

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİBİYOTİĞE BAĞLI  
HASTANE VE TOPLUM KÖKENLİ İSHAL OLGULARINDA  
*CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ARAŞTIRILMASI**

*Bio. Sibel USLUER*

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç.Dr. Mustafa ALTINDIŞ**

**Tez No:2006-010**

**2006-AFYON**

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada antibiyotiğe bağlı hastane ve toplum kökenli ishal olgularında etken olarak *Clostridium difficile* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada hastanenin polikliniklerine müracaat eden, klinik ve yoğun bakımlarında tedavi görmekte olan ishallerli hastalar yanı sıra yoğun bakım çalışanı hemşireler ve gıda çalışanlarında *C.difficile* taşıyıcılığı kültür, üreyen koloniden Lateks aglütinasyon, Toksin A lateks ve Toksin A+B ELISA yöntemleri ile araştırılmıştır.

Bu tezin seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, yetişmemde emeği olan diğer bölüm hocalarıma, örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı hastanemizin tüm poliklinik ve kliniklerine, çalışmanın yürütülmesi sırasındaki katkılarından dolayı Dr. Nedim TUNÇ'a, Lab. Ayşe AKBAŞ'a Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Bio. Sibel USLUER

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
Önsöz	
İçindekiler	
Simgeler ve Kısaltmalar	
Tablolar Dizini	
<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>3</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1.Tarihçe.....	5
2.2.Mikrobiyolojik Özellikleri.....	6
2.2.1.Toksin A.....	8
2.2.2.Toksin B.....	9
2.3.Patogenez.....	10
2.3.1. Kolon Florası Ve Floranın Bozulması.....	10
2.3.2. Risk Faktörleri.....	12
2.4.Epidemiyoloji.....	12
2.5.Klinik.....	13
2.5.1.Aseptomatik Taşıyıcılık.....	14
2.5.2.Psödomebransız Kolit.....	15
2.5.3.Psödomebranöz Kolit.....	15
2.5.4.Fulminant Kolit.....	16
2.6.Tanı.....	16
2.7. <i>Clostridium Difficile</i> 'nin Laboratuvar Tanısı.....	17
2.7.1. Biyokimyasal Testler.....	17
2.7.1.1.Rutin Biyokimyasal Testler.....	17
2.7.1.2.Gaz-Likid Kramatografisi.....	17
2.7.2. Radyolojik İncelemeler.....	17
2.7.3. Mikrobiyolojik İncelemeler.....	18
2.7.3.1.Mikroskobik İnceleme.....	18
2.7.3.2.Kültür.....	18
2.7.4. Toksin Aramaya Yönelik Testler.....	19
2.7.4.1.Doku Kültürü.....	19
2.7.5. İmmünoyagnostik Testler.....	19
2.7.5.1.Enzim İmmünoassay (EIA).....	19
2.7.5.2.Lateks Aglutinasyon Testi.....	20
2.7.5.3.İmmünokromatografik Testler.....	21
2.7.6. Zıt Yönlü İmmunoelektroforez ( CIE ).....	21
2.7.7. Floresan Antikor Testi ( FAT ).....	21
2.7.8. Moleküler Yöntemler.....	21
2.7.8.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	21
2.7.9. Diğer Testler.....	22
2.8.Tedavi.....	23
2.9.Korunma.....	24
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>25</b>
3.1. Makroskobik inceleme.....	25

3.2. Mikroskopik inceleme.....	25
3.2.1. Direkt mikroskopik inceleme.....	25
3.3. Bakteriyel ve Viral İnceleme.....	25
3.4. <i>Clostridium difficile</i> Kültürü.....	26
3.5. Kültürü Doğrulama Amaçlı Lateks Aglütinasyon.....	26
3.6. <i>Clostridium difficile</i> Toxin A Lateks.....	27
3.7. Enzim immunoassay (EIA).....	27
3.8. İstatistiksel Analiz.....	28
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>29</b>
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
<b>6.SONUÇ.....</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER</b>	

***SİMGELER ve KISALTMALAR***

<u>KAVRAM</u>	<u>SİMGE</u>
Psödomembranöz Kolit	PMC
Enzim immünoassay	EIA
Mikrometre	µm
Milimetre	mm
Ultraviyole	UV
Nanometre	nm
Cycloserine –Mannitol agar	CMA
Cycloserine Mannitol Kanlı agar	CMBA
Cycloserine Cefoxitine Fructose agar	CCFA
Kilodalton	kDa
Polimorf nüveli lökosit	PNL
Tümör nekroze edici faktör	TNF $\alpha$
Centers for Disease Control	CDC
İnsan epidermoid karsinoma hücreleri	Hep2
Chinese Hamster Ovary hücreleri	CHO
İnsan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri	MRC 5, WI-38
İnsan amniyon hücreleri	FL
Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri	Vero
Zıt Yönlü İmmünoelektroforez	CIE
Fluoresan Antikor Testi	FAT
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	PCR
İnterlökin	IL
Kotrimaksazol	SXT

***TABLolar DİZİNİ***

Tablo 1: <i>C.difficile</i> 'ye bağlı ishale neden olan ilaçlar	11
Tablo 2: <i>C.difficile</i> ile ilişkili ishalde rol oynayan risk faktörleri	12
Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı	29
Tablo 4: Hasta ve kontrol gruplarının yaş gruplarına göre dağılımı	30
Tablo 5: Hastaların geldikleri bölümlere göre dağılımı	30
Tablo 6: Klinik hastaların dağılımı	31
Tablo 7: Hastalarda geldikleri bölümlere göre <i>C.difficile</i> pozitifliğinin dağılımı	32
Tablo 8: Kullanılan antibiyotikler ile <i>C.difficile</i> pozitifliği dağılımı	33
Tablo 9: Kültür sonuçlarının yaş gruplarına göre dağılımı	34
Tablo 10: Kültür ile elde edilen <i>C.difficile</i> pozitifliğinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı	34
Tablo 11: ELISA Toksin A+B ile kültür pozitifliğinin karşılaştırılması	35
Tablo 12: Kültür ve Toksin A lateks yöntemlerinin karşılaştırılması	35
Tablo 13: Toksin A kart testin ELISA Toksin A+B ile karşılaştırılması	36

## ÖZET

*Clostridium difficile*, asemptomatik taşıyıcılık, psödomembransız kolit, psödomemranöz kolit (PMC), fulminant kolit/toksik megakolon gibi çok çeşitli klinik tablolara neden olabilen gram pozitif, anaerop, sporlu bir basildir. Yoğun bakımlarda antibiyotik kullanımı ile bağırsak florasının bozulmasından *C.difficile* sorumlu tutulabilmektedir. Çalışmada poliklinik, klinik ve yoğun bakım hastalarında antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen ishal hastalarında *C.difficile*'nin etken olup olmadığının farklı yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, 2005 yılı boyunca hastanemizin polikliniklerine başvuran, klinik ve yoğun bakım servislerinde yatan 18-80 yaş arası hastalar ile taşıyıcılıklarının araştırılması açısından yoğun bakım çalışanları ve gıda personeli dahil edilmiştir. Bu dönemde 45'i (% 49.4) erkek olmak üzere toplam 91 hasta ile 21'i (% 77.8) erkek toplam 27 kontrol grubundan bilgileri içeren anket formu yanı sıra dışkı örnekleri toplanmıştır. Hasta dışkı örneklerinden *C.difficile*; kültür, kültürde üreyen kolonilerden lateks aglütinasyon, Toksin A lateks ve Toksin A+B ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır. Hasta dışkı örneklerinden 13'ünde (% 14.2) kültür, 4'ünde (% 4.3) toksin A lateks, 13'ünde (% 14.2) ise Toksin A+B ELISA yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır.

Sonuç olarak; yoğun antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishal hastalarında *C.difficile*'nin önemli olduğu, kültür ya da Toksin A+B ELISA yöntemi ile araştırılmasının uygun olacağı ayrıca antibiyotik kullanımı konusunda hekimlerin ve toplumun bilinçlendirilmesi gerekliliği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İshal, *Clostridium difficile*, Toksin A lateks, Toksin A+B ELISA.

## SUMMARY

*Clostridium difficile* is an anaerobic spore forming bacteria which is the major cause of pseudomembranous colitis (PMC), antibiotic associated diarrhea and fulminate colitis /toxic megacolon. When normal intestinal flora is altered generally due to the overuse of antibiotics especially at intensive care unit we see these clinical spectrum. In this study we examine whether or not *C.difficile* is a responsible agent of diarrhea after using antibiotics on either outpatient or inpatient basis, including intensive care unit.

During 2005, patients seen on outpatient clinics, admitted to wards or intensive care units, aging 18 to 80, their caring staff were included into the study. In this term, 91 patients (49.4% men/45 men) and 27 control group (77.8% men/21 men) were studied. *C.difficile*, culture(Oxoid *Clostridium difficile* Agar Base), latex agglutination which is a colony springs up culture, searched by toxin A latex (Oxoid, UK) and toxin A+B ELISA(Seramun GmbH, Serazym *C.difficile* Toksin A+B) .

In the 13 (14.2%) of samples culture, in the 4 (4.3%) of samples toxin A latex, in the 13 (14.2%) of samples ELISA toxin A+B were found positive.

As a result; at diarrhea situations which is a reason of intensive antibiotics usage *C.difficile* is important agent, so investigating it by culture or toxin A+B ELISA

**Key Words:** Diarrhea, *Clostridium difficile*, Toxin A Lateks, Toxin A+B ELISA.



## 1.GİRİŞ

Günümüzde yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak; özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda *C.difficile* enfeksiyonlarına sık rastlanmaktadır. Antibiyotik kullanımının bilinçsiz olması bu durumu daha da tetiklemektedir. Ancak *C.difficile* enfeksiyonları nadir de olsa antibiyotik kullanım hikayesi olmayan hastalarda da görülmektedir.

Son yıllarda tıp alanındaki gelişmelere bağlı olarak malign hastalıkların tanı ve tedavisinde büyük gelişmeler olmuştur, ancak bu durum bağışıklık sisteminin baskılanması, enfeksiyon oranında artış, antimikrobiyallere karşı aşırı duyarlılık, toksik yan etkiler ve mikroorganizmalarda direnç gelişimi gibi sorunları da beraberinde getirmiştir. Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterileri değil normal flora bakterilerini de etkilemekte, endojen mikroflorayı bozmakta ve süper-enfeksiyonlara yol açabilmektedir (1).

Sağlıklı kişilerde, kolon florası büyük bir oranda *C.difficile* kolonizasyonunu önlemektedir. Ancak antimikrobiyal ajanlar, sitostatik ilaçlar, radyasyon ve bağırsakların ameliyat öncesi mekanik temizliği gibi değişik faktörler kolon florasını bozarak çevrede yaygın olarak bulunan *C.difficile* sporlarının yerleşmesine zemin hazırlamakta; sık kullanımları nedeni ile antibiyotikler florayı bozanlar arasında ilk sırada yer almaktadır (2).

*Clostridium difficile*, normal koşullarda insanların gastrointestinal sistem florasının stabil bir üyesi olmamakla birlikte yenidoğanlarda % 60-70 oranında kolonize olabilmektedir. Ancak ilerleyen yaşla ters orantılı olarak yetişkinlerde bu oran % 1-3'lere kadar düşmekte olup, dışkıdan normal flora bakterileri ile birlikte de izole edilebilmektedir. Yenidoğanlarda bakterinin yüksek oranda kolonize olduğu ve toksin ürettiği halde bu grupta psödomembranöz enterokolitin nadir olarak görülmesinin sebebinin; bu dönemde bağırsak epitel hücrelerinin toksine duyarlı olamaması veya uygun reseptörlerinin olmadığı kanısını uyandırmaktadır. İlerleyen yaş ile birlikte intestinal sistemin mikroflorasını oluşturan bakteri türlerinin *C.difficile* suşlarını inhibe ettiği, özellikle anaerob mikroflorayı oluşturan *Eubacteria*, *Bifidobacteria* ve *Bacteroides* türlerinin *C.difficile*'nin kolonizasyonunu tamamen engellediğini göstermiştir (3, 4).

Kalın bağırsak enfeksiyonlarına sebep olan bakteriyel etkenler içinde ilk sıralarda yer alan *C.difficile*'ye karşı konağın cevabı çok farklı olabilmekte; bakteri asemptomatik taşıyıcılıktan psödomembransız kolit, psödomembranöz enterokolit (PMC) ve fulminant kolit-toksik megakolona kadar değişebilen klinik tablolara yol açabilmekte, bazı hastalar da bağırsak perforasyonu ile kaybedilebilmektedir. *C.difficile*'ye yönelik tanı yöntemlerin gelişmesiyle birlikte mikroorganizmanın ishal gelişimindeki önemi giderek daha fazla anlaşılmaya başlanmış, klinik sendrom olarak yüzyıldır bilinmesine rağmen PMC'in etyoloji, tanı ve tedavisinde son 15 yıl içinde önemli gelişmeler olmuştur (5, 6).

*C.difficile* ile meydana gelen enfeksiyonlar kalın bağırsaklarla sınırlı olmayıp litaretürde az sayıda da olsa, ekstra-intestinal enfeksiyonlar bulunmaktadır. Ancak antibiyotiğe bağlı ishalleri hastaların çoğundan, PMC'lilerin ise hemen hemen hepsinden sorumlu olan *C.difficile*, son yıllarda nozokomiyal ishal etkenleri içinde en sık izole edilen bakteri olarak karşımıza çıkmakta ve insanlarda enfeksiyona neden olan anaerop, gram pozitif-sporlu basiller içinde yer almaktadır (7).

Antibiyotiğe bağlı hastane ve toplum kökenli ishal hastalarında *C.difficile*'nin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada; çeşitli nedenlerle antibiyotik tedavisi gören ve ishal yakınması gelişen klinik ve yoğun bakımlarda yatan hastalar ile yoğun bakım ve gıda personelindeki taşıyıcılığın belirlenmesi için bireylere ait dışkı örneklerinde kültür, kültürde üreyen kolonilerin lateks aglütinasyon ile doğrulanması yapıldıktan sonra Toksin A lateks yöntemi ile toksin A ve Enzim immünoassay (EIA) yöntemi ile toksin (A+B) varlığı araştırılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Tarihçe

Psödomembranöz enterokolit (PMC), ilk kez 1893 yılında Finney tarafından tarif edilmiştir. Mide tümörü nedeni ile ameliyat olan bayan hastanın, postoperatif dönemde progresif ishali başlamış, hasta ameliyattan 15 gün sonra ölmüş, yapılan otopside; ince bağırsaklarda “*difterik membran*”lar gözlenmiştir (8, 9).

*Clostridium difficile* ilk defa 1935 yılında “Hall” ve “O.Toolle” tarafından 2 hafta ile 1 yaş arasındaki semptomsuz çocukların dışkı ve mekonyumlarından izole edilip “*Bacillus difficilis*” adı verilmiştir. Mikroorganizmanın her ne kadar deney hayvanlarında letal bir toksin ürettiği gösterilmişse de sağlıklı yenidoğanların dışkılarında sık olarak rastlandığından kommensal olarak sınıflandırıldı. “Synder” yine aynı yaş grubundaki bebeklerde benzer sonuçlar bildirmiştir (10-12).

Hastalıkla ilgili yayınlar başlangıçta sınırlı sayıda olup, 1950'lere kadar yılda birkaç PMC hastası bildirilmiştir. Mayo klinikte 1925-1952 yılları arasında postoperatif enterokolit hastalarının araştırıldığı retrospektif bir çalışmada, hastalığın yılda yaklaşık üç hasta ile sınırlı olduğu saptanmış ve antibiyotikler ile PMC arasında ilişki olabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan istatistiksel çalışmalar antibiyotik öncesi ve sonrasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur. Daha sonra 1960-1970 yılları arasında klindamisin, linkomisin veya geniş spektrumlu  $\beta$ -laktam antibiyotikler ile tedavi edilen hastalarda PMC görülme oranında artış tespit edilmiş, bu yıllarda hastalığın tedavisi tam olarak bilinmediğinden bazı hastalar kaybedilmiştir (8, 9, 13).

“Small” (1968) syrian hamsterlerinde linkomisin enjeksiyonundan sonra fetal enterokolit geliştiğini göstermiştir. 1970'li yıllarda klindamisin ile tedavi edilen 200 hasta ile yürütülen prospektif bir çalışmada bu hastaların % 21'inde ishal gelişip endoskopide PMC olduğu ortaya çıkınca PMC'ye olan ilgi daha da artmış ve dışkı örneklerinde *C.difficile* toksininin araştırılmasına hız verilmiştir. Daha sonra “Larson” ve arkadaşları (1977) antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen PMC'li bir hastanın dışkı filtratlarının doku kültürü hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olduğunu göstererek kaynağı bilinmeyen bir toksinin varlığını öne sürmüşler, bundan kısa bir süre sonra da “Bartlett” ve arkadaşları (1978) sitotoksinin kaynağının

*C.difficile* olduğunu tespit etmişlerdir. O zamandan beri *C.difficile* nozokomiyal ishal enfeksiyonunun önemli bir sebebi olarak kabul edilmektedir (12, 14).

## 2.2.Mikrobiyolojik Özellikleri

*C.difficile*, anaerop, subterminal sporlu, hareketli, kapsülsüz, 0.5 - 2 µm eninde, 3 - 17 µm boyunda gram pozitif bir basildir. Genç kültürlerde daima gram pozitif boyanma özelliği gösterir. Yaşlı kültürlerde gram negatif boyanmaya eğilimi vardır (15, 16).

Katı besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda filamantöz şekilde, fakat dokudan hazırlanan preparasyonlarda tek tek veya kısa zincirler halinde görülürler. Sporların çapları bakteri eninden geniş olduğundan bakterinin şeklini bozar ve adeta bakteriye raket görünümünü kazandırır (10, 12, 17-19).

Adi besiyerlerinde üreyebilir, ancak içinde kan, fruktoz ve yumurta bulunan besiyerlerinde daha kolay ürer. Optimal üreme ısı 37° C, pH 7-7,2'dir. Uygun besiyerlerinde 48 saat inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında S tipi koloniler oluşturur. Koloniler 360 nm'lik ultraviyole (UV) ışığı altında incelendiğinde açık yeşilden sarıya kadar değişebilen, bir hale ile çevrili olup buzlu cam görünümündedir. Bakterinin dışkı gibi kontamine örneklerden izolmanında içinde çeşitli antimikrobiyal ajanlar bulunan Cycloserine-Mannitol Agar (CMA), Cycloserine-Mannitol Kanlı Agar (CMBA), Cycloserine-Cefoxitine-Egg Yolk Fructose Agar (CCFA) gibi selektif besiyerleri kullanılır. İndikatörlü (neutral red) CCFA besiyerinde; *C.difficile* 48 saatlik inkübasyondan sonra etrafı sarı halka ile çevrili 3 mm veya daha büyük çaplı filamentöz kenarlı, buzlu cam görünümünde koloniler meydana getirir (15, 16).

Koyun ve insan kanlarında hemoliz oluşturmaz. At kanını nadiren hemoliz eder (10, 20). Virulan suşlarda kapsül oluşumu görülür (21, 22).

*C.difficile*'nin antibiyotikle ilişkili ishale neden olduğunun anlaşılmasından sonra çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunu arttırmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Dışkının 70-80° C'lik benmaride 20 dakika tutulmasının veya 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırıldıktan sonra oda ısısında en az 45 dakika bekletilmesinin kontaminant çoğu bakteriyi öldürdüğü ve *C.difficile* izolatını önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir (2, 9, 15). Sodium taurocholate'ın *C.difficile*

sporlarının vegetatif forma geçmesini kolaylaştırdığı ve CCFA besiyerine % 0.1-0.2 oranında saf sodium taurocholate eklenmesinin özellikle çevresel kaynaklardan alınan örneklerdeki az sayıdaki *C.difficile*'nin saptanmasında yararlı olduğu bildirilmiştir. Ancak bu konu ile ilgili rutin klinik laboratuvarlarca yeterli araştırmalar yapılmamıştır (23).

Tyrosin'li besiyerinde ürediğinde tyrosini metabolize ederek L-tyrosin'den p-krezol açığa çıkarırlar. Bunun sonucu olarak besiyerinde spesifik cresol kokusu (at veya fil gübresine benzer) oluşur (10, 18, 24).

*C.difficile*, % 2 nişastalı sıvı besiyerinde anaerop atmosferde spor oluşturur. Sporların varlığı bu besiyerinin 80° C'de 20 dakika tutulduktan sonra kanlı agara ekim yapıp anaerop atmosferde 24 saat süre ile 37° C'de inkübe edilmesi sonucu bakterilerin üremesi ile gösterilir (10).

*C.difficile* katalaz, üreaz, lesitinaz ve lipaz aktivitesine sahip değildir. Bazı suşlar jelatini ve eskulini hidrolize eder. H<sub>2</sub>S ve indol oluşturmaz. Çoğu suş glikoz, manitol, mellibioz ve melesitozu asit oluşturarak fermente ederken, bazı suşlar salisin, ksiloz, sorbitol ve trehaloza da etki edebilir. Laktoz, sükroz, maltoz, arabinoz, glisin, rafinoz, ramnoz üzerine etkisi yoktur. L-tirozin (p-hydroxyphenylacetic acid)'i p-krezole çevirir (2, 25, 26). *C.difficile*'nin vejetatif şekilleri ısı, eter ve alkol gibi fiziksel ve kimyasal etkenlere dayanıksız oldukları halde sporları oldukça dirençlidir. Oda ısısında tutulan kontamine materyalde enfeksiyöz özelliğini yaklaşık 5 ay korur (10, 16, 18, 19).

Antibiyotiğe bağlı ishal patogenezinde rol oynayan toksijenik suşlarda protein yapısında termolabil ve soluble iki tip toksin toksin A ve toksin B belirlenmiştir (9, 27).

Toksin A, primer olarak enterotoksisiteden, toksin B ise sitotoksisiteden sorumludur. Toksin B'nin enterotoksik etkisi yoktur. Toksin A sitotoksik etkiye de sahiptir. Ancak toksin B'nin sitotoksik etkisi, toksin A'ya göre 1000 kat daha fazla olup bu etki aktin depolimerizasyonu sonucu hücre iskeletinin bozulması ile ortaya çıkmaktadır (2, 28, 29).

Toksin A ve B'nin saflaştırılması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Sullivan ve ark. (30) DEAE ion-exchange chromatogphy yöntemi ile toksin A'nın 440-500 kDa, toksin B'nin 360-470 kDa molekül ağırlığında olduğunu ileri sürmüşler,

Barrossco ve ark. (31), toksin A'nın molekül ağırlığını 308 kDa, toksin B'ninkini ise 270 kDa olarak belirlemişlerdir.

Yapılan sekans analiz çalışmaları toksin A ve toksin B arasında yapısal bakımdan % 63 oranında benzerlik olduğunu ancak aminoasit dizilimi açısından önemli farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Gerek toksin A, gerekse toksin B'nin C-terminal uçlarında yer alan 21-50 aminoasit uzunluğundaki tekrarlayıcı yapıların, bu moleküllere immünodominant özellik kazandırdığı, ligand domaini olarak işlev gördüğü, konak hücre yüzeyindeki toksin bağlayıcı molekülleri tanıdığı ve toksinlerin değişik hücre içi aktivitelerden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. İki toksin arasında yüksek derecede benzerlik olmasına rağmen toksin A veya toksin B'ye karşı elde edilen antitoksinlerin özgül olduğu ve aralarında çapraz reaksiyonlar görülmediği saptanmıştır (32, 33).

#### 2.2.1.Toksin A

Toksin A enterotoksisite, sitotoksisite, tavşan eritrositlerinde hemagglütinasyon gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Hücre yüzeyindeki karbonhidrat yapısındaki özgül reseptörlere bağlanma özelliğindedir (34).

Enterosit yüzeyindeki reseptörler doğumda henüz hastanlaşmamış olup toksin bağlama kapasiteleri çok düşüktür. Hayatın ilk üç haftasında yavaş yavaş yapısal olgunluğa erişir ve bebek 30-40 günlük olduğunda toksin bağlama kapasitesi erişkinlerdeki düzeye gelir (35). Bu durum sağlıklı yenidoğanlarda toksijenik *C.difficile* suşlarının sık olarak izole edilmesine rağmen hastalığın görülmemesini açıklamaktadır. *C.difficile*'nin yenidoğanların normal bağırsak florasının bir üyesi olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (13, 36).

Psödomembranöz kolitin ilk semptomu olan ve bağırsak mukoza hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu oluşan diyarenin kaynağı büyük olasılıkla toksin A'dır (37). Çünkü bu toksin enterositleri direkt olarak etkilemeyip enterositlerin altındaki mikrovaskülariteye sahip endotel tabakasına ulaşarak kemotaktik etkiyle bölgeye polimorf nüveli lökosit (PNL)'lerin göçünü aktive ettiği için ve PNL'ler tarafından oluşturulan lipoksigenaz ürünlerinin de Cl<sup>-</sup> sekresyonunu stimüle ederek sekonder doku hasarına sebep oldukları iddia edilmiştir (37, 38).

Toksin A hemen hemen tüm hücre tipleri için toksiktir. Toksisitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte enflamasyon bölgesine göç eden PNL'leri öldürebilmektedir. Böylece PNL'lerden salınan lizozomal enzimler lokal hasara katkıda bulunur (37). Toksin A mukoza hücrelerini doğrudan öldürebildiği gibi monosit, PNL ve makrofaj gibi sitokin üreten hücelere bağlanarak antijenik stimülasyon sonucunda bu hücrelerin solubl mediatör salgılayarak lokal doku tahribine neden olabilir. Toksin A insan kan grubu antijenleri olan I, X, Y içeren birçok farklı reseptörlerine de bağlanabilmektedir. X antijenleri PNL'lerin yüzeyinde bol miktarda bulunmaktadır (12, 37, 39, 40).

*C.difficile* tarafından salgılanan toksinler kolera toksini ve *E.coli*'nin ısıya duyarlı enterotoksini gibi diğer bakteriyel toksinlerle bazı ortak özelliklere sahiptir. Kolera ve *C.difficile* toksinleri için ana hedef, konak hücrelerdeki mikroflamanlardır. Ancak fonksiyonel ve yapısal önemli değişiklikler mevcuttur (33, 37).

### 2.2.2.Toksin B

Toksin B'nin sitotoksik etkisi hücre iskeletinin bozulması sonucu hücrenin yuvarlaklaşması ile sonuçlanan filamentöz aktin depolimerizasyonu ile olur. Toksin B'nin aktin polimerizasyonunda rol alan proteinler üzerine indirek bir etkisinin de olabileceği düşünülmektedir (41, 42).

Toksin B'nin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Toksin B muhtemelen tek başına toksin değildir, toksin A ile birlikte sitotoksik etki göstermektedir. Sıçan ve hamsterlerde invivo şartlarda yapılan çalışmalarda bu hayvanların kolonlarında toksin B'ye az miktarda toksin A ilave edilmezse veya mukozaya mekanik olarak hasar verilmezse hiçbir semptom görülmemektedir. Bu olay mukoza hücrelerinin toksin B için reseptör taşımadığını göstermektedir. Toksin B sadece toksin A veya diğer faktörlerin mukozaya yeterli miktarda tahrip edip toksin B'nin alttaki dokuya nüfuz ettiğinde etkisini göstermektedir. Toksin A ve B kompleks bir etkiye sahip olup, iyon dengesiyle birlikte hücre morfolojisini değiştirirler (5, 10,12, 20, 37, 43-45).

Pothoulakis ve ark.(41), toksin B'nin değişik tip bağırsak hücrelerinde protein sentezini inhibe ettiğini ifade etmişler, Siffert ve ark.(46) ise bu etkinin sadece

bağırsak hücrelerinde değil, inflamasyonda önemli rol oynayan fagositik hücrelerde de görüldüğünü ancak mononükleer hücrelerin canlı kaldığını göstermişlerdir.

### 2.3.Patogenez

*C.difficile* invazyon yapmayan bir bakteridir. Kolon mukozasında kolonize olarak salgıladığı toksinlerle hastalık oluşturur. Flajellar proteinler, yüzey proteinleri ve yüzey adezinlerinin bakteri kolonizasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (47).

*C.difficile*'nin yapmış olduğu toksin A ve B ise hastalık patogenezinde esas rolü oynamaktadır. Her iki toksin de yüksek molekül ağırlıklı ve ısıya duyarlı proteinlerdir. Bunun dışında ADP-ribozile eden toksin gibi bazı diğer toksinler de tanımlanmıştır (48, 49). *C.difficile* bunların dışında in vitro olarak bazı ekstraselüler enzimler yapmaktadır. Ancak, bunların hastalığın patogenezindeki rolleri henüz aydınlığa kavuşturulmamıştır (48).

Her iki toksin de hücre içine endositoz yoluyla girer (50, 48). Hücre içinde toksinlerin hedefi, aktin hücre iskeletinin bütünlüğünden sorumlu sinyal molekülleri olan rho proteinleridir (48, 50). Bu proteinlerin inaktivasyonu sonucu hücre iskeletinin bütünlüğü bozulur ve protein sentezi inhibe olur, hücreler yuvarlaklaşır ve hücre ölümü görülür. Toksin A ve B ayrıca tümör nekroze edici faktör alfa (TNF $\alpha$ ) ve proinflamatuvar interlökinlerin salgılanmasına neden olarak inflamatuvar yanıtı ve psödomembran gelişmesine yol açar; aynı zamanda kapiller permeabilite ve peristaltizm artışına da neden olurlar (48, 50, 51).

*C.difficile*'ye bağlı ishal patogenezinde kolon florasının bozulması, mikroorganizmanın toksijenik olup olmaması ve risk faktörleri gibi çok çeşitli etmenler rol oynar.

#### 2.3.1.Kolon Florası ve Floranın Bozulması

Normal fekal florada 100'den fazla ayrı organizma tipi düzenli olarak bulunur. Sigmoidoskopi gibi minor travmalı girişimlerin % 10'unda bakteriyemi gelişebilme riski vardır.

Fekal floranın % 96-99'unu anaerop, % 1-4'ünü ise aerop ve fakültatif anaerop bakteriler oluşturur. Anaerop bakteriler olarak; *Bacteroides*, *Fusobacterium*,



*Lactobacillus* ve *Clostridium* türleri, aerop olarak; Gram negatif basiller, koliform bakteriler, enterokok, *Proteus*, *Laktobasil* ve *Candida* türleri bulunur (52).

*C.difficile*'nin bağırsaklara kolonizasyonu, henüz açıklanamayan mekanizmalarla *Lactobacillus*, *Bacteroides spp.*, *Enterococcus*, *Clostridium bifermentans*, *Escherichia coli* ve *Peptostreptococcus productus* başta olmak üzere birçok flora bakterisi tarafından sınırlandırılmaktadır (8).

Ayrıca cerrahi girişim öncesi gastrointestinal sistemin mekanik temizliği, radyoterapi, hastanede uzun süreli yatarak tedavi görme, yoğun bakım ünitesinde kalma gibi ilaç dışı faktörler de rol oynayabilir (2).

Tablo.1. *C.difficile*'ye bağlı ishale neden olan ilaçlar (53).

<b>1-Sıklıkla neden olanlar</b>	Ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin, linkomisin, metronidazol
<b>2-Seyrek olarak neden olanlar</b>	Kloramfenikol, eritromisin, imipenem, aminopenisilinler dışındaki penisilinler
<b>3-Çok seyrek olarak neden olanlar</b>	<b>a) Antimikrobiyaller</b> Basitrasin, aminoglikozitler, kinolonlar, rifampisin, tetrasiklin, vankomisin, trimetoprim-sulfametoksazol, amfoterisin B, aztreonam, asiklovir
	<b>b) Antineoplastikler</b> Sisplatin, siklofosfamid, metotreksat, doksorubisin

Minör enfeksiyonların profilaksi veya tedavisi amacıyla kısa süreli antibiyotik kullanımı bile *C.difficile*'nin aşırı çoğalmasına neden olabilmekte ishale yol açabilmektedir (8, 9)

### 2.3.2.Risk Faktörleri

İleri yaş, altta yatan hastalık, başka bir enfeksiyonun varlığı, karın içi cerrahi girişimler ve yanık gibi çeşitli faktörler enfeksiyon riskini arttırmaktadır (54, 55).

Tablo 2. *C.difficile* ile ilişkili ishalde rol oynayan risk faktörleri (53).

<b>1-Bireysel faktörler</b>	<b>2-Çevresel veya girişimsel faktörler</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- İleri yaş</li> <li>- Altta yatan hastalık(AIDS, kanser, üremi, diabet)</li> <li>- Kullanılan ilaçlar               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antiperistaltik ajanlar</li> <li>• İmmüsupresif ajanlar</li> <li>• Antineoplastik ajanlar</li> <li>• Narkotik analjezikler</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hastane personelinin el yıkamaması veya eldiven kullanmaması</li> <li>- Karın içi cerrahi tedavi (karaciğer, safra kesesi ve bağırsak)</li> <li>- Uzun süre hastanede kalma</li> <li>- Yoğun bakım ünitesinde kalma</li> <li>- Nazogastrik tüp uygulaması</li> <li>- Bağırsakların mekanik temizliği</li> </ul>

### 2.4.Epidemiyoloji

*C.difficile* esas olarak hastane enfeksiyonlarına neden olmakla birlikte, hastane dışı enfeksiyon da yapabilir. Ancak, hastane dışı enfeksiyonların epidemiyolojisi çok iyi bilinmemektedir (56). Mikroorganizmanın insana geçişi oral fekal yol ile olur. *C.difficile* sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak bulunur ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur (57).

Kedi, köpek, at, eşek, inek, deve gibi birçok hayvanın kolon florasında olmakla birlikte insana bulaşta hayvan rezervuarlarının önemi yoktur (15, 23). Salgınlar sırasında yenidoğan servislerindeki küvözlerden, yoğun bakım servislerinin yer döşemesi, havalandırma tesisatları, banyo küveti, lavabo ve tuvalet taşı gibi yerlerden alınan örneklerden, hasta odalarındaki nevresim, mobilya yüzeyi ve telefon tuşları yanında steteskop, termometre ve hastane personelinin ellerinden yapılan kültürlerde *C.difficile* izole edilmiştir (58-60).

Hayatın ilk yılında % 60-70 olan taşıyıcılık oranı bağırsak florasındaki diğer mikroorganizmaların *C.difficile* kolonizasyonunu engellemesi nedeniyle erişkinlerde % 0-3'e kadar düşmektedir (61, 62).

Hastanede yapılan doğumlarda *C.difficile*'nin alınması daha kolaydır. Fakat toksinin enterositlere bağlanmasında rol oynayan reseptörler yaşamın ilk yıllarında henüz hastanlaşmadığı için bakteri toksijenik olsa da genellikle ishal gelişmez, enfeksiyon asemptomatik olarak seyreder. Bir yaşından itibaren bağırsak hücrelerindeki reseptörlerin hastanlaşması ile toksine karşı duyarlılık da artar (9, 35, 63).

Sağlıklı erişkinlerdeki taşıyıcılık oranları ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir. Bu oran İsveç'te % 2, Japonya'da % 15 olarak bildirilirken ülkemizde yapılan az sayıdaki çalışmada farklı sonuçlara ulaşılmıştır (9).

Mikroorganizmanın hastanede kazanılma oranı % 7-30 arasında değişmekte olup bu hastaların % 70'inde ishal gelişmektedir. *C.difficile*'ye bağlı salgınlarda bu oranlar daha da artmaktadır. Hastanede yatan çocuklarda taşıyıcılık oranının % 4-75 arasında olduğu bildirilmektedir (59, 64, 65).

Matsuki ve ark.'nın çocuklarda *C.difficile* taşıyıcılığını araştırdığı çalışmada, 40 yenidoğandan bir tanesinde *C.difficile* taşıyıcılığı saptanmış tiplendirmeler sonrasında bunun anne değil çevre kaynaklı olduğu; 1-2 yaş grubunda *C.difficile* taşıyıcılığının % 84.4'e kadar çıktığı 2 ve üzeri yaş grubunda bu oranın % 30.3'lere kadar düştüğü görülmüştür (66).

Son yıllarda CDC'nin raporlarına göre Amerika'daki hastanelerde 2000-2001 yıllarında *C.difficile* ilişkili diyarenin sıklığı ve şiddeti artmaya başlamış, 2005 yılında bu oran % 26'lara kadar yükselmiştir (67).

## 2.5.Klinik

*C.difficile*, asemptomatik taşıyıcılık, psödomembransız kolit, psödomembranöz enterokolit (PMC), fulminant kolit/toksik megakolon gibi çok çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir. Mikroorganizmaya karşı konak cevabındaki farklılıkların nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durumun suşlar arasındaki farklılıklardan, konaktaki toksin reseptörlerin farklılığından ya da immün yanıt farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (6, 9).

Hastalığın bulguları antibiyotik kullanımı sırasında ortaya çıkabileceği gibi, antibiyotik kesildikten 8 hafta sonrasına kadar herhangi bir zamanda da gelişebilir. Ancak, birçok hastada bu süre antibiyotik tedavisinin 4-9'uncu günleridir (68).

Hastaların çoğunda *C.difficile* enfeksiyonunun her şeklienden sonra asemptomatik taşıyıcılık gelişebilir. Bunun en büyük önemi, asemptomatik taşıyıcıların enfeksiyon için sürekli kaynak oluşturmalarıdır (68). Hastalığın diğer bir şekli olan basit diyare hastaları tüm antibiyotiğe bağlı diyarelerin % 20'sini oluşturur. Hafif seyirlidir. Kramp şeklinde karın ağrısı ve diyare ile karakterizedir. Sistemik semptom ve bulgular yoktur. Psödomembran gelişmeyen kolit hastaları ise genellikle halsizlik, iştahsızlık, bulantı, karın ağrısı ve sulu diyare ile seyredir. Bazen gaitada gizli kan olabilir. Çok yüksek olmayan ateş ve lökositöz gibi sistemik bulgular mevcuttur. Endoskopide diffüz ya da yama tarzında eritematöz kolit bulguları saptanır (56).

PMC enfeksiyonunun en ağır seyreden şeklidir. Sigmoidoskopide 2-10 mm çapında, etraf dokudan yüksek, sarımsı renkte psödomembranlar tüm kolorektal mukozada yaygın olarak gözlenir (56). Hastaların % 20'sinde rutin sigmoidoskopide görülemeyen daha proksimal tutulum olabilir. Hastalık nadiren ince bağırsağı tutar. *C.difficile* enfeksiyonlarının %3'ü fulminant kolit şeklinde seyredir. Bu durumda, şiddetli karın ağrısı ve diyare, yüksek ateş ve belirgin lökositöz mevcuttur; ancak ileus oluştuysa diyare görülmeyebilir ve bu hastalarda toksik megakolon gelişme riski yüksektir. Protein kaybeden enteropatiye bağlı olarak hipoalbuminemi ve asit gelişebilir. Enfeksiyonun bu şeklinde kolon perforasyonu, toksik megakolon, uzamış ileus tablosu ve hatta ölüm görülebilir. Bu hastalarda endoskopi perforasyona yol açabileceği için önerilmez. Eksploratris laparotomi ve total kolektomi gerekebilir (56, 68).

### 2.5.1.Asemptomatik Taşıyıcılık

Sağlıklı yenidoğanların % 50'sinden fazlası *C.difficile* taşıyıcısıdır. Bu oran coğrafi özelliklere göre değişiklik gösterse de sağlıklı erişkinlerde % 1 civarındadır. Antibiyotik tedavisi gören erişkinlerin % 25'nin *C.difficile* ile kolonize olduğu saptanmış, ancak taşıyıcılığı belirleyen konak ve bakteriye ait faktörler tam olarak anlaşılammıştır (58, 69). Kaynak görevi gören asemptomatik taşıyıcılar fekal yolla organizmayı etrafa yayarak çevreyi kontamine ederler ve daha duyarlı hastalara bulaşmayı sağlayarak enfeksiyon zincirini devam ettirirler. Taşıyıcılık oranları tedavi ile azalmaz. Bu sebeple taşıyıcılarda tedavi önerilmemektedir. Herhangi bir

nedenden dolayı bu hastalar antibiyotik verilecek olursa tedavi sırasında veya kullanımda kısa süre sonra ishal gelişebilir (59, 61).

### 2.5.2.Psödomebransız Kolit

Antibiyotik kullanımının başlangıcından 5-10 gün sonra ortaya çıkar. Fakat tedavinin ilk dozuyla da başlayabilir. Bazen antibiyotik kullanımını takip eden 8-10 hafta içinde de gelişebilir.

Hafif hastalarda abdomende hassasiyet dışında fizik muayene bulgusu yoktur. Dışkıda *C.difficile* toksinleri vardır. Antibiyotik tedavisinin sonlandırılması ile ishal kendiliğinden geçer (9, 58).

Ağır hastalarda en belirgin hasta ani başlayan ishaldir, kramp tarzında karın ağrısı ve distansiyon olup ateş, iştahsızlık, kırıklık, bulantı ve kusma olabilir. Günde 8-20 arasında; çok sulu ya da mukoid, sarı-yeşilimsi görünümde, pis kokulu dışkı çıkarırlar. İshal hastayı güçsüz bırakacak kadar güçlü olabilir, dehidratasyon görülebilir. Lökositöz görülür, dışkıda gizli kan pozitifdir. Sigmoidoskopide yaygın ve yama şeklinde nonspesifik kolit görülebilir. Hastalığın ilerlemesini önlemek için medikal tedavi önerilir (9, 58, 63).

### 2.5.3.Psödomebranöz Kolit

*C.difficile* ile ilişkili ishalin malign formudur. Psödomebransız kolitin ağır formuna benzer. Karında hassasiyet ve ishal yanında sistemik semptomlar daha belirgindir. En önemli fark bağırsaklarda psödomebranların görülmesidir. Sigmoidoskopi ve kolonoskopide 2-10 µm çapında PMNL, nekrotik epitel hücreleri, fibrin ve mukus içeren karakteristik beyazımsı-sarı plaklar görülmesidir. Ciddi hastalarda plaklar mukozanın büyük bir kısmını kaplayacak şekilde birleşebilir. Psödomebranöz plaklara tipik olarak rektum ve sigmoid kolonda rastlanır. Fakat hastaların % 10'unda daha proksimal yerleşimli olabilir. Rektum ve sigmoidde psödomebran görülmeyen durumlarda kolonoskopi yapılmalıdır (9, 58).

#### 2.5.4.Fulminant Kolit

Hastalarda ateş, taşikardi, letarji ve şiddetli karın ağrısı vardır. Toksik dilatasyon ve toksik megakolona bağlı olarak kolonun müsküler tonusu kaybolur, fekal pasaj durur ve paradoksal olarak ishal azalır. Fizik muayenede karında belirgin duyarlılık ve distansiyon saptanabilir. Perforasyon riski sebebiyle kolonoskopi ve sigmoidoskopi önerilmez. İlerlemiş ve tedaviye dirençli hastalarda, geçici ileostomi-subtotal kolektomi gibi cerrahi girişimler hayat kurtarır (15, 58,63, 70).

#### 2.6.Tanı

*C.difficile* enfeksiyonlarının tanısı öykü, klinik bulgular ve labaratuvar bulguları ve gerektiğinde de endoskopi ile konmaktadır. Öyküsünde antibiyotik kullanımı olan ve diyare gelişen hastada lökositoz, formülde kayma, dışkı yaymasında lökosit görülmesi antibiyotiğe bağlı kolit olasılığını düşündürse de bunun *C.difficile*'ye bağlı olduğunun gösterilmesi gerekir (71, 72).

*C.difficile* tanısında dikkat edilecek noktalar Şu iki kategoride sıralanır (73):

##### *Yapılması gerekenler:*

- Semptomatik hastaların dışkı örneklerinin test edilmek üzere gönderilmesi.
- Her hasta örneğinden bir veya en fazla iki tane örnek gönderilmesi.
- Altı aydan fazla hastanede yatan hastalarda rutin mikrobiyolojik incelemeler ile ishal etkeninin saptanamadığı durumlarda *C.difficile*'den Őphelenilmelidir.

##### *Yapılmaması gerekenler:*

- Asemptomatik hastalarda dışkı örneklerinin gönderilmesi.
- Hastanede yatan ve 3.günden sonra diyare Őikayeti başlayan hastalarda *C.difficile* Őüphesi varsa bu hastaların dışkı örneklerinden *Salmonella*, *Shigella*, *Camphylobacter* ve paraziter etkenlerin araştırılması.

## 2.7. *Clostridium Difficile*'nin Laboratuvar Tanısı

### 2.7.1. Biyokimyasal Testler

#### 2.7.1.1. Rutin Biyokimyasal Testler

Lökositozun yanında, ciddi hastalarda gelişen enteropatiye bağlı olarak dehidratasyon, protein kaybı sonucunda ortaya çıkan hipoalbuminemi ve diğer bazı elektrolit anomalileri saptanabilir. Yine fekal lökositlerin saptanması *C.difficile* enfeksiyonunu destekleyen nonspesifik bulgulardır (74, 75).

#### 2.7.1.2. Gaz-Likid Kromatografisi

Bu anaerop bakteriler metabolizmaları sonucu uçucu spesifik metabolitler oluştururlar. Gaz-likid kromatografisi ile bu metabolitler saptanarak, *C.difficile*'nin kesin tanımlayıcı identifikasyonu yapılmaktadır. Basit, hızlı ve çok güvenilir diyagnostik bir testtir (76).

### 2.7.2. Radyolojik İncelemeler

Abdominal radyografi ve bilgisayarlı tomografi *C.difficile* enfeksiyon tanısında yardımcı olsa da bu amaçla en çok tercih edilebilecek radyolojik inceleme endoskopi ile (74). Abdominal radyogramda kolon ve çekumdaki dilatasyonları, incebağırsaktaki hava-su seviyesini görmek mümkündür. Bilgisayarlı tomografide ise kolondaki kalınlaşmalar ve katlanmalar görülebilir. Fakat bunlar tamamen nonspesifik bulgulardır (75). Endoskopik yöntemlerde ise kolon duvarındaki lezyonlar incelenir. Tipik psödomembran formasyonu yoksa kısmen nonspesifiktir. Maliyeti, hasta için risk taşıması ve diğer tanı testlerinin olması nedeni ile daha çok özel durumlarda başvurulmalıdır. The Amerikan College of Gastroenterology Guidelines (Amerikan Gastroenteroloji Koleji Rehberi) endoskopiye şu şartlarda önermektedir (3):

- 1) Hızlı tanı testlerine ihtiyaç duyuluyor ve test sonuçları gecikecekse,
- 2) Hasta ileuslu ve dışkı örneği alınamıyorsa,
- 3) Endoskopik tanıyı gerektiren başka bir hastalık düşünülüyorsa.

### 2.7.3.Mikrobiyolojik İncelemeler

#### 2.7.3.1.Mikroskopik İnceleme

Toksin testleri için yeterli örnek alındıktan sonra buradan bir de gram boyaması yapılır. Ayrıca taze preparat hazırlanarak faz kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde tipik salınım hareketi yapılan sporlu basiller görülebilir. Özgüllüğü düşüktür (75, 77).

#### 2.7.3.2.Kültür

*C.difficile*, kanlı agar besiyerinde, 48 saatlik inkübasyonu takiben, hemolizsiz, at dışkısı kokusunda, sarımsı-yeşil floresans veren yaklaşık 2 mm çapında, koloniler oluşturur. Bakterinin izolasyonunda en fazla kullanılan besiyeri CCFA (cyclocerin cefoxitin fructoz agar)'dır. *C.difficile* indikatörlü (neutral red) CCFA besiyerinde UV lambası altında incelendiğinde floresans veren, yaklaşık 3 mm çapında, altın sarısı renginde koloniler oluşturur (58, 63, 78).

Dışkı örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA'ya pasajlarının yapılması *C.difficile* izolasyon oranını arttırmaktadır (80, 156). Kültürde üreyen koloniler lateks aglütinasyon, gaz kromatografi veya biyokimyasal yöntemlerle identifiye edilir (77).

Kültür duyarlı olmasına rağmen, kompleks oluşu, toksijenik ve nontoksijenik suşları ayırt edememesi gibi nedenlerle kısmen merkezi laboratuvarlarda uygulanır ve daha çok salgın zamanlarında epidemiyolojik açıdan önem kazanır. Bazı hastanelerde nontoksijenik suşların oranı % 20-25'i bulmakta olup, bu sorun toksin testleri ile kombine edildiğinde çözülebilmektedir. Ancak bu da ilave zaman ve maliyet anlamı taşımaktadır (75, 3).



## 2.7.4.Toksin Aramaya Yönelik Testler

### 2.7.4.1.Doku Kültürü

Dışkı örneklerinde 10 pg'lik sitotoksin saptayabilen doku kültürleri, toksinlerin varlığını araştırmada altın standart olarak kabul edilir (80). Bu yöntemde, (Hep2) insan epidermoid karsinoma hücreleri, (CHO) Chinese Hamster Ovary hücreleri, (MRC 5, WI-38) insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri, (FL) insan amniyon hücreleri ve (Vero) Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri gibi hücre kültürleri kullanılmaktadır (30, 81).

Sıvı dışkı örnekleri santrifüje edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar saydam hücre kültürü kaplarına eklenir. 37° C'de 24-48 saat anaerob inkübasyondan sonra, ışık mikroskopunda sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Normal dışkı örnekleri çalışmaya uygun olmadığı için rutin işlemlerde en az on, hatta yüz kez dilüe edilmiş dışkılarından toksisite titreleri araştırılır (81). Nötralizan antikor (anti-*C. sordelli* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar (74, 3).

Doku kültürünün dezavantajı uzun sürede sonuç alınması, pahalı olması, standardizasyonunun sağlanamamış olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve doğrulama için referans laboratuvarına gereksinim olmasıdır. Bu nedenle pratik bir yöntem değildir (74, 82).

Her ne kadar altın standart olarak kabul edilse de toksin B'nin proteazlarla parçalanması sonucunda yalancı negatiflikler de görülebilmektedir (83).

## 2.7.5.İmmünoyagnostik 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 bir çok ticari kit üretilmiştir. Değişik çalışmalarda sadece toksin A'yı saptayabilen testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla % 63-94 ve % 75-100, *C.difficile* toksin A-B testlerinde ise oranlar % 76-95 ve % 98-100 olarak bildirilmiştir (81, 84).

*C.difficile*'ye bağlı ishal hastalarının mikrobiyolojik tanısında hücrel sitotoksite testleri altın standart olarak kabul edilse de, EIA testlerinin yüksek düzeylerde özgülük ve duyarlılığa sahip olması, kısa sürede sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin daha kolay ve zahmetsiz olması yanında maliyeti gibi sebeplerle klinik laboratuvarlar için alternatif bir yöntem olarak önerilir (78, 85).

Fakat bu yöntemle 100-1000 pg toksin A veya B saptanabilmektedir. Bu sebeple % 10-20 oranında yalancı negatiflik söz konusudur (74). Ticari kitlerin bir kısmı sadece toksin A'yı saptamaya yöneliktir, *C.difficile* suşlarının % 1-2'si toksin A üretmediği için toksin A ve B'yi birlikte saptayabilen kitler tercih edilir (74, 75). Bunun yanında *C.difficile*'nin 10 farklı toksin tipi saptanmış olup ( I-X ), tip VIII ve X toksin A'ya spesifik testlerle saptanamaz (86). Bu yöntem ile üç dışkı örneği incelenmesi tanı şansını % 5-10 arttırırken, maliyeti yükseltir. Bu sebeple hastalığın tablosunu açıklayıcı başka sebep bulunamamasına rağmen, diyare devam etmesi gibi durumlar dışında genelde tercih edilmez (74, 75). Sadece diyareli hasta dışkılarında çalışılması önerilmektedir (74).

#### 2.7.5.2.Lateks Aglutinasyon Testi

Hızlı, basit ve ucuz bir testtir. Bu testlerin esası toksin A'nın saptanması olsa da, tüm *C.difficile* suşlarında bulunan glutamat dehidrogenaz da saptanabilmektedir (75). Hücrel metabolizma üzerinde önemli rol oynayan glutamat dehidrogenaz enzimi yüksek oranda immünojenik olup memeli hücreleri ve diğer bakterilerle de ilişkilidir. Dolayısıyla bu enzime karşı oluşan antikorların saptanması esasına dayanan testlerde toksijenik ve nontoksijenik *C.difficile* izolatları ile diğer mikroorganizmalar veya memeli hücreleri arasında ayırım yapılmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu tür testlerde pozitif ve negatif prediktif değerler % 63-98 arasında değişir. Lateks aglutinasyon testlerinin hızlı taramalar için uygun olduğu ama pozitif sonuçların diğer testlerle doğrulanması gerektiği bildirilmektedir (9, 87, 88). Diğer testlere oranla duyarlılığının ve özgülüğünün düşük olması nedeni ile yaygın kullanım alanı bulamamıştır (75).

### 2.7.5.3.İmmünokromatografik Testler

Toksin A'yı saptamaya yönelik kısa sürede sonuç veren tarama testleridir. Bazıları glutamat dehidrogenaz enzimini de saptar. Diğer sitotoksin testlerine göre bunların da duyarlılığı daha düşüktür (% 70-90.6). Tanı amaçlı tek başına kullanılması önerilmez (89, 90).

Lateks aglütinasyon ve bu testin hücre kültürü sitotoksite testlerine tek üstünlüğü daha hızlı ve ucuz olması, uygulama kolaylığı ve tek veya birden fazla hasta örneğini çalışmak için uygun olmasıdır (74).

### 2.7.6.Zıt Yönlü İmmunoelektroforez ( CIE )

*C.difficile* toksinlerinin dışkı örneklerinde CIE ile saptanması bazı laboratuvarlarda *C.difficile* ile ilgili hastalığın tanısını koymakta yardımcı bir test olarak kullanıldı. Fakat birçok çalışma bunun kullanılmasını desteklemedi. Hücresel sitotoksite ile karşılaştırıldığında % 53-75 arasında yalancı negatiflik ve pozitif oranları antijen saflığına, antikorun özgüllüğüne ve klinik örneklerdeki sitotoksin miktarının yetersizliğine bağlı görünmektedir. CIE duyarlılık ve özgüllüğü düşük olduğu için tanıda kullanılması önerilmez (9).

### 2.7.7.Fluoresan Antikor Testi ( FAT )

Canlı *C.difficile* izolatlarının tavşanlara verilmesi ile elde edilen antiserumlar kullanılarak yapılmaktadır. Fakat antikor özgüllüğünün olmaması ve antiserumun *C.sordelli*, *C.bifermantans*, *C.chauvoei* ile *C.sporogenes* izolatlarına karşı da reaktivite göstermesi sebebi ile tercih edilmemektedir (9, 23).

### 2.7.8.Moleküler Yöntemler

#### 2.7.8.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR )

Bu yöntem klinik örneklerdeki az miktardaki *C.difficile* DNA'sının bir enzim (polimeraz) yardımı ile amplifikasyonu sonucunda saptanabilir hale getirilmesi temeline dayanmaktadır.

Son yıllarda monoklonal *C.difficile* antikoru ile kaplanmış manyetik boncukların dışkı örneği ile inkübe edilmesi, daha sonra bu boncukların mıknatıs yardımı ile çıkarılması ve toksin B genine özgül primerlerle PCR'da işleme sokulması esasına dayanan manyetik immüno-PCR testi geliştirilmiştir. Duyarlılığı % 96.7, özgüllüğü % 100 olan bu testin hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğuna inanılmaktadır (91).

#### 2.7.9.Diğer Testler

İnflamatuvar yanıt için belirleyici rolü olan laktoferrin, TNF-alfa, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınımını *C.difficile*'nin uyardığı ve bunların bakılmasının *C.difficile* enfeksiyonu tanısında ek bilgi sağlayacağı belirtilmektedir (92- 94).

Taşıyıcılardan ayırt etmek için sadece sulu ve son 36 saat içinde en az altı kez sulu dışkılama olan hastaların dışkıları kabul edilmelidir. Rutin dışkı kapları uygundur. Labaratuvar incelemesi ilk 24 saatte +4°C'de, daha uzun süre bekleyecekse -20°C'de bekletilmelidir (5, 95).

Sonuçta, bu yöntemlerin hepsinde birtakım avantaj ve dezavantajlar vardır. Tüm hastalar için aynı tanı yöntemini kullanmak uygun olmayabilir. Sonuçların yorumunda klinikle uyumu esas alınmalıdır. Bu amaçla The Infectious Disease Society of America ve the Society for Hospital Epidemiology of America önerisine göre *C.difficile* toksin tespitinde izlenecek yol şu şekildedir (74);

1. İleus hastaları dışında, sadece diyareli dışkılar test edilmelidir,
2. Epidemiyolojik araştırmaların dışında tedavi sonrası takip yapılmalıdır,
3. Sadece bir yaşın üzerindeki kişilerden örnek alınmalıdır,
4. Duyarlılığı daha düşük olmakla birlikte ELISA testleri sitotoksin testlerine göre alternatif olarak kabul edilebilir özelliktedir,
5. Nötropenili, HIV ile infekte ve 65 yaşın üzerindeki kişiler dışında, sadece hospitalizasyondan üç gün sonra diyare gelişen hastalar toksin yönünden test edilmelidir (üç gün kuralı).

## 2.8.Tedavi

Tedavide en önemli adım kullanılmakta olan antibiyotiğin kesilmesidir. Hafif ve orta şiddette enfeksiyonların önemli bir bölümü antibiyotiğin kesilmesine 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 (96). Basitrasın, teikoplanin ve fusidik asit gereğinde kullanılabilir seçeneklerdir (96, 97). Metronidazol *C.difficile*'ye *in vitro* olarak çok etkili olduğu gibi vankomisinden de ucuzdur. Tedavi başlanacak hastalarda ilk olarak metronidazol seçilmelidir (97). Her iki ilacın da başlangıç tedavisi 10-14 gündür. Hastaların % 80-90'ında her iki antibiyotikle yapılan başlangıç tedavisine klinik yanıt alınır da metronidazol ile % 5-16, vankomisin ile % 16-33 oranlarında relaps görülür (97). Relaps büyük olasılıkla *C.difficile* sporlarının persistansına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu hastaların tedavisinde aynı ilaçlar azaltılan dozlarda daha uzun süreler uygulanır (96, 98).

Antibiyotik tedavisine ek olarak relapsla seyreden hastalarda toksin bağlayıcı etkileri sebebi ile kolestiramin ve kolestipol gibi anyon bağlayan reçineler kullanılmaktadır (50, 72, 96, 98). Tekrarlayan hastalarda bakteri toksinine karşı Ig G düzeylerinin düşük olması sebebi ile intravenöz immünglobulin uygulanması rekürrensleri önleyebildiği gibi ağır kolit hastalarında da tedavi edici etki göstermektedir. Ayrıca formalinle inaktive toksoid aşılar da geliştirilmiştir (47, 50).

Son yıllarda denenen bir diğer tedavi yöntemi probiyotiklerin kullanılmasıdır (96, 97). İlk çağlardan beri mikroorganizmaların enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Ancak modern anlamda biyoterapötik ajanların kullanımı ile ilgili ilk fikir 1908 yılında "Nobel Tıp Ödülü" sahibi olan Rus bilim adamı Ellie Metchnikoff'a aittir. Probiyotikler *in vivo* patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar canlılarda intestinal ekosistemin kurulmasında ve korunmasında rol oynarlar. Probiyotiklerin tedavi amacıyla kullanılabilmesi için sayılarının yeterli olması, stabil kalabilmeleri, verildiklerinde ve sindirim süresince yaşıyor olabilmeleri, intestinal ekosistemde canlılıklarını koruyabilmeleri, zararsız olmaları ve konak defansı üzerinde olumlu etki göstermeleri gerekmektedir (99).

*Latobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, *Enterococcus faecium SF*, non-toksijenik *C.difficile*, yoğurt, bira mayası ve özellikle *Saccharomyces boulardii* ile elde edilen sonuçlar ümit vericidir. *S.boulardii*'nin antibiyotiğe bağlı ishalin önlenmesi ve tedavisindeki etkisi dört farklı şekilde açıklanabilir (99);

a.İmmün sistemin stimülasyonu,

b.Patojen mikroorganizmaların çoğalmasının engellenmesi,

c.Patojenik toksinlerle etkileşim, toksinlerin bağırsaklardaki reseptörlere bağlanmasının engellenmesi ve toksinlerle interferans,

d.Bağırsaklarda enzimatik aktivite değişikliği.

## 2.9.Korunma

Korunmada en etkili yol gelişigüzel antibiyotik kullanmamaktır. Aseptomatik taşıyıcıların vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilmesi taşıyıcılık oranlarını azaltmamaktadır (100, 101).

Hastane personelinin ellerinden ve hasta odalarının değişik yerlerinden yapılan kültürlerde sıkça izole edilmeleri, geçiş yolunun çapraz reaksiyonlar olduğunu düşündürmektedir. Kontamine olmaktan korunmak zordur. Ancak hastalar ile yakın temasta bulunan hastane personelinin el yıkama konusunda bilinçlendirilmesi, hasta bakımı sırasında eldiven kullanılması, rektal ve enterik girişimlerin mümkün olduğu kadar tek kullanımlık aletlerle yapılması, *C.difficile* ile enfekte hasta odalarının sodyum hipoklorid veya benzeri dezenfektanlarla temizlenmesi korunmada önemlidir (37, 58).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Kasım'2004 - Aralık'2005 tarihleri arasında prospektif randomize vaka kontrol çalışması olarak planlanmış, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma hastanesinin çeşitli kliniklerinde tedavi görmekte olan ve antibiyotik kullanılmasını takiben ishal gelişen hastalar ve yoğun bakım çalışanları üzerinde yürütülmüştür. Hastaların adı-soyadı, yaşı, cinsiyeti, kullandığı antibiyotikler, antibiyotik kullanımının kaçınıcı gününde ishal geliştiği, ishal sıklığı gibi bilgiler bir anket formu ile toplanmıştır. Bireylerden temiz tek kullanımlık kaplar içine alınan taze dışkı örnekleri önce makroskobik-mikroskobik incelemeye tabi tutulmuş, bakteriyel ve viral gastroenterit etkenlerinin ekarte edilmesi için gerekli testler yapılmış, daha sonra *C.difficile* için mikrobiyolojik incelemeye geçilmiştir.

#### 3.1.Makroskobik inceleme

Örneklerin kanlı, mukuslu, sulu, şekilsiz veya katı kıvamda olup olmadığı gibi özelliklerine bakılmıştır.

#### 3.2.Mikroskobik inceleme

Materyalden preparat hazırlanmış direkt mikroskobik incelemeye tabi tutulmuştur.

##### 3.2.1.Direkt mikroskobik inceleme

Direkt mikroskobik incelemede dışkı örneklerinde lökosit, eritrosit, parazit, parazit yumurtası bulunup bulunmadığı incelenmiştir (102).

#### 3.3. Bakteriyel ve viral inceleme

Makroskobik ve mikroskobik incelemeyi takiben dışkı örneklerinde bakteriyel ve viral gastroenterit etkenleri açısından; bakteriyel açıdan Kanlı agar, EMB (Eozine Metilen Blue), SS (Salmonella Shigella), Selenit+F, SDA (Saboraud dekstroz agar) gibi besiyerlerine ekimler yapılmış, viral açıdan incelemede Rotavirüs

ve Adenovirüsün beraber bakılabildiği Rotavirüs/Adenovirüs Combi Lateks Aglutinasyon (R-biopharm, Germany) kiti kullanılmıştır.

#### 3.4. *Clostridium difficile* Kültürü

*C.difficile* izolasyonu için *C.difficile* agar besiyeri kullanılmıştır. 500 ml distile suyun içine 34.5 gr *C.difficile* agardan (Oxoid *Clostridium difficile* Agar Base) konularak kaynatılmış daha sonra 121° C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sıcaklığı 50°C’ye soğutulduktan sonra içine 2 ml steril distile suda eritilen supplement (Oxoid Ltd. Wade Road, Basingstoke, ENGLAND) ve % 7’lik insan kanı konulmuştur. Hazırlanan besiyerleri, her defasında, standart *C.difficile* ATCC 11223 suşu ile kontrol edilmiştir.

Dışkı örnekleri 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırılmış, karışım 15 sn vortekslendikten sonra 30 dakika oda ısısında bekletilmiş daha sonra *C.difficile* agar besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekilmiştir. Ekim yapılan plaklar anaerop sistemde 37° C’de inkübe edilmiştir (103, 104). Anaerop kavanoz 48 saat sonra açılmış, plaklar üreme açısından kontrol edilmiş, üreme olmayan plaklar tekrar (OXOİD AnaeroGen™ 2.5 L) anaerop sisteme konmuş ve gün aşırı kontrol edilerek 10 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda üreme olmayan plaklar atılmıştır. Yapılan kontrollerde *C.difficile* besiyerinde kenarları düzensiz, yassı, mat ve sarı renkli, buzlu cam görünümünde, at dışkısı kokusu olan koloniler incelenmiştir.

Bu kolonilerden hazırlanan gram boyaları ile boyanmış gram pozitif basil şeklindeki bakteriler tarafından oluşturulan kolonilerin saf kültürleri yapılmıştır (105).

#### 3.5. Kültürü Doğrulama Amaçlı Lateks Aglutinasyon

*C.difficile* olduğuna karar verilen bakteriler doğrulama amacı ile *C.difficile* anti-serumu (Oxoid, Basingstoke-England, Hants, RG24 OPW) ile karşılaştırılmış ve aglutinasyon veren izolatlar *C.difficile* olarak isimlendirilmiştir.



### 3.6. *Clostridium difficile* Toksin A Lateks.

Dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A varlığının araştırılması için *C.difficile* toxin A (Oxoid, UK) kiti kullanılmıştır.

Test kiti oda ısısına getirildikten sonra sulu dışkılarından 100 µl, katı ve yarı-katı dışkılarından bir öze dolusu 1 ml dilüsyon sıvısı ile karıştırılmış, bu karışım 10-15 sn vortexlenmiş, 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant kısmından 125 µl alınıp test kartının örnek penceresine damlatılmıştır. Test kitinin çalışıp çalışmadığı, damlatma işleminden 30 dakika sonra kontrol penceresinde mavi çizginin görülmesi ile kontrol edilmiş, bu süre sonunda sonuç penceresinde mavi çizgi oluşan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### 3.7. Enzim immunoassay (EIA)

Dışkı örneklerinde *C.difficile*'ye ait toksin A+B'nin gösterilmesi için (Seramun GmbH, Serazym *Clostridium difficile* Toxin A+B) kiti kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubunda bulunan kişilerden alınan dışkı örnekleri, çalışma yapılincaya kadar -20° C'lik derin dondurucuda bekletilmiştir.

Uygulama öncesinde EIA kiti ve dışkı örneklerinin ısısı 20° C'ye getirilmiş, ependorf tüplere 500 µl tampon solüsyon konduktan sonra yumuşak kıvamlı ve sıvı örneklerden 100 µl, katı örneklerden ise 0.1 mg eklenmiş, tüpler 10 sn vortekslenmiş, 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrılarak kit prospektüsünde belirtildiği şekilde işleme tabi tutulmuştur (106).

Test işleminde; 8 x 12 kuyucuklu EIA plağının A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> kuyucuklarına negatif kontrol C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> kuyucuğuna pozitif kontrolden 100 µl konmuş ve geri kalan boş kuyucukların her birine ayrı ayrı 100 µl vortekslenmiş süpernatantlar konduktan sonra üstü kapatılan plak oda ısısında 60 dk. inkübe edilmiştir. Süre bitiminde kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmış, her kuyucuğa 120 µl konjugat biotin konmuş 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre bitiminde kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yeniden 5 kez yıkandıktan sonra 120 µl konjugat strep konularak 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmış bu kez 120 µl substrat TMB konularak 15 dk oda ısısında beklenmiş ve son olarak 120 µl stop solüsyonu

(phosphoric acid) ile reaksiyon durdurulduktan sonra plak 450-620 nm dalga boyunda, Reader 230 cihazında okutulmuştur.

Kontrol kuyucuklarına ait absorbans değerlerinin kit prospektüsünde belirtilen değerlere uygunluğu saptandıktan sonra negatif kontrol değerleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda cut-off değeri 0.240 olarak bulunmuş, örneklere ait kuyucukların absorbans değeri ile cut-off değeri karşılaştırılarak dışkı örneklerinin *C.difficile*-toksin A+B içerip içermediğine karar verilmiştir. Absorbans değeri 0.240'dan daha düşük olan örnekler negatif, absorbansı bu değerden yüksek çıkan örnekler ise pozitif olarak kabul edilmiştir.

### 3.8. İstatistiksel analiz

Veriler SPSS 10.0 (Statistical Programme Social Sciences) bilgisayar programında ki-kare testi ile yapılmış anlamlılık değeri  $p>0.05$  olarak kabul edilmiştir.

#### 4.BULGULAR

Afyonkarahisar bölgesinde antibiyotiğe bağlı ishal hastalarında *C.difficile*'nin farklı yöntemlerle araştırılmasını amaçlayan bu çalışmaya, 27'si sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 66 erkek 52 bayan toplam 118 kişi dahil edilmiştir. Kontrol grubu; taşıyıcılığın belirlenmesi için antibiyotik kullanmadığı halde hastalarla yakın temasta bulunan yoğun bakım personeli ve gıda çalışanlarından oluşturulmuştur.

*C.difficile* pozitifliği saptanan hastaların dışkı mikroskobilerinin % 35.1'inde lökosit, % 2.2'sinde eritrosit varlığı yanısıra hastaların % 55'inde serumda lökosit yüksekliği saptanmıştır. Çalışmada 91 hasta 27 kontrol grubundaki kişilerin dışkı örneklerinde *C.difficile* kültür ve toksin pozitifliği gösteren dışkı makroskobilerinin % 2.2'sinin kanlı, % 19.8'inin mukuslu, % 30.8'sinin sulu, % 19.8'inin kanlı ve mukuslu, % 5.5'inin ise kokulu ve mukuslu olduğu gözlenmiştir. Gastroenterit etkeni bakteri, rotavirüs, adenovirüs ve parazit açısından yapılan incelemelerde pozitiflik saptanamamıştır. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyetlerine göre dağılımı Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Hasta		Kontrol		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
Erkek	45	49.5	21	77.7	66	55.9
Bayan	46	50.5	6	22.3	52	44.1
<b>Toplam</b>	91	100.0	27	100.0	118	100.0

İshalli hastaların 14'ünün 16-25 yaş, 31'inin 26-35 yaş, 15'inin 36-45 yaş, 20'sinin 46-55 yaş, 6'sının 56-65 yaş ve 12'sinin 65 ve üzeri yaşta olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Hastaların 45'i poliklinik, 11'si yoğun bakım, 35'i ise çeşitli kliniklerde izlenen ve ishal gelişen bireylerdir. Kontrol grubu olarak değerlendirilen 27 kişi, hastane gıda çalışanı (n:20) ve yoğun bakım personelinden (3 Hemşire ve 4 personel) oluşmuştur.

Tablo 4. Hasta ve kontrol gruplarının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş	Hasta		Kontrol		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
16 - 25	14	15.4	2	7.4	16	13.6
26 - 35	24	26.4	24	88.9	48	40.7
36 - 45	15	16.5	1	3.7	16	13.6
46 - 55	20	22.0	-	-	20	16.9
56 - 65	6	6.6	-	-	6	5.0
65 ve üzeri	12	13.1	-	-	12	10.2
<b>Toplam</b>	91	100.0	27	100.0	118	100.0

Hastaların kabul edildiği veya gönderildiği yoğun bakım, klinik ve polikliniklere göre dağılımı Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların geldikleri bölümlere göre dağılımı.

	N	%
Yoğun bakımlar	11	12.0
Klinikler	35	38.5
Poliklinikler	45	49.5
<b>Toplam</b>	91	100.0

Hastaların 45’i polikliniklerden müracaat eden ayaktan hastalar, 46’sı ise klinik ve yoğun bakımlarda tedavi gören yatan hastalardan oluşmuştur. Antibiyotiğe bağlı gelişen ishal hastalarından alınan dışkı örneklerinin kliniklere göre dağılımı gözden geçirildiğinde; Dahiliye, Enfeksiyon hastalıkları, Cerrahi-Anestezi Yoğun Bakım Servislerinde yoğunlaştıkları, bunu Nöroşirürji, Göğüs Hastalıkları, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniklerinin takip ettiği en az örnek gelen servislerin ise

Dermatoloji, K.B.B., Acil Servis, Kardiyoloji ve Nöroloji olduğu saptanmıştır (Tablo 6). Dahiliye kliniğinden kabul edilen hastaların fazlalığı diğer kliniklere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

Tablo 6. Klinik hastaların dağılımı.

	N	%
Dahiliye	38	41.7
Enfeksiyon Hast.	14	15.3
Nöroşirürji	5	5.4
Fizik Tedavi ve Reh.	6	6.5
Üroloji	2	2.1
K.B.B.	1	1.0
Dermatoloji	2	2.1
Göğüs hastalıkları	4	4.4
Acil servis	2	2.1
Kardiyoloji	2	2.1
Nöroloji	2	2.1
Yoğun bakımlar ve diğer (Anestezi, KVC, Cerrahi)	13	14.2
<b>Toplam</b>	<b>91</b>	<b>100.0</b>

Hastaların 45'i polikliniklerden müracaat eden ayaktan hastalar 46'sı ise klinik ve yoğun bakımlarda tedavi gören yatan hastalardan oluşmuş olup bunlardan klinikten gelen hastaların % 17.1'de, polikliniklerden gelen hastaların ise %15.5'de kültür yöntemi ile *C.difficile* pozitifliği saptanmış, yoğun bakımlardan gelen hastalarda pozitiflik saptanamamıştır (Tablo 7). Kontrol grubunda da hiç pozitiflik saptanamamıştır.

Tablo 7. Hastalarda geldikleri bölümlere göre *C.difficile* pozitifliğinin dağılımı.

	N	<i>C.difficile</i> pozitifliği	
		N	%
Yoğun bakımlar	11	-	-
Klinikler	35	6	17.1
Poliklinikler	45	7	15.5
<b>Toplam</b>	91	13	14.2

Antibiyotiğe bağlı ishal hastalarının hangi antibiyotikler sonrası ishal geliştiği sorgulandığında; Ampisilin /sulbaktam % 84.7, antimetabolitlerden Kotrimaksazol (SXT) % 7.7 ve makrolitlerin (Azitromisin, klaritromisin) % 7.6 kullanımında pozitifliklerin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Tablo 8). Ampisilin/sulbaktam kullanımı diğer antibiyotiklere göre ishal oluşumunda etken olarak istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Ayrıca antibiyotik kullanımının ilk 3. gününde ve 7. gününde ishal geliştiği gözlenmiştir.

Tablo 8. Kullanılan antibiyotikler ile *C.difficile* pozitifliği dağılımı.

	<i>C.difficile</i> Pozitifliği				Toplam	
	Pozitif		Negatif			
	N	%	N	%	N	%
Kotrimaksazol (SXT)	1	7.7	10	9.5	11	9.3
Ampisilin/sulbaktam	11	84.7	35	33.3	46	38.9
Makrolidler (AZM, CLA)	1	7.6	3	2.8	4	3.3
Aminoglikozitler	-	-	5	4.7	5	4.2
Glikopeptitler	-	-	4	3.8	4	3.3
Sefalosporinler	-	-	3	2.8	3	2.5
Karbapenemler	-	-	4	3.8	4	3.3
Monobaktamlar	-	-	2	1.9	2	1.6
Tetrasiklin	-	-	2	1.9	2	1.6
Antibiyotik öyküsü olmayanlar	-	-	37	35.2	37	31.3
<b>Toplam</b>	13	100.0	105	100.0	118	100.0

Kültürlerinde pozitif saptanan hastaların 4'ü 16-25 yaş, 3'ü 26-35 yaş, 2'si 36-45 yaş, 3'ü 46-55 yaş, 1'i 65 ve üzeri yaş grubunda olduğu görülmüştür (Tablo 9). Hastaların yaş gruplarına göre *C.difficile* pozitiflik oranlarının karşılaştırılmasında daha çok erişkin çağlarda pozitiflik gözlenmesine rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ( $p<0.05$ ).

Tablo 9. Kültür sonuclarının yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grubu	Kültürde reme				Toplam	
	reme var		üreme yok			
	N	%	N	%	N	%
16 – 25	4	30.8	12	11.5	16	13.6
26 – 35	3	23.1	45	42.8	48	40.7
36 – 45	2	15.3	14	13.3	16	13.6
46 - 55	3	23.1	17	16.2	20	16.9
56 - 65	-	-	6	5.8	6	5.0
65 ve üzeri	1	7.7	11	10.4	12	10.2
<b>Toplam</b>	13	100.0	105	100.0	118	100.0

Tablo 10. Kültür ile elde edilen *C.difficile* pozitifliğinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı.

	Kültür		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Hasta	13	78	91
Kontrol	-	27	27
<b>Toplam</b>	13	105	118



ELISA ile Toksin A+B araştırma yönteminin kültür ile *C.difficile* saptanması karşılaştırıldığında; ELISA'nın duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin % 100 olduğu gözlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. ELISA Toksin A+B ile kültür pozitifliğinin karşılaştırılması.

ELISA Toksin A+B	Kültürde üreme		Toplam
	Üreme var	Üreme yok	
Pozitif	13	-	13
Negatif	-	105	105
<b>Toplam</b>	13	105	118

Toksin A lateks yönteminin kültür yöntemine göre duyarlılığı % 30.7, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri % 100, negatif prediktif değeri ise % 92.1 olarak hesaplanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. Kültür ve Toksin A lateks yöntemlerinin karşılaştırılması.

Toksin A lateks	Kültürde üreme		Toplam
	Üreme var	Üreme yok	
Pozitif	4	-	4
Negatif	9	105	114
<b>Toplam</b>	13	105	118

Toksin A lateks yönteminin ELISA Toksin A+B'ye göre duyarlılığı % 30.7, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri % 100 ve negatif prediktif değeri % 92.1 olarak saptanmıştır (Tablo 13).

Tablo 13. Toksin A kart testin ELISA Toksin A+B ile karşılaştırılması.

Toksin A kart test	ELISA		<b>Toplam</b>
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	4	-	4
Negatif	9	105	114
<b>Toplam</b>	13	105	118

Diyareli hastaların *C.difficile* pozitifliği belirlendikten sonra kullandıkları antibiyotiğin kesilmesi ve değiştirilmesi ile ortalama 7 günde ishalin kendi kendini sınırladığı kliniklerden ve dosya bilgilerinden öğrenilmiştir.

## 5.TARTIŞMA

Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterileri değil normal flora bakterilerini de etkiler, endojen mikroflorayı bozarak süperenfeksiyonlara neden olabilirler (10). Antibiyotik kullanımının bağırsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten sonraki 6. haftaya kadar sürebilmekte, bu süre içinde *C.difficile*'ye bağlı ishaller ortaya çıkabilmektedir. Geçiş çoğunlukla hastane ortamından olmakta ve bunda personel önemli rol oynamaktadır. Genellikle ekzojen kaynaklı olan enfeksiyonun gelişiminde ileri yaş, kullanılan ilaçlar (antibiyotik, antiperistaltik, immünsüpresif, antineoplastik, narkotik analjezikler vb.), yapılan girişimler (lavman, nazogastrik tüp), alta yatan ciddi hastalık (kanser, AIDS, böbrek yetmezliği vb.), hastanede kalış süresi, yoğun bakım ünitesinde kalma gibi farklı risk faktörleri rol oynayabilmektedir (8, 61, 63).

Bu çalışmada ishaller hastaların dışkı örneklerinin makroskopik muayenesinde dışkının şekli, kıvamı, rengi, kan ve/veya mukuslu olup olmaması, direkt mikroskopik muayenede ise parazit veya parazit yumurtasının bulunup bulunmaması, eritrosit ve/veya lökosit olup olmaması gibi mikrobiyolojik yöntemlere dikkat edilmiştir.

Büyükbaba ve ark. İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzun süre antibiyotik tedavisi gören ve PMC bulguları olan 50 çocuğun dışkı örneklerinde yaptıkları çalışmada bunların 12 (%24)'sinde *C.difficile* izole etmişler ve bu 12 suştan 8 (%60)'inin toksin A oluşturduğunu belirlemişlerdir (20).

Gerding ve ark., *C.difficile* bağlı ishal olan 109 hasta ile kontrol grubundaki 108 hastanın dışkı örneklerini incelemişler. *C.difficile* kültür ve toksin pozitifliği gösteren dışkıların % 27'sinin mukus, % 26'sının kan içerdiğini tesbit etmişler, gram boyalı preparatların incelenmesinin *C.difficile*'ye bağlı ishallerin erken tanısında yarar sağlamadığını vurgulamışlardır (54).

Bu çalışmada 91 hasta 27 kontrol grubundaki hastanın dışkı örneklerinde *C.difficile* kültür ve toksin pozitifliği gösteren dışkı örneklerinin % 2.2'sinin kanlı, % 19.8'inin mukuslu, % 30.8'inin sulu, % 19.8'sinin kanlı ve mukuslu, % 5.5'inin ise kokulu ve mukuslu olduğu gözlemlenmiştir.

Arjantin’de yapılan bir çalışmada hastanelerdeki semptomatik hastalardan *C.difficile* ilişkili diyarelerde tanı metodları gözden geçirilmiştir, hastalardan dışkı örnekleri alınarak gaitalardaki toksinler Premier Cytocon A+B EIA yöntemi ile araştırılmıştır. Her bir örnek kültür ile toksijenik *C.difficile* türleri için incelenmiştir. 104 örneğin 40 (%38.5)’ı pozitif ve 64 (%61.5)’ü negatif, gaita toksin yöntemi ve/veya toksijenik kültür ile 40 pozitif örneğin 11’inde *C.difficile* toksinleri sadece toksijenik kültür ile saptanmıştır. 5 hastada ise (%15.6) semptomatik tekrarlar bildirilmiştir. Toksin negatif türler izole edilmemiştir bu bilgi *C.difficile*’nin toksijenik kökenlerinin yüksek prevalansını göstermektedir. *C.difficile* ilişkili diyare bu hastane için acil nozokomiyal problem olarak saptanmıştır (107).

Kim Kyung ve ark. Kore’de antibiyotik kullanım hikayesi olmayan ishalleri çocukların *C.difficile*’nin toksijenik suşlarının izolasyon oranının % 15.6 olmasına karşılık asemptomatik çocuklarda bu oran % 6.7 olarak saptamışlar ve bu durumu antibiyotik kullanımı dışında coğrafik ve sosyoekonomik faktörlerin de *C.difficile*’nin neden olduğu ishaller üzerine etkili olabileceği şeklinde açıklamışlardır (54).

Ercis ve ark. antibiyotiğe bağlı ishal veya psödomembranöz enterokolit ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde, *C. difficile* toksin varlığını ve klinik bulgular arasındaki ilişkiyi 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. *C.difficile*’ye bağlı ishalin, hastaların büyük çoğunluğunda (32/68) beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanımına bağlı olarak geliştiğini gözlenmiştir, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) kullanımının izlediği bildirilmiştir. Anılan çalışmada hastaların yaş aralığı 1-86 yıl (yaş ortalaması: 43.3 yıl) arasında değişmektedir. 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 (diabet, hepatit, transplantasyon ve multipleks skleroz) mevcuttur (108).

Bu çalışmada ise pozitif hastaların çoğunda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri kullanımının fazla olduğu bunu antimetabolitler ve makrolidlerin takip ettiği saptanmıştır.

Pepin ve ark Kanada'nın Ouebec bölgesindeki yaptıkları çalışmada, 1991-2003 yılları arasında *C.difficile* ilişkili ishal hastalarında 1991-1992 yıllarında *C.difficile* ilişkili ishal hastaları oranı % 7.1, 2003'te % 18.2'ye kadar çıkmıştır. Tanıdan sonra 30 gün içinde ölüm oranı 1991-1992 yıllarında % 4.7 iken, 2003 yılında % 13.8'e kadar çıktığı bildirilmiştir (109).

Wroblewska ve ark. yaptıkları çalışmada 1998 ve 2002 yılları arasında hastanede yatan yetişkin hastalardan 4414 dışkı örneği toplamışlardır. 1308 (% 29.3) örnek *C.difficile* kültüründe pozitif vermiştir, bunun % 15.1'i 1998, % 29.5'i 1999, % 33.8'i 2000, % 31.2'si 2001, % 32.0'ı 2002 yılında saptanmıştır. Yatan hastalar içinde en fazla pozitif veren servis hematoloji/onkoloji, % 8.3'ü nöroloji, % 8'i nefroloji, % 7'si gastroenteroloji, % 6.2'si nöroşirürjidir. *C.difficile* toksin A'nın test edilmesinde 847'si (% 19.2) pozitif bulunmuş, 3567'si (% 80.8) negatif bulunmuştur. Bu pozitifliklerin % 29.4'ü 1998, % 17.5'i 1999, % 23.2'si 2000, % 17.1'i 2001, % 15'i 2002 yılında saptanmıştır. Bu süreç içinde *C.difficile* test edilmiş dışkı örneklerinin sayısında bir artış ve *C.difficile* kültür pozitif örneklerin sayısında da bir artış gözlemlenmiştir. Çalışmanın son iki yılında *C.difficile* toksin A pozitif örnek sayısında bir düşüş kaydedilmiştir. Bu durumun antibiyotik kullanım politikasından kaynaklanmış olabileceğini düşünmüşlerdir (110).

Bu çalışmada hastaların kliniklere göre dağılımı gözden geçirildiğinde; Dahiliye, Enfeksiyon hastalıkları ve Cerrahi-Anestezi Yoğun Bakım Servislerinde yoğunlaştıkları, bunu Nöroşirürji, Göğüs Hastalıkları, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon kliniklerinin takip ettiği en az örnek gelen servislerin ise Dermatoloji, K.B.B., Acil Servis, Kardiyoloji ve Nöroloji olduğu saptanmıştır.

Büyükbaba'nın yaptığı başka bir çalışmada *C.difficile* ön tanısı ile 1998-2000 yılları arasında 360 hastanın dışkı örneğinde "ImmunoCard Toxin A (Meridian Diagnostic)" kit ile, 2000-2002 yılları arasında 400 dışkı örneğinde "Premier Toxin A/B (Meridian Diagnostic)" kit 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. İki ayrı çalışma döneminde elde edilen pozitif sonuçlar karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde her iki toksini birlikte saptayan kitlerin kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir (111).

Schroder, *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 (112).

Bu çalışmada Toksin A lateks yöntemi ile 4 pozitiflik saptanırken Toksin A+B'nin beraber saptandığı ELISA yöntemiyle 13 pozitiflik saptanmıştır. Duyarlılık % 30.7 özgüllük % 100 olarak saptanmıştır. Duyarlılığın düşük olmasının nedenleri olarak Toksin A lateks yönteminin sadece Toksin A saptıyor olması ve yönteminden kaynaklandığı söylenebilir.

Karaer ve ark. Çukurova bölgesinde yaptıkları bir çalışmada, çeşitli yaş gruplarında görülen akut gastroenterit hastaları ile *C.difficile*'nin toksijenik ve nontoksijenik suşları arasındaki muhtemel etyolojik ilişkiyi göstermek amacıyla yaptıkları araştırmada 211'i kadın, 246'sı erkek toplam 457 ishali hasta ile toplumdaki asemptomatik *C.difficile* taşıyıcılık oranını tespit için 45'i kadın, 45'i erkek 90 sağlıklı kişiden alınan gaita örnekleri bakteriyolojik ve immünolojik metodlarla incelemişlerdir. Akut diyareli 24 (% 5.2) hastanın gaitalarında *C.difficile* izole edilirken kontrol grubuna ait 7 (%7.7) gaita örneğinde *C.difficile* saptamışlardır. Gaita örneklerinde *C.difficile* toksinlerinin gösterilmesi amacı ile yapılan immünolojik değerlendirmelerde ise kontrol grubuna ait örneklerde toksin tesbit edilmezken, hasta grubuna ait örneklerin 2'si (% 0.4) hem ELISA hem Latexle, 2'si (%0.4) de sadece Latexle olmak üzere 4'ünde (% 0.8) toksin A/B gösterilmiştir (14).

Çalışmamızda 45 erkek, 46 bayan toplam 91 hasta ile 21 erkek, 6 bayan toplam 27 sağlıklı kişiden alınan gaita örneklerini bakteriyolojik ve immünolojik olarak incelenmiş, akut diyareli hastaların 13 (% 14.2)'ünde *C.difficile* izole edilirken kontrol grubuna ait dışkı örneklerinde *C.difficile* saptanmamıştır. İmmünolojik değerlendirmede ise kontrol grubunda yine toksin izole edilemezken hastaların ELISA yöntemiyle 13 (14.2)'ü, Toksin A Kart test yöntemiyle 4 (% 4.3)'inde toksin saptanmıştır.

Di Persio ve ark. 328 dışkı örneğinde kültür, lateks aglütinasyonu, hücre kültürlerinde toksin araştırması ve ELISA ile toksin A araştırılması yöntemlerini birlikte uygulayarak yaptıkları çalışmada 52 (% 15.9) örnekte bir veya daha fazla test ile pozitiflik tespit etmişlerdir (78).

Ferreira ve ark. Brazilya'daki bir çalışmada 0-5 yaş arası çocuklarda, 90 ishalsiz, 91 akut ishali toplam 181 gaita örneği araştırmışlar; 18 ishali çocukta *C. ramosum*, *C.difficile*, *C. limosum*, *C. clostrioforme*, *C. septicum*, *C. butyricum*, *C. innocuum* ve *Clostridium* sp. pozitif; 19 ishalsiz çocukta ise *C. ramosum*, *C. septicum*, *C. barattii*, *C. butyricum*, *C. bifermentans*, *C. paraputrificum* ve *C. sphenoides* pozitif bulunmuştur. Buna ilave olarak diyareli çocukların 5'inde (%5.5) 10 tane *C.difficile* tipi saptanmıştır. Test edilen soyların çoğu kullanılan antibiyogramlara dirençli bulunmuş, 9 örnekte *C.difficile*'nin, vero hücreleri ve multipleks PCR ile toksijenik olduğu gözlenmiş, bu 9 örneğin 6 tanesinde hem toksin A hem toksin B genleri, 3 tanesinde sadece toksin B geni varlığı bildirilmiştir. Çocukluk çağındaki ishallerde *C.difficile*'nin oynadığı rolü değerlendirmek için daha fazla çalışma ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin periyodik olarak yapılması önerilmektedir (113).

Kanada'da yapılan bir çalışmada 400 gaita örneği test edilmiş. Triage® *C.difficile* test (TCT), TechLab *C.difficile* toxin A-B enzyme immuno-assay (EIA), cell-culture cytotoxin test (CT) yöntemleri karşılaştırılmış, TCT ile 92, EIA 41, CT 58 pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Herhangi bir testle pozitiflik saptama oranı % 99'dur. Kültür uyumsuzluğu olanlarda 52 kişinin 42 tanesi toksijenik 10 tanesi nontoksijenik bulunmuştur. 10 hastada diğer *Clostridium* türleri saptanmış 2 tanesinde ise *Clostridium* izolatına rastlanmadığı bildirilmiştir. Bunlardan 21 toksijenik *C.difficile* izolatının 17'sinin CT yöntemiyle negatif olduğu bildirilmiştir. Altın standart olan CT ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllük değerleri TCT ve EIA yöntemi için sırasıyla % 89-93 ve % 66-99'dur. Toxin A(-), Toxin B(+) 8 gaita örneğinde TCT ile 8, EIA ile 4, CT ile 6 izolat pozitif saptanmıştır. Alınan gaita örneklerinin % 85'inde TCT pozitifliği saptanabilmiş, kalan %15'inde daha ileri testlere gereksinim duyulduğu bildirilmiştir (90).

Bir başka çalışmada Tox A/B Test (Techlab, Blacksburg, VA, USA) ve hücre kültür sitotoksite yöntemi *C.difficile* ön tanıli hastalardan elde edilen 1109 diyareli gaita örneğinde karşılaştırılmıştır. Tox A/B Test toksin A ve B'yi tanıyan enzim immünoassay yöntemidir. Bu test için yaklaşık 1,5 saat süre gerekmektedir. Hücre kültür sitotoksite yöntemi 4 saat, 24 saat ve 48 saatte okunan fibroblast hücre dizi formatını kullanan bir yöntemdir. 1109 örneğin 194'ü altın standart sitotoksite

yöntemiyle pozitifken 189'u enzim immünoassay ile pozitif bildirilmiştir. İki yöntem arasında % 98.5 bir uyum olduğu gözlenmiş, sitotoksite yöntemiyle karşılaştırıldığında EIA'nın % 94.3 duyarlılığı ve % 99.3 özgüllüğü bildirilmiştir. Buna rağmen toksin A'nın tanımlanması için başka bir ELISA'nın kullanılması ile toksin A/B test için duyarlılık % 94.5, özgüllük % 100, pozitif prediktif değer % 100, negatif prediktif değer % 98.8 olarak hesaplanmıştır. Sitotoksik yöntem için ise duyarlılık % 97, özgüllük % 100, pozitif prediktif değer % 100, negatif prediktif değer % 93 bulunmuştur. Hücre kültür sitotoksite yöntemi ile karşılaştırıldığında bu testin mükemmel duyarlılık ve özgüllük gösterdiği görülmektedir (114).

Yapar ve ark. Haziran'1998 ve Aralık'2003 tarihleri arasında toplum kökenli antibiyotik ilişkili diyareli, yetişkin hastaların klinik ve laboratuvar bulgularını araştırmışlardır. Haziran'1998 ve Aralık'2003 tarihleri arasında 288 yetişkin hastanın klinik raporları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastaların % 86'sında antibiyotik tedavisine başlama zamanı ile semptomların ortaya çıkması arasında 7 günlük bir süre gözlemlenmiştir (Ort 1±9 gün), tüm hastalarda diyare kendi kendini sınırlayan tarzda ve semptomların ortalama süresi 3 gün olarak bildirilmiştir. En yaygın semptomlar abdominal ağrı ve tenesmus (% 61.1) olarak saptanmış, lökositoz ve ateşe nadir rastlandığı bildirilmiştir (115). Antibiyotik ilişkili ishali olan fakat *C.difficile* toksinlerin saptanamadığı hastalarda *C. perfringens* (enterotoksin üreten), *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Giardia lamblia* gibi çeşitli etkenlerin patogeneizde rol oynayabileceği bildirilmiştir (40, 116). Normal kolon florasında bulunan ve antibiyotiklerden etkilenmeyen *C. albicans*'ın bağırsak florasının bozulduğu hallerde sık olarak ishale neden olduğu gözlenmiş, özellikle yaşlı hastalarda nistatin tedavisi ile ishali sona erdiği gösterilmiştir. *S.aureus*'un bağlı olduğu ishallerde lezyon ince bağırsaklarda olduğu ve sıklıkla tetrasiklin, kloramfenikol ve neomisin kullanımından sonra ortaya çıktığı, bu özellikler nedeni ile *C.difficile*'ye bağlı ishallerden kolaylıkla ayrılabilceği bildirilmiştir (40).

Bir başka çalışmada antibiyotik ilişkili diyarede *Candida*'ların rolü araştırılmış, toplam 395 hastadan gaita örnek alınarak 98 hasta antibiyotik ilişkili diyareli, 93 hasta antibiyotik kullanan fakat diyaresi olmayan, 97 hasta antibiyotik kullanmayan fakat diyaresi olan, 107 hasta ise kontrol hastası olarak belirlenmiş, antibiyotik ilişkili diyareli hastalarda *Candida* pozitifliği ve *Candida*'ların aşırı artışı



antibiyotik alan fakat diyaresi olmayan hastalardakinden farklı olmadığı bildirilmiştir. Antibiyotik kullanmayan diyareli hastalarda *Candida* artışı antibiyotik ilişkili diyaresi olan hastalardan daha sıklıkla fakat *Candida* pozitifliğinin aynı olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise *Candida* pozitifliğine tüm diğer gruplardan daha az rastlanmıştır. Bu bilgiler *Candida* hastalarının antibiyotik ilişkili diyare sebebinden ziyade antibiyotik tedavisi veya diyare sonucu olduğunu desteklemektedir (117).

Bu çalışmada ishal etkeni olarak *Candida* da araştırılmış, selektif SDA ekimlerinden hiç *Candida* saptanamamıştır.

Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve diğer enterik patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar sırasında veya sonrasında dışkıdan *C.difficile* izolasyon sıklığının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (118, 119). Varki ve Aquino antibiyotik tedavisi görmeyen 72 hastadan 8'inde *C.difficile* izole etmiş bu hastaların 2'sinde aynı zamanda *Salmonella spp.*, 2'sinde *Campylobacter spp.*, 2'sinde *Giardia spp.* ve 1'inde de helmint yumurtası bulunduğunu bildirmişlerdir (120).

Bu çalışmada rutin bakteriyolojik inceleme yanı sıra Rotavirüs/Adenovirüs araştırılmış, çalışmaya özel seçilmiş olgularda bu etkene rastlanamamıştır.

Avustralya'daki yapılan başka bir çalışmada son 20 yılda tüm dünyadaki hastanelerde *C.difficile* ilişkili diyare insidansının arttığını, fakat batı Avustralya'da 1980'li yıllarda bu insidansın artmasının daha çarpıcı yükseklikte olduğunu bildirmişlerdir. Avustralya'da epidemiyoloji çalışması ile 1993-2000 arası 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımı kontrol altına alınmıştır, 1993'ten 1998'e kadar *C.difficile* ilişkili diyare insidansı rölatif olarak stabil kalmıştır, reçeteleme politikaları aralarındaki değişiklikler nedeni ile 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımında azalma sağlanmıştır. Bu bulgular 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının kontrol altına alınması ile *C.difficile* ilişkili diyare oluşumunu azaltabileceğini desteklemektedir (121).

## 6.SONUÇ

Antibiyotiğe bağılı hastane ve toplum kökenli *C.difficile* enfeksiyonlarının araştırılmasına yönelik yaptığımız çalışmada antibiyotiğe bağılı olarak ishal oluşturan etkenler arasında *C.difficile*'nin önemli bir yer tuttuğı söylenebilir.

Son yıllarda hastane enfeksiyonları arasında önemi daha çok fark edilen *C.difficile* yoğun bakım ve kliniklerde salgınlara neden olabilmektedir. Her ne kadar bu çalışmada sağıık personelinde *C.difficile* izole edilmesede sağıık personelinin taşıyıcılıkta önemli olduğı, bunun için hastane personelinin hijyene dikkat etmesi ve her müdahaleden sonra ellerin yıkanması gerektiğinin vurgulanması önemli bulunmuştur.

Gerekli anaerop koşullar ve kültür ortamının sağııkanamadığı laboratuvarlarda EIA yönteminin de güvenilir ve hızlı olması nedeni ile laboratuvarlarda rutin kullanıma uygun yöntem olabileceğı düşünölmektedir.

Sonuç olarak;

1.*C.difficile* enfeksiyonlarının bölgemizdeki oranı yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

2.*C.difficile* enfeksiyonlarına yönelik ELISA yöntemlerinin rutin mikrobiyolojik incelemeler içinde yer almasının tanı ve tedavi açısından gerekli olduğı düşünölmektedir.

3.Kültür yönteminin uygulanması zor ve diğere yöntemlere göre daha yavaş bir tanı testi olduğı kanısına varılmıştır.

Öneriler;

-Antibiyotiğe bağılı hastane ve toplum kökenli ishalleri semptomatik hastalarda *C.difficile*, araştırılması gereken bir patojendir.

- ELISA uygulanması kolay, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Görenek L., Beşirbellioğlu B. (1997). Antibiyotik kullanımının diğer bir yüzü; *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal. *Sendrom*. **9** (10): 87-94.
2. Kıyan M.(2005):Anaerob, sporlu, gram pozitif basiller. Cegiz A.T.(bölüm ed).Bakteriyoloji. Ustaçelebi Ş.(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabında.Ankara Güneş Tıp Kitabevi Ltd.Şti.,Ankara.
3. Theilman NM (2000): Antibiotic associated colitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone, 1111-21.
4. El-Mohands AE, Keiser JF, Refat M,Jackson BJ (eds) ( 1993). Prevalance and Toxigenicity of *Clostridium difficile* Isolates in Fecal Microflora of Preterm Infants in the Intensive Care.Nursery Biol Neonate, 63:225-229.
5. Mülazımoğlu L. (1996). Antibiyotiğe bağlı ishal. *KLİMİK Derg*. **9** (1) :13-14.
6. Ovaran C. , Çavuşoğlu Ş. , Özsoy M.F. ve ark.( 1996). Antibiyotiğe bağlı diyarelerde *C.difficile*'nin yeri. *KLİMİK Derg*. **9** (1): 15-17.
7. Çakır M. , Özsan M. ( 1997). *Clostridium difficile*'ye bağlı kolit. *Güncel Gastroenteroloji* **1** (3) : 439-452.
8. Bartlett J. G.(ed) ( 1990). *C.difficile: Clinical considerations*. *Rev. Infect. Dis*. **12** (suppl 2) : 243-251.
9. Knoop F.C. , Owens M. , Crocker I.C.(eds) ( 1993). *C.difficile: Clinical disease and dianosis*. *Clin. Microbiol. Rev*. **6** (3) : 251-265.
10. Akan E. (1993). *Clostridium difficile*. Tıbbi Mikrobiyoloji. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2. Baskı, 286-289.
11. Bilgehan H. (1994). *Clostridium difficile*. Klinik Mikrobiyoloji. 8. Baskı, Barış Yayınları, İzmir, 310-311.
12. Tabaqchalli S, Jumaa P.(eds) ( 1995). Diagnosis and Management of *Clostridium difficile* Infection. *BMJ.*, 310 (27): 1375-1380.
13. Bartlett J. G.(ed) ( 1990). *C.difficile* : Clinical considerations.*Rev. Infect. Dis*. **12** (suppl) : 243-251.
14. Karaer P, Yarkın F, Alhan E. ve ark. (1996). İshalli ve Aseptomatik Kişilerin Dışkılarında *C.difficile* ve Toksinleri ile Diğer Enterik Patojenlerin İnsidansı. *Ç Ü Tıp Fak Derg*, **21**: 88-95.

15. Ondedonk A. B. , Allen S. D. (eds) (1995). Clostridium. In : Murray P. R., Baron E. , Pfaller M. A. , Tenover F. C. , Tenover F. C. , Tenover F. C. , Yolken R. H. (eds). Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition, Washington D. C. : American Society for Microbiology, 574-586.
16. Bilgehan H. (ed). ( 1994). Gram Olumlu Sporlu Basiller. Klinik Mikrobiyoloji kitabında. Sekizinci baskı, İzmir : Fakülteler Kitabevi 282-311.
17. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL (eds) (1991). Clostridium. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, 5. Ed, 505-518.
18. Bilgehan H. (ed). ( 1992). *Clostridium difficile*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, 1. Baskı, ss 320-2, 496-500.
19. Isenberg HD.(ed) ( 1992). Anaerobic Gram Pozitive Bacilli. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington DC, Vol 1, pp 2.11.1-2.11.9.
20. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büğet E.(1994). Uzun Süreli Antibiyotik Tedavisi gören İshalli Çocuktan Dışkılarında *Clostridium difficile*'nin Araştırılması. *KLİMİK Derg.*; 7 (2): 105-107.
21. Strelaw E, Wagner B, Wagner M, Karsch W.(eds) (1989). Demonstrain of Capsules in *Clostridium difficile*. 261 Bakt Hyg, A (270) : 456-461.
22. Brazier JS (1993). Role of the Laboratory in Investigation of *Clostridium difficile* Diarrhea. *Clin Infect Dis*, 16 (14): 228-233.
23. Wilson K.H. , Kennedy M. J., Fekety R. et al.( 1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *C.difficile*. *J.Clin. Microbiol.* 15 (3): 443-446.
24. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al.(1993). Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manuel. Star Publishing Company, California, 5. Ed, pp 95-101.
25. Phillips K. D. , Rogers P. A.(eds) ( 1981). Rapid detection and presumptive identification of *C.difficile* by p-cresol production on a selective medium. *J. Clin. Pathol.* 34: 642-644, 1981.
26. Koneman E.W.( 1992). The Anaerobic Bacteria. In: Koneman E. W. , Allen S. D. , Janda M. , Schreckenberger P. C. , Winn W. C. (eds). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 557-600.

27. Triadafilopoulos G. , Pothoulakis C. , O'brien M. J., Lamont J. T. (eds) ( 1987). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology* 93 (2): 273-279.
28. Rothman S. W. , Brown J.E. , Diecidue A. , Foret D. A.(eds) ( 1984). Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 46 (2): 324-331.
29. Pothoulakis C. , Barone L. M. , Ely R. , Faris B. , Clark M. E. , Franzblau C. , Lamont J. T (eds) (1986). Purification and properties of *Clostridium difficile* cytotoxin B. *J. Biol. Chem.* 261 (3): 1316-1321.
30. Sullivan N. M. , Pellet S. , Wilkins T.D. (eds) (1982). Purification and characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35 (3): 1032-1040.
31. Barrasso L. A. , Wang S. Z. , Phelps C. J. , Jhonson J.L. , Wilkins T. D.(eds) (1990). Nucleotide sequence of *C.difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. *B. Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 179:271-279.
32. Von Eichel-Streiber C. , Layfenberg-Feldmann R. , Saringen S. , Schulze J. , Sauerbon M.(eds) ( 1992). Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Mol.Gen. Genet.* 233:260-268.
33. Hatheway C. L.,Johnson E. A.(eds) ( 1998). *Clostridium* :The spore-bearing anaerobes.In: Balows A. , Duerden B. I. (volume eds).Systematic Bacteriology. In: Collier L. Balows A., Susman M. (eds) Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Ninth edition, Second volume, London: Oxford Universty Pres, 762-764.
34. Wolfhagen M. J. , Torenma R. , Fluit A. C. , Verhoef J.(eds) ( 1994). Toxin A and B of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol.Rev.* 13:59-64.
35. Cerquetti M. , Luzzi I. , Caprioli A. , Sebastianelli A. et al (1995). Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea.*Pediatr. Infect. Dis. J.*14 (7): 598-603.
36. Kelly C. P. , Pothoulakis C. , LaMont J. T. et al (1994). *Clostridium difficile* colitis.*N.Engl. J.Med.* 330 (4): 257-262.

37. Salyers AA, Whitt DD. (eds) (1994). Pseudomembranous Colitis. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. American Society for Microbiology, Washington DC, 282-289.
38. Moore R, Pothoulakis C, La Month JJ, Carlson S, Madara JL. (1990). *C.difficile* Toxin A. Increases Intestinal Permeability and Induces Cl<sup>-</sup> Secretion. *Am J Physiol*, **259**: 165-172.
39. Gilbert RJ, Triadafiloulos G, Giampolo PC, Lamonth JT (1987). Effect of purified *Clostridium difficile* Toxin on Intestinal Smooth Muscle. *Gastroenterology*, **94** (1404): 759-766.
40. Bartlett JG. (1992). Antibiotic-Associated Diarrhea. *Clin Infect Dis*, **15**:573-581.
41. Pothoulakis C. , Tradafilopoulos G. , Clark M. , Franzblau C. , Lamont J. T (1986). *Clostridium difficile* cytotoxin inhibits protein synthesis in fibroblasts and intestinal mucosa. *Gastroenterology* **91**:1147-1153.
42. Ottlinger M. E. , Lin S.( 1988) . *Clostridium difficile* toxin B induces reorganization of actin, vinculin and talin cultured cells. *Exp. Cell Res.* **174**: 215-229.
43. Delme M, A vesani V (1990). Virulence of Ten Serogroups of *Clostridium difficile* in Hamsters. *J. Med Microbiol*, **33**: 185-190.
44. Tucker KD, Carrig PE, Wilkins TD (1990). Toxin A of *Clostridium difficile* is a Potent Cytotoxin. *J Clin Microbiol*, **28** (5): 869-871.
45. Corthier G, Muller MC, Wilkins TD, Lysterly D, Haridon L (1991). Protection against Experimental Pseudomembranous colitis in Gnotobiotic Mice by Use of Monoclonal Antibodies against *C.difficile* Toxin A. *Infection and Immunity*, **59**(3): 1192-1195.
46. Siffert J. C. , Baldacini O. , Kuhry J. G. , Wachsmann D. Benabdelmoumene S. , Faradji A. , Monteil H. , Poidron P.( 1993). Effects of *Clostridium difficile* toxin B on human monocytes and macrophages: Possible relationship with cytoskeletal rearrangement. *Infect. Immun.* **61**: 1082-1090.
47. Giannasca PJ, Warny M.( 2004). Active and passive immunization against *C.difficile* diarrhea and colitis. *Vaccine*, **22**: 848-856.
48. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G.( 2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, **7**: 421-427.
49. Rupnik M.( 2001). How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. *Clin Microbiol Infect*, **7**: 417-420.

50. Kyne L, Farell RJ, Kelly CP.( 2001). *C.difficile*. *Gastroenterol Clin North Am*, **3**: 753-777.
51. Yasin SF, Young-Fadok TM, Zein NN, Pardi DS. et al (2001). *Clostridium difficile*-Associated diarrhea and colitis. *Mayo Clin Proc*, **76**: 725-730.
52. Ustaçelebi Ş. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara Güneş Kitabevi Ltd Şti. 114-115.
53. Yergök B. (1999 ). Antibiyotiğe Bağlı İshallerde *Clostridium difficile*'nin Araştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi Ankara.
54. Gerding D.N. , Olson M. M. , Peterson L. R. , Teasley D. G. , Gebhard R.L. , Schwartz M. L. , Lee J.T. (1986). *C.difficile* associated diarrhea and colitis in adults. *Arch. Intern. Med.* **146**: 95-100.
55. Söyletir G. , Topçu A. W. (1996). Akut bakteriyel ishaller. Topçu A. W. , Söyletir G., Doğanay M. (eds). Enfeksiyon Hastalıkları kitabında. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. , 605-618.
56. Hurley BW, Nguyen CC. (2002). The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic associated diarrhea. *Arch Intern Med*, **162**: 2177-2184.
57. Barbut F, Petit JC. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect*, **7**: 405-410.
58. Kelly C. P. , Pothoulakis C. , LaMont J. T. (1994). *Clostridium difficile* colitis. *N.Engl. J.Med.* **330** (4): 257-262.
59. MacFarland L. V. , Mulligan M. E. , Kwok R. Y. Y. Stamm W. E. (1989). Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N. Eng. J. Med.* **320** (4): 204-210.
60. Kim K. H. , Fekety R. , Batts D. H. , Brown D. , Cudmore M. , Silva J. , Waters D. (1981). Isolation of *C.difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* **143** (1) : 42-50.
61. Reinke M. C. , Messick C.R. (1994). Update on *Clostridium difficile*-induced colitis, part 1. *Am. J. Hosp. Pharm.* **51**: 1771-1781.
62. Tabaqchali S. , Wilkins M. (1992). Epidemiological aspects of infections caused by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11** (11): 1049-1057.



63. Fecety R. (1990). Antibiotic-associated colitis. In: Mandell G. L. , Douglas R. G. , Bennet J.E. (EDS). Principles and Praticce of Infectious Disease. Third edition, New York: Churhill Livingstone, 863-880.
64. Hirschhom L. R. , Trnka Y. , Onderdonk A. , Lee M. L. , Platt R. (1994).Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* associated diarrhea. *J. Infect. Dis.* 196: 127.
65. Beşirbellioğlu B. , Görenek L, Dizer U. , Hacıbektaşoğlu A.( 1997). GATA eğitim hastanesinde nozokomiyal *C.difficile* kolonizasyon sıklığı 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 6-10 Ekim 1997, Antalya. Kongre Program ve Özet Kitabında, s: 522.
66. Matsuki S., Ozaki E., Shozu M. et al.(2005). Colonization by *Clostridium difficile* of neonates in a hospital, and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan.; 8(1):43-8.
67. Centers for Disease Control And Prevention (CDC). (2005) Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk-four states, 2005.,2;54(47):1202-5.
68. Kelly CP, LaMont JT. (1998). *Clostridium difficile* infection.*Ann Rev Med* , 49: 375-390.
69. Donta S.T. , Myers M. G. (1982). *C.difficile* toxin in asymptomatic neonates. *J. Pediatr.* **100** (3): 431-434.
70. Koneman E. W. (1992). The Anaerobic Bacteria. In: Koneman E.W. , Allen S. D. , Janda M. , Schreckenberger P. C. , Winn W. C. ( eds). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Company, 557-600.
71. Yasin SF, Young-Fadok TM, Zein NN, Pardi DS. (2001). *Clostridium difficile*-Associated diarrhea and colitis. *Mayo Clin Proc*, 76: 725-730.
72. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. (2001). *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Arch Intern Med*, 161: 525-533.
73. David F. Welch, Phd, D (ABMM) (2005). Laboratory testing considerations for *C.difficile* disease. Division of Clinical Microbiology, Department of Pathology Baylor Universty Medical Center at Dallas and Medical Microbiology Consulting, LLC, Dallas. 19(1): 14-15.



74. Barlett JG. (2002). Antibiotic-associated diarrhea. *N Eng J Med*, **346**: 334-339.
75. Fry DE. (2000). *Clostridium difficile* infection. In: Moellering RC. ed. Emerging Pathogens: Implications for the Future. Montreal: PharmaLibri Publishers, 51-75.
76. Nonhoff C, Struelens MJ, Serruys E, (1995). Evaluation of gas-liquid chromatography (GLC) for rapid detection of *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Acta Clin.* **50**: 76-80.
77. Collee JG, Brown R, Poxton IR. (1996). Clostridia of wound infection. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, eds. Practical Medical Microbiology. 14th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 511-547.
78. DiPersio J.R. , Varga F.S. , Conwell D.L. , Kraft J. A. , Kozak K. J. , Willis D. H. (1991). Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C.difficile*-associated disease. *J. Clin. Microbiol.* **29**(12): 2724-2730.
79. Buogo C, Burnens AP, Perrin J, Nicolet J. (1995). Presence of *Campylobacter spp. Clostridium difficile. C.perfringens* and *Salmonella* in some litters of puppies and adult population of dogs. *Schweizer Arch Tierheilkunde*, **137**: 165-171.
80. Baylan O, Doğançlı L Gün H. (1998). Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Clostridium difficile*, *Sendrom*, **10**: 71-76.
81. Lyster DM. Howard CK. Wilkins TD. (1988). *Clostridium difficile*: it's disease and toxins. *Clin Microbiol Rev.*, **1**: 1-18.
82. Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C. Charache P. Barlett JG. (1995). *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med.*, **123**: 835-840.
83. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vanechoutte M, Verschraegen G. et al (2001). Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/ or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect.*, **7**: 55.
84. Doern G. V. , Coughlin R. T. , Wu L. (1992). Laboratory diagnosis of *C.difficile*-associated gastrointestinal disease: Comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity. *J. Clin. Microbiol.* **30** (8): 2042-2046.
85. Liensfeld O. , Saeger F. Hahn H. (1994). Detection of *Clostridium difficile* toxin by enzyme immunoassay, tissue culture test and culture. *Infection* **22**: 33-36.

86. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmée M, Avesani V, Merrigan MM, Gerding DN. (2003). International typing study of toxin A negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J. Clin. Microbiol*, **41**: 1543-1547.
87. Huovinen P. , Raiba I. , Vuento R. , Eerola E. , Lehtonen A. (1990). False-positive *C.difficile* latex agglutination tests. *Lancet* 335: 1467-1468.
88. Sherman M. E. , Deirolami P. C. , Thorne G. M. , Kimber J. , Eichelberger K.( 1988). Evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated Colitis. *Am. J. Clin. Pathol.* **89**: 228-233.
89. Fedorko DP, Engler HD. O'Shaughnessy EM, Williams EC, Reichelderfer CJ, Smith WI. (1999). Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* Toxin A in stool specimens. *J. Clin Microbiol*, **37**: 3044-3047.
90. Alfa MJ, Swan B, VanDekerhove 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.
91. Wolfhagen M. J. , Fluit A. C. H. M. , Torensma R. (1994). Rpid detection of toxigenik *C.difficile* in Fecal samples by magnetic immuno PCR assay *J. Clin. Microbiol.* **32** (7): 1629-1633.
92. Schlepner MA, Garner DC, Sosnowski KM, (1995). et al. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, Fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C.difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J. Clin. Microbiol*, **33**: 1755-1759.
93. Warny M, Keates AC, Keates S, et al.(2000). P38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J. Clin Invest*, **105**: 1147-1156.
94. Steiner TS, Flores CA, Pizarro TT, Guerrant RL, (1997). Fecal lactoferrin, interleukin-1 beta, and interleukin-8 are elevated in patiens with severe *Clostridium difficile* Colitis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **4**: 719-722.
95. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Atlas K. (2002). Hastanede yatarken gelişen ishal hastalarında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. *ANKEM Derg*, **16**: 82-84.
96. Malnick SDH, Zimhony O. (2002). Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Ann Pharmacother*, **36**: 1767-1775.

97. Bergogne-Berezin E. (2000). Treatment and prevention of Antibiotic Associated diarrhea. *Int J Antimicrob Agents*, 16: 521-526.
98. Kyne L, Kelly CP. (2001). Recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Gut*, 49: 152-153.
99. Yılmaz R., Çevik A., Ünal S., (2000). *Flora Derg.* 5 (2):11
100. Dizer U. , Beker M. C. , Hayat L. (1998). Antibiyotik nedenli *Clostridium difficile* enfeksiyonlarının klinik tanı ve tedavisi. *Flora* 3 (3): 165-170.
101. Johnson S. , Homann S. R. , Betten K. M. (1992). Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers with vancomycin or oral metronidazole *Ann. Intern. Med.* 117: 297-302.
102. Altıntaş K. (1994). Tıbbi Parazitoloji Atlas kitabında. İkinci baskı, Ankara: Aydoğdu Ofset.
103. The Oxoid Manual. 5<sup>th</sup> Ed. Turnergraphic Ltd. Basingstoke-Hampshire. 1982.
104. Oxoid Microbiological and Diagnostic Reagents. International Product List. Turnergraphic Ltd. Basingstoke-Hampshire. 1987.
105. Api 20 A: For the identification of anaerobes Test prospektüsü. bioMérieux sa Lyon, 1998.
106. Serazym. *Clostridium difficile* Toxin A+B. Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* Toxin A and Bin faecal samples. 2005.
107. Legaria M.C., Lumelsky G., Rosetti S., (2003). *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina, *Anaerobe* 9, 113-116.
108. Ercis S., Engin A., Haşçelik G. (2004). *Clostridium difficile*'ye Bağlı İshal Hastalarının 6 Yıllık Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Mikrobiyoloji Bülteni, 38: 45-50.
109. Pepin J., Valiquette L., Alary ME. Et al. (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Ouebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 31;171(5):466-72.
110. Wroblewska MM., Swoboda-Kopec E., Rokosz A., et al.(2005). Detection of *Clostridium difficile* and toxin A (TcdA) in stool specimens from hospitalised patients, Chair and Department of Medical Microbiology, Medical Universty of Warsaw, 5 Chalubinskiego Street, 02-004 Warsaw, Poland.54(2):111-5.

111. Özden Büyükbaba Boral, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. İstanbul, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* **32**: 220-234.
112. Schroeder MS.(2005) *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Am Fam Physician.*1;71(5):921-8.
113. Ferreira C.E.A., Nakano V., Avila-Campos M.J., (2004) Cytotoxicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitalized children with acute diarrhea, *Anaerobe* 10, 171-177.
114. Aldeen W.E., Binham M., Aiderzada A., Kucera J., Jensa S., Carroll K.C., (2000). Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 36, 211-213.
115. Yapar N., Sener A., Karaca B., Yücesoy M., Tarakcı H., Çakır N., Yüce A., (2005). Antibiotic-Associated Diarrhea in a Turkish Outpatient Population: Investigation of 288 Cases., *J.Chemother.*, 17 (1): 77-81.
116. Borriello S. P., Larson H.E., Welch A.R.,( 1984). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* i: 305-307.
117. Krause R., Schwab E., Bachhiesl D., Daxböck F., Wenisch C., Krejs G.J., Reisinger E.C.,( 2001). Role of Candida in Antibiotic-Associated Diarrhea, *JID*, 184 (15 October), 1065-1069.
118. LaMont J.T., Miller C.P., Martin W.R. (1964). Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental Salmonella infection. *J. Exp. Med.* 120: 805-813.
119. Bender B.S., Laughon B.E., Gaydos C. (1986). Is *Clostridium difficile* endemic in chronic-care facilities. *Lancet* ii: 11-13.
120. Varki N.M., Aquino T.I. (1982.). Isolation of *C.difficile* from hospitalized patients without antibiotic-associated diarrhea or colitis. *J. Clin. Microbiol.* **16** (4): 659-662.
121. Thomas C., Stevenson M., Williamson D.J., Riley T.V., (2002). *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: Epidemiological Data from Western Australia Associated with a Modified Antibiotic Policy, *Clostridium difficile* Epidemiology *CID*, 35 (15 December),1457-1462.