

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

**CLOSTRIDIUM DIFFİCİLE SUŞLARININ TANISINDA
SEROLOJİK VE KROMOJENİK AGAR YÖNTEMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Dilek BOZ**

**Danışman
Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2016
KAYSERİ**

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

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE SUŞLARININ TANISINDA
SEROLOJİK VE KROMOJENİK AGAR YÖNTEMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Dilek BOZ**

**Danışman
Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL–2013-4672 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Dilek BOZ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Clostridium difficile Suşlarının Tanısında Serolojik ve Kromojenik Agar Yöntemlerinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi ’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Dilek BOZ

Danışman

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ danışmanlığında **Dilek BOZ** tarafından hazırlanan “**Clostridium difficile** Suşlarının Tanısında Serolojik ve Kromojenik Agar Yöntemlerinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../2016

JÜRİ:

İmza

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

.....

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (Mikrobiyoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Ömer POYRAZ

.....

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi (Mikrobiyoloji ABD)

Üye : Doç. Dr. M. Altay ATALAY

.....

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (Mikrobiyoloji ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..../... /2016

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle gerek tez çalışmam sürecinde, gerekse tez çalışması dışındaki iş ortamında çalışmaya teşvik edici yaklaşımı ile iyi bir rehberlik ve danışmalık ederek bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ'a, bu süreçte desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç.Dr. M. Altay ATALAY'a

Tezimin birçok aşamasında yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Ömür Mustafa PARKAN'a, Dr. Filiz TEKİNŞEN ve çalışmayı yapmaya olanak sağlayan bakteriyoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Hayatımın her anında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, ömrüm boyunca hayat arkadaşım olacak çok sevdiğim eşim Murat BOZ'a,

TYL-2013-4672 no'lu bu tez projesini maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine.

Yaşamımın her anında bana duydukları güven ve verdikleri destek için aileme,

SONSUZ teşekkürlerimi sunarım.

Dilek BOZ

Kayseri, Ağustos 2016

***CLOSTRIDIUM DIFFICILE* SUŞLARININ TANISINDA SEROLOJİK VE KROMOJENİK AGAR YÖNTEMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dilek BOZ

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2016**

Danışman: Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ

ÖZET

Amaç: *Clostridium difficile* nazokomiyal ishalin en sık sebebi olarak bilinmektedir. Bu çalışmada *C.difficile*'nin gastrointestinal sistemdeki kolonizasyonu ile ishal oluşumu arasındaki muhtemel ilişkinin ve tanıda kullanılan yöntemlerin değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve metod: Bu çalışmada üç farklı yöntemle 50 dışkı örneğinde *C. difficile* varlığı araştırıldı. İlk olarak hızlı tanı amacıyla immünokromatografik kart test kullanıldı. Örnekler selektif besiyerlerine (Cycloserin cefoksitin fruktoz agar (CCFA) ve chromID) ekilerek anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. ELISA ile toksin A ve B varlığı araştırıldı.

Bulgular: İmmünokromatografik yöntemle iki (%4) hastada pozitif sonuç elde edildi. Kültür sonuçlarına göre üç (%6) hastada chromID besiyerinde, bir (%2) hastada CCFA'da ve bir (%2) hastada her iki besiyerinde de *C. difficile* izole edildi. İki örnekte ELISA yöntemiyle pozitiflik saptandı.

Sonuç : Rutin klinik laboratuvarlarda kullanılan immünokromatografik test toksin belirlemede yeterli değildir. Kültür zaman alıcı bir işlem olduğu için, başka yöntemlerle toksin varlığını tespit etmek güvenilirliği bir adım daha artırmada alternatif olabilir.

Anahtar kelimeler: *C.difficile*, toksin A/B, immünokromatografi kart test

INVESTIGATION OF SEROLOGICAL AND CHROMOGENIC AGAR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Dilek BOZ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences Department of Microbiology

M. Sc. Thesis ,August 2016

Supervisor: Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ

ABSTRACT

Aim: *Clostridium difficile* is known to be the most common causative agent of nosocomial diarrhea. In this study, it was aimed to evaluate the possible relationship between gastrointestinal colonisation of *C. difficile* and the development of diarrhoea, and to assess the diagnostic value of the methods used.

Material and method: In the study *C. difficile* was investigated in 50 stool specimens by using three different methods. Firstly immunochromotographic card test was used for rapid detection. Specimens were inoculated on selective media (CCFA and chromID) and incubated in anaerobic atmosphere at 37oC for 48 hours. ELISA was used for detection of toxin A and B.

Results: Two positive results were detected by using immunochromotographic method. According to culture results, *C. difficile* was isolated in three patients on chromID agar, in one patient on CCFA and in one patient on both agars. Two specimens were found to be positive by using ELISA.

Conclusion: In routine clinical laboratories, immunochromotographic test is not satisfactory for detection of the toxins. However, since culture is time consuming, detection the toxins by using different methods can be an alternative for taking reliability of the results to one step forward.

Key words: *C. difficile*, toxin A/B, immunochromotographic card test

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY:	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikrobiyolojik özellikler	3
2.3. Virülans özellikleri.....	4
2.3.1. Spor oluşturma	4
2.3.2. Flajella.....	4
2.3.3. Fibronektin Bağlayıcı Protein	5
2.3.4. Fimbria (Pilus)	5
2.3.5 Toksinler	5
2.3.5.1. Toksin A (tcdA)	6
2.3.5.2. Toksin B (tcdB).....	6
2.3.5.3.“Binary” Toksin (CdtA ve CdtB):	6
2.4. Patogenez	7
2.5. Epidemiyoloji.....	9
2.6. Tanı	10

2.6.1. Kültür ve Toksik Kültür	10
2.6.2.Hücre Kültüründe Sitotoksikite Testi	11
2.6.3.Enzim immunoassay(EIA) Yöntemler	11
2.6.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	12
2.6.5.Dışkı Laktoferrin Testi	13
2.6.6. Endoskopi.....	13
2.6.7. Histopatoloji.....	13
2.6.8. Radyoloji	14
2.7. Tanı Algoritması	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. İmmüno-kromatografik kart testi	17
3.1.1. Gereçler	17
3.1.2. Test prosedürü	17
3-2.ELISA testi	18
3.2.1.Gereçler	18
3.2.2.Test prosedürü	19
3-3) Kültür.....	19
4.BULGULAR	20
4.1. İmmüno-kromatografik kart test	20
4.2.Kültür :	21
4.3.Clostridium difficile toksin A+B ELISA testi	22
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	23
6.KAYNAKLAR	26

KISALTMALAR ve SİMGELER

- C.difficile : Clostridium difficile
GİS : Gastrointestinal sistem
PMK : Psödomembranöz kolit
PME : Psödomembranöz enterokolit
Nazokomiyal : Hastane kökenli enfeksiyon
Tcd A : TOKSİN A
Tcd B : TOKSİN B
CDE : Clostridium difficile enfeksiyonu
µm : mikrometre
UV : ultraviole
kDA : kilodalton
mm : milimetre
Hep-2 : insan epitel hücresi
VERO : afrika yeşil maymun böbrek hücresi
GDH : glutamat dehidrogenaz
EIA : Enzim immünoassay

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Clostridium difficile</i> enfeksiyonu patogenezinde toksinler ve inflamasyon	8
Şekil 2. <i>Clostridium difficile</i> toksinlerinin gen regülasyonu	9
Şekil 4-1 : İmmünokromotografik kart test GDH ve toksin pozitifliği.....	20
Şekil 4-2. ChromID besiyeri ve CCFA besiyeri görüntüleri.....	21
Şekil 4-3: Gram boyama görüntüsü	22

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Clostridium difficile gram-pozitif, spor oluşturan anaerobik bir basildir. Fekal oral yolla kişiden kişiye veya çevreden kişiye bulaşmaktadır. İlk olarak 1935 yılında sağlıklı bebeklerin dışkı florasından izole edilmiş ve izolasyonun zor olmasından dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiş; 1978 yılına dek antibiyotikle ilişkili diyare ve psödomembranöz enterokolit için etken olarak gösterilememiştir (1).

Günümüzde nozokomiyal diyarenin en sık sebebi olan *C. difficile* , sağlıklı erişkinlerin %5'inin, bebeklerin %30-70'inin dışkılarında bulunmaktadır (2). *C. difficile*, asemptomatik taşıyıcılıktan psödomembranöz kolite (PMK) kadar değişen farklı tablolarla karşımıza çıkabilen, ağır olgularda septik şok, megakolon, kolon perforasyonu gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilen ve mortalite ile seyredabilen enfeksiyonlar yapar. Sadece toksijenik suşlar yaptıkları toksinler ile hastalığa sebep olmaktadır. *C. difficile* ile enfekte yatan hastaların çoğunluğu asemptomatik taşıyıcılardır ve hastane koşullarında *C. difficile*'nin sürekli mevcudiyetini sağlayan sessiz taşıyıcı konumundadırlar (3).

Enfeksiyon kontrolündeki gelişmelere ve *C. difficile* enfeksiyonu tedavisindeki yeni seçeneklere rağmen, *C. difficile* enfeksiyonu insidansında kararlı ve sürekli bir artış söz konusudur ve bu durum artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (4). *C. difficile* enfeksiyonu epidemiyolojisindeki bu değişiklikler, dünyada gittikçe yaygınlaşan ve acil bir sorun haline gelen hipervirülan *C. difficile* suşlarının yayılımı ve enfeksiyonun tanı yöntemlerinin gelişmesiyle ilişkilidir.

Hipervirülan *C. difficile* suşları, 2000 yılı öncesine dek Amerika Birleşik Devletleri'ndeki (A.B.D) *C. difficile* kökenlerinin%1'inden azını oluşturmaktaydı (5). Toksinotip III olarak karakterize edilen bu kökenler, toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB)'nin üretimi için negatif düzenleyici olan *tcdC* geninde 117. pozisyonda 18 baz çiftlik bir delesyon ile karakterizedir (6). Bu çerçeveye kayma mutasyonu prematür bir stop kodonu oluşturmaktadır.

Hipervirülan (epidemik) *C. difficile* suşları birim zamanda daha fazla toksin üretmek yerine daha uzun süreler boyunca toksin üretimini sürdürmektedir ve bu durum fonksiyonel negatif regülasyon mekanizmasının yokluğundan kaynaklanmaktadır (7).

Hipervirülan kökenlerin bir diğer önemli özelliği "binary" toksin denilen diğer bir toksini de üretmeleridir. Bu toksinin *C. difficile* enfeksiyonu patogenezindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar, "binary" toksinin kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerinin dış yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. Bu bulgular "binary" toksinin daha şiddetli hastalık oluşturmasında önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu ayrıca tekrarlayan hastalıklarda rol oynadığı düşündürmüştür (8).

Çalışmamızda *Clostridium difficile* ishali şüphesi ile merkez seroloji laboratuvarına gönderilen hastaların dışkı örneklerinde serolojik yöntemlerden ELISA ve immunokromatografiik kart testi ; bakteriyolojik yöntemlerden de kültür yöntemleri ile toksin varlığı ve etkenleri araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Psödomembranöz enterokolit (PME) ilk olarak 1893 yılında Finney tarafından tanımlanmıştır. 1935 yılında Hall ve O'Toole (9) tarafından sağlıklı yenidoğanların barsak florasında saptanmış ve barsak hastalığı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Kültüre edilmesi oldukça zor olduğundan bu bakteriye güç (*difficult*) anlamında "*Clostridium difficile*" adı verilmiştir. Antibiyotikle ilişkili barsak hastalıkları üzerine 1940 ve 1950"li yıllarda hayvan modellerinde çalışmalar yapılmıştır. *C. difficile*'nin ekzotoksinleri, 1960 ve 1970"li yıllarda yapılan çalışmalarda belirlenip, psödomembranöz kolit (PMK) ile ilişkisi saptanmış, sonrasında antibiyotiğe bağlı ishale yol açan en önemli etken olarak tanımlanmıştır. Tedesco ve arkadaşları (10), 1974 yılında klindamisin ile tedavi edilen 200 olgunun 42'sinde (%21) diyare oluştuğunu, bunların 20'sinde (%10) ise endoskopik olarak PMK bulduklarını bildirmişlerdir.

C. difficile kökenlerinin, antibiyotikle ilişkili ishale neden oldukları ilk kez 1977 yılında gösterilmiştir . Larson ve Price (11) 1977'de, Bartlett ve arkadaşları (12) 1978'de, antibiyotiğe bağlı PMK'da etkenin, toksin yapan *C. difficile* olduğunu saptamışlardır. CDE'lerin yakından takip edildiği ülkelerde, 1990'lı yıllarda bu enfeksiyonların insidansında bir artışın başladığı, 2006 ve 2007 yıllarında artış oranının en üst seviyeye ulaştığı belirlenmiştir . O zamandan beri CDE (*Clostridium difficile* enfeksiyonu) nozokomiyal ishal enfeksiyonunun önemli bir sebebi olarak kabul edilmektedir (13).

2.2. Mikrobiyolojik özellikler

Clostridium difficile 0,5 µm eninde ve 3-5 µm boyunda, zorunlu anaerob basillerdir. Anilin boyaları ile kolay boyanır ve gram pozitifdir. Ancak, eski kültür kolonilerinden yapılan boyamalarda gram negatif olarak görülebilmektedir. Kapsülsüz ve peritrik kirpikleri ile zayıf hareketlidir. İnaktif spor üretir, zorlu çevre koşullarında yıllarca ve

hatta yüzyıl boyunca canlı olarak kalabilir. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan sporlar muhtemelen insana bulaşta ortak kaynaklardır. Bakteri bedeninden daha geniş olan sporları, oval ve subterminal yerleşimlidir. Spor nadiren terminal yerleşim gösterebilmektedir (14,15). Buna bağlı olarak mekik, davul tokmağı ve raket görünümü alırlar. Üremek için kan, serum, yumurta sarısı ve fruktoz bulunan besiyerlerine ihtiyaç gösterir. En sık kullanılan besiyeri Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) besiyeridir. Optimal üreme sıcaklığı 37°C olup pH 7-7,2'de iyi ürer. 37 °C'de, 48 saatlik inkübasyon sonunda hafif kabarık, kenarları düzensiz, 1-3 mm çaplı koloniler meydana gelir (15). Bu besiyerinde 24 saat içinde oluşan koloniler 360 nm.'de UV ışık altında incelenirse, etrafının açık yeşilden sarıya kadar değişen bir hale ile çevrili olduğu görülür. Tyrosinli, besiyerinde ürediğinde tyrosini kullanarak L tyrosinden p-krezol açığa çıkararak, kendine özgü at pisiği kokusu oluşturmaktadır (16).

C. difficile katalaz , üreaz , lesitinaz ve lipaz aktivitesi göstermez. Bazı suşlar jelatini ve eskülünü hidrolize eder. Hidrojen sülfür (H₂S) ve indol oluşturmaz. Çoğu köken glukoz, mannitol, mellibioz ve melesitozu asit oluşturarak fermente ederken, bazı suşlar salisin, ksiloz, sorbitol ve trehaloza da etki edebilir (17). Laktoz, sukroz,galaktoz,inülin,nişasta ve gliserole etki etmez. Lipaz ve lesitinaz aktiviteleri yoktur. Katalaz negatif , üreaz negatif, proteaz, kollagenaz, heparinaz ve kondrotin -4-sülfataz gibi hidrolitik enzimleri var olup bu enzimler virülansla ilişkilidir (3,5,9,11).

2.3. Virülans özellikleri

2.3.1. Spor oluşturma

C. difficile uygun olmayan koşullar altında spor oluşturmaktadır. *C. difficile*'nin vejetatif şekilleri ısı, eter ve alkol gibi fiziksel ve kimyasal etkenlere dayanıksız oldukları halde sporları oldukça dirençlidir ve oda sıcaklığında tutulan kontamine materyalde enfeksiyöz özelliğini yaklaşık olarak 5 ay korumaktadır. Sporlar enfeksiyöz olup hastalığın geçişinde önemli role sahiptir (18).

2.3.2. Flajella

Flajella konak invazyonu ve kolonizasyon için gerekli olan önemli bir virülans faktörüdür. En iyi karakterize edilen iki *C. difficile* flajellar proteini, major flajellin yapısal monomer olan FliC ve FliD'dir. Flajella oluşumu ayrıca biyofilm üretimi ile de ilişkilendirilmektedir (18).

2.3.3. Fibronektin Bağlayıcı Protein

C. difficile, 68 kDa'luk manganez bağlayıcı bir protein olan fibronektin bağlayıcı protein (Fbp68) üretir. İn-vitro olarak yapılan çalışmalar Fbp68'in fibronektin, fibrinojen ve vitronektini içeren ekstraselüler hücre matris proteinlerine bağlanmakta rol oynadığını göstermiştir (19).

2.3.4. Fimbria (Pilus)

Bazı *C. difficile* suşları fimbriaya sahipken diğerleri değildir. Saptandıklarında 4-9 nm çapında ve 6 µm uzunlukta olup polar orijinlidirler. Yapılan bir çalışmaya göre fimbria içermeyen suşların da *C. difficile* enfeksiyonu oluşturması nedeniyle bu mikroorganizmanın patogeneğinde fimbria oluşumunun önemli olamayabileceği düşünülmüştür (20).

Tip IV pili hücre yüzeyinde üretilmekte ve konak kolonizasyonu ile *C. difficile* hastalık patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. T4P genlerinin (*pilA1* ve *pilB1*) inaktivasyonu pilus formasyonunu bozmakta ve hücre agregasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (21).

2.3.5. Toksinler

Clostridium difficile enfeksiyonu, bakterinin ürettiği ekzotoksinlerle olmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen *C. difficile* izolatlarının %75'i toksin üretir (15). *C. difficile* toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) denilen iki farklı toksin üretmektedir. Toksin A, 308 kDa molekül ağırlığında bir enterotoksin olup ana patojenik komponenti oluşturur. Toksin B ise 270 kDa ağırlığında, sitotoksik etkiye sahip kısımdır. Toksin A da sitotoksik etkilidir, ancak toksin B'nin sitotoksik özelliği, toksin A'ya göre 100 ile 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Her iki toksinde protein yapısında olup asitlere, proteolitik enzimlere ve ısıya duyarlıdır (15,22,23).

Bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücresine girdikten sonra hücrenin aktin iskeletini etkileyip hücre ölümüne neden olurlar. Toksinler, aynı zamanda bazı sitokinlerin salgılanmasına, bunun sonucunda inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açarlar (23,24). Her ne kadar toksin üretmeyen suşlar hastalığa neden olmasa da, toksijenik her suş da hastalık yapmamaktadır. Bu durumun, suşlar arasındaki farklardan, konaktaki toksin reseptörlerinin ve immün yanıt farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (15).

Enterosit yüzeyindeki reseptörler doğumda henüz yapısal olarak olgunlaşmamış olup toksin bağlama kapasiteleri çok düşüktür. Bu durum sağlıklı yenidoğanlarda toksijenik *C.difficile* suşlarının, sık olarak (%60-70) izole edilmesine rağmen hastalığın görülmemesini açıklamaktadır (25).

2.3.5.1. Toksin A (tcdA)

Toksin A, enterotoksin ve 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 arkasından da ishale neden olur (22).

Toksin A, enterosit membranı üzerinde bulunan glikoprotein reseptörlerine bağlanarak, hücre içine girer. Fibriler aktini değiştirerek konak hücrede yuvarlaklaşmaya neden olur. Kolon mukoza hücreleri arasındaki bağlantılar kopar ve yaygın harabiyet gelişir. Sonuçta, bağırsaktan lümene proteinden zengin bir iltihap sızar. Oluşan harabiyet toksin B'nin mukoza hücrelerine penetre olmasını daha da kolaylaştırır (15).

Toksin A, enterositler dışındaki diğer hücreler üzerine de etki gösterebilmektedir. Makrofaj ve mast hücrelerini aktive edip, nötrofillerin mobilizasyonuna yol açar. Sonuçta mukoza hasarı ile birlikte etkilenen bağırsak segmenti içine nötrofiller hücum eder. Bu nedenle toksin A, kolera toksininin aksine monosit, nötrofil ve dökülmüş enterositler içeren proteinden zengin bir dışkılamaya sebep olur. Hemorojiye bağlı olarak dışkıda bazen kanda bulunabilmektedir (15).

2.3.5.2. Toksin B (tcdB)

Moleküler ağırlığı 250-270 k.da olan bu toksin oldukça potent bir toksindir .tek başına toksik olmayıp, toksin A' ile birlikte sitotoksik etki göstermektedir . Toksin B'nin sitotoksik etkisi toksin A'ya göre 100-1000 kat daha fazladır. Bağırsak mukoza hücrelerinde toksin B için spesifik reseptör bulunmamaktadır(26).

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

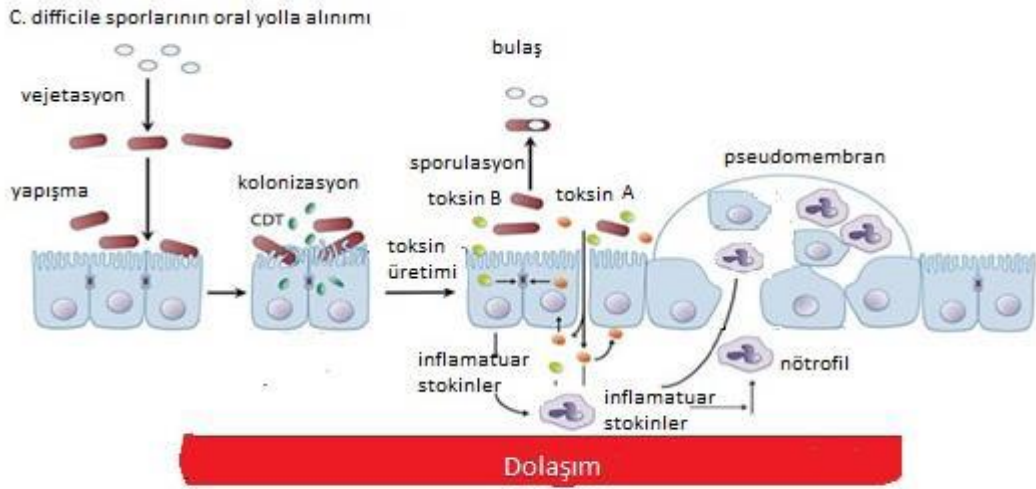
1987 yılında bazı *C. difficile* suşları tarafından üçüncü bir toksin olan “binary” toksinin üretildiği bildirilmiştir (27). 2000’li yıllardan itibaren bu toksini salgılayan suşlar özellikle yaygın hale gelmiştir (5). Toksinin bağlanma aktivitesinden sorumlu olan CdtB ve enzimatik aktiviteden sorumlu olan CdtA’yı kodlayan genlerin 1997 yılında dizi analizi gerçekleştirilmiştir (28). Ardından geni barındıran 6,2 kb’lık bir bölge

identifiye edilmiştir ve “*cdt* lokus” veya “*CdtLoc*” olarak adlandırılmıştır (29). Bu bölge her iki toksin genini de içermektedir ve aynı zamanda adenozin difosfat (ADP) ribozile edici toksin ailesine ait regülatör proteini de kodlamaktadır. Bu toksin ailesinin diğer üyeleri *Clostridium botulinum* C2 toksin, *Clostridium perfringens* iyota toksin, *Clostridium spiroforme* toksin ve *Bacillus cereus* vejetatif proteinleridir. CdtA biyolojik olarak aktif ve “ADP ribozil transferaz” aktivitesine sahipken CdtB konak hücrelere bağlanmaktan ve sitozole enzimatik komponentin translokasyonundan sorumludur. Çalışmalar, “binary” toksinin kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerinin dış yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. Bu bulgular “binary” toksinin daha şiddetli hastalık oluşturmada önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu ayrıca tekrarlayan hastalıklarda rol oynadığı düşündürmüştür. Çeşitli klinik çalışmalar, artmış mortalite ile ilişkisini ortaya çıkarmıştır ancak daha ileri analizlere gereksinim vardır (30).

2.4. Patogenez

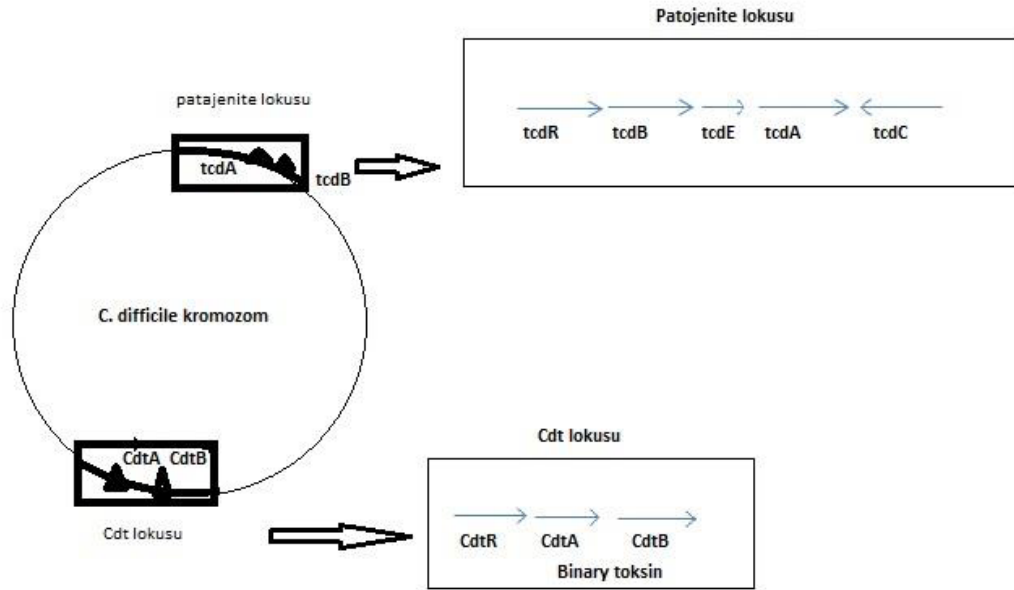
C.difficile 'nin hastalığa neden olabilmesi için barsakta yerleşmesi ve mukozal hasar , sıvı sekresyonu ve enflamasyona neden olarak toksin üretmesi gerekir. Bu kolonizasyon 2 aşamadan oluşmaktadır (16,22). Patojenik sürecin ilk adımı barsak hücrelerine yapışmasıyla başlar (31).

Patojenik sürecin ikinci aşaması toksinlerin üretimidir. Ana virulans faktörler toksin A ve toksin B (*tcdA* ve *tcdB*)'dir. Bu iki toksin, insan kolon mukozasına zarar veren güçlü sitotoksik enzimlerdir. Hücre iskeletinin önemli proteinleri olan *Ras* ve *Rho* proteinlerini glikozilasyon ile inaktive ederler. Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekreteruar ishal oluşmasına neden olmaktadır (32,33) (Şekil 1).



Şekil 1. *Clostridium difficile* enfeksiyonu patogeneğinde toksinler ve inflamasyon (34)

Toksin A ve B'nin sentez ve salınmasını düzenleyen genler, patojenite lokusu olarak adlandırılan özel bir yerde kümelenirler (Şekil 2). Burası beş genin kodlandığı yerdir: İki toksini kodlayan *tcdA* ve *tcdB* genleri, tam fonksiyonları bilinmeyen ama toksin üretimini arttırdığı düşünülen *tcdE* ve düzenleyici proteinleri kodlayan *tcdR* ve *tcdC* genleri (33,36). *TcdR*'nin toksin gen ekspresyonunda sigma faktör grup 5'e ait olan önemli bir alternatif RNA polimeraz sigma faktör, *tcdC*'nin ise negatif bir düzenleyici olduğunu göstermiştir. *TcdC*, gen ekspresyonu için gerekli olan kor RNA polimeraz ile *tcdR* arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini göstermektedir. Bu yüzden *tcdC* anti-sigma faktör olarak bilinmektedir (35,36). Virülans özelliği yüksek izolatlar, toksin A ve B haricinde aktine özgül ADP ribozil transferaz olan *binary* toksin veya CDT isimli üçüncü bir toksin üretmektedirler. Patojenik lokus dışındaki CDT lokus olarak adlandırılan bölgede, bu toksinin genleri olan *cdtA* ve *cdtB* genleri ve bir düzenleyici proteinin geni bulunmaktadır (36) (Şekil 2).



Şekil 2. *Clostridium difficile* toksinlerinin gen regülasyonu (31)

2.5. EPİDEMİYOLOJİ

C. difficile toprakta ve sularda (nehir, göl, yüzme havuzu gibi) yaygın olarak bulunmaktadır. Hayvanların ve insanların barsaklarında asemptomatik olarak bulunabilir. Bebeklerin %30-50'sinde barsak florasının bir üyesidir ve hastalığa nadiren neden olur. Yenidoğanlarda bakteri ve toksin varlığı yüksek oranlarda saptanırken, hastalık bulgularının olmayışı; reseptörlerin yeterince gelişmemesi, kolostrumun olası koruyucu etkisi ya da reseptörleri örten ince bir tabaka varlığı ile açıklanmaktadır. Yıllar içerisinde taşıyıcılık oranı giderek azalır. Sağlıklı erişkinlerde hastalığa neden olmadan dışkıda bulunma olasılığı %3-5'e düşer. Asemptomatik taşıyıcılık oranı sağlık çalışanlarında ve sağlık hizmeti alanlarda ve hastanede yatmakta olan hastalarda %30'lara ulaşır (14). Hastaların hastanede kalış süresi boyunca kolonizasyon riski de artmaktadır (15).

Hastane kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra toplum kaynaklı *C. difficile* tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır. ABD'de her yıl 100.000 kişide 6,9 ile 46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu tespit edilmektedir. Retrospektif bir çalışmada Kuzey Carolina'da toplum kaynaklı *C. difficile* oranının 2005 yılında %20 olarak tahmin edildiği ve bu oranın Avrupa ve Kanada'da benzer olduğu bildirilmiştir (37).

Türkiye’de *CDE* ile ilişkili durumun halen bir sorun olup olmadığı konusunda yeterli bilgi yoktur. Çünkü iyi planlanmış çok merkezli bir çalışma henüz yapılmamıştır. Türkiye’de yapılan bir çalışmada hastane kökenli ishallerin %43’ünde etken olarak *C. difficile*’yi saptanırken, *C.difficile* enfeksiyonu insidansı 1000 hasta gününde 0,6 olarak bildirilmiştir (38). Cerrahpaşa Üniversitesinde 16 aylık periyotta nozokomiyal ishalleri 226 hastanın incelenmesinde *C. difficile* TcdA veya B pozitiflik oranını %5,5 olarak tespit edilmiştir (39).

Son yıllarda yapılan çalışmalara *CDE* antibiyotik maruziyeti olmadan ve son zamanlarda hastane yatışı olmadan da gelişebilir. *CDE*’nin meydana gelmesinde kaynak olarak pakette gıda ürünleri ve evcil hayvanlarının rol aldığı öne sürülür (40). Ancak *C. difficile* taşınmasında onların rolü tam olarak bilinmemektedir.

2.6. Tanı

2.6.1. Kültür ve Toksik Kültür

C. difficile için dışkı kültürü; özel seçici sikloserin sefoksitin fruktozlu agarda (CCFA) ve anaerob ortamda yapılır. Ekim yapılmadan önce dışkıya alkol şok işlemi yapılması normal barsak florasını baskılayarak, taurokolat veya lizozim ilavesi sporların germinasyonunu arttırarak *C. difficile*’nin izolasyon şansını arttırabilir (41). Anaerobik ortamda en az 48 saat inkübe edilir. Koloniler düz, 4–6 mm çapında, sarı renkte, düzensiz kenarlı, sarı halo ile çevrili ve buzlu cam görünümündedir . Kültür, 2–3 gün alan, nisbeten pahalı bir incelemedir. Özel deneyim gerektiğinden, her laboratuarda bakterinin izolasyonu kolayca yapılamayabilir. Kültürde üreyen kolonilerden yapılan Gram boyamalarında genellikle Gram pozitif basiller görülür. Gram boyamada subterminal sporlar görülebilir. Tipik koloni morfolojisinin görülmesi ve gram boyama çoğu zaman identifikasyon için yeterli olur, ancak tanımlanamayan kültürler biyokimyasal yöntemlerle veya gaz kromatografi ile tanımlanabilir (16).

Bebeklerde, çocuklarda ve sağlıklı erişkinlerde toksijenik olmayan *C. difficile* suşları bulunabilmektedir. Toksin yapan ve yapmayan suşların kültürle ayırt edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle, tek başına kültür *CDE* tanısı için yeterli değildir. Kültür ile birlikte toksin araştırılması gereklidir. Kültürle birlikte toksin pozitifliği ya da tek başına toksin pozitifliği tanıda değerlidir. Kültür yapılması, antibiyogram olanağını sağlayacağı için yararlı olacaktır. Kültürü takiben, izole edilen suşlarda in vitro olarak EIA, sitotoksikite testi ile toksin araştırılmasına toksijenik kültür adı verilmektedir. Toksik kültür ve

hücre kültüründe sitotoksisite testi CDE tanısı için referans testlerdir. İzole edilen suşlarda toksin araştırılmasının klinik olarak anlamı tam olarak netleşmemiş olmasına rağmen toksijenik kültürün hücre kültüründe sitotoksisite araştırılmasından daha duyarlı bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (34,43,44,45).

2.6.2.Hücre Kültüründe Sitotoksisite Testi

Toksin B'ye ait karakteristik sitopatik etkiyi araştıran bir testtir. Bugün için *C. difficile* toksinini saptamada en değerli test olarak kabul edilmektedir. Sitotoksisite testi için dışkı filtratı tek katlı hücre kültürüne inoküle edilir ve 24 ile 48. saatlerde toksin B'nin sitopatik etkisi araştırılır. Hücre kültüründe Vero hücreleri, HeLA hücreleri, insan prepisyum derisi fibroblast hücreleri ve Hep-2 hücreleri kullanılabilir. Düşük titrelerdeki toksin düzeylerine de duyarlı olduğu için çoğunlukla insan prepisyum derisi fibroblast hücreleri tercih edilir. Sitopatik etki saptanan durumlarda tanının doğrulanması için antiserum (*C. sordelli* antitoksini veya *C. difficile* antitoksini) ile nötralizasyon testi yapılmalıdır. Sonuç alabilmek için en az 2-3 gün gerekir. Doku kültürü teknolojisi olan laboratuarlarda yapılabilir, pahalı bir yöntemdir. Ayrıca değerlendirilmesi için deneyimli elemanlara gerek duyulan bir incelemedir. *C. difficile* ishali olguların saptanmasında çok duyarlı bir yöntemdir. Ancak bu toksin sıcağa ve aside dayanıklı olmadığından, dışkı örneğinin saklanma ve taşınmasına veya uygulamaya bağlı olarak test yanlış negatif sonuç verebilir. Duyarlılık %94-100, özgüllük %99'dur (43,44,46,47).

2.6.3.Enzim immunoassay(EIA) Yöntemler

Hasta örneğinde antijen ve toksin arayan serolojik testlerdir. Yukarıda da belirtildiği gibi kültür, toksijenik kültür ve hücre kültüründe sitotoksisite testinin zaman alıcı, pahalı, özel deneyim ve donanım gerektiren laboratuarlarda yapılabilen tetkikler olması sebebiyle birçok sağlık kuruluşu CDE'lerin tanısında EIA yöntemlerini tercih etmektedir. Bu testler nispeten ucuz, hızlı sonuç alınabilen, uygulaması kolay testlerdir. Bu yöntemle bakterinin ürettiği toksin A, toksin B ve GDH enziminin saptanması mümkündür. Yalnız toksin A veya GDH, toksin A+B ve toksin A+B+GDH saptayan kitler mevcuttur. EIA testler kuyu-tip EIA ve membran-tip EIA testler olarak ikiye ayrılır. Membran-tip EIA testler örneklerin tek tek çalışılabildiği testlerdir. Kuyu-tip EIA testler ise çok sayıda örneğin toplu olarak çalışılabildiği testlerdir. Kuyu-tip EIA ve membran-tip EIA testler arasında duyarlılık ve özgüllük açısından anlamlı fark

bulunmamaktadır (48). GDH toksijenik olmayan suşlar tarafından da sentezlenmektedir. Dışkıda glutamat dehidrogenazı saptayan EIA testleri dışkıda *C. difficile* mevcudiyetini gösterir, bu testle toksijenik ve non-toksijenik suşları ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle toksin testleri ile karşılaştırıldığında özgüllüğü düşük bir testtir ve tanıdaki değeri kültür kadardır, tek başına anlamlı değildir (48,49). EIA yöntemiyle toksin A ve B saptayan testler, *C. difficile* tanısında en sık kullanılan testlerdir. Toksinlerden birini sentezleyip diğerini sentezlemeyen suşların olduğu bilindiğinden, her iki toksinin birlikte araştırılması önerilmektedir. Bu nedenle, birçok laboratuarda toksin A ve B'nin her ikisini birden saptayan kitler kullanılmaktadır (50,51). Toksin araştırmalarında unutulmaması gereken nokta bu toksinlerin ısıya hassas olmalarıdır. Uygunsuz koşullarda saklama ve transport yanlış sonuçların alınmasına neden olabilir. EIA yöntemlerin toksijenik kültür ve hücre kültüründe sitotoksisite testi gibi referans testlere göre duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Kullanılan test kitine göre toksin A ve B saptayan testlerin duyarlılığı %63–94; özgüllüğü %75–100 arasında değişmektedir. GDH saptayan EIA testlerin duyarlılığı, %85–95; özgüllüğü %89–99 arasında değişmektedir (16). Bu testlerin negatif prediktif değerinin yüksek olduğu ve CDE prevalansının düşük olduğu durumlarda EIA yöntemlerle alınan negatif sonuçların hastalığın dışlanması için yeterli olduğu, sadece epidemi gibi prevalansın yüksek olduğu durumlarda testlerin negatif prediktif değerinde düşme olduğu ve bu durumlarda testlerin tekrarlanmasında fayda olabileceği belirtilmektedir (48,52,53). Hastalık prevalansı çok yüksek olmadıkça, EIA testlerinin birçoğunun pozitif prediktif değeri düşük saptanmıştır. Bu nedenle mevcut EIA kitleri CDE tanısında tek başına kullanılmamalıdır. EIA testler ile alınan tüm pozitif sonuçlar mutlaka doğrulanmalıdır. Doğrulama; toksijenik kültür veya hücre kültüründe sitotoksisite testi ile yapılmalıdır. Eğer toksijenik kültür veya hücre kültüründe sitotoksisite testi imkânı yoksa özgüllüğü daha yüksek bir EIA kiti veya PZR yöntemi ile doğrulama yapılabilir. Ancak ilk sonuç pozitif, doğrulama testi negatif sonuçlanırsa, toksijenik kültür veya hücre kültüründe sitotoksisite testi ile tekrar doğrulama yapılmalıdır (48,54,55).

2.6.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Nükleik asit amplifikasyon tekniğidir. PZR ile dışkıda toksin A ve B üretiminden sorumlu *tcdA* ile *tcdB* ve binary toksin üretiminden sorumlu *cdtA* ile *cdtB* genlerinin varlığı araştırılabilir. Ayrıca toksin üretimi üzerine negatif-düzenleyici etkisi olduğu

düşünülen *tcdC* genindeki toksin üretiminde artışla sonuçlanan baz çifti delesyonları saptanabilir (48). *C. difficile* tanısında PZR yöntemine dayalı ticari kitler mevcuttur. PZR yöntemi, EIA yöntemlere göre daha duyarlı ve özgül olabilir, ancak rutin kullanımının önerilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (16).

2.6.5.Dışkı Laktoferrin Testi

Lökosit ürünlerini gösterir, çabuk sonuç veren ama tanıda değeri olmayan bir testtir.

2.6.6. Endoskopi

Her hastaya yapılması mümkün olmayan bir tanı yöntemidir. Acil tanının gerekli olduğu ve toksin sonuçlarının gecikeceği, ileus varlığı nedeni ile dışkıının alınmadığı veya diğer kolon hastalıklarından şüphe edildiği durumlarda yapılır. Hastaların %90'ında rektum ve sigmoid tutulumu söz konusu olduğundan rektosigmoidoskopik inceleme ile başlamalıdır. Ancak lezyon saptanamazsa tüm kolon incelenmelidir (44,49,56). Endoskopik olarak çapları 2-10 mm arasında değişen, normal görünümlü mukozaya serpilmiş, kolay kopan sarımsı beyaz nodüller veya plaklar ve membranlar PMK'in karakteristik bulgusudur. Bu bulguların varlığında bazen biyopsiye bile gerek duyulmadan tanı konabilir ama histopatolojik olarak tanıyı desteklemek gerekir ilerlemiş olgularda sayıları artar, genişler, plak ve membranlara dönüşürler veya soyulmuş görünümü verebilirler. Aradaki mukoza normal veya hiperemik ve ödemli olabilir. Nodül ve küçük membranlar biyopsi sırasında kolaylıkla koparlar. Lezyonlar yer yer de bulunabilir (34,44,49,57). PMK tüm CDE'lerinin bir bölümünü oluşturur. Endoskopik olarak sadece hiperemi, ödem ve frajilite de bulunabilir. Hatta normal mukozaya rastlanabilir. Bunlar, nonspesifik ishal olguları olup pek çok nedeni olabileceğinden, nodül ve psödomembranlar gibi tanı için karakteristik bulgular değildirler (57).

2.6.7. Histopatoloji

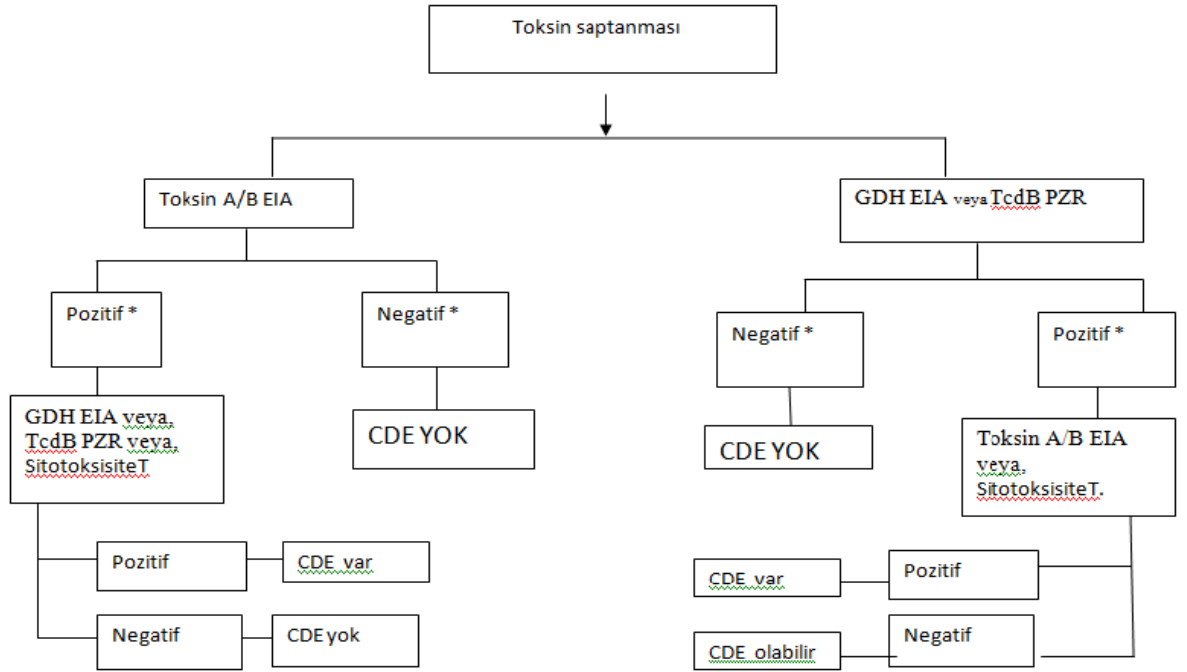
Histolojik olarak epitel nekrozu, mukusla şişmiş goblet hücreleri, yüzeysel ülserden yayılan psödomembranlar (fibrin, müsin ve akut iltihap hücreleri) bulunur ve bu görünüm volkan lezyon olarak adlandırılır. Lamina propriada akut ve kronik iltihap hücreleri birliktedir. Başlangıçta inflamasyon lamina proprianın yüzeysel bölümünde sınırlanmışken, ilerlemiş olgularda tüm lamina propriaya yayılır (49,56).

2.6.8. Radyoloji

Düz karın grafisinde gergin ve ödemli kolon saptanabilir. Komplikasyonlardan toksik megakolon ve perforasyon konusunda bilgi verir. 20 Kontrastlı kolon grafisi ileri derecede ağır hastalarda tehlikelidir ve uygulanmamalıdır. Erken evrede diğer nedenleri ekarte etmek için yapılabilir. Bilgisayarlı tomografi, özellikle sağ tutulumlu, diyaresi olmayan kolon duvar kalınlaşması olan olgularda yararlı olabilir (56,58).

2.7. Tanı Algoritması

İshal olan her olguda, CDE akla gelmelidir. Özellikle ileri yaş, altta yatan hastalık varlığı, antibiyotik kullanımı, sağlık hizmeti almış olması ve hastanede yatış gibi risk faktörleri CDE ihtimalini arttırmaktadır. Ancak ishalleri hastalarda *C. difficile* araştırılmasını risk grupları ile sınırlandırmak *C. difficile* hastalarının bir kısmının atlanmasına sebep olabilir. Çünkü *C. difficile* toplum kaynaklı ve/veya risk grubunda olmayanlarda da enfeksiyolara neden olabilmektedir. Üstelik bu durum son yıllarda daha da artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. difficile* saptanan hastaların yaklaşık %25"inde herhangi bir risk faktörü söz konusu değildir. Bu nedenle enfeksiyöz ishal düşünülen tüm hastalarda *C. difficile* araştırılabilir (59,60). Bu durumda ilk yapılacak işlem *C. difficile* toksinleri ve/veya kültürü için dışkı incelenmesinin yapılmasıdır. Hastaların aynı ishal atağında tekrarlayan örneklerle test edilmesinde ilave fayda bulunmamaktadır (16). Mevcut tanı yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük ve uygulanabilirlikleri göz önüne alındığında CDE tanısı için iki veya üç testten oluşan tanı algoritmalarının kullanılması önerilmektedir. Özellikle prevalansın düşük olduğu yerlerde negatif prediktif değeri yüksek olan EIA testlerle tarama yapılması, negatif sonuçların kesin sonuç olarak raporlanması; pozitif sonuçların ise PZR, toksijenik kültür veya sitotoksisite testi ile doğrulanması önerilmektedir. Önerilen tanı algoritması şekilde verilmiştir (48). Eğer hastanın durumu çok acil ise, hemen karar vermek gerekiyorsa veya ileus nedeni ile dışkı alınamıyorsa veya bir başka kolon hastalığı söz konusu ise endoskopik inceleme ilk sıraya alınabilir.



* Yüksek klinik şüphe varsa kültür yapılabilir. Toksijenik kültür pozitifliği *C. difficile* varlığını gösterir ve başka test yapılması gereksizdir(48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız *C.difficile* ishali şüphesi ile merkez seroloji laboratuvarına gönderilen örneklerde *C.difficile* ve toksin varlığı; toksin A/B ELISA testi (*DRG diagnostic, Almanya*), immüno-kromatografi kart testi (*TECHLAB, Hollanda*), bakteriyolojik kültür yöntemleri ile araştırıldı. Hastanemiz klinik ve polikliniklerinden gönderilen dışkı örnekleri temiz, sızıntıya dayanıklı kapaklı kaplara alınarak merkez laboratuvarına gönderildi.

Laboratuvara gelen bu örnekler ;

- 1) İmmüno-kromatografi kart testi ile direk toksin varlığına bakıldı.
- 2) Örnekler -80 °C de muhafaza edildi.
- 3) Oda ısısına getirilen örneklerden selektif besiyerlerine ekim yapılarak anaerob ortamda 37 °C de 48-72 saat inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon süresi sonunda üreyen şüpheli koloniler makroskopik ve mikroskopik yönünden incelenip daha sonra ileri identifikasyonları yapıldı .

3.1. İmmünokromotografik kart testi

3.1.1.Gereçler

1. Test kasetleri ve reaktifler (*Pozitif kontrol solüsyonu, dilüent ve konjugat solüsyonları, yıkama solüsyonu, substrat*) (*C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*, *TECHLAB, Hollanda*)
2. Test tüpleri
3. Mikropipetler (25µL, 300µL, 500µL ve 750µL şeklinde derecelendirilmiş)
4. Vorteks cihazı
5. Buzdolabı
6. Derin dondurucu (-80°C)

3.1.2.Test prosedürü

1. Tüm reaktifler ve test kasetleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Her bir test tüpüne 750 µL *Diluent* aktarıldı.
3. Her bir test tüpüne 1'er damla *Konjugat* damlatıldı.
4. Transfer pipeti yardımıyla 25µL gaita örneği daha önce hazırlanan *Diluent/Konjugat* karışımı içine ilave edildi.
5. Hazırlanan örnek/dilüsyon tüpleri vorteks ile karıştırıldı.
6. Hazırlanan örnekten 500"er µL karışım test kasetlerinin örnek kuyucuğuna aktarıldı.
7. Test kasetleri oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
8. inkübasyondan sonra reaksiyon penceresine 300µL yıkama solüsyonu ilave edildi.
9. Reaksiyon penceresine 2 damla substrat ilave edildi.
10. On dakikalık inkübasyondan sonra sonuçlar okundu.

GDH ve toksin A+B serolojik belirteçlerini araştırmak amacıyla membran yöntemi prensibiyle çalışan *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* kitleri üretici firmanın

önerileri doğrultusunda kullanıldı ve sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda yorumlandı.

3-2) ELISA

3.2.1.Gereçler

1. Test kuyucukları ve reaktifler (*Pozitif kontrol solüsyonu, dilüent ve konjugat solüsyonları, yıkama solüsyonu, substrat*) (*C.difficile toxin A+B Ag ELISA ,DRG diagnostic, Almanya*)
2. Test tüpleri
3. Otomatik Mikropipetler (25µL, 300µL, 500µL ve 750µL şeklinde derecelendirilmiş)
4. Vorteks cihazı

3.2.2. Test prosedürü

1. Tüm reaktifler ve plate oda sıcaklığına getirildi.
 2. Örnekler 1000 ml dilüentle sulandırılıp vortekslendi. (sıvı örneklerden 100 µl, katı örneklerden ise 0.1 mg eklendi)
 3. İlk kuyucuğa pozitif kontrol , 2. kuyucuğa negatif kontrol 100 er ml pipetlendi
 4. 700 devirde 30 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
 5. Yıkama solusyonu ile yıkandı.
 6. Kuyucuklara 120 ml biotin-konjugat pipetlendi.
 7. 700 devirde 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
 8. Yıkama solusyonu ile yıkandı.
 9. Her kuyucuğa 120 ml streptavidin-HRP-konjugat pipetlendi.
 10. 700 devirde 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
 11. Yıkama solusyonu ile yıkandı.
 12. 120 ml substrat pipetlendikten sonra 15 dk oda ısısında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
 13. İnkübasyon sonucunda 120 ml stop solusyonu ilave edilip 30 dk sonunda 450nm/≥ 620nm de sonuçlar okundu.
- Sonuçlar, cut off'a göre belirlendi. Cut off > değerler pozitif , cut off < değerler negatif kabul edildi. *C.difficile toxin A+B Ag ELISA testi* üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı ve yorumlandı.

3-3) Kültür

Laboratuvara gelen dışkı örnekleri *C.difficile*'nin izolasyonuna imkan veren selektif besiyerlerinden hazır olarak temin ettiğimiz CCFA (*Concord Circle, CA*) ve chromID *C.difficile* agar kullanılarak izolasyon yapıldı. Örnekler tek koloni düşecek şekilde besiyerlerine ekim yapıldı. Besiyerleri anaerob ortam sağlamak için anaerogan (*Oxoid , İngiltere*) kiti ile 37°C de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürler makroskopik değerlendirmeye tabi tutuldu.

C.difficile özgü 2-3mm. Çapında, kenarları yuvarlak, sarı yeşilimsi kolonilerin varlığı yönünden araştırıldı. Koloniler gram boyama ile gram pozitif termal ya da subterminal spor basillerin varlığına bakıldı.

4.BULGULAR

Çalışmamıza Ocak 2013 – Ağustos 2016 tarihleri arasında Erciyes üniversitesi Gevher Nesibe araştırma ve uygulama hastanesinden gelen 50 hastanın dışkı örnekleri dâhil edildi. Cinsiyet, yaş, klinik ve poliklinik ayrımı gözetilmeden hastalar çalışmaya tabi tutuldu.

4.1. İmmünokromotografik Kart testi

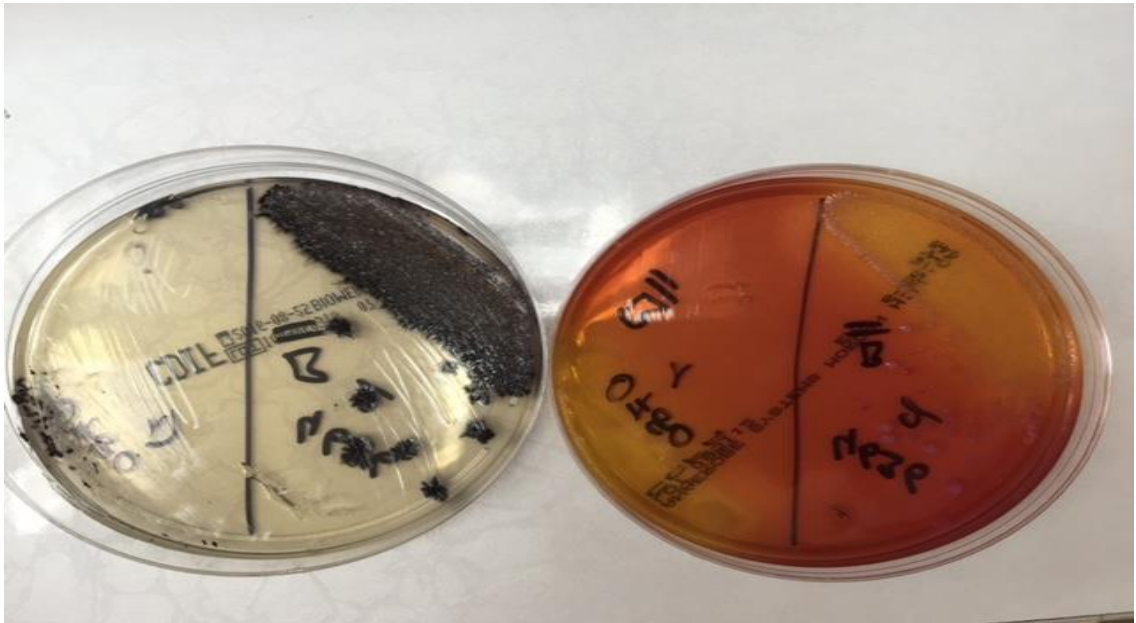
Çalışmamıza dahil edilen hastalara ait kıvamsız dışkı örneklerinden immünokromotografik kart yöntemi ile GDH ve toksin A+B araştırıldı. Hastaların 1 (%2) tanesinde GDH ve toksin A+B pozitifliği saptandı (Şekil 4.1). Yine 1 (%2) hastada GDH pozitifliği saptanmasına rağmen toksin varlığı bulunamadı.



Şekil 4-1 : İmmünokromotografik kart testte GDH ve toksin pozitifliği

4.2.Kültür :

Değerlendirme sonucu chromID besiyerinde 3 (%6) hastanın koloni şekilleri , kokusu ve boyama sonuçlarının CDE ile uyumu bulundu. Bir (%2) hasta CCFA besiyerinde aynı uyumu gösterirken , iki besiyerinde uyum gösteren sadece 1 (%2) hasta uyum gösterdi (Şekil 4.2). Örnekler gram boyama ile boyanarak doğrulandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. ChromID ve CCFA besiyerlerinde üreyen *C.difficile* koloni görüntüleri



Şekil 4.3. Kültürde Gram boyama *C. difficile* görüntüsü

4.3. *Clostridium difficile* toksin A+B ELISA testi

ELISA yöntemi değerlendirmesi sonucu toksin pozitifliği 2 (%4) hastada belirlendi, aynı zamanda bu hastaların kültürlerinde üreme belirlendi. Bu hastalara laboratuvarımızda bulunan otomatik identifikasyon VITEK (bioMérieux, France) ile doğrulama yapıldı , doğrulama yapılan bu hastalarda yine pozitiflik görüldü.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Clostridium difficile enfeksiyonu tüm dünyada hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ciddi bir sağlık sorunudur. Bu bakteriye bağlı enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir (24).

Her geçen gün dünyanın çeşitli ülkelerinden virölansı yüksek ve antibiyotiklere daha dirençli *C. difficile* kökenlerine bağlı yeni hastane salgınları ve yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (61). İzolatların epidemiyolojik analizlerin yapılabilmesi ve antibiyotiklere duyarlılık durumlarının saptanabilmesi için, kültür yapılması ve bakterilerin izole edilerek değerlendirilmesi gereklidir. Rutin tanıda ise kültür dışı yöntemler hızlı sonuç vermesi ve kullanım kolaylığı açısından tercih edilmektedir. Bu nedenle, direnç oranlarının belirlenmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesi ancak araştırma yapılması ile mümkün olmaktadır. Çalışmaların son derece kısıtlı olduğu ülkemizde verilerimizin, diğer çalışmalara da ışık tutacağına inanıyoruz.

Ülkemizde yapılan, *C. difficile* toksin varlığını araştıran bazı çalışmalar farklı oranlarda toksin pozitifliği belirlemişlerdir. Büyükbaba ve ark. (62), ImmunoCard Toksin A (Meridian Diagnostic) yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada 360 hastanın dışkı örneğinde toksin A varlığını % 4.7, daha sonraki dönemde ELISA yöntemiyle yaptıkları başka bir çalışmada ise 400 hastada Toksin A/B varlığını %12 olarak saptamışlardır. Aygün ve ark. (63) ise hastalarının dışkı örneklerinde, ELISA yöntemiyle toksin A/B pozitiflik oranını % 3.2 bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi hem poliklinik hem de hastanede yatan hastaların ele alındığı bir çalışmada; Altındiş ve ark. (64) toplam 91 hastanın 13'ünde (%14.3) toksin A/B'yi pozitif olarak belirlemişlerdir.

2006-2008 yılları arasında Deniz ve ark.'nın (23) gerçekleştirdikleri çalışmada ise 633 hastaya ait dışkı örneğinin 30'unda (%4.7) "ImmunoCard Toxins A&B EIA" kiti ile toksin A/B tespit edilmiştir. Aynı zamanda çalışmaya alınan tüm dışkı örneklerine toksijenik kültür uygulanmış, hastaların 50'sinden *C.difficile* üretilmiş, ve bu kökenlerin 36'sında (%5.7) toksin A ve toksin B genleri tespit edilmiş, *binary* toksin geni bulunmamıştır.

Di persio ve ark.'nın (65) 328 dışkı örneğinde kültür, lateks aglütinasyon ve ELISA ile toksin A araştırılması yöntemlerini birlikte uygulayarak yaptıkları çalışmada 52 (%15.9) örnekte bir veya daha fazla test ile pozitiflik tesbit etmişlerdir.

Günümüzde ishal en önemli sağlık problemlerinden birisi olup , erken etiyolojik tanı ile etkene yönelik tedbirlerin zamanında alınabilmesi hayat kurtarıcı olabilmektedir. Çalışmamızda *C.difficile*'in bölgemizde GIS'deki kolonizasyon prevalansının belirlenmesi ve tanıda kullanılan metodların karşılaştırılması planlandı. Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Uygulama ve araştırma hastanesinin çeşitli klinik ve polikliniklerinde takip edilen 50 hastanın dışkı örnekleri değerlendirildi. Çalışmamıza dahil edilen örneklere immunokromotografik kart testi , ELISA ve kültür yöntemleri birlikte uygulandı.

Çalışmamızda immunokromotografi ile incelenen 50 örneğin 2 (%4)' sinde pozitiflik bulundu. ELISA yöntemi ile yine 2 (%4)'sinde pozitiflik bulundu. ELISA'nın doğrulanması için altın standart kültür yöntemidir. Ancak biz laboratuvarımızda VITEK ile aynı hastalarda tekrardan pozitiflik elde ederek doğrulamış olduk.

Çalışmamızın bulguları ülkemizde yapılan diğer çalışmaların bulguları ile karşılaştırıldığında Büyükbaba ve ark. , Aygün ve ark., Deniz ve ark.larının bulguları ile

paralellik gösterirken ; Di Persio ve ark. sonuçları ile farklılık göstermektedir. Bizim oranlarımızın düşük çıkması , bu araştırmacıların olgularının uzun süre antibiyotik tedavisi gören kişilerden seçilmiş olması , çalışmalarında örnek sayılarının fazla olması, kişilerin sosyo ekonomik ve kültürel farklılığı gibi faktörlerin rolünün olabileceği akla gelmektedir.

Çalışmamızda kültür yöntemiyle %4 gibi düşük bir pozitiflik elde edilmesi anaerop ortam gerektiren kültür ortamının oldukça kompleks oluşuna ve prosedür gereği hata kaynaklarının fazla olabileceğine bağlanmaktadır.

Dışkıda *C.difficile* ait enterotoksin varlığının gösterilmesi lateks aglütinasyon ile *C.difficile* ortak antijen varlığı veya CCFA'da *C.difficile* üretilmesi değerli testlerdir. Ancak bunların hiçbiri tek başına CDE tanısı koymak için yeterli değildir. Lateks aglütinasyon testi, dışkıda toksik olmayan *C.difficile* suşları ve diğer bakterilerin çapraz reaksiyon nedeniyle hatalı pozitif sonuçlara yol açmaktadır. CCFA gibi selektif besiyerinde üreyen *C.difficile* suşları toksin A/B üretmeyen suşlar olup ishallerine sebep olmayabilirler. Bu da kültür yönteminin laboratuvar tanı yöntemi olarak güvenilirliğini azaltmaktadır. Ayrıca kültür yöntemi zaman bakımından laboratuvar tanısı için zordur. Kesin *C.difficile* diyebilmek için klinik yöntemlerden birkaçının birlikte uygulanması gerekir.

ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre , diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de ishal olgularında bilinen etiyolojik ajanların yanı sıra *C.difficile*'nin dikkatle araştırılması gerektiğini ve seroloji laboratuvarlarında bu mikroorganizmayı belirleyen imkanlar doğrultusunda daha hızlı tetkiklerin de rutin testler arasında yer almalarının yararlı olabileceği kanısına varıldı.

C.difficile'nin tanısında immünolojik prosedürlerin hızlı ve duyarlı olduklarından klinikten gelen örneklerde öncelikle bu mikroorganizmayı belirleyen hızlı immünokromotografik kart testleri ve diğer serolojik yöntemlerle etkenin özgül toksinleri ve toksijenik suşların ayırımında yararlı olacağı kanısındayız.

6.KAYNAKLAR

- 1 - Ciaran P, LaMont J. *Clostridium difficile*. More difficult than ever. The New England Journal of Medicine 2008;359:1932-1940.
- 2- Fekety R, Shah AB. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. Journal of the American Medical Association 1993;269: 71–75.
- 3- Khanna S, Pardi DS. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 2010;4:409-416.
- 4- Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman M, Michaud S. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. The New England Journal of Medicine 2005;353:2442-2449.
- 5- McDonald, L. C, Killgore G.E, Thompson A, Owens R.C, Kazakova S.V, Sambol S.P, Johnson S, Gerding D.N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. The New England Journal of Medicine 2005;353:2433–2441.
- 6- Freeman J, Bauer M.P, Baines S.D, Corver.J, Fawley W.N, Goorhuis B, Kuijper E.J, Wilcox M.H. The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. Clinical Microbiology Reviews 2010;23:529-549.
- 7- Freeman, J., Fawley W.N, Baines S, Wilcox M. Measurement of toxin production by *Clostridium difficile*. Lancet 2006;367:982–983.
- 8- Geric, B, Carman R.J, Rupnik M, Genheimer C.W., Sambol S, Lyerly D.M., Gerding D.N, Johnson S. Binary toxin-producing, large clostridial toxin negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. Journal of Infectious Disease and Therapy 2006; 193:1143–1150.
- 9- I.C. Hall, E. O'Toole Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child. 1935;49(2): 390–402.

- 10- Tedesco, F.J., Barton, R.W., Alpers, D.H., Clindamycin-associated colitis: a prospective study, *Ann. Intern. Med.*, 81(4), 429–33, 1974.
- 11- Larson, H.E., Price, A.B., Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin, *Lancet*, 2(8052-8053), 1312–4, Dec 24-31, 1977.
- 12- Bartlett, J.G., Chang, T.W., Gurwith, M., Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing Clostridia, *N. Engl. J. Med.*, 298, 531–5, 1978.
- 13- Pearson, A., Historical and changing epidemiology of healthcare-associated infections, *J. Hosp. Infect.*, 73(4), 296–304, 2009.
- 14- Bilgehan H. *Clostridium difficile*. Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. s. 361-363, 9. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1995.
- 15- Kıyan M. Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s. 645-649, 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
- 16- Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al. Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manuel*. 5th. Edition, pp 95-101, Star Publishing Company, California, USA, 1993.
- 17- Koneman EW. Identification of Anaerobic Bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda M, Schreckenberger PC, Winn WC. (eds). *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*. Sixth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 2006:933-993.
- 18- Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 2014;5:579-593.
- 19- Hennequin C, Janoir C, Barc MC, Collignon A, Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 2003; 149:2779-2787.

- 20- Taha S, Johansson O, Rivera Jonsson S, Heimer D, Krovacek K. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2007; 30:163-174.
- 21- Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier LC, Tamayo R, Burrus V. Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 2015;197:819-832.
- 22- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Clostridium difficile*. (Çev: Başustaoğlu AC) s. 377-389. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010
- 23- Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde Yatan ishaller Hastalardan izole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(1):1-10.
- 24- Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7(8):421-427.
- 25- Popoff, MR, EJ Rubin, DM Gill and P Boquet. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988; 56: 2299-2306
- 26- Vaishnavi C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol*, 2009;27: 289-300.
- 27- Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infection and Immunity* 1988; 56: 2299–2306.
- 28- Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infection and Immunity* 1997;65:1402-1407.
- 29- Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JJ. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *Journal of Bacteriology* 2007;189:7290–7301

- 30- Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *The Journal of Infection* 2009; 58: 403-410.
- 31- Den`eve C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33: 24-28.
- 32- Von Eichel-Streiber C, Sauerborn M, Thlestam M. Large clostridial cytotoxins a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol*. 1996;4:375-382.
- 33- Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol*. 2008;57:685-689.
- 34- Shen A. *Clostridium difficile* toxins: Mediators of inflammation. *J Innate Immun*. 2012;4:149–158
- 35- Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. 2001;50:613-619.
- 36- Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol*. 2007;64:1274-1288.
- 37- O’Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology* 2011; 27: 38-47.
- 38- “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. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2009;39:382-387.
- 39- Aygun G, Yilmaz M, Yasar H, Aslan M, Polat E, Midilli K, Ozturk R, Altas K. Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? *The Journal of Hospital Infection* 2005;60:283-5.
- 40- Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis* 2010; 51:577.
- 41- Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect*. 2009; 58(6): 403-10.

- 42- Shen A. *Clostridium difficile* toxins: Mediators of inflammation. J Innate Immun. 2012;4:149–158
- 43- McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(6): 581-92.
- 44- Ovaran C, Çavuşlu Ş, Özsoy MF, Keskin K, Yenen OS. Antibiyotiğe Bağlı Diyarelerde *Clostridium difficile* 'nin Yeri. Klimik Derg. 1996; 9(1):15-17.
- 45- Öztürk R. Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve Tedavi. Ankem Derg. 2004;18(2):82-86.
- 46- Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, et al. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. JAMA Intern Med 2013; 173:1359.
- 47- Borriello SP and Wilcox HM. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. JAC. 1998;41:67-69.
- 48- Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. J. Antimicrob Chemother. 1998;41:47-57.
- 49- Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis 2005; 41:1254.
- 50- Garimella PS, Agarwal R, Katz A. The utility of repeat enzyme immunoassay testing for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review of the literature. J Postgrad Med. 2012; 58(3): 194-198.
- 51- Ardıç N. *Clostridium difficile* İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. Klimik Dergisi. 2004, 17(3):142-145.
- 52- Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities:a review. J Am Geriatr Soc. 2010; 58(8): 1556-1564.
- 53- Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. Anaerobe. 2011;17(4): 170-4.

- 54- Çaylan R. Antibiyotikle ilişkili ishaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008:1060-1064.
- 55- Koçak BT. Çocuk Kliniğine Gastroenterit Tanısıyla Yatırılan Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü. İstanbul 2008.
- 56- Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 1999; 341:1645.
- 57- 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.
- 58- Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: past and present perspectives. *Gut Microbes*. 2010; 1(1): 58-64.
- 59- 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.
- 60- 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.
- 61- Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I; European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13: 1048-57.
- 62- Büyükbaba B. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanıli hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.* 2003;32: 220-224.

- 63- 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.
- 64- 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.
- 65- Dipersio JR ,Varga FJ , Conwell DL , Kraft JA, Kozak KJ, Willis DH : Development of a Rapid Enzyme Immunoassay for *Clostridium difficile* Toxin A and Its Use in the Diagnosis of C.difficile-Associated Disease.J Clin Microbiol, 1991; 29(2)2724-2730

ÖZ GEÇMİŞ

