



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOKSİN İSTEĞİ İLE GELEN DIŞKILARDAN ÜRETİLEN
C.DİFFİCİLE KÖKENLERİNDE TOKSİN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

**DR. Umut DENİZ
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL 2009



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOKSİN İSTEĞİ İLE GELEN DIŞKILARDAN ÜRETİLEN
C.DİFFİCİLE KÖKENLERİNDE TOKSİN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

**DR. UMUT DENİZ
UZMANLIK TEZİ**

Danışman:DOÇ.DR. NURVER ÜLGER

İSTANBUL 2009

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince bana yol gösteren, bilgilendiren, deneyimlerini aktaran, tezle ilgili çalışmalarımda sabırla yönlendiren, uzmanlık eğitimim boyunca emeği geçen tüm değerli hocalarıma, karşılıklı uyum, anlayış ve yardımlaşma içinde aynı çatı altında çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, uzmanlarıma, çalışmalarım sırasında bana daima destek olan aileme

Teşekkür ederim.

Dr. Umut Deniz

ÖNSÖZ	
SUMMARY	6
ÖZET	8
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	10
2.GENEL BİLGİLER	12
2.1 TARİHÇE	12
2.2 MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER	13
2.3 KLİNİK.....	14
2.4 RİSK FAKTÖRLERİ.....	16
2.5 EPİDEMİYOLOJİ	17
2.6 PATOGENEZ.....	18
2.6.1 TOKSİN A	18
2.6.2 TOKSİN B.....	19
2.6.3 BİNARY TOKSİN	21
2.6.4 C.DİFFİCİLE TOKSİN VARYANT TIPLERİ.....	22
2.7 TANI YÖNTEMLERİ	23
2.7.1 BİYOKİMYASAL TESTLER	23
2.7.2 RADYOLOJİK İNCELEMELER	23
2.7.3 MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER	
2.7.4. TOKSİN ARAMAYA YÖNELİK TESTLER	25
2.7.5. İMMÜNODİYAGNOSTİK TESTLER	26
2.7.6. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	27
2.8. TEDAVİ	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. GEREÇLER.....	28
3.1.1. Besiyerleri	28
3.1.2. STANDART KÖKENLER	29
3.1.3. Kimyasal Maddeler	30
3.1.4. PZR Malzemeleri:	30
3.1.5. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	30
3.2 YÖNTEMLER.....	31
3.2.1. HASTA SEÇİMİ	31

3.2.3.C.DİFFİCİLE İZOLASYONU:.....	32
3.2.4. IMMUNO-CARD (MERİDYEN) ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ:	32
3.2.5. TRIAGE PANEL ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ:.....	33
3.2.6.RAPİD ID 32 A:.....	34
3.2.7. C.DİFFİCİLE DNA ELDE EDİLME PROSEDÜRÜ:..	34
3.2.8. TOKSİN GENLERİNİN PZR İLE SAPTANMASI:	35
3.2.9. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR):	35
3.2.10. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ:.....	36
3.3 ARAŞTIRMA ETİK KURUL ONAYI.....	37
4. BULGULAR	37
5.TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR.....	54

SUMMARY

Clostridium difficile, is an anaerobic, gram(+), spor forming bacteria, which is the cause of a wide spectrum diseases; from a self-healing diarrhea to fulminant pseudomembranous enterocolitis; due to antibiotic usage. Toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin) are responsible for pathogenesis of the disease. In recent years, "binary toxin" leading nosocomial infections was defined. In our study, the stool samples which were sent for examining *C.difficile* toxin to the Marmara University Microbiology Laboratory, were used. We aimed, to determine the existence of the toxin by EIA method and making isolation of the *C.difficile* isolates from cultures of the same samples. We tried to determine, the genes, which are responsible for toxin production and existence of the binary toxin gene or variant isolates, in the obtained isolates. In addition, for investigating the ability of the toxin production of the isolates were determined by EIA method and their toxin determining performances, in stool were compared. In the period of September 2006-March 2008 totally 633 stool samples were processed and incubated in anaerobic condition by inoculation to CCFA (cycloserin,cefoxitin, fructose agar) selective medium. The toxin A/B existence were searched by enzyme immunoassay (Immunocard-Meridian) method from isolates and also from the stool samples. In 30 of the *C.difficile* produced stools, toxin positivity was determined and when we reexamine toxin from cultures of the 20 isolates which were isolated from toxin negative stools, we determine the toxin production in 6 of them. The isolates were examined by another enzyme immunoassay method (Triage *C.difficile* Panel-Biosite) and existence of toxin A and the common antigen (glutamate dehydrogenase) is searched. In all of the isolates, shared antigens is determined, but toxin A positivity is determined in 22 isolates (%44), by this method. Totally from 50 patients, *C.difficile* isolates were isolated; *tdcA* gene for the existence of toxin A, *tdcB* gene for toxin B and *cdtA* and *cdtB* genes for the binary toxin are searched by PCR. Totally from 36 isolates (%72) in which the positivity was determined from culture and stool; toxin A and toxin B genes were found positive, but binary toxin gene wasn't found in anyone. Our

results, will form a database for the knowledge of toxin gene situation of *C.difficile* isolates in patients with diarrhea due to antibiotic usage in a given period of time in our hospital and monitor the possible changes that may develop in future.

ÖZET

C.difficile, antibiyotik kullanımına bağlı, kendiliğinden iyileşen akut ishalden fulminant pseudomembranöz enterokolite kadar değişen, geniş bir yelpazede hastalıklara yol açan, gram pozitif, sporlu, anaerob bakteridir. Hastalığın patogenezinden toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) üretimi sorumludur. Son yıllarda hastane salgınlarına da neden olan “binary toksin” varlığı tanımlanmıştır. Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, *C.difficile* toksin bakılması isteği ile gönderilen dışkı örnekleri kullanılmıştır. Örneklerden EIA yöntemi ile toksin varlığının saptanması ve aynı örneklerin kültürlerinden ise *C.difficile* kökenlerinin izolasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen izolatlarda toksin üretiminden sorumlu genlerin belirlenmesi, toksin varyant kökenler veya “binary toksin” geni varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Ayrıca rutinde kullanılan toksin testlerinin yeterliliğini araştırmak amacıyla, izole edilen kökenlerin toksin üretimi iki farklı EIA yöntemi ile belirlenip toksini saptama performansları kıyaslanmıştır. Eylül 2006-Mart 2008 tarihleri arasında toplam 633 dışkı örneği işleme alınmış, CCFA (sikloserin,sefoksitin-fruktoz agar) seçici besiyerine ekilerek anaerob ortamda inkübe edilmiştir. Gerek dışkı örneği gerekse izole edilen kökenlerden enzim immunoassay (İmmunocard-Meridian) yöntemi ile toksin A/B varlığı araştırılmıştır. *C.difficile* üretilen dışkıların 30’unda toksin pozitifliği saptanmış, toksin negatif olan dışkılarından izole edilen dışkılarından 20 kökenin kültüründen yeniden toksin çalışıldığında 6 kökende toksin üretiminin olduğu saptanmıştır. Kökenler diğer bir enzim immunoassay yöntemi (Triage *Clostridium difficile* Panel-Biosite) ile çalışılmış, toksin A ve ortak antijen (glutamat dehidrogenaz) varlığı araştırılmıştır. Kökenlerin hepsinde ortak antijen pozitif saptanmış, ancak bu yöntemle 22 kökende (%44) toksin A pozitifliği saptanmıştır. Toplam 50 hastadan *C.difficile* kökenleri izole edilmiş, PZR ile toksin A varlığı için *tcdA*, toksin B varlığı için *tcdB* ve “binary toksin” için *cdtA* ve *cdtB* genleri bakılmıştır. Kültürden ve dışkıdan pozitiflik saptanan toplam 36 kökenden (%72) toksin A ve toksin B genleri pozitif bulunmuş, hiçbir kökende “binary toksin” geni saptanmamıştır. Sonuçlarımız, belli bir zaman

diliminde hastanemizde antibiyotiğe bağlı gelişen ishallerdeki *C.difficile* kökenlerinin toksin geni durumunun bilinmesi ve ileride gelişebilecek değişiklikleri izleyebilmek için bir veri tabanı oluşturacaktır.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotiklerin keşfinden sonra bakteri kaynaklı infeksiyon hastalıklarının çoğunun tedavisi sorun olmaktan çıkmış, mortalite ve morbidite oranlarında önemli düzeyde azalmalar kaydedilmiştir. Ancak, antibiyotiklerin kullanılması istenmeyen bir takım yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında gelişen ve başka nedenle açıklanamayan ishaller genel tanımla “antibiyotikle ilişkili ishal” olarak adlandırılırlar. Antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-25’inde etken *Clostridium difficile*’dir. Bunların kliniği kendini sınırlayan ishalden psödomembranöz kolite kadar değişen geniş bir yelpazede seyredebilir. Pseudomembranöz kolitlerin ise %99’undan *C.difficile* sorumludur (1).

Önceleri klindamisin kullanımı ile ilişkilendirilen *C.difficile* kolitinin, kolon florasına etkili ampisilin, amoksisilin ve sefalosporinler gibi diğer antibiyotiklerin kullanımından sonra da ortaya çıktığı saptanmıştır (1).

C.difficile’ye bağlı infeksiyonların oluşmasında antibiyotik kullanımından başka, hastanede kalış süresi, altta yatan hastalığın şiddeti, yaşlılık, yoğun bakımda yatma, bağırsakların ameliyat öncesi mekanik temizliği, radyasyon gibi çok değişik faktörlerde rol oynamaktadır (2).

C.difficile, sağlıklı kişilerin yaklaşık %0-3’ünün barsak florasında saptanırken, yeni doğanların gastrointestinal sisteminde %60-70 oranında kolonize olabilmektedir (1).

Hastalığın oluşmasına toksin salgılayan *C.difficile* kökenleri neden olmaktadır. Bu kökenlerin, patogeneizde önemli role sahip, moleküler ve biyolojik aktiviteleri iyi tanımlanmış ve birbirlerinden farklı iki toksin; toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) salgıladıkları bulunmuştur. Son yıllarda toksin A ve toksin B üretiminde farklılıklar veya toksin genlerinde varyant gelişmiş kökenler (Toksın A-/B+ gibi) saptanmıştır. Ayrıca, bazı ülkelerde

hastane salgınlarına neden olan, toksin A ve B'den farklı, "binary toksin" üreten kökenler bildirilmiştir (3).

Toksin isteği ile gelen dışkı örneklerinden üretilen *C.difficile* kökenleri ile yaptığımız bu çalışmada; *C.difficile* üretilen hastalardan, anket formu doldurulmuş daha sonra klinik bulgular ile toksin varlığı arasında ilişki irdelenmiş,hem dışkıdan hem de kültürden enzim immünassay yöntemi (İmmuno-card) ile toksin A ve B araştırılmış, yine kültürden enzim immunassay yöntemi (Triage *Clostridium difficile* Panel) ile toksin A ve *C.difficile* ortak antijeni (glutamat dehidrogenaz) çalışılmıştır. İzole edilen kökenlerde aynı zamanda PZR ile genotipik olarak toksin A, toksin B ve "binary toksin" varlığına bakılmıştır.

Bu çalışmanın amacı dışkı örneklerinden EIA yöntemi ile toksin varlığının saptanması ve aynı örneklerin kültürlerinden ise *C.difficile* kökenlerinin izolasyonunun yapılması,bu kökenlerin toksin üretiminin iki farklı EIA yöntemi ile belirlenip toksini saptama performanslarının kıyaslanması ,elde edilen izolatlarda toksin üretiminden sorumlu genlerin belirlenmesi,toksin varyant kökenler veya "binary toksin" geni varlığının saptanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

Psödomembranöz enterokolit (PMC), ilk kez 1893 yılında Finney tarafından tarif edilmiştir. Mide tümörü nedeni ile ameliyat edilen 22 yaşında bayan hasta, 15 günlük postoperatif progresif ishalin ardından kaybedilmiş, yapılan otopside; ince barsaklarda “difterik kolitis” gözlenmiştir (4).

Clostridium difficile ilk defa 1935 yılında “Hall” ve “O.Toole” tarafından, bir yaştan altındaki semptomsuz çocukların dışkı ve mekonyumlarından izole edilmiştir. Bu bakterinin izolasyonunun güç ve üremesinin yavaş olması nedeniyle, difficult (güç, zor) kelimesinden esinlenerek “*Bacillus difficilis*” adı verilmiştir (4.5). Daha sonra yapılan çalışmalarla, bazı *C.difficile* kökenleri sıvı kültür filtratlarının, deney hayvanlarına subkütanöz veya intraabdominal yolla verilmesiyle öldürücü toksik etki oluşturduğu saptanmıştır (6).

C.difficile ile ilgili yayınlar 1950-1960’lı yıllara kadar sınırlı sayıda ve farklı alanlarda yapılmıştır. McBee(7) *C.difficile*’yi 1960 yılında Antarktika’da ayı balıklarının barsak muhtevasında izole etmiştir . Daha sonra 1960’lı yılların sonları ile 1970’li yılların başlarında klindamisin, linkomisin’in antimikrobiyal kemoterapide yoğun olarak kullanılmasıyla PMC görülme oranında artış tespit edilmiştir. Tedesco ve ark. (8) klindamisin kullanımı ile PMC arasındaki ilişkiyi saptamışlardır.

Larson ve arkadaşları (9), 1977 yılında antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen PMC’li bir hastanın dışkı filtratının, doku kültürü hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini göstererek, kaynağı bilinmeyen bir toksinin varlığını öne sürmüşlerdir . Bu çalışmadan bir yıl sonra da Bartlett ve arkadaşları (10) sitotoksinin kaynağının *C.difficile* olduğunu tespit etmişlerdir. O zamandan beri *C.difficile* hafif diyareden ,şiddetli diyareye ,psödomembranöz kolite kadar

değişen spektumda hastalığa neden olan bir bakteri olarak tanımlanmaktadır(11).

2.2 MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

Clostridium kökenlerinin, Colins ve arkadaşları (12) tarafından 16S rRNA (ribozomal ribonükleik asit) dizi analizine göre yapılan filogenetik dendrogramında *C.difficile*, diğer patojenlerden *C.sordelii* ve *C.difermentans* ile birlikte 11. küme içerisine yerleştirilmiştir.

C.difficile, subterminal oval sporlu, hareketli, kapsülsüz, zorunlu anaerob bir çomaktır. Genç kültürlerde daima gram pozitif boyanma özelliği göstermekle beraber, yaşlı kültürlerde gram negatif boyanmaya eğilimi vardır (13).

Bakterinin dışkı gibi kontamine örneklerden izolasyonunda, sikloserin (500 mg/ml) ve sefoksitin (16mg/ml) gibi antimikrobisidler, fruktoz ve nötral kırmızısı bulunduran “Cycloserine-Cefoxitine- Fructose Agar (CCFA)” gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır. CCFA besiyerinde; *C.difficile* 48 saatlik anaerobik inkübasyon sonunda 2-3 mm çapında S tipi koloniler oluşturmaktadır. Bir hale ile çevrili, buzlu cam görünümündeki koloniler, uzun dalga ultraviyole (UV) ışığı altında incelendiğinde, açık yeşilden sarıya kadar değişebilen refle vermektedir (5,14,15,16).

C.difficile'nin, eskulini hidrolize ettiği, katalaz, üreaz, lesitinaz ve lipaz aktivitesine sahip olmadığı, jelatini eritmediği, H₂S ve indol oluşturmadığı, glikoz ve manitolü fermente ettiği ancak diğer şekerlerden laktoz, sükroz, maltoz, arabinoz, glisin, rafinoz ve ramnoz üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bilinmektedir (13,14,16,17). Diğer yandan *C.difficile*, p-hidroksifenilasetik asitten p-krezol açığa çıkararak kendine özgü at pisliği kokusu oluşturmaktadır (15).

Antibiyotiğe bağlı ishal patogenezinde rol oynayan toksijenik suşlar üç toksinin değişik kombinasyonlarını üretirler. Bunlar toksin A (enterotoksin), toksin B (sitotoksin) ve üçüncü toksin “binary toksin”. Klasik bilgilere göre, Toksin A ve toksin B ana virulans faktörleri olarak tanımlanmaktadır. Son dönemde giderek önem kazanan “binary toksin” ilk kez 1988 yılında Popoff ve ark. tarafından izole edilmiştir (18). Bu toksinin prevalansı ve patogenezdaki rolü hala araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bakteriden toksin A ve B salınımı üzerine etkili *tcdR*,*tcdE* ve *tcdC* genleri tesbit edilmiş ve bu genler tarafından kodlanan proteinlerin toksinler üzerine etkisinin *C.difficile*'nin virülansını doğrudan etkilediği tesbit edilmiştir.Özellikle *tcdC* geni *tcdA* geni üzerinde negatif regülatör etki göstermekte toksin A salınımını baskılamaktadır.Bu gendeki bir delesyon toksin A 'nın aşırı salınımına neden olmaktadır(19).

2.3 KLİNİK

C.difficile ile ilişkili hastalıklar değişik klinik tablolar sergilemektedir. Bu klinik tablolar asemptomatik taşıyıcılık, kendini sınırlayan ishalden ciddi ishale, psödomembran yaparak veya yapmadan gelişen kolite kadar değişebilmekte, komplike durumlarda ise toksik megakolon, perforasyon ve peritonite kadar ilerlemektedir. Antibiyotik tedavisi ile ilişkilendirilen *C.difficile* ishali ile antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishalin ayırımının yapılması önemlidir. Antibiyotik tedavisi bittikten 6- 8 hafta sonrasında dahi semptomlar ortaya çıkabilmekte ve bu durum tanısal karışıklığa yol açabilmektedir (20,21).

Tablo 1. Antibiyotik ilişkili ishal ile *C.difficile*'ye bağlı ishal arasındaki farklılıklar (20)

Özellik	<i>C.difficile</i> ishal	Diğer etkenlerle ilişkili ishal
Sık neden olan antibiyotik	Klindamisin, sefalosporinler, Penisilinler	Klindamisin, sefalosporinler, amoksisilin-klavulonat
Öykü	Genellikle antibiyotik intoleransına dair öykü yok	Antibiyotik kullanım sonrası ishal öyküsü genellikle var
Klinik bulgular		
İshal	Ciddi kramp şeklinde karın ağrısı, ateş, dışkıda lökosit	Genellikle hafif; kolit bulgusu yok
BT veya endoskopi bulgusu	Kolit	Genellikle normal
Komplikasyon	Hipoalbuminemi, toksik megakolon; tedavi sonrası relaps görülebilir	Dehidratasyon dışında komplikasyon pek görülmez
Dışkıda <i>C.difficile</i> toksini	Pozitif	Negatif
Epidemiyolojik bulgular	Hastane içinde epidemiler görülebilir	Genellikle sporadik veya endemik olarak bulunur
Tedavi		
Sorumlu antibiyotiğin kesilmesi	Düzelebilir, ancak genellikle sürer	Genellikle düzelir
Antiperistaltik ilaçlar	Kontrendike	Genellikle yararlı
Oral metronidazol/ vankomisin	Süratle yanıt verir	Gereksizdir

2.4 RİSK FAKTÖRLERİ

En önemli risk faktörleri arasında antibiyotik kullanımı, ileri yaş(>65 yaş), hastanede yatış süresi, nazogastrik tüp kullanımı, gastrointestinal sistem operasyonu geçirmiş olmak, antiperistaltik ilaç ve kemoterapötik kullanımı bulunmaktadır (22).

İshal ile ilişkili *C.difficile* enfeksiyonunda, en önemli predispozan faktörün antibiyotikler olduğu saptanmıştır. *C.difficile* kolonizasyonu ve enfeksiyonunun önlenmesinde en önemli bariyer normal barsak florasıdır. *C.difficile* kalın barsak sistemine ulaşmış olsa bile, barsak florasının diğer komponentleri tarafından baskılanarak kolonize olması önlenir ve bu durumda çoğu zaman klinik asemptomatiktir. Ancak barsak florası antibiyotik kullanımı sonucu çoğu zaman etkilenir ve *C.difficile* bozulan barsak florasını fırsat bilerek kolonize olur ve enfeksiyona yol açabilir. *C.difficile* enfeksiyonunun en çok ilişkilendirildiği antibiyotikler klindamisin, sefalosporinler ve ampisilinlerdir. *C.difficile* enfeksiyonun ortaya çıkışına uzanan dönem içinde bu antibiyotiklerin alındığı belirlenmiştir. Tablo-2’de *C.difficile* enfeksiyonuna neden olan antibiyotikler görülmektedir.

Tablo 2. *C. difficile* isheline neden olan antibiyotikler (10)

Sıklıkla	Ampisilin ve amoksisilin, Sefalosporinler, Klindamisin
Daha az sıklıkla	Tetrasiklin, Sülfonamid, Makrolid, Kloramfenikol, Trimetoprim, Kinolon
Çok nadir	Parenteral aminoglikozit, Metronidazol, Basitrasin, Vankomisin

2.5 EPİDEMİYOLOJİ

C.difficile doğada yaygın olarak bulunabilen bir bakteridir. Hastane kaynaklı ishallerin ise %8-10'unu oluşturmaktadır (22). Hastalar sıklıkla hastanede yatan hastaların çevresinde bulunan sporların varlığı nedeni ile kolonize olabilirler. Antibiyotiğe bağlı ishal etkeni olan *C.difficile*'nin sporları hastanelerde tuvalet, küvet, yer zeminlerinde, termometre, tansiyon aleti manşonunda sık olarak saptanabilmekte ve semptomatik hasta taburcu edildikten sonra hasta odalarında ve yer zeminlerinde aylarca canlı kalabilmektedir (23). Çevre, özellikle hastane çevresi *C.difficile* için ana kaynaktır. Spor ısıya dirençlidir çevrede yıllarca kalabilir. Hastanede kontamine yüzeylerde bulunur ve sağlık çalışanlarının elleri aracılığıyla ile geçiş gerçekleşebilir (22).

C.difficile hastane personelinin elleri ile hastadan hastaya taşınabilir. El yıkama, eldiven kullanımının artırılması bulaşı önlemek için doğrudan hastalarla temas olan yoğun bakım ünitelerinde özellikle çok önemlidir (23).

Enfeksiyon için bilinen önemli risk faktörü infekte hasta ile aynı odayı paylaşmaktadır. Böylece hastadan hastaya veya çevreden hastaya çapraz bulaşma ile enfeksiyon gelişebilmektedir (22,23). Toksik C.*difficile*'nin çeşitli gruplarda izole edilme oranları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Toksik C.difficile'nin çeşitli gruplarda izole edilme oranları (22)

Grup	C. difficile izolasyon oranı %
Psödomembranöz enterokolit	95-100
Antibiyotiğe bağlı ishali hastalar	15-25
Antibiyotik tedavisini önceden almış, ishali olmayan hastalar	10-20
Hastanede yatanlar	10-25
Sağlıklı erişkinler	<3
Sağlıklı yenidoğan ve bebekler	5-70

2.6 PATOGENEZ

Patogeneizde en önemli faktör bakterinin ürettiği ve asıl kliniği oluşturan toksinleridir.

2.6.1 TOKSİN A

Toksin A enterotoksisite gibi biyolojik aktivitelere sahip bir proteindir. Yapılan çalışmalarda molekül ağırlığının 308 kDa olduğu tesbit edilmiştir (19).

Yapılan moleküler çalışmalar toksin A'nın üç fonksiyonel bölümden oluştuğunu açığa çıkarmıştır. N-terminal uç toksin A'nın sitotoksisitesinden sorumludur. Orta bölümde bulunan transmembran domaini toksini sitozol içine taşımaktadır. Toksin A'nın C-terminal ucunda yer alan

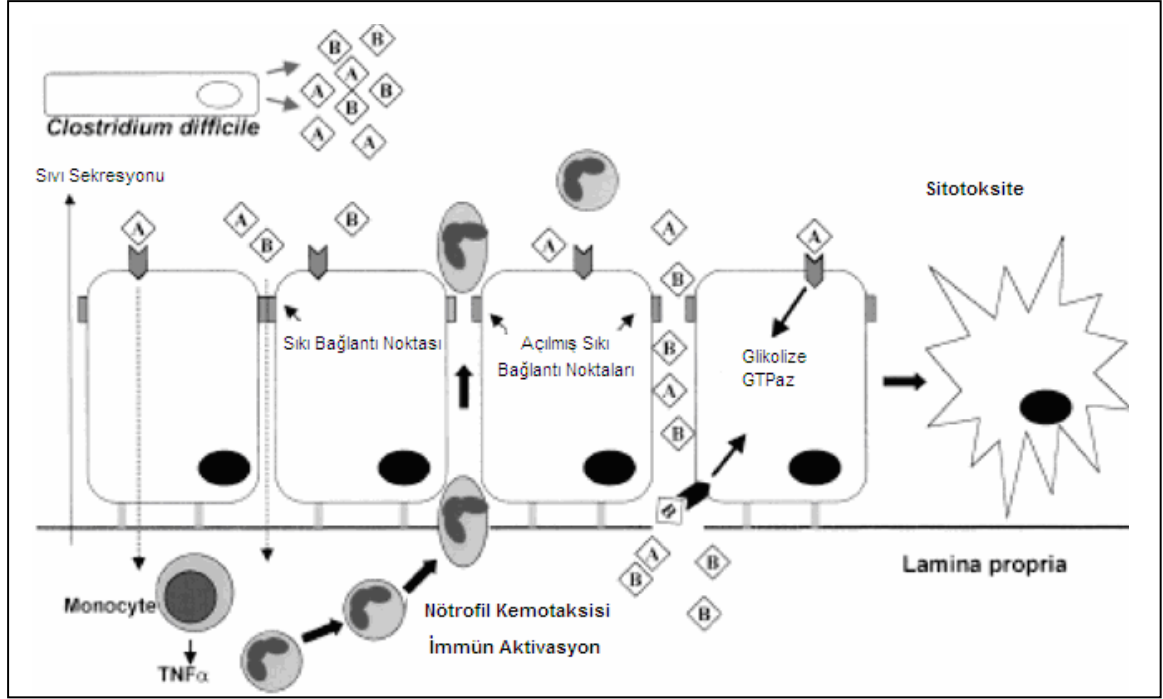
tekrarlayıcı yapıların konak hücre yüzeyindeki reseptörü tanıdığı ve bu reseptöre bağlanmada işlev gördüğü saptanmıştır (19).

Enterosit yüzeyindeki reseptörler doğumda henüz yapısal olarak olgunlaşmamış olup toksin bağlama kapasiteleri çok düşüktür. Bu durum sağlıklı yenidoğanlarda toksijenik *C.difficile* suşlarının sık olarak (%60-70) izole edilmesine rağmen hastalığın görülmemesini açıklamaktadır (24).

Bağırsak mukoza hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu oluşan ishalin nedeni toksin A'dır (19). Bu toksinin enterositleri direkt olarak etkilemeyip, enterositlerin altındaki mikrovaskülariteye sahip endotel tabakasına ulaşarak kemotaktik etkiyle bölgeye polimorf nüveli lökosit (PNL)'lerin göçünü uyardığı ve sekonder doku hasarına sebep oldukları iddia edilmiştir. Toksikite mekanizması monosit ve makrofajlardan TNF-alfa IL-8, IL-1 salınımı sonucu inflamasyon bölgesine nötrofillerin göç etmesi, lamina propriada inflamasyon ve vasküler konjesyona neden olması şeklinde açıklanmıştır. Toksin A mukoza hücrelerinde doğrudan apoptozise neden olduğu gibi, monosit ve makrofaj gibi sitokin üreten hücreleri aktive ederek bu hücrelerden sitokin salınımına ve lokal doku tahribine yol açmaktadır (19).

2.6.2 TOKSİN B

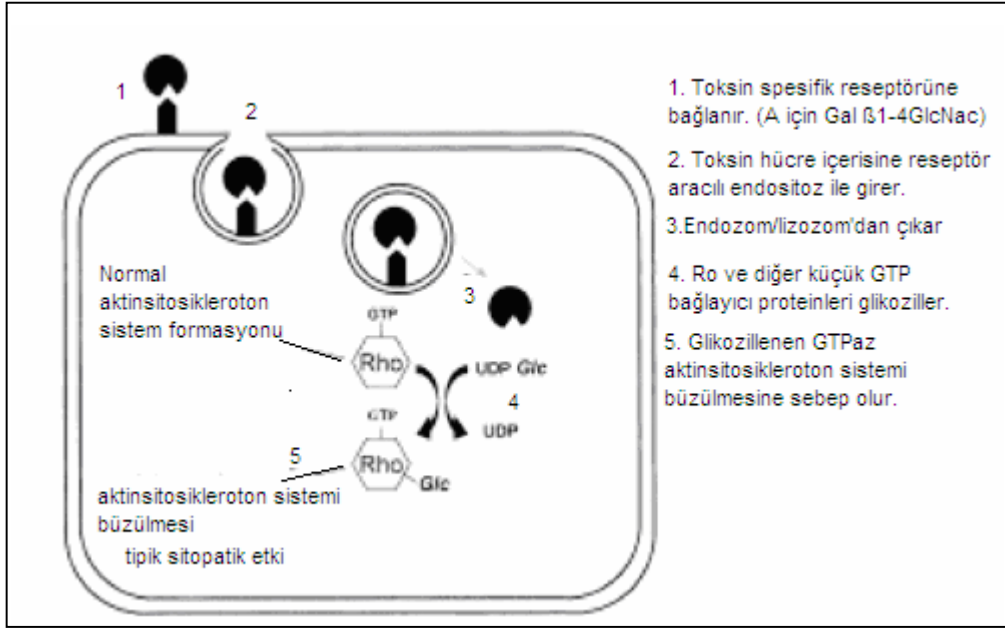
Toksin B, 270 kDa molekül ağırlığında sitotoksik bir proteindir, aktin polimerizasyonundan sorumlu Rho ailesine ait proteinlere etki ederek, aktin depolarizasyonuna, dolayısı ile hücre iskeletinin bozulmasına ve hücrenin yuvarlaklaşmasına neden olmaktadır (19).



Şekil 1. *C.difficile* toksin A ve B'nin intestinal epitel üzerine etkisi(20)

Toksin B ile muamele edilen barsak hücrelerinde apoptoza özgü morfolojik belirtiler saptanmıştır. Rho ailesi proteinleri aktin polimerizasyonunu sağlar. Toksin B, Rho proteinlerini monoglikozilleyerek inaktif hale getirir. Sonuçta hücrede büzülme ve yuvarlaklaşma meydana gelir. Böylece enterositlerde apoptoz gerçekleşmiş olur (19).

Toksin A, majör patojenik enterotoksindir. Toksin B ise sitotoksik etkisi aracılığı ile epitelyum hücrelerinde harabiyete neden olmaktadır. Sonuçta mukoza hasarı ile birlikte etkilenen barsak segmenti içine nötrofiller göç etmektedir. Toksin B'nin sitotoksik etkisi toksin A'dan 1000 misli daha güçlüdür (19).



Şekil 2. C.difficile toksin'lerinin hücre içi etkisi(19)

2.6.3 BİNARY TOKSİN

Binary toksin üreten *C.difficile* kökeni ilk kez Popoff ve ark. tarafından 1988 yılında PMC'li bir hastadan izole edilmiştir (18). Yapılan çalışmalarda bu kökenin (CD 196), aktin spesifik ADP-ribozil transferaz ürettiği ve *C.perfringens*'in I-toksin'ine yapı ve aktivite olarak benzerlik gösterdiği saptanmıştır (25,26).

Aktin spesifik ADP ribozil transferaz (CDT), iki birbirinden bağımsız protein birimden oluşmuştur, bunlar enzimatik komponent CDT a (48 kDa) ve bağlanma komponenti CDT b (99 kDa) olarak adlandırılmıştır. Bağlanma komponenti, bir hücre yüzey reseptörüne sahiptir. Enzimatik komponent, hücre içinde aktinin ADP'sinin ribozillenmesini katalizliyerek hücre iskeletinin bozulmasına neden olmaktadır (26,27). Toksinin sitotoksik etkisi, Vero hücrelerinde yuvarlaklaşma, aktin flamanında depolarizasyon varlığıyla gösterilebilir.

Binary toksin geninin tanımlanması, semptomatik hastalardan izole edilen bazı nontoksijenik A-/B- kökenlerin oluşturduğu ciddi kliniği açıklamaya yardım etmiştir. Bu toksine sahip kökenlerin prevalansı çeşitli çalışmalarda %1.6'den %5.5'e kadar değişmektedir ve patogenezdaki rolü hala araştırılmaktadır (27).

2.6.4 C.DİFFİCİLE TOKSİN VARYANT TIPLERİ

C.difficile'nin ana virulans faktörü olarak bilinen toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB) dışında üçüncü toksin olarak (binary toksin CDT) bazı kökenlerde saptanmıştır (28). Tablo-4'de *C.difficile* toksin varyantlarının çeşitli kombinasyonları görülmektedir.

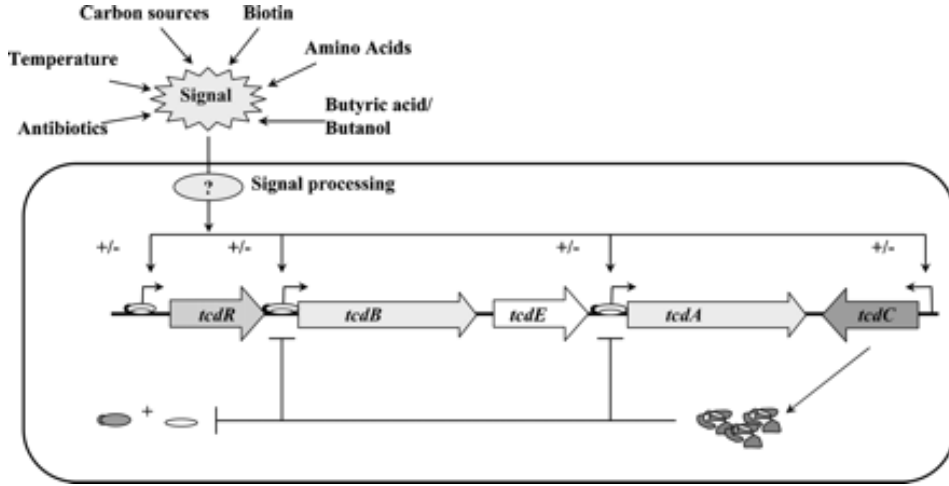
Tablo 4. *C.difficile* Toksin Varyant Tipleri* (27)

Toksin Varyant Tipleri	Clostridium Toksinleri		Binary Toksin	Referans Kökenler
	TcdA	TcdB	CDT	
CDT-A+B+	+	+	-	VPI 10463
CDT+A+B+	+	+	+	51377
CDT-A-B+	-	+	-	1470
CDT+A-B+	-	+	+	8864
CDT+A-B-	-	-	+	IS 58

* Toksin üretim tipleri üç farklı toksinin farklı kombinasyonları ile tanımlanır, toksin tipleri ise tcdA ve tcdB genlerinin varlığına göre tanımlanır.

Patogenezdaki bakteriden toksin salınımını etkileyen birtakım proteinlerin olduğu saptanmış ve bunlar "pathogenicity locus" (PaLoc) adı verilen kromozomal bir lokus üzerine yerleşmiştir. Bu genler tcdR, tcdE ve tcdC olarak adlandırılmış ve bunların kodladığı TcdR, TcdE ve TcdC proteinlerinin toksin salınımını üzerine etkileri olduğu bulunmuştur. Toksin A üzerinde negatif regülatör görevi gören tcdC genindeki delesyon toksin A aşırı salınımına neden olmaktadır.

dir. Salgınlara neden olan epidemik kökenlerde aşırı toksin A salınımına *tcdC* genindeki bu delesyonun yol açtığı saptanmıştır(19).



Şekil 3. *C.difficile* toksin genin TcdC tarafından regülasyonu(19)

Üretilen bu toksinler bağırsak epitelinde hasara yol açabilir. Daha sonraki dönemde bu hasarın ilerlemesi inflamatuvar hücre, fibrin, musin ve hücresel debrislerin birikimine, mukoza nekrozu ve psödomembran oluşumuna neden olur ve psödomembranöz enterokolit gelişir (29).

Klinik hastalığa toksin A ve B'nin yanı sıra *C.difficile*'nin diğer potansiyel virulans faktörleri katkıda bulunabilir. Bu faktörler polisakkarit kapsül, fimbria, flagella gibi yapılar ve hyolurinidaz, kondroitin-4-sülfataz, jelatinaz, kollejenaz gibi hidrolitik enzimlerdir (30).

Patogenezde ilk adım barsak epitelinin *C.difficile* ile kolonizasyonudur. Konak hücrelerine adhezyon, patojen suşların virulansı için önemlidir. Virulansı fazla olan suşların adherensi, virulan ve toksijenik olmayan suşlardan çok daha fazladır. Toksin A fazla üreten suşların toksin A az üreten suşlara göre daha virulan olduğu tesbit edilmiştir. Bu durum toksin A'nın barsak epiteli üzerinde kendine ait reseptörüne bağlanarak patogenezin ilk basamağını

oluşturduğunun göstergesidir. Tüm olgularda adherensin en belirgin olduğu bölgeler terminal ileum, çekum ve kolondur (30,31). *C.difficile* hareketlidir ve flajellası vardır. Bağırsakta hücrelere bağlanmayı sağlayan yapılardan biri fimbrialardır. Bu yapıların kolonizasyondaki rolü açık değildir. Mikroorganizmanın fizikokimyasal özellikleri de adezyona katkıda bulunur. *C.difficile* 'nin hücre yüzeyi hidrofobiktir ve pozitif yük taşır. Negatif yüklü konak hücre duvarı ile ilişkisinin *C.difficile*'nin bağırsakta kolonize olmasına katkıda bulunuyor olabileceği düşünülmektedir (30).

2.7 TANI YÖNTEMLERİ

C.difficile enfeksiyonlarının tanısı öykü, klinik bulgular ve laboratuvar bulguları ve gerektiğinde de endoskopi ile konmaktadır.

2.7.1 BİYOKİMYASAL TESTLER

Lökositozun yanında, ciddi hastalarda gelişen enteropatiye bağlı olarak dehidratasyon, protein kaybı sonucunda ortaya çıkan hipoalbüminemi ve diğer bazı elektrolit anomalileri saptanabilir. Yine dışkıdaki lökositlerin saptanması *C.difficile* enfeksiyonunu destekleyen diğer bulgulardır (20).

2.7.2 RADYOLOJİK İNCELEMELER

Abdominal radyografi ve bilgisayarlı tomografi *C.difficile* enfeksiyon tanısında yardımcı olsa da bu amaçla en çok tercih edilebilecek radyolojik inceleme endoskopi ile dir. Abdominal radyogramda kolon ve çekumdaki dilatasyonları, ince bağırsaktaki hava-su seviyesini görmek mümkündür. Endoskopik yöntemlerde ise kolon duvarındaki lezyonlar incelenir. Tipik psödomembran formasyonu yoksa kısmen non spesifiktir (32).

2.7.3 MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER

2.7.3.1 Mikroskopik İnceleme

Antibiyotik ile ilişkili ishal mikroskopisinde gram boyama ile lökositler görülebilir. Bu bulgunun tanı değeri yoktur ve duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür (5).

Floresan mikroskop ile *C.difficile* duvar antijenlerine karşı işaretlenmiş antikolar kullanılarak gaita yaymasının incelenmesi, kültür ve sitotoksisite testi ile %93 korelasyon göstermektedir. Ancak bu test, *C.bifermantans* ve *C.sordellii* ile çapraz reaksiyon vermektedir. Dışkının direkt incelemesinde lökositlerin görülmesi tanıyı desteklemektedir.

2.7.3.2 Kültür

C.difficile, kanlı agar besiyerinde, 48 saatlik anaerob inkübasyonu takiben, hemolizsiz, at dışkısı kokusunda, sarımsı-yeşil floresans veren yaklaşık 2-4 mm çapında, koloniler oluşturmaktadır. Bakterinin izolasyonunda en fazla kullanılan besiyeri CCFA'dır. *C.difficile* indikatörlü (nötral kırmızısı) CCFA besiyerinde UV lambası altında incelendiğinde floresans veren, yaklaşık 2-4 mm çapında, altın sarısı renginde koloniler oluşturur (5,15) .

C.difficile'nin antibiyotikle ilişkili ishale neden olduğunun anlaşılmasından sonra çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunu arttırmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Dışkının 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırılmasının ardından oda ısısında en az 45 dakika bekletilmesiyle (alkol-şok), kontaminant çoğu bakterinin öldüğü ve *C.difficile* izolasyonunun önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (15). Sodium taurocholate'ın da *C.difficile* sporlarının vegetatif forma geçmesini kolaylaştırdığı ve % 0.2 oranında CCFA besiyerine eklenen sodium taurocholate'ın, örneklerdeki az sayıdaki *C.difficile*'nin saptanmasında yararlı olduğu görülmüştür (16).

Kültürün duyarlılığı yüksektir. Ancak, yöntemin kompleks oluşu, toksijenik ve nontoksijenik suşları ayırt edememesi gibi nedenlerle merkezi

laboratuvarlarda uygulanır ve daha çok salgın zamanlarında epidemiyolojik açıdan önem kazanır. Kültür, toksin testleri ile kombine bir şekilde yapılmalıdır (5,33).

2.7.3.3 Gaz-likit Kromatografisi

Anaerob bakteriler metabolizmaları sonucu uçucu spesifik metabolitler oluşturmaktadırlar. *C.difficile*'ye özgü metabolitlerin (isovalerik asit, isokaproik asit, p-kresol) gaz-likit-kromatografisi ile belirlenmesi ile identifikasyonu yapılmaktadır. Özel düzenekleri gerektiren bu yöntem ancak büyük laboratuvarlarda uygulanmaktadır (5).

2.7.4 TOKSİN ARAMAYA YÖNELİK TESTLER

2.7.4.1 Doku Kültürü

Dışkı örneklerinde 10 pg'lik sitotoksin saptayabilen doku kültürleri, toksin varlığını araştırmada altın standart olarak kabul edilir. Bu yöntemde, Hep2, CHO, HeLa ve Vero gibi hücre kültürleri kullanılmaktadır. Sıvı dışkı örnekleri santrifüje edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar hücre kültürü kaplarına eklenir. İnkübasyon sonrası, ışık mikroskopunda sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Nötralizan antikor (anti-*C.sordelli* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar. Doku kültürünün avantajı özgül ve duyarlı olması, dezavantajı ise uzun sürede sonuç alınması, uygulanmasının zor, zahmetli ve pahalı olmasıdır (5,33).

2.7.5 İMMÜNODİYAGNOSTİK TESTLER

2.7.5.1 Enzim immünoassay (EIA)

Dışkıda *C.difficile* toksinlerinin saptanması amacıyla yönelik olarak sadece toksin A veya hem toksin A hem de toksin B'yi saptayabilen birçok ticari kit üretilmiştir. Değişik çalışmalarda sadece toksin A'yı veya toksin A-B'yi beraber saptayabilen testlerin duyarlılıkları % 63-99 ve özgüllükleri ise %75-100'e kadar değişen oranlarda bildirilmiştir (5,32).

C.difficile'ye bağlı ishal hastalarının mikrobiyolojik tanısında hücresel sitotoksite testleri altın standart olarak kabul edilse de, EIA testlerinin kısa sürede sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin daha kolay, bunun yanısıra ucuz olması nedeniyle klinik laboratuvarlar da alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir (33).

Ticari kitlerin bir kısmı sadece toksin A'yı saptamaya yöneliktir, Toksijenik *C.difficile* suşlarının % 8'inin varyant toksin ürettiği göz önüne alındığında sadece toksin A'yı saptayan kitlerin yerine toksin A ve B'yi birlikte saptayabilen kitler tercih edilmesi önerilmektedir (3,33).

2.7.5.2Lateks Aglütinasyon Testi

Hızlı, basit ve ucuz bir testtir. Bu testlerin esası antikor ile kaplı lateks partikülleri yardımı ile toksin A'nın saptanmasıdır. Lateks aglütinasyon testlerinin hızlı taramalar için uygun olduğu ama pozitif sonuçların diğer testlerle doğrulanması gerektiği bildirilmektedir. Diğer testlere oranla duyarlılığının %48-59 gibi düşük oranlarda olması nedeni ile yaygın kullanım alanı bulamamıştır (5,32).

2.7.6. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

2.7.6.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu yöntem klinik örneklerdeki az miktardaki *C.difficile* DNA'sının amplifikasyonu sonucunda saptanabilir hale getirilmesi temeline dayanmaktadır. Toksin A ve toksin B'nin saptanması için bu toksinlerin genomik yapısına uygun primerler kullanılmaktadır. Kültürde üretim aşamasını atlayarak direkt dışkı örneğinden çalışılabilmesi en önemli avantajıdır (5). Günümüzde, daha önce altın standart olarak kabul edilen sitotoksik testlere alternatif yöntem olarak gösterilmektedir. Fakat bu yöntem ile dışkının transportunun gecikmesi gibi durumlar sebebi ile çeşitli inhibitörler salınmakta ve bu sebeple PZR ile toksinler tesbit edilememektedir.

C.difficile kökenlerinin PZR ile spesifik toksin A ,toksin B ve "binary toksin" primerleri ile toksin gen durumu saptanabilmekte ve bu kökenler içerisinde varyant kökenler var ise bunlar tesbit edilmektedir.

Sonuçta, bu yöntemlerin hepsinde birtakım avantaj ve dezavantajlar vardır. Tüm hastalar için aynı tanı yöntemini kullanmak uygun olmayabilir. Sonuçların yorumunda klinikle uyumu esas alınmalıdır.

2.8. TEDAVİ

Tedavide en önemli adım kullanılmakta olan antibiyotiğin kesilmesidir. Hafif ve orta şiddette enfeksiyonların önemli bir bölümü antibiyotiğin kesilmesine ve destekleyici tedaviye gayet iyi yanıt verir. Fakat daha ağır enfeksiyonlarda ve altta yatan hastalığı olanlarda buna ek olarak oral metronidazol ya da vankomisin tedavisi gerekir. Basitrasin ,teikoplanin ve fusidik asit gereğinde kullanılabilir. Metronidazol *C.difficile*'ye in vitro olarak çok etkili olduğu gibi vankomisinden de ucuzdur. Tedavi başlanacak hastalarda ilk olarak metronidazol seçilmelidir.

İlk seçenek olan metronidazol ve vankomisin dozu, süre ve avantajları tablo 5'de belirtilmektedir.

Tablo 5. *C.difficile*'ye bağlı ishal için metronidazol veya vankomisin tedavisi(36).

	Metronidazol	Vankomisin
Doz	250-500mg	125-500mg
Sıklık	Günde 4 veya 2 kez	4 veya 2
Verilme yolu	oral, iv	Oral
Süre	10-14 gün	10-14 gün
Cevap oranı	>%96	>%96
Fiyat	20 Amerikan doları	800 Amerikan doları
Dezavantajları	Sistemik yan etkiler; <i>C.difficile</i> suşlarında nadir direnç gelişir	Hastane kaynaklı rezistan bakteri

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1 .1.Besiyerleri

1-FOX (sefoksitin) katkılı kıymalı Besiyeri (bu besiyeri laboratuvarımızda hazırlanmıştır.)

2-CCFA Besiyeri (BioMerieux)

3-%5 Koyun Kanlı Agar (BioMerieux)

FOX (sefoksitin) katkılı kıymalı besiyerinin hazırlanışı:

Kalp kasi.....500gr (kıyma şeklinde)

Distile su.....1000ml

NaOH(1N).....25ml

Yukarıda maddelerden oluşan karışım kaynatıldıktan sonra buzdolabında 1 gece bekletilir. Yüzeyde oluşan yağ tabakası alınır.Gazlı bezden süzdürülür.Kıyma parçacıkları birkaç defa distile su ile yıkanarak NaOH uzaklaştırılır,ardından temiz gazlı bezler üzerine yaydırılarak kurulanır.Süzdürülmüş sıvıya aşağıdaki kimyasal maddeler eklenir.

Triptikeyz.....30gr

Maya özeti.....5gr

K₂HPO₄.....5gr

L-sistein.....0.5gr

Hemin(%1solüsyon).....0.5ml

K vitamini(%1 solüsyonu).....0.1ml

Üzerine 1000ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir.L-sistein dışındaki maddeler karıştırılıp eriyinceye kadar ısıtılır ve soğumaya bırakılır. 50°C ısısında iken karışıma L-sistein eklenir. Yaklaşık 0.5gr kıyma, 15x90mm ölçüsündeki burgulu

tüplere konur, üzerine 7ml sıvı kısım eklenerek 121°C'de 15dk steril edilir.1 ml'de 8mg olacak şekilde her bir kıymalı tüpe sefoksitin eklenir.

3.1.2. Standart Kökenler

1. NCTC 11223 *C. difficile* (toksin A/B (+) kontrol kökeni) *
2. HU 25591 *C. difficile* (binary toksin (+) kontrol kökeni) **
3. HU 10010 *C. difficile* (binary toksin (+) kontrol kökeni) **

* : NCTC 11223 *C.difficile* toksin A/B (+) kontrol kökeni Prof.Dr. Mine Yücesoy tarafından temin edilmiştir.

** : HU 25591 ve HU 10010 *C. difficile*, binary toksin (+) kontrol kökenleri Prof.Dr. Elizabeth Nagii (Macaristan) tarafından temin edilmiştir.

3.1.3. Kimyasal Maddeler

1. NaOH (Merck)
2. HCl (Merck)
3. EDTA (Sigma)
4. Tris-HCl (Sigma)
5. Agaroz (Sigma)
6. Etidyum bromid (Sigma)

3.1.4. PZR Malzemeleri:

1. 1kb Ladder DNA (MBI Fermentas)
2. λ DNA (MBI Fermentas)
3. 6 x Loading Dye (MBI Fermentas)
4. 10xTBE tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
5. 1xTBE tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
6. 2x PCR Master karışımı (MBI Fermentas)

7. DNaz - RNaz içermeyen distile su (MBI Fermentas)
8. 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik ependorflar (DNaz -RNase içermeyen) (AXYGEN)
9. Sarı ve mavi pipet uçları (500,200,100 µl)(DNaz -RNase içermeyen) (AXYGEN)
10. Beyaz pipet uçları (2 µl) (DNaz -RNaz Free) (USA-SCIENTIFIC)
11. *TcdA*, *TcdB*, *cdtA*, *cdtB* revers ve forward primerleri (IDT)
12. Eldiven (Beybi)
13. Tek kullanımlık steril özeler (Peel here)

3.1.5.Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

1. Pastör pipeti
2. Deney tüpü
3. Pipet ucu (Sarı,mavi,beyaz)
4. Ependorf
5. Sporlar
6. Otomatize sistemler (miniApi)
7. Otoklav (Hireyama)
8. Vorteks (Elektromag, Yellow line)
9. Su banyosu (Elektromag)
10. Tek kanallı otomatik pipet (Pipetmen, Socorex, Thermo)
11. Kaba terazi (Scaltec)
12. Santrifüj (Hettich)
13. Etüv (Binder, Dedeoğlu)
14. Pastör fırını (Kermanlar, Elektro mag)
15. İnokülatör
16. Buzdolabı (Arçelik)
17. (- 20 °C) Derin dondurucu (Arçelik, Uğur)
18. (- 45 °C) Derin dondurucu (Fiocchetti)
19. pH metre cihazı (Hana Instruments)
20. Mikrodalga fırın (BEKO)

- 21.Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO RAD)
- 22.Elektroforez tankı ve cihazı (Biometra)
- 23.UV görüntüleyicisi (Vilber Lourmant)
- 24.Anoxomat cihazı
- 25.Oxigen gen bag, gen box

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1. Hasta Seçimi:

Çalışma kapsamına, eylül 2006-mart 2008 arasında ishali olan hastalardan alınan ve Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örneklerinden, *C.difficile* toksin bakılması isteği ile başvuran hasta örnekleri alınmıştır.

3.2.2.Hasta Anket Formu:

İşleme alınan gaita örneklerinde *C.difficile* üremesi olan hastalar'ın doktoru ile temasa geçilip dosyasından hasta ile ilgili bilgiler öğrenilip anket formu dolduruldu. Buna göre; ishalin şiddeti, süresi, hastane ile ilişkili olup olmadığı, yakınmaları (ateş, karın ağrısı v.b.), laboratuvar değerleri (PMNL sayısı, kan albümin değeri v.b.) ve pozitif testten önceki ay antibiyotik tedavi alma öyküsü gibi bilgileri forma işlendi.

3.2.3.C.difficile İzolasyonu:

C.difficile toksin isteği ile gelen tüm dışkılar işleme alındı. Bu dışkılar direkt olarak CCFA (sikloserin, sefoksitin-fruktoz, agar) besiyerine ekildi aynı zamanda alkol şok yöntemi ile dışkı bire bir oranda etil alkol ile karıştırılarak bir saat ara ara çalkalamak sureti ile oda ısısında bekletildikten sonra pastör pipeti yardımı ile 100µl örnek alınarak CCFA besiyerine, koyun kanlı besiyerine ve

sefoksitin içeren kıymalı besiyerine ekimi yapıldı, petriyerler 2 gün gen bag içerisinde anaerob inkübasyona kaldırıldı. Sefoksitin içeren kıymalı besiyerinden ise 2 gün sonunda koyun kanlı besiyerine yeniden ekim yapılarak yine 2 günlük anaerob inkübasyona kaldırıldı. Peş peşe gönderilen dışkı örneklerinden, aynı hastaya ait *C.difficile* izolatları tek bir köken olacak şekilde kabul edildi.

3.2.4. Immuno-Card (MERİDYEN) Çalışma Prosedürü:

Immuno-card (Meridyen) test kiti bir membran üzerinde toksin A/B 'ye karşı hazırlanan immobilize monoklonal anti-toksin A ve poliklonal anti-toksin B antikorları taşır. Dışkıdaki toksinin tutunması sonucu mavi renk oluşması ile pozitif olarak değerlendirilen enzim immunoassay bir testtir. Bu kit dışkıdaki 3 ng/ml toksin A ve toksin B'yi tespit edebilmektedir.

Elde edilen suşlar BHİB (brain-heart-infision-broth)'a ekimi yapılarak 5 günlük anaerob ortamda inkübasyona bırakıldı. Beş gün sonunda 20 dakika 3000 devirde, içerisine ekim yapılan tüpler çevrilerek elde edilen üst kısım kit'in önerdiği şekilde çalışıldı (28).

Test tüpüne 200µl dilüent, üzerine 3 damla enzim konjugatı eklendi bu karışıma 25µl dışkı veya kültürden hazırlanan santrifüj süpernatanı konularak 10 sn vortekslendi. Sonrasında 5 dk inkübe edildi. Hazırlanan örnekten test kartının alt iki bölümüne 150µl konuldu ve 5 dakika bekletildi. Test kartının üst iki bölümü olan reaksiyon bölümüne ise 3 damla yıkama solüsyonundan damlatıldı. Yıkama solüsyonu absorbe olunca substrattan 3 damla üst iki bölüme konuldu. 5 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda reaksiyon bölümünde pozitif kontrol penceresinde mavi renk oluştu. Örnek penceresinde de mavi renk oluşmaları da pozitif olarak değerlendirildi (34).

3.2.5. Triage Panel Çalışma Prosedürü:

Triage *Clostridium difficile* Panel kiti membran üzerinde toksin-A ve ortak antijen (glutamat dehidrogenaza)'e karşı spesifik antikörler taşır. Dışkıdaki toksin-A ve glutamat dehidrogenaz antijenlerinin bu antikörlere bağlanması sonucu siyah bir bant oluşması ile pozitif olarak değerlendirilen enzim immunoassay bir testtir. Dışkıdaki 2ng/ml glutamat dehidrogenazı ve 2ng/ml toksin-A'yı tespit edebilir.

Elde edilen suşlar BHİB'a ekim yapılarak 5 günlük anaerob ortamda inkübasyona bırakıldı. Beş gün sonunda 20 dakika 3000 devirde, içerisine ekim yapılan tüpler çevrilerek süpernatanttan kit plağına dışkı miktarına eşit olacak şekilde konuldu (28).

Konjugattan 140 µl plak üzerine damlatıldı, 3 dakika beklendi. İki kez 7 damla yıkama solüsyonu damlatıldı. Son olarak dört damla substrat damlatılarak yine 5 dakika beklendi. *C.difficile* triage panel kiti ile toksin A ve *C.difficile* ortak antijen (glutamat dehidrogenaz) bakıldı. Test sonucu eğer pozitif ise *C.difficile* ortak antijen(glutamat dehidrogenaz) ve toksin A test zonlarında koyu bir bant gözlemlendi (35).

3.2.6. Rapid ID 32 A:

Sistem dehydrate edilmiş substratlar taşıyan 32 kuyucuktan oluşmaktadır. Şüpheli bakteri kolonileri API Süspansiyon Medyumun (2 ml) içerisinde süspanse edildikten sonra bu test tüpleri içerisine ilave edildi, test kuyucukları metabolik reaksiyonları göstermesi amacıyla 4 saat süre ile 37°C inkübe edildi. pH indikatöründeki değişikliklere göre sonuçlar pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. 29 parametre değerlendirilmektedir. ID 32 A kitleri 25 strip içermektedir (36).

Bakteri süspansiyonu hazırlanırken her bir bakteri suşu için 1 ampul API süspansiyonu (medyum) açıldı. Anaerobik şartlarda CCFA'da subkültür yapılan

bakteri kolonilerinden bol miktarda eküvyon yardımı ile alındı. APİ süspansiyon medyum içerisinde eküvyon ile alınan koloniler 4 Mc Farland'a eşdeğer olacak şekilde süspansiyon edildi.

Bir pipet yardımı ile bakteri süspansiyonu stripin kuyucuklarına dolduruldu. Üre testi 2 damla mineral yağ ile örtüldü. Stripin üzerine kapağı yerleştirildi. Rapid ID 32 A 37 derecede etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı.

Stripler 4 saatlik inkübasyon sonrası NIT1 ve NIT2 ,IND,James reaktifi,PAL,SerA reaktiflerinden 1 damla ilave edilerek tüm reaksiyonlar okundu. Stripler 5 dakika sonra APİ otomatize sisteminde okutuldu. Sonuç formuna reaksiyonlar gözle de değerlendirilerek kaydedildi.

3.2.7. C.difficile DNA Elde Edilme Prosedürü:

Anaerob ortamda 48 saat inkübe edilen *C.difficile* kolonisi 200 µl DNAaz, RNAaz içermeyen suda süspansiyon edilerek 20 dk 95°C'de ısıtılmış daha sonra en yüksek devirde santrifüjleşerek süpernatanı bakteri DNA'sı olarak kullanıldı.

3.2.8. Toksin Genlerinin PZR İle Saptanması:

tcdA, *tcdB*, *CdtA*, *CdtB* genlerine spesifik aşağıda sıralanan oligonükleotid primerleri kullanıldı.

***tcdA* genleri için;(37)**

tcdA-F: 5'-CCC AAT AGA AGA TTC AAT ATT AAG CTT -3'

tcdA-R: 5'- GGA AGA AAA GAA CTT CTG GCT CAC TCA GGT-3'

***tcdB* genleri için;(38)**

tcdB-F: 5'-GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C -3'

tcdB-R: 5'- CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT-3'

Binary toksin *CdtA* genleri için; (25)

CtdA -F: 5'-TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG-3'

CtdA -R: 5'- AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG -3'

Binary toksin *CdtB* genleri için;(25)

CtdB -F: 5'-CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G-3'

CtdB -R: 5'- AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC-3'

3.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Kökenlerde *tcdA*, *tcdB*, *CdtA* ve *CdtB* genlerinin varlığını araştırmak için PZR yapılmıştır. Standart kökenlerimiz gereçler içerisinde bölüm 3.1.2.'de 1. ile 3.maddeler arasında belirtilmiş, PZR'de (+) kontrol olarak; *C.difficile* NCTC 11223 kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir:

tcdA genleri için PZR reaksiyon koşulları (38) :

Reaksiyon karışımı:

PCR Master karışımı	25 µl
TcdA-F	1 µl
TcdA-R	1 µl
Distile su	18 µl
DNA	5 µl
<hr/>	
Toplam hacim:	50 µl

Reaksiyon koşulları:

95°C'de	20 sn	} 35 döngü
55°C'de	2 dk	
72°C'de	1 dk	
74°C'de	5dak	

tcdB genleri için PZR reaksiyon koşulları (38):

Reaksiyon karışımı:

PCR Master karışımı	25 µl
TcdB-F	1 µl
TcdB-R	1 µl
Distile su	18 µl
DNA	5 µl
<hr/>	
Toplam hacim:	50 µ

Reaksiyon koşulları:

95°C'de	20 sn	} 35 döngü
56°C'de	2 dk	
72°C'de	1 dk	
74°C'de	5 dk	

Binary toksin *cdtA* geni için PZR reaksiyon koşulları (25):

Reaksiyon karışımı:

PCR Master karışımı	25 µl
CtdA -F	1 µl
CtdA -R	1 µl
Distile su	18 µl
DNA	5 µl

Toplam hacim: 50 µl

Reaksiyon koşulları:

94°C'de	45 sn	} 35 döngü
52°C'de	1 dk	
75°C'de	80 sn	

Binary toksin *cdtB* geni için PZR reaksiyon koşulları (25):

Reaksiyon karışımı:

PCR Master karışımı	25 µl
CtdB -F	1 µl
CtdB -R	1 µl
Distile su	18 µl
DNA	5 µl

Toplam hacim: 50 µl .

Reaksiyon koşulları:

94°C'de	45 sn	} 35 döngü
52°C'de	1 dk	
75°C'de	80 sn	

3.2.10. Agararoz Jel Elektroforezi:

Elde edilen PZR ürünleri, etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde ve 1xTBE tamponu içinde 90 V'de 1 saat yürütülmüş ve oluşan bantlar UV ışığı altında gözlemlendikten sonra yorumlanarak fotoğrafları çekilmiştir.

3.3 ARAŞTIRMA ETİK KURUL ONAYI

MAR-YÇ-2008-0107 protokol no'lu çalışmamız, Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek, B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/302 sayılı yazısı ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

Eylül 2006-Şubat 2008 tarihleri arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na toksin isteği ile gönderilen 633 dışkı örneğinden toplam 50 (%7.8) *C.difficile* kökeni izole edilmiştir. Aynı hastadan birden fazla örnekten elde edilen kökenlerden sadece birisi çalışmaya alınmıştır.

C.difficile kökeni izole edilen hastaların 24'ü (%48) kadın, 26'sı (%52) erkektir. Yaş ortalaması 35.94(±standart sapma, ±27.67) olup hastaların 12'si 1-9 yaş, 9'u 10-19 yaş, 3'ü 20-29 yaş, 3'ü 30-39 yaş, 2'si 40-49 yaş, 9'u 50-59 yaş, 4'ü 60-69 yaş ve 8'i 70 yaş üzeri grupta yer almaktadır (Tablo 6).

Hastaların 28'i (%56) dahili bilimler, 11'i (%22) pediatri bölümü, 6'sı (%12) cerrahi bilimler, 3'ü (%6) yoğun bakım ve 2'si (%4) kemikiliği transplantasyon bölümünde takip edilirken antibiyotiğe bağlı ishal nedeniyle dışkıda toksin isteminde bulunulmuştur (Tablo 6).

Antibiyotiğe bağlı ishal hastalarının hangi antibiyotikler sonrası ishal geliştiği sorgulandığında, tüm hastalarda en sık kullanılan antibiyotikler arasında beta-laktamların öne çıktığı gözlenmiştir; penisilin grubu 15, sefalosporinler 15, penemler 12, florokinolonlar 11, aminoglikozidler 8 ve glikopeptidler 10 hastada kullanılmıştır. Bu hastaların 29'unda tekli antibiyotik kullanımı, 19'unda çoklu antibiyotik kullanımı, 2 hastada ise antibiyotik kullanımı tespit edilememiştir. Çoklu antibiyotik kullanılan hastaların 12'sinde 2'li, 7'sinde ise 3'lü antibiyotik kullanımı tespit edilmiştir. Tüm hastalarda, ishal öncesi kullanılan antibiyotiklerin dağılımları aşağıdaki tabloda verilmiştir (tablo 6).

Tablo 6. Klinik ve epidemiyolojik veriler (n=50)

Hasta No	Yaş/ Cinsiyet	Bölüm	Alta yatan hastalık	Antibiyotik kullanımı	Tedavi
1	68/K	Cerrahi	Operasyon	Ak	Almamış
2	31/K	Dahiliye	Gastroenterit	Cip	Almış
3	52/E	Dahiliye YB	MI	İmp+Cip+Pen	Almış
4	45/K	Cerrahi	Pankreatit	Cef	Almamış
5	11/K	Dahiliye	AML	Cef+Cip	Almış
6	62/K	Dahiliye	SVO	Cef	Almış
7	28/E	Dahiliye	Crohn		Almamış
8	75/K	Dahiliye	Over Ca	Cip	Almamış
9	33/E	Dahiliye	Gastroenterit	Cip	Almamış
10	7/E	Dahiliye	Germ hücreli tm	İmp+Ak	Almış
11	10/K	Pediyatri	Nöroblastom	İmp+Va	Almamış
12	63/E	Dahiliye	Nazofarinks Ca	Pen	Almamış
13	58/K	Dahiliye	Hodgin Lenfoma	Cip	Almış
14	70/E	Cerrahi	Larinks Ca	Cef	Almamış
15	44/K	Dahiliye	Renal Transplant	Cef	Almış
16	65/E	Dahiliye	KLL	Cef	Almamış
17	17/E	Dahiliye	AML	Va	Almamış
18	58/K	Nöroşirurji	Optik Gliom	Va+İmp	Almamış
19	19/K	Pediyatri	Miksoid Sarkom	Cef	Almamış
20	4/K	Dahiliye	Diyare	Va	Almış
21	57/E	Dahiliye	Hodgin Lenfoma	Pen+Ak	Almış
22	51/E	Dahiliye	Hipertansiyon	Cip	Almamış
23	5/K	Dahiliye	Nörofibromatosis	Cef+Ak+Va	Almamış
24	72/E	Dahiliye	Akut Peritonit	İmp	Almamış
25	11/E	Dahiliye	Lenfoblastik len	Cef+İmp+Va	Almış
26	76/E	Nöroloji	SVO	İmp	Almış
27	12/K	Pediyatri	ALL	İmp+Ak+Va	Almış
28	11/E	Pediyatri	Lösemi	Cef+İmp+Va	Almış
29	82/K	Dahiliye	Kolon Ca		Almış
30	28/K	Dahiliye	Addison Hst	Cip	Almamış
31	13/E	Dahiliye	Pleositik	Pen+İmp	Almış
32	3/E	Pediyatri	ALL	Cef+İmp+Ak	Almamış
33	4/E	Pediyatri	Pnömoni	Pen	Almamış
34	59/K	Ortopedi	DM	Pen	Almış
35	3/E	Pediyatri	Spina Bifida	Cef	Almamış
36	06-305-	Cerrahi	Mastoidit	Va	Almış
37	81/K	Dahiliye	KBY	Cef	Almış
38	56/E	Dahiliye	Gastroenterit	Cip	Almamış
39	30/E	Dahiliye	Gastroenterit	Pen	Almamış
40	11/E	Pediyatri	West Send	Cef	Almamış
41	80/E	Dahiliye	KOAH	Va	Almış
42	5/E	Dahiliye	Diyare	Cef	Almamış
43	74/K	Dahiliye YB	ABY	Pen+Cip	Almamış
44	3/E	Dahiliye	Bartter Send		Almış
45	5/K	Pediyatri	Diyare	Cef	Almamış
46	3/E	Dahiliye	Diyare	Pen+Cef	Almamış
47	59/K	Dahiliye	AML	Pen+Ak	Almış
48	2/K	Pediyatri	Meningomyelose	Cef+İmp	Almış
49	51/E	Dahiliye	Multipl Myelom	Cef	Almış
50	5/K	Dahiliye	Nöroblastom	İmp+Ak	Almamış

Elde edilen suşlar kesin tür tanısı amacıyla rapid ID 32 A sistemi ile incelenmiştir. İzole edilen tüm *C.difficile* suşlarının biyokimyasal özelliklerine bakılmış, Prolin arilamidaz ve Lösin arilamidaz reaksiyonu pozitif olarak gözlenmiş diğer tüm reaksiyonlar negatif olarak tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm kökenler *C.difficile* olarak adlandırılmıştır.

Kökenlerden yapılan Triage Kit çalışmasının 50'sinde (%100) *C.difficile* glutamat dehidrogenaz enzimi pozitif bulunmuş ve aynı kit ile toksin A; 28(%56) örnekte pozitif bulunmuştur. Aynı kökenlerden yapılan immunocard çalışmasında ise 36 (%72) örnekte toksin A/B pozitif bulunmuştur (Tablo 7).

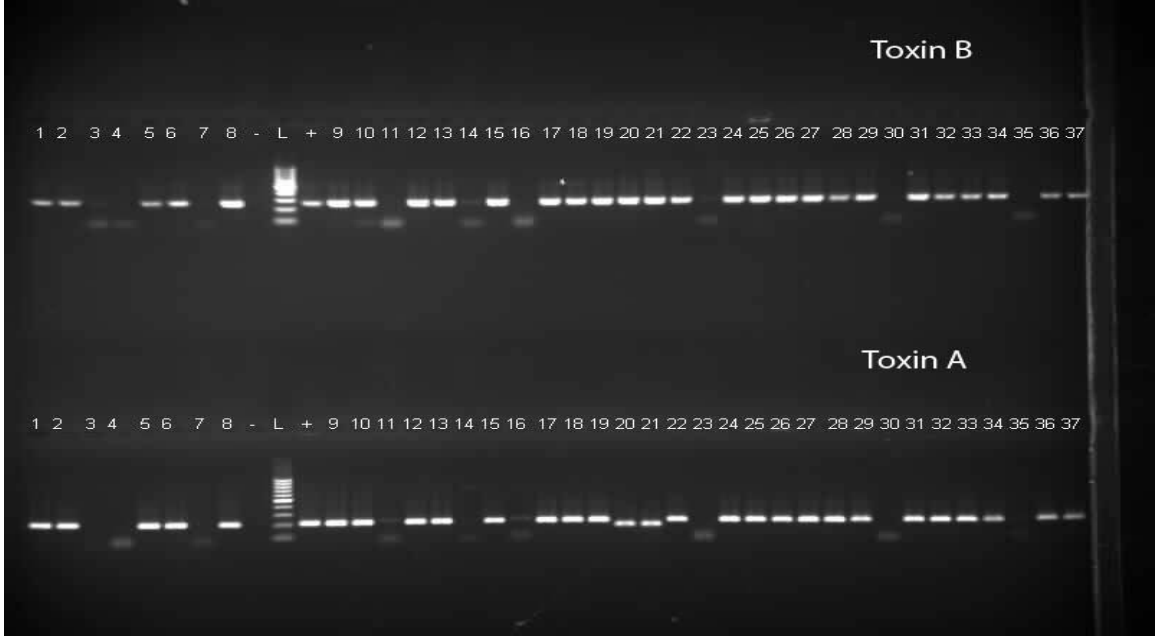
Tablo 7. Triage kit ve immunocard ile *C.difficile*, toksin A/B sonuçlarının dağılımı

TRIAGE KİT	Pozitif (+)		Negatif (-)	
	N	%	N	%
<i>C.difficile</i>	50	100	0	0
Toksin A	28	56	22	44
İMMUNOCARD	Pozitif (+)		Negatif (-)	
	N	%	N	%
Toksin A/B	36	72	14	28

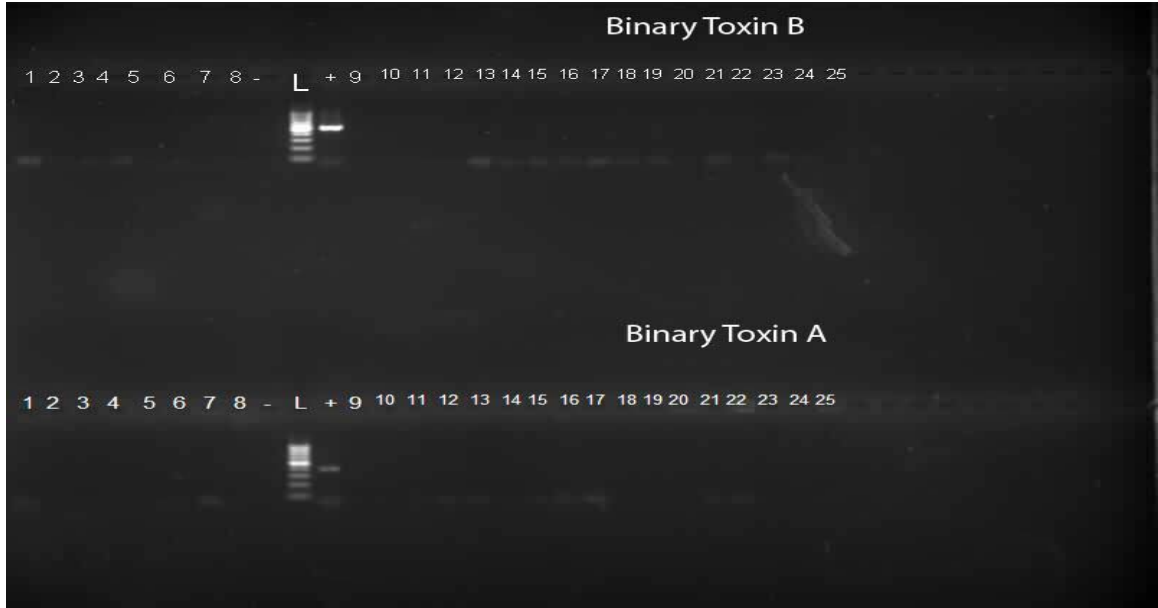
PZR çalışmasında ise 36(%72) hastada toksin A pozitif, yine 36(%72) hastada toksin B pozitif bulunmuştur. Binary toksin A ve B ise hiçbir örnekte saptanamamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. PZR ile toksin A/B ve binary toksin A/B sonuçlarının dağılımı

PZR	Pozitif (+)		Negatif (-)	
	N	%	N	%
Toksin A	36	72	14	28
Toksin B	36	72	14	28
Binary toksin A	0	0	50	100
Binary toksin B	0	0	50	100



Şekil 4. Kökenlerin Toksin A ve B gen durumunun agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 5. Kökenlerin “binary toksin” *cdt A* ve *cdt B* gen durumunun agaroz jeldeki görüntüsü

Örneklerin Triage kit , Immunocard kiti ile elde edilen sonuçları ve tüm kökenlerin PZR ile elde edilen toksin gen durumları görülmektedir.(Tablo 9a-Tablo 9b)

Tablo 9a. Toksin üretiminin tespitinde kullanılan yöntemlerin sonuçları

	Triage Kit Sonuçları		İmmunocard Kit Sonuçları	PZR Çalışma Sonuçları			
	<i>C.difficile</i>	Toksin A	Toksin A/B	tcdA	tcdB	Cdt A	CdtB
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	-	-
13	+	-	+	+	+	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	+	+	-	-
18	+	+	+	+	+	-	-
19	+	-	+	+	+	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-
21	+	-	+	+	+	-	-
22	+	-	+	+	+	-	-
23	+	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	+	-	-
25	+	+	+	+	+	-	-

Tablo 9b. Toksin üretiminin tespitinde kullanılan yöntemlerin sonuçları

	Triage Kit Sonuçları		İmmunocard Kit Sonuçları	PZR Çalışma Sonuçları			
	<i>C.difficile</i>	Toksin A	Toksin A/B	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	Cdt A	Cdt B
26	+	+	+	+	+	-	-
27	+	+	+	+	+	-	-
28	+	-	+	+	+	-	-
29	+	-	+	+	+	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	+	-	-
32	+	+	+	+	+	-	-
33	+	-	+	+	+	-	-
34	+	+	+	+	+	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	+	-	-
37	+	+	+	+	+	-	-
38	+	+	+	+	+	-	-
39	+	+	+	+	+	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-
41	+	+	+	+	+	-	-
42	+	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	+	-	-
44	+	+	+	+	+	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	-
47	+	-	+	+	+	-	-
48	+	+	+	+	+	-	-
49	+	+	+	+	+	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-

Dışkıdan EIA yöntemi ile toksin A+B araştırma yöntemi ile kökenlerden çalışılan PZR' nu sonuçları karşılaştırıldığında; dışkıdan EIA yönteminin kökenlerden çalışılan PZR' una göre duyarlılığı %83.3, seçiciliği %100 pozitif prediktif değeri %70 negatif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır(Tablo 10).

Tablo 10. Dışkıdan EIA yöntemi ile toksin A+B bakılmasının PZR ile karşılaştırması

Dışkı EIA toksin A+B	PZR		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	30	0	30
Negatif	6	14	20
Toplam	36	14	50

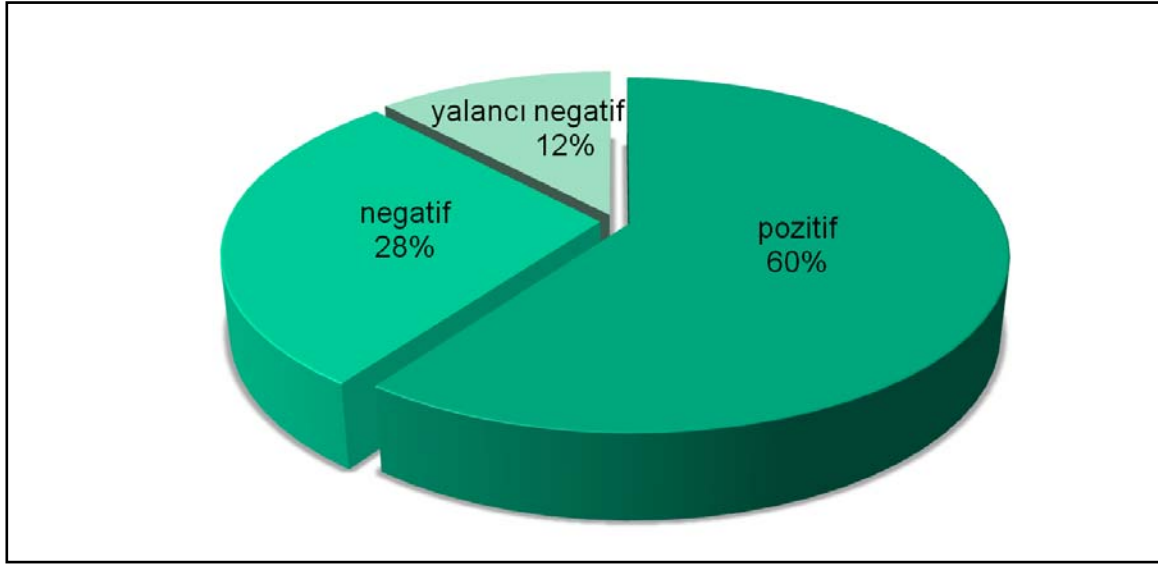
Kültürde üretilen kökenlerden EIA yöntemi ile toksin A+B araştırma yöntemi ile yine kökenlerden çalışılan PZR 'nu sonuçları karşılaştırıldığında; kültürden EIA yöntemi ile toksin A+B araştırılmasının duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif prediktif değerinin %100 olduğu gözlenmiştir.(Tablo 11)

Tablo 11. Kültürden EIA yöntemi ile toksin A+B bakılmasının PZR ile karşılaştırması

Kültür EIA toksin A+B	PZR		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	36	0	36
Negatif	0	14	14
Toplam	36	14	5

Dışkıdan EIA yöntemi ile toksin aranması sonucu 30 pozitif ve 20 negatif sonuç elde edilmiştir. Kültürden EIA yöntemi ile toksin aranması sonucunda ise

20 negatif sonuçtan 6'sı pozitif olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda sadece dışkıdan EIA yöntemi ile toksin A ve toksin B araştırılarak elde edilen sonuçlar kültürden EIA yöntemi ile toksin A ve toksin B araştırılmasıyla karşılaştırıldığında %12 yalancı negatiflik saptanmıştır.(Grafik-1)



Grafik 1. Dışkıdan EIA ile toksin aranması ile elde edilen sonuçlar

5.TARTIŞMA

Antibiyotiklerin keşfi ile insanoğlunun yaşam süresi uzayarak, yaşam kalitesi artmıştır. Birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisi problem olmaktan çıkmış, mortalite ve morbidite oranları azalmıştır. Ancak diğer taraftan tanı ve tedavi amacıyla uygulanan invazif girişimler ve bilinçsiz antibiyotik kullanımları istenmeyen birçok yan etkiyi beraberinde getirmiştir. Vücudun normal mikroflorasının baskılanması ve bu mikrofloranın kontrolü altındaki patojenlerin aşırı çoğalması sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlar bu yan etkilerden biridir. *C.difficile* enfeksiyonu bu tip enfeksiyonlara iyi bir örnektir. Antibiyotik kullanımının bağırsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten sonraki 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir. Clostridium difficile ile ilişkili ishal özellikle hastanede yatan hastalarda geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir .Genellikle ekzojen kaynaklı olan enfeksiyonun gelişiminde ileri yaş, kullanılan ilaçlar (antibiyotik, antiperistaltik, immünsüpresif, antineoplastik, narkotik analjezikler vb.), yapılan girişimler (lavman, nazogastrik tüp), altta yatan ciddi hastalık (kanser, AIDS, böbrek yetmezliği vb.), hastanede kalış süresi, yoğun bakım ünitesinde kalma gibi farklı risk faktörleri rol oynayabilmektedir (22).

Pepin ve ark. Kanada'nın Ouebec bölgesinde yaptıkları çalışmada, 1991-2003 yılları arasında *C.difficile* ilişkili ishal hastalarının 1991-1992 yıllarındaki oranı % 7.1, 2003'te ise% 18.2 saptamışlardır. Tanıdan sonra 30 gün içinde ölüm oranı 1991-1992 yıllarında % 4.7 iken, 2003 yılında % 13.8'e kadar çıktığı bildirilmiştir (39).

Bizim çalışmamızda 2006-2008 yıllarında işleme alınan 633 dışkı örneğinden 50'sinde(%7.8) *C.difficile* saptanmış ve bu hastaların üç aylık takibinde ölüm saptanmamıştır.

C.difficile'ye bağlı ishale en önemli risk faktörlerinden birisi antibiyotik kullanımı olup seçilen antikemoterapotik grupları ülkeden ülkeye hatta hastaneden hastaneye bile değişebilmektedir.

Urban ve ark. Macaristan'da yaptıkları çalışmada, kendi hasta gruplarında en çok beta-laktam, daha sonrada kinolon kullanımının *C.difficile*'ye bağlı ishalde önemli rol oynadığını vurgulamışlardır (40).

Wirström ve ark. İsveç'te antibiyotiğe bağlı ishallerde yapılan çalışmada sefalosporin, klindamisin ve geniş spektrumlu penisilin kullanımının *C.difficile*'ye bağlı ishal riskini artırdığını göstermiştir (41).

Ülkemizde Erciş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada antibiyotiğe bağlı ishal veya psödomembranöz enterokolit ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde, *C.difficile* toksin varlığını ve klinik bulgular arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada *C.difficile*'ye bağlı ishalin, hastaların büyük çoğunluğunda (32/68) beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanımına bağlı olarak geliştiği gözlenmiştir, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) kullanımının izlediği bildirilmiştir (42).

Altındış ve ark. yaptığı çalışmada ise hastaların %84.6'sının (11/13) ampisilin/sulbaktam, birer hastanın (%7.7) ise kotrimoksazol ve makrolit kullandığı tesbit edilmiştir. Ampisilin/sulbaktam kullanımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p 0.05) (43).

Bizim çalışmamızda ise pozitif hastaların 15'inde penisilin grubu antibiyotikler, 15'inde sefalosporinler gibi beta-laktam antibiyotiklerin kullanımlarının fazla olduğu bunları ise sırası ile penemlerin , florokinolonların ve makrolidlerin takip ettiği saptanmıştır.

Buchner ve ark. çalışmasına göre kanser, kemoterapi, solunum yolları enfeksiyonları ve böbrek yetmezliği gibi altta yatan çeşitli hastalıklar *C.difficile*'ye bağlı ishale yakalanma riskini artırmaktadır (44).

Erciş ve ark.'nın yaptığı çalışmada hastaların 36'sında (% 52.9) altta yatan hastalık varlığı belirlenmiştir. Bu hastaların 18'inde kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı ve böbrek yetmezliği, 11'inde kanser ve 7'sinde diğer hastalıklar (diyabet, hepatit, transplantasyon ve multiple skleroz) mevcuttur (42).

Bu çalışmada *C.difficile* üretilen hastaların 42'sinde (%84) altta yatan hastalık varlığı belirlenmiştir. Bu hastaların 22'sinde kanser, 3'ünde kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı ve böbrek yetmezliği ve 17'sinde diğer hastalıklar (diyabet, pankreatit, Chron, transplantasyon) bulunmuştur.

Wroblewska ve ark. yaptıkları çalışmada, 1998 ve 2002 yılları arasında hastanede yatan hastalar içinde en fazla toksin pozitif örnek gönderilen servis %51.1 ile hematoloji ve onkoloji servisi olup, bunları takiben % 8.3'ü nöroloji, %8'i nefroloji, %7'si genel cerrahi, %6.2'si nöroşirurji servislerinden gelmiştir (45).

Altındış ve ark. yaptıkları çalışmada antibiyotiğe bağlı gelişen hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımı sıklık sırasına göre, dahiliye (41.7), enfeksiyon hastalıkları (15.3), cerrahi/anestezi/yoğun bakım (%12), nöroşirurji (%5.4), göğüs hastalıkları (4.4), fizik tedavi ve rehabilitasyon klinikleri (3.2) ve daha az oranda da diğer bölümlerdir. Dahiliye kliniğinden kabul edilen hastaların fazlalığı diğer kliniklere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p 0.05) (43).

Bu çalışmada hastaların kliniklere göre dağılımı gözden geçirildiğinde; 28 hasta ile dahiliye ve 11 hasta ile pediatri servislerinde yoğunlaştıkları, bunları diğer kliniklerin takip ettiği (yoğun bakım, cerrahi servisi ve KİT) saptanmıştır.

Dünyada *C.difficile*'ye bağlı ishal hastanelerde yaygın olarak görülmekte ve yıllarla birlikte artma eğilimi göstermektedir. Hastane kaynaklı ishal etkenleri içinde *C.difficile* saptanma oranı %8-10'dur (22).

Barbut ve ark. hastane kaynaklı ishali olan 344 hastayla yaptıkları çalışmada 35 (%10.2) hastada *C.difficile* saptamışlardır (46).

Ülkemizde de bu alanda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Eskitürk A. ve ark.'nın 1993 yılında yayınlanan, dışkıda az rastlanan bakterileri (*Aeromonas*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica* ve *VETEC*) araştırdıkları çalışmalarında *C.difficile* oranını %12.9 olarak saptamışlardır (47).

Altındış ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada 91 hastadan 13'ünün (%14.3) kültüründen *C.difficile* izole etmişlerdir (43).

Bizim çalışmamızda toksin isteği ile gelen 633 dışkının 50'sinde (%7.8) kültürde *C.difficile* saptanmıştır.

C.difficile kökenlerinde toksin varlığının araştırılması amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Yolken ve ark. ilk kez 1981 yılında *C.difficile* toksin varlığını saptama amacı ile EIA testini geliştirmişlerdir (54). Bunu takiben yapılan çalışmalar sonucunda yalnızca toksin A'yı ve toksin A + B 'yi beraber saptayan kitler geliştirilmiştir (28).

Schroder ve ark. (49), *C.difficile* için EIA yöntemiyle Toksin A+B'nin beraber saptandığı testin en yaygın doğrulama testi olduğunu, özgüllüğünün %93-100,duyarlılığının ise %63-99 civarında olduğunu bildirmiştir.

Çok merkezli bir çalışmada dışkı örneğinde altın standart yöntem olan hücre kültürü ile toksin A+B EIA test karşılaştırması yapılarak toksin aranmış, yönteminin duyarlılığı %92.2, özgüllüğü ise %100 olarak saptanmıştır (50).

Aldeen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise 1109 ishali dışkı örneği toksin A+B EIA ile test edilmiş ve referans kabul edilen sitotoksik hücre kültürü ile karşılaştırılmıştır. Testin duyarlılığı %94.3,özgüllüğü %99.3 olarak saptanmıştır. Sitotoksik hücre kültürü ile toksin A+B sonuçları arasındaki uyum %98.5 olarak bulunmuştur (51).

Kanada'da 400 gaita örneğinin, Triage *C.difficile* test Toxin A (TCT), TechLab *C.difficile* Toxin A-B enzim immünassay (EIA) yöntemlerinin hücre kültürü sitotoksite testi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, TCT'nin duyarlılığı %93, özgüllüğü %89 EIA'nin duyarlılığı %89,özgüllüğü %99 olarak saptanmıştır(52).

Ülkemizde yapılan *C.difficile* toksin prevalans çalışmalarında değişik sonuçlar saptanmıştır. Ülkemizde Erciş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada antibiyotiğe bağlı ishal veya psödomembranöz enterokolit ön tanılı hastaların

dışkı örneklerinde, *C.difficile* toksin varlığını göstermek amacı ile yaptıkları çalışmada Toksin A ve/veya B varlığını EIA yöntemleriyle araştırmışlardır. İncelenen 726 dışkı örneğinin 62'sinde toksin A ve 6'sında toksin B olmak üzere toplam 68'inde (% 9.4) pozitiflik saptamışlardır (42).

Büyükbaba'nın (53) yaptığı bir çalışmada *C.difficile* ön tanısı ile 1998-2000 yılları arasında 360 hastanın dışkı örneğinde ImmunoCard Toksin A (Meridian Diagnostic) kiti ile, 2000-2002 yılları arasında 400 dışkı örneğinde Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic) kiti kullanılarak toksin varlığı araştırılmıştır. İlk çalışma döneminde toksin A varlığı hastaların %4.7'sinde, ikinci çalışmada ise toksin A/B varlığı hastaların %12'sinde saptanmıştır.

Çalışmamızda Triage Clostridium difficile Panel (Biosite) EIA kiti ile Toksin A ve *C.difficile* ortak antijeni bakılmış ortak antijen (glutamat dehidrogenaz) hepsinde saptanırken, Toksin A 28'sinde (%56) pozitif saptanmıştır. ImmunoCard toksin A+B EIA kiti ile 36 (72%) örnekte toksin pozitif bulunmuştur.

Toksin isteği ile gelen örneklerin toksin negatif çıkan test sonuçlarının aynı örneğin kültürde üretilen *C.difficile* kökeninden çeşitli yöntemlerle yeniden çalışıldığında pozitifleşebildiği bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak *C.difficile* toksinlerinin yapısının bozulması, bu bozulmaya dışkının transportu esnasında serbest toksinlerin salınması, fekal proteolitik enzimlerin açığa çıkması, ısı değişikliği gibi faktörler gösterilmektedir (54).

Bizim çalışmamızda dışkıdan EIA yöntemi ile toksin A+B araştırma yöntemi ile PZR'nu sonuçları karşılaştırıldığında; dışkıdan EIA yönteminin PZR'una göre duyarlılığı %83.3, seçiciliği %100 pozitif prediktif değeri %70 negatif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır. Duyarlılığının düşük olmasının nedenleri olarak toksin yapısının transport esnasında bozulması, ısı değişimi gibi faktörlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Çalışmamızda kültürden EIA yöntemi ile toksin A+B araştırma yöntemi ile PZR 'nu sonuçları karşılaştırıldığında; kültürden EIA yöntemi ile toksin A+B

araştırılmasının duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif prediktif değerinin %100 olduğu gözlenmiştir.

Bouza ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada 1992-1999 yılları arasında gelen 8241 dışkı örneğine hücre kültürü ile sitotoksite testi yapılmış ve bunlar aynı zamanda CCFA besiyerine ekilmiş ve burada üretilen kökenler yeniden hücre sitotoksite testi ile çalışılmış ve pozitif bulunan 1691 (% 20.5) örneğin 1437'si (%85) dışkı çalışılarak tesbit edilirken, 254 (%15) pozitif sonuç kökenden çalışılan sitotoksite testi ile tesbit edilmiştir (54).

Bizim çalışmamızda dışkıda EIA yöntemi ile toksin aranması ile 30'unda pozitif sonuç saptanırken, toksin isteği ile gelen dışkılarından üretilen *C.difficile* kökenleri yeniden kültürden Immunocard EIA ile çalışılmış ve 6 (%12) kökende negatif olan sonuç pozitifleşmiştir.

C.difficile'nin ana virulans faktörü olarak bilinen toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB) dışında üçüncü toksin olarak (binary toksin CDT) bazı kökenlerde saptanmıştır (3,18). Binary toksin varlığının saptanması için bu güne kadar geliştirilmiş bir kit mevcut değildir. Bunun yanında bazı kökenlerde toksin A-/B+ olarak saptanmıştır. Binary toksin geni taşıyan *C.difficile* kökenlerinin tanımlanması çoğu tanı laboratuvarında mümkün olmamaktadır. Toksin A-/B+ kökenlerin aynı zamanda binary toksin geni taşıyan kökenlerin PZR yöntemi ile toksin genlerinin araştırılması ile ancak varyant kökenler saptanabilmektedir.(3)

Pituch H. ve ark.2005 yılında Polanya'da 58 örnek ile yaptıkları bir çalışmada kökenlerinde binary toksin gen varlığını araştırmışlar 41 toksin A+/B+ hastanın 5'inde binary toksin gen varlığı saptanmış 17 toksin A-/B+ kökenlerinin hiçbirinde binary toksin genine rastlanmamıştır. Binary toksin prevalansı bu çalışmada %8-6 (5/58) olarak tesbit edilmiştir (55).

Gonçalves ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmada 369 kökenin 22 (%6)'sinde binary toksin saptamışlardır. Bu 22 köken TcdA ve TcdB yönünden incelendiğinde hepsinde bu iki toksinin üretimi olduğu saptanmıştır (26).

Barbut ve ark. 2007'de yaptıkları Türkiye'nin farklı hastanelerinden izole edilen kökenleri de içine alan çok merkezli bir çalışmada 411 kökenin 86'sı toksin varyant olarak tesbit edilmiş,66'sında binary toksin pozitif saptamış, Türkiye'den gönderilen kökenler içerisinde ise varyant köken ve binary toksin içeren kökene rastlanmamıştır (56).

Araştırma kriterlerine uygun olarak çalışmaya alınan 50 izolatin PZR yöntemi ile toksin genlerine bakılmış, kökenlerin 36'sında *tcdA* ve *tcdB* geni pozitif bulunmuştur. Hastanemizde izole edilen *C.difficile* kökenlerinde PZR yöntemi ile varyant toksin üretimi ve binary toksin gen varlığı araştırılmış hiçbir kökende binary toksin geni saptanmamış ve toksin genlerinde herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızın sonuçları incelendiğinde ise *C.difficile* kökenlerinin sadece toksin A'yı saptayan kit ile yapılan analiz ve aynı anda toksin A ve toksin B'nin birlikte saptandığı kit ile elde edilen pozitif sonuçlar karşılaştırıldığında toksin A+B'nin birlikte saptandığı kit'in sonuçlarının daha anlamlı olduğu görülmüştür. *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde her iki toksini birlikte saptayan kitlerin kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir.

Toksin isteği ile gelen örneklerin toksin negatif çıkan test sonuçlarının bizi yanıltabileceği göz önüne alındığında gelen örneklerin kültürünün yapılması bu açıdan önem kazanmaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre laboratuvarlarda kültürden EIA yöntemi ile toksin aranmasının yalancı negatifliğin önüne geçilebileceği saptanmış ve olanağı olan laboratuvarlarda *C.difficile* için kültürün rutin olarak yapılmasının gerektiği düşünülmektedir.

Ülkemizde toksin varlığı EIA ve ELİSA yöntemleri ile çalışılmakta, fakat genotipik olarak toksin A/B ve binary toksin varlığını araştıran yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada laboratuvarımıza toksin isteği ile gelen ve dışkısında *C.difficile* izole edilen kökenlerde toksin varlığının genotipik yöntemlerle araştırılması bu kökenlerdeki varyant toksin üretiminin ve yurtdışında epidemilere yol açtığı saptanmış olan binary toksinin, hastane kökenlerimizde ki varlığına bakılarak hastanemizdeki prevalansı araştırılmıştır.

C.difficile izolatları için yeni ortaya çıkabilecek epidemik izolatların saptanması adına suşların karakterizasyon değişikliği açısından bu tür genotipik araştırmalarla kontrol edilmesi önerilmekte ve çokmerkezli çalışmalarla bu düzenli olarak yapılmaktadır. Bizim çalışmamızın ışığında yapılacak diğer çalışmaların da ülkemizde gelecekte *C.difficile* izolatlarında olabilecek genotipik değişikliklerin anlaşılabilmesi adına yarar sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Söyletir G, Topçu AW, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Antibiyotiğe bağılı kolitler (*Clostridium difficile* Koliti) s:762.
2. Kıyam M, Ustaçelebi Ş.(ed)(1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Anaerob, sporlu, gram pozitif basiller.s:645-648
3. Rupnik M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. Clin Microbio infect. 2001 Aug; 7(8):417-20.
4. Julian Rood (ed) Enterotoxins. The Clostridia: Molecular Biology and pathogenesis. 1997; s:369
5. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. J. Antimicrob Chemother. 1998 May;41(suppl)C:29-40.
6. Snyder M. L. Further studies on *Bacillus difficilis*. J. Inf. Dis. 1937;60:223-231.
7. Mc Bee, R.H. Intestinal flora of some antarctic birds and mammals. J. Bacteriol. 1960;79:311-12.
8. Tedesco FJ, Barton RW and Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Annals of internal Medicine. 1974. 81,429-433
9. Larson HE, Parry JV, Price AB, Davies DR, Dolby J and Tyrell DAJ. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. British Medical Journal.1977. 1246-8
10. Barlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL and Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *clostridium* in hamsters. J Infect Dis. 1977 Jul 1;190(1):202-9.
11. Poxton I.R.,McCoubrey J.,Blair G.The Pathogenicity of *Clostridium difficile*.Clin.Microbiol Infect 2001;7:421-427
12. Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J.A. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol. 44:812-826.

13. Koneman EW. (1997). The Anaerobic Bacteria. In: Koneman E W, Allen S D, Janda M, Schreckenberger P C, Winn W C(eds). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Fifth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 709-784
14. Isenberg HD.(ed) (2004) Anaerobic Gram Positive Bacilli. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington DC, Vol 1, pp 4.11.1-4.11.9.
15. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al. (1993). Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company, California, 5.Ed, pp 95-101.
16. Fekety R. Antibiotic-Associated colitis. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. (ed.). Principles and Practice of Infectious Disease. Third edition, New York: Churchill Livingstone, 1995; 978-986.
17. Engelkirk G.P.,Engelkirk D.J.Anaerobes of Clinical Importance. In:Mahon R.C.,Lehman C.D.,Manuselis G.(ed.)Diagnostic Microbiology. Third edition,2000;587-641
18. Popoff, MR, EJ Rubin, DM Gill and P Boquet. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1988; 56:2299-2306.
19. Dupuy B.,Govind R,Antunes A. and Matamouros S.Clostridium difficile toxin synthesis is negatively regulated by TcdC.JMM 2008;57,685-689.
20. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis American College of Gastroenterology, Practice parameters committee. Am J Gastroenterol 1997;92:739-750.
21. Bartlett JG. Antibiotic associated diarrhoea. N Engl J Med. 2002; 346:334-339.
22. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect. 2001; 7:405-410.
23. Worsley MA. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* Infection JAC. 1998;41 suppl. C:59-66.

24. Cerquetti M, Luzzi I, Caprioli A, Sebastianelli A, et al. Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14(7):598-603.
25. Stubbs S, Rubnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile* 2000 March;307-312
26. Gonçalves C, Derce D, Barbut F, Burghoffer B and Petit JC. Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2004 May; p. 1933-1939.
27. Rupnik M, Grabner M, Geric B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 9. 2003; 289-294.
28. Yücesoy M., McCoubrey J., Brown R., Poxton R.I. (2007) Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. *Clin Microbiol Infect* 8:413-418
29. Brito GAC, Sullivan GW, Ciesla WP, Carper HT, Mandell GL and Guerrant RL. *Clostridium difficile* Toxin A Alters In Vitro-Adherent Neutrophil Morphology and Function. *J Infect Dis*. 2002; 185:1297-306.
30. Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* Infection. *JAC*. 1998;41:13-19
31. Pothoulakis C and LaMont JT. *Clostridium difficile* Colitis and Diarrhea. *Gastroenterol Clin N Am* 1993; 22:623-637.
32. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41:47-57.
33. Borriello SP and Wilcox HM. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions.. *JAC*. 1998;41:67-69.
34. Wilcox M.H. (1998) Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *JAC* 41:41-46
35. DN. Gerding, CA Muto, RC Owens. (2008) *Clin Infect Dis*. Jan 15;46 Suppl 1:S32-42
36. ImmunoCard: Toxin A-B Test Card prosedürü. Meridyen
37. Triage *C. difficile* Panel : *C. difficile* common antigen or glutamate dehydrogenase procedure. Biosite

38. Kato H.,Kato N.,Watanabe K.,Iwai N.,NakamuraH.,Yamamoto,Suzuki K.,Kim S,Chong Y.,Wasito B.E.(1998)Identification of Toxin A-Negative,Toxin B-pozitive *Clostridium difficile* by PCR. . J Clinic Microbiol.,,p.2178-2182
39. Pepin J.,Valiquette L.,Alary ME.,Villemure P.,Pelletier A.,Forget K.,Pepin K.,Chouinard D.(2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a reagon of Quebec from 1991 to 2003:a changing pattern of disease severity.CMAJ.31;171(5):466-472.
40. Urban E.,Tusnadi A,Terhes G,Nagy E(2002) .Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary.J Hospital Infect ,51:175-178.
41. Wiström J,Norrby SR,Myhre EB,et al(2001)Frequency of antibiyotic-associated diarrhoea in 2462 antibiyotic-treated hospitalized patients:A prospective study.J Antimicrob Chemother,47:43-50.
42. Erciş S.,Ergin A.,Hasçelik G.(2004)*Clostridium difficile*'ye bağlı ishal olgularının 6 yıllık değerlendirilmesi.Mirobiyol Bült 38:45-50.
43. Altındiş M.,Usluer S.,Çiftçi H.i.,Tunç N.,Çetinkaya Z.,Aktepe C.O.Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması.Mikrobiyol Bült (2007)41:29-37.
44. Buchner AM,Sonnenberg A:Medical diagnosis and procedures associated with *Clostridium difficile* colits.Am J Gastroenterol 2001,96:766-772.
45. Wroblewska MM.,Swoboda-Kopec E.,r,Rokosz A.,et al.(2005)Detection of *Clostridium difficile* and toxin A(Tcd A) in stool specimens from hospitalized patients.Pol J Microbiol ;54:111-115
46. Barbut F.,Lelvan P.,Antoniotti G.,Collignon A.,Sedallian A.,Petit J.C.(1995)Value of Routine Stool Cultures in Hospitalized Patients with Diarrhea.Eur.J.Clin Microbiol Infect .Dis.14:346-349.
47. Eskitürk A.,Söyletir G.(1994)Isolation rate of unusual bacterial pathogens from stool cultures.Marmara Med.J;7:27.

48. Yolken RH,Whitcomb LS,Marien G.(1981)Enzyme Immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* antigens.J.Infect Dis ;144:378.
49. Schroeder MS.(2005)*Clostridium difficile* associated diarrhea.AM.Fam Physician.1;17(5):921-928.
50. Lyerly DM.,Neville LM.,Evans DT et al.(1998)Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B Test.J Clin Microbiol.36:184-90.
51. Aldeen WE.,Binham M.,Aiderzada A,Kucera J.,Jense S.,Carroll KC.,(2000)Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxin assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools.Diagn Microbiol Infect Dis.36:211-213.
52. Alfa MJ, Swan B, VanDekervhove B, Pang P, Harding GK. (2002). The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: comparison of Triage *C.difficile* panel, EIA for Tox A/B and cytotoxin assays. Diagn Microbiol Infect Dis, 43: 257-263.
53. Büyükbaba B. *C.difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003;32:220-224.
54. Bouza E.,Pelaez T.,Alonso R.,Catalan P.,Munoz P.,Creixems R.M.(2001) 'Second -look' cytotoxicity :an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD 48:233-237.
55. Pituch H.,Rupnik M.,Woszczatynski P., Grubescic A.,Mikolajczyk F.,Luczak M.(2005)Detection of binary-toxin genes(cdt A and cdt B)among *Clostridium difficile* strains isolated from patients with *C.difficile*-associated diarrhoea(CDAD) in Poland.Journal of Medical Microbiology 54.143-147
56. Barbut F.,Mastrantonio P.,Delme M.,Brazier J.,Kuijper E.,Poxton I.(2007)Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect .13:1048-1057