



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

*Clostridium difficile* TOKSİN A GENİNİN  
KLONLANMASI

Dr. Nilgöl UZUN  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

AYDIN-2015

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

*Clostridium difficile* TOKSİN A GENİNİN  
KLONLANMASI

Dr. Nilgöl UZUN  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

AYDIN-2015

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TPF-14035 numaralı proje olarak desteklenmiştir

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık eğitim sürecimde bilgi ve deneyimini paylaşan tez danışmanım Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Neriman AYDIN başta olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği olan hocalarım Doç. Dr. Sevin KIRDAR, Doç. Dr. Berna KORKMAZGİL, Doç. Dr. Murat TELLİ'ye teşekkür ederim.

Aynı zamanda çalışma arkadaşlarım ve aileme de teşekkürler...

Dr. Nilgöl UZUN

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	6
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ .....	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Toksinler.....	2
2.2. <i>Clostridium</i> Türleri.....	6
2.3. <i>Clostridium difficile</i> .....	7
2.3.1. Mikrobiyolojik Özellikler.....	7
2.3.2. Epidemiyoloji .....	8
2.3.3. Patogenez.....	11
2.3.4. Klinik.....	18
2.3.4.a. Asemptomatik Taşıyıcılık.....	18
2.3.4.b. <i>Clostridium difficile</i> İshali .....	19
2.3.4.c. <i>Clostridium difficile</i> Koliti.....	19
2.3.4.d. Psödomembranöz Enterokolit .....	19
2.3.4.e. Fulminan Kolit.....	20
2.3.5.Tanı.....	20
2.3.5.a. Kültür .....	21
2.3.5.b. Doku Kültürü Sitotoksin Testi.....	21
2.3.5.c. Enzim İmmunoassay .....	22
2.3.5.d. Lateks Aglütinasyon Testleri.....	22
2.3.5.e. Moleküler Yöntemler.....	23
2.3.5.f. Kolonoskopi .....	23

2.3.6. Tedavi .....	23
2.3.7. Relaps .....	25
2.3.8. Korunma .....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	26
3.1. Gereçler .....	26
3.1.1.Çalışma Örneği .....	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri .....	26
3.2. Yöntemler .....	28
3.2.1. <i>Clostridium difficile</i> Suşunun Canlandırılması .....	28
3.2.2. Total DNA Ekstraksiyonu .....	29
3.2.3. <i>TcdA</i> geninin PCR ile Çoğaltılması.....	30
3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektforezi .....	30
3.2.5. pUC19 İçeren <i>E. coli</i> DH10B Suşundan Plazmid Ekstraksiyonu.....	31
3.2.6. PCR İle Çoğaltılan <i>TcdA</i> geni Amplikonlarının ve pUC19 Vektörünün Restriksiyonu .....	31
3.2.7. Restriksiyon Ürünlerinin Presipitasyonu.....	32
3.2.8. Restriksiyon Ürünlerinin Ligasyonu .....	32
3.2.9 Elektrokompentan <i>E. coli</i> DH10B Hücreslerinin Hazırlanması.....	32
3.2.10. Ampisilin-Xgal-IPTG Seçici Besiyerinin Hazırlanması .....	33
3.2.11. Elektrotransformasyon .....	33
3.2.12. Plakların İncelenmesi .....	33
3.2.13. Amplikonun Restriksiyon İle Doğrulanması.....	34
4. BULGULAR .....	35
4.1. <i>TcdA</i> Geninin Çoğaltılması .....	35
4.2. <i>TcdA</i> genini İçeren Amplikonun EcoRI Enzimi ile Kesilerek Doğrulanması.....	35

4.3. PCR İle Çoğaltılan <i>Tcda</i> Geni Amplikonu ve pUC19 Plazmidinin BamHI Enzimi İle Restriksiyonu.....	36
4.4. Plakların İncelenmesi .....	37
4.5. Seçilen Kolonilerden Ekstrakte Edilen Plazmidlerin Elektrofrezisi .....	37
4.6. En Büyük Plazmid Olan 9 Nolu Plazmiddeki İnsertinin Görüntülenmesi .....	38
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	41
ÖZET.....	42
ABSTRACT .....	43
KAYNAKLAR.....	44

## TABLolar DİZİNİ

Tablo I. Ekzotoksin ve endotoksinlerin özellikleri .....	6
Tablo II. Klinik önemi olan anaerop bakterilerin sınıflandırılması .....	6
Tablo III. <i>C. difficile</i> enfeksiyonu ve kolonizasyonu için risk faktörleri .....	10
Tablo IV. <i>C. difficile</i> enfeksiyonuna neden olan antibiyotikler .....	11

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Difteri toksininin etki mekanizması .....	4
Şekil 2. Kolera toksininin etki mekanizması .....	5
Şekil 3. Tetanoz toksininin etki mekanizması .....	5
Şekil 4. <i>C. difficile</i> 'nin gram boyama sonrası mikroskopik görünümü .....	8
Şekil 5. Toksin A (a) ve toksin B (b)'nin yapısı.....	12
Şekil 6. <i>C. difficile</i> <i>tcdA</i> gen sekansı .....	15
Şekil 7. <i>C. difficile</i> toksinlerinin hücre içi etkisi .....	16
Şekil 8. Yetişkinlerde <i>C. difficile</i> ilişkili diyarenin patogenezi .....	17
Şekil 9. <i>C. difficile</i> 'nin <i>PaLoc</i> ve <i>CdtLoc</i> 'u .....	18
Şekil 10. Psödomembranöz enterokolitin endoskopik görünümü .....	19
Şekil 11. Anaerop inkübasyon .....	28
Şekil 12. <i>Clostridium difficile</i> 'nin %5 koyun kanlı agar'daki görünümü .....	29
Şekil 13. pUC19 plasmidinin yapısı .....	31
Şekil 14. Spesifik primerlerle <i>tcdA</i> geninin çoğaltılması. ....	35
Şekil 15. PCR ile çoğaltılan <i>tcdA</i> geninin EcoRI restriksiyonu ile doğrulanması. ....	36
Şekil 16. BamHI kesim yeri eklenmiş primerlerle çoğaltılan <i>tcdA</i> geninin (1) ve pUC19 plasmidinin (2) kesimden sonra %1'lik jelde elektroforezi. ....	36
Şekil 17. Transformasyondan sonra seçici besiyerine ekilen transformantların 24 saatlik inkübasyondan sonraki görüntüsü.. ....	37
Şekil 18. Beyaz koloniler arasından seçilenlerden yapılan plazmid ekstraksiyonu. ....	37
Şekil 19. Transformantlardan 9 numaralı olanın BamHI enzimi ile kesildikten sonra %1'lik jeldeki elektroforez sonrası görünümü. ....	38

## SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

ABİ	: Antibiyotiğe bağlı ishal
<i>C. difficile</i>	: <i>Clostridium difficile</i>
PMK	: Psödomembranöz kolit
Nİ	: Nozokomiyal ishal
<i>PaLoc</i>	: Patojenite lokusu
<i>TcdA</i> ve <i>tcdB</i> genleri	: <i>Clostridium difficile</i> toksin A ve toksin B genleri
PAMPs	: Pathogen Associated Molecular Patterns
LPS	: Lipopolisakkarit
CD14	: Cluster of differentiation 14
TLR	: Toll like reseptör
NF-kappaB	: Nuclear factor-kappaB
MHC	: Major Histocompatibility Complex
Vβ	: T hücre reseptörü beta zinciri
EF-2	: Elongasyon faktör-2
ADP	: Adenozin difosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
GABA	: Gama aminobütirik asit
CCFA	: Cycloserine-Cefoxitine-Fructose Agar
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
NAP1	: North American Pulsed-Field Type 1 suşu (Diğer adıyla ribotip 027 ve BI)
CDT	: <i>Clostridium difficile</i> transferaz (Binary toksin)
GTP	: Guanozin trifosfat
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
IL	: İnterlökin

IFN	: İnterferon
TNF	: Tmr nekroz faktör
MİP	: Makrofaj inflamatuvar protein
<i>CdtLoc</i>	: <i>Clostridium difficile</i> transferaz lokusu
EIA	: Enzim immunoassay
GDH	: Glutamat dehidrogenaz
PCR	: Polimerase Chain Reaction
LAMP	: Loop mediated izotermal amplifikasyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
BHI	: Brain Heart Infusion
rpm	: Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
XGAL	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
IPTG	: İsopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
b	: Baz ifti
kb	: Kilobaz
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İshal, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan çeşitli nedenlerle meydana gelebilen bir semptomdur. Barsak enfeksiyonlarında, enfeksiyöz olmayan barsak hastalıklarında (inflamatuvar barsak hastalıkları, malignensi vb.), sistemik bazı hastalıklarda (hipertiroidi, diyabetes mellitus vb.) görülebilir (1).

Antibiyotiğe bağlı ishal (ABİ), antibiyotik alımını takiben birkaç saatten altı-sekiz hafta sonrasına kadar geçen süre içinde gelişen ishali tanımlamaktadır(2).ABİ insidansı; kullanılan antibiyotiğe, süre ve doza bağlı olarak değişmek üzere %0, 5-39 oranındadır. Hastane dışındaki olguların büyük çoğunluğu başka nedenlere bağlı iken hastanede yatan olguların büyük çoğunluğu *Clostridium. difficile* (*C. difficile*)'ye bağlıdır (3). *C. difficile*, aynı zamanda nozokomiyal ishal (Nİ)'inde en sık nedenidir ve bu olguların yaklaşık %20'sinden sorumludur (4). ABİ'lerindeki etkenleri olarak *Salmonella* ve *Candidalar*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* bildirilmektedir. (5, 4).Antibiyotik kullanımı; florada değişiklik oluşturması ve dirençli bakterilerin seçilmesi, kolonizasyonun koruyucu etkisini ortadan kaldırması gibi etkilerinin dışında önemli oranda ishal gelişmesi riski de taşımaktadır (6). Son altı-sekiz hafta içerisinde antibiyotik kullanan kişilerde oluşabilen bu klinik tablolar, antimikrobik madde kullanımı dışı nedenlerle (normal florayı değiştiren kemoterapotikler ve diğer ilaçlar) de görülebilmektedir (7).

*C. difficile*, bağırsak florasında bulunabilen zorunlu anaerop, sporlu, gram-pozitif basil morfolojisinde bir bakteridir (3). Sadece toksin üretebilen *C. difficile* kökenleri *C.difficile* enfeksiyonuna yol açabilirler.

Klasik bilgilere göre *C. difficile* kromozomu'nun patojenite lokusunda (*PaLoc*) bulunan *tcdA*ve *tcdB* genleri tarafından kodlanan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) hastalığın patogenezinde sorumludur. Toksik C. *difficile* suşları genellikle her iki toksini birlikte üretirler. Son yıllarda toksin A ve toksin B üretiminde farklılıklar veya toksin genlerinde varyant gelişmiş kökenler (toksin A-/B+ gibi) saptanmıştır. Ayrıca, bazı ülkelerde hastane salgınlarına neden olan, toksin A ve B'den farklı binary toksin üreten kökenler bildirilmiştir (8).

Çalışmamızın amacı, *C. difficile* toksin A geninin klonlanması ile toksin A elde edilerek tanı testlerinde kullanılabilecek antijen elde edilmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Toksinler

Toksin yunanca toxikon kelimesinden gelmekte olup zehir anlamı taşımaktadır (9). Toksinler, patojeniteye önemli katkıda bulunurlar yadapatojeniteden bizzat sorumludurlar (10). Bakterileri toksinleri endotoksin ve ekzotoksin olmak üzere iki grupta toplanır (11).

#### **Endotoksinler**

Vücudun doğal (innate) immünitesi tarafından algılanan ve tanınan bakteri ürünlerine, patojen bağımlı moleküler yapılar [Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)] denir. Patojen bağımlı moleküler yapılar içerisinde en önemlisi lipopolisakkarit (LPS)'dir (12). LPS, Gram negatif bakteri dış membranının en immünostimülan parçaları arasındadır (13). LPS lipit A, kor polisakkarit ve O antijeni olmak üzere üç yapısal bölümden oluşmaktadır. Lipit A, LPS'in endotoksin aktivitesinden sorumludur (14). Gram negatif hücre duvarının bir parçası olması nedeniyle genellikle bakteri parçalandığı zaman açığa çıkar. Bazan da bakterinin vejetatif üremesi sırasında salınabilirler (10). LPS, bir akut faz proteini olan lipopolisakkarit bağlayan protein tarafından bağlanır. Bu kompleksmonosit, makrofaj ve polimorf nüveli lökosit yüzeyinde bulunan CD14 (Cluster of differentiation 14) ile etkileşime girer. (15). LPS, TLR4 (Toll like reseptör 4) üzerinden sinyal gönderir (13). TLR sitozol enzimlerini (özellikle 1 kappaB kinaz enzimi) aktive eder. Bu enzim Nuclear factor (NF)-kappaB'yi aktive eder, p50 ve p65 (NF-kappaB'nin 2 alt ünitesi) makrofajların nükleusuna geçer. Böylece sitokin sentezi için kopyalama başlamış olur (16). Güçlü inflamatuvar cevap ve septik şok oluşturabilir (13). Gram pozitif bakterilerde hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve lipoteikoik asit, inflamasyonu artırıcı özellik gösterir (17).

#### **Ekzotoksinler**

Ekzotoksin üretimi ile ilişkili genlerin çoğu plazmid, transpozon veya bakteriyofajlar üzerinde bulunur ve bu genler bakteriden bakteriye aktarılabilirler (10). Gram pozitif bakteriler sentezledikleri toksinlerini doğrudan dış ortama salırlar. Gram negatif bakteriler ise toksinlerini beş değişik sekresyon sisteminden birini kullanarak hücre dışına ulaştırırlar (9).

Ekzotoksinler vücuttaki etki bölgelerine göre üç grupta toplanırlar:

1. Enterotoksinler-*C. difficile* (toksin A), Enterotoksijenik *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*

2. Nörotoksinler-*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*

3. Sitotoksinler-*C. difficile* (toksin B), *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*  $\alpha$  toksin, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* pirojenik ekzotoksin (10).

Ekzotoksinler etki mekanizmalarına göre de üç gruba ayrılırlar:

1. Tip I toksinler (Süper antijen toksinler)

Bakteriyel ekzotoksin süperantijenler küçük moleküllerdir, sınıf II MHC (Major Histocompatibility Complex) moleküllerine yüksek afinite ile bağlanırlar ve herbiri T hücrelerini çeşitli V $\beta$  (T hücre reseptörü beta zinciri) segmentleri ile stimüle ederler. Ekzojen süperantijenler immün sistemi aşırı şekilde uyarabilirler, bazen uyarım verimsiz veya hasarlandırıcı immün cevap şeklinde de olabilir (18). *Staphylococcus aureus* toksik şok sendromu toksin 1 ve enterotoksini, *Streptococcus pyogenes* pirojenik ekzotoksin (19)

2. Tip II toksinler (Sitolitik toksinler)

Bağlandıkları konak hücrelerin plazma membranlarına etki ederek hücre zarının bütünlüğünü bozarlar.

*Streptococcus pyogenes*'in streptolizin O ve S toksini, *Escherichia coli*'nin  $\alpha$  hemolizini, *Aeromonas*'ın aerolizini gibi bazı bakteri toksinleri konak hücre membranında por oluşturarak dış ortamdan hücre içerisine su girişine ve hücrenin lizisine neden olurlar. Bu toksinlere por oluşturan toksinler denir.

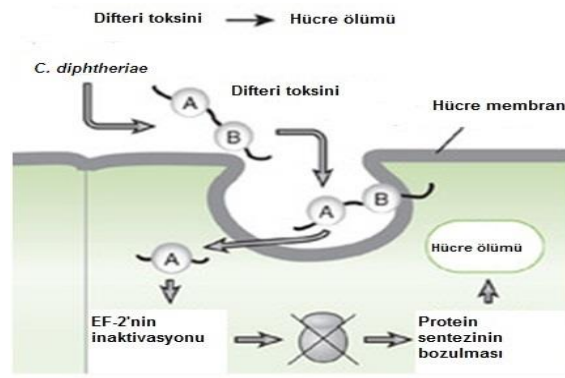
*Clostridium perfringens*'in  $\alpha$  toksini lesitinaz aktivitesi ile hücre membranındaki lesitini parçalayarak diğer bazı bakterilerdeki fosfolipaz ve sfingomyelinaz aktivitesi gösteren toksinler de hücre membranındaki lipitleri parçalayarak hücre membran stabilitesini bozarak hücre ölümüne neden olurlar (15).

3. Tip III toksinler (A-B modeli toksinler)

Genel olarak konak hücre fonksiyonlarını bozarak etki gösterirler (10). İki bileşenli yapısı olan toksin, B alt birimiyle hücre reseptörüne tutunurken A alt birimi ile biyolojik aktivite gösterir (21). A ve B alt birimleri, birbirlerine disülfid bağları ile bağlanır (11).

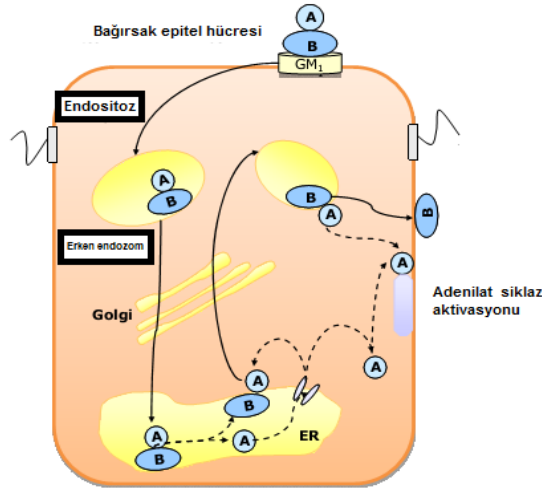
**C. difficile toksin A ve B**, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholera*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Shigella*, Enterohemorajik *Escherichia coli*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis* (10).

*Corynebacterium diphtheriae*'nın toksini EF-2 (elongasyon faktör-2) üzerine etki ederek protein sentezini bozar (9).



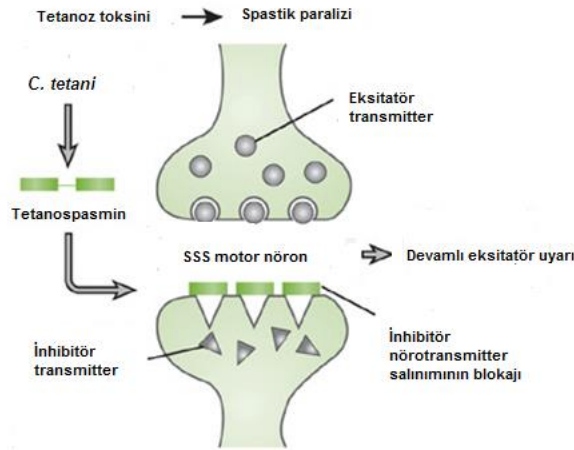
Şekil 1. Difteri toksininin etki mekanizması (22)

*Vibrio cholera* tarafından salgılanan kolera toksini Gs olarak ifade edilen proteinin adenozin difosfat (ADP) ribozilasyonuna neden olaraksiklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşur. Artan cAMP barsak lümeninde bulunan epitel hücrelerinden sodyum geri emilimini engeller ve fazla miktarda klor atılımına neden olur (9).



Şekil 2. Kolera toksininin etki mekanizması (23)

Tetanospazminin ağır kısmı olan B zinciri motor nöronlar üzerinde bulunan siyalik asit ve glikoproteinlere bağlanır. Endozomal vezikül ile içeri alınan toksin nöron aksonları ile spinal kortta bulunan motor nöronlara iletilir. Özellikle glisin ve gama aminobütirik asit (GABA) salgılayan inhibitör hücrelere dağılır. Burada endoplazmik vezikül asidifiye olur ve iki zincirin ayrılıp A zincirinin sitozole salınmasına neden olur. A zinciri çinko endopeptidaz olup glisin ve GABA salınımını sağlayan sinaptobrevin proteinini inaktive eder. Spastik paraliziler ortaya çıkar (24).



Şekil 3. Tetanoz toksininin etki mekanizması (22)

Bazı bakteri toksinlerinin A-B modeline uymadığı sadece aktif A kısımlarının olduğu görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Yersinia* türlerinin bazı toksinlerin

bakterilerin tip III sekresyon sistemleri sayesinde konak hücreye verildiği gösterilmiştir (9).

Tablo I. Ekzotoksin ve endotoksinlerin özellikleri (9, 10, 11)

Ekzotoksinler	Endotoksinler
Gram pozitif ve negatif bakteriler	Gram negatif bakteriler
Hücre dışına salınır.	Hücre duvarının parçası
Protein	LPS
Isıya duyarlı	Isıya dirençli
İyi antijen	Zayıf antijen
Spesifik reseptörlere tutunur.	Spesifik reseptörleri bulunmaz.
Ateş oluşturmaz.	Ateş oluşturur.
Toksoid hale döndürülerek aşı olarak kullanılır.	Toksoid hale dönmez.
Aşırı toksik	Toksisitesi düşük
Sıklıkla ekstrakromozomal genlerle kontrol edilir	Kromozomal genlerle kontrol edilir

## 2.2. Clostridium Türleri

*Clostridium* cinsinde anaerop veya aerotoleran, endosporoluşturan, katalaz negatif gram pozitif basiller yer alır (25).

Tablo II. Klinik önemi olan anaerop bakterilerin sınıflandırılması (26)

Gram negatif basiller	Gram negatif koklar	Gram pozitif sporlu basiller	Gram pozitif sporsuz basiller	Gram pozitif koklar
<i>Bacteroides</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<b><i>Clostridium</i></b>	<i>Actinomyces</i>	<i>Anaerococcus</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>Aneroglobus</i>		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Caprococcus</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Megasphaera</i>		<i>Eubacterium</i>	<i>Finegoldia</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Veillonella</i>		<i>Lactobacillus</i>	<i>Gallicola</i>
<i>Campylobacter</i> ( <i>Wolinella</i> )			<i>Mobiluncus</i>	<i>Gemella</i>
<i>Capnocytophaga</i>			<i>Propionibacterium</i>	<i>Micromonas</i>
<i>Leptotrichia</i>				<i>Peptococcus</i>
<i>Selenomonas</i>				<i>Peptoniphilus</i>
				Peptostreptococcus
				Ruminococcus

*Clostridium*'lar doğada (toprak, tatlı su kaynakları ve denizlerin dibinde) bol miktarda bulunan, çoğu mezofilik, bazıları termofilik olabilen mikroorganizmalardır (1). Önemli klostridyumlar *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. septicum*, *C. sordellii* ve *C. tertium*'dur (27).

*Clostridium*'larda guanin ve sitozin miktarı oldukça değişkendir (%22-55 mol); ancak toksijenik türlerde guanin ve sitozin miktarı birbirleriyle benzerlik göstermektedir (%24-29 mol). Bu cins endospor varlığı, çok sıkı olan anaerobik metabolizması, sülfatı sülfite dönüştürme yeteneği ve gram pozitif hücre duvar yapısına sahip olması ile tanımlanmaktadır (1, 27).

*Clostridium* türleri oval veya yuvarlak sporlara sahip olup sporlar santral, terminal veya subterminal yerleşim gösterebilir. Spor genellikle bakteriden daha geniş yapıda olup bakterinin yapısını bozar. Patojen *Clostridium* türleri 37°C'de ürerler. Anaerob şartlarda ve kan içeren anaerob besiyerlerinde kolaylıkla ürerler (24).

### **2.3. *Clostridium Difficile***

*Clostridium difficile*, ilk defa 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından, yenidoğanların dışkılarından izole edilmiştir. Kültür ve izolasyonun zor olmasından dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiştir (28, 29).

#### **2.3.1. Mikrobiyolojik Özellikler**

*C. difficile*, bağırsak florasında bulunabilen, subterminal sporlu, peritrich kirpikleri ile hareketli, zorunlu anaerob bir basildir (3, 30). Genç kültürlerde daima gram pozitif boyanma özelliği göstermekle beraber, yaşlı kültürlerde gram negatif boyanmaya eğilimi vardır (31). Her ne kadar 25-45°C'ler arasında üreyebilirse de optimal üreme ısısı 30-37°C, pH:7-7, 2'dir (1). *C. difficile*'nin eskulini hidrolize ettiği, üreaz, lesitinaz ve lipaz aktivitesine sahip olmadığı, jelatini erittiği, indol oluşturmadığı, glikoz ve mannitolü fermente ettiği ancak diğer şekerlerden laktoz, sükröz, ksiloz, arabinoz üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bilinmektedir (30, 32). Agarlı besiyerlerinde 35°C'de, 48 saatlik anaerob inkübasyon sonunda hafif kabarık, kenarları düzensiz, 1-3 mm çaplı koloniler meydana gelir. At kanı konmuş besiyerlerinde bazen hemoliz görülebilirse de, koyun ve insan kanlı agar besiyerlerinde hemoliz oluşmaz (1). Bakterinin dışkıdan izolasyonunda,

sikloserin, sefoksitin, fruktoz ve nötral kırmızısı bulunduran Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar (CCFA) gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Kanlı besiyerlerinde bakteri sporlu iken CCFA'da spor oluşumu gözlenmez (30). *C. difficile* kolonileri, CCFA besiyerinde 35 C'de 48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirildiğinde buzlu cam görüntüsü verir ve at gübresi kokusu tipiktir (33). Besiyerindeki koloniler, uzun dalga ultraviyole ışığı altında incelendiğinde, açık yeşilden sarıya kadar değişebilen refle vermektedir (31).



Şekil 4. *C. difficile*'nin gram boyama sonrası mikroskobik görünümü (34)

### 2.3.2. Epidemiyoloji

*C. difficile*, enfekte olmuş kişilerin dışkılarıyla çıkarılan sporların ağızdan alınması ile bulaşır. Sporlar, kontamine yüzeylerden sağlık çalışanlarının elleri ve medikal gereçler aracılığıyla duyarlı hastalara bulaşabilir veya doğrudan çevresel yüzeylerle temas yoluyla alınabilirler. Sağlıklı erişkinlerde %5-15, yenidoğan ve sağlıklı bebeklerde %84 gibi yüksek taşıyıcılık oranı görülebilmektedir (32). Hastanede kalış süresi de *C. difficile* kültür pozitifliği yönünden önemlidir. Asemptomatik yenidoğan ve infantların bağırsaklarında yüksek seviyede toksin A ve B olmasına rağmen bağırsaklarda gerekli reseptörlerin az olması veya olmaması nedeniyle hastalık oluşmamaktadır (35). Toplumda asemptomatik kolonizasyon prevalansı %5'ten daha düşük oranda saptanırken, hastanede yatan hastalarda özellikle de yaşlı hastalarda asemptomatik kolonizasyon prevalansı %20-30'lara ulaşmaktadır (6). *C. difficile*'nin neden olduğu enfeksiyon primer olarak hastanede yatan kişilerde oluşur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde hastaneye yatanlarda oluşan diyare ve kolit olgularının çoğunu *C. difficile* oluştururken (üç milyon olgu/yıl) poliklinik

olgularında sadece 20.000 olgu/yıl *C. difficile*'ye bağlanmıştır. Enfekte olanların ise sadece 1/3'ünde diyare gelişirken diğerleri asemptomatik kalmaktadır (35). Son yıllarda *C. difficile* insidansı ve ciddi sonuçları olan vaka sayısı dünya çapında artmıştır (36, 37). Kasım 2004 ile Nisan 2005 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışmada insidans her 1000 hastada 4, 6 olgu ve mortalite oranı ise %5,7 olarak bildirilmiştir (38). ABD'de deorolar 1996 ile 2003 yılları arasında neredeyse iki katına çıkmıştır (39). Kanada, ABD ve Avrupa'da, 2003 yılında toplumda ve hastanelerde *C. difficile* North American pulsed-field type 1 (NAP1, diğer adlarıyla BI/027) suşunun neden olduğu hastalık bildirilmiştir. Bu suşun artmış virülansı, toksin üretimini düzenleyen gendeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. NAP1 diğer izolatlardan 16-23 kat daha fazla toksin üretmektedir. Bu suş florokinolonlara dirençlidir. Florokinolonların geniş alanda kullanılması nedeniyle bu virülen suşun seçimine neden olduğudüşünülmektedir (27). 2008 yılında 34 Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan çalışmada *C. difficile* enfeksiyonu insidansının ortalama her 10.000 hasta gününde 4,1 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 65 farklı ribotip bulunmuş ve en sık olarak ribotip 014/020 (%16), 001 (%9), 078 (%8) ve 027 (%5) izole edilmiştir (40). Toplum kaynaklı ABİ olgularında da *C. difficile*'nin önemli bir etken olarak akla gelmesi gerektiği fakat rutin araştırmalarda gözden kaçabildiği belirtilmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada *C. difficile* olgularının %42'si toplum kaynaklı olarak bulunmuş ve en az yarısında son bir ayda hastanede yatış öyküsü olmadığı belirlenmiştir (41). Asit baskılayıcı tedavi özellikle proton pompa inhibitörlerinin kullanımı toplumdan edinilmiş *C. difficile*'nin artmış riski ile ilişkilidir. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımının beklenmedik artışının ise araştırılması gerektiği belirtilmiştir (42).

*C. difficile* ishali için en önemli risk faktörleri ileri yaş, hastanede yatma, iki-üç ay içinde antibiyotik kullanımı ve uzun süreli bakım evlerinde kalmadır (43).

Tablo III. *C. difficile* enfeksiyonu ve kolonizasyonu için risk faktörleri (34, 35, 44, 45, 46)

• Hastanede yatmak
• Yoğun bakım, onkoloji ve yanık ünitesinde yatmak
• İleri yaş ( $\geq 65$ ), erkek cinsiyet
• Antibiyotik ve bazı antineoplastik ilaç kullanımı
• Operasyon (özellikle abdominal cerrahi)
• İntestinal motiliteyi değiştiren ajanlar, son zamanlarda lavman uygulanması
• Nazogastrik tüp, gastrointestinal işlemler, enteral beslenme
• Antasit/H <sub>2</sub> reseptör blokleri, proton pompa inhibitörü kullanımı
• Kronik böbrek hastaları
• İmmünsüpresyon
• Malnütrisyon
• Diyabet
• Neoplastik hastalıklar
• Kistik fibrozis
• İnflamatuar barsak hastalığı
• Kronik karaciğer hastalığı

*C. difficile*'nin önemli bir özelliği, birçok antibiyotiğe kısmi dirençli olmasıdır. Bu nedenle antibiyotik kullanımı sırasında veya kullanımını izleyen dönemde hızla çoğalarak toksin üretebilirler (47). Hemen hemen tüm antibiyotikler *C. difficile* enfeksiyonuna yol açabilir. Profilaksi veya tedavi amaçlı bir doz bile olsa antibiyotik kullanımı *C. difficile* enfeksiyonu gelişmesi için yeterli olabilir (48). Önde gelen antibiyotikler ampisilin, klindamisin ve sefalosporinlerdir. Özellikle orta derecede antibakteriyel etkiye sahip antineoplastik ajanların (metotreksat, 5-fluorourasil, doksorubisin, siklofosomid, klorambusil veya paklitaksel) kullanımı da *C. difficile* enfeksiyonuna neden olabilir (35). Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdan uzaklaştırılmakta ve baskın hale geçen *C. difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksin salgılamaktadır (49).

Tablo IV. *C. difficile* enfeksiyonuna neden olan antibiyotikler (35)

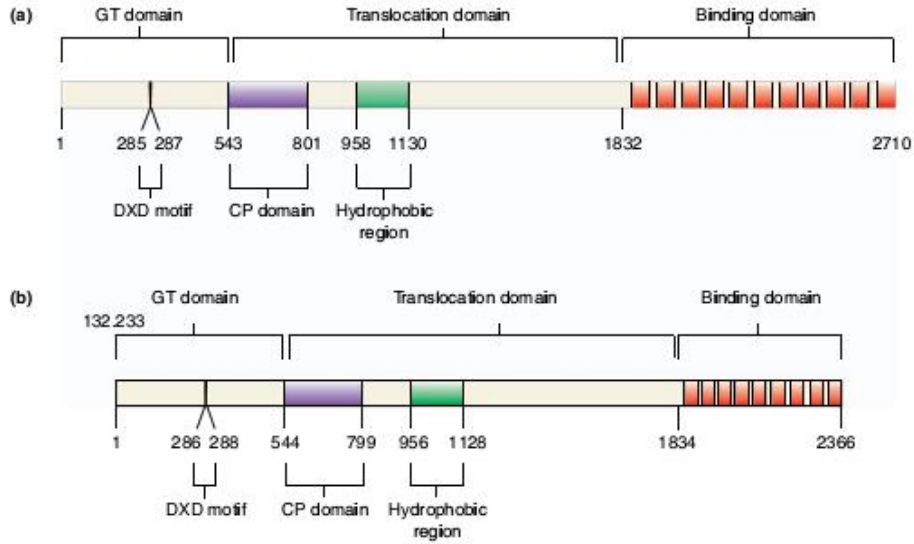
Sıklık	Antibiyotikler
Sık	Ampisilin, amoksisilin, klindamisin, sefalosporinler
Daha az	Makrolidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, sülfonamidler, tikarsilin-klavulanik asit
Nadir	Kinolonlar, rifampisin, trimetoprim, aminoglikozidler, vankomisin, metronidazol, basitrasin

### 2.3.3. Patogenez

*C. difficile*, invaziv bir bakteri değildir. Nötropenik hastalarda ve çocuklarda bir dereceye kadar doku invazyonu görülebilir (3). Hastalık, basilin ürettiği ekzotoksinlerin etkisiyle olmaktadır (6). *C. difficile* tarafından toksin A (*tcdA*, enterotoksin-308 kDa), toksin B (*tcdB*, sitotoksin-269 kDa) ve binary toksin (*C. difficile* transferaz-CDT) olmak üzere üç toksin üretir (50). Son dönemde giderek önem kazanan binary toksin ilk kez 1988 yılında Popoff ve ark. tarafından izole edilmiştir (51). Ayrıca insan barsak hücrelerine bağlanmasını kolaylaştıran adezin faktör, hiyalüronidaz, kollagenaz gibi proteolitik enzimler diğer virulans faktörleridir (47). Daha önce yapılan çalışmalarda toksin A'nın *C. difficile* enfeksiyonu oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmekteyken, yapılan deneysel hayvan çalışmalarında toksin A negatif ve toksin B pozitif *C. difficile* izolatlarının da ciddi bir hastalık tablosu oluşturdukları görülmüştür. Bu çalışmalar, toksin B'nin toksin A gibi enterotoksin etkisi gösterdiğini ve hastalık oluşumunda esas faktör olduğunu düşündürmüştür (49). Bu toksinler birbirleriyle %66 aminoasit homolojisi gösterirler. Toksin A ve B, kromozomun *PaLoc* adı verilen 19,6 kilobazlık bölgesinde kodlanmaktadır (32). *PaLoc*, bu toksinlerin sentez ve düzenlenmesini sağlayan *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olmak üzere beş gen içermektedir (49). Toksijenik olmayan suşlarda *PaLoc* gen bölgesi yoktur ve *PaLoc* yerine 115 baz çiftlik kodlayıcı olmayan bölge bulunur. Bazı suşlarda *PaLoc* bölgesi defektif olabilir ve bu defektif suşlar da hastalık oluşturabilir (32). Yapılan çalışmalar, *tcdR*'nin toksin gen ekspresyonunda önemli bir alternatif sigma faktörü olduğunu, *tcdC*'nin isenegatif bir düzenleyici olduğunu göstermiştir. *TcdC*, gen ekspresyonu için gerekli olan RNA polimeraz ile *tcdR* arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini göstermektedir. *TcdE*'nin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerden toksin salınımında etkili olduğu düşünülmektedir (52). Toksin A ve B'nin üretimi suşa ve besin miktarı (glikoz, aminoasitler ve biyotin), sıcaklık gibi çevresel faktörler ile subinhibitör konsantrasyonda antibiyotik varlığına bağlıdır. *TcdC* ve

*tcdR*'yeek olarak CodY gibi faktörler de toksin sentezinin düzenlenmesinde rol oynar. Belirli aminoasitler, guanozin trifosfat (GTP) gibi yeterli besin varlığında CodY'nin *tcdR*'nin promotör bölgesine bağlandığı ve toksin gen ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (32).

Glikozil transferaz özelliğindeki *C. difficile* toksinlerinin biyolojik açıdan aktif N-terminal glikozil transferaz bölgesi, bir sistein proteaz bölgesi, toksinin iletilmesinde rol oynayan bir santral translokasyon bölgesi ve bir C-terminal reseptör bağlayan bölgesi olmak üzere dört yapısal bölgesi bulunmaktadır (32). Toksin B'nin enzimatik aktivitesi toksin A'dan en az 100 kat daha fazla bulunmuştur (53).



Şekil 5. Toksin A (a) ve toksin B (b)'nin yapısı (52)

*TcdA* gen bölgesi 8133 bazdan oluşmaktadır.

```

0001 atttatTTTT aaaaaataga aaggagtgta taagatttat tttcaaagtt taaaaacaag
0061 aaaatcaatt taaatttcag aaggaataaa tgtggttata gaagtggatt tattatcaaa
0121 aataataata ctaggaggtt tttatgtctt taatatctaa agaagagtta ataaaactcg
0181 catatagcat tagaccaaga gaaaatgagt ataaaactat actaactaat ttagacgaat
0241 ataataagtt aactacaaac aataatgaaa ataaatattt acaattaaaa aaactaaatg
0301 aatcaattga tgtttttatg aataaatata aaacttcaag cagaaataga gcactctcta
0361 atctaaaaaa agatatatta aaagaagtaa ttcttattaa aaattccaat acaagccctg
0421 tagaaaaaaa tttacatttt gtatggatag gtggagaagt cagtgatatt gctcttgaat
0481 acataaaaca atgggctgat attaatgcag aatataatat taaactgtgg tatgatagtg
0541 aagcattcct agtaaataca ctaaaaaagg ctatagttga atcttctacc actgaagcat
0601 tacagctact agaggaagag attcaaatc ctcaatttga taatatgaaa tttcaaaaa
0661 aaaggatgga atttatatat gatagacaaa aaagtttat aaattattat aaatctcaaa
0721 tcaataaacc tacagtacct acaatagatg atattataaa gtctcatcta gtatctgaat
0781 ataatagaga tgaactgta ttagaatcat atagaacaaa ttctttgaga aaaataaata
0841 gtaatcatgg gatagatattc agggctaata gtttgtttac agaacaagag ttattaaata

```

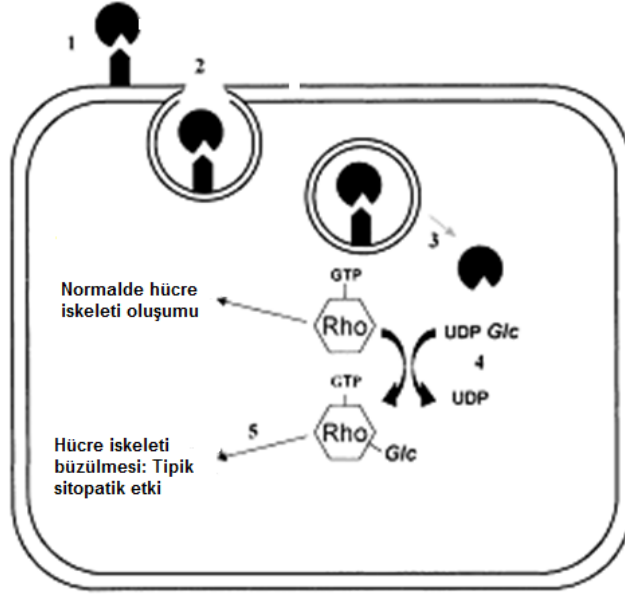
0901 tttatagtca ggagttgta aatcgtggaa atttagctgc agcatctgac atagtaagat  
0961 tattagccct aaaaaatfff ggcggagtat atttagatgt tgatagctt ccaggtattc  
1021 actctgattt atttaaaaca atatctagac cttagctctat tggactagac cgttgggaaa  
1081 tgataaaatt agaggctatt atgaagtata aaaaatataat aaataattat acatcagaaa  
1141 actttgataa acttgatcaa caattaaaag ataattttaa actcattata gaaagtaaaa  
1201 gtgaaaaatc tgagatattt tctaaattag aaaattttaa tgtatctgat cttgaaatta  
1261 aaatagcttt cgcttttaggc agtgttataa atcaagcctt gatatcaaaa caaggttcat  
1321 atcttactaa cctagtaata gaacaagtaa aaaatagata tcaattttta aaccaacacc  
1381 ttaaccacgc catagagtct gataataact tcacagatac tactaaaatt tttcatgatt  
1441 cattatttaa ttcagctacc gcagaaaact ctatgttttt aacaaaaata gcaccatact  
1501 tacaagtagg ttttatgcca gaagctcgtt ccacaataag ttttaagtggc ccaggagctt  
1561 atgctcagc ttactatgat ttcataaatt tacaagaaaa tactatagaa aaaactttaa  
1621 aagcatcaga tttaatagaa tttaaattcc cagaaaataa tctatctcaa ttgacagaac  
1681 aagaaataaa tagtctatgg agctttgatc aagcaagtgc aaaatatcaa tttgagaat  
1741 atgtaagaga ttatactggg ggatctcttt ctgaagaca tgggtagac tttataaaaa  
1801 atactgccct cgacaaaaac tatttattaa ataataaaat tccatcaaac aatgtagaag  
1861 aagctggaag taaaaattat gttcattata tcatacagtt acaaggagat gatataagtt  
1921 atgaagcaac atgcaattta ttttctaaaa atcctaaaaa tagtattatt atacaacgaa  
1981 atatgaatga aagtgcaaaa agctactttt taagtgatga tggagaatct attttagaat  
2041 taaataaata taggatacct gaaagattaa aaaataagga aaaagtaaaa gtaaccttta  
2101 ttggacatgg taaagatgaa ttcaacacaa gcgaatttgc tagattaagt gtagattcac  
2161 tttccaatga gataagttca tttttagata ccataaaatt agatatatca cctaaaaatg  
2221 tagaagtaaa cttacttggg tgtaatatgt ttagttatga ttttaagtgt gaagaaactt  
2281 atcctgggaa gttgctatta agtattatgg acaaaattac ttccacttta cctgatgtaa  
2341 ataaaaattc tattactata ggagcaaatc aatatgaagt aagaattaat agtgagggaa  
2401 gaaaaaactc tctggctcac tcaggtaaa ggataaataa agaagaagct attatgagcg  
2461 atttatctag taaagaatac attttttttg attctataga taataagcta aaagcaaggt  
2521 ccaagaatat tccaggatta gcatcaatat cagaagatat aaaaacatta ttacttgatg  
2581 caagtgttag tcctgatata aaatttattt taaataatct taagcttaat attgaatctt  
2641 ctattggtga ttacatttat tatgaaaaat tagagcctgt taaaaatata attcacaatt  
2701 ctatagatga tttaatagat gagttcaatc tacttgaaaa tgtatctgat gaattatag  
2761 aattaaaaaa attaaataat ctagatgaga agtatttaat atcttttgaa gatattctca  
2821 aaaataattc aacttactct gtaagattta ttaacaaaag taatggtgag tcagtttatg  
2881 tagaaacaga aaaagaaatt ttttcaaaat atagcgaaca tattacaaaa gaaataagta  
2941 ctataaagaa tagtataatt acagatgtta atggtaattt attggataat atacagttag  
3001 atcactactc tcaagttaat acattaaacg cagcattctt tattcaatca ttaatagatt  
3061 atagtagcaa taaagatgta ctgaatgatt taagtacctc agttaagggt caactttatg  
3121 ctcaactatt tagtacaggt ttaaatacta tatatgactc tatccaatta gtaaatttaa  
3181 tatcaaatgc agtaaatgat actataaatg tactacctac aataacagag gggataccta  
3241 ttgtatctac tatattagac ggaataaact taggtgcagc aattaaggaa ttactagacg  
3301 aacatgacc attactaaaa aaagaattag aagctaagggt ggggttttta gcaataaata  
3361 tgtcattatc tatagctgca actgtagctt caattgttgg aataggtgct gaagttacta  
3421 ttttcttatt acctatagct ggtatatctg caggaatacc ttcatagtt aataatgaat  
3481 taatattgca tgataaggca acttcagttg taaactattt taatcatttg tctgaatcta  
3541 aaaaatatgg cctctttaa acagaagatg ataaaaatff agttcctatt gatgatttag  
3601 taatcagaa aatagatttt aataataatt cgataaaaact aggaacatgt aatatattag  
3661 caatggaggg gggatcagga cacacagtga ctggtaatat agatcacttt ttctcatctc  
3721 catctataag ttctcatatt cttcattat caatttattc tgcaataggt atagaaacag  
3781 aaaatctaga tttttcaaaa aaaataatga tgttacctaa tgctccttca agagtgtttt  
3841 ggtgggaaac tggagcagtt ccaggtttaa gatcattgga aaatgacgga actagattac  
3901 ttgatcaat aagagattta taccaggtta aattttactg gagattctat gcttttttcg  
3961 attatgcaat aactacatta aaaccagttt atgaagcac taatattaaa attaaactag  
4021 ataaagatac tagaaacttc ataatgcaa ctataactac taacgaaatt agaacaat  
4081 tatcttattc atttgatgga gcaggaggaa cttactcttt attattatct tcatatccaa

4141 tatcaacgaa tataaattta tctaaagatg atttatggat atttaatat gataatgaag  
4201 taagagaaat atctatagaa aatggtacta ttaaaaaagg aaagttaata aaagatgttt  
4261 taagtaaaat tgatataaat aaaaaataaac ttattatagg caatcaaaca atagattttt  
4321 caggcgatat agataataaa gatagatata tattcttgac ttgtgagtta gatgataaaa  
4381 ttagttaa atagaaata aatctgttg caaaatctta tagtttgta ttgtctggg  
4441 ataaaaatta tttgatatcc aatttatcta atattattga gaaaatcaat actttaggcc  
4501 tagatagtaa aaatatagcg tacaattaca ctgatgaatc taataataaa tttttggag  
4561 ctatatctaa aacaagtcaa aaaagcataa tacattataa aaaagacagt aaaaaatat  
4621 tagaatttta taatgacagt acattagaat ttaacagtaa agattttatt gctgaagata  
4681 taaatgtatt tatgaaagat gatattaata ctataacagg aaaatactat gttgataata  
4741 atactgataa aagtatagat ttctctatct ctttagttag taaaaatcaa gtaaaagtaa  
4801 atggattata tttaaatgaa tccgtatact catcttacct tgattttgtg aaaaattcag  
4861 atggacacca taatacttct aattttatga atttattttt ggacaatata agtttctgga  
4921 aattgtttgg gtttgaat ataaattttg taatcgataa atactttacc cttgttgga  
4981 aaactaatct tggatatgta gaatttatt gtgacaataa taaaaatata gatatatatt  
5041 ttggtgaatg gaaaacatcg tcatctaaa gcactatatt tagcggaaat ggtagaaatg  
5101 ttgtagtaga gcctatata aatctgata cgggtgaaga tatactact tcactagatt  
5161 tttctatga acctctctat ggaatagata gatatatcaa taaagtattg atagcacctg  
5221 atttatatac aagtttaata aatattaata ccaattatta ttcaaatgag tactaccctg  
5281 agattatagt tcttaaccca aatacattcc acaaaaaagt aaatataaat ttatagatt  
5341 cttcttttga gtataaatgg tctacagaag gaagtgactt tattttagtt agacttag  
5401 aagaaagtaa taaaaaata ttacaaaaa taagaatcaa aggtatctta tctaatactc  
5461 aatcatttaa taaaatgagt atagatttta aagatattaa aaaactatca ttaggata  
5521 taatgagtaa ttttaaatca ttttaattctg aaaatgaatt agatagagat catttaggat  
5581 ttaaaataat agataataaa acttattact atgatgaaga tagtaatta gttaaaggat  
5641 taatcaatat aaataattca ttattctatt ttgatcctat agaatttaac ttagtaactg  
5701 gatggcaaac tatcaatggt aaaaaatatt attttgataa aaactactgga gcagctttaa  
5761 ttagtataa aattattaat ggtaaacact tttattttaa taatgatggt gtgatgcagt  
5821 tgggagtatt taaaggacct gatggatttg aatattttgc acctgccaat actcaaaata  
5881 ataacataga aggtcaggct atagtttatc aaagtaaatt cttactttg aatggcaaaa  
5941 aatattattt tgataatgac tcaaaagcag tcaactggatg gagaattatt aacaatgaga  
6001 aatattactt taatccta atagctattg ctgcagtcgg attgcaagta attgacaata  
6061 ataagtatta tttcaatcct gacactgcta tcatctcaa aggttggcag actgttaatg  
6121 gtagtagata ctactttgat actgataccg ctattgcctt taatggttat aaaactattg  
6181 atggtaaaaca cttttatttt gatagtgatt gtgtagtga aataggtgtg tttagtaact  
6241 ctaatggatt tgaatatttt gcacctgcta atacttataa taataacata gaaggtcagg  
6301 ctatagttta tcaaagtaaa ttcttaactt tgaatggtaa aaaatattac tttgataata  
6361 actcaaaagc agttaccgga tggcaaaacta ttgatagtaa aaaatattac ttaataacta  
6421 aactgctga agcagctact ggatggcaaa ctattgatgg taaaaaatat tactttaata  
6481 ctaaacactgc tgaagcagct actggatggc aaactattga tggtaaaaaa tattacttta  
6541 atactaacac tgctatagct tcaactgggt atacaattat taatggtaaa catttttatt  
6601 ttaatactga tggattatg cagataggag tgtttaaagg acctaatgga tttgaaatatt  
6661 ttgcacctgc taatacggat gctaacaaca tagaaggcca agctatactt taccaaatg  
6721 aattcttaac tttgaaatgg aaaaaatatt actttggtag tgactcaaaa gcagttactg  
6781 gatggagaat tattaacaat aagaaatatt actttaatcc taataatgct attgctgcaa  
6841 ttcatctatg cactataaat aatgacaagt attactttag ttatgatgga attcttcaa  
6901 atggatata tactattgaa agaaataatt tctattttga tgctaataat gaatctaaaa  
6961 tggtaacagg agtattttaa ggacctaag gatttgagta ttttgacct gctaatactc  
7021 acaataataa catagaaggc caggctatag tttaccagaa caaattctta actttgaaatg  
7081 gcaaaaaata ttattttgat aatgactcaa aagcagttac tggatggcaa accattgatg  
7141 gtaaaaaata ttactttaat cttaaacact ctgaagcagc tactggatgg caaactattg  
7201 atggtaaaaa atattacttt aatcttaaca ctgctgaagc agctactgga tggcaaaacta  
7261 ttgatggtaa aaaatattac ttaataacta aactttcat agcctcaact ggtatacaa  
7321 gtattaatgg taaacatttt tatttttaata ctgatggtat tatgcagata ggagtgttta

```
7381 aaggacctaa tggatttgaa tactttgcac ctgctaatac tcataataat aacatagaag
7441 gtcaagctat actttaccaa aataaattct taactttgaa tggtaaaaaa tattactttg
7501 gtagtgactc aaaagcagtt accggattgc gaactattga tggtaaaaaa tattacttta
7561 atactaacac tgctgttgca gttactggat ggcaactat taatggtaaa aaatactact
7621 ttaatactaa cacttctata gcttcaactg gttatacaat tattagtggg aacattttt
7681 attttaatac tgatggtatt atgcagatag gagtgtttaa aggacctgat ggatttgaat
7741 actttgcacc tgctaataca gatgctaaca atatagaagg tcaagctata cgttatcaaa
7801 atagattcct atatttcat gacaatatat attattttgg taataattca aaagcagcta
7861 ctggttgggt aactattgat ggtaatagat attacttoga gcctaataca gctatgggtg
7921 cgaatgggta taaaactatt gataataaaa atttttactt tagaaatggg ttacctcaga
7981 taggagtgtt taaaggtct aatggatttg aatactttgc acctgctaatac acggatgcta
8041 acaatataga aggtcaagct atacgttatc aaaatagatt cctacattta cttggaaaaa
8101 tatattactt tggtaataat tcaaaagcag ttactggatg gcaactatt aatggtaaag
8161 tatattactt tatgcctgat actgctatgg ctgcagctgg tggacttttc gagattgatg
8221 gtggtatata tttctttggg gttgatggag taaaagcccc tgggatatat ggctaaaata
8281 tatgtttgat aaaaaattat tcctgtgcta ctaagaaatt atttttatat aataaatatt
8341 gagatttaat t
```

Şekil 6. *C. difficile* *tcdA* gen sekansı (Yeşil ile başlangıç, mavi ile stop kodonları belirtilmiştir.) (54)

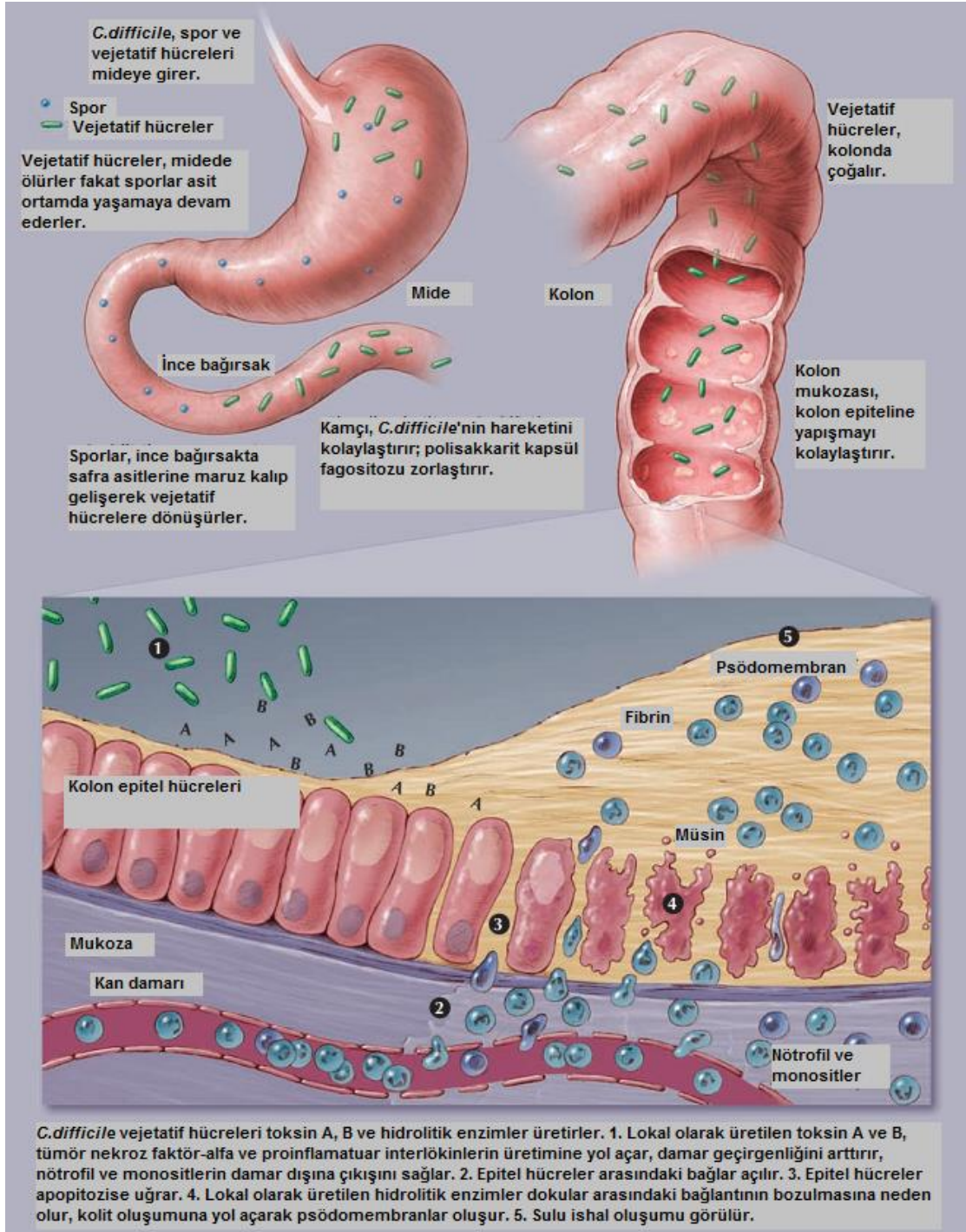
Toksin A için kolonda bulunan gp96 glikoproteininin ko-reseptör olduğu belirtilmektedir. Toksinler reseptörle ilişkili endositoz yoluyla konak hücreye girerler. Toksinlerin tranlokasyonu için asidik özellikte bir endozoma gereksinim vardır. Toksinlerin hedefi Rho ve Ras ailesinden Rho, Rac ve Cdc gibi küçük guanozin trifosfaz (GTPaz)'lardır. Toksin aktive olduktan sonra konak guanozin trifosfazlarını glikozilleyerek inaktive eder (32). Glikolizasyon aktin filamentlerinin depolimerizasyonuna, hücre iskeletinin bozulmasına, hücrenin yuvarlaklaşmasına ve hücre ölümüne (apoptozis) yol açar (35).



1. Toksin, spesifik reseptörüne bağlanır.
2. Toksin, hücre içine reseptör aracılı endositoz ile girer.
3. Endozom/lizozomdan çıkar.
4. Rho ve diğer küçük GTP bağlayıcı proteinleri glikoziller.
5. Glikozillenen GTPaz hücre iskeletinin büzülmesine sebep olur.

Şekil 7. *C. difficile* toksinlerinin hücre içi etkisi (55)

Toksinler tarafından salgılanması uyarılan, inflamasyonu artıran ve konağın hasar görmesinden sorumlu olan proinflamatuvar sitokinler içinde IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , makrofaj inflamatuvar protein (MIP) 1 $\alpha$  ve 2, IL-8, leptin sayılabilir. *C. difficile* toksinleri, TLR4, TLR5 ve nucleotid-binding oligomerizasyon domain containing 1 (NOD1) sinyal iletim yollarının dahil olduğu hem yüzeyde bulunan hem de hücre içi doğal immün sensörleri aktive etmektedir (32). Toksin A ve B vasküler geçirgenliği artırır ve hücreler arası sıkı bağların açılmasıyla kanamaya sebep olur. Toksin A, ishalin patogeneğinde toksin B'den daha kritik rol oynar. Toksin B, direkt enterotoksik etkiye sahip değildir ve toksin A'nın oluşturduğu gastrointestinal doku hasarından sonra rol oynadığı düşünülmektedir (56).

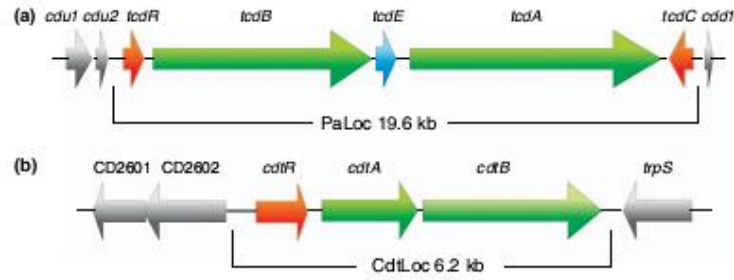


Şekil 8. Yetişkinlerde *C. difficile* ilişkili diyarenin patogenezi (56)

Her iki toksin hastalığın patogenezinde karşılıklı sinerjik etkileşim gösterir (27, 57). Fakat toksin A negatif izolatlar, yine de hastalığa neden olabilmektedir (27). Son yıllarda yapılan çalışmalarda toksin-B üreten suşlar tanımlanmış, bununla beraber başka varyant suşlar da tespit edilmiştir. Bazı suşlar, yüksek miktarda toksin A ve toksin B salgılamaktadır. Bu suşlarda toksin ekspresyonu üzerinde negatif etki yapan *tcdC* geninde

bir bozukluk olduğu tespit edilmiştir (31, 58). Bakteriyel yüzey proteinleri surface layer protein (SLP), *C. difficile*'nin intestinal epitel hücrelerine bağlanmasında önemli olup, toksinlerin belirli yerlerde üretilmesine ve arkasından da doku hasarına neden olmaktadır (27).

*C. difficile* suşlarının %6-12, 5'u binary toksin de üretir (59). Binary toksin, *CdtLoc* bölgesinde bulunan *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca *CdtLoc* bölgesinde regülatör *cdtR* geni de kodlanmaktadır. Çalışmalar binary toksin'in kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerindışı yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. Bu bulgular, binary toksin'in daha şiddetli hastalık oluşumunda önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu düşündürmektedir (32, 49).



Şekil 9. *C. difficile*'nin PaLoc ve CdtLoc'u (52)

### 2.3.4. Klinik

Asemptomatik taşıyıcılıktan ciddi ishale, toksik megakolon ile psödomembranöz kolite kadar değişen klinik tablolar oluşur (60). Klinik tablonun oluşumunda konak faktörleri, bakteriyel virülans faktörlerinden daha önemlidir. Önemli konak faktörleri toksin reseptör dansitesi, antitoksin antikor seviyesi ve normal kolon florasının varlığı veya yokluğudur (4, 35, 61).

#### 2.3.4.A. Asemptomatik Taşıyıcılık

Kolon, *C. difficile* ile kolonizedir. Ancak ishal gibi klinik bulgular oluşmamaktadır. Yapılan kültürde toksin pozitif *C. difficile* üremesi olmaktadır (49). Hastanede yatan hastaların %10-20'si *C. difficile*'yi taşırlar (35).

#### 2.3.4.B. *Clostridium difficile* İshali

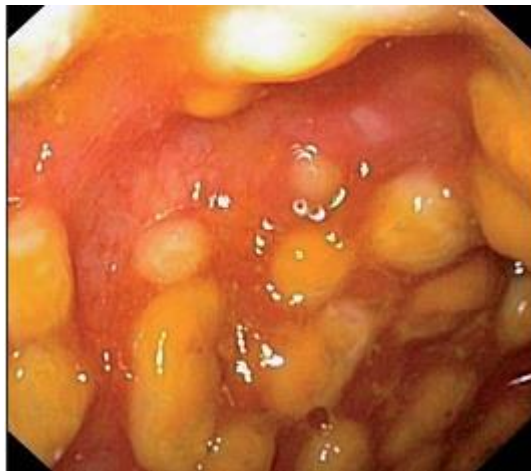
En sık klinik tablo olan *C. difficile* ishali, ABİ'lerin %20-30'unu oluşturur. *C. difficile* ishali tipik olarak proktokolit ile uyumludur. İshal kısa süreli, kendisini sınırlayan veya günde 20 ve daha fazla dışkılamayla kolera benzeri olabilir. Bazı hastalarda ateş, lökositöz, kramp tarzında karın ağrısı olabilir (35).

#### 2.3.4.C. *Clostridium difficile* Koliti

Sigmoidoskopide özgül olmayan yaygın veya yama tarzında psödomembransız eritematöz kolit tablosu görülebilir (49). Hastaların çoğunda antibiyotik kesildiğinde ishal de biter (35).

#### 2.3.4.D. Psödomembranöz Enterokolit (Pme)

Klinik tablo, psödomembranı olmayan *C. difficile* kolitine benzer fakat çoğunlukla semptomları daha şiddetlidir. İshal, karında duyarlılık ve sistemik bulgularla karakterize bu formda barsaklarda 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar bulunur. Plaklar fibrin, mukus, nekrotik mukozal hücreler ve nötrofillerden oluşur (1). PME'li hastaların çoğunda rektosigmoid bölge tutulur. Ancak %10 olguda proksimal kolon da tutulabilir ve sigmoidoskopide saptanamaz. Şiddetli formların komplikasyonları dehidratasyon, hipoalbuminemi, elektrolit bozukluğu, toksik megakolon, barsak perforasyonu ve ölümdür. Mortalite ve morbiditeyi önlemek için agresif terapötik girişim gereklidir (35).



Şekil 10. Psödomembranöz enterokolitin endoskopik görünümü (62)

### 2.3.4.E. Fulminan Kolit

Altkadrana lokalize veya diffüz karın ağrısı, ishal ve distansiyon vardır. Bazı hastalarda yüksek ateş, titreme, taşikardi, letarji ve belirgin lökositoz olur. Genelde ishal belirgindir fakat ileus gelişen hastalarda minimal olabilir (35). Bu tablo ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüm gibi ciddi komplikasyonla seyredebilir ve *C. difficile* enfeksiyonlu hastaların %2-3'ünde görülebilmektedir (49). Komplikasyonların en sık görüldüğü klinik formdur. Agresif tanıs ve terapötik girişimler, hastalarda mortalite ve morbiditeyi önlemek için gereklidir. Fleksibl sigmoidoskopi veya kolonoskopi yatak başında uygulanabilir, ancak perforasyon riski vardır (35).

Selülit, bakteriyemi, iç organlarda apse, reaktif artrit gibi nadiren ekstraintestinal tablolar da görülebilir (63).

### 2.3.5 Tanı

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonunun kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir. *C. difficile* enfeksiyonu tanısı, klinik ve laboratuvar testleri temelinde olmaktadır. Hastalarda 36 saatte en az altı sulu ishal, 48 saat içinde sekizin üzerinde şekilsiz ishal veya iki gün için günde üç şekilsiz ishal olması klinisyenlere *C. difficile* enfeksiyonu varlığını düşündürmelidir (49).

Günümüzde *C. difficile* ilişkili ishalin tanısında birkaç metot bulunmaktadır. Bunlar toksin A ve toksin A/B Enzim Immunoassay (EIA), Glutamat dehidrogenaz (GDH) EIA ve immunokromotografik testler ile toksin A/B veya GDH tespiti, doku kültür nötralizasyonu, toksijenik kültür ve toksin genlerinin Polimerase Chain Reaction (PCR) ile gösterilmesidir (64). Optimal bir laboratuvar incelemesi için taze gaita örneği hemen laboratuvara gönderilmeli ve toksin yönünden incelenmelidir. Sitotoksin titresi, 22°C'de saklanan dışkılarda 2 log düşer (65). Örneğin alınıp laboratuvara ulaştırılması sonrasında ilk 24 saatte +4°C'de, daha uzun kalacaksa -20°C'de saklanması önerilmektedir. Dışkıda bulunan proteazların toksini parçalayarak miktarını azaltabileceği düşünülmektedir (4). İshali olmayani şekilli dışkıda toksin araştırılması önerilmemektedir (66). Semptomların başlangıcında alınan bir veya iki örnek genellikle tanı için yeterlidir. Eğer birinci örnek negatif ise ilave dışkı örneği ile testin tekrarlanması faydalı olabilir. Üç farklı

dışkı örneğinin test edilmesi pozitiflik olasılığını %10 civarında artırmasına rağmen maliyeti yükselttiğinden dolayı tavsiye edilmemektedir (49).

### **2.3.5.a. Kültür**

*C. difficile* için anaerobik gaita kültürü en sensitif testtir (%89-100) fakat toksin üreten suşlar için spesifik değildir. Literatürde *C. difficile*'nin izole edilmesinin değeri tartışmalıdır (35). Salgın araştırmaları ve hastane izolatlarının epidemiyolojik amaçlı incelenmesinde önemlidir. *C. difficile* kültürü için genellikle CCFA kullanılmaktadır. Bu besiyerine sporların üremelerini artırmak için taurakolat ve lizozimilave edilebilmektedir (49). Cefoxitin mannitol agar (CMA) bu bakterinin izolasyonunda kullanılabilecek başka bir selektif besiyeridir (7). Gaita örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA'ya pasajlarının yapılması *C. difficile* izolasyon oranını artırmaktadır (67). *C. difficile* kolonileri gri, opak, 24-48 saattenonhemolitiktir. Fakat bazı suşlar alfa hemoliz yapabilmektedir. İnkübasyondan 48-72 saat sonra sporülasyona bağlı olarak merkezibeyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler gelişebilir (7). *C. difficile* kolonileri düşük dalga boylu ultraviyole (366 nm) altında yeşil-sarı floresans verir. P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asidlere bağlı olarak tipik at veya fil dışkısı kokusu vardır (67). *C. difficile*'nin saptanmasında anaerob dışkı kültürünün sensitivitesi yüksektir fakat asemptomatik taşıyıcılardaki nontoksijenik suşların tanımlanmasında daha az faydalıdır. Toksikitenin saptanması ile ilişkili dışkı kültürü daha faydalıdır fakat yoğun emek gerektirir ve test sonuçları en az 72-96 saatte elde edilebilir (56).

### **2.3.5.b. Doku Kültürü Sitotoksin Testi**

Dışkı örneklerinde 10 pg'lık sitotoksin saptayabilen doku kültürleri, toksinlerin varlığını araştırmada altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla embriyonik akciğer fibroblast (MRC 5, WI-38) hücreleri, insan amniyon (FL) hücreleri, Hep2 (human epithelial) hücreleri, Afrika yeşil maymun böbreği (Vero), intestinal fibroblast hücreleri gibi birçok hücre kullanılabilmektedir (67). Sıvı gaita örnekleri santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar hücre kültürü kaplarına eklenir. 37°C'de 24-48 saat anaerobinkübasyondan sonra, ışık mikroskopunda sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Nötralizan antikor (anti-*C.sordellii* antiserum)eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar (1). Özgülüğü > %97,

duyarlılığı %75-85 arasında olmasına rağmen pahalı, zaman alıcı olması ve iyi gelişmiş laboratuvar gerektirdiğinden rutin laboratuvarlar tarafından tercih edilmemektedir (49).

### **2.3.5.c. Enzim İmmunoassay**

İlk kez 1984 yılında *C. difficile* toksin A veya toksin A ve B'yi tespit etmek için kullanılmıştır (49). Sitotoksinlerin saptanmasında doku kültürlerinin dezavantajları nedeni ile daha başka testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla daha hızlı, kısmen ucuz ve özgüllüğü yüksek olan EIA testleri tercih edilmektedir (67). EIA ile 100-1000 pikogram seviyesinde toksin A veya B saptanabilmektedir (7). Hafif ve erken olgularda toksin saptanamaz (4). Ticari kitlerin bir kısmı sadece toksin A'yı saptamaya yöneliktir. Toksin A molekülünün amino-terminal bölgesinde lokalize bir epitop ile reaksiyona giren bir monoklonal antikor kullanılarak toksin A'yı saptar. *C. difficile* suşlarının %1-2'si toksin A üretmediğinden dolayı toksin A ve B'yi birlikte saptayan kitler tercih edilir. *C. difficile*'nin 10 farklı toksinotipi saptanmış olup (I-X) tip VIII ve X toksin A'ya spesifik testlerle saptanamaz (67). EIA testlerinin duyarlılığı %66-93, özgüllüğü %75-100'dür (35). EIA yöntemi ile üç gaita örneği incelenmesi tanı şansını sadece %5-10 artırırken, maliyeti oldukça yükseltir. Bu nedenle hastalığın tablosunu açıklayıcı başkasebep bulunamamasına rağmen, ishalin devam etmesi gibi durumlar dışında genelde tercih edilmez. Şekilli gaitalarda %10 dolayında yalancı pozitiflik gözlenebileceğinden sadece ishalleri hasta gaitalarında çalışılması önerilmektedir (67). *C. difficile* toksinleri dışında, hem toksin oluşturan hem de oluşturmayan *C. difficile* suşlarının ürettiği metabolik enzim olan GDH'ı tespit eden EIA testleri de vardır (49).

### **2.3.5.d. Lateks Aglütinasyon Testleri**

Hızlı, basit ve ucuz bir testtir. Lateks aglütinasyon yöntemi uygulanacak gaita örneğinin dondurulmaması gerekmektedir (67). Antikor ile kaplı lateks partikülleri yardımı ile toksin A saptanmaktadır. Lateks aglütinasyon testlerinin hızlı taramalar için uygun olduğu ama pozitif sonuçların diğer testlerle doğrulanması gerektiği bildirilmektedir (31). Toksin A'yı saptamaya yönelik düşünülmesine rağmen daha sonra bakteriyel bir enzim olan GDH'ı saptamaya yönelik olarak geliştirilmiştir (35). Testin diğer *Clostridium* türleri, *Peptostreptococcus anaerobius* ve *Bacteroides assaccharolyticus* ile çapraz reaksiyon verdiği ve yalancı pozitif sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir. Bu testin kullanımı, ne

izolatın toksijenik olduğuna dair bilgiyi ne de epidemiyolojik çalışmalar için yararlı olabilecek suşun kendisini ortaya çıkarmaktadır (1).

### **2.3.5.e. Moleküler Yöntemler**

Günümüzde PCR ve loop mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) temelli yöntemler kullanılmaktadır (68). Toksin A veya B'nin gen bölgesine özel primerler kullanılarak yapılan PCR oldukça duyarlı (%100) ve özgül (%96, 7-100)'dür. *C. difficile* kültürü gerektirmesi dezavantajdır. Bundan dolayı direkt gaitadan toksin saptamaya yönelik PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-time PCR, direk olarak gaitadan toksin genlerini saptamak için kullanılan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Hedeflenen genler, *tcdB* geni veya *tcdC* genidir. *TcdC* genindeki baz çifti delesyonlarının, toksinin aşırı üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu delesyonlar da real-time PCR ile belirlenebilmektedir (1).

LAMP teknolojisinde uygun primerlerin kullanımı ile Deoksiribonükleik asit (DNA) amplifikasyonu belirli bir ısı altında (60-65°C), termal döngü cihazı gerektirmeden olmaktadır. Polimeraz enzimi ile çift zincir DNA'lar pirofosfat iyonları oluşturmakta, oluşan pirofosfat iyonları ortama ilave edilen mangan ile reaksiyona girerek, floresan metal indikatörü olan kalsein yardımıyla görünür hale gelmektedir. 30-60 dakikada oluşan renk değişikliği turbidimetre ile veya çıplak gözle tespit edilebilmektedir (49).

### **2.3.5.f. Kolonoskopi**

Kolonoskopi, *C. difficile* ishali hastaların çoğunda gerekli değildir. Maliyeti, perforasyon riski ve tanı için noninvasif diğer yöntemlerin olması nedeniyle özel durumlarda uygulanmalıdır. Hızlı tanı gerektiğinde ve test sonuçları geciktiğinde veya duyarlı olmayan testler kullanıldığında, hastada ileus nedeniyle gaita elde edilemiyorsa ve endoskopi ile tanı konabilecek diğer hastalıklar düşünüldüğünde yapılması önerilir (35).

### **2.3.6. Tedavi**

*C. difficile* kolitinde ilk yaklaşım indükleyici olan antibiyotiği kesmek ve sıvı elektrolit kaybının yerine konmasıdır. Antibiyotik tedavisi gerekli ise daha az riskli bir antibiyotik ile değiştirilmelidir. Hastaların %15-25'i bu yaklaşıma yanıt verir (35). Antiperistaltik ilaç kullanımından kaçınılması gerekmektedir (41). Antibiyotik

kesilmesine rağmen semptomlar devam ediyorsa, hastada sistemik semptomlar varsa, altta yatan durum nedeniyle antibiyotik kesilemiyor veya değiştirilemiyorsa metronidazol yada vankomisin ile antibakteriyel tedavi başlanmalıdır (35). Başlangıç tedavisi olarak oral metronidazol'un (3x500 mg) 10-14 gün kullanılması önerilmektedir (69). *C. difficile*, kolon lümenine sınırlı olduğundan antibiyotik tedavisi oral olarak verilmelidir. İntravenöz tedavi gerekli ise kolonda ilacın ulaşılan konsantrasyonları nedeni ile sadece metronidazol verilmesi etkin bulunmuştur. Tedaviden beklenen cevap ateşin bir gün içerisinde, ishalin dört-beş günde düzelmesidir. Metronidazol, gerek maliyetinin düşük olması gerekse vankomisin kullanımının hastane kaynaklı vakalarda enterokoklarda vankomisin direncini indüklemeye riski nedeni ile tercih edilen tedavidir (6). Metronidazol intoleransı veya alerjisi olan hastalar, hamile veya emziren kadınlar ile dirençli diyaresi olan hastalar vankomisin'i (4x125mg) 10-14 gün kullanmalıdır (69). Basitrasin, teikoplanin ve fusidik asit kullanılabilecek diğer seçeneklerdir. Oral teikoplanin bu konuda etkili görülmeyle birlikte glikopeptid direnci yönünden dikkatli olunmalıdır (41). 2011 yılında onay alan fidaksomisin, *C. difficile*'ye karşı bakterisidal etkili oral makrosiklik antibiyotiktir ve normal kolonik mikroflora üzerine minimal etki oluşturur. Bu mikroflora koruyucu aktivitesi *C. difficile* enfeksiyonu olan hastalarda normal kolonik mikrofloranın daha hızlı oluşmasına izin verir (32, 70). Tedavinin tamamlanmasından sonra, hastaların %20-30 kadarında relapslar meydana gelebilmektedir. Çünkü antibiyotikler *C. difficile*'nin sadece vejetatif formlarını öldürmektedir, sporlar ise antibiyotiklere dirençlidir. Aynı antibiyotik ile ikinci kez tedavi sıklıkla başarılıdır, ancak birden fazla relaps bazı hastalarda bildirilmiştir (27). Toksin A ve B'ye karşı olan insan monoklonal antikorları (actoxumab ve bezlotoxumab)'nın standart antibiyotik tedavili hastalarda rekürrens oranını azalttığı gösterilmiştir (71). *C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak probiyotikler, intestinal mikrobiyal flora transferi ve immunoterapi gibi tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Probiyotiklerin kullanılmasının kolon florasının dengesini sağlayarak *C. difficile* enfeksiyonunun önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Fekal transplantasyon da, yine kolon florasını tamir etmek amacıyla sağlıklı vericilerden alınarak uygulanmaktadır. *C. difficile* kolonizasyonunda immun yanıt önemli olduğundan intravenöz immunoglobulinler tedavi amaçlı olarak hastalara uygulanabilmektedir (72). Fekal transplantasyon; uygulamada belirli bir standardizasyon olmamasına rağmen tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonu ve psödomembranöz enterokolit tedavisinde oldukça

etkin ve güvenilir olarak görülmektedir. Diğer tedavi rejimlerine oranla oldukça da düşük maliyetlidir (73).

Tıbbi tedavi başarısız kaldığında, bağırsak perforasyonu gelişen veya gelişmek üzere olan şiddetli koliti olan hastalarda, toksik megakolon gelişen hastalarda ölümü önlemek için acil cerrahi nadiren de olsa gerekebilir (35). Bazı merkezlerde yapılan çalışmalarda *C. difficile* kökenlerinin metronidazol ve vankomisine duyarlı oldukları gösterilmiştir (74, 75). Ancak son yıllarda *C. difficile* enfeksiyon tedavisinde kullanılan metronidazol ve vankomisin'e karşı klinik yanıtızsızlıklar ve dirençli kökenlerin varlığı bildirilmiştir (76, 77). Diğer antibiyotiklere dirençlülere göre farklılık göstermekle beraber değişik oranlarda bildirilmiştir. En fazladirenç klindamisin-eritromisin grubunda görülmekte ve yıllar içinde giderek artmaktadır (62, 78, 79).

### **2.3.7. Relaps**

*C. difficile* ishalinin ilk epizodu başarıyla tedavi edilen hastaların yaklaşık %15-25'inde relaps gelişir. Relaps, genellikle vankomisin veya metronidazol tedavisinin kesilmesinden sonraki ortalama bir hafta içinde ishalin ve diğer semptomların tekrar görülmesiyle ortaya çıkar. Relapsların çoğu 10 günlük antibiyotik tedavisine yanıt verir fakat hastaların %3-5'inde altıdan fazla relaps olur (35). Relaps olguları, ilk izolat veya farklı izolat ile oluşabilmektedir (49).

### **2.3.8. Korunma**

*C. difficile*, önemli nozokomiyal bir patojendir (35). Yaşlı hastalar ve uzunsüre hastane ortamında kalanlarda risk daha yüksektir (80). *C. difficile* enfeksiyonuna bağlı ishalin gelişiminin önlenmesi amacı ile bağırsak florasının bozulmasına sebep olan antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması, yatan bir hastada *C. difficile* saptandığı zaman çapraz enfeksiyonu önlemek amacı ile enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumun artırılması gereklidir. Hastanelerde *C. difficile* kaynaklı ishal olgularında yayılma, temas izolasyonu önerileri, uygun çevre temizliği ve el yıkamaya uyum ile önlenmektedir (6).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Çalışma Örneği**

*TcdA* pozitif *C. difficile* 06012 suşu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Ankara)'ndan temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri**

- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Etüv (Mettler UE 600 )
- Otoklav (Hirayama HA-300 M4)
- Hassas terazi (Dikorsan Elektronik San. Tic. LTD)
- Vortex (Velp Scientifica Classic)
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200 R)
- Distile su cihazı
- Tek kanallı otomatik pipetler (Thermo Scientific )
- Jar (Becton Dickinson)
- Bunsen beki
- pHmetre cihazı (HANNA Instruments HI2211)
- Mikrodalga fırın
- Termal döngü cihazı (BIO-RAD T100™)
- Elektroforez tankı ve cihazı (Thermo EC330 Electrophoretic gel system )
- UV görüntüleyicisi (Vilber Lourmant)
- %5 koyun kanlı agar (Becton Dickinson)
- BHI broth (Lab M)

- TSA (Lab M)
- TSB (Lab M)
- Becton Dickinson Gaz pack
- EDTA (BioShop)
- Tris-HCl (BioShop)
- Borik asit (BioShop)
- Agaroz (BioShop)
- Loading Dye (New England BioLabs)
- 10X TBE tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
- $\lambda$  DNA (Fermentas)
- PstI-HF (New England BioLabs)
- NE Buffer4 (New England BioLabs)
- Safe View (abm)
- 0, 2 ml ve 1, 5 ml'lik ependorflar
- Mavi ve sarı filtreli pipet uçları (1000, 200  $\mu$ l) (DNaz-RNaz free)
- Beyaz filtreli pipet uçları (2  $\mu$ l) (DNaz-RNaz free)
- *TcdA*, forward ve reverse primerleri (Macrogen)
- 10X Ex Taq buffer (TaKaRa)
- ExTaq polymerase (TaKaRa)
- MgCl<sub>2</sub> (25mM) (abm)
- dNTP (10mM)mix (abm)
- 10XBamHI buffer (Fermentas)
- BamHI enzyme (Fermentas)
- 10X T4 DNA Ligase buffer (Fermentas)
- T4 DNA Ligase enzyme (Fermentas)

- EcoRI enzyme (New England BioLabs)
- Isı bloęu (Gen-Probe)
- Pudrasız eldiven
- Tek kullanımlık plastik steril özeler
- BIO-RAD InstaGene Matrix
- Gene MATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EUR<sub>x</sub>)
- Su banyosu (Lauda)
- Elektroporasyon küveti (Sigma)
- Elektroporatör (BIO-RAD)

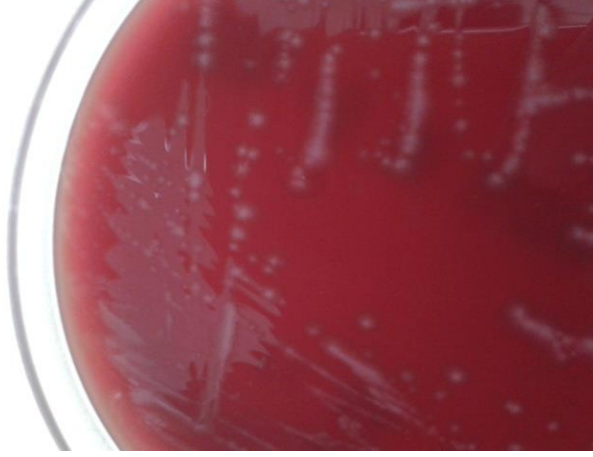
## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. *Clostridium difficile* Suşunun Canlandırılması

Liyofilize olarak temin edilen suş Brain Heart Infusion (BHI) broth ile rehidrate edildi. Hemen %5 koyun kanlı agar'a pasaj yapıp jar'a konup Gaz Pak ile anaerob ortam sağlandı. 37°C'de 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonra üreyen bakteri kolonisinden pasaj yapıldı.



Şekil 11. Anaerop inkübasyon (çalışmamızdan)



Şekil 12. *Clostridium difficile*'nin %5 koyun kanlı agar'daki görünümü (çalışmamızdan)

### 3.2.2. Total DNA Ekstraksiyonu

#### **BIO-RAD InstaGene matrix ile DNA ekstraksiyonu**

*C. difficile* kolonisinden öze ile beş-sekiz tane alınıp ependorfun içindeki 1 mililitre (ml) steril distile sudahomojen hale getirildi. 13000 revolution per minute (rpm: dakikadaki devir sayısı)'de 22°C'de 1dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 200 mikrolitre (µl) BIORAD InstaGene matrix eklenip homojen hale getirildi.56°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yüksek devirde 10 saniye vortekslenip ısı bloğunda 95°C'de sekiz dakika bekletildi. Tekrar yüksek devirde 10 saniye vortekslendi ve 13000 rpm'de 22°C'de 3dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 2 µl PCR için DNA olarak kullanıldı.

#### **Kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonu**

*C. difficile* kolonilerinden öze ile alınıp 1ml steril distile suda homojen hale getirildi. 13000 rpm'de 22°C'de 3 dakika santrifüjden sonra pellet 100 µl distile suda homojen hale getirildi ve 95°C'de 15 dakika bekletildi. Santrifüjden sonra süpernatant PCR için DNA olarak kullanıldı.

### 3.2.3. Toksin A Geninin PCR ile oğaltılması

#### Kullanılan primerler:

TXAF(BamHI): 5'-AAAGGATCCTGTGGTTATAGAAGTGGATTTA-3'

TXAR(BamHI): 5'-TAATTTCTTAGTAGCACAGGGGTACCTT-3'

Reaksiyon (50µl) :

10X ExTaqbuffer : 5 µl

MgCl<sub>2</sub> (25mM): 4 µl

dNTP mix (10mM): 1 µl

Primer Forward (100pmol): 0, 4 µl

Primer Reverse (100pmol): 0, 4 µl

ExTaqpolymerase: 0, 6 µl

dH<sub>2</sub>O: 38, 6 µl

100 µl'lik miks hazırlandı. 50 µl reaksiyon miksinden 0, 2 ml'lik iki ependorfa kondu. Ependorfun birine total DNA'dan 2 µl eklendi, diğerine negatif kontrol olarak DNA eklenmedi.

#### Reaksiyon koşulları:

94°C	3dk	} 35 siklus
94°C	20sn	
52°C	30sn	
72°C	5dk	
72°C	6 dk	

### 3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

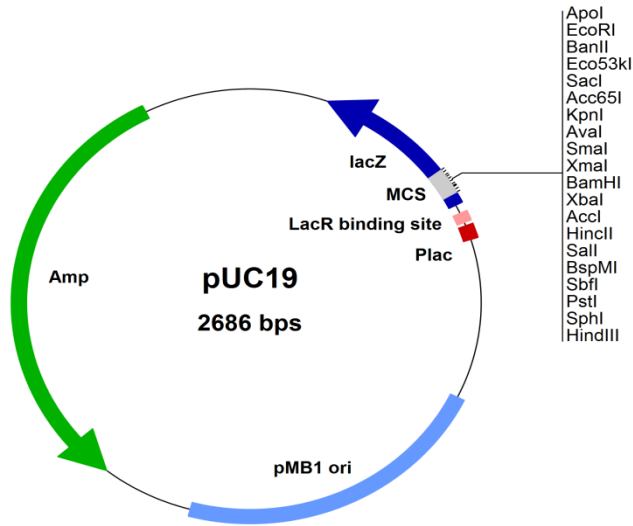
PCR programı tamamlandıktan sonra reaksiyon ürününe 5:1 oranında yükleme tamponu (loading dye) ilave edildi ve hafifçe pipetaj yapılarak homojenize hale getirildi. Elde edilen karışım, markır DNA ile birlikte %1'lik agaroz jelin kuyularına dikkatli bir

şekilde yüklendi ve 100 V'da 30 dakika süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Pozitif amplifikasyon görülen amplikonlar klonlama işlemi için -20 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.5. pUC19 İçeren *E. coli* DH10B Suşundan Plazmid Ekstraksiyonu

*E. coli*'den pUC19 plazmid DNA'sı Gene MATRIX plazmid miniprep DNA purification kit (EUR<sub>x</sub>) kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda elde edildi.

### 3.2.6. PCR ile Çoğaltılan *TcdA* Geni Amplikonlarının ve pUC19 Vektörünün Restriksiyonu



Şekil 13. pUC19 plazmidinin yapısı (81)

Restriksiyon kesim yerleri içeren ve PCR ile çoğaltılmış *tcdA* geni amplikonunu, pUC19 vektörü içerisine klonlamak amacıyla BamHI enzimi ile restriksiyonları yapıldı. Plazmid restriksiyonunun plazmidin tekrar kapanmaması için alkalın fosfataz kullanıldı.

Restriksiyon reaksiyonu (20 µl):

Amplikon için;

10 µl Amplikon

2 µl 10XBamHI buffer

1 µl BamHI enzime

7 µl dH<sub>2</sub>O

pUC19 için;  
10 µl Amplikon  
2 µl 10XBamHI buffer  
1 µl BamHI enzyme  
1 µl Alkalın fosfataz  
7 µl dH<sub>2</sub>O

Hazırlanan restriksiyon reaksiyonları 37°C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5’er µl ile elektroforez yapıldı.

### 3.2.7. Restriksiyon Ürünlerinin Presipitasyonu

Kalan 15 µl kesilen DNA veya plazmide 85 µl distile su eklendi. 100 µl Fenol: Kloroform: İzooamilalkol eklenip karıştırılarak 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Üst fazlar yeni bir ependorfa alınarak (yaklaşık 200 µl) 20 µl 3 M Na Asetat (pH:5, 2) eklenerek karıştırıldı (DNA ve plazmid bu aşamada birleştirildi.). 600 µl %95-100 etanol eklenerek karıştırıldı. 20 dk. -20°C’de bekletildi. 20-30 dk 14000 rpm’de 4°C’de santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak üzerine 600 µl %70’lik etanol eklendi ve 14000 rpm’de 5 dk 4°C’de santrifüj edildi. Üstteki sıvı atılarak pellet kuruduktan sonra 17 µl steril distile suda çözüldü.

### 3.2.8. Restriksiyon Ürünlerinin Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu:

17 µl Plazmid+amplikon karışımı  
2 µl 10X T4 DNA Ligase buffer  
1 µl T4 DNA Ligase enzyme

1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra gece boyunca buzdolabında bekletildi.

Ligasyon sonrası presipitasyon işlemi tekrarlandı.

### 3.2.9. Elektrokompentan *E. coli* DH10B Hücrelerinin Hazırlanması

*E. coli* DH10B ekilmiş plaktan bir koloni alınarak 5 ml Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine inoküle edilerek 37°C’de gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 50 ml TSB içeren tüpe, 1 ml gecelik kültürden inoküle edildi. 37°C’de yaklaşık 3 saat inkübe edilerek

OD600'deki absorbans değeri OD 0,6-0,8 oluncaya kadar inkübe edildi. Sonraki tüm işlemler soğuk zincirde sürdürüldü. Absorbansı 0, 6-0, 8'e olan 50 ml bakteri kültürünü içeren falkon tüp 5000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak pellete 10 ml soğuk steril distile su eklenerek homojenize edildi ve 5 dk buz içerisinde bekletildi. 4°C'de 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek üst sıvı atıldı ve pellet üzerine tekrar 10 ml steril soğuk distile su eklenerek 4°C'de 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Üst sıvı uzaklaştırılarak 10 ml soğuk %10 gliserol içeren steril distile sudan eklenerek karıştırıldı. 4°C'de 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Tekrar üzerine 10 ml soğuk %10 gliserol içeren steril distile sudan eklenerek karıştırıldı ve 4°C'de 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üst sıvı atıldı. Pellet üzerine %10 gliserol içeren steril distile sudan eklenerek karıştırıldı ve 100 µl'lik bölümlere ayrıldı.

### **3.2.10. Ampisilin-Xgal-IPTG Seçici Besiyerinin Hazırlanması**

Tryptic Soy Agar (TSA)'dan 37 gram tartıldı ve 1 litre distile suda eritilip otoklavlandı. Otoklavdan çıkan besiyeri 50-60°C'ye kadar soğutuldu. Petriler içerisine 1 ml steril distile su dağıtıldı. Bu suyun içine 100 µl IPTG (2mM), 50 µl %2'lik Xgal ve 20 µl 100mg/ml'lik ampisilin solüsyonları eklendi. Bunun üzerine sıvı haldeki 19 ml TSA dökülüp hafifçe karıştırıldı.

### **3.2.11. Elektrotransformasyon**

10 µl'lik ligant ile 100 µl kompetan hücre pipet yardımıyla karıştırıldı. 5 dk buz içerisinde bekletildi. Kompetan hücre-ligant karışımı kompetan hücre küvetine aktarıldı. Elektroporatörde *E. coli* programı kullanılarak elektrik şoku verildi. Şoktan hemen sonra 1 ml TSB eklendi ve ependorf tüpü içerisinde 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında Ampisin-Xgal-IPTG içeren besiyerlerinden birine 50 µl, diğerine 200 µl olacak şekilde yayıldı.

### **3.2.12. Plakların İncelenmesi**

Ampisin-Xgal-IPTG içeren plaklarda pUC19 içinde yabancı DNA yoksa koloniler mavi, insert varsa beyaz renk verirler. Plazmid ekstraksiyonu için beyaz kolonilerden 15-20 koloni seçilerek 100 µg/ml ampisilin içeren 2 ml TSB tüplerine ekildi ve 37°C'de

inkübe edildi. Tüpte gelişen hücrelerden daha önce belirtildiği şekilde plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Plazmidlerin elektroforezi yapılarak plazmid ve insert incelendi.

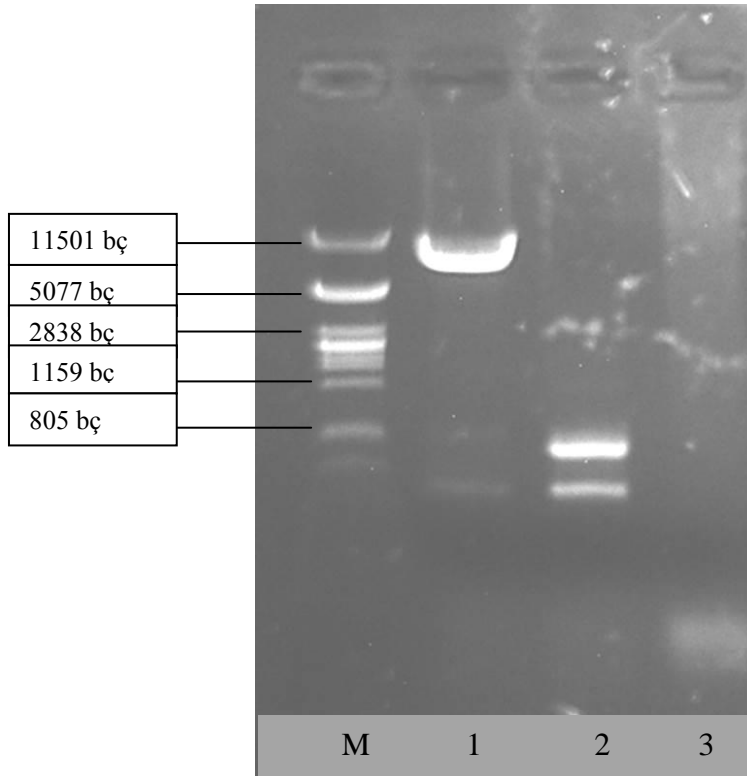
### **3.2.13. Amplikonun Restriksiyon ile Doğrulanması**

Gen bankasındaki sekans analizine göre EcoRI enzimi 4 fragman oluşturmaktadır. Toplam 8133 baz uzunluğundaki amplikon üzerindeki kesim yerleri 2028, 6630 ve 6799 nolu bazlardır. Oluşan fragmanlar ise 2028, 4602, 1395 ve 169 baz çifti uzunluğundadır. Çoğalan amplikon EcoRI enzimiyle kesildiğinde Şekil 14'te görülen ve yukarıdaki uzunluklarla orantılı fragmanlar oluşmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *TcdA* Geninin oğaltılması

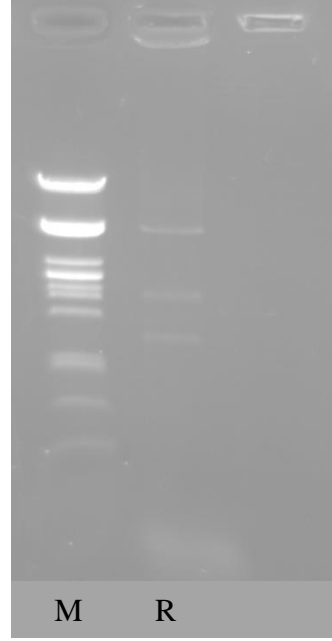
*TcdA* geninin çoğaltılması için *tcdA* geni pozitif olan *C. difficile* suşundan InstaGene matriks ve kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı. Spesifik primerlerle gen çoğaltıldı. Şekil 13'te görüldüğü gibi Insta Gene yöntemiyle toksin genini içeren fragman elde edilirken kaynatma yöntemiyle nonspesifik bir bant elde edildi.



Şekil 14. Spesifik primerlerle *tcdA* geninin oğaltılması. Kullanılan 2 DNA ekstraksiyonundan Insta Gene matrix (1) ile ekstrakte edilen DNA beklenen büyüklükte fragman çoğaltılmasını sağlarken kaynatma yöntemi (2) ile ekstrakte edilen DNA ile nonspesifik bir bant elde edildi. 3 numaralı kuyucuk negatif kontrol için kullanıldı. Marker PstI ile kesilmiş lambda faj DNA'sı (Lambda PstI).

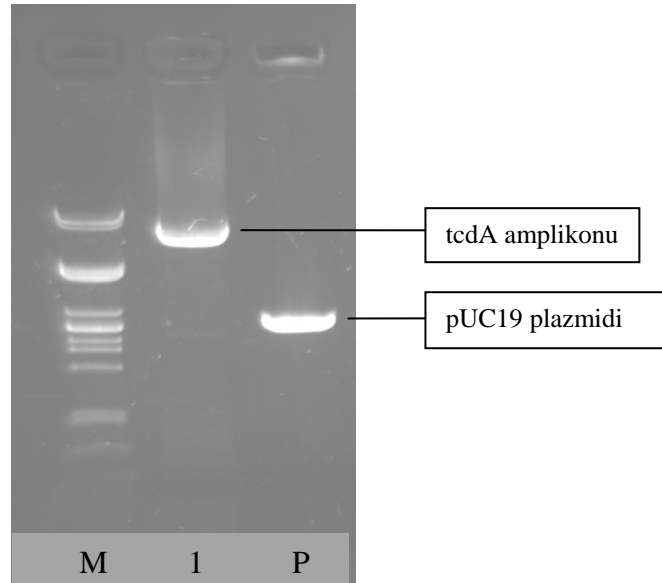
### 4.2. *TcdA* genini içeren Amplikonun EcoRI Enzimi ile Kesilerek Doğrulanması

Amplikonun doğrulanması EcoRI enzimi ile kesilerek yapıldı. Kesim sonunda Şekil 15'te görüldüğü gibi beklenen büyüklükte fragmanlar oluşmuştur. Böylece çoğalan fragmanın toksin geni içerdiği doğrulandı.



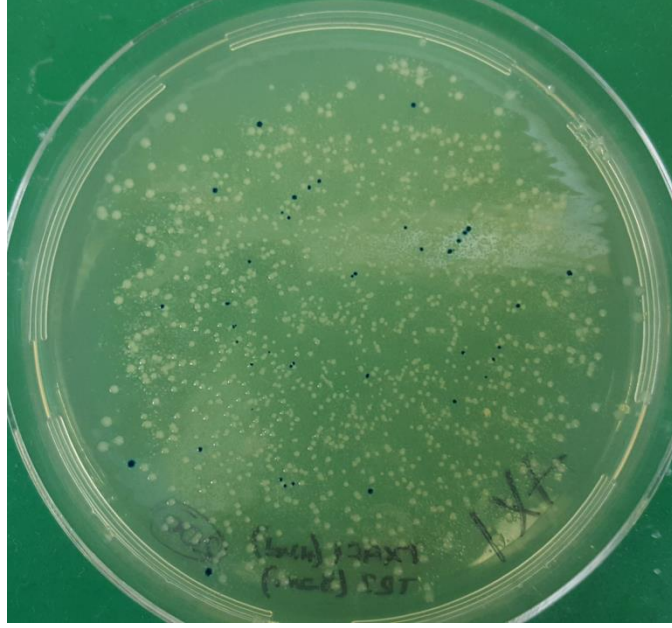
Şekil 15. PCR ile çoğaltılan *tcdA* geninin EcoRI restriksiyonu (R) ile doğrulanması. Kesim sonrasında 4 fragman görülmektedir. Fragmanların beklenen boyları 4602, 2028, 1395 ve 169 baz çiftidir. Marker Lambda PstI

#### 4.3. PCR ile Çoğaltılan *tcdA* geni amplikonu ve pUC19 plazmidinin BamHI enzimi ile Restriksiyonu



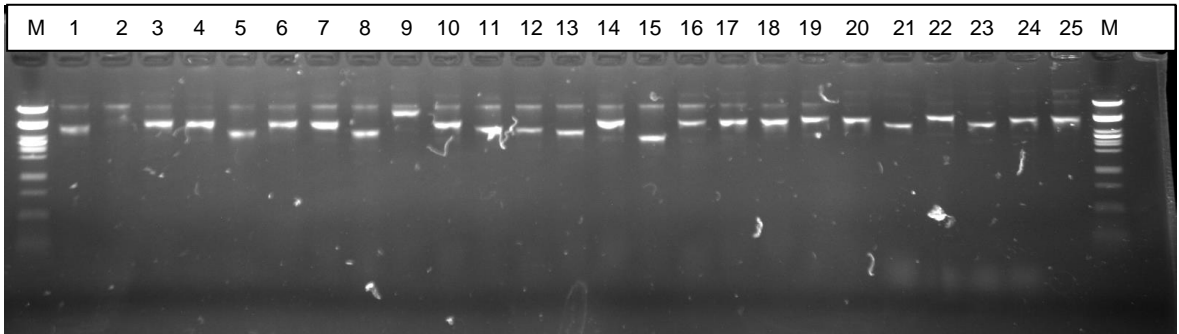
Şekil 16. Bam HI kesim yeri eklenmiş primerlerle çoğaltılan *tcdA* geninin (1) ve pUC19 plazmidinin (P) kesimden sonra %1'lik jelde elektroforezi. Marker Lambda PstI.

#### 4.4. Plakların İncelenmesi



Şekil 17. Transformasyondan sonra seçici besiyerine ekilen transformantların 24 saatlik inkübasyondan sonraki görüntüsü. Mavi koloniler insert almayan, beyaz koloniler insert alan plazmid taşıyan bakterileri gösterir.

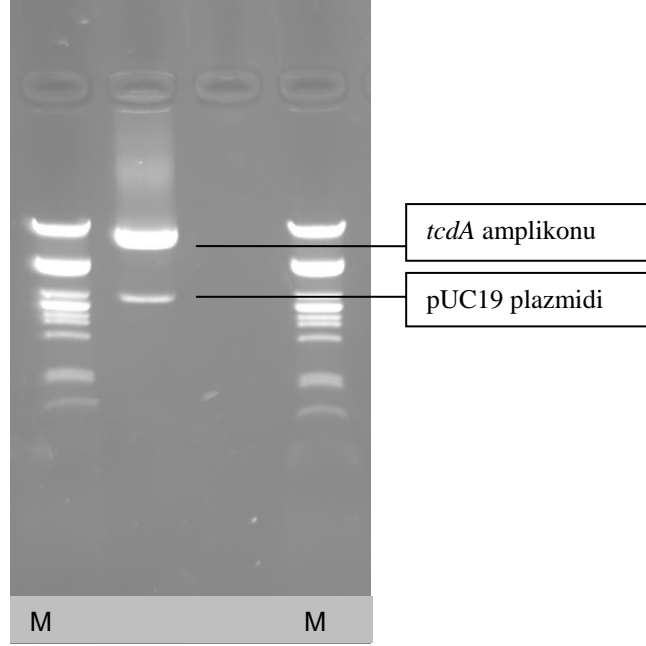
#### 4.5. Seçilen Kolonilerden Ekstrakte Edilen Plazmidlerinelektroforezi



Şekil18. Beyaz koloniler arasından seçilenlerden yapılan plazmid ekstraksiyonu. Plazmidler arasında en büyük inserti 9 numaralı koloninin plazmidinin taşıdığı görülüyor.Marker Lambda PstI.

#### 4.6. En Büyük Plazmid Olan 9 Nolu plazmiddeki İnsertin Görüntülenmesi

Beklenen plazmid boyuna en uygun olduğu düşünülen 9 nolu plazmid alındı ve BamHI enzimi ile kesildi. Kesimden sonra oluşan 2 fragmandan küçük olanı 2,8kb, büyük olanı ise yaklaşık 8kb civarında olup beklenen fragman boyutlarıyla uyumludur.



Şekil 19. Transformantlardan 9 numaralı olanın BamHI enzimi ile kesildikten sonra %1'lik jeldeki elektroforez sonrası görünümü. Kesimden sonra oluşan 2 fragmanın büyük olanı yaklaşık 8 kb'lık *tcdA* fragmanı, diğeri ise yaklaşık 2, 7kb olan ise pUC19'dur. Marker Lambda PstI.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *C. difficile*'nin *tcdA* geninin klonlanması amaçlanmıştır. *C. difficile*, nozokomiyal bir ajan olması ve uygun olmayan antibiyotik kullanımlarının sık görülmesi nedeniyle her yıl milyonlarca insanın enfekte olmasına yol açmaktadır (67). Hastanede yatan hastalar arasında kolonizasyon oranı bir-iki haftalık yatış süresinde %13 iken, dört haftadan fazla yatış süresinde %50'ye kadar çıkmaktadır (47). Son dönemlerde *C. difficile* enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde ülkelere ve merkezlere göre değişiklik göstermekle beraber belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu artışta, mikroorganizmanın virulansı ve uygulanan antibiyotik politikası önemli rol oynamaktadır. Özellikle 2000'li yılların ilk yarısında, dünyanın çeşitli ülkelerinden virulansı yüksek *C. difficile* 027/NAP1/BI kökenine bağlı ölüm oranı yüksek salgınlar bildirilmiştir (61). ABD'de ribotip 027 dışında ribotip 106 ile oluşan *C. difficile* enfeksiyon ve salgınları artan oranda bildirilmeye başlamıştır (49).

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonlarının kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir (82). Lateks aglütinasyon testi, basit ve hızlı bir test olmasına rağmen duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle tercih edilen bir yöntem değildir (1, 3). Çoğu laboratuvar, duyarlılığı düşük olmasına rağmen hücre kültürü sitotoksite testi yerine glutamat dehidrogenaz (GDH) ve toksinleri tespit eden, hızlı ve kolay yapılan enzim temelli immünolojik yöntemleri tercih etmektedir (82). Son dönemlerde yüksek duyarlılığa sahip moleküler testler, sitotoksin testi ile karşılaştırıldığında hızlı olma avantajı nedeniyle yaygın kabul görmektedirler. Ayrıca otomatize olanları ile çok kısa sürede (yaklaşık 1-2 saat) sonuç alınmaktadır (83).

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan ve istenilen gen veya ürününün çoğaltılmasını mümkün kılan bir yöntemdir (84). Rekombinant DNA teknolojisinin ilk adımı 1972 yılına dayanmaktadır. *Hemophilus influenzae*'dan restriksiyon endonükleaz enzimi ayrıştırılmış ve enzim SV40'ın DNA'sını kesmek için kullanılmıştır (85). 1973 yılında DNA klonlaması yapılarak rekombinant DNA oluşturulmuştur. 1978 yılında Genentech şirketi tarafından human insülin üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (86). Gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan

genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılmasının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin açıklanması gibi amaçlarla yapılmaktadır (87).

Rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen toksik olmayan bu proteinler, immunoassay kitlerin kontrol ve kalibrasyonları için doğal toksinlerin yerine ve spesifik monoklonal antikorlar elde etmek için kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada *C. difficile tcdA* ve *tcdB* karboksi terminal bölgeleri *E. coli* ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmiş ve kolaylıkla saflaştırılmıştır (88).

*C. difficile tcdA* geninin üç parça halinde oluşturulduğu bir çalışmada ise her bir parça ardışık olarak komple gene bağlanmış ve pWH1520 vektörüne klonlanmıştır. Gen ekspresyonu için *Bacillus megaterium* sistemi kullanılmıştır (yaklaşık 300 kDa'lık protein). Toksin A, tiroglobülin afinite kromatografisi gibi  $Ni^{+2}$  tarafından saflaştırılmıştır. Rekombinant toksin A'nın sitotoksitesi ve hücre dışında glikozil transferaz aktivitesi gösterilmiştir (89).

*C. difficile* ile ilgili aşı çalışmaları ise devam etmektedir. *C. difficile tcdA* geninin C-terminal reseptör bağlayan bölgesinin (A-rRBP) yedi potansiyel oligosakkarit bağlanma bölgesi içerdiği tahmin edilmektedir. *C. difficile* ilişkili hastalığa karşı aşı adaylarının *tcdA* geninin C-terminal reseptör bağlayan bölgesi veya üç parçasını araştırmak için fare immünite çalışması yapılmıştır (90). *C. difficile tcdA* geninin C-terminal reseptör bağlayan bölgesinin (A-rRBP) vero hücre sitotoksitesi deneyinde toksin A'yı nötralize eden antikor yanıtının meydana geldiği gösterilmiştir. Fakat hamster'larda *C. difficile* sporlarının letal dozuna karşı etkili koruyuculuk tespit edilmemiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda B-rRBD ile formüle edilmiş A-rRBP lipid formunun klinik öncesi çalışmalar ve gelecekte yapılacak klinik araştırmalara mükemmel bir aşı adayı olabileceğini göstermiştir (91).

Bu çalışmada *tcdA* pozitif *C. difficile*'den DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra *tcdA* gen bölgesi çoğaltılmış ve daha sonra pUC19 plazmidine aktarılmıştır. pUC19 plazmidinin elektroporasyonu *E. coli* DH10B kompetan hücrelerine yapılmış ve *C. difficile tcdA* geni, rekombinant toksin sentezi ve ileri çalışmalar için klonlanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *C. difficile tcdA* geni, rekombinant toksin sentezi için klonlanmıştır. Toksin A'nın rekombinant teknoloji ile sentezlenmesi ve saflaştırılması daha ileri çalışmalar için kolaylık sağlayacaktır. Toksinin saflaştırılmasıyla poliklonal ve monoklonal antikorların eldesi, serum antikor düzeylerinin saptanması, enzim aktivitesi üzerine *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılabilmesi mümkün olacaktır.

## ÖZET

Son 20 yılda gerek hastane, gerekse toplum kaynaklı *Clostridium difficile* enfeksiyon insidans ve mortalitesinde belirgin bir artış görülmektedir. Hastalığın patogenezinden toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) sorumludur. Ayrıca son yıllarda hastane salgınlarına neden olan binary toksin tanımlanmıştır. Bu çalışmada *C. difficile* toksin A geninin klonlanması ile toksin A elde edilerek tanı testlerinde kullanılabilecek antijen elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Ankara)'ndan temin edilen *tcdA* pozitif *C. difficile* 06012 suşu kullanılmıştır. Gen bankasından NCBI Reference Sequence: NC-009089.1 nolu *tcdA* sekansı baz alınarak spesifik primerler dizayn edilmiş ve primerler sonlarına BamHI restriksiyon enzim yeri eklenerek modifiye edilmiştir. *C. difficile* suşundan DNA saflaştırılmış ve PCR yoluyla ExTaq polimeraz enzimi yardımıyla *tcdA* genini içeren DNA fragmanı çoğaltılmıştır. Amplikon ve pUC19 plazmidi Bam HI enzimi ile kesilmiş ve ligasyondan sonra *E. coli* DH10B suşuna elektroporasyon yoluyla aktarılmıştır. Rekombinant plazmidler incelenmiş ve *tcdA* geni içeren plazmid seçilerek ileri araştırmalar için stoklanmıştır.

Bu çalışmada *C. difficile tcdA* geni rekombinant toksin sentezi için klonlanmıştır. Toksin A'nın rekombinant teknoloji ile sentezlenmesi ve saflaştırılması daha ileri çalışmalar için kolaylık sağlayacaktır. Toksinin saflaştırılmasıyla poliklonal ve monoklonal antikorların eldesi, serum antikor düzeylerinin saptanması, enzim aktivitesi üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar yapılabilmesi mümkün olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Clostridium difficile*, *tcdA*, klonlama

## ABSTRACT

In the past twenty years, there has been a significant increase in incidence and mortality of both hospital acquired and community acquired *Clostridium difficile*. Toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin) are responsible for the pathogenesis of the disease. Moreover, binary toxin, the cause of hospital outbreaks, has recently been identified. The current study aimed to produce the antigen that can be used in diagnostic tests by cloning *C. difficile* toxin A gene.

In our study, *tcdA* positive strain, *C. difficile* 06012 obtained from Turkey Public Health Association (Ankara) was used. Specific primers were designed according to the reference sequence in Genbank NC-009089.1 and modified by adding Bam HI restriction site to the end. DNA was isolated from *C. difficile* strain and by using Extaq polymerase enzyme, DNA fragment including *tcdA* gene was amplified. Amplicon and pUC19 plasmid were digested with BamHI and ligated, than it was used to transform *E. coli* DH10B strain by electroporation. Recombinant plasmids were studied and the plasmid that contained *tcdA* gene was chosen and stored for further studies.

In this study, *C. difficile tcdA* gene was cloned for the synthesis of recombinant toxin. The synthesis and purification of toxin A by recombinant technology will be helpful for further studies. Using purified toxin production of polyclonal and monoclonal antibodies and, determining serum antibody levels, conducting studies on *in vitro* and *in vivo* enzyme activity will be possible.

**Key words:** *Clostridium difficile*, *tcdA*, cloning

## KAYNAKLAR

1. Gündem, NS. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile*'nin araştırılması. Uzmanlık tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2010.
2. Hakyemez İN, Şimşek F, Yıldırım T, Yöntem B, Aksu A. Antibiyotik ilişkili ishal olgularının değerlendirilmesi. Abant Med J 2012;1(1):16-17.
3. Özinel ME. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak *Clostridium difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 251-254.
4. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 39-41.
5. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 1087-1093.
6. Kostul H. Antibiyotik kullanan hastalarda bağırsak florasının incelenmesi ve *Clostridium difficile* toksin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2012.
7. Öztürk R. Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve tedavi. Ankem Derg 2004; 18 (Ek 2): 82-86.
8. Rupnik M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. Clin Microbio infect. 2001; 7: 417-420.
9. Özkuyumcu C. Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakterioloji El Kitabı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009: 1-22.
10. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 37-57.
11. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 108-112.
12. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi. Yoğun Bakım Dergisi 2005; 5(2): 80-84.

13. Mathieu J. Interactions between autophagy and bacterial toxins: Targets for therapy? *Toxins* 2015; 7: 2918-2958. doi:10.3390/toxins7082918
14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010: 9-21.
15. Batur S, Abacıoğlu H, Öngen B. *Enfeksiyon patogenezi ve bağışıklık*. 1. Baskı, İstanbul: Akademi Yayınevi, 2015: 651-672.
16. Çağatay AA. Sepsis gelişimini kolaylaştıran faktörler ve sepsis patogenezi. *ANKEM Derg* 2006; 20 (Ek 2): 43-46.
17. Wang JE, Jorgensen PF, Almlöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg A. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6) and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* 2000; 68: 3965-3970.
18. Tekeli FA. Süperantijenler ve hastalıklardaki rolü. *Flora Dergisi* 1999; 4(3): 163-169.
19. Yücel AF, Yücel A. Süperantijenler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1996; 16: 1-7.
20. Salman N. Streptococcus pyogenes enfeksiyonları. *Ankem Derg* 2003; 17(3): 252-253.
21. Middlebrook J, Dorland RB. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. *Microbiological reviews*, 1984: 199-221.
22. <https://quizlet.com/26048202/gram-toxigenic-bacilli-flash-cards>
23. Valério E, Chaves S, Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins* 2010; 2: 2359-2410. doi: 10.3390/toxins 2102359
24. Özkuyumcu C. *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2009: 219-230.
25. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008:2350-2363.

26. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:2319-2333.
27. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010:377-389.
28. Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49:390.
29. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* more difficult than ever. N Engl J Med 2008; 359:1932-1940.
30. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. 5. Baskı, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2009:533-552.
31. Deniz U. Toksin isteği ile gelen dışkılarından üretilen *C. difficile* kökenlerinde toksin varyantlarının araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2009.
32. Batur S, Abacıoğlu H, Öngen B. Enfeksiyon patogenezi ve bağışıklık. 1. Baskı, İstanbul: Akademi Yayınevi, 2015: 1037-1054.
33. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? JMD 2011; 13: 6.
34. Vaishnavi C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. Indian J Med Microbiol 2009; 27: 289-300.
35. Ulusoy S, Leblebicioğlu H. Önemli ve sorunlu anaerob bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2005: 169-198.
36. Levent B. Dünyada ve ülkemizde *Clostridium difficile* enfeksiyonlarının önemi ve epidemiyolojisi. Panel 2. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi. Ankara, 15-19 Haziran 2010:1-4.
37. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. International Journal of Infectious Diseases 2007; 11: 5-10.

38. Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D, Kelly S, Boyd D, Mulvey M and the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: A Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. Clin Infect Dis 2009; 48 (5): 568-576.
39. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 529-549.
40. Bauer MP, Notermans DW, Van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, Van Dissel JT, Kuijper EJ, for the ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital based survey. Lancet 2011; 377(9759): 63-73.
41. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:1087-1093.
42. Dial S, Delaney JAC, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid suppressive agents and the risk of community acquired *Clostridium difficile* associated disease. JAMA 2005; 294 (23): 2989-2995. doi:10.1001/jama.294.23.2989.
43. Heinlen L, Ballard JD. *Clostridium difficile* infection. Am J Med Sci. 2010; 340 (3): 247-252. doi:10.1097/MAJ.0b013e3181e939d8.
44. Akova M. Antibiyotikle ilişkili ishalde epidemiyoloji ve risk faktörleri. Ankem Derg 2004; 18 (Ek 2): 80-81.
45. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Aghdam EM, Nazeri S. *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, pathogenesis, risk factors and therapeutic options. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/916826>
46. Huang H, Wu S, Chen R, Xu S, Fang H, Weintraub A, Nord CA. Risk factors of *Clostridium difficile* infections among patients in a university hospital in Shanghai, China. Anaerobe 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.015>
47. Boral ÖB. *Clostridium difficile* infeksiyonu ön tanımlı hastaların gaita örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002;32:220-224.

48. Arda B. Nozokomiyal diyare. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2004; 8: 271-281.
49. Kılıç A. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenez, klinik özellikler, tanı ve tedavi. Mikrobiyol Bul 2013; 47 (3): 556-566.
50. Janezic S, Marín M, Martín A, Rupnik M. A new type of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strain lacking a complete *tcdA* gene. J Clin Microbiol 2015 53: 692–695. doi:10.1128/JCM.02211-14.
51. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM and Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1988; 56: 2299-2306
52. Carter GP, Rood JJ, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. Trends Microbiol 2012; 20 (1): 21-29.
53. Dupuy B, Govind R, Antunes A, and Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by *TcdC*. JMM 2008; 57: 685-689.
54. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_009089.1?report=genbank&from=795843 & to=80397586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_009089.1?report=genbank&from=795843 & to=80397586)
55. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 421-427.
56. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile* associated diarrhea in adults. Can. Med. Assoc. J. 2004; 171: 51–58.
57. Lale Z, Doğruman AI, Fidan I, Adıyaman G, Yeşilyurt E, Özkan S, Çağlar K. İshalli hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin A/B sıklığının araştırılması. ANKEM Derg 2013; 27 (2): 55-59. doi:10.5222/ankem.2013.055
58. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain. Gastroenterology 2009; 136: 1913-1924.
59. Humphries RM. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. Clinical Microbiology Newsletter 2012; 34(19): 151-157.

60. Drummond LJ, McCoubrey J, Smith DGE, Starr JM, Poxton IR. Changes in sensitivity patterns to selected antibiotics in *Clostridium difficile* in geriatric in patients over an 18 month period. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52: 259-263. DOI10.1099/jmm.0.05037-0
61. Ülger NT, İlki A, Akgül Ö, Söyletir G. Marmara Üniversitesi hastanesi'nde izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinin antibiyotiklere direnç durumu. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2011; 1 (3): 162-165.
62. Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *The Lancet*. 2008;371 (9623):1486-1488
63. Hull M, Beck PL. *Clostridium difficile* associated colitis. *Can Fam Physician* 2004; 50: 1536-1545.
64. Schmidt ML, Gilligan PH. *Clostridium difficile* testing algorithms: What is practical and feasible? *Anaerobe* 2009; 15: 270-273.
65. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile* associated disease. *J. Antimicrob Chemother*. 1998; 41: 29-40.
66. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2010; 31 (5): 431-455.
67. Ardiç N. *Clostridium difficile* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. *Klimik Dergisi* 2004; 17 (3): 142-145.
68. Mizusawa M, Doron S, Gorbach S. *Clostridium difficile* diarrhea in the elderly: Current issues and management options. *Drugs Aging* 2015; 32: 639–647. DOI 10.1007/s40266-015-0289-2
69. Moyenuddin M, Williamson JC, Ohl CA. *Clostridium difficile* associated diarrhea: Current strategies for diagnosis and therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4 (4): 279-286.

70. Cornely OA. Current and emerging management options for *Clostridium difficile* infection: What is the role of fidaxomicin? *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (6): 28–35.
71. Yang Z, Ramsey J, Hamza T. Mechanisms of protection against *Clostridium difficile* infection by the monoclonal antitoxin antibodies actoxumab and bezlotoxumab. *Infect Immun* 2014; 83: 822-831.
72. Badger VO, Ledebroer NA, Graham MB, Edmiston CE. *Clostridium difficile*: Epidemiology, pathogenesis, management and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36 (6): 645-662.
73. Korkut E, Özden A. Fekal transplantasyon. *Güncel gastroenteroloji* 2012; 16 (2): 143-146.
74. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E and Poxton I, on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (11): 1048-1057.
75. Hecht DW, Galang MA, Sambol SP, Osmolski JR, Johnson S, Gerding DN. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 2716–2719.
76. Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48: 741–742.
77. Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3028–3032
78. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34: 516–522.

79. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, and CDAD-CSI Study Group. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 3473–3475.
80. Akgül Ö. Nozokomiyal ishallerde *Clostridium difficile* sıklığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2010.
81. [http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04\\_vector\\_sys/standard\\_cloning\\_vectors.html](http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/standard_cloning_vectors.html)
82. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(12): 1053-1066.
83. Öngen B. Tanı sorunları yaşanan bakteriyel enfeksiyonlar. Gastrointestinal sistem etkenleri: *Campylobacter*, *Clostridium difficile*. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya, 10-13 Kasım 2013: 11-18.
84. Koçoğlu T, Yalçınkaya T. Rekombinant DNA teknolojisi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 1992; 26: 177-188.
85. Nathans D, Danna K. Studies of SV40 DNA. *Journal of Molecular Biology* 1972; 64 (2): 515-518
86. Russo E. The birth of biotechnology. *Nature* 2003; 421: 456-457
87. Kuk S, Erensoy A. Gen klonlama, plazmit seçimi ve *Fasciola hepatica* cathepsin L1 uygulamaları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008; 32 (1): 16-22.
88. Letourneur O, Ottone S, Delauzun V, Bastide MC, and Foussadier A. Molecular cloning, overexpression in *Escherichia coli* and purification of 6his-tagged C-terminal domain of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Protein Expression and Purification* 2003; 31: 276-285.
89. Burger S, Tatge H, Hofmann F, Genth H, Just I, and Gerhard R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 307: 584-588.

90. Huang JH, Shen ZQ, Lien SP, Hsiao KN, Leng CH, Siu LK, Sing Chon PC. Biochemical and immunological characterization of truncated fragments of the receptor-binding domains of *C. Difficile* Toxin A. PLoS ONE 2015; 10(8): e0135045. doi:10.1371/journal.pone.0135045
91. Huang JH, Wu CW, Lien SP, Leng CH, Hsiao KN, Liu SJ, Chen HW, Siu LK, Chong P. Recombinant lipoprotein-based vaccine candidates against *C. difficile* infections. Journal of Biomedical Science 2015; 22: 65. DOI 10.1186/s12929-015-0171