

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEDAVİDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLERİN  
SUBMİK KONSANTRASYONLARININ TEKRARLAYAN  
CLOSTRIDIUM DIFFICILE ENFEKSİYONLARINDA  
BİYOFİLM OLUŞUMUNA VE TOKSİN ÜRETİMİNE ETKİSİ

Uzm. Nuray GÜLEÇ

Mikrobiyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2017



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEDAVİDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLERİN  
SUBMİK KONSANTRASYONLARININ TEKRARLAYAN  
CLOSTRIDIUM DIFFICILE ENFEKSİYONLARINDA  
BİYOFİLM OLUŞUMUNA VE TOKSİN ÜRETİMİNE ETKİSİ**

**Uzm. Nuray GÜLEÇ**

**Mikrobiyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Güner SÖYLETİR**

**ANKARA**

**2017**

**Tedavide Kullanılan Antibiyotiklerin Submik Konsantrasyonlarının  
Tekrarlayan *Clostridium difficile* Enfeksiyonlarında Biyofilm Oluşumuna  
Ve Toksin Üretimine Etkisi  
Nuray Güleç**

Bu çalışma 14.08.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Mikrobiyoloji Programı"nda yüksek lisans / doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof.Dr.Güner Söyletir  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Tez Danışmanı:** Prof.Dr.Cumhur Özkuyumcu  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

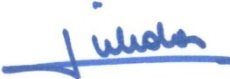
**Üye:** Prof.Dr.Sibel Ergüven  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Üye:** Prof.Dr.Deniz Gür  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Üye:** Prof.Dr.Ceren Karahan  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih 21 Eylül 2017

  
(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir 4 cm kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir (Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir).

• Tezimin/Raporumun 14.09.2018 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun 14.09.2018 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

25 /09/2017


(imza)



## ETİK BEYAN SAYFASI

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, danışman Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu ve İkinci Danışman Prof. Dr. Güner Söyletir danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Nuray GÜLEÇ



## TEŞEKKÜR

Doktora dönemim süresince emeği geçen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu'ya, tez çalışmalarım süresince bana destek veren ve deneyimlerini paylaşan Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi öğretim üyelerinden ikinci danışman Sayın Prof. Dr. Güner Söyletir'e, Prof. Dr. Nurver Ülger'e, Prof. Dr. Ufuk Hasdemir'e, her zaman manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşım Prof. Dr. Nilgün Çerikçioğlu'na, tezimin istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Pınar Ay'a ve Biyolog MSc Mehmet Ramazan Ayaş'a ve laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi yönetimine ve bana her zaman destek olan eşim Prof. Dr. M. Akif Güleç'e ve çocuklarıma çok teşekkür ederim.

Uzm. Nuray GÜLEÇ



## ÖZET

**Güleç, N. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarının, tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumuna ve toksin üretimine etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.** *C. difficile* enfeksiyonlarında spesifik antibiyotik tedavisine rağmen vakaların %20-%30'unda yüksek oranda tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, 2012-2015 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesine yatan ve antibiyotik tedavisine bağlı olarak en az iki kez *C. difficile* enfeksiyonu geçiren 15 hasta (30 izolat) çalışmaya dahil edilmiş, tüm hastaların dışkısından toksin A + B testi pozitif saptanmış olup dışkı kültürlerinden *C. difficile* izole edilmiştir. Tekrarlayan izolatlar arasında, rep-PCR yöntemi ile 22 izolat (%73) yakın ilişkili, 8 izolat (%27) farklı bulunmuştur. Agar Dilüsyon Yöntemi ile iki izolatin 2. geliş seftriakson MİK değerlerinde iki dilüsyon artış olduğu saptanmış, diğer izolatlarda ise bu gözlenmemiştir. Biyofilm oluşturan bakteriyel patojenler, antibiyotik direncinde artış ve kronik tekrarlayan enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Biyofilm oluşumu açısından antibiyotik etkisi olmaksızın 9 (%30) izolat pozitif saptanırken, antibiyotiklerin 1/2-1/64 subMİK değerlerinde biyofilm üretimi vankomisinli ortamda 1/2 subMİK hariç istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiş, benzer artış metronidazolün tüm subMİK değerlerinde gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Antibiyotiklerin 1/2-1/64 subMİK değerlerinde, antibiyotiksiz ortama göre toksin A + B değerleri karşılaştırıldığında %25 ve üzerinde artış, 1/16-1/64 subMİK değerlerinde kökenlerin en fazla %20'sinde gözlenmiştir. Tekrarlayan izolatlarda PZR yöntemi ile 30 kökenin hepsinde toksin A ve toksin B gen varlığı gösterilmiş ancak varyant (*tcd A-/tcd B+*) veya "binary toksin" geni saptanmamıştır. Sonuç olarak, *C. difficile*'nin tedavisinde sık kullanılan antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarında kökenlerde biyofilm oluşumunda ve toksin düzeylerinde artış meydana gelmesi, konakçı savunmasına karşı dirence ve tekrarlayan enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Clostridium difficile*, diyare, toksin A + B, subinhibitör konsantrasyon, binary toksin

**ABSTRACT**

**Güleç, N. Effect of subMIC concentrations of the antibiotics used for the treatment on biofilm formation and toxin production of *Clostridium difficile* strains isolated from recurrent infections. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph. D. Thesis in Microbiology, Ankara, 2017.** Despite specific antibiotic treatments in *C. difficile* infections, high rate of recurrence is observed in 20%-30% of the cases. We have hospitalized fifteen patients (30 isolates) at Marmara University Pendik Training and Research Hospital between 2012-2015. These patients, forming the study group for this thesis, developed *C. difficile* infections due to antibiotic treatment at least twice. All patients' stool samples for toxin A + B test was found to be positive and *C. difficile* have been isolated from all the stool cultures. According to the gene sequences revealed by Rep-PCR, these strains were investigated whether they are closely related. 22 origin (73%) was closely related, 8 origin (27%) was different from each other. By using Agar Dilution method in the two strains that were isolated twice, a two fold increase in MIC values for ceftriaxone was detected in the second isolations was observed, but not in the other isolates. Biofilm producing bacterial pathogens have been associated with increase in antibiotic resistance and chronic, recurrent infections. Without antibiotic effect 9(30%) strains were detected to be biofilm positive while in the presence of 1/2-1/64 subMIC values of the antibiotics, in the medium with vancomycin a statistically significant increase was seen expect for 1/2 subMIC, a similar increase was observed in all the subMIC values of metronidazole ( $p < 0.05$ ). When toxin A + B values were compared with the medium without antibiotics and with the medium with 1/2-1/64 subMIC values of the antibiotics, a 25% and more increase in toxin A + B values was detected in a maximum of 20% of the strains. In the repeated isolates toxin A and toxin B genes have been shown by PCR, but variant (*tcd A-/tcd B+*) or "binary toxin" gene was not detected. As a result, increase in biofilm and toxin levels in the subMIC concentrations of the frequently used antibiotics in the treatment of *C. difficile* is considered to predispose resistance against host defence and repeated infections.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, diarrhea, toxin A+B, subinhibitor concentration, binary toxin.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYAN	iv
ETİK BEYAN SAYFA	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Patogenez ve Virulans Faktörleri	4
2.4. Risk Faktörleri	9
2.5. Tanı Yöntemleri	10
2.5.1. Mikroskopik İnceleme	10
2.5.2. Kültür Yöntemleri	10
2.5.3. İmmünolojik Tanı Yöntemleri	13
2.5.4. Moleküler Yöntemler	13
2.5.5. Tanısal Algoritma	14
2.6. Tedavi	14
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	16
3.1. Rep-PCR Yöntemi ile Suşlar Arasındaki Genetik Yakınlığın Saptanması	16
3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi	21
3.2.1. Antimikrobik İlaçlar	21

3.2.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	21
3.3. Biyofilm Oluşturma	27
3.3.1. Biyofilm Oluşumunun ROC Eğrisi İle Belirlenmesi ve İstatistiksel Değerlendirmesi	27
3.4. Toksin A + B Üretiminin Araştırılması	27
3.5. <i>Clostridium difficile</i> Toksin Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması	30
<b>4. BULGULAR</b>	32
4.1. Rep-PCR Yöntemi ile Suşlar Arasındaki Genetik Yakınlık	32
4.2. Antibiyotik MİK Değerleri ve Bu Değerlerin Zaman İçinde Değişimi	35
4.3. Biyofilm Oluşturma	36
4.4. Toksin A + B Araştırılması	41
4.5. <i>Clostridium difficile</i> Toksin Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması	46
<b>5. TARTIŞMA</b>	48
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	52
<b>7. KAYNAKLAR</b>	53
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	59

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>ADP</b>	Adenozin Difostat
<b>BHIS</b>	Brain-Heart İnfüzyon Suplement
<b>CAMPs</b>	Katyonik Antimikrobiyal Peptitler
<b>CCFA</b>	Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar
<b>CDE</b>	<i>Clostridium difficile</i> Enfeksiyonu
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EIA</b>	Enzim İmmunoassay
<b>ELFA</b>	Enzyme Linked Fluorescent Assay
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GDH</b>	Glutamat Dehidrogenaz
<b>GlcNAc</b>	N-Asetil Glukozamin
<b>HeLa</b>	Henrietta Lacks Cell
<b>Hep-2</b>	Human Epithelial Type-2
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MurNAc</b>	N-Asetil Muramik Asit
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
<b>MRC-5</b>	Human Lung Fibroblast Cell
<b>PaLoc</b>	Patojenite Lokusu
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PMC</b>	Pseudomembranöz Kolit
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SDS</b>	Sodyum Lauryl Sülfat
<b>SPR</b>	Solid Phase Ekstraktion (Katı faz sağlayıcı)
<b>SubMİK</b>	Subinhibitör Konsantrasyon
<b>TBE</b>	Elektroforez tamponu (Tris, Boric acid, EDT)
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pairwise Grouping Matematical Avenaging
<b>Vero</b>	Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücreleri
<b>5 FU</b>	5 Fluorouracil

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2. 1. <i>C.difficile</i> enfeksiyon basamakları (27)	5
2. 2. a) Patojenite Lokusu (PaLoc) üzerinde kodlanmış toksin A( <i>tcdA</i> ) ve toksinB( <i>tcd B</i> ), b) <i>C. difficile</i> transferaz (CDT)ya da binary toksini ( <i>cdtA</i> ve <i>cdtB</i> ) kodlayanPaLoc dışındaki bölge (30)	6
2.3. <i>C.difficile</i> 'nin subterminal sporlu basilleri (gram boyama)	11
2.4. <i>C.difficile</i> 'nin subterminal sporları (malaşit yeşili ile spor boyama)	12
2.5. CCFA'da <i>C.difficile</i> kolonileri	12
3. 1. (sol) MicroBead çözeltisi dağıtımı, (sağ) besiyerinden numune alınışı	16
3. 2. (sol) Vortexlenme aşaması, (sağ) santrüfuj aşaması	17
3. 3. Thermo Scientific NanoDrop 2000	17
3. 4. Rep-PCR amplifikasyon uygulanması	18
3. 5. (sol ve orta) "Diversilab™ DNA LabChip Kit"i ile mikroakışkan elektroforez, (sağ) çipe basınç uygulanan şırınga	19
3. 6. Biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan Agilent Elektroforez 2100 biyoanalizör	20
3. 7. a) Brucella agar besiyerlerinin petrilere dökülmesi, b) Şablon yardımı ile petrinin alttan çizimi, c) ATCC 25285 <i>B. fragilis</i> kontrol suşu, d) <i>C. difficile</i> aerop kontrol, e) <i>C. difficile</i> anaerop kontrol (antibiyotik içermeyen petri)	24
3. 8. Biyofilm oluşumunun mikropklarda değerlendirilmesi	27
3. 9. <i>C. difficile</i> izolatlarının toksin A + B üretimini araştırmak üzere tüplerin hazırlanması	28
3. 10. Anaerob ortamda <i>C. difficile</i> izolatlarının hazırlanması	29
4. 1. Diversilab yöntemi ile 30 izolatın klonal ilişkilerinin belirlenmesi	34
4. 2. Öngörülen duyarlılık ve 1- özgüllüğe göre saptanan eşik değeri ve ROC eğrisi	36

- 4. 3.** Toksin A ve toksin B PZR gen ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü  
(L: Ladder-Belirteç, +: pozitif kontrol (NCTC 11223 *C. difficile*),  
-: negatif kontrol) 47
- 4. 4.** Binary" toksin *cdt A* ve *cdt B* genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü  
(L: Ladder-Belirteç, +: pozitif kontrol (HU 10010 binary toksin),  
-: negatif kontrol) 47



## TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2. 1. <i>C. difficile</i> ishaline neden olan antibiyotik ve antineoplastik ilaçlar (25)	15
3. 1. Termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR	18
3. 2. Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar	22
3. 3. Antibiyotiklerin iki kat seri sulandırım değer aralıkları	22
3. 4. <i>C. difficile</i> MİK değerlerinin CLSI ve EUCAST'e göre değerlendirilmesi	23
3. 5. Biyofilm oluşumunun araştırılması için kullanılan şablon	26
3. 6. <i>C. difficile</i> toksin A + B değerinin saptanması	29
3. 7. Toksin genlerine özgül primerler ( <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> ) ve reaksiyon koşulları	30
4. 1. <i>C. difficile</i> enfeksiyonu gelişmeden önce tedavide kullanılan antibiyotikler ve hasta sayısına bağlı yüzdeleri	32
4. 2. Hastaların (n: 15) yakın ilişkili, benzer ve farklı izolatları (n: 30)	33
4. 3. Hastalardan (n: 15) izole edilen izolatların (n: 30) çeşitli antibiyotikler için saptanan MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerleri	35
4. 4. 30 izolatın vankomisin subMİK değerlerinde biyofilm üretimi	38
4. 5. 30 izolatın metronidazol subMİK değerlerinde biyofilm üretimi	39
4. 6. 30 izolatın meropenem subMİK değerlerinde biyofilm üretimi	40
4. 7. Antibiyotiksiz ortam ve antibiyotiklerin subMİK değerlerinde biyofilm üretimleri	41
4. 8. İzolatların (n: 30) vankomisin subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi	42
4. 9. 30 izolatın metronidazol subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi	43
4. 10. 30 izolatın meropenem subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi	44
4. 11. 30 izolatın seftriakson subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi	45
4. 12. <i>C. difficile</i> izolatın (n: 30), antibiyotiklerin subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi sayı ve yüzdeleri	46
4. 13. <i>C. difficile</i> kökenlerinin , toksin A + B üretimine antibiyotiklerin subMİK değerlerinin etkisi	46
4. 14. <i>C. difficile</i> izolatlarında (n: 30) PZR ile toksin genlerinin dağılımı	47

## 1. GİRİŞ

*Clostridium difficile*, hastaneden kazanılmış diyare etkeni olarak en sık tanımlanan patojendir. Antibiyotikle ilişkili diyarelerin %15-20'sinden, pseudomembranöz kolitli olguların hemen hemen hepsinden sorumludur (1). Sıklıkla sorumlu tutulan antibiyotikler sefalosporinler, klindamisin, florokinolonlar gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (2-4). En önemli virülans faktörleri toksin A (308 kDa molekül ağırlığında enterotoksin) ve toksin B (207 kDa molekül ağırlığında sitotoksin)'dir (5). Bu toksinler ısı, biotin sınırlanması, amino asit, glukoz konsantrasyonu ve oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin değişimi gibi pek çok faktörden etkilenir (6-8). *C. difficile* enfeksiyonunda tanının doğrulanması ve tedavisi çok önemlidir. Spesifik antibiyotik tedavisine rağmen tekrarlayan enfeksiyon oranı %20-30'dur (9, 10). Tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonunda köken aynı ya da farklı olabilir. *C. difficile* enfeksiyonunun epidemiyolojisi her zaman değişmektedir. Yaklaşık on yıl önce Kuzey Amerika'dan, Avrupa'ya yayılan hipervirülan epidemik "binary toksin"e sahip B1/NAP1/027 kökeni yüksek mortalite ve morbiditeden sorumludur (11, 12). Son yıllarda toplumdan kazanılmış enfeksiyonlarda da artış görülmektedir (13, 14). *C. difficile*'de tekrarlayan enfeksiyon hızının yüksek olması önemlidir. Antibiyotiklerin başarısız olması sonucunda yüksek morbidite ve mortaliteye sahip kolit gelişmektedir (15).

Bu çalışmada;

Tekrarlayan izolatlar arasında,

- Genotipik olarak yakın ilişkili olup olmadıkları rep-PCR yöntemi ile (DiversiLab, bioMérieux, Fransa),
- Sık kullanılan antibiyotiklerin MİK değerlerinde artış olup olmadığı agar dilüsyon yöntemi ile,
- Bu kökenlerin biyofilm üretimi açısından artış olup olmadığı:
  - a) Antibiyotik etkisi olmaksızın biyofilm üretiminde artış,
  - b) Sık kullanılan antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarının biyofilme etkisi,
- Bu izolatların toksin üretimleri açısından fark olup olmadığı toksin A + B testi ile (VIDAS, bioMérieux, Fransa):

a) Antibiyotik etkisi olmaksızın toksin üretiminde artış,

b) Sık kullanılan antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarının toksin üretimine etkisi,

ve tekrarlayan enfeksiyonlarda “binary toksin”in rolü olup olmadığının (polimeraz zincir reaksiyonu ile) araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

*C. difficile*, zorunlu anaerop, subterminal sporlu, gram-pozitif basil şeklinde bir bakteridir. *C. difficile* enfeksiyonu ciddi gastrointestinal bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl yaklaşık 500.000 olgu görülmekte olup en sıklıkla karşılaşılan hastaneden kazanılmış enfeksiyonlardır (16).

### 2.1. Tarihçe

*C. difficile* ilk kez 1935 yılında sağlıklı yenidoğanların dışkı florasında tanımlanmıştır (17). İzolasyonu zor olmasından dolayı *Bacillus difficilis* olarak adlandırılmıştır. 1950-1970 yıllarında antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile antibiyotiklerle ilişkili diyare olguları görülmeye başlamıştır. 1978 yılına kadar patojen bir bakteri olduğu anlaşılamamıştır. 1978 yılında Bartlett ve arkadaşları, pseudomembranöz kolit tanısı konmuş hastaların dışkılarında sitotoksin kaynağının *C. difficile* olduğunu tanımlamışlardır (18). 1979 yılında *C. difficile*'e bağlı pseudomembranöz kolitin ilk basamak tedavisi olan vankomisin uygulanmıştır. 1980 yılında ABD'de en önemli nozokomiyal diyare etkeni olarak tanımlanmıştır. 1989-1992 yıllarında klindamisin'in yoğun kullanılması ile klindamisine dirençli suşlar ABD'de salgınlar yapmıştır. 2003 yılında Kanada, ABD ve Avrupa'da halk arasında ve hastanelerde *C. difficile*'nin oldukça virulan bir suşunun neden olduğu hastalık bildirilmiştir. Bu suş, hastalığın daha şiddetli gelişmesi, yüksek mortalite oranı, tekrar etme riski olan *C. difficile*'in "binary toksin"li suşudur (19). Böylece, 2003-2006 yıllarında daha şiddetli, tedaviye dirençli, *C. difficile* enfeksiyonları tanımlanmıştır. *C. difficile*, genellikle yaşlı, uzun süreli hastanede yatan, altta yatan hastalığı bulunan, cerrahi girişim uygulanmış hastalarda antibiyotik kullanımı ile ilişkili enfeksiyonlara neden olur. Ancak hastane ortamında görülmeyip, antibiyotik kullanım öyküsü ya da risk faktörü olmayan toplumdan kazanılmış enfeksiyonlara da neden olmaktadır (13, 14).

## 2.2. Epidemiyoloji

Son yıllarda *C. difficile* enfeksiyonu (CDE), ABD, Kanada ve Avrupa ülkelerinde hayatı tehdit eden önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. 2000'li yıllarda sadece *C. difficile* enfeksiyon insidansı değil enfeksiyonun şiddeti de artmıştır. 1991-2003 yılları arasında Kanada'da her 100.000 kişide 35.6 olgudan 156.3 olguya çıkararak dört kat artış kaydedilmiştir (20, 21). 2005 yılında Avrupa'da 14 ülke ve 38 hastanenin katılımı ile ishaller ve toksijenik kültür sonucu pozitif olan hastalarla yapılan çalışmada, ortalama insidans her 10.000 hastada 2.45 olgudur. Bunların %6'sı ribotip 027 olarak saptanmıştır. 2008 yılında 34 Avrupa ülkesi, 106 laboratuvarında yapılan çalışmada *C. difficile* insidansı her 10.000 hastada 4.1 olgudur ve bunların %5'i ribotip 027'dir (22).

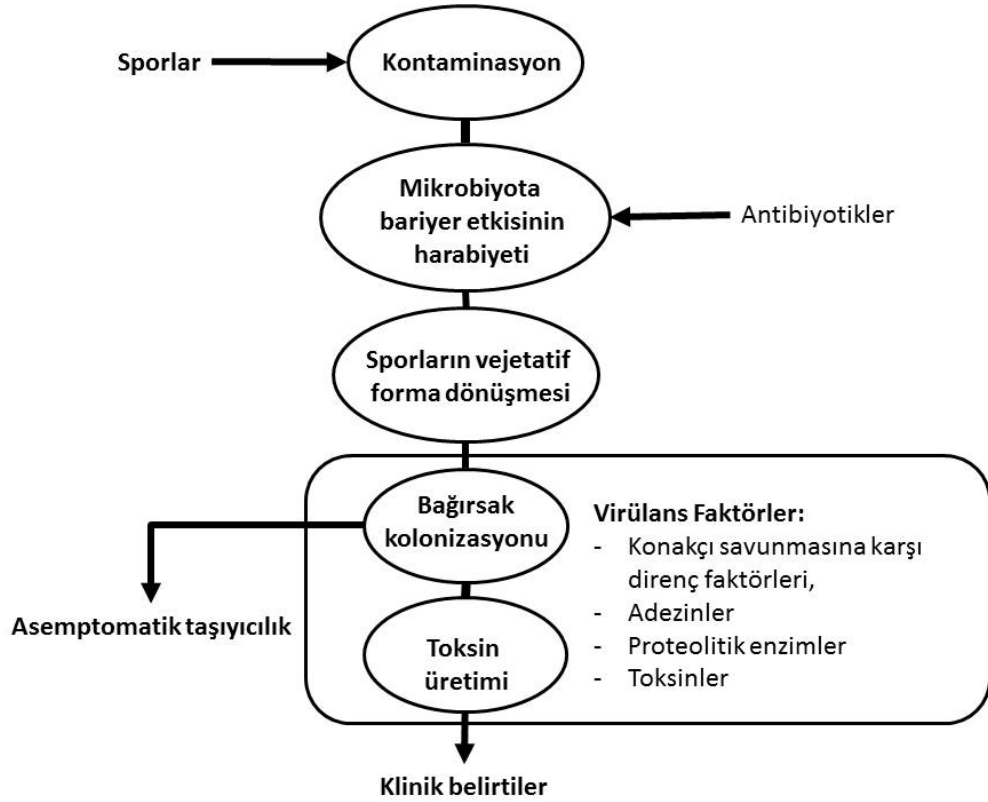
Toksijenik ve toksijenik olmayan suşlarla kolonizasyon asemptomatik taşıyıcılık olarak adlandırılır. Asemptomatik taşıyıcılık, sağlıklı erişkinlerde %2-3, yeni doğanlarda %40-60, hastanede yatan hastalarda %15-45 olarak görülür. İnsanlar bu bakteriyi ve sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabilirler (23, 24). Yenidoğanlarda kolonizasyon sık görülür. Yetişkinlerin gaitasında sitotoksin düzeyi ciddi kolite neden olurken bebeklerde aynı düzey asemptomatik seyreder. Bir yaşından sonra çocuklar *C. difficile* kolitlerine duyarlı olmaya başlarlar (25). Çocuklarda *C. difficile* enfeksiyonunun en sık görüldüğü yaş grubu 1-4 yaşdır.

Son yıllarda sadece hastane ortamından değil, antibiyotik kullanmaksızın toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da artış olmuştur. ABD'de her yıl 100.000 kişide 6.9 ile 46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu saptanmaktadır (26).

## 2.3. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Patogenezde kolon mikrobiyotasının antibiyotik veya antineoplastikler ile baskılanmasını; fekal-oral yolla *C. difficile* kolonizasyonu, bakterinin çoğalması ve toksin salgılanması izler (25). Dirençli sporlar ile kontaminasyondan sonra enfeksiyonun gelişmesi için risk faktörü bağırsak mikrobiyotasının bariyer etkisinin bozulmasıdır. Bu çoğunlukla geniş spektrumlu antibiyotik kullanımından sonra gelişir. Sporlar vegetatif forma dönüşür. Konakçı bağırsak hücrelerine kolonizasyon ile mukozaya bakteriyel adezyon ve konakçı yanıtına bakteriyel direnç gelişir.

Bakteriler toksin üretmeye başlar. Böylece klinik belirtiler ortaya çıkar ya da asemptomatik taşıyıcılık görülür (27) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *C. difficile* enfeksiyon basamakları (27).

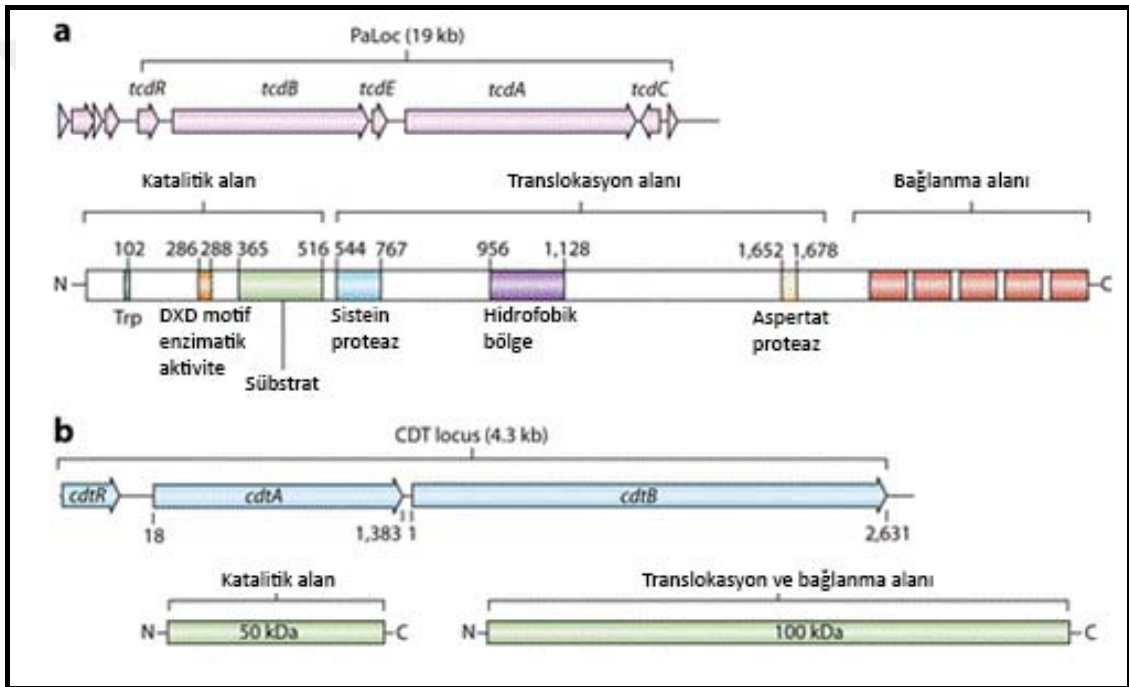
*C. difficile*'nin temel virülans faktörü toksinleridir. *C. difficile*'nin iki önemli toksini bulunmaktadır. Toksin A (enterotoksin) ve Toksin B (sitotoksin). Her iki toksin de konakçı hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive ederler.

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

Toksin B (sitotoksin), hücre iskeletinin yıkımı ile sonuçlanan aktinin depolimerizasyonuna neden olur (28). Toksin B, toksin A'dan daha sitotoksiktir.

Bu toksinler, toksijenik suşların genomunda bulunan ve "patojenite lokusu" (PaLoc) adı verilen bir bölgede yer alan genlerce kodlanırlar (Şekil 2.2). Bu bölgede bulunan (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR*, *tcdE*) beş genden *tcdA* ve *tcdB* genleri toksin

sentezinden sorumlu genlerdir. *tcdR* toksin gen ekspresyonunda önemli bir alternatif sigma faktörü, *tcdC* ise negatif bir düzenleyicidir. *tcdC*, anti-sigma faktör olarak bilinir ve gen ekspresyonu için gerekli olan kor RNA polimeraz ile *tcdR* arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini gösterir. *tcdE*'nin ise hücrelerden toksin salınımında etkili olduğu düşünülmektedir (29). Patojenite lokusu dışında bulunan bir bölgede yer alan *cdt A* ve *cdt B* genleri ise *C. difficile*'nin hipervirulan epidemik suşu B1/NAP1/027 (*ribotip 027*) tarafından oluşturulan "binary toksini" kodlamaktadır. Binary toksinin patogenezdaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, bu toksinin hastalığın şiddetini arttırdığı düşünülmektedir (30, 31) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** a) Patojenite Lokusu (PaLoc) üzerinde kodlanmış toksin A (*tcdA*) ve toksin B (*tcd B*), b) *C. difficile* transferaz (CDT) ya da binary toksini (*cdtA* ve *cdtB*) kodlayan PaLoc dışındaki bölge (30).

Çeşitli ülkelerde hastane salgınlarına yol açan virülansı yüksek *ribotip 027* kökeninde, *tcdC* geninde delesyon bulunduğu, buna bağlı olarak yüksek düzeyde toksin A ve toksin B salgılandığı belirlenmiştir. Aynı zamanda "binary toksin" (ADP ribozil transferaz) olarak bilinen üçüncü bir toksin ürettiği de gösterilmiştir (32, 33). Hipervirulan epidemik suşun bir diğer özelliği de florokinolonlara dirençli olmasıdır (13).

*C. difficile*'nin patogenezinde toksinlerin yanı sıra adezin, fimbria, flajella ve parakristalin S proteini gibi diğer virülans faktörleri de önemlidir.

*C. difficile*'nin bakteriyel yüzey proteinleri (surface-layer protein, SLP), intestinal epitelyum hücrelerine bağlanmasında önemli olup, toksin üretilmesine ve doku hasarına neden olmaktadır (28). Bakteriyel patojenler mukozal yüzeylere kolonize olup antimikrobiyallere karşı direnç geliştirirler. Lizozim, epitelyum tarafından salınan bir antimikrobiyal olup peptidoglikan yapıda MurNAc ve GlcNAc arasında beta(1-4) glikozid bağlarına bağlanır. Peptidoglikanı hidrolize eder. Birçok bakteriyel patojen lizozim direnci geliştirir (34). *C. difficile* doğal olarak yüksek seviyede in vitro lizozime dirençlidir. Bu, peptidoglikanın yüksek deasetilasyon miktarı ile ilişkili olabilir (35). Ho ve arkadaşları *C. difficile*'nin, GlcNAc'nin deasetilasyonunu lizozimin subinhibitör konsantrasyonlarında indüklediğini bunun da lizozim direncine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (36). Birçok insan katelisinleri ve defensinler (alfa defensin 1 ve 5) *C.difficile*'nin vejetatif hücrelerini öldürür. O27 suşu memeli katelisinini LL-37 ye yüksek düzeyde direnç gösterir. Bu suş defensinlere duyarlıdır (37, 38). Diğer bir antimikrobiyal, katyonik antimikrobiyal peptitler (CAMPs) konakçı savunma mekanizmasını korur. Patojen bakteriler, CAMPs'den kaçmak için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Teikoik asidin D-alanil esterifikasyonu bunlardan biridir ve bu olgu bakteri yüzeyinin pozitif yükünü arttırarak CAMPs'ın etkisini azaltmaktadır (39). Bakteri hücre duvarındaki bu değişiklik dlt operonu ile bağlantılıdır. Son yıllarda Mc Bride ve Sonenshein *C.difficile*'in dlt operonunun birkaç CAMPs'ın subinhibitör konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucu indüklendiğini ve bu bölgedeki hasarın ise birçok CAMPs'a karşı duyarlılıkta artış ile sonlandığını göstermişlerdir. Bu veriler D-alanilasyonun *C. difficile*'nin konakçı immün yanıtından kaçışında önemli olabileceği fikrini vermektedir (40). *C. difficile*'de Cpr ABC transporter, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen toksinlere karşı savunmada birçok substratı tanıyarak etki göstermektedir(41). Bunun yanı sıra, insan katelisinleri ve defensinler belirli ölçüde *tcdA* ve *tcdB* toksinlerinin neden olduğu inflamasyonu, doku harabiyetini ve inflamatuvar sitokin üretimini azaltırlar.

Spor oluşumu, organizmanın hastane ortamında devamlı olarak kalmasına ve dekontaminasyon çalışmalarına direnç göstermesine neden olmakta ve sağlık personelinin elleri ile diğer hastalara geçiş göstermektedirler (28).

Enfeksiyonların patogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmalar hız kazandıkça biyofilmlerin enfeksiyon patogeneziindeki rolleri daha fazla açığa çıkmaya başlamıştır. Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur.

Biyofilm içindeki oksijen yoğunluğu direnci etkileyen bir faktördür. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda anaerobik ortamın olduğu bilinmektedir. Anaerobik mikroorganizmalarda biyofilm yapımı ile ilgili çalışmalar çok yaygın değildir. *C. difficile* gibi klinikle yakından ilişkili patojenlerin uzun süreli dayanıklılığı çok önemlidir. *C. difficile* cansız yüzeylerde biyofilm üretebilmekte fakat bunun dayanıklılığı laboratuvar ve klinik izolatlar arasında değişiklik göstermektedir(1, 42). Bakteriler; DNA, polisakkaritler ve hücre duvar proteinleri ve özellikle toksin A olmak üzere toksinlerin bulunduğu proteinlerden oluşan bir matrikse gömülüdür (1, 43). *C. difficile* biyofilminin oluşumu SpoOA ve Lux S gibi merkezi regülatörler ve de flagella ve sistein proteaz Cwp84 gibi yüzey bileşenlerinden etkilenmektedir (1, 42). Hücre içi guanozin monofosfat düzeyindeki artışın da biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir (44). *C. difficile*'nin in vivo biyofilm üretimi hakkında bilgiler azdır. Bu hipotezi destekleyen birkaç deneysel hayvan enfeksiyonu mevcuttur. Bir fare modelinde hasarlı dokuda *C. difficile* mikrokolonilerinin olduğu gözlenmiştir (45); hamster ve monoksenik fare modellerinde de dokularda *C. difficile* kümeleri gösterilmiştir (46, 47). Bu bulgulara rağmen CDE'de ve bu enfeksiyonların tekrarında biyofilmin rolünü doğrulamak için ileri çalışmalara gerek vardır. Ancak biyofilmin, *C. difficile*'nin antibiyotiklere ve oksijen stresine karşı direncini arttırdığı ve de bu bakterinin dirençli sporlar halinde varlığını sürdürmesine yol açtığı da gösterilmiştir (42, 43, 48)

*C. difficile* enfeksiyonlarının (CDE) asemptomatik taşıyıcılıktan toksik megakolona hatta ölüme giden farklı klinik durumları mevcuttur. Bu hastalıkların tipi ve şiddeti organizmaya ve hastaya ait faktörlerle ilişkilidir.

Asemptomatik kolonizasyonda, kolon *C. difficile* ile kolonize olur, ishal yoktur. Kültürde toksin pozitif *C. difficile* üremesi vardır. Hastanede yatan ve antibiyotik tedavisi alan hastaların %15-45'inde görülür (23).

*C. difficile* ishali, karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette ishal ile kendini gösterir. Ateş ve halsizlik nadirdir. Antibiyotik tedavisi esnasında, tedaviden kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra ortaya çıkar (49).

*C. difficile* koliti, en sık görülen CDE tablosudur. Klinik ciddi seyreder. Hafif ve orta şiddette karın ağrısı, kusma, bulantı, iştahsızlık ve sulu ishal mevcuttur (49).

Pseudomembranöz kolit, *C. difficile* kolitinden daha ağır seyreder. Şiddetli ishal vardır. Endoskopik muayenede kalın bağırsak proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı ve kolorektal mukoza boyunca pseudomembran dağılımları görülmektedir.

Fulminant CDE; ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüm gibi ciddi komplikasyonlarla seyreder. *C. difficile* enfeksiyonlu hastaların %2-3'ünde görülebilir (50).

Tekrarlayan CDE; vankomisin, metronidazol ile tedavi sonrası birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkması ile tanımlanır. Hastaların %20-30'unda görülmektedir. Tekrarlayan CDE olguları aynı veya farklı izolat ile oluşabilmektedir (50).

#### **2.4. Risk Faktörleri**

Risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır:

- Antibiyotik kullanımı,
- İleri yaş (> 65 yaş),
- İmmünsupresyon, altta yatan ciddi hastalık,
- Uzun süre hastanede yatış,
- Gastrointestinal cerrahi uygulama,

- Antineoplastik kemoterapi,
- Mide asidini azaltan ilaçlar,
- İnflamatuvar bağırsak sendromu,
- Tüp ile beslenme,
- Kronik karaciğer hastalığı,
- Böbrek yetmezliği (50).

## 2.5. Tanı Yöntemleri

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı CDE'lerin kontrol altına alınması açısından önemlidir.

*C. difficile* enfeksiyonunun tanısı, klinik semptomlar ile uyumlu hastaların dışkı örneklerinde toksinin gösterilmesi ile konur. Laboratuvara sulu, şekilsiz dışkı örnekleri gönderilmelidir. Eğer toksin araştırması isteniyorsa dışkı örneği steril, geniş ağızlı, vida kapaklı kaplara alınmalıdır. En az 5 ml (5-50 ml) dışkı örneği alınmalıdır. Toksin için örnek < 1 saat içerisinde oda sıcaklığında veya > 1 saat sürecek şehir içi mesafeler için +4 °C'de veya > 48 saat sürecek şehirlerarası mesafeler için kuru buz içinde -70 °C'de laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir.

Toksin A ve/veya toksin B üreten mikroorganizmaların hastalık yapma yeteneğinden dolayı dışkı örneklerinde toksinlerin tespit edilmesi önemlidir.

### 2.5.1. Mikroskopik İnceleme

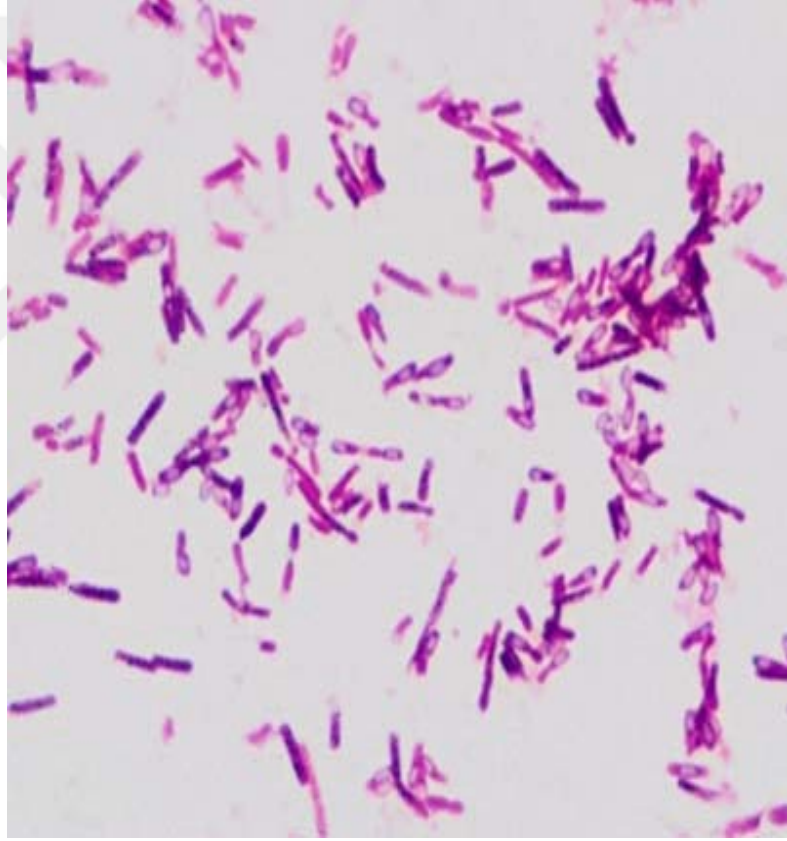
Hazırlanan preparat Gram ve Malaşit yeşili (spor boyası) ile boyanarak 100x immersiyon objektifi ile incelenir (Şekil 2.3, Şekil 2.4).

Floresan mikroskobu ile de dışkı yaymasında *C. difficile* duvar antijenlerine karşı işaretlenmiş antikolar kullanılarak bakteri aranabilir. Ancak çapraz reaksiyonlar oluşabilmektedir.

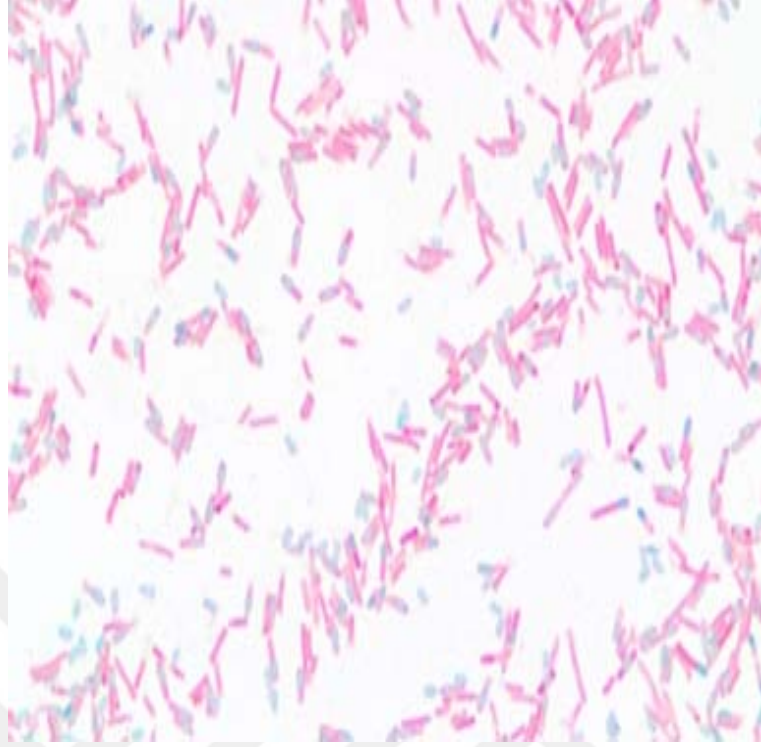
### 2.5.2. Kültür Yöntemleri

*Anaerop Dışkı Kültürü:* *C. difficile* kültürü yapılacaksa dışkı örnekleri mutlaka anaerop transport ortamında gönderilmelidir. Anaerop kanlı agar, brucella agar ya

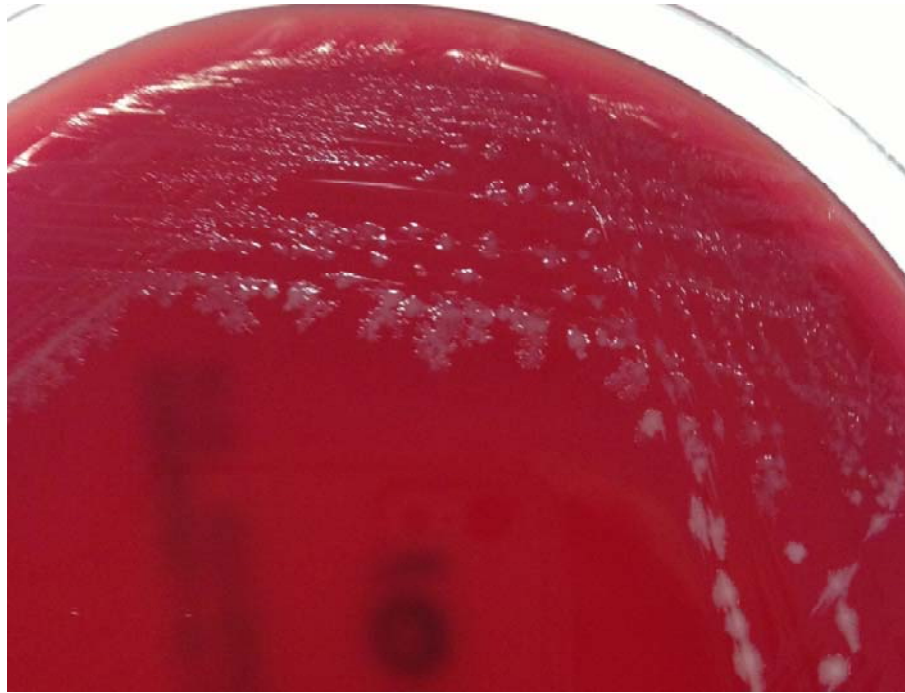
da seçici bir besiyeri olan sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA) en duyarlı besiyerleri olarak bildirilmektedir (51). Anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra *C. difficile*'nin beyaz, yaygın, düz, at gübresi kokusunda (para-kresol) kolonileri incelenir (Şekil 2.5). Fakat toksin oluşturmayan kolonize bir bakteriyi de saptaması nedeniyle özgüllüğü düşüktür. Ancak, izole edilen *C. difficile* suşunun toksijenitesi gösterildiğinde bu yöntem çok duyarlı ve özgüdür ve toksijenik kültür olarak adlandırılır. Toksijenik kültür, tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir (52).



**Şekil 2.3.** *C. difficile*'nin subterminal sporlu basilleri (Gram boyama)



**Şekil 2.4.** *C. difficile*'nin subterminal sporları (malakit yeşili ile spor boyama)



**Şekil 2.5.** CCFA'da *C. difficile* kolonileri

*Doku Kültür Sitotoksinite Testleri: C. difficile* toksininin duyarlı hücre kültürlerinde sitopatik etki oluşturması esasına dayanır. Toksin B'nin aktivitesi araştırılmaktadır. Sıklıkla Hep2, Vero, HeLa, MRC-5 akciğer fibroblast hücre kültürleri kullanılmaktadır. *C. difficile* toksinini tanımlamada halen referans bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (53).

Gerek doku kültürü, gerekse toksijenik kültür yöntemleri zaman alan, özel laboratuvar düzenekleri ve deneyimli elemanlar gerektiren testlerdir.

### **2.5.3. İmmünolojik Tanı Yöntemleri**

-*Glutamat dehidrogenaz (GDH) testi*: GDH toksijenik olan ve olmayan *C. difficile*'nin ürettiği temel enzimdir. Dışkı örneklerinde *C. difficile*'nin taranması için kullanılmaktadır. Toksik *C. difficile*'e özgü bir enzim değildir. Çeşitli ticari sistemlerle saptanabilmektedir.

GDH Latex aglütinasyon testi: (duyarlılığı %58-68, özgüllüğü %94-98). Uygulaması kolaydır ve kısa sürede sonuç verir.

Enzyme immunoassay ile GDH saptanması: (duyarlılığı %85-95, özgüllüğü %89-99).

GDH negatif bulunması, *C. difficile* açısından yüksek bir negatif prediktif değere (%97-100) sahiptir (30).

-*Enzyme immunoassay (EIA) ile C. difficile toksin A ve B saptanması*: EIA ile *C. difficile* toksin A ve B saptanmaktadır. En sık kullanılan tanı testidir. Uygulaması kolay ve hızlıdır. Bu yöntemin duyarlılığı %75, özgüllüğü %99'dur (54).

Elisa-Toksin Test: Toksin A ve toksin B'nin saptanmasına yönelik poliklonal veya monoklonal antikorların kullanıldığı testlerdir. Test prosedürü, iki adım enzim immünotest sandviç yöntemini, bir son floresan okuma (ELFA) ile kombine eder. Yüksek özgüllük (%75-100) ve duyarlılığa (%63-99) sahiptir (54).

### **2.5.4. Moleküler Yöntemler**

*C. difficile*'nin tanımlanmasında oligonükleotid problarla toksin genleri amplifiye edilmektedir. *C. difficile*'nin *tcdA* ve *tcdB* genlerinin saptanmasına yönelik real-time PCR testlerinin geliştirilmesi ile toksin ve toksinin tipi ile ilgili bilgi

sağlanabilmektedir (55). Güvenilir bir PCR testi için *C. difficile*'e özgü 16 S rRNA, toksin ve GDH'ı kodlayan (*gluD*) genleri tespit eden moleküler yöntemler yapılmaktadır (56, 57). *C. difficile* suşları arasındaki genetik yakınlığın belirlenmesi için de son yıllarda rep-PCR (Diversilab, Biomerieux, Fransa) yöntemi kullanılmaktadır.

İzole edilen bakterinin moleküler tiplendirmesi salgınların kaynağını, bulaş yollarını ve derecesini belirlemede önemlidir.

*C. difficile* enfeksiyonunun genetik incelemelerinde en büyük engel sağlıklı taşıyıcıların bulunmasıdır. *C. difficile*'nin toksijenik ve toksijenik olmayan suşlarının asemptomatik taşıyıcılık oranları yenidoğanlarda %40-60 civarındayken, erişkinlerde bu oran %2-3'dir.

Yenidoğan kolon mukoza epitelinin, bakteri toksin reseptörleri gelişmemiş olmasından dolayı bu yaş grubunda *C. difficile*'e bağlı enfeksiyonlar görülmez (58).

### **2.5.5. Tanısal Algoritma**

*C. difficile*'nin laboratuvar tanısında 2'li ve 3' lü algoritmalar oluşturulmuştur. Örneklerin glutamat dehidrogenaz (GDH) yöntemi ile taranması, negatif bulunursa ek test yapmadan negatif raporlanması, pozitif bulunursa doğrulama testlerinin yapılması önerilmektedir. İki basamaklı algoritma kullanılan yerlerde bu doğrulama testi moleküler yöntemlerdir. Raporlama bu sonuca göre yapılır. Üç basamaklı algoritma kullanılan yerlerde ise örnekler GDH testleri ile taranır, pozitif bulunursa toksin EIA uygulanır, sonuç pozitif çıkarsa pozitif olarak raporlanır. GDH pozitif, toksin negatif bulunursa örnekler moleküler yöntemler ile çalışılır.

### **2.6. Tedavi**

*C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde en önemli problem tekrarlayan enfeksiyon hızının yüksek olması ve CDE'nun şiddetli şekillerinde antibiyotiklerin başarısız olması nedeniyle ilerleyici kolitle sonuçlanmasıdır (15).

Önerilen antimikrobiyal tedavi metronidazol ve vankomisinidir. Teikoplanin tedavisi de metronidazol veya vankomisin ile yapılan tedavi kadar etkilidir. Metronidazol, oral vankomisin ile karşılaştırıldığında hastalık süresini kısaltmadaki

eşitlik nedeniyle ve vankomisin rutin kullanıldığında vankomisine dirençli enterokokların artacağı endişesiyle, olguların çoğunda standart tedavi seçeneği olmuştur (59). *C. difficile*'de metronidazol direnci nadir olup hemen hemen tüm suşların minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) < 2 mg/L'dir. Yapılan bir araştırmada, hafif CDE tedavisinde metronidazol ve vankomisin eşit derecede etkili iken, şiddetli CDE tedavisinde vankomisinin metronidazolden üstün olduğu saptanmıştır (60). Tedavi kılavuzlarına göre seçilecek ilaç; hafif-orta şiddetteki CDE'nin başlangıç atağında oral metronidazol, şiddetli CDE'nin başlangıç atağında ise oral vankomisindir.

Semptomları gerileyen hastaların %20-30'unda enfeksiyon nüks etmekte veya dış kaynaklardan tekrarlayan enfeksiyon gelişmektedir (15).

Tekrarlayan CDE riskini arttıran faktörler, toksinlere karşı yetersiz bağışık yanıt ve kolon mikrobiyotasının devam eden bozukluğudur. İleri yaş, diğer antibiyotiklere devam edilmesi ve uzun süre hastanede yatış diğer risk faktörleridir.

2011 yılında "Food and Drug Administration (FDA)" onayı almış oral formda kullanılan yeni bir antibiyotik olan fidaksomisin (difucid), dar spektrumlu olması nedeniyle, anaerobik mikroflora üzerine etkisi daha azdır (61). Vankomisin ve metronidazol *C. difficile*'e bakteriyostatik, fidaksomisin ise bakteriosidal etkilidir.

Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterileri değil, normal mikrobiyotayı da harap ederek süperenfeksiyonlara neden olabilirler.

*C. difficile* ishaline neden olan antibiyotik ve antineoplastik ilaçlar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. 1.** *C. difficile* ishaline neden olan antibiyotik ve antineoplastik ilaçlar (25).

Sıklıkla	Klindamisin, Ampisilin, Amoksisilin, Sefalosporinler (2. ve 3. kuşak)
Daha az sıklıkla	Kinolon, Tetrasiklin, Sülfonamid, Makrolid, Kloramfenikol, Trimetoprim, 5 FU, Metotreksat, Doksorubisin, Siklofosfomid
Çok nadir	Parenteral Aminoglikozitler, Metronidazol, Basitrasin, Vankomisin

### 3. MATERYAL VE METOD

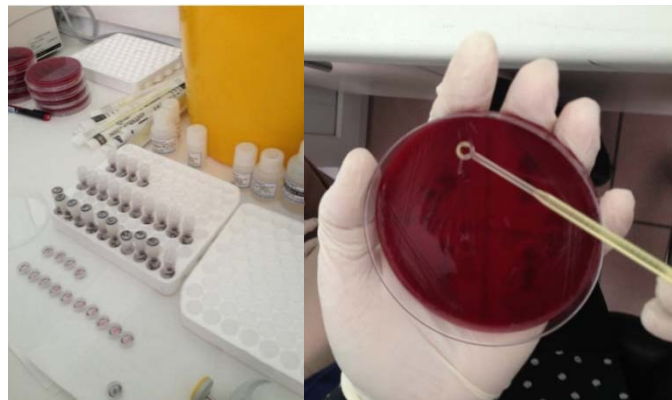
Çalışmamızda; 2012-2015 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesine yatan ve antibiyotik tedavisine bağlı olarak en az iki kez *C. difficile* enfeksiyonu geçiren hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların dosya bilgilerinden bu özelliğe sahip 15 hasta saptanmış olup bu hastaların ilk ve tekrarlayan izolatları olmak üzere toplam 30 *C. difficile* izolatı çalışmaya alınmıştır.

#### 3.1. Rep-PCR Yöntemi ile Suşlar Arasındaki Genetik Yakınlığın Saptanması

Tekrarlayan *C. difficile* kökenlerinin genotipik olarak yakın ilişkili olup olmadıkları rep-PCR (DiversiLab, bioMérieux, Fransa) yöntemi ile saptanmıştır. Bu amaçla sikloserin-sefoksitin fruktoz agara pasajları yapılarak elde edilen saf *C. difficile* suşları dört aşamada hazırlanmıştır:

1. Manuel DNA ekstraksiyonu
2. Termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR,
3. Biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan elektroforez,
4. İnternet tabanlı yorumlama yazılım programı ile kolay ve hızlı değerlendirme yapılmıştır.

Tüm suşlardan DNA izolasyonu “UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit” (MoBio Laboratories, A.B.D.) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2).



**Şekil 3. 1.** (sol) MicroBead çözeltisi dağıtımı, (sağ) besiyerinden numune alınışı.



**Şekil 3. 2.** (sol) Vortexlenme aşaması, (sağ) santrifüj aşaması

DNA ölçümü, Thermo scientific NanoDrop 2000'de spektrofotometrik olarak yapılmıştır (Şekil 3.3).



**Şekil 3. 3.** Thermo Scientific NanoDrop 2000

Uygun şekilde elde edilen tüm DNA ekstraktlarına “Diversilab™ DNA Finger printing Kit” (bioMerieux, Fransa) kullanılarak rep-PCR uygulanmıştır (Tablo 3.1).

Master Miks şu aşamalarla hazırlanmıştır:

- 10.000x g'de 5 saniye santrifüj edilmiştir.
- Her bir PCR tüpüne 23.0 µL konmuştur.

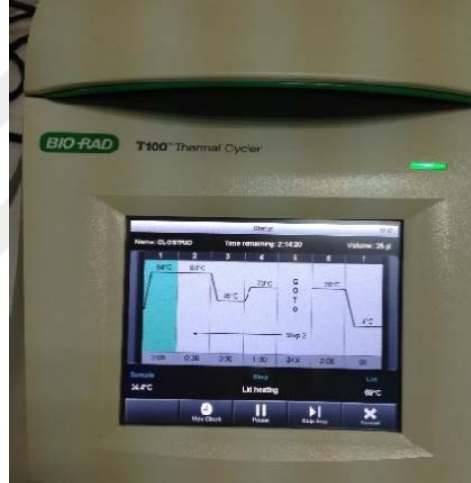
**Tablo 3. 1.** Termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR

Reaksiyon Karışımı	Volüm Reaksiyonu	Reaksiyon Sayısı	Master
Rep-PCR MM1 (N+ekstra)	18.0 µL	N	18.0 x
Gene Amp 10 x PCR Buffer (N+ekstra)	2.5 µL	N	2.5 x
Primer Mix H (N+ekstra)	2.0 µL	N	2.0 x
Ampli Tag DNA Polymerase (N+ekstra)	0.5 µL	N	0.5 x
<b>Total Hacim (N+ekstra)</b>	<b>23.0 µL</b>	<b>N</b>	<b>23.0 x</b>

PCR tüplerine DNA şu aşamalarla eklenmiştir:

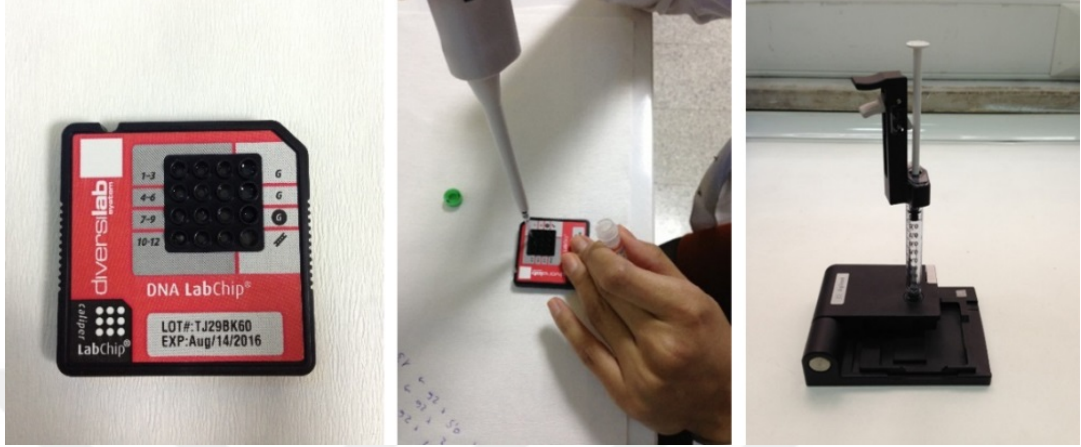
- 2.0 µL DNA ilave edilip tüplerin ağzı kapatılmıştır (Konsantrasyon 25-50 ng/µL).

Rep-PCR Amplifikasyonu şu aşamalarla uygulanmıştır (Şekil 3.4).

**Şekil 3. 4.** Rep-PCR amplifikasyon uygulanması

- Rep-PCR Protokolü - rep-PCR 45
- Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de, 2 dakika
- Tekrarlayan döngü sayısı: 35 döngü
  - Denatürasyon: 94 °C'de, 30 saniye,
  - Bağlanma: 45 °C'de, 30 saniye,
  - Uzama: 70 °C'de, 90 saniye,
- Final uzama: 70 °C'de, 3 dakika,
  - Saklama: 4 °C'de.

Rep-PCR ile örneklerdeki nükleik asitler çoğaltıldıktan sonra “Diversilab™ DNA LabChip Kit”i (bioMerieux, Fransa) kullanılarak mikroakışkan elektroforez yapılmıştır (Şekil 3.5).



**Şekil 3. 5.** (sol ve orta) “Diversilab™ DNA LabChip Kit”i ile mikroakışkan elektroforez, (sağ) çipe basınç uygulanan şırınga.

Jel Boya Matrisi aşağıdaki aşamalarla hazırlanmıştır:

1. İçeriğin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
2. Jel ve boya vortekslenmiştir.
3. 1.5 ml’lik bir tüpe 200  $\mu$ L jel ve 10  $\mu$ L boya konulmuştur.
4. Homojen oluncaya kadar vortekslenmiştir.
5. Kit içindeki spin filtreye transfer edilmiştir.
6. 1500x g’de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

Dikkat edilmesi gereken noktalar:

- Jel yapışkandır. Doğru hacim için yavaşça pipetlenmelidir.
- Işıktan etkilenebileceği için boya ışıktan korunmalıdır.
- 4 hafta stabil kalabilir.

Çip Yükleme şu aşamalarla yapılmıştır (Şekil 3.5):

1. 9  $\mu$ L Jel-Boya karışımı vortekslenmeden çip yükleme kuyusuna (siyah daire) pipetlenmiştir.
2. Şırıngaya 1 ml hizasına kadar hava çekilip çip yükleme kuyusuna boşaltmak sureti ile 30 saniye basınç uygulanmıştır.
3. Kalan G kuyularına 9  $\mu$ L Jel- Boya karışımı pipetlenmiştir.

4. Her bir örnek kuyusuna kısa süreli santrifüjten sonra 5  $\mu$ l marker ve sadece 1  $\mu$ l ladder sağ alt kuyucuğa ilave edilmiştir.

5. Örnek kuyularına 1  $\mu$ l örnek pipetlendikten sonra çip 1 dakika vortekslenmiştir (hız olarak 2200 önerilir).

Agilent 2100 biyoanalizöre çip yerleştirilmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3. 6.** Biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan Agilent elektroforez 2100 biyoanalizör

Tüm *C. difficile* suşlarının rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları, internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, bioMerieux, Fransa) ile elde edilmiştir. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında, DiversiLab yazılımı Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pairwise Grouping Matematical Avenaging; matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi, rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

Verilerin analizinde, her bir izolat için jel benzeri görüntü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturulmuştur.

İzolatlar;

- Yakın ilişkili (benzerlik > %97),
- Benzer (benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı),
- Farklı (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) olarak sınıflandırılmıştır.

Birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar ana klon; ana klonlar içerisinde de %97'nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edilmiştir. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar ise farklı klon olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi

Hastalardan izole edilen *C.difficile* kökenlerinin vankomisin, seftriakson, metronidazol ve meropenem karşı minimal inhibitör konsantrasyonları referans yöntem olan Agar Dilüsyon Yöntemi ile saptanmıştır ve sonuçlar MİK (mg/L) olarak tanımlanmıştır.

#### 3.2.1. Antimikrobik İlaçlar

Referans toz antibiyotikler, vankomisin (Koçak), seftriakson (Mustafa Nevzat), metronidazol (Sigma), meropenem (Zeneca) gibi doğrudan ticari kaynaklardan sağlanmıştır. Tozlar üreticinin önerilerine göre 4-8°C'de saklanmıştır. Buzdolabından çıkarıldığında, açılmadan önce (buğu oluşumunu engellemek için) oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. İlaç tozları kalibre edilmiş analitik terazilerde en az 100 mg olarak tartılmıştır. Antimikrobik ilacın ulaşılması istenen son konsantrasyonu ve gereken sulandırıcının hacmi, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/mg})}{\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

#### 3.2.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Antimikrobik ilaç stok çözeltileri en az 1000 µg/ml'lik (örneğin 5120 µg/ml) konsantrasyonda hazırlanmıştır. Antimikrobik ilaçlar üretici firma başka bir öneride bulunmadıkça steril distile su ile çözülmüş ve sulandırılmıştır. Metronidazol için çözücü olarak DMSO, sulandırıcı olarak steril distile su kullanılmıştır. Antimikrobik tozu çözebilecek DMSO en az miktarda kullanılmış ve gereken hacme distile su eklenmesi ile ulaşılmıştır (Tablo 3.2).

**Tablo 3. 2.** Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar

Antimikrobik İlaç	Çözücü	Sulandırıcı
Vankomisin (VAN)	Su	-
Seftriakson (CRO)	Su	-
Metronidazole (MET)	DMSO	Su
Meropenem (MEM)	Su	-

Antibiyotiklerin iki kat seri sulandırım değer aralıkları Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3. 3.** Antibiyotiklerin iki kat Sseri sulandırım değer aralıkları

Antibiyotikler	Seri Sulandırım Değer Aralıkları ( $\mu\text{g/ml}$ )
Vankomisin (VAN)	4-0.06
Seftriakson (CRO)	256-4
Metronidazole (MET)	16-0.06
Meropenem (MEM)	16-0.06

Agar dilüsyon yönteminde önerilen besiyeri Brucella sıvı besiyeri (Difco) ve Brucella agardır (Difco) (5  $\mu\text{g/ml}$  Hemin, 1  $\mu\text{g/ml}$  K vitamini eklenmiş). Hemin ve K vitamini sterilizasyondan önce besiyerine katılmıştır. Brucella sıvı besiyeri steril tüplere 5 er ml dağıtılıp herbir suşun ekimi yapılmıştır. *C. difficile* (30 suş), kontrol suş (ATCC 25285 *Bacteroides fragilis*) ve besiyeri kontrol anaerob ortamda 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün inokulum  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde Brucella sıvı besiyerindeki bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

Brucella agar besiyeri şu adımlarda hazırlanmıştır:

- Brucella Agar besiyeri (5  $\mu\text{g/ml}$  hemin, 1  $\mu\text{g/ml}$  K vitamini eklenmiş) hazırlanmıştır. Otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir.
- Besiyeri 56°C soğutulduğunda içine %5 defibrine veya dondurulup çözülmüş koyun kanı ilave edilmiştir.
- Petriler bir şablon yardımıyla alttan çizilerek bölümlere ayrılmıştır. Her bir suş ve kontrol suşu (ATCC 25285 *Bacteroides fragilis*) için bir numara verilmiştir (Şekil 3.7).
- Antibiyotik sulandırımına göre petriler ayrılmıştır. Antibiyotiğin ismi ve sulandırımı da petrilere yazılmıştır. Boş petriye önce 2 ml antibiyotik sulandırımı

sonra 18 ml %5 defibrine koyun kanı ilave edilmiş olan Brucella agar besiyeri dökülmüştür. Hafifçe çalkalayıp antibiyotik sulandırımı ile besiyeri karıştırılarak antibiyotığın 1/10 dilüsyonu sağlanmıştır. Bek alevinin yanında katılaşması beklenmiştir.

- İnokülasyon için en düşük antibiyotik konsantrasyonunu içeren plaktan başlanmıştır. Belli hacimde bakteri süspansiyonu tüm plaklara ekilmiştir. İnokulum her ekim alanında  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Her uygulamada test bakterileri antibiyotik içermeyen iki ayrı plağa ekilerek biri üreme kontrolü için anaerop, diğeri ise kontaminasyon kontrolü için aerop ortamda inkübe edilmiştir (Şekil 3.7).

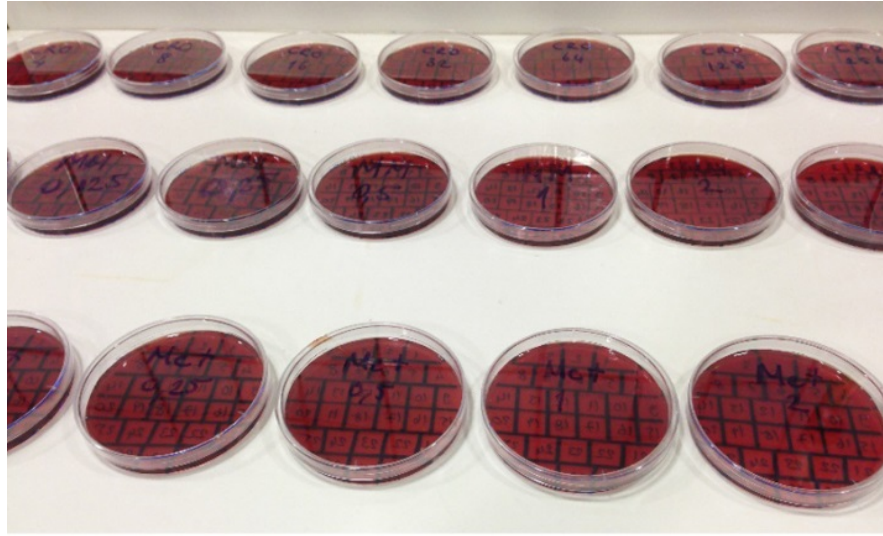
- Anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben koyu, ışığı yansıtmayan bir zemin üzerinde sonuçlar kontrol üreme ile karşılaştırıldığında, üremenin belirgin olarak değişiklik gösterdiği dilüsyon MİK değerini verir. Üremede gözlenen belirgin değişiklik, hiç üreme olmaması ya da çok hafif bir üreme, sisli bir görünüm, çok sayıda minik koloniler veya bir iki tane normal büyüklükte koloni görülmesidir (62). Hastalardan (n: 15) izole edilen izolatlar (n: 30) için MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerleri, anaerop bakterilerde agar dilüsyon metodu ile CLSI'nın (2007) M11-A7 önerileri doğrultusunda çalışılmış, vankomisin ve metronidazol EUCAST'a, meropenem ve seftriakson CLSI'ya göre değerlendirilmiştir (62) (Tablo 3.4).

**Tablo 3. 4.** *C. difficile* MİK değerlerinin CLSI ve EUCAST'a göre değerlendirilmesi

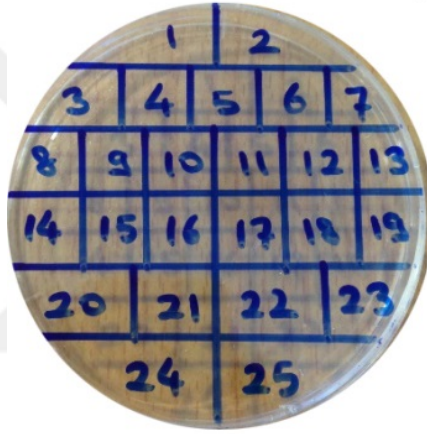
#### SINIR DEĞERLER

	CLSI	EUCAST
	S I R	S R
Vankomisin	--- --- ---	$\leq 2 > 2$
Metronidazol	$\leq 8 \ 16 \geq 32$	$\leq 2 > 2$
Meropenem	$\leq 4 \ 8 \geq 16$	--- ---
Seftriakson	$\leq 16 \ 32 \geq 64$	--- ---

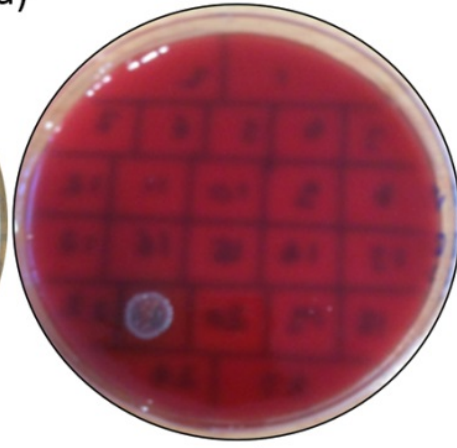
S: Duyarlı, I: Orta, R: Dirençli



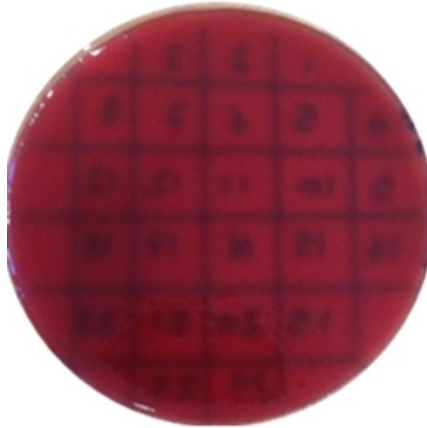
a)



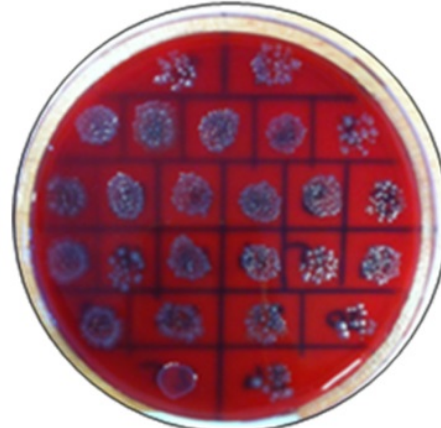
b)



c)



d)



e)

**Şekil 3. 7.** a) Brucella agar besiyerlerinin petrilere dökülmesi, b) Şablon yardımı ile petrinin alttan çizimi, c) ATCC 25285 *B. fragilis* kontrol suşu, d) *C. difficile* aerop kontrol, e) *C. difficile* anaerop kontrol (Antibiyotik içermeyen petri)

### 3.3. Biyofilm Oluşturma

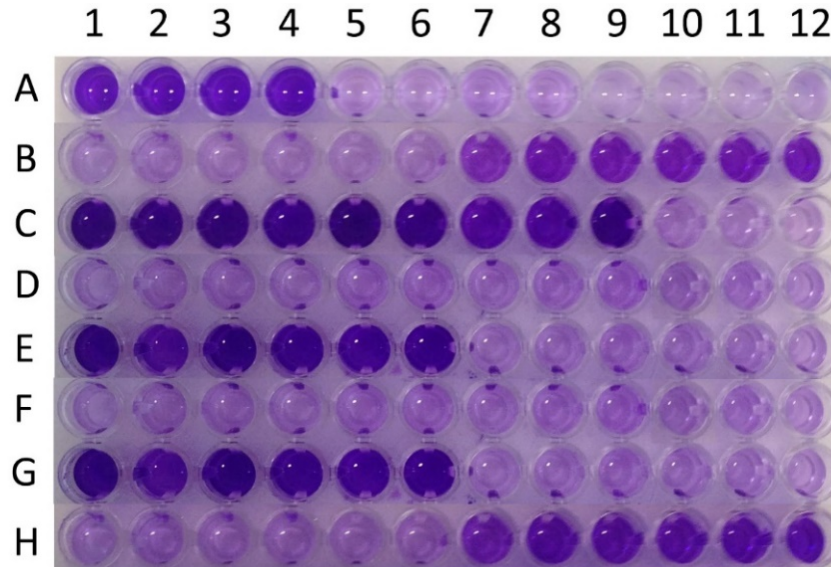
Antibiyotiklerin biyofilm yapımına olumlu ya da olumsuz etkilerinin araştırılması amacıyla mikroplaklarda vankomisin, metronidazol ve meropenemin çeşitli sulandırımıları ve *C. difficile*'nin 30 izoladı ile çalışılmıştır.

- Beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri + Maya özütü (5 mg/ml) karıştırılmıştır. 121°C'de 15' steril edilmiştir. 56°C'ye kadar soğuyunca (%1.8) glukoz ve (%0.1) sistein steril filtreden süzülerek ilave edilmiştir (1).
- Hazırlanan beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri steril tüplere 5'er ml olarak dağıtılmıştır. Otuz adet *C. difficile* izoladı ve ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis* (biyofilm pozitif kontrol) tüplerdeki sıvı besiyelerine ekilmiştir.
- Anaerop ortamda (%90 N<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>, %5 H<sub>2</sub>) 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün sıvı kültürlerdeki mikroorganizma sayısı McFarland 1.5 x 10<sup>8</sup>cfu/ml'ye göre ayarlanmıştır.
- Taze beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde 1/100 dilue edilerek 1.5 x 10<sup>6</sup>cfu/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir.
- Diğer yandan steril 96 kuyucuklu polystren U tabanlı plaklar vankomisin, metronidazole ve meropeneme göre üç gruba ayrılmıştır.
- Mikroplak kuyucuklarına *C. difficile* süspansiyonundan konulmuş ve üzerine vankomisin, metronidazol ve meropenemin seri sulandırımılarından eklenmiş ve mikroplak hafifçe çalkalanıp kapağı kapatılmıştır.
- Mikroplakta boş kuyucuklara buharlaşmayı önlemek için PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon çözeltisi konulmuştur. Plaklar anaerop ortamda (%90 N<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>, %5 H<sub>2</sub>) 37°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.
- Örnek vermek gerekirse; vankomisin MİK değeri 1.0 µg/ml saptanan bir köken için kuyucuklara aşağıdaki dağıtım yapılmıştır (Tablo 3.5).

**Tablo 3. 5.** Biyofilm oluşumunun araştırılması için kullanılan şablon

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	ATCC 35984 <i>S. epidermidis</i>			Distile su kontrol					Besiyeri kontrol			
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1 no'lu izolat + Van 1.0 µg/ ml.			1 no'lu izolat + Van 0.5 µg/ ml.			1 no'lu izolat + Van 0.25 µg/ ml.			1 no'lu izolat + Van 0.125 µg/ ml.		
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1 no'lu izolat + Van 0.06 µg/ ml.			1 no'lu izolat + Van 0.03 µg/ ml.			1 no'lu izolat + Van 0.015 µg/ ml.			Antibiyotiksiz 1. izolat		
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2 no'lu izolat + Van 0.5 µg/ ml.			2 no'lu izolat + Van 0.25 µg/ ml.			2 no'lu izolat + Van 0.125 µg/ ml.			2 no'lu izolat + Van 0.06 µg/ ml.		
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2 no'lu izolat + Van 0.03 µg/ ml.			2 no'lu izolat + Van 0.015 µg/ ml.			2 no'lu izolat + Van 0.0075 µg/ ml.			Antibiyotiksiz 2. izolat		
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	3 no'lu izolat + Van 1.0 µg/ ml.			3 no'lu izolat + Van 0.5 µg/ ml.			3 no'lu izolat + Van 0.25 µg/ ml.			3 no'lu izolat + Van 0.125 µg/ ml.		
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	3 no'lu izolat + Van 0.06 µg/ ml.			3 no'lu izolat + Van 0.03 µg/ ml.			3 no'lu izolat + Van 0.015 µg/ ml.			Antibiyotiksiz 3. izolat		
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	4 no'lu izolat + Van 1.0 µg/ ml.			4 no'lu izolat + Van 0.5 µg/ ml.			4 no'lu izolat + Van 0.25 µg/ ml.			4 no'lu izolat + Van 0.125 µg/ ml.		
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

96 kuyucuklu polystren U tabanlı plaklara A1-A4'e 200 µl pozitif kontrol, A5-A12'ye 200 µl distile su ve besiyeri kontrol, B1-C9'a 180 µl bakteri süspansiyonu ve 20 µl vankomisin dilüsyonları konmuş, C10-C12'ye sadece 200 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Benzer uygulama 2-4 no'lu izolatlar için de gerçekleştirilmiştir. Üç gün sonra mikroplaklar etüvden çıkartılıp içindeki sıvı atık kabına boşaltılmış, her bir kuyucuk iki kez steril PBS ile yıkandıktan sonra mikroplaklar 37°C'de 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Her kuyucuğa 200 µl %0.2 kristal viyole eklenerek mikroplaklar 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Kuyucuklar iki kez steril PBS ile yıkanıp her bir kuyucuğa alkol-aseton (%80-%20) karışımı konmuş ve 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.8).



**Şekil 3. 8.** Biyofilm oluşumunun mikropklarda değerlendirilmesi

### 3.3.1. Biyofilm Oluşumunun ROC Eğrisi İle Belirlenmesi ve İstatistiksel Değerlendirmesi

Suşların biyofilm oluşturup oluşturmadığı ROC eğrisi ile elde edilen eşik değere göre belirlenmiştir. Bu amaçla, pozitif kontrol suşunun her çalışmada spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değerleri ortalamaları baz alınarak, antibiyotiksiz ortamda *C. difficile* izolatlarının biyofilm üretip üretmediği tespit edilmiştir. Ortalamanın altında kalan değerler “üretmiyor”, üzerinde olan değerler ise “üretiyor” olarak sınıflandırılmıştır. Antibiyotiksiz ortamdan elde edilen bu absorbans değerleri negatiflikten pozitifliğe doğru ROC grafiğine yerleştirilmiş ve pozitif kesim noktası, sınır değeri belirlemek üzere kullanılmıştır. ROC eğrisinde ideal değer olan 1'e en yakın saptanan alan biyofilm üretimi için eşik değerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Buradan yola çıkarak, antibiyotikli ortamda da suşların biyofilm üretip üretmediği ROC eğrisinden elde edilen eşik değerlere göre belirlenmiştir. Kökenlerin vankomisin, metronidazol ve meropenemin subMİK konsantrasyonlarının biyofilm üretimine etkisi McNemar ki kare testi ile değerlendirilmiştir.

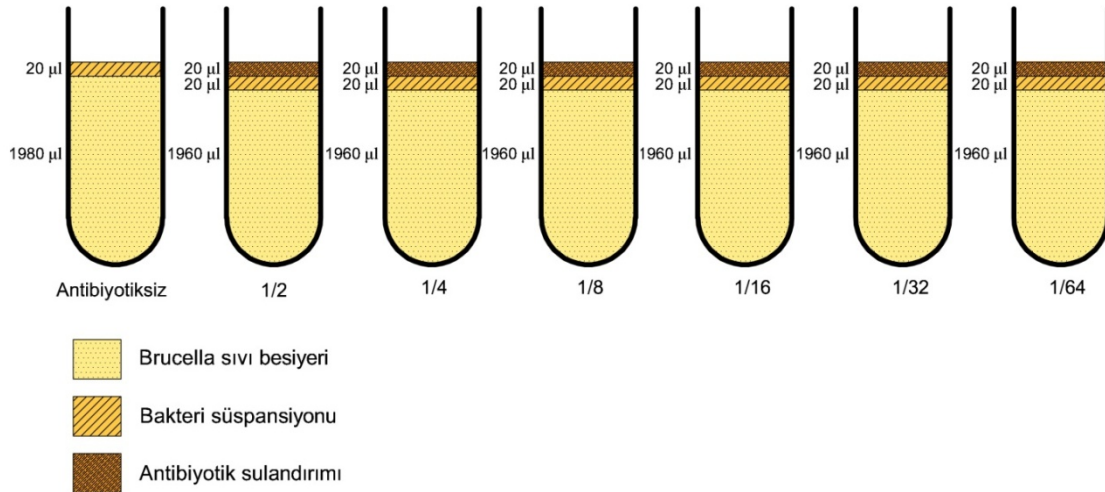
### 3.4. Toksin A + B Üretimini Araştırılması

*C. difficile* suşlarında toksin A + B toksin üretimi açısından antibiyotikli ve antibiyotiksiz ortamda bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için *C. difficile* suşları sikloserin-sefoksitin-fruktoz agara (CCFA) ekilerek anaerop ortamda 37°C'de

48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden taze hazırlanan 5 ml'lik Brucella sıvı besiyerine (5 µg/ml Hemin, 1 µg/ml K vitamini eklenmiş) pasaj yapılmış, anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kırk sekiz saat sonra son bakteri konsantrasyonu  $1.5 \times 10^6$  cfu/ml olacak şekilde hazırlanarak toksin A + B testinde kullanılmıştır.

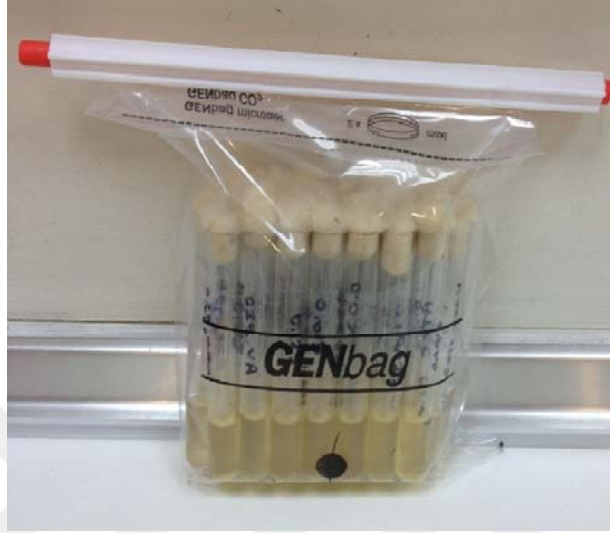
Antimikrobik ilaçlar agar dilüsyon yönteminde anlatıldığı üzere her bir *C. difficile* izolatı için vankomisin, seftriakson, metronidazol ve meropenemin seri sulandırmaları ile subMİK değerleri hazırlanmıştır. Toksin üretimini araştırmak üzere tüplerin her birine toplamda 2 ml olacak şekilde, 1960 µl Brucella sıvı besiyeri (5 µg/ml Hemin, 1 µg/ml K vitamini eklenmiş), 20 µl antibiyotik (her bir subMİK sulandırmalarından olacak şekilde) 20 µl *C. difficile* süspansiyonu ( $1.5 \times 10^6$  cfu/ml) eklenmiştir.

Kontrol olarak antibiyotiksiz ortam hazırlanmak amacıyla; 1980 µl Brucella sıvı besiyerine (5 µg/ml Hemin, 1 µg/ml K vitamini eklenmiş) sadece bakteri süspansiyonundan 20 µl eklenmiş olup, Şekil 3.9'da şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 3. 9.** *C. difficile* izolatlarının toksin A+B üretimini araştırmak üzere tüplerin hazırlanması

Tüpler bu şekilde hazırlandıktan sonra anaerob ortamda 37°C'de 120 saat (5 gün) inkübasyona bırakılmıştır. Örnek vermek gerekirse MİK değeri 1 µg/ml olan 1 no'lu izolat Şekil 3.9'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.



**Şekil 3. 10.** Anaerob ortamda *C. difficile* izolatlarının hazırlanması

120 saat sonunda her bir tüp (4000xg) 15 dakika santrüfuj edilip 300 µl süpernatant alınmış ve *C. difficile* toksin A + B kiti (VIDAS, bioMérieux, Fransa) ile üreticinin önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Her numune için test değeri cihaz tarafından,

$$\frac{\text{Hasta RFV (Bağlı floresan ışığı)}}{\text{Standart RFV}}$$

formülüne göre hesaplanmış ve elde edilen değer aşağıdaki tabloya göre sonuçlandırılmıştır (Tablo 3.6).

**Tablo 3.6.** *C. difficile* toksin A + B değerinin saptanması

Test Değeri	Sonuç
< 0.13	Negatif
≥ 0.13 ile < 0.37	Ara değer
≥ 0.37	Pozitif

Antibiyotiksiz ve antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarında toksin A + B seviyesine bakılan süpernatandan CCFA besiyerine ekim yapılmış, 48 saat inkübasyondan sonra hem besiyerinde hem de mikroskopta incelenmiştir.

### 3.5. *Clostridium difficile* Toksin Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması

*C. difficile* suşlarında *tcdA*, *tcdB*, *CdtA* ve *CdtB* toksin genlerinin saptanması amacıyla suşların Rep-PCR (Diversilab, Biomerieux, Fransa) yöntemi için elde edilen DNA ekstratları kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapılmıştır. Tablo 3.7'de bu amaçla kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları yer almaktadır. Sonuçların kıyaslanması için: NCTC 11223 *C. difficile* toksin A (+)/B (+), HU 10010 binary toksin (+) *C. difficile* kökenleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Tablo 3. 7.** Toksin genlerine özgül primerler (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*) ve reaksiyon koşulları

Primerler	Yön	DNA dizisi	Kaynak	Reaksiyon Karışımı	Reaksiyon Koşulları
<i>tcdA</i>	Reverse	5'-GGAAGA AAA GAA CTT CTG GCT CAC TCA GGT -3'	31	PCR Master karışımı 25 µl TcdA-F 1 µl TcdA-R 1 µl DNA 5 µl Distile su 18 µl	95°C'de 20 sn 55°C'de 2 dk } 35 döngü 72°C'de 1 dk 74°C'de 5 dk
<i>tcdA</i>	Forward	5'- CCC AAT AGA AGA TTC AAT ATT AAG CTT -3'			
<i>tcdB</i>	Reverse	5'- CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT-3'	31	PCR Master karışımı 25 µl TcdB-F 1 µl TcdB-R 1 µl DNA 5 µl Distile su 18 µl	95°C'de 20 sn 56°C'de 2 dk } 35 döngü 72°C'de 1 dk 74°C'de 5 dk
<i>tcdB</i>	Forward	5'- GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C -3'			
<i>CdtA</i>	Reverse	5'- AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG -3'	23	PCR Master karışımı 25 µl CdtA-F 1 µl CdtA-R 1 µl DNA 5 µl Distile su 18 µl	94°C'de 45 sn 52°C'de 1 dk } 35 döngü 75°C'de 80 sn
<i>CdtA</i>	Forward	5'- TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG -3'			
<i>CdtB</i>	Reverse	5'- AAC GGA TCT CTT GCT tca GTC -3'	23	PCR Master karışımı 25 µl CdtB-F 1 µl CdtB-R 1 µl DNA 5 µl Distile su 18 µl	94°C'de 45 sn 52°C'de 1 dk } 35 döngü 75°C'de 80 sn
<i>CdtB</i>	Forward	5'- CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G -3'			

Agoroz Jel Elektroforezi:

PZR ürünleri, etidyum bromid eklenmiş %2'lik agaroz jelde ve 1 x TBE tamponu içinde 90 Volt'da 1 saat yürütülmüş, oluşan bantların fotoğrafları TFX20M Vilmer Lourmat DNA görüntüleme cihazı ile ultraviyole altında çekilmiştir.



#### 4. BULGULAR

2012-2015 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesine yatan ve antibiyotik tedavisine bağlı olarak en az iki kez *C. difficile* enfeksiyonu geçiren toksin A + B testi pozitif olan, dışkı kültürlerinden *C. difficile* izole edilen 15 hastanın yedisi çocuk, sekizi yetişkindir.

*C. difficile* izole edilen hastaların dokuzu kadın, altısı erkektir. Çocuk hastaların yaş aralığı 2-9 iken, erişkinlerde 18-> 65 arasındadır.

*C. difficile* enfeksiyonu gelişen hastalarda hangi antibiyotik tedavisine bağlı olarak geliştiği araştırıldığında ilk sırada beta-laktam grubu antibiyotiklerin yer aldığı görülmüştür (Tablo 4.1).

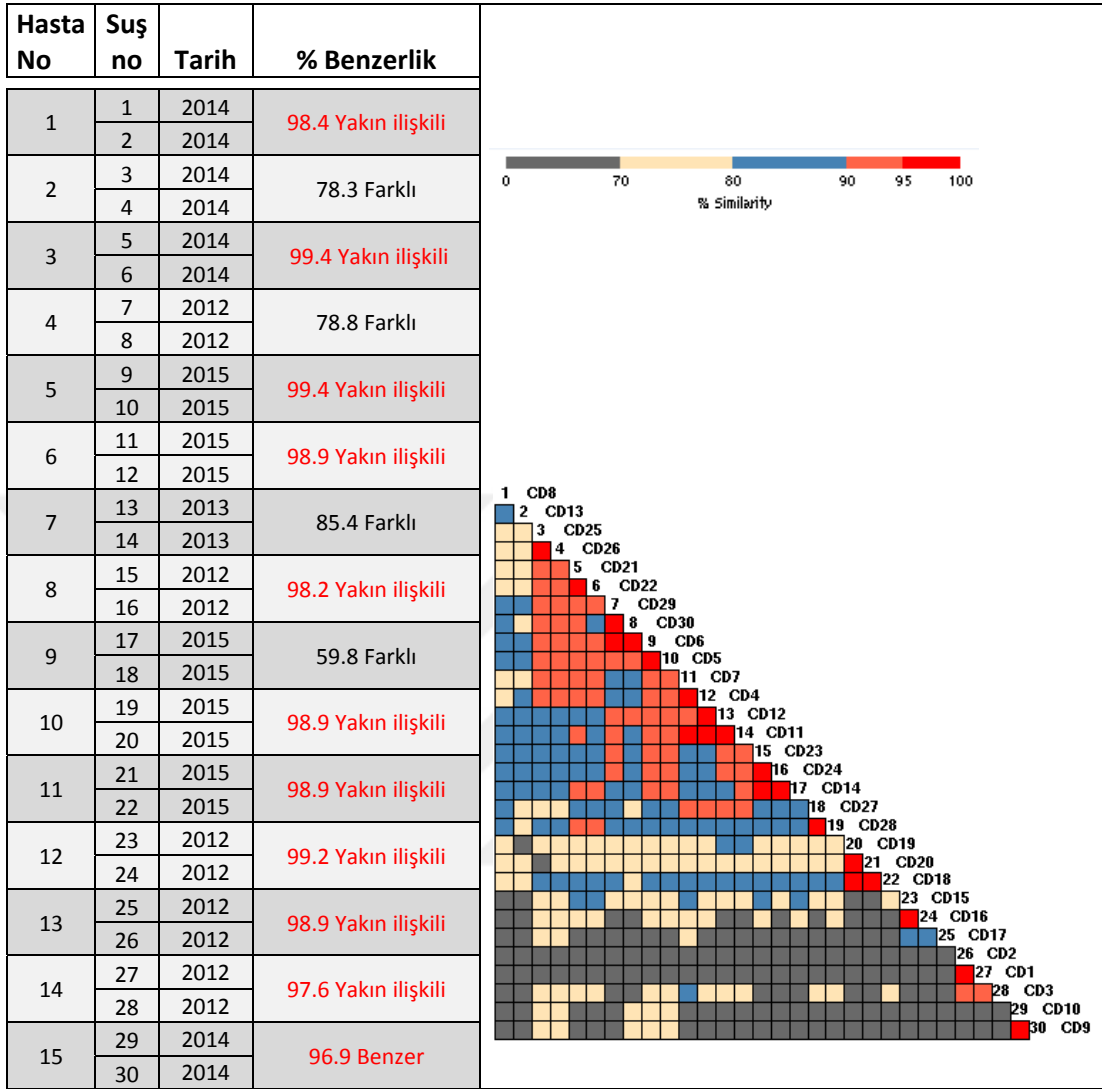
**Tablo 4. 1.** *C.difficile* enfeksiyonu gelişmeden önce tedavide kullanılan antibiyotikler ve hasta sayısına bağlı yüzdeleri

	Hasta Sayısı	Yüzde (%)
Sefalosporinler	12	80
Penisilinler	10	70
Karbapenemler	6	40
Glikopeptitler	5	30
Aminoglikozidler	4	26
Florokinolonlar	2	13
Makrolid grubu	1	6

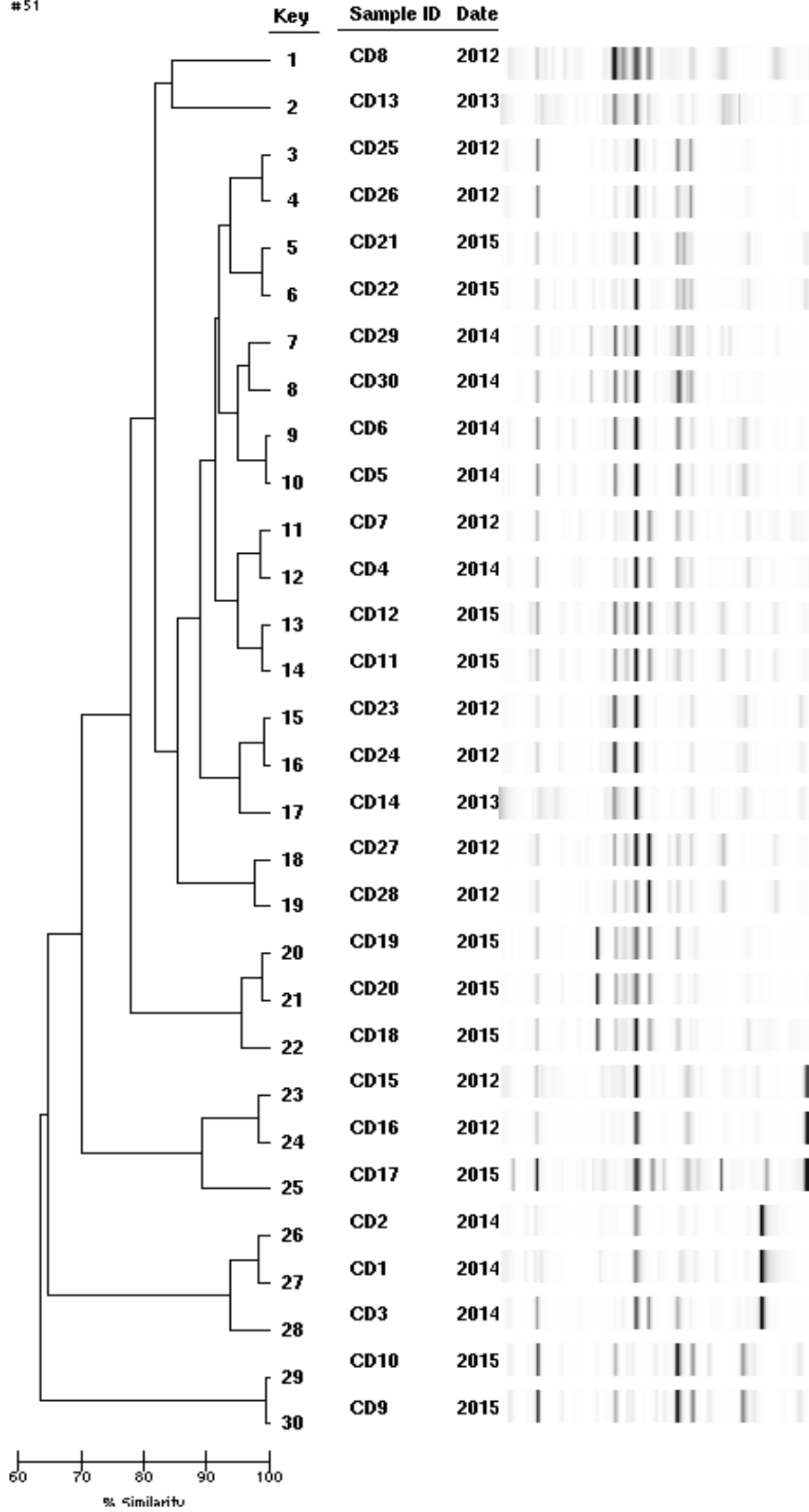
Hastaların 11'inde çoklu antibiyotik kullanımı tespit edilmiş olup 4 hastada tekli antibiyotik kullanılmıştır. Hastaların üçünde hematolojik, dördünde solid organ malignensisi olmak üzere yedisinde altta yatan hastalık olduğu belirlenmiştir.

##### 4.1. Rep-PCR Yöntemi ile Suşlar Arasındaki Genetik Yakınlık

On beş hasta içinde (aynı hastaların 1. ve 2. gelişleri), 11 (%73) hasta yakın ilişkili ve benzer izolat, 4 (%27) hasta ise farklı izolat olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2) (Şekil 4.1).

**Tablo 4. 2.** Hastaların (n: 15) yakın ilişkili, benzer ve farklı izolatları (n: 30)

Diversilab v3.6  
PC  
#51



Şekil 4. 1. Diversilab yöntemi ile 30 izolatin klonal ilişkilerinin belirlenmesi

#### 4.2. Antibiyotik MİK Değerleri ve Bu Değerlerin Zaman İçinde Değişimi

On beş hastadan elde edilen 30 *C. difficile* izolatının MİK değerleri ve tekrarlayan enfeksiyon düşünülen hastalarda bu MİK değerlerinin değişimine baktığımızda (Tablo 4.3). Sadece 5. ve 6. hastanın 2. geliş seftriakson MİK değerinde iki dilüsyon artış görülmüş ve ikinci gelişlerinde dirençli hale geçtiği gözlenmiştir. Diğer izolatların 1. ve 2. geliş MİK değerlerinde belirgin bir artış görülmemiştir.

**Tablo 4. 3.** Hastalardan (n: 15) izole edilen izolatların (n: 30) çeşitli antibiyotikler için saptanan MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerleri

Hasta No	Suş no	Tarih	% Benzerlik	VA	CRO	MET	MEM
1	1	2014	98.4 Yakın İlişkili	1.0	16.0	1.0	2.0
	2	2014		0.5	16.0	0.5	2.0
2	3	2014	78.3 Farklı	1.0	8.0	1.0	1.0
	4	2014		1.0	8.0	1.0	1.0
3	5	2014	99.4 Yakın İlişkili	0.25	16.0	0.5	1.0
	6	2014		0.25	16.0	0.5	1.0
4	7	2012	78.8 Farklı	0.25	32.0	0.5	2.0
	8	2012		0.25	32.0	0.5	2.0
5	9	2015	99.4 Yakın İlişkili	0.25	16.0	0.5	1.0
	10	2015		0.5	64.0	0.25	2.0
6	11	2015	98.9 Yakın İlişkili	0.5	16.0	1.0	0.5
	12	2015		0.5	64.0	1.0	2.0
7	13	2013	85.4 Farklı	0.5	16.0	1.0	2.0
	14	2013		0.5	32.0	1.0	2.0
8	15	2012	98.2 Yakın İlişkili	1.0	16.0	1.0	2.0
	16	2012		1.0	16.0	1.0	2.0
9	17	2015	59.8 Farklı	1.0	16.0	1.0	2.0
	18	2015		0.5	16.0	1.0	2.0
10	19	2015	98.9 Yakın İlişkili	0.5	32.0	0.5	2.0
	20	2015		0.5	32.0	0.5	2.0
11	21	2015	98.9 Yakın İlişkili	1.0	32.0	1.0	2.0
	22	2015		1.0	32.0	1.0	2.0
12	23	2012	99.2 Yakın İlişkili	1.0	16.0	0.25	1.0
	24	2012		0.25	16.0	0.5	1.0
13	25	2012	98.9 Yakın İlişkili	0.5	16.0	1.0	2.0
	26	2012		1.0	16.0	1.0	2.0
14	27	2012	97.6 Yakın İlişkili	0.5	16.0	1.0	2.0
	28	2012		1.0	16.0	1.0	2.0
15	29	2014	96.9 Benzer	0.25	16.0	0.25	1.0
	30	2014		0.25	16.0	0.25	1.0

### 4.3. Biyofilm Oluşturma

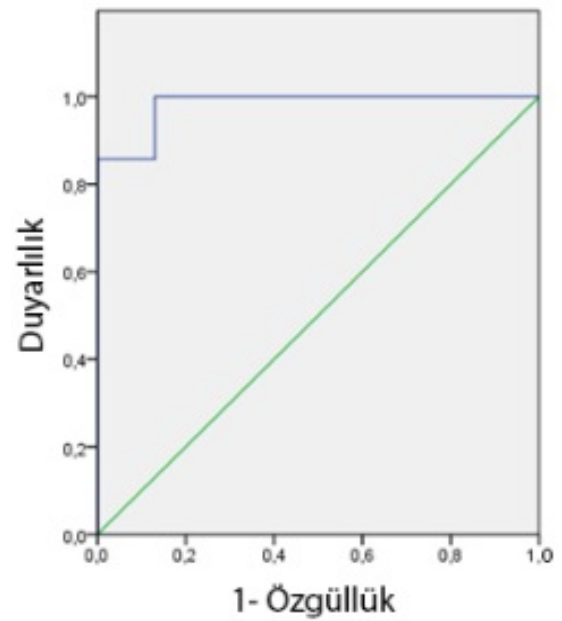
Çalışmaya dahil edilen 30 izolatin vankomisin, metronidazol ve meropenemin seri dilüsyonlarının bulunduğu ortamda biyofilm oluşturup oluşturmadıklarını değerlendirmek üzere kullanılan ROC eğrisi verileri Şekil 4.2’de verilmiş, hem duyarlılığın hem de özgüllüğün birlikte en yüksek olduğu değer, eşik değer belirlenmiştir. Buna göre duyarlılığın %85.7, özgüllüğün %87 ( $1-0.130 = 0.87$ ) olduğu noktadaki 999.78 değeri eşik değer olarak kabul edilmiştir.

#### Eğri koordinatları

Test Sonucu Değişkenleri: Ant. siz C. difficile

Değerden büyük veya eşitse pozitif	Duyarlılık	1-Özgüllük
-,49200	1,000	1,000
,51950	1,000	,957
,54200	1,000	,913
,58700	1,000	,870
,62400	1,000	,826
,64250	1,000	,783
,68300	1,000	,739
,71900	1,000	,696
,73150	1,000	,652
,73900	1,000	,609
,74950	1,000	,565
,75950	1,000	,522
,76950	1,000	,478
,77850	1,000	,435
,80400	1,000	,391
,83100	1,000	,348
,83950	1,000	,304
,86250	1,000	,261
,88450	1,000	,217
,88800	1,000	,174
462,39400	1,000	,130
999,78250	,857	,130
1103,00000	,857	,087
1154,16650	,857	,043
1271,83350	,857	,000
1379,50000	,714	,000
1458,83300	,571	,000
1600,16650	,429	,000
1709,16650	,286	,000
1793,66650	,143	,000
1846,00000	,000	,000

#### ROC Eğrisi



Şekil 4.2. Öngörülen duyarlılık ve 1- özgüllüğe göre saptanan eşik değer ve ROC eğrisi

ROC eğrisi verilerine göre, her deneyde çalışılan pozitif kontrol kökeninin (ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis*) absorbans değerlerinin ortalaması olan 1057.69 değeri test kökenlerinin biyofilm üretimleri için sınır değer kabul edildiğinde kökenlerin antibiyotiksiz ortamda ve vankomisin, metronidazol ve meropenem varlığında biyofilm üretip üretmedikleri Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiş olup bu kökenlerin toplam sayısı ve yüzdeleri Tablo 4.7'de özetlenmiştir. Bu tablolara göre antibiyotiksiz ortamda 9 köken (%30) biyofilm üretirken, antibiyotiklerin 1/2-1/64 subMİK değerlerinde biyofilm üretimi vankomisinli ortamda 1/2 subMİK hariç istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiş, benzer artış metronidazolün tüm subMİK değerlerinde gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Meropenem varlığının ise biyofilm üretimine katkısı olmamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4. 4.** 30 izolatin vankomisin subMİK değerlerinde biyofilm üretimi

Hasta No	Suş No	Biyofilm için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	Ant.sız biyofilm üretimi
1	1	1089(P)	0.758(N)	0.706(N)	0.713(N)	0.703(N)	0.700(N)	0.783(N)
	2	3190(P)	3200(P)	3210(P)	3110(P)	3200(P)	3200 (P)	0.553(N)
2	3	1355(P)	2200(P)	2728(P)	3419(P)	3420(P)	3400(P)	0.890(N)
	4	0.348(N)	0.333(N)	1124(P)	1149(P)	1132(P)	1135(P)	0.837(N)
3	5	3210(P)	3200(P)	3220(P)	3220(P)	3230(P)	3200(P)	1075(P)
	6	3200(P)	3806(P)	3864(P)	3900(P)	3900(P)	3900(P)	1676(P)
4	7	2210(P)	2500(P)	2810(P)	2900(P)	2910(P)	2920(P)	1845(P)
	8	3000(P)	3730(P)	3740(P)	3800(P)	3810(P)	3800(P)	1742(P)
5	9	3288(P)	3781(P)	3700(P)	3710(P)	3800(P)	3810(P)	0.842(N)
	10	3951(P)	3687(P)	3600(P)	3650(P)	3660(P)	3700(P)	0.883(N)
6	11	3190(P)	3200(P)	3210(P)	3180(P)	3200(P)	3210(P)	1393(P)
	12	3210(P)	3894(P)	3438(P)	3563(P)	3600(P)	3600(P)	1130(P)
7	13	0.338(N)	0.363(N)	0.480(N)	0.494(N)	0.500(N)	0.510(N)	0.531(N)
	14	0.360(N)	0.399(N)	0.493(N)	0.481(N)	0.510(N)	0.510(N)	0.733(N)
8	15	0.452(N)	0.470(N)	0.700(N)	0.670(N)	0.700(N)	0.700(N)	1524(P)
	16	0.553(N)	1889(P)	1505(P)	1547(P)	1500(P)	1610(P)	0.923(N)
9	17	0.448(N)	0.400(N)	0.410(N)	0.495(N)	0.653(N)	0.617(N)	0.730(N)
	18	0.704(N)	2924(P)	2197(P)	2100(P)	2150(P)	2200(P)	0.508(N)
10	19	1890(P)	0.947(N)	0.776(N)	0.965(N)	0.900(N)	0.910(N)	0.754(N)
	20	0.356(N)	0.464(N)	0.659(N)	0.693(N)	0.700(N)	0.700(N)	0.627(N)
11	21	1701(P)	1529(P)	1521(P)	1622(P)	1580(P)	1680(P)	1178(P)
	22	1519(P)	1371(P)	1285(P)	1385(P)	1443(P)	1500(P)	1365(P)
12	23	0.338(N)	2158(P)	2057(P)	2100(P)	2098(P)	2100(P)	0.658(N)
	24	0.421(N)	0.524(N)	0.735(N)	0.800(N)	0.788(N)	0.800(N)	0.765(N)
13	25	2550(P)	2555(P)	3011(P)	3500(P)	3510(P)	3600(P)	0.774(N)
	26	0.668(N)	0.660(N)	0.656(N)	0.670(N)	0.700(N)	0.700(N)	0.886(N)
14	27	1446(P)	1518(P)	1500(P)	1510(P)	1490(P)	1500(P)	0.825(N)
	28	0.432(N)	1141(P)	1233(P)	1268(P)	1200(P)	1210(P)	0.745(N)
15	29	0.364(N)	0.476(N)	0.479(N)	0.510(N)	0.560(N)	0.590(N)	0.621(N)
	30	0.338(N)	0.397(N)	0.507(N)	0.510(N)	0.508(N)	0.510(N)	0.708(N)

**Tablo 4. 5.** 30 izolatin metronidazol subMİK değerlerinde biyofilm üretimi

Hasta No	Suş No	Biyofilm üretimi için hesaplanan değer-sonuç						Ant.siz biyofilm üretimi
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	
1	1	2197 (P)	2110(P)	2175(P)	1894(P)	1900(P)	1920(P)	0.783(N)
	2	2210(P)	2198(P)	2300(P)	2310(P)	2320(P)	2400(P)	0.553(N)
2	3	2110(P)	2210(P)	2100(P)	2110(P)	2200(P)	2200(P)	0.890(N)
	4	0.480(N)	0.526(N)	0.595(N)	0.745(N)	0.765(N)	0.770(N)	0.837(N)
3	5	2660(P)	2550(P)	2670(P)	2800(P)	2570(P)	2600(P)	1075(P)
	6	2440(P)	2230(P)	2350(P)	2400(P)	2398(P)	2400(P)	1676(P)
4	7	2200(P)	2190(P)	2250(P)	2282(P)	2300(P)	2300(P)	1845(P)
	8	2340(P)	2280(P)	2100(P)	2100(P)	2190(P)	2200(P)	1742(P)
5	9	2100(P)	2200(P)	2150(P)	2250(P)	2150(P)	2200(P)	0.842(N)
	10	2130(P)	2200(P)	2180(P)	2150(P)	2100(P)	2110(P)	0.883(N)
6	11	2376(P)	2280(P)	2400(P)	2840(P)	2890(P)	2900(P)	1393(P)
	12	3316(P)	3836(P)	3200(P)	3110(P)	3180(P)	3200(P)	1130(P)
7	13	0.687(N)	0.668(N)	0.863(N)	0.920(N)	0.918(N)	0.900(N)	0.531(N)
	14	0.675(N)	0.615(N)	0.822(N)	0.978(N)	0.980(N)	0.980(N)	0.733(N)
8	15	1192(P)	1600(P)	1800(P)	1823(P)	1800(P)	1810(P)	1524(P)
	16	1900(P)	1890(P)	1980(P)	2446(P)	2500(P)	2510(P)	0.923(N)
9	17	1063(P)	2100(P)	1831(P)	1600(P)	1780(P)	1800(P)	0.730(N)
	18	1800(P)	2100(P)	2200(P)	2544(P)	2500(P)	2510(P)	0.508(N)
10	19	1860(P)	1889(P)	2237(P)	2300(P)	2290(P)	2300(P)	0.754(N)
	20	1265(P)	1532(P)	1763(P)	1800(P)	1980(P)	1980(P)	0.627(N)
11	21	0.580(N)	0.567(N)	0.623(N)	0.694(N)	0.700(N)	0.710(N)	1178(P)
	22	0.459(N)	0.502(N)	0.659(N)	0.710(N)	0.750(N)	0.750(N)	1365(P)
12	23	2100(P)	3775(P)	3550(P)	3600(P)	3580(P)	3600(P)	0.658(N)
	24	2280(P)	2100(P)	2440(P)	2500(P)	2480(P)	2500(P)	0.765(N)
13	25	1920(P)	2100(P)	1931(P)	1890(P)	1800(P)	1890(P)	0.774(N)
	26	1900(P)	1200(P)	2078(P)	2077(P)	2100(P)	2110(P)	0.886(N)
14	27	1980(P)	2103(P)	2200(P)	2486(P)	2400(P)	2400(P)	0.825(N)
	28	0.832(N)	0.914(N)	0.982(N)	1619(P)	1600(P)	1600(P)	0.745(N)
15	29	0.696(N)	0.800(N)	0.890(N)	0.910(N)	0.916(N)	0.920(N)	0.621(N)
	30	0.743(N)	0.741(N)	0.820(N)	0.880(N)	0.850(N)	0.880(N)	0.708(N)

**Tablo 4. 6.** 30 izolatin meropenem subMİK değerlerinde biyofilm üretimi

Hasta No	Suş No	Biyofilm üretimi için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	Ant.siz biyofilm üretimi
1	1	0.743(N)	0.490(N)	0.860(N)	0.957(N)	0.976(N)	0.980(N)	0.783(N)
	2	1862(P)	2509(P)	2051(P)	2076(P)	2571(P)	2600(P)	0.553(N)
2	3	1799(P)	1057(P)	1809(P)	1351(P)	1450(P)	1500(P)	0.890(N)
	4	0.291(N)	0.295(N)	0.300(N)	0.376(N)	0.380(N)	0.390(N)	0.837(N)
3	5	2193(P)	1844(P)	1592(P)	1626(P)	1600(P)	1610(P)	1075(P)
	6	1944(P)	1970(P)	1830(P)	2100(P)	2090(P)	2090(P)	1676(P)
4	7	0.697(N)	0.751(N)	0.802(N)	0.919(N)	0.924(N)	0.930(N)	1845(P)
	8	0.334(N)	0.300(N)	0.310(N)	1297(P)	1766(P)	1780(P)	1742(P)
5	9	1196(P)	1133(P)	1225(P)	0.900(N)	0.910(N)	0.920(N)	0.842(N)
	10	1522(P)	1541(P)	1922(P)	1284(P)	1893(P)	1900(P)	0.883(N)
6	11	3406(P)	3200(P)	3500(P)	3650(P)	3600(P)	3610(P)	1393(P)
	12	1955(P)	2134(P)	1894(P)	2381(P)	2612(P)	2600(P)	1130(P)
7	13	0.481(N)	0.592(N)	0.302(N)	0.505(N)	0.439(N)	0.440(N)	0.531(N)
	14	0.372(N)	0.238(N)	0.290(N)	0.273(N)	0.308(N)	0.310(N)	0.733(N)
8	15	1313(P)	2137(P)	2261(P)	2192(P)	1989(P)	1900(P)	1524(P)
	16	1331(P)	1270(P)	1319(P)	1844(P)	1777(P)	1800(P)	0.923(N)
9	17	1580(P)	1607(P)	1961(P)	1541(P)	1383(P)	1380(P)	0.730(N)
	18	1752(P)	1120(P)	1245(P)	0.883(N)	0.699(N)	0.699(N)	0.508(N)
10	19	0.825(N)	0.764(N)	0.697(N)	0.827(N)	1390(P)	1390(P)	0.754(N)
	20	0.724(N)	0.505(N)	0.584(N)	0.652(N)	0.892(N)	0.900(N)	0.627(N)
11	21	0.642(N)	0.717(N)	0.647(N)	0.817(N)	0.820(N)	0.820(N)	1178(P)
	22	0.745(N)	0.622(N)	0.611(N)	0.715(N)	0.735(N)	0.740(N)	1365(P)
12	23	1797(P)	1177(P)	1412(P)	1541(P)	1499(P)	1500(P)	0.658(N)
	24	1500(P)	1200(P)	1368(P)	1453(P)	1400(P)	1410(P)	0.765(N)
13	25	1059(P)	1085(P)	1165(P)	1903(P)	1551(P)	1500(P)	0.774(N)
	26	1217(P)	1300(P)	1809(P)	1630(P)	2100(P)	2100(P)	0.886(N)
14	27	1469(P)	1739(P)	1870(P)	1954(P)	2152(P)	2150(P)	0.825(N)
	28	0.389(N)	0.658(N)	0.500(N)	0.620(N)	0.656(N)	0.700(N)	0.745(N)
15	29	0.253(N)	0.252(N)	0.267(N)	0.347(N)	0.350(N)	0.350(N)	0.621(N)
	30	0.321(N)	0.323(N)	0.301(N)	0.292(N)	0.310(N)	0.300(N)	0.708(N)

**Tablo 4. 7.** Antibiyotiksiz ortam ve antibiyotiklerin subMİK değerlerinde biyofilm üretimleri

	Antibiyotiksiz Ortam n (%)	MİK/2 n (%)	MİK/4 n (%)	MİK/8 n (%)	MİK/16 n (%)	MİK/32 n (%)	MİK/64 n (%)
Vankomisin	–	16 (53)	18 (60)	19 (63)	19 (63)	19 (63)	19 (63)
Metronidazol	–	22 (73)	22 (73)	22 (73)	23 (76)	23 (76)	23 (76)
Meropenem	–	17 (56)	17 (56)	17 (56)	16 (53)	17 (56)	17 (56)
Antibiyotiksiz Ortam	9 (30)	–	–	–	–	–	–

#### 4.4. Toksin A + B Araştırılması

Tüm izolatların antibiyotiksiz ortamda toksin A + B üretimi pozitif olarak saptanmıştır. Tüm izolatlar için vankomisin, metronidazol, meropenem ve seftriakson MİK değerlerine göre 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 subMİK dilüsyonlardaki toksin A + B değerleri sırasıyla Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11’de verilmiş, Tablo 4.12’te bu veriler sayı ve yüzde olarak özetlenmiştir. Tablo 4.12’te de görüleceği gibi MİK/64’de antibiyotik konsantrasyonu oldukça düşük olmasına paralel olarak bakterilerin aktif olmaları nedeniyle 30 izolatta da toksin A + B pozitif bulunmuştur. Fakat antibiyotiklerin görece olarak daha konsantre olduğu 1/2 ve 1/4 subMİK konsantrasyonların sadece %6’sının hala toksin ürettiği gözlenmiştir. Antibiyotiklerin subMİK değerlerine göre toksin A + B seviyesi pozitif olan izolatların tamamı kültürlerde üretilmiş, mikroskopik incelemede de *C. difficile* morfolojisi ile uyumlu gram-pozitif basiller görülmüştür, toksin A + B negatif olan tüm izolatlarda üreme ve mikroskopik incelemede *C. difficile* görülmemiştir.

**Tablo 4. 8.** İzolatların (n: 30) vankomisin subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi

Hasta No	Suş No	Toksın A + B için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	ToksınA+B Ant.siz
1	1	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	2.00(P)	2.10(P)	2.20(P)
	2	0.01(N)	0.01(N)	0.05(N)	1.23(P)	1.26(P)	1.54(P)	1.31(P)
2	3	0.01(N)	0.05(N)	0.08(N)	0.09(N)	6.00(P)	6.72(P)	10.36(P)
	4	0.02(N)	0.08(N)	5.00(P)	6.10(P)	6.10(P)	7.40(P)	7.74(P)
3	5	1.00(P)	4.50(P)	5.57(P)	7.12(P)	8.95(P)	9.30(P)	9.94(P)
	6	0.08(N)	2.00(P)	2.20(P)	4.00(P)	4.20(P)	4.50(P)	5.77(P)
4	7	0.01(N)	0.15(N)	9.50(P)	9.60(P)	9.60(P)	9.80(P)	9.93(P)
	8	0.01(N)	0.02(N)	0.85(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)
5	9	0.06(N)	0.08(N)	9.93(P)	9.87(P)	9.87(P)	9.94(P)	9.78(P)
	10	0.04(N)	0.08(N)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.93(P)	9.94(P)
6	11	0.01(N)	0.01(N)	1.20(P)	1.25(P)	1.25(P)	1.25(P)	9.94(P)
	12	0.01(N)	0.01(N)	0.40(P)	0.42(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)
7	13	0.01(N)	0.01(N)	1.07(P)	1.08(P)	1.08(P)	1.10(P)	7.70(P)
	14	0.01(N)	0.01(N)	0.31(N)	7.80(P)	8.00(P)	9.99(P)	10.36(P)
8	15	0.01(N)	0.01(N)	5.00(P)	5.83(P)	6.52(P)	6.83(P)	7.74(P)
	16	0.01(N)	0.01(N)	3.00(P)	3.90(P)	4.90(P)	5.49(P)	9.73(P)
9	17	0.01(N)	0.01(N)	0.18(N)	0.18(N)	0.18(N)	4.30(P)	6.19(P)
	18	0.01(N)	0.01(N)	0.09(N)	0.09(N)	0.10(N)	5.02(P)	10.36(P)
10	19	0.01(N)	0.01(N)	1.24(P)	1.47(P)	1.52(P)	1.59(P)	10.36(P)
	20	0.01(N)	0.01(N)	0.18(N)	8.00(P)	9.20(P)	10.30(P)	10.36(P)
11	21	0.01(N)	0.02(N)	1.68(P)	3.60(P)	4.07(P)	4.23(P)	4.20(P)
	22	0.01(N)	0.02(N)	1.76(P)	2.00(P)	4.06(P)	5.98(P)	4.07(P)
12	23	0.01(N)	0.01(N)	0.03(N)	0.04(N)	0.04(N)	3.32(P)	3.31(P)
	24	0.01(N)	0.01(N)	0.40(P)	0.47(P)	0.52(P)	10.36(P)	10.36(P)
13	25	0.01(N)	0.02(N)	0.05(N)	0.05(N)	0.79(P)	6.83(P)	5.47(P)
	26	0.01(N)	0.02(N)	0.05(N)	0.05(N)	0.05(N)	10.14(P)	7.76(P)
14	27	0.01(N)	0.01(N)	0.40(P)	0.67(P)	10.36(P)	10.36(P)	10.36(P)
	28	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	6.40(P)	7.42(P)	9.46(P)	10.36(P)
15	29	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	4.44(P)	5.04(P)	5.48(P)	3.88(P)
	30	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	2.80(P)	2.84(P)	2.95(P)	3.51(P)

**Tablo 4. 9.** 30 izolatin metronidazol subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi

Hasta No	Suş No	Toksin A + B için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	ToksinA+B Ant.siz
1	1	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.02(N)	2.14(P)	2.20(P)
	2	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.02(N)	0.02(N)	1.24(P)	1.31(P)
2	3	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.03(N)	0.08(N)	6.09(P)	10.36(P)
	4	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	5.06(P)	5.54(P)	5.54(P)	7.74(P)
3	5	0.02(N)	0.04(N)	7.00(P)	7.08(P)	8.41(P)	9.94(P)	9.94(P)
	6	0.01(N)	0.02(N)	3.00(P)	3.05(P)	4.36(P)	5.11(P)	5.77(P)
4	7	0.02(N)	0.04(N)	0.16(N)	7.00(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.93(P)
	8	1.00(P)	8.04(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)
5	9	0.01(N)	0.02(N)	0.06(N)	8.09(P)	8.09(P)	8.10(P)	9.78(P)
	10	1.03(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.93(P)	9.94(P)	9.94(P)
6	11	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	1.14(P)	1.14(P)	1.15(P)	9.94(P)
	12	0.01(N)	0.01(N)	0.20(N)	0.21(N)	8.10(P)	9.94(P)	9.94(P)
7	13	0.01(N)	0.01(N)	1.00(P)	1.07(P)	1.16(P)	1.13(P)	7.70(P)
	14	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	8.26(P)	9.99(P)	10.36(P)
8	15	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.11(N)	9.94(P)	7.74(P)
	16	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.15(N)	6.07(P)	6.83(P)	9.73(P)
9	17	0.01(N)	0.01(N)	0.20(N)	0.20(N)	0.20(N)	4.97(P)	6.19(P)
	18	0.02(N)	0.04(N)	0.08(N)	0.09(N)	0.09(N)	8.04(P)	10.36(P)
10	19	0.02(N)	0.04(N)	0.05(N)	1.59(P)	1.60(P)	1.64(P)	10.36(P)
	20	0.01(N)	0.01(N)	0.19(N)	0.16(N)	7.09(P)	10.36(P)	10.36(P)
11	21	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.04(N)	4.66(P)	4.20(P)
	22	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.06(N)	2.92(P)	4.07(P)
12	23	0.01(N)	0.03(N)	0.04(N)	0.04(N)	5.38(P)	5.40(P)	3.31(P)
	24	0.02(N)	0.04(N)	0.48(P)	0.51(P)	0.60(P)	10.36(P)	10.36(P)
13	25	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	0.05(N)	0.05(N)	0.20(N)	5.47(P)
	26	0.02(N)	0.04(N)	0.05(N)	0.05(N)	0.05(N)	0.15(N)	7.76(P)
14	27	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.20(N)	0.20(N)	10.36(P)	10.36(P)
	28	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.06(N)	0.09(N)	10.36(P)	10.36(P)
15	29	0.02(N)	0.04(N)	4.26(P)	5.89(P)	5.90(P)	5.98(P)	3.88(P)
	30	0.02(N)	0.04(N)	0.05(N)	0.05(N)	2.93(P)	3.76(P)	3.51(P)

**Tablo 4. 10.** 30 izolatin meropenem subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi

Hasta No	Suş No	Toksın A + B için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	ToksınA+B Ant.siz
1	1	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	1.51(P)	2.09(P)	2.20(P)
	2	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	1.78(P)	1.31(P)
2	3	0.02(N)	0.04(N)	5.03(P)	5.50(P)	5.58(P)	10.36(P)	10.36(P)
	4	0.02(N)	0.04(N)	3.60(P)	3.66(P)	4.45(P)	5.90(P)	7.74(P)
3	5	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	7.00(P)	9.93(P)	9.93(P)	9.94(P)
	6	0.02(N)	0.04(N)	2.00(P)	2.6(P)	2.92(P)	3.37(P)	5.77(P)
4	7	1.00(P)	1.18(P)	2.18(P)	5.82(P)	8.12(P)	8.37(P)	9.93(P)
	8	0.50(P)	0.60(P)	0.65(P)	0.69(P)	7.03(P)	9.94(P)	9.94(P)
5	9	0.04(N)	0.05(N)	3.92(P)	5.18(P)	7.81(P)	9.94(P)	9.78(P)
	10	0.01(N)	0.02(N)	2.08(P)	3.38(P)	9.94(P)	9.94(P)	9.94(P)
6	11	0.04(N)	0.04(N)	1.22(P)	7.25(P)	7.44(P)	7.49(P)	9.94(P)
	12	0.01(N)	0.02(N)	5.04(P)	5.04(P)	5.76(P)	8.15(P)	9.94(P)
7	13	0.02(N)	0.04(N)	1.00(P)	1.09(P)	1.09(P)	1.10(P)	7.70(P)
	14	0.01(N)	0.02(N)	0.30(N)	0.35(N)	0.35(N)	7.23(P)	10.36(P)
8	15	0.01(N)	0.01(N)	4.00(P)	4.34(P)	5.59(P)	5.99(P)	7.74(P)
	16	0.01(N)	0.01(N)	4.90(P)	5.00(P)	5.57(P)	6.31(P)	9.73(P)
9	17	0.01(N)	0.01(N)	0.20(N)	0.25(N)	0.25(N)	3.14(P)	6.19(P)
	18	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.02(N)	0.09(N)	4.83(P)	10.36(P)
10	19	0.04(N)	0.06(N)	1.45(P)	1.46(P)	1.64(P)	1.68(P)	10.36(P)
	20	0.01(N)	0.01(N)	0.20(N)	0.20(N)	0.21(N)	10.36(P)	10.36(P)
11	21	0.01(N)	0.01(N)	2.30(P)	3.30(P)	4.30(P)	4.46(P)	4.20(P)
	22	0.01(N)	0.01(N)	2.00(P)	2.02(P)	2.34(P)	2.74(P)	4.07(P)
12	23	0.01(N)	0.01(N)	0.09(N)	0.09(N)	0.09(N)	2.53(P)	3.31(P)
	24	0.02(N)	0.04(N)	3.20(P)	3.30(P)	3.49(P)	5.06(P)	10.36(P)
13	25	0.02(N)	0.04(N)	5.05(P)	5.86(P)	6.12(P)	6.67(P)	5.47(P)
	26	0.01(N)	0.02(N)	1.68(P)	5.70(P)	6.42(P)	7.01(P)	7.76(P)
14	27	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	1.79(P)	5.49(P)	7.73(P)	10.36(P)
	28	0.01(N)	0.02(N)	0.04(N)	2.45(P)	6.67(P)	10.36(P)	10.36(P)
15	29	0.02(N)	0.04(N)	0.06(N)	2.36(P)	7.14(P)	7.15(P)	3.88(P)
	30	0.02(N)	0.04(N)	0.07(N)	1.81(P)	2.66(P)	2.81(P)	3.51(P)

**Tablo 4. 11.** 30 izolatin seftriakson subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi

Hasta No	Suş No	Toksin A + B için hesaplanan değer-sonuç						
		MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	ToksinA+B Ant.siz
1	1	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.04	2.30(P)	2.39(P)	2.20(P)
	2	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	1.40(P)	1.43(P)	1.45(P)	1.31(P)
2	3	0.04(N)	0.05(N)	1.49(P)	6.90(P)	6.92(P)	9.11(P)	10.36(P)
	4	1.00(P)	5.04(P)	6.14(P)	6.20(P)	6.23(P)	6.25(P)	7.74(P)
3	5	0.02(N)	0.04(N)	0.10(N)	0.10(N)	7.69(P)	8.14(P)	9.94(P)
	6	0.02(N)	0.04(N)	0.08(N)	4.44(P)	4.60(P)	4.64(P)	5.77(P)
4	7	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.02(N)	0.15(N)	8.10(P)	9.93(P)
	8	0.02(N)	0.04(N)	4.00(P)	5.00(P)	7.01(P)	7.01(P)	9.94(P)
5	9	0.04(N)	0.08(N)	0.09(N)	7.23(P)	8.05(P)	9.85(P)	9.78(P)
	10	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.40(P)	0.46(P)	0.47(P)	9.94(P)
6	11	0.01(N)	0.02(N)	1.01(P)	1.06(P)	1.20(P)	9.94(P)	9.94(P)
	12	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	1.00(P)	1.10(P)	1.14(P)	9.94(P)
7	13	1.00(P)	1.17(P)	1.20(P)	1.25(P)	7.80(P)	9.64(P)	7.70(P)
	14	0.01(N)	0.20(N)	7.00(P)	7.46(P)	7.83(P)	8.00(P)	10.36(P)
8	15	0.01(N)	0.01(N)	2.75(P)	10.0(P)	10.30(P)	10.31(P)	7.74(P)
	16	0.01(N)	0.01(N)	5.00(P)	5.71(P)	6.21(P)	6.87(P)	9.73(P)
9	17	0.01(N)	0.19(N)	0.20(N)	0.20(N)	8.18(P)	8.89(P)	6.19(P)
	18	0.01(N)	0.10(N)	4.08(P)	4.43(P)	9.23(P)	9.28(P)	10.36(P)
10	19	0.02(N)	0.04(N)	1.61(P)	1.63(P)	7.50(P)	7.74(P)	10.36(P)
	20	0.01(N)	0.01(N)	0.18(N)	0.20(N)	0.20(N)	9.99(P)	10.36(P)
11	21	0.02(N)	0.04(N)	3.00(P)	3.02(P)	4.55(P)	4.60(P)	4.20(P)
	22	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	0.02(N)	0.06(N)	3.76(P)	4.07(P)
12	23	0.01(N)	0.02(N)	0.03(N)	3.08(P)	4.00(P)	4.25(P)	3.31(P)
	24	0.01(N)	0.02(N)	7.00(P)	7.30(P)	7.36(P)	8.01(P)	10.36(P)
13	25	0.02(N)	0.04(N)	0.05(N)	7.05(P)	7.36(P)	7.71(P)	5.47(P)
	26	0.02(N)	0.04(N)	6.05(P)	6.61(P)	7.54(P)	8.23(P)	7.76(P)
14	27	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	8.20(P)	8.87(P)	8.90(P)	10.36(P)
	28	0.01(N)	0.01(N)	0.01(N)	8.14(P)	10.34(P)	10.36(P)	10.36(P)
15	29	0.02(N)	0.05(N)	0.09(N)	1.09(P)	1.81(P)	8.25(P)	3.88(P)
	30	0.01(N)	0.02(N)	0.05(N)	2.04(P)	2.85(P)	2.89(P)	3.51(P)

**Tablo 4. 12.** *C. difficile* izolatın (n: 30), antibiyotiklerin subMİK değerlerinde toksin A + B üretimi sayı ve yüzdeleri

	MİK/64 n (%)	MİK/32 n (%)	MİK/16 n (%)	MİK/8 n (%)	MİK/4 n (%)	MİK/2 n (%)
Vankomisin	30 (100)	26(87)	23 (77)	17 (57)	2 (6)	1 (3)
Metronidazol	28 (93)	18 (60)	12 (40)	7 (23)	2 (6)	2 (6)
Meropenem	30 (100)	24(80)	23 (77)	18 (60)	2 (6)	2 (6)
Seftriakson	30(100)	27 (90)	24 (80)	13 (43)	2 (6)	2 (6)

Antibiyotiklerin (1/2-1/64) subMİK değerlerinde, toksin A + B'nin antibiyotik etkisi olmaksızın saptanan floresan ışımaya değeri açısından %25 ve üzerinde artış olup olmadığı araştırıldığında, (1/2-1/8) subMİK değerlerinde hiç artış olmadığı, vankomisin (1/32-1/64) subMİK değerlerinde toksin A + B üretiminde sadece 4 kökende (%13) artış olduğu, metronidazol (1/16-1/64) subMİK değerlerinde 3 kökende (%10), meropenem (1/32) subMİK değerinde 1 kökende (%3) artış saptanırken, seftriakson (1/16-1/64) subMİK değerlerinde 6 kökende (%20) artış gözlenmiştir (Tablo 4.13).

**Tablo 4. 13.** *C. difficile* kökenlerinin , toksin A + B üretimine antibiyotiklerin subMİK değerlerinin etkisi

Antibiyotikler	MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64	Toplam sayı (%)*
Vankomisin	---	---	---	---	1	3	4 (13)
Metronidazol	---	---	---	1	1	1	3 (10)
Meropenem	---	---	---	---	1	---	1 (3)
Seftriakson	---	---	---	2	1	3	6(20)

\* Antibiyotiksiz ortamda saptanan floresan ışımaya değerlerinde  $\geq$  %25 artış olan köken sayısı

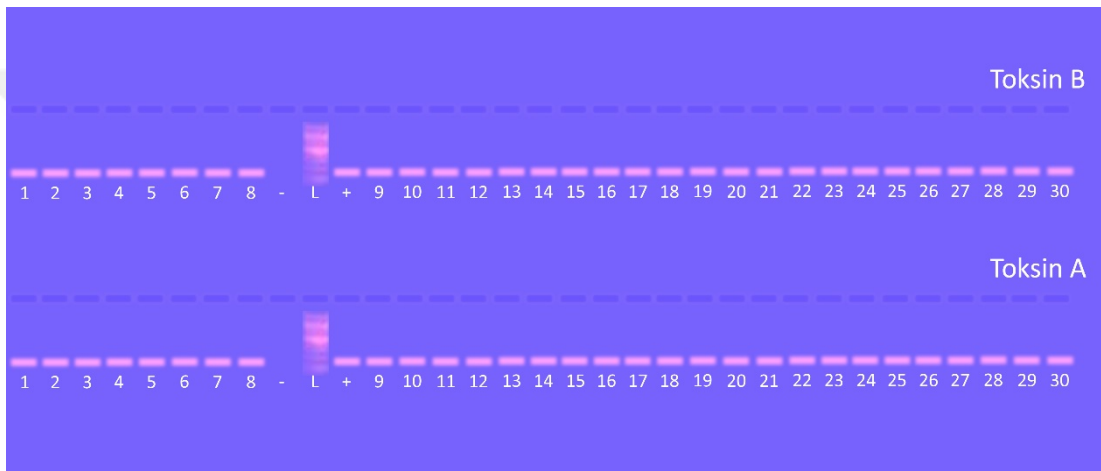
#### 4.5. *Clostridium difficile* Toksin Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile

##### Saptanması

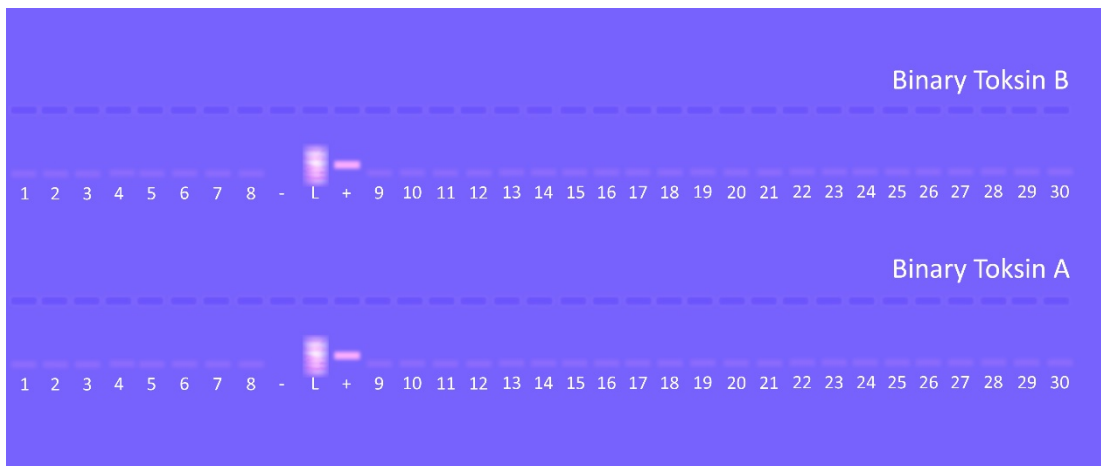
Tekrarlayan izolatlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile 30 izolatın hepsinde toksin A ve toksin B gen varlığı gösterilmiştir. Ancak, varyant (*tcd A-/tcd B+*) veya "binary toksin" geni saptanmamıştır (Tablo 4.14) (Şekil 4.3), (Şekil 4.4).

**Tablo 4. 14.** *C. difficile* izolatlarında (n: 30) PZR ile toksin genlerinin dağılımı

PZR Pozitif		Negatif	
	n (%)	n (%)	
Toksin A	30 (100)	0 (0)	
Toksin B	30 (100)	0 (0)	
"Binary" toksin A	0 (0)	30 (100)	
"Binary" toksin B	0 (0)	30 (100)	



**Şekil 4. 2.** Toksin A ve toksin B PZR gen ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü (L: Ladder-Belirteç, +: pozitif kontrol (NCTC 11223 *C. difficile*), -: negatif kontrol)



**Şekil 4. 3.** Binary" toksin *cdt A* ve *cdt B* genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü (L: Ladder-Belirteç, +: pozitif kontrol (HU 10010 binary toksin), -: negatif kontrol)

## 5. TARTIŞMA

*Clostridium difficile* enfeksiyonu (CDE), yaşamı tehdit eden bir enfeksiyondur. Tüm dünyada *C. difficile* enfeksiyonlarının hem sıklığı hem de şiddeti giderek artmaktadır. Enfeksiyon gelişiminde ileri yaş, hastanede yatış süresi ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. *C. difficile* ABD’de 65 yaş üzerindeki kişilerde 18. ölüm nedenidir (63). Klinisyenlerin bu risk faktörlerini göz önünde bulundurarak hastalarını değerlendirmeleri önemlidir. Morbidite ve mortalitede artıştan sorumlu *C. difficile*’nin hipervirülan varyantları Kuzey Amerika ve Avrupa’da salgınlara neden olmuştur. Enfeksiyondan korunmak için en önemli yol uygun olmayan antimikrobiyal kullanımından kaçınmaktır. Antimikrobiyallerin endike olduğu durumda en dar spektrumlu ilaç kısa süre kullanılmalıdır. İntravenöz ve oral antimikrobiyal kullanım süresinin sınırlanmasının *C. difficile* insidansını azalttığı görülmüştür (64). Herhangi bir antimikrobiyal, *C. difficile* enfeksiyonunu tetikleyebilir, ancak sefalosporinler, klindamisin ve florokinolonlar enfeksiyon gelişiminde özellikle önem taşırlar. *C. difficile* tedavisinde kullanılan vankomisin ve metronidazolun dahi enfeksiyonu tetikliyor olması ilginçtir. Antibiyotik ve proton pompa inhibitörlerinin birlikte kullanımı CDE yönünden en yüksek riski oluşturur (65-67). Bununla birlikte, normal barsak florasını bozan bazı kanser kemoterapileri, sistemik antifungaller, immünosüpresanlar ve nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlara bağlı olarak *C. difficile* enfeksiyonu gelişebilir (68).

Son yıllarda toplum kaynaklı CDE’da artış kaydedilmiştir. ABD’de her yıl 100.000 kişide 6.9 ile 46 arasında değişen toplum kökenli CDE görülmektedir (26). Vankomisin ve metronidazol ile tedaviden sonra birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların görülmesi tekrarlayan (rekürent) CDE olarak adlandırılmaktadır. Tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonlarında etken aynı izolat olduğu gibi farklı izolat da olabilmektedir ve CDE geçirmiş hastaların yaklaşık %20-30’unda enfeksiyon tekrarlayabilmektedir (50). Bu çalışma sırasında hastanemiz için yaptığımız irdilemede tekrarlayan enfeksiyon oranının %3 gibi düşük değerlerde olduğu saptanmıştır (Yayınlanmamış veri). Rep-PCR (DiversiLab, bioMérieux, Fransa) yöntemi ile bu kökenlerin benzer ya da farklı olup olmadıklarını araştırdığımız bu çalışmada kökenlerin %73’ünün benzer olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.1)

Bunun yanısıra kökenlerin ilişkilerini belirleyen Şekil 4.1'e baktığımızda 4 ve 7 no'lu izolatlar farklı hastalar (2 ve 4 no'lu hastalar) olmasına rağmen ayırt edilemeyecek kadar benzer izolatlardır. Benzer durum 9 ve 10 no'lu hastalar için de geçerli olup 9 no'lu hastanın 18 no'lu izolatu ile 10 no'lu hastanın tekrarlayan iki izolatu (19 ve 20 no'lu izolatlar) epidemiyolojik olarak ayırt edilemeyecek kadar benzer bulunmuştur. Bu bulgular, hastanemizde kökenlerin uzun süre hastane ortamında kalabildiklerini, dekontaminasyon işlemlerine direnç göstererek çapraz enfeksiyonla diğer hastalara geçebildiğini vurgular niteliktedir. Çünkü 9 ve 10 no'lu hastalar 2015 yılının aynı ayında hastane ortamında yakın ilişki saptadığımız hastalar iken 4 no'lu hasta 2012 yılında hastanede yatmış iken, 2 no'lu hasta 2014 yılında hastane ortamında bulunmuştur. Tekrarlayan izolatlarda antibiyotiklerin MİK değerlerinde artış, antibiyotik etkisi altında biyofilm ve toksin A + B üretimlerindeki artışı araştırmak üzere *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan vankomisin ve metronidazolün yanısıra yatan hastaların tedavisinde sıklıkla kullanılan seftriakson ve meropenemi çalışmamızda kullandık. Tekrarlayan izolatlarda antibiyotiklerin MİK değerlerinde artışı sadece 2 hastada seftriakson için gözlemledik; 5 ve 6 no'lu hastaların birinci ve ikinci gelişlerindeki kökenlerde seftriakson için MİK değerlerinde iki kat artış saptanarak kökenler ilk gelişlerinde duyarlı iken ikinci gelişlerinde dirençli hale gelmişlerdir. Bu durum test edilen diğer antibiyotikler için gözlenmemiştir. Seftriakson için dirençli hale gelen kökenlerin üretildiği hastalardan sadece 6 no'lu hastanın ilk gelişinde seftriakson kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır. Elde ettiğimiz bu veri az sayıda hasta ile sınırlı olduğundan bu verinin irdelenebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Biyofilmlerin ana görevi, antibiyotik gibi olumsuz koşullardan bakteriyi korumaktır; planktonik bakteri ile kıyaslandığında biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere 10-1000 kat daha dirençlidir. Bu da enfeksiyonların inatçı olmasına ya da tekrarlamasına neden olmaktadır. Ayrıca düşük konsantrasyondaki antibiyotik varlığında *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerin ortamda düşük düzey antibiyotiklerin bulunmasını bir stres faktörü olarak algılayıp savunma mekanizması olarak biyofilm ürettiklerine dair çalışmalara literatürde rastlanmakla birlikte benzer ilişkinin *C. difficile* için gösterildiği sınırlı sayıda yayın vardır. Vankomisinin subMİK konsantrasyonlarında biyofilm

üretimini arttığını gözlemleyen Dapa ve arkadaşları *C. difficile*'e bağlı tekrarlayan enfeksiyonlardan sadece bakterinin dış ortamlara dayanıklı spor formunun sorumlu olmadığını in vivo ortamda biyofilmlerin sürekli bulunmasının katkısı olabileceğini ifade etmişlerdir (69). Çalışmamızda bu etkiyi araştırmak üzere sadece vankomisini değil metronidazol ve hastanelerde sıklıkla kullanılan meropenemin subMİK konsantrasyonlarında biyofilm oluşumuna katkılarını antibiyotiksiz ortama kıyasla irdelediğimizde; vankomisin ve metronidazolün çeşitli subMİK konsantrasyonlarında biyofilm üretimini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığını ( $p < 0.05$ ), meropenemin ise böyle bir etkiye sahip olmadığını gözlemledik (Tablo 4.7). Bulgularımız, özellikle *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin (vankomisin, metronidazol vb.) bu enfeksiyonların tedavisi amacıyla hastaya başlandığında tedavi sürecinde antibiyotik konsantrasyonlarının düşük olabileceği zaman dilimlerinde (örneğin tedavinin hemen başlangıcında ya da doz aralıklarının bitiminde) mikroorganizmanın biyofilm üretim mekanizmasını indükleyebileceğini düşündürmektedir. Diğer bir deyişle, bu bulgular özellikle tekrarlayan enfeksiyonlarda enfeksiyona neden olan izolatın tedavide kullanılacak antibiyotik için MİK değerlerinin saptanması ve antibiyotik dozu ve tedavi şemasının MİK değeri dikkate alınarak şekillendirilmesine özen gösterilmesi gereğini vurgulamaktadır. Çalışmamızda araştırmak istediğimiz bir diğer nokta, 15 hastadan izole ettiğimiz toksijenik (toksin A + B pozitif) 30 kökenin antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarında toksin üretim miktarlarında artış olup olmadığı idi. Literatürde bu amaçla yapılan çalışmalardan Sachdeva ve arkadaşları yaptıkları araştırmada yarısentetik thiopeptit bir antibakteriyel olan LFF571, fidaksomisin, vankomisin ve metronidazolün mevcudiyetinde toksin A, B seviyelerini ve *C. difficile*'nin üremesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bakteriyel protein sentezini inhibe eden LFF571 ve RNA sentezini inhibe eden fidaksomisinin subinhibitör konsantrasyonlarının kültür süpernatantındaki *C. difficile* toksin seviyesini azalttığını, hücre duvar sentezini inhibe eden vankomisinin ise subinhibitör konsantrasyonlarında toksin seviyesini arttırdığını göstermişler, vankomisin ile elde edilen bu sonucun hücre duvarı harabiyeti ile intrasellüler toksinlerin çevreye salınımına neden olmasına bağlamışlardır (70). Gerber ve arkadaşları ise vankomisin, klindamisin, metronidazol

ve linezolidin subMİK konsantrasyonlarının *C. difficile* üremesi ve toksin gen transkripsiyonu üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, *C. difficile*'nin antibiyotiksiz ortama kıyasla antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarında strese girdiklerini ve yanıt olarak birçok genin aktivasyonunun toksin üretimini etkilediğini iddia etmişlerdir (71). Çalışmamızda, antibiyotiklerin (1/2-1/64) subMİK değerlerinde, antibiyotiksiz ortama göre toksin A + B değerleri karşılaştırıldığında, %25 ve üzerinde artış, 1/16-1/64 subMİK değerlerinde kökenlerin en fazla %20'sinde gözlenmiştir. Nitekim Drummond ve arkadaşları, biri standart köken olmak üzere toplam üç *C. difficile* kökeni ile yaptıkları çalışmada metronidazol, amoksisilin ve klindamisin subMİK konsantrasyonlarında toksin A + B üretiminin antibiyotiksiz ortama kıyasla üremenin daha erken fazında gerçekleştiğini bu etkinin vankomisin ile nadiren ortaya çıktığını belirterek bu etkileşimin çok kompleks, suşa bağlı bir ilişki olduğu fikrine vardıklarını söylemişlerdir (72).

*C. difficile* enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olmakla birlikte hipervirulan suş olan ribotip 027, toksin A ve B'ye ek olarak "binary toksin" üretmekte ve bu kökenlerin patogenezdeki rolü bilinmemekle birlikte hastalığın şiddetini arttırdığı düşünülmektedir. Bu hipervirulan kökenler, ABD ve Kanada'da ciddi salgınlara neden olurken Avrupa'da bu kökenlerin prevalansı %5-6 civarındadır (22). İzolatlarımızdaki toksin A, toksin B ve "binary toksin" varlığını ve "binary toksin" in tekrarlayan enfeksiyonlarda olası yerini araştırdığımız çalışmamızda izolatların tamamının toksin A + B genlerine sahip olduğu ama hiçbirinde "binary toksin" geni olmadığı saptanmıştır. Görece az sayıdaki hastanın hiçbirinde bu genin bulunmamış olması "binary toksinin" tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmadığını iddia etmek için yeterli gibi görünmemektedir. Bunun için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm dünyada *C. difficile* enfeksiyonları giderek artmaktadır. Spesifik antibiyotik tedavisine rağmen vakaların %20-30'unda tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir. İleri yaş, hastanede yatış süresi ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır.

Çalışmamızda, biyofilm üretimi açısından vankomisin ve metronidazolün subinhibitör konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir. Toksin A + B üretimi, 1/2 ve 1/4 subMİK değerlerde hastaların %6'sında devam etmektedir. Bu da antibiyotiklere dirence ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Enfeksiyondan korunmak için uygun olmayan antimikrobiyal kullanımından kaçınılmalıdır.

*C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan vankomisin, metronidazol gibi antibiyotiklerin tedavi sürecinde antibiyotik konsantrasyonlarının düşük olabileceği zaman dilimlerinde (örneğin tedavinin hemen başlangıcında ya da doz aralıklarının bitiminde) mikroorganizmanın biyofilm üretim mekanizmasını indükleyerek direnç kazanacağı ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabileceği düşünülerek MİK değerleri saptanmalı, antibiyotik dozu ve tedavi şeması buna göre düzenlenmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Pantal on V, Soavelomandroso AP, Bouttier S, Briandet R, Roxas B, Chu M, et al. The *Clostridium difficile* protease Cwp 84 modulates both biofilm formation and cell-surface properties. *PLoS ONE*. 2015;10(4):1-20.
2. Dodson AP, Borriello SP. *Clostridium difficile* infection of the gut. *J Clin Pathol*. 1996;49(7):529-32.
3. Starr JM, Rogers TM, Impallomeni M. Hospital acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. *Lancet*. 1997;349:426-8.
4. Kelly CP, Pothoulakis C, La Mont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med*. 1994;330(4):257-62.
5. Dove CH, Wang SZ, Price SB, Phelps CJ, Lyerly DM, Wilkins TD, et al. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect Immun*. 1990;58(2):480-8.
6. Barc MC, Depitre C, Corthier G, Collignon A, Su WJ, Bourlioux P. Effects of antibiotics and other drugs on toxin production in *Clostridium difficile* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(6):1332-5.
7. Dupuy B, Sonenshein AL. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol*. 1998;27(1):107-120.
8. Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by aminoasids. *Microbiol*. 1999;145:1683-93.
9. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, Crook DW, Gorbach SL. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection fidaxomicin versus vancomycin. *Clin Infect*. 2012;55(2):154-61.
10. Rupnik M, Wilcox MH, Carding DN. *Clostridium difficile* infection new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;526-36.
11. Mc Donald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2005;353:2433-41.
12. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Branier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005;366(9491):1079- 84.
13. Lessa FC, Gould CV, McDonald LC. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2012;55(2): 565-70.

14. Kutty PK, Woods CW, Sena AC, Benoit SR, Naggie S, Frederick J, et al. Risk factors for and estimated incidence of community associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:197-204.
15. Bauer MP, Kuijper EJ, Van Diesel JT. Treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:1067-79.
16. Sachdeva M, Leeds JA. Subinhibitory concentrations of LFF571 reduce toxin production by *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:1252-7.
17. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficile*. *Am J Dis Child*. 1935;49:390-402.
18. Bartlett JG, Chang TEW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing clostridia. *N Eng J Med*. 1978;298:531-4.
19. Pépin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*. 2005;173(9):1037-42.
20. Pépin J, Valiquette L. *Clostridium difficile*-associated disease in a region of Quebec from 1991 to 2003; a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004;171(5):466-72.
21. Gravel D, Miller M, Simon A. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care-associated *Clostridium difficile* Infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):568-76.
22. ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* Infection in Europe. A hospital-based Survey. *Lancet*. 2011;377(9759):63-73.
23. Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *Lancet*. 2008;371:1486-8.
24. Leclair MA, Allard C, Lesur O, Pépin J. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2010;25(1):23-30.
25. Thielman NM, Wilson KH. Antibiotic-associated colitis. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5. ed, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000;1111-26.
26. O'Donoghue C, Kyne L. Update *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27(1):38-47.

- 27.** Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*. 2015;37:13-24.
- 28.** Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Clostridium*, *Medical Microbiology*, 7. ed, Elsevier Saunders, 2013;335-7.
- 29.** 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.
- 30.** Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile* implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:501-52
- 31.** Stevens D, Bryant AE, Carroll K. *Clostridium*, *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. ASM Press, Washington DC, 2015;940-66.
- 32.** Poxton I, McMoubrey J, Blair G. The Pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:421-7.
- 33.** O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic B1/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*. 2009;136:1913-24.
- 34.** Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun*. 2011;79:562-70.
- 35.** Peltier J, Countin P, Meouche EI, Lemee L, Chapot MP, Pons JI. *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *J Biol Chem* 2011;286:29053-62.
- 36.** Ho TD, Williams KB, Chen Y, Helm RF, Popham DL, Ellermeier CD. *Clostridium difficile* extracytoplasmic function alpha-factor alpha V regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect Immun*. 2014;82:2345-55.
- 37.** Mc Quade R, Roxas B, Viswanathan VK, Vudentam G. *Clostridium difficile* clinical isolates exhibit variable susceptibility and proteome alterations upon exposure to mammalian cationic antimicrobial peptides. *Anaerobe*. 2012;18:614-20.
- 38.** Furci L, Balden R, Bianchini V, Trovato A, Ossi C, Cichero P, Cirillo DM. New role for human alpha defensin 5 in the fight against hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *Infect Immun*. 2015;83:986-95.
- 39.** Revilla A, Gebhard S, Mascher T, Zuriga M. Defence against antimicrobial peptides: different strategies in Firmicutes. *Environ Microbiol*. 2014;16:1225-37.

40. Mc Bride SM, Sonenshein AI. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology*. 2011; 157:1457-65.
41. Mc Bride SM, Sonenshein AI. Identification of a genetic locus responsible for antimicrobial peptide resistance in *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. 2011;79:167-76.
42. Dawson LF, Valiente E, Faulds A, Donahue EH, Wren BW. Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for SpoOA. *PLoS One*. 2012;(7):50527.
43. Semenyuk EG, Laning ML, Foley J, Johnston PF, Knigh KL, Gerding DN, et al. Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One*. 2014;(9):87757.
44. Soutourina OA, Monot M, Boudry P, Saujet L, Pichon C, Sismeiro O. Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*. 2013;(9):1003493.
45. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N. Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect Immun*. 2009;77:3661-9.
46. Buckley A, Spencer J, Jukes C, Candlish D, Irvine J, Douce G. Biofilm formation in *Clostridium difficile*. P84,5t International *Clostridium difficile* Symposium. Bled, Slovenia. 2015;19-21.
47. Soavelomandroso AP, Bouttier S, Hoys S, Candela T, Janoir C. Spatial organization of tissue-associated bacteria in a *Clostridium difficile* monoxenic Mouse model. P95,5th International *Clostridium difficile* Symposium. Bled, Slovenia. 2015;19-21 .
48. Crowther GS, Chilton CH, Todhunter SL, Nicholson S, Freeman J, Baines SD, et al. Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:2137-47.
49. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments and outcomes. *J Infect*. 2009;58(6):403-10.
50. Mc Collum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):581-92.
51. Geroling DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME. *Clostridium difficile* associated diarrhoea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16(8):459-77.

52. Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. *Anaerobe*. 2011;17(4):170-4.
53. Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res*. 2010;131:487-99.
54. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *Clostridium difficile tcd B* and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3211-17.
55. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Colitis. Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010;1375-87.
56. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1048-57.
57. Yücesoy M, Mc Coubrey J, Brown R, Poxton RI. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. *Clin Microbiol Infect*. 2007;8:413-18.
58. Badger VO, Ledebor PA, Graham MB. *Clostridium difficile* epidemiology, pathogenesis, management and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. *J Parenter Enteral Nutr*. 2012;0148607112446703.
59. Du Pont HL, Garey K, Caeiro JP, Jiang ZD. New advances in *Clostridium difficile* infection: changing epidemiology, diagnosis, treatment and control. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:500-7.
60. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis*. 2007;45:302-7.
61. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada and the U.S.A.: a double blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2012;12:281-9.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard, 7<sup>th</sup> ed.* 2007;M11-A7. CLSI, Wayne, PA.

63. Murphy SL, Xu JQ, Kochanek KD. Deaths: National vital statistics reports. 2010;60 (4) .
64. Valiquette L, Cossette B, Garant MP, Diab H, Pépin J. Impact of reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile* associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. Clin Infect Dis. 2007;45(2):112-21.
65. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2012;107:1011-19.
66. Janarthanan S, Dilah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. *Clostridium difficile* associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2012;107:1001-10.
67. Molloy D, Molloy A, O'Loughlin C, Falconer M, Hennessy M. Inappropriate use of proton pump inhibitors. Ir J Med Sci. 2010;179:73-5.
68. Suissa D, Delaney JA, Dial S, Brassard P. Non steroidal anti-inflammatory drugs and risk of *Clostridium difficile* associated disease. Br J Clin Pharmacol. 2012;74:370-5.
69. Dapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, et al. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. Journal of Bacteriology. 2013;195(3):545-55.
70. Sachdeva M, Leeds JA. Subinhibitory concentrations of LFF571 reduce toxin production by *Clostridium difficile*. Actimicrob Agents Chemother. 2015;59(2):1252-7.
71. Gerber M, Walch C, Löffler B, Tischendorf K, Reischl U, Ackermann G. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. 2008;57:776-83.
72. Drummond LJ, Smith DGE, Poxton IR. Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. 2003;52:1033-8.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 1982 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1986 yılında Mikrobiyoloji Uzmanı oldum. Aynı yıl doktora programına başladım. 1988 yılında eşimin Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesine atanması nedeniyle doktoramı yarıda bıraktım ve Gaziantep Av. Cengiz Gökçek Devlet Hastanesi ve Çocuk Hastanesi'nde Mikrobiyoloji Uzmanı olarak çalışmaya başladım. 2009-2010 yılında İstanbul'a dönerek International Hospital'da Mikrobiyoloji Bölümü sorumlusu olarak çalışmaya başladım. 2010 yılında Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Mikrobiyoloji Uzmanı olarak göreve başladım ve halen çalışmaktayım. 2013 yılında afaan yararlanarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora Programına başladım. Evli ve iki çocuk annesiyim.

