *C. difficile* suşlarının ishallerin azaltılabileceği vurgulanmıştır.

Analia ve diğ. İşpanya'da 2013 yılında 225 ishalleri kanser hastalarında yaptıkları araştırmada, GDH antijen, toksin A ve B ve PCR yöntemi uygulayarak *C. difficile* toksijenik türlerinin oranını %17,3 olarak bildirmişler (Analia Rodrıguez Garzotto ve diğ., 2013).

Son zamanlarda bir çok dünya ülkesinde CDE insidansında artış görülmektedir ve bu artış ile beraber, *C. difficile* ribotip 027 NAP1/B1 ve tcdA-/tcdB+ gibi varyant izolatlarına bağlı salgınların sıklığında bir artış yaşanmaktadır. Yüksek mortaliyete neden olan bu virulan suşlar ülkeler arasında yaygınlık açısından değişkenlik göstermektedir ( McDonald ve diğ., 2005; Cohen ve diğ., 2010).

Avrupa ülkeleri ve Türkiye'nin de yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, toksijenik olan 354 suşun %24.3'ünün varyant gen bölgesine sahip olduğu ve bu toksijenik suşların %17.2'si *binary* toksin gen ekspresyonu gösteren suşlar olduğu gösterilmiştir.

Marmara Üniversite'sinde Deniz ve ark.'ları (Deniz ve diğ.,2011) tarafından yapılan çalışmada izolatların hiçbirinde *binary* toksin veya varyant genine rastlanmamıştır.

Klasik bilgilere göre CDE genelde hastane kaynaklıdır ama son zamanlarda toplum kaynaklı olgularda belirgin bir artış olduğu ve düşünülenden daha yaygın hale geldiği bildirilmektedir. ABD'de her yıl yüz bin kişide 6.9 ile 46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu saptanmaktadır (O'Donoghue ve diğ.2011).

Son zamanlarda çoğu laboratuvar toksijenik türlerin non-toksijenik türlerden ayrımı için kullanılan iki basamaklı bir algoritmayı kullanmaktadır. İlk basamağında GDH testi olan bu algoritmaya göre ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer test negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise toksin testi yapılarak türün toksijenik olduğu doğrulanması gerekmektedir. Her iki test sonucu pozitif ise ve hastada semptomlar var ise CDE tanısı konulmaktadır. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise ya hasta toksijenik olmayan bir suşu taşımakta veya hasta toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir (Carroll ve diğ., 2011).

Bizim çalışmada elli altı örnekte her üç testle negatif sonuç elde edildi. Dokuz hastada ise yapılan testlerden en az iki tanesi pozitif olarak bulundu. Üç hastada ise EIA (GDH, toksin A ve B ) testleri pozitif iken moleküler yöntemle negatif sonuç alındı. Moleküler yöntem ile saptanan ve yalancı negatiflik olarak kabul ettiğimiz bu durumun *tcdB* geninde gerçekleşen mutasyon ve ya sadece toksin B/binary toksin sentezleyen suş nedeniyle olduğu düşünüldü.

Stamper ve diğ. (Stamper ve diğ., 2008) tarafından yapılan bir çalışmada ise sitotoksin ve toksijenik kültür testleri pozitif olan bir hasta örneğinde PCR testi sonucu yalancı negatif olarak saptanmıştır. Benzer bir çalışmada da Elizabeth ve diğ. (Elizabeth ve diğ., 2009) 4 örnek GDH antijen ve toksin A ve B EIA testi sonucu pozitif ve PCR sonucu yalancı negatif olarak belirlenmiştir.

Son zamanlarda *tcdB* gen bölgelerinde mutasyonlar ve delesyonlar olan toksijenik suşların varlığı bilinmektedir (Cohen ve diğ., 2000; Rupnik, Ve diğ.,



1997). Ayrıca toksin A+/binary toksin + ve toksin B negatif olan yeni bir suş da izole edilmiştir (Persson ve diğ., 2008).

Toksin B hastalık oluşumunda en önemli virülans faktörü kabul edildiği için bu tip varyantların raporlanması çok nadir olmaktadır. Toksin B negatif olan bu suş genetik olarak Kuzey Amerikada salgına neden olan BI/NAP1/027 ribotipinden farklıdır bu nedenle *tcdB*'nin yeni varyantların evrimi için izlenmesi gerekmektedir. PCR testi ile yalancı negatif sonuçlar nedeniyle toksin gen bölgesini hedefleyen testler yerine *in vivo* toksin üretimine yönelik testlerin geliştirilmesine ağırlık verilmesi vurgulanmaktadır.

Hastalar *C. difficile* toksijenik suşları ile kolonize olabilirler ancak başka nedenlere bağlı olarak da ishal gelişebileceği de unutulmamalıdır.

Moleküler yöntemler ile pozitif sonuçlar söz konusu olduğunda bu durum hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Çünkü pozitif bir test sonucu canlı organizmaların mutlaka bulunduğu anlamına gelmez. Ancak *tcdB* geninin bulunduğu anlamına gelir ve toksijenik *C. difficile* tanısının varsayılmasını sağlar.

Bu çalışmada bir hasta örneğinde GDH antijen EIA testi ve Real-time PCR sonucu pozitif, toksin A ve B EIA testi negatif olarak saptanmıştır. Bu durumun toksin titresinin azlığı nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda GDH EIA yönteminin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 96.1, toksin A ve B EIA yönteminin ise duyarlılığı % 83.3, özgüllüğü % 96.1, saptandı. Yapılan bir çok çalışmada toksin A ve B yönteminin duyarlılığı %32-98.7 ve özgüllüğü ise %92-100 olarak saptanmıştır.

Bulgularımız CDE tanısında GDH(EIA) testinin güvenilir bir tarama testi olduğunu ve pozitif çıkması durumunda ise toksin A ve B EIA veya moleküler yöntemle doğrulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bulgularımız ışığında geniş spektrumlu antibiyotik uygulanan ve diyare gelişen kanser hastalarında CDE tanısı için yüksek özgüllük ve duyarlılıkta bulduğumuz GDH EIA testini ön test olarak önermekteyiz . Pozitif sonuçların Toksin A+B yi saptayan EIA testi ve toksin B genini saptayan moleküler test ile doğrulanması uygun olacaktır. Ancak toksin A+B EIA ve moleküler testlerle nadir de olsa yalancı negatifliğin söz konusu olabileceği de unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Akan E. (1993). *Clostridium difficile*. Tıbbi Mikrobiyoloji. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2. Baskı, 286-289.
2. Aktories, K., U. Weller, et al. (1987). " *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin." FEBS letters 212(1): 109-113.
3. Altındış M, Usluer S, Çiftçi Hİ, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe CO. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bült. 2007;41:29-37
4. Aldeen W.E., Binham M., Aiderzada A., Kucera J., Jensa S., Carroll K.C., (2000). Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 36, 211-213.
5. Al-Barrak, A., J. Embil, et al. (1999). "An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital." Canada communicable disease report Relevé des maladies transmissibles au Canada 25(7): 65.
6. Anand, A. and A. E. Glatt (1993). "*Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review." Clinical Infectious Diseases 17(1): 109-113.
7. Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8(1): 17-26.
8. Analia Rodríguez Garzotto & Antonio Mérida García & Nerea Muñoz Unceta & M. Mar Galera Lopez & M. Ángeles Orellana-Miguel & C. Vanesa Díaz-García & Susana Cortijo-Cascajares & Hernán Cortes-Funes & M. Teresa Agulló-Ortuño (2014). Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients, 23:1569–1577 DOI 10.1007/s00520-014-2506-7
9. Aygün G, Aslan M, Yağar H, Altaş K. Hastanede Yatarken Gelişen İshal Olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B Araştırılması. Ankem Derg, 2002; 16(1):82-84.
10. Bartlett JG. (1992). Antibiotic-Associated Diarrhea. Clin Infect Dis, 15:573-581.
11. Barrasso L. A. , Wang S. Z. , Phelps C. J. , Jhonson J.L. , Wilkins T.D.(eds) (1990). Nucleotide sequence of *C.difficile* toxin B gene and

demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. B. Med. Microbiol. Immunol. Berl.179:271-279.

**12.** Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL (eds) (1991). Clostridium. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, 5. Ed, 505-518.

**13.** Bartlett, J. G., T. E. W. Chang, et al. (1978). "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia." New England Journal of Medicine 298(10): 531-534.

**14.** Barbut, F. and J. C. Petit (2001). "Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections." Clinical Microbiology and Infection 7(8): 405-410.

**15.** Bilgehan H. (ed). ( 1994). Gram Olumlu Sporlu Basiller. Klinik Mikrobiyoloji kitabında. Sekizinci baskı, İzmir : Fakülteler Kitabevi 282-311.

**16.** Bilgehan H. *Clostridium difficile*. Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. s. 361-363, 9. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1995.

**17.** Bignardi, G. (1998). "Risk factors for *Clostridium difficile* infection." The Journal of hospital infection 40(1): 1.

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

**19.** Bruins MJ, Verbeek E, Wallinga JA, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(11): 3035-9.

**20.** Boyanton BL Jr, Sural P, Loomis CR, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 640-5.

**21.** Borriello, S., H. Davies, et al. (1990). "Virulence factors of *Clostridium difficile*" Review of Infectious Diseases 12(Supplement 2): S185-S191.

**22.** Borriello, S. (1998). "Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41(suppl 3): 13-19.

- 23.** Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. *Anaerobe* 2011;17(4): 170-4.
- 24.** Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 2012; 20(1): 21-9. 55.  
Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *Lancet* 2008; 371(9623): 1486-8.
- 25.** Cohen, S. H., Y. J. Tang, and J. Silva, Jr. 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J. Infect. Dis.* 181:659–663.
- 26.** Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31(5): 431-55.
- 27.** Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI) *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(12): 1053-66.
- 28.** Çaylan R. Antibiyotikle ilişkili ishaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Cilt 2, istanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008:1060-1064.
- 29.** Doing KM, Hintz MS. Prospective evaluation of the Meridian Illumigene™ loop-mediated amplification assay and the Gen Probe ProGastro™ Cd polymerase chain reaction assay for the direct detection of toxigenic *Clostridium difficile* from fecal samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72(1): 8-13.
- 30.** 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. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3211-7.
- 31.** Elizabeth J. Kvach, David Ferguson, Paul F. Riska, and Marie L. Landry, 2010 Comparison of BD GeneOhm Cdiff Real-Time PCR Assay with a Two-

Step Algorithm and a Toxin A/B Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Toxigenic *Clostridium difficile* Infection JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2010, p. 109–114.

**32.** Elixhauser, A., Jhung, M., 2008. *Clostridium difficile*-associated disease in US hospitals, 1993–2005. In: HCUP Statistical Brief No. 50, April 2008. US Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD, Available :accessed March 23, 2009.

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

**34.** Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 529-49.

**35.** Giannasca PJ, Warny M.( 2004). Aktive and passive immunization against *C.difficile* diarrhea and colitis.Vaccine, 22: 848-856.

**36.** Gilbert RJ, Triadafiloulou G, Giampolo PC, Lamonth JT (1987). Effect of purified *Clostridium difficile* Toxin on Intestinal Smooth Muscle. Gastroenterology, 94 (1404): 759-766.

**37.** Gonçalves C, Derce D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 1933-1939.

**38.** Gravel D, Miller M, Simor A, et al. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. Clin Infect Dis 2009; 48(5): 568-76.

**38.** Hatheway C. L.,Johnson E. A.(eds) ( 1998). Clostridium :The spore-bearing anaerobes.In: Balows A. , Duerden B. I. (volume eds).Systematic Bacteriology. In: Collier L. Balows A., Susman M. (eds) Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections. Ninth edition, Second volume, London: Oxford Universty Pres, 762-764.

**39.** Huovinen P. , Raiba I. , Vuento R. , Eerola E. , Lehtonen A. (1990). False-positive *C.difficile* latex agglutination tests. Lancet 335: 1467-1468.

- 40.** Isenberg HD.(ed) ( 1992). Anaerobic Gram Pozitive Bacilli. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington DC, Vol 1, pp 2.11.1-2.11.9.
- 41.** Janoir, C., S. Péchiné, et al. (2007). "Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins." Journal of Bacteriology 189(20): 7174-7180.
- 42.** Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH. *Clostridium difficile*: a European perspective. J Infect. 2013;66(2): 115–128.
- 43.** Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 2009; 58(6): 403-10.
- 44.** Johnson, E. A. (1999). "Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins." Annual Reviews in Microbiology 53(1): 551-575.
- 45.** Kelly CP. Current strategies for management of initial *Clostridium difficile* infection. J Hosp Med 2012; 7 (Suppl 3): S5-10.
- 46.** Kelly, C. P., C. Pothoulakis, et al. (1992). "Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A receptor binding." Gastroenterology 102(1): 35-40.
- 47.** Kıyan M. Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s. 645-649, 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2005.
- 48.** Kıyan M. Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s. 645-649, 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
- 49.** Knoop F.C. , Owens M. , Crocker I.C.(eds) ( 1993). *C.difficile*: Clinical disease and dianosis. Clin. Microbiol. Rev. 6 (3) : 251-265.
- 50.** Koneman E.W.( 1992). The Anaerobic Bacteria. In: Koneman E. W. , Allen S. D. , Janda M. , Schreckenberger P. C. , Winn W. C. (eds). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 557-600.
- 51.** Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. Lancet 2008; 371(9623): 1486-8.

- 52.** Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J Infect Dis 1984; 149(5): 781-8.
- 53.** Leclair MA, Allard C, Lesur O, Pepin J. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. J Intensive Care Med 2010; 25(1): 23-30.
- 54.** Lyras, D., J. R. O'Connor, et al. (2009). "Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*." Nature 458(7242): 1176-1179.
- 55.** Lyerly, D. M. and T. D. Wilkins (1986). "Commercial latex test for *Clostridium difficile* toxin A does not detect toxin A." Journal of Clinical Microbiology 23(3): 622-623.
- 56.** McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10(6): 581
- 57.** Moyenuddin M, Williamson JC, Ohl CA. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: current strategies for diagnosis and therapy. Curr Gastroenterol Rep 2002; 4(4): 279-86.
- 58.** Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Clostridium difficile*. (Çev: Başustaoğlu AC) s. 377-389. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010
- 59.** Nelson, D. E., S. B. Auerbach, et al. (1994). "Epidemic *Clostridium difficile*-associated diarrhea: role of second-and third-generation cephalosporins." infection control and hospital epidemiology: 88-94.
- 60.** Ondedonk A. B. , Allen S. D. (eds) (1995). Clostridium. In : Murray P. R., Baron E., Pfaller M. A. , Tenover F. C. , Yolken R. H. (eds). Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition, Washington D. C. : American Society for Microbiology, 574-586
- 61.** Ovaran C, Çavuşlu Ş, Özsoy MF, Keskin K, Yenen OS. Antibiyotiğe Bağlı Diyarelerde *Clostridium difficile*'nin Yeri. Klimik Derg. 1996; 9(1):15-17.
- 62.** O'Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. Curr Opin Gastroenterol 2011; 27(1): 38-47.
- 63.** Perelle, S., M. Gibert, et al. (1997). "Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196." Infection and Immunity 65(4): 1402-1407.



- 64.** Phillips K. D. , Rogers P. A.(eds) ( 1981). Rapid detection and presumptive identification of *C.difficile* by p-cresol production on a selective medium. J. Clin. Pathol. 34: 642-644, 1981.
- 65.** Popoff, M. R., E. Rubin, et al. (1988). "Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain." Infection and Immunity 56(9): 2299-2306.
- 66.** Poxton IR, McCoubrey J, Blair G.( 2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect, 7: 421-427.
- 67.** Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerg Infect Dis. 2007; 13(9): 1417-1419.
- 68.** Rupnik M, Grabner M, Geric B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. Anaerobe 2003;9(6): 289-294.
- 69.** Rupnik M.( 2001). How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. Clin Microbiol Infect, 7: 417-420.
- 70.** Rupnik, M., V. Braun, F. Soehn, M. Janc, M. Hofstetter, R. Laufenberg-Feldmann, and C. von Eichel-Streiber. 1997. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol. Lett. 148:197-202.
- 71.** Salcedo, J., S. Keates, et al. (1997). "Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis." Gut 41(3): 366-370.
- 72.** Salyers AA, Whitt DD. (eds) (1994). Pseudomembranous Colitis.Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. American Society for Microbiology, Washington DC, 282-289.
- 73.** Seddon, S. and S. Borriello (1992). "Proteolytic activity of *Clostridium difficile*." Journal of Medical Microbiology 36(5): 307-311.
- 74.** Seddon, S., I. Hemingway, et al. (1990). "Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model." Journal of Medical Microbiology 31(3): 169-174.
- 75.** Sherman M. E. , Deirrolami P. C. , Thorne G. M. , Kimber J. , Eichelberger K.(1988). Evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of *Clostridium difficile* associated Colitis. Am. J. Clin. Pathol. 89: 228-233.

- 76.** Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. J Am Geriatr Soc 2010; 58(8): 1556-64.
- 77.** Simpson, L., B. Stiles, et al. (1989). "Production by *Clostridium spiroforme* of an iotalike toxin that possesses mono (ADP-ribosyl) transferase activity: identification of a novel class of ADP-ribosyltransferases." Infection and Immunity 57(1): 255-261.
- 78.** Simor, A. E. M. D., S. F. M. D. Bradley, et al. (2002). "*Clostridium difficile* in Long-Term-Care Facilities for the Elderly" infection control and hospital epidemiology 23(11): 696-703.
- 79.** Snyder, M. L. (1937). "Further Studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'Toole)." The Journal of Infectious Diseases 60(2): 223-231.
- 80.** Stamper PD, Babiker W, Alcabasa R, et al. Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in clinical stool specimens. J Clin Microbiol 2009; 47(12): 3846-50.
- 81.** Stamper, P. D., R. Alcabasa, D. Aird, W. Babiker, J. Wehrlin, I. Ikpeama, and K. C. Carroll. 2008. Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 47:373-378.
- 82.** Stubbs, S., M. Rupnik, et al. (2006). "Production of actin specific ADP ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*." FEMS microbiology letters 186(2): 307-312.
- 83.** Stubbe, H., J. Berdoz, et al. (2000). "Polymeric IgA is superior to monomeric IgA and IgG carrying the same variable domain in preventing *Clostridium difficile* toxin A damaging of T84 monolayers." The Journal of Immunology 164(4): 1952-1960.
- 84.** Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al. Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 5th. Edition, pp 95-101, Star Publishing Company, California, USA, 1993.

- 85.** Sullivan N. M. , Pellet S. , Wilkins T.D. (eds) (1982). Purification and characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 35 (3): 1032-1040.
- 86.** Taylor, N. S., G. M. Thorne, et al. (1981). "Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*." Infection and Immunity 34(3): 1036.
- 87.** Tabaqchalli S, Jumaa P.(eds) ( 1995). Diagnosis and Management of *Clostridium difficile* Infection. BMJ., 310 (27): 1375-1380.
- 88.** Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. Indian J Med Res 2010; 131: 487-99.
- 89.** Voth, D. E. and J. D. Ballard (2005). "*Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease." Clin. Microbiol. Rev. 18(2): 247-
- 90.** Vonberg, R. P., E. J. Kuijper, et al. (2008). "Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*." Clinical Microbiology and Infection 14: 2-20.
- 91.** 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.
- 92.** Woo, P., S. Lau, et al. (2005). "*Clostridium bacteriaemia* characterised by 16S ribosomal RNA gene sequencing." Journal of Clinical Pathology 58(3): 301-307.
- 93.** Wolfhagen M. J. , Torenma R. , Fluit A. C. , Verhoef J.(eds) ( 1994). Toxin A and B of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol.Rev. 13:59-64.
- 94.** Wroblewska MM., Swoboda-Kopec E., Rokosz A., et al.(2005). Detection of *Clostridium difficile* and toxin A (TcdA) in stool specimens from hospitalized patients, Chair and Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw, 5 Chalubinskiego Street, 02-004 Warsaw, Poland.54(2):111-5.

# ÖZGEÇMİŞ

## Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Mehdi Meskini Heydarlou

Doğum tarihi ve yeri : 04/06/1983-OROUMIEH

Uyruğu : İRAN

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresleri : akarbaşı mah.akyıl sokak NO:7,D:4

## Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) :

Rahe noor ilkokulu 1995 OROUMIEH Hadi ortaokulu 1998

Imam khomeyni lise 2000 OROUMIEH

Urmia azad üniversitesi 2011 OROUMIEH

Eskişehir Osmangazi 2012

yabancı dil / diller: Farsça, Türkce, Azerice, İngilizce, Arapça

## Bilimsel Etkinlikler

## EK-1: Hasta onay formu

Adı:

Soyad :

TC kimlik numarası:

Yattığı servis:

Aldığı antibiyotik/antibiyotikler:

Aldığı diğer ilaçlar:

Yatış tarihi:

Örnek alım tarihi:

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvara gönderilen dışkı örneğimde *Clostridium difficile* toksinleri açısından mikrobiyolojik inceleme yapılmasını kabul ediyorum.

Hastanın adı soyadı

İmza