

**T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Bülent BAYSAL**

**ANTİBİYOTİKLE İLİŞKİLİ İŞHAL OLGULARINDA  
*CLOSTRIDIUM DIFFICILE*' NİN ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Dr. Nadire Seval GÜNDEM**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR**

**KONYA  
2010**

## İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	ii
RESİM DİZİNİ.....	iii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1. Clostridium türleri.....	2
2.2. Clostridium difficile.....	4
2.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.2.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.2.3. Dirençlilik.....	6
2.2.4. Virulans ve Patojenite.....	6
2.3. Epidemiyoloji.....	9
2.4.C.difficile İnfeksiyonları.....	11
2.5. Clostridium difficile İnfeksiyonlarında Tanı.....	15
2.6. Clostridium difficile İnfeksiyonlarında Tedavi.....	20
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>22</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ÖZET.....</b>	<b>45</b>
<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>46</b>
<b>8. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>47</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo I:</b> Araştırmaya katılan hastaların cinsiyetlerine göre toksin varlığının dağılımı.....	<b>28</b>
<b>Tablo II:</b> Çalışmaya alınan örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı.....	<b>29</b>
<b>Tablo III:</b> Araştırmaya katılan hastaların yaş gruplarına göre toksin varlığının dağılımı.....	<b>30</b>
<b>Tablo IV:</b> Toksine pozitif bulunan hastaların tanılarına göre dağılımı .....	<b>30</b>
<b>Tablo V:</b> Toksine pozitif bulunan hastaların kullandıkları antibiyotikler ve kullanım süreleri.....	<b>31</b>
<b>Tablo VI:</b> Kliniklere göre toksin pozitifliğinin dağılımı.....	<b>31</b>
<b>Tablo VII:</b> Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda toksin pozitiflik oranları....	<b>42</b>

## RESİM DİZİNİ

<b>Resim I:</b> Pozitif test sonucu.....	<b>24</b>
<b>Resim II:</b> Negatif test sonucu.....	<b>24</b>
<b>Resim III.</b> Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi.....	<b>26</b>
<b>Resim IV:</b> İzole edilen <i>C. difficile</i> kolonilerinin CCFA besiyerindeki görünümü.....	<b>26</b>
<b>Resim V:</b> 100'lük büyütmede yapılan incelemede gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basillerin görünümü.....	<b>27</b>
<b>Resim VI.</b> İzole edilen mikroorganizmanın biyokimyasallara etkisinin API 20A ile değerlendirilmesi.....	<b>28</b>

## GİRİŞ VE AMAÇ

İshal, infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan çok çeşitli nedenlerle meydana gelebilen bir semptomdur. Barsak infeksiyonlarında, infeksiyöz olmayan barsak hastalıklarında (inflamatuvar barsak hastalıkları, malignensi vb.) sistemik bazı hastalıklarda (hipertiroidi, diyabetes mellitus vb.) görülebilir. Antibiyotikle ilişkili ishal ise, başka bir nedenle açıklanamayan ve antibiyotik kullanımı sonrasında gelişen ishal için kullanılır. Klinik açıdan üç tipi önemlidir; antibiyotikle ilişkili ishal, antibiyotikle ilişkili kolit, psödomembranöz kolit. En ağır seyirli olan psödomembranöz kolittir. Son 6-8 hafta içerisinde antibiyotik kullanan kişilerde oluşabilen bu klinik tablolar, antimikrobik madde kullanımı dışı nedenlerle (normal florayı değiştiren kemoterapotikler ve diğer ilaçlar) de görülebilmektedir.

*C.difficile*, 1935 yılında ilk kez izole edildiğinde insanlar için patojen olmadığına inanılmış, 1970'li yılların sonlarında ise psödomembranöz kolit ve antibiyotikle ilişkili ishale neden olan ajan olduğu anlaşılmıştır. *C.difficile*'ye bağlı infeksiyon, antibiyotiklerle tedavi edilen hastanede yatan hastaların bir kısmında benign, kendini sınırlayan ishal şeklinde seyrederken, bir kısmında hayatı tehdit eden psödomembranöz kolit tablolarına kadar çok geniş bir yelpazede kendini gösterir. Antibiyotiğe bağlı ishallerin %3-25'inde etken *C.difficile*'dir. Psödomembranöz kolitlerin ise %99'undan *C.difficile* sorumludur.

*C.difficile*, doğada yaygındır. Toprakta, suda ve çeşitli hayvanların barsak içeriklerinden izole edilebilir. Sağlıklı erişkinlerin %3-5, yenidoğanların %60-70'inin barsak florasında bulunur. Bu yüksek taşıyıcılık oranı sekiz ay kadar devam edip, daha sonra 2-3 yaşına doğru erişkin oranlarına düşer. Antibiyotik kullanıp ishal gelişmeyenlerde *C.difficile* kolonizasyon oranı %5-15, hastanede yatanlarda %10-25'dir.

*C.difficile*, insanlar için patojen olan, ekzotoksin üreten gram (+), sporlu, zorunlu anaerob basildir. Toksin A ve toksin B üreten toksijenik suşları olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşları da vardır. Toksin üreten *C.difficile* suşları yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Antibiyotik kombinasyonları veya uzun süreli antibiyotik kullanımı hastalık gelişme sıklığını artırmaktadır. *C.difficile* ile ilişkili gastrointestinal hastalıklara en sık yol açan antibiyotikler aminoglikozidler, beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar, ampisilin, klindamisin, kinolonlar, rifampin, trimetoprim sulfametoksazol, amfoterisin B, makrolid türevleri ve tetrasiklinlerdir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin özellikle oral yoldan kullanılan formları klinik tablodan sorumludur. Değişik çalışmalarda gösterilen risk faktörleri arasında >65 yaş, yoğun bakımda yatma, laksatif kullanımı, anti-ülser ilaç kullanımı, uzun süreli hastanede

yatma, lavman yapılması, gastrointestinal invaziv işlemler, gastrointestinal cerrahi ve enteral beslenme sayılabilir. Antibiyotik kullanımının barsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten 6 hafta sonrasına kadar sürmekte, bu süre içinde *C.difficile*'ye bağlı psödomembranöz kolit ortaya çıkabilmektedir.

*C.difficile*, son derece yaygın ve büyük maliyete neden olan hastaneden kazanılmış infeksiyon etkenlerinden biridir. Rapor edilme oranı arttıkça, saptanan *C.difficile* infeksiyon oranı da yükselmektedir. Sporları etkin bir şekilde eradike edemeyen alkol bazlı el antiseptiklerinin kullanımının yaygınlaşması, yeni suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Birçok ülkede yapılan çalışmalarda, daha virulan *C.difficile* suşlarının neden olduğu *C.difficile* ile ilişkili hastalığın artmış oranları bildirilmiştir. Buna rağmen dünya çapında hastanede yatan hastalarda gelişen *C.difficile* ile ilişkili hastalığın prevalansına dair bilgi sınırlıdır. Ayrıca bu olguların tanısı klinik ve endoskopik bulgulara dayanarak konulmakta ve *C.difficile* ile ilişkili hastalığın laboratuvar tanı yöntemleriyle ilgili rutin bir algoritma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada amaç, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanımı hikayesi olan, antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen hastalardan alınan gaita örneklerini makroskopik ve mikroskopik olarak inceledikten sonra *C.difficile* toksin A-B varlığını araştırmak, toksijenik *C.difficile*'yi kültür yöntemiyle izole etmektir. Ayrıca çalışmamızda *C.difficile* ile ilişkili hastalığın epidemiyolojisi ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve nozokomiyal yayılımını önlemek için yapılması gerekenlerin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. CLOSTRİDİUM TÜRLERİ**

Clostridium genusunda çoğunluğu anaerop, bazısı aerotoleran olan, endospor oluşturan, katalaz negatif, gram pozitif basiller yer alır. Clostridium'lar doğada (toprak, tatlı su kaynakları ve denizlerin dibinde) bol miktarda bulunan, çoğu mezofilik, bazıları termofilik olabilen mikroorganizmalardır. Şimdiye kadar 100 civarında tür tanımlanmış olsa da, tıbbi önemi olan tür sayısı 25'dir. Bu türlerin 14'ü klinik örneklerden izole edilen Clostridium'ların % 96'sını oluşturmaktadır. En önemli türler *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* ve *C.difficile*'dir. Daha seyrek olarak *C.septicum*, *C.ramosum*, *C.novyii*, *C. histolyticum* ve *C. bifermentas* klinik örneklerden izole edilir (1,2,3,4).

Filogenetik açıdan bakıldığında Clostridium cinsinin son derece heterojen olduğu görülmektedir. Pek çok tür, diğer cinslerde bulunan spor oluşturan ya da oluşturmeyen türler ile karıştırılabilmektedir. Geleneksel olarak türler, bazı morfolojik, yapısal ve fizyolojik özelliklerine göre tanımlanmaktadır. Son on yıl içinde yapılan 16S rRNA gen sekansı çalışmalarına göre, Clostridium'lar 19 kümeye ve 11 gruba ayrılabilir. Homoloji grup 1, Clostridium cinsinin temelini oluşturmakta ve klinik öneme sahip pek çok Clostridium türü, bu grup içinde yer almaktadır. Son yapılan rRNA gen analiz sonuçlarına göre Clostridium'lar 5 yeni cins ve 11 yeni türde toplanmıştır. Clostridium'lar *Firmicutes* şubesinde yer almakta ve en az 12 neslin yer aldığı heterojen bir grubu oluşturmaktadır. Clostridium'larda G+C miktarı oldukça değişkendir (%22-55mol); ancak toksijenik türlerde G+C miktarı birbirleriyle benzerlik göstermektedir (%24-29 mol). Bu cinsi tanımlamak amacıyla geleneksel olarak kullanılan yaygın morfolojik ve fenotipik özellikler şöyle sıralanabilir: endospor oluşumu, anaerobik enerji metabolizmasının varlığı, sülfatın sülfite indirgenememesi ve gram pozitif hücre duvar yapısına sahip olmasıdır (5).

Clostridium cinsinde bulunan bakterilerin çoğu zorunlu anaerop olmakla birlikte *C. tertium*, *C. histolyticum* ve *C. bifermentas* gibi türler aerotolerandır. *C. perfringens* ve *C. ramosum* diğer Clostridium'lardan farklı olarak dokuda ve kültürde ürediklerinde sporlu görünmezler. Sporları santral, subterminal ve terminal olarak oluşurlar. Önemli bir özellikleri de çoğunda sporanjiyumun bakteri hücre kalınlığından daha geniş olması ve bulunduğu yerde bakteriyi şişirmesidir. Buna göre mekik, davul tokmağı ve raket görünümü alırlar. Kültürde üreyen Clostridium cinsleri hemolizin, kollagenaz, lipaz, deoksiribonükleaz, hiyalürinidaz gibi çok çeşitli enzim ve ekzotoksin oluştururlar. Tabiatta bilinen en ölümcül ekzotoksinlerin de içinde bulunduğu yirmiden fazla farklı toksin sentezleyen Clostridiumlar, biyolojik aktif protein üretimi açısından en geniş çeşitliliğe sahip bakteri genusunu oluştururlar (2). *C. perfringens* dışında, diğer Clostridium'lar peritrik kirpikleriyle hareketli ve kapsülsüzdür. Gram pozitif olmakla birlikte eskimiş kültürlerde gram negatif görünebilirler (1,2,4).

Clostridiumlar çoğunlukla endojen mikroflora elemanları arasında yer almakta; ancak morbidite ve mortaliteye neden olan infeksiyonlara da yol açabilmektedir. Virulans faktörleri (özellikle toksinler) inokulum miktarı ve diğer özellikleri Clostridium türlerine bağlı hastalıkların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Konak savunma sisteminin baskılanmış olması da Clostridium türleri ile gelişecek infeksiyonlara karşı hassasiyeti artırmaktadır (5). Clostridium cinsi bakteriler, gazlı gangren, tetanoz, botilismusun yanı sıra, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, besin zehirlenmesi ve psödomembranöz kolite neden olurlar (4).

## 2.2. CLOSTRIDIUM DIFFICILE

*C.difficile*, insanlar için patojen olan ekzotoksin üreten gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerop basildir (6,7). Toksin A ve toksin B üreten toksijenik suşları olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşları da vardır. Toksin üreten *C.difficile* suşları yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (5,8,9). Nozokomiyal bir ajan olması ve uygun olmayan antibiyotik kullanımlarının sık görülmesi, bu bakteri ile her yıl milyonlarca insanın infekte olmasına yol açmaktadır (10). Bir tahmine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl *C.difficile*'ye bağlı 250.000'den fazla ishal olgusu bildirilmekte ve infeksiyonun maliyeti yaklaşık 1 milyar doları bulmaktadır (5). İngiltere'de de rapor edilen *C.difficile*'ye bağlı infeksiyon sayısı artmaya devam etmektedir. Bu durumun hastane kaynakları için ağır bir yük olduğu anlaşılmıştır (9). Hastadan hastaya geçiş ve çevresel kontaminasyon hastanelerde hastalığın yayılımı için risk faktörleridir (11). Nozokomiyal ishallerin %20'sinden *C.difficile* sorumlu tutulmuş ve psödomembranöz koliti olan hastaların odalarının farklı yerlerinden (tuvalet, döşemeler ve yatak kenarlarından) alınan örneklerde, %33 oranında *C.difficile* üretilmiştir (3). Salgınlar sırasında yüzeyden, havadan, yiyeceklerden, uzun süreli tedavi ve bakım yapılan bölümlerden ve hastane personelinin ellerinden izole edilmiştir. Hastaların *C.difficile* ile çok kolay kontamine olabileceği bir yerde antibiyotik tedavisi görmeleri nedeniyle hastane ortamında birinci sırada gastrointestinal infeksiyon nedeni haline gelmiştir. Psödomembranöz kolitlerin %90-100'ünden, antibiyotikle ilişkili kolitlerin %60-75'inden, antibiyotikle ilişkili ishallerin %11-33'ünden sorumludur (10).

*C.difficile*, ilk kez 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından yenidoğanlarla bir yaşına kadar olan bebeklerin gaitalarından izole edilmiş, önceleri *Bacillus difficilis* diye adlandırılmış (12) ve küçük yaşlarda kolonun normal flora üyesi olduğu bildirilmiştir. 1940'ta Synder hayatın ilk yılında 22 sağlıklı infantın 10'unun gaitasından *Bacillus difficilis* izole ettiğini rapor etmiştir. Bakterinin izolasyonunun güç olması nedeniyle "difficult =güç" anlamında *C.difficile* adı verilmiş ve uzun yıllar bu bakterinin herhangi bir patolojiye yol açabileceği kabul edilmemiştir. Psödomembranöz kolit ile antibiyotik tedavisi arasındaki ilişkinin ortaya konmasından sonra 1974 yılında birbiriyle bağlantılı üç tarihi çalışma yapılmıştır. Tedesco hastalığın anatomisini, Green hayvan modellerinde toksinin etkisini, Hafız ise basilin doğada yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir. *C.difficile*, doğada yaygın olarak bulunan, uygun olmayan koşullarda sporulasyonla hayatını sürdürebilen nozokomiyal patojendir (3,13).



### 2.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

*C.difficile*, 0,5 µm en ve 3-5 µm boyunda, peritrih kirpikleri ile zayıf hareketli, kapsülsüz, uçları yuvarlak, ince, uzun, düz, gram pozitif basillerdir (1,3). Bakteri bedeninden daha geniş, oval, subterminal yerleşimli spora sahiptir. Spor nadiren terminal yerleşim gösterebilmektedir. Dokudan hazırlanan preparatlarda tek tek veya kısa zincirler halinde görülürken katı besiyerlerinde filamentöz yapıda görülebilmektedir. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanır ancak eski kültürlerde bazen gram negatif görülebilir (3).

### 2.2.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

*C.difficile*, üreyebilmesi için karbondioksit (%10), hidrojen (%10) ve nitrojen (%80) bulunan ortama ihtiyaç gösteren, zorunlu anaerop bir bakteridir (3). Katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesi olmamakla birlikte, sitokrom sistemine de sahip olmadığı için oksidaz negatiftir (5). Her ne kadar 25-45°C' ler arasında üreyebilirse de optimal üreme ısısı 30-37°C, pH:7-7,2'dir (3). Lesitinaz, lipaz aktivitesi olmayan, indol oluşturmeyen, bazı karbonhidratları parçalayabilen bir bakteridir (4). İlk izolasyonda içinde kan, serum, yumurta sarısı ve fruktoz bulunan besiyerlerine ihtiyaç gösterir. Besiyerine %0,2 p-crezol eklenmesi seçici özellik sağlar. Agarlı besiyerlerinde 35°C'de, 48 saatlik anaerop inkübasyon sonunda hafif kabarık, kenarları düzensiz, 1-3 mm çaplı koloniler meydana gelir. At kanı konmuş besiyerlerinde bazen hemoliz görülebilirse de, koyun ve insan kanlı agar besiyerlerinde hemoliz oluşmaz. Bakteri çoğu antibiyotiğe dirençli olduğundan gaitadan ilk izolasyonda, içinde çeşitli antibakteriyel ajanlar bulunan selektif besiyerleri kullanılır (3). Selektif besiyerlerine ekim yanında alkol veya ısı şokuyla spor seleksiyonu tekniği de kullanılır (14). Isı (80°C) veya etanol uygulanması, sporların saptanmasında yardımcı olan etkenlerdir. En sık kullanılan sikloserin sefoksitin fruktoz agar (CCFA) besiyeridir. *C.difficile*, CCFA besiyerinde, materyal ekiminden 24 saat sonra 2-4 mm çaplı, buzlu cam görüntüsü veren, krem-sarı ile gri-beyaz renkte ve düzensiz kenarlı koloniler oluştururlar. Koloniler benekli ve mat, düşük büyütme mikroskop altında yüzeyden hafif kabarık görünümündedir. Bu besiyerinde 24 saatte oluşan koloniler, 360 nm. ultraviyole ışınları altında incelenirse, etrafının açık yeşilden sarıya kadar değişen floresans verdiği görülür. Kokusu, ayırt edicidir. At gübresi kokusu tipiktir. Kanlı besiyerlerinde bakteri sporlu iken CCFA'da spor oluşumu gözlenmez. Gram boyama yöntemiyle bakteriler, gram pozitif veya gram değişken, basiller şeklinde görünür. Sporlu basillerde spor, subterminal yerleşimlidir. *C.difficile*'nin tahmini tanımlaması, tipik kolonilerin gözlenmesi, gram boyama ile saptanan mikroskopik morfoloji ve tipik kokusu ile yapılabilir. Tanımlamanın doğrulanması için izolatların biyokimyasal

özelliklerinin de belirlenmesi gerekmektedir (3,5,14,15). Glukoz, mannoz ve mannitolü asit oluşturarak fermente eder. Ksiloz ve salisine etkisi değişkendir. Maltoz, laktoz, sükroz, galaktoz ve gliserole etkisi yoktur. İndol, nitrat ve üreaz negatiftir. Jelatin ve eskülünü hidroliz eder. Proteolitik değildir, lipaz ve lesitinaz aktivitesi yoktur. Metabolik son ürün olarak asetik, propiyonik, izobutirik, butirik, izovalerik, valerik ve izokaproik asit oluşturur (16).

### **2.2.3. Dirençlilik**

Diğer Clostridium türlerinde olduğu gibi, *C.difficile*'nin vejetatif şekilleri fiziksel ve kimyasal etkenlere duyarlıyken, sporlar oldukça dirençlidir. Sporlar oda ısısında 5 ay infektivitesini korumaktadır. Vejetatif formları oksijene çok duyarlı olmakla beraber, sporlu şekilleri hastane ortamında, sağlık çalışanlarının ve hastaların ellerinde aylarca canlılıklarını sürdürebilmektedir. *C.difficile* sporları, nozokomiyal infeksiyonlar açısından önemli bir sorundur. Sporlar, alkol bazlı el antiseptikleri ve deterjanların kullanımı ile eradike edilememektedir (3,17,18).

### **2.2.4. Virulans ve Patojenite**

*C.difficile*, insanların %2-10'unun normal gastrointestinal florasında yer alan bir bakteridir. *C.difficile*'nin önemli bir özelliği, birçok antibiyotiğe nisbi dirençli olmasıdır. Bu nedenle, antibiyotik kullanımı sırasında veya kullanımını izleyen dönemde hızla çoğalarak toksin üretebilirler. Üretilen toksin enterokolit gelişimine yol açar. Daha sonraki dönemde ise inflamatuvar hücre ve fibrin birikimi, mukoza nekrozu ve psödomembran oluşumuna neden olur ve sonuçta psödomembranöz kolit gelişebilir. *C.difficile* suşlarında toksin üretimi, kromozomal bir gen olan "tox" geninin kontrolündedir ve bu gen tüm suşlarda bulunmaz (19).

Toksin A (308 kDa) ve toksin B (270 kDa) olmak üzere iki farklı toksin üretebilirler. İmmünolojik olarak ikisi de farklıdır. Ayrıca insan barsak hücrelerine bağlanmasını kolaylaştıran adezin faktör, hiyaluronidaz ve spor oluşturmaları da virulansında rolü olan diğer faktörlerdir (4). Toksin A potent bir enterotoksin, toksin B ise bir sitotoksindir. Her iki toksinin de barsak mukozasında harabiyete neden olan sitotoksik enzimler olduğu ve mukoza hücreleri harabiyetinde sinerjistik etkileri olduğu kanıtlanmıştır (20). Yapısal olarak benzerdirler ve %49 homoloji gösterirler. Bu toksinler karboksil ucunda devamlı tekrar eden üniteler içerir. Toksin A ve toksin B'nin karboksi terminal bölgeleri benzer glikoziltransferaz aktivitesine sahiptir. Toksin A'da bu üniteler karbonhidrat reseptörlerine bağlanmadan sorumludur. İnsanlarda ve kemiricilerde toksin A spesifik karbonhidrat reseptörlerine bağlanır. Bu spesifik yapıyı taşıyan karbonhidrat antijenler insanda barsak epitelinde bulunan Lewis I, X ve Y'dir. Bunlar toksin A'yı bağlar, başka bir deyişle reseptör işlevi gördükleri

düşünülür. Ancak bunların fonksiyonel reseptörler olarak işlev görüp görmediği belli değildir. Toksin B için henüz bir reseptör saptanmamıştır (21). Bu toksinlerin sitotoksik aktiviteleri ve buna karşı gelişen inflamatuvar yanıt, *C.difficile* ile ilişkili ishalin histopatolojisini oluşturmaktadır. Toksinlerin hücre membranındaki reseptörlere bağlanması toksik etkiyi oluşturur. Her iki toksin mukozada inflamasyona yol açar; nötrofil, monosit ve dökülen enterositleri içeren proteinden zengin bir eksüda salgılamasına neden olurlar. *C.difficile* kökenlerinin yaklaşık % 25'i toksin üretmemektedir ve dolayısıyla bunların ishal ve kolite neden olması beklenmez (5,14).

*C.difficile* infeksiyonlarının %90'ından fazlası, antibiyotik kullanımı sırasında veya kullanımı sonrasında oluşmaktadır. Antibiyotikler, endojen veya ekzojen kaynaklı *C.difficile*'nin kolonda yerleşip çoğalmasını sağlayarak normal kolon florasının bozulmasında rol oynamaktadırlar (22). Kolon mikroflorasının bozulması ile *C.difficile*'ye duyarlı hale gelen kişilerde vejetatif mikroorganizmaların çoğu mide asit ortamından etkilenerek ölürken, spor şekilleri aside dirençlidir ve zarar görmeden ince barsağa ulaşır. Burada safra asidine maruz kalan sporlar terminal ileumda vejetatif forma dönerler ve kolon lümeninde çoğalırlar. Klinik sonuç, adezyon, hidrolitik enzim sekresyonu ve konak faktörleri gibi diğer virülans faktörlerine bağlıdır. Suş toksijenikse, hemen hemen tüm olgularda eş zamanlı olarak toksin A ve toksin B üretilmekte, sıvı sekresyonu, inflamasyon ve mukozal hasara neden olmaktadır (21,22).

*C.difficile*'nin virülansına katkıda bulunan pek çok faktör vardır. Ancak patojen olan suşların virülansı aynı değildir. *C.difficile* suşu ne kadar çok toksin üretirse o kadar patojendir. Konak hücrelerine adezyon patojen suşların virülansı için önemlidir. Virülansı fazla olan suşların aderensi virülansı zayıf olanlardan daha iyidir. Aderensin en belirgin olduğu bölgeler terminal ileum ve çekumdur. *C.difficile*'de adezyondan sorumlu olabilecek pek çok faktör olmakla beraber bunların rolü tam olarak belli değildir. Barsakta hücrelere bağlanmayı sağlayan yapılardan biri fimbriyalardır. Bu yapıların kolonizasyondaki rolü açık değildir. *C.difficile* hareketlidir ve flagelleri vardır. Ancak bunların adezin görevi açık değildir. Mikroorganizmanın fizikokimyasal özellikleri de adezyona katkıda bulunur. *C.difficile*'nin hücre yüzeyi hidrofobiktir ve pozitif yük taşır. Konak hücre duvarının negatif yüklü olması *C.difficile*'nin barsakta kolonize olmasına katkıda bulunuyor olabilir. Patojen bakterinin barsak lümeninden mukozaya doğru hareket kabiliyeti mikroorganizmanın barsak reseptörlerine adezyonuna bağlıdır. İnsan ve hayvanlarda barsak mukusu *C.difficile* için kemoatraktan olarak işlev görür. *C.difficile* barsak mukozasına yerleşir yerleşmez toksinlerini üretir (21).

Toksinler kolon epitelinin lüminal tarafındaki spesifik reseptörlere bağlanırlar ve sonra sitoplazma içine alınırlar. Her iki toksin hücre içine girer girmez Rho proteinlerini inaktive eder. Bu proteinler hücre iskeletinde aktin polimerizasyonunun ve çeşitli sinyal transdüksiyon aşamalarını düzenleyen küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinlerin ailesindedir. Toksinler Rho üzerinde spesifik bir treonine bir glikoz parçasının eklenmesini katalize eder. Rho'daki bu modifikasyon aktin filamentlerinin depolimerizasyonuna, hücre iskeletinin bozulmasına, hücrenin yuvarlaklaşmasına ve hücre ölümüne (apoptozis) yol açarak onu inaktive eder. *C.difficile* toksinlerinin kolera toksini veya *E.coli* ısı-stabil toksininden farklı olarak cAMP (siklik adenozin monofosfat) veya cGMP'nin (siklik guanozin monofosfat) intraselüler seviyesi üzerine etkisi yoktur. Bununla beraber *C.difficile* toksinlerinin genel mekanizmaları Rho proteinlerini hedef alan diğer bazı bakteriyel toksinler ile benzerdir. *Clostridium sordellii* ve *Clostridium novyi*'nin sitotoksinleri Rho'ya glikoz ekler ve *Bacillus cereus* ile *Staphylococcus aureus*'ta Rho protein ailesini modifiye eder. Hepsi ökaryotik hücrelerde aktin filament formasyonunu regüle eden Rho proteinlerine saldırarak hücre yapısını ve fonksiyonunu değiştirir (21).

Toksin A, enterosit membranı üzerinde bulunan glikoprotein reseptörlere bağlanarak hücre içine girer. Fibriler aktini değiştirerek konak hücrede yuvarlaklaşmaya neden olur. Kolon mukoza hücreleri arasındaki bağlantılar kopar ve yaygın harabiyet gelişir. Sonuçta barsaktan lümeneye proteinden zengin bir eksuda sızar. Oluşan harabiyet toksin B'nin mukoza hücrelerine penetre olmasını daha da kolaylaştırır. Toksin A, enterositler dışındaki diğer hücrelere de etkilidir. Makrofaj ve mast hücrelerini aktive edip, nötrofillerin mobilizasyonuna yol açar. Bu sırada, PGE<sub>2</sub>, lökotrien B<sub>4</sub>, lökotrien C<sub>4</sub>, PAF, IL-1, IL-8 ve histamin salınımı olur (3). Toksin A lamina propria'da belirgin inflamatuvar reaksiyona neden olur. Bunu sitoliz ve apikal bazal hücrelerin bazal kısımlarının ayrılması izler. Toksin B'nin permeabilitede artış, sıvı sekresyonu, nötrofil göçü ve intestinal morfolojide değişikliklere yol açtığı gösterilmemiştir. Ama toksin A gibi insan epitelyum hücreleri arasındaki sıkı bağlantı bölgelerini bozduğu ve insan kolon mukozasının hasarıyla ilgili olarak toksin A'dan en az 10 kat daha fazla potent olduğu biliniyor. Yine toksin B makrofaj kökenli TNF alfa ve lipooksijenaz aracılığıyla yoğun nötrofil toplanmasını stimüle eder (21). Sonuçta mukoza hasarı ile birlikte etkilenen barsak segmenti içine nötrofiller hücum eder. Hemorajiye bağlı olarak gaitada bazen kan bulunabilmektedir (3).

Toksin A ve toksin B'yi kodlayan genler, *C.difficile*'nin patojen suşlarında bulunan ve kısa bir kromozomal segment olan PaLoc (pathogenicity locus) operonunun bir parçasıdır (23). Tipik toksijenik suşlar, karşılaştırılabilir seviyede her iki toksini de üretir. Atipik

toksijenik suşlar ise sadece toksin B üretir. Non- toksijenik suşlar toxA ve toxB'yi bulunduran patojenite lokusunu (PaLoc) taşımamaktadır. Günümüzde araştırmacılar, oldukça komplike toksinotiplerle sonuçlanabilecek şekilde, toxA ve toxB genlerindeki mutasyon ve delesyonları tanımlamışlardır. Altı benzer alt birimden oluşan bir metabolik enzim olan Glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) ise, tüm *C.difficile* suşlarında yüksek oranda eksprese edilmektedir ve ortak antijen olarak belirlenmiştir (24).

Toksin A ve toksin B sırasıyla tcdA ve tcdB tarafından kodlanır. Bazı *C.difficile* suşları, ek olarak cdtA (enzimatik komponent) ve cdtB (binding komponent) operonundan eksprese edilen *Clostridium difficile* binary toksinini (CDT) de içermektedir. tcdC ise, tcdA ve tcdB'nin negatif regülatörü olarak kabul edilmektedir ve PaLoc operonunun bir parçasıdır (25). Başlangıçta, epidemik suşun tcdC genindeki baz çifti delesyonlarının (özellikle 18bp) aşırı toksin üretiminden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Son zamanlarda, olası mekanizmanın, 117. pozisyonundaki bir tekli nükleotid mutasyonunun, tcdC gen ürününün kesilmesiyle sonuçlanan bir stop kodonunu tanıyan çerçeve kaymasına (DNA mutasyonu) sebep olduğu bildirilmiştir (26). Logaritmik fazda, tcdC geninin ekspresyonu artmaktayken, toksin A (tcdA) ve toksin B'yi (tcdB) kodlayan genlerin ve pozitif regülatörün (tcdD) transkripsiyonu azalmaktadır. Stasyoner fazda ise bunun tersi bir durum oluşmaktadır. PaLoc sekansındaki varyasyonlar, toksinotiplendirme ile saptanabilir (23).

Toksin A ve toksin B'nin her ikisi de Rho ve Ras ailesindeki proteinlerin UDP-glukoz bağımlı glikozilasyonu ile barsak epitel hücrelerinin aktin yapısını parçalamaktadırlar. Binary toksin adı verilen üçüncü toksin ise aktin spesifik adenosin difosfat-riboziltransferazdır ve 1988 yılında *C.difficile* CD 196 suşunda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *C.difficile* suşlarının yaklaşık %5'inde saptandığı bildirilmiştir. Her ne kadar bu toksinin *C.difficile* 'nin patojenitesine katkısı bilinmese de, binary toksininin ilk kez saptandığı *C.difficile* suşu, psödomembranöz kolite sebep olmuştur (27,28).

### 2.3. Epidemiyoloji

*C.difficile*, dirençli endospor oluşturabilme yeteneği sayesinde doğada yaygındır. Bu mikroorganizma, toprakta, gaitada, kanalizasyonda ve deniz tabanında yaygın olarak bulunur (5). Sağlıklı erişkinlerin % 3-5, yenidoğanların % 60-70'inin barsak florasında bulunur; bu yüksek taşıyıcılık oranı sekiz ay kadar devam edip, daha sonra 2-3 yaşına doğru erişkin oranlarına düşer. Antibiyotik kullanıp ishal gelişmeyenlerde *C.difficile* kolonizasyon oranı % 5-15, hastanede yatanlarda %10-25'dir (14). Asemptomatik taşıyıcı olan yenidoğan ve infantlarda barsaklarında yüksek seviyede toksin A ve B olmasına rağmen erişkinlerdeki gibi

hastalık yapmaması da dikkat çekicidir. Bakteri toksin üretmesine rağmen genellikle hastalığa yol açmamaktadır; bunun nedeni yenidoğanda barsak hücreleri, muhtemelen toksin etkisine duyarlı değildir (29). Yenidoğanlarda ve infantlarda infeksiyona direncin nedeni açıklanamamaktadır. Öngörülen nedenlerden biri toksin için barsaklarda gerekli reseptörlerin olmamasıdır. Reseptörlerin gelişimi yaşla bağlıdır ve normal barsak florasının gelişmesine paraleldir. Koruyucu mekanizmanın ne zaman kaybolduğu ve kolonizasyon direncinin ne zaman yerleştiği açık değildir. Anne sütünün bu duruma etkisi ise tam olarak bilinmemektedir çünkü mama ile beslenenlerde infeksiyonun arttığına dair kanıt yoktur. 8. aydan sonra normal erişkin florasının oluşmasından itibaren yaşla gittikçe artan duyarlılık ortaya çıkmaktadır. İnfeksiyon sıklıkla orta ve ileri yaşlarda, düşükün hastalarda görülmektedir (21,29).

*C.difficile* antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-25'inden sorumludur ve giderek daha çok major bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmiştir. *C.difficile* toksinleri ise antibiyotikle ilişkili ishal olgularının %10-25'inde saptanmıştır (30,31). Her yıl İngiltere'de *C.difficile* infeksiyonlarına bağlı 300,000- 3,000,000 kadar ishal ve kolit olgusu bildirilmekte ve sağlık sisteminde yıllık 1 milyar dolarlık ekonomik yüke yol açmaktadır (7,32). ABD'de yapılan bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve antibiyotik tedavisi alan hastaların %30'undan fazlasında *C.difficile* kolonize olmuş, %56'sında *C.difficile* ile ilişkili ishal gelişmiştir. Fakat olguların çoğunda etyolojik ajan identifiye edilememiştir (31). *C.difficile*'nin nozokomiyal bir ajan olması ve uygun olmayan antibiyotik kullanımlarının sık görülmesi, bu bakteriyle her yıl milyonlarca insanın infekte olmasına yol açmaktadır (10). Bakteri, 1974 yılından beri araştırma konusu olmakla birlikte, infeksiyon kontrol programları, etkin tedavi yöntemleri ve klinik tanıdaki ilerlemelere rağmen, Avrupa ve Kanada'daki hastanelerde salgınlar oluşturmaya devam etmektedir. Bu salgınlardan *C.difficile* BI/NAP/027 suşu sorumlu tutulmuştur. Bu suş, *tcdC* geninde bir 18-bp delesyonu içermektedir ve bu suşun 16 kat daha fazla toksin A ve 23 kat daha fazla toksin B ürettiği saptanmıştır. Ek olarak, binary toksin denilen ekstra bir toksin de üretmektedir. Bu epidemik klon, moksifloksasin ve gatifloksasin gibi florokinolonlara yüksek düzey direnç göstermektedir. İlk kez Kuzey Amerika'da saptanan *C.difficile* 027 hızla Avrupa'nın çeşitli ülkelerine yayılmıştır. Bu suşun dünyanın pek çok yerine yayılımı, *C.difficile* infeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli değişikliklere yol açabilir (33). 2003-2004 yıllarında Kanada'da yapılan bir çalışma, hipervirulan toksinotip III ribotip 027 suşunun neden olduğu *C.difficile* ile ilişkili hastalık salgınının Quebec'te pek çok hastaneye yayıldığını ortaya koymuştur. Suş aynı zamanda ABD, İngiltere ve Hollanda'da saptanmıştır. Hastanede yatış süresi ve mortalite üzerinde bu salgının etkileri bilinmemektedir (34). Finlandiya'da, hipervirulan PCR ribotip 027 (Kuzey

Amerika pulse-field gel elektroforez tip 1; NAP1) suşu, ilk kez 2007 yılında saptanmıştır. *C.difficile*'nin değişen epidemiyolojisi ve hipervirulan suşun aciliyeti Finlandiyalı sağlık otorlerinin *C.difficile*'ye verdikleri önemi artırmıştır. TcdA-negatif TcdB pozitif PCR ribotip 017 suşu ise bazı ülkelerde epidemilere sebep olmuştur. *C.difficile*, şimdiye kadar, hastane ve bakım evlerinde başlıca tehdit haline gelmiş olsa da, daha önce bildirilen risk gruplarının haricinde toplumdan kazanılmış olguların insidansı artmaktadır (35).

Son çalışmalar, dünya çapında nozokomiyal *C.difficile* infeksiyonlarının insidansında önemli bir artış olduğunu ve bu infeksiyonun sağlık hizmetleri üzerinde finansal olarak büyük bir etki yaptığını göstermektedir. *C.difficile* ile ilişkili hastalıkların epidemiyolojisindeki değişiklikler, antibiyotik kullanımındaki değişimleri, infeksiyon kontrol yöntemlerindeki gelişmeleri, daha virulan suşların varlığını ve antibiyotik direncini kapsamaktadır (36,37).

#### **2.4. Clostridium difficile İnfeksiyonları:**

Klinik olarak asemptomatik taşıyıcılıktan ölümle sonlanabilen psödomembranöz enterokolit tablolarına kadar çok geniş bir yelpazesi olan *C.difficile*, antibiyotikle ilişkili ishallerde ve nozokomiyal ishallerde en sık rastlanan etken olarak karşımıza çıkmaktadır (7,38,39).

Antibiyotikle ilişkili ishal olgularının sadece % 15-25 kadarı *C.difficile* tarafından oluşturulurken, aynı bakteri kolitle seyreden olguların hemen tamamından sorumludur. Antibiyotik ishalinden sorumlu diğer mikroorganizmalar arasında *Salmonella*, *Clostridium perfringens* tip A, *Staphylococcus aureus* ve bir görüşe göre de *Candida albicans* gelmektedir. 50'li yıllarda antibiyotikle ilişkili ishallerin en önemli etkeni olarak tanımlanan *S. aureus*'un bu rolü de bugün için tartışmalıdır. Bu dönemde *C.difficile* infeksiyonunun yanlışlıkla *S. aureus* infeksiyonu olarak adlandırılması olasılığı olabileceği gibi, *S.aureus*'a bağlı gelişen enterokolit tablosunun da yine yanlış bir tanımlamayla antibiyotikle ilişkili ishal olarak değerlendirilme olasılığı söz konusudur (40).

Günümüze kadar parenteral verilen vankomisin ve aminoglikozidler dışında hemen hemen tüm antibiyotiklerin antibiyotikle ilişkili ishale yol açabildiği gösterilmiştir (22). Tüm antimikrobiyal ajan grubunda bulunan antibiyotikler ve çeşitli antikanser kemoterapötik ajanların kullanılması *C.difficile* ile ilişkili hastalık ve psödomembranöz kolit gelişmesine yol açabilmektedir (5). Hastalığa en sık yol açan antibiyotiklerin başında, normal intestinal floranın tahrip edilmesine neden olan geniş spektrumlu antibiyotiklerin özellikle oral yoldan kullanılan formları gelmektedir. Antibiyotik kombinasyonları veya uzun süreli antibiyotik kullanımı hastalık gelişme sıklığını artırmaktadır. Değişik çalışmalarda gösterilen risk

faktörleri arasında >65 yaş, yoğun bakımda yatma, laksatif kullanımı, anti-ülser ilaç kullanımı, uzun süreli hastanede yatma, lavman yapılması, gastrointestinal invaziv işlemler, gastrointestinal cerrahi ve enteral beslenme sayılabilir. Bu faktörlerin çoğu hastalarda normal intestinal floranın bozulması sonucu, yoğun bakımda veya hastanede uzun süreli yatışın ise *C.difficile* ile karşılaşma sıklığı ve yoğunluğunu artırması sonucu ishale yol açtığı varsayılmaktadır. Çalışmalarda antineoplastik tedavi tek başına bağımsız bir risk faktörü olarak gösterilememiş olsa da, çok sayıda olgu sunumunda kanser ilaçlarının özellikle de metotreksat ve paklitakselin *C.difficile* infeksiyonuna neden olabildiği bildirilmiştir (22,40). Proton-pompa inhibitörleri ve H2 antagonistleriyle tedavi ve inflamatuvar barsak hastalığı gibi gastrointestinal hastalıklar da diğer risk faktörleri arasındadır (41).

Hemen hemen tüm çalışmalar, *C.difficile* ile ilişkili infeksiyon için üç major risk faktörü belirlemişlerdir: antibiyotik maruziyeti, ileri yaş ve hastanede yatma öyküsü. Antibakteriyel spektrumlu herhangi bir antimikrobiyal ajan, bu duruma sebep olabilir. Örneğin 1970'li yıllarda klindamisin, ampisilin veya amoksisilinin etkin bir rol oynadığı düşünülmüş, 1980'lerde ise bunların yerini büyük ölçüde sefalosporinler almıştır (42). Linkomisin, klindamisin ve ampisilin kolitin en sık sebebi olarak bildirilmişlerse de bazı çalışmalar çeşitli sefalosporinleri de kapsamaktadır. *C.difficile* ve toksini sefoksitin uygulaması ile ilişkili olarak ishal olan bir hastada ve non-spesifik koliti olan bir diğerinin gaitasında saptanmıştır. Antitüberküloz ajanlar, üriner antiseptikler (methenamine mandelate, nalidiksik asit ve nitrofurantoin) ve aminoglikozidler parenteral uygulandığında kolitle ilişkili bulunmamışlardır (12).

Florokinolonların bu hastalığa yol açabileceğine inanılmasa da, florokinolon ilişkili *C.difficile* ishali bildiren birkaç olgu yayınlanmıştır. Kanada'da Yip ve ark tarafından yapılan vaka-kontrol çalışmasında, siprofloksasin kullanımının nozokomiyal *C.difficile* ile ilişkili hastalıkta güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiş, özellikle *C.difficile*'nin endemik olduğu hastanelerde kinolonların dikkatli kullanılması önerilmiştir (43,44).

Klasik semptom ve bulgular olduğunda *C.difficile* infeksiyonu tanısını koymak oldukça kolaydır. Hastalık başlıca aşağıdaki beş klinik formdan biri ile seyredebilir:

[1] Asemptomatik taşıyıcılık, [2] Psödomembransız kolit, [3] Psödomembranlı kolit (PMK), [4] Toksik megakolon, [5] Fulminan kolit.

İshal ana semptomdur. *C.difficile*, nozokomiyal ishallerin önde gelen sebebi olup, hastaneyle ilişkili ishallerin %20-45'inden sorumludur (10). Hastaneye yatıştan 72 saat sonra başlayan ishal nozokomiyal olarak değerlendirilmektedir (33). Mcfarland ve ark. tarafından yayınlanan bir rapora göre; hastaneye kabul sırasında *C.difficile* kültür negatif olan 399



hastanın %21'inde hospitalizasyon sırasında *C.difficile*'ye bağı hastalık gelişmiştir. Bu hastalardan %63'ünde infeksiyon belirtisiz seyrederken, %37'sinde ishal gelişmiştir (5). Semptomatik olgularda infeksiyon bulgularından 6 hafta öncesine kadar gidebilen antibiyotik kullanımı öyküsü vardır. Antibiyotik kullanımından genellikle 4-9 gün sonra başlayan çok sulu veya mukoid, yeşil renkli, kötü kokulu ishal vardır. Kramp tarzında karın ağrısı buna eşlik eder. Gaita bazen kanlı olabilir; gaitada lökosit olguların %30-50'sinde vardır. Yüksek ateş, aşırı karın hassasiyeti, lökositöz bulguları masum bir ishalden çok koliti düşündürür (29). Hafif ishallerde sistemik semptomlar genellikle yoktur fakat şiddetli hastalıkta sık görülür. Olguların %28'inde ateş, %50'sinde lökositöz ve %22'sinde karın ağrısı eşlik eder. Karın ağrısı, genellikle alt kadrana lokalizedir. Bazı hastalarda, ateş 40 °C'ye ulaşabilir, lökosit sayısı yaklaşık 50,000 hücre/mm<sup>3</sup>'tür. Hipoalbuminemi, albumin kaçığına bağı aşırı protein kaybının sonucudur ve hastalığın seyrinde erken dönemde oluşabilir (45).

#### **2.4.1. Asemptomatik taşıyıcılık:**

Sağlıklı yenidoğanların yaklaşık yarısı, erişkinlerin %1'den azı asemptomatik taşıyıcıdır. Ancak yakın zamanda antibiyotik tedavisi görenlerde kolonizasyon oranı %25'e kadar çıkmaktadır. Asemptomatik taşıyıcılar, diğer hastalar için sessiz kaynaklardır. Bir epizottan sonra gaitada taşıyıcılık süresinin ne kadar sürdüğü tam olarak bilinmemekle birlikte olasılıkla 3-6 hafta kadar olduğu tahmin edilir. Klinik tablonun belirgin olduğu durumlarda semptomlar genellikle kolonizasyondan hemen sonra başlar. Kolonizasyon antibiyotik tedavisi sırasında veya antibiyotik tedavisi kesildikten sonraki haftada gelişebilir. Kolonizasyondan sonra inkübasyon döneminin ne kadar olduğu bilinmemekle beraber antibiyotik tedavisi başladıktan sonra bir haftadan daha kısa süre (4-7 gün) olarak kabul edilir. Ancak ishal tedavinin ilk gününde veya tedaviden 10 hafta sonra da gelişebilir. Bununla beraber hastaların 1/3'ünde antibiyotik tedavisi kesildikten sonra başlar (3,21).

#### **2.4.2. Basit *C.difficile* ishali:**

En sık klinik tablo olan basit *C.difficile* ishali, antibiyotikle ilişkili ishallerin %20-30'unu oluşturur. *C.difficile* ishali tipik olarak proktokolit ile uyumludur. İshal kısa süreli, kendini sınırlayan veya günde 20 ve daha fazla dışkılamayla kolera benzeri olabilir. Gaitada mukus ve gizli kan olabilir ancak görünür kan nadirdir (21).

#### **2.4.3. Psödomembran olmadan gelişen *C.difficile* koliti:**

*C.difficile*'ye bağı ishal olgularının çoğu bu tiptir. Psödomembran olmadan gelişen *C.difficile* kolitinde bulantı, kusma, anoreksi, hipoalbuminemi, kolonda gizli kanama ve dehidratasyon olabilir. Bazı hastalarda psödomembransız kolit şiddetli ishal, kramp tarzında

karın ağrısı ve distansiyonla karakterize olabilir. Gaita çok sulu, mukoid, yeşil renkli ve pis kokuludur. Fizik muayenede alt kadranda hafif duyarlılık olabilir. Nadiren ekstra intestinal olarak septik artrit, bakteremi veya splenik apse olabilir. Sigmoidoskopide normal kolon mukozası veya hafif ödem ve rektumda hiperemi olabilir. Bazen non-spesifik diffüz veya yama tarzında eritematöz kolit olur. Belirgin kolit veya psödomembran formasyonu oluşmaz. Hastaların çoğunda antibiyotik kesildiğinde ishal de biter (3,21).

#### **2.4.4.Psödomembranöz Enterokolit (PME)**

Hastalık, ilk kez 1893 yılında Finney tarafından tarif edilmiştir. Mide tümörü nedeniyle ameliyat edilen bayan hastada, operasyonu takiben ilerleyici ishal başlamış; hasta 15 gün sonra ölmüş, yapılan otopside barsaklarda difterik membranlar görülmüştür. Bakteri, 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından izole edilmiş, Hambre 1943 yılında hayvan modellerindeki toksisiteye dikkat çekmiştir. 1960'lı yıllardan sonra antibakteriyel ajanların yaygın kullanımına bağlı olarak psödomembranöz enterokolit olgularının sayısında artma olmuş, 1974 yılında Tedesco hastalığın anatomisini, Green deney hayvanlarında toksinin etkisini, Hafız ise epidemiyolojisini incelemişlerdir. Psödomembranöz enterokolitli olgulardan alınan gaita örneklerinin doku kültürlerinde oluşturduğu sitopatik etki ise 1977'de gösterilmiştir (3).

Psödomembranöz enterokolitin klinik tablosu, psödomembranı olmayan *C.difficile* kolitine benzer fakat sıklıkla semptomları daha şiddetlidir. İshal, karında duyarlılık ve sistemik bulgularla karakterize bu formda, barsaklarda 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar bulunur. Plaklar, fibrin, mukus, nekrotik mukozal hücreler ve nötrofillerden oluşan bir yapı gösterir. *C.difficile* infeksiyonlarının %3-5'inde şiddetli psödomembranöz enterokolit gelişebilir. Mortalite oranı %65 gibi yüksek oranlardadır. Psödomembranöz enterokolitli hastaların çoğunda rektosigmoid bölge tutulur. Ancak %10 olguda proksimal kolon da tutulabilir ve sigmoidoskopide saptanamaz. Gaita mukuslu, sulu ve pis kokuludur. Kan bulunabilir. Şiddetli formların komplikasyonları, dehidratasyon, hipoalbuminemi, elektrolit bozukluğu, toksik megakolon, barsak perforasyonu ve ölümdür. Mortalite ve morbiditeyi önlemek için agresif terapötik girişim gereklidir (3,21).

#### **2.4.5.Fulminan kolit:**

*C.difficile* infeksiyonu olan hastaların %3'ünde fulminan kolit gelişir. Bu hastalar alt kadrana lokalize veya diffüz karın ağrısı, ishal ve distansiyondan yakınırlar. Bazı hastalarda yüksek ateş, titreme, taşikardi, letarji ve belirgin lökositoz olur. Genelde ishal belirgindir fakat ileus gelişen hastalarda minimal olabilir. Bu durum, infeksiyon paralitik ileusa neden olup gaita pasajını engellediğinde ortaya çıkar. Narkotik analjezik kullanan postoperatif hastalarda yaygındır. Yakın zamanda antibiyotik tedavisi almış başka türlü açıklanamayan ateşi,

lökositozu ve karın ağrısı gibi semptomları olan hastalarda ishal olmasa bile *C.difficile* infeksiyonundan kuvvetle şüphe edilmelidir. Bu hastalarda lökosit sayısı  $\geq 100,000$  hücre/mm<sup>3</sup> olacak şekilde lökomoid reaksiyon, şok, böbrek yetmezliği ve anazarka tarzı ödemle sonuçlanan ağır hipoalbuminemi görülebilir. Bu klinik özelliklerin hiçbiri *C.difficile* infeksiyonuna spesifik değildir ve enterik patojenlerin sebep olduğu ishal, intraabdominal sepsis, iskemik kolit, idiyopatik inflamatuvar barsak hastalıkları, laksatif kullanımı ve parenteral nütrisyon gibi pek çok durum benzer klinik semptomlara yol açabilir (21,45).

#### **2.4.6. Relaps**

*C.difficile* ishalinin ilk epizodu başarıyla tedavi edilen hastaların yaklaşık %15-25'inde relaps gelişir. Relaps genellikle vankomisin veya metronidazol tedavisinin kesilmesinden sonraki ortalama bir hafta içinde (3-21 gün) ishalin ve diğer semptomların tekrar görülmesiyle ortaya çıkar. Relapsların çoğu 10 günlük antibiyotik tedavisine yanıt verir fakat hastaların %3-5'inde 6'dan fazla relaps olur. Neden bazı insanların multiple semptomatik relapslara maruz kaldığı açık değildir. Bu hastalarda *C.difficile* toksinlerine karşı zayıf immün yanıt olduğuna dair ve *C.difficile* antikörlerinin bazı yaşlı kişilerde azaldığını gösteren kanıtlar vardır. Relapslar genellikle antibiyotik direnci ile ilişkili değildir. Çünkü relapslar metronidazol veya vankomisin ile tedaviye hala duyarlıdır. Relapsın çevreden kazanım sonucu gelişen reinfeksiyondan mı yoksa hastanın kendi barsak florasında kalan endojen mikroorganizmalar yüzünden mi olduğu açık değildir (30). Öte yandan metronidazol veya vankomisin ile tedavi mikroflorayı bozup *C.difficile* ile reinfeksiyona eğilimi artırıyor olabilir (21).

#### **2.5. Clostridium difficile İnfeksiyonlarında Tanı:**

*C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı, klinik ve laboratuvar bulgularına dayanarak konur. *C.difficile* ile ilişkili hastalıktan şüphelenilen olgularda, çeşitli kriterlerle tanımlanmış ishal ( $\geq 36$  saattir en az 6 kez sulu gaita veya  $\geq 48$  saat en az 8 kez şekilsiz gaita) gastrointestinal endoskopide görülen psödomembranlar, gaita örneklerinde toksin A veya B'nin gösterilmesi, ve başka bir sebeple açıklanamayan ishal (nadiren AIDS'de veya inflamatuvar barsak hastalıklarında gelişen ishal) varlığı tanıya yardımcıdır. Toksik *C.difficile*'nin kültürde üretilmesi ise kesin tanı kriteridir. Hemen hemen tüm hastalarda son 8 hafta içinde antimikrobiyal veya antineoplastik ajan kullanımı öyküsü vardır (46). Antiasitler, sitotoksik ajanlar ve gaita yumuşatıcı ajanlar ile laksatif alma öyküsü de *C.difficile* ile ilişkili ishali tetikleyebilir. Yine nazogastrik enstrümantasyon, lavman ve yoğun bakımda uygulanan diğer işlemlerin de *C.difficile* infeksiyonu için eğilimi artırdıkları göz önüne alınmalıdır (21). *C.difficile* ishalinden şüphe edildiğinde inceleme için alınan gaita örneği taze olmalıdır.

Nadiren (<%1), semptomatik bir hastada ishal olmaksızın ileus gelişebilir. Bu hastalarda tanı güçtür, uygun örnek şekilli gaitanın az bir miktarı alınarak veya ya rektumdan ya da endoskopi aracılığıyla silgiç ile elde edilir. Böyle olgularda, örnekten toksin bakılması ve *C.difficile* kültürünün yapılması için laboratuvarla iletişime geçilmesi gereklidir (46).

*C.difficile* infeksiyonlarının laboratuvar tanısındaki geleneksel yaklaşım, uygun örneklerden etkenin izolasyonu ve identifikasyonu ile hastalığa yol açan toksinlerin saptanması temeline dayanır. *C.difficile* ishalinden şüphe edildiğinde, gaita su geçirmez temiz bir kaba alınarak hemen laboratuvara gönderilmeli ve toksin yönünden incelenmelidir. Anaerobik kültür ve transport besiyeri organizmanın veya toksinin saptanmasını artırmaz. Gaita örnekleri hemen toksin için test edilmeli, test edilemiyorsa buzdolabı veya dondurucuya konmalıdır. *C.difficile* spor oluşturduğu için gaitadan yapılan kültür ısı değişikliklerinden etkilenmez. Bir hastadan üç örneğin çalışılması, toksin açısından pozitif test olasılığını %10 artırır. Fakat bu düşük olasılık, birçok örneğin rutin çalışılmasını maliyeti uygun bir tanısal yöntem olarak desteklemez (2,21,46).

Laboratuvar tanıda kullanılan yöntemler: (3)

1. Toksin A-B varlığı (Enzim immunoassay) (EIA)
2. Kültür
3. Hücresel sitotoksinite testi
4. Lateks aglütinasyon testi
5. Floresan antikor yöntemi
6. Moleküler yöntemler

### **2.5.1. Toksin A-B varlığı**

Sitotoksinlerin saptanmasında doku kültürlerinin dezavantajları nedeniyle daha başka testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla daha hızlı, kısmen ucuz ve özgülüğü yüksek olan ELISA testleri tercih edilmektedir. ELISA ile ancak 100-1000 pg toksin A veya B saptanabilmektedir (45). Bu nedenle %10-20 oranında bir yalancı negatiflik söz konusudur. Negatif sonuçtan sonra alınan ikinci üçüncü örnekler %5-10 oranında pozitif sonuç verebilmektedir. Bazı kökenlerin (%1-3) toksin A oluşturmadığı, sadece toksin B oluşturduğu tanıda dikkate alınmalıdır (14).

Ticari kitlerin bir kısmı sadece toksin A antijenini saptamaya yöneliktir. Toksin A molekülünün amino-terminal bölgesinde lokalize bir epitop ile reaksiyona giren bir monoklonal antikor kullanarak toksin A'yı saptar (21). *C.difficile* suşlarının %1-3'ü toksin A üretmediğinden dolayı toksin A ve B'yi birlikte saptayan kitler tercih edilir. Bunun yanı sıra

*C.difficile*'nin 10 farklı toksinotipi saptanmış olup (I-X) tip VIII ve X toksin A'ya spesifik testlerle saptanamaz. ELISA yöntemi ile üç gaita örneği incelenmesi tanı şansını sadece %5-10 artırırken, maliyeti oldukça yükseltir (46). Bu nedenle hastalığın tablosunu açıklayıcı başka sebep bulunamamasına rağmen, ishalin devam etmesi gibi durumlar dışında genelde tercih edilmez. Şekilli gaitalarda %10 dolayında yalancı pozitiflik gözlenebileceğinden sadece ishalleri hasta gaitalarında çalışılması önerilmektedir (10). Bu testlerin spesifiteleri yüksektir (%75-100) ancak sitotoksin testine göre sensitiviteyi düşüktür (%66-93) (21).

### 2.5.2. Kültür

*C.difficile* izolasyonunda, CCFA (cefoxitin-cycloserine fructose agar) seçici besiyeri olarak kullanılmaktadır. Gaita örneklerinin direkt olarak inoküle edildiği ilk CCFA'nın bileşiminde sikloserin (500 mg/lt), sefoksitin (16 mg/lt), fruktoz, nötral kırmızısı indikatörü ve yumurta sarısı vardır. Sikloserin ve sefoksitin konsantrasyonlarının çok yüksek olmasına bağlı olarak birçok *C.difficile* suşunun inhibe olduğunun anlaşılması üzerine bu antimikrobiyal ajanların konsantrasyonlarının yarı dozlarını içeren modifikasyonları yapılmıştır. CCEY (cycloserine-cefoxitine-egg yolk) agar gibi CCFA'nın modifikasyonları geliştirilerek kullanıma girmiştir. Sikloserin ve sefoksitin, besiyerini selektif hale getirir, pH indikatörü olarak nötral kırmızısı kullanılır, fruktozun ise ayırt edici özelliği vardır çünkü *C.difficile* bu şekeri fermente eder (10,47).

Gaita örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA'ya pasajlarının yapılması *C.difficile* izolasyon oranını artırmaktadır. *C.difficile* kolonileri ultraviyole (UV) ışığı altında (366 nm dalga boyunda) CCFA üzerinde sarı-yeşil floresans verir. P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asidlere bağlı olarak tipik at veya fil gaitası kokusu vardır. *C.difficile* kolonileri tipik olarak gri, opak, 24-48 saatte non-hemolitiklidir. Fakat bazı suşları alfa-hemoliz yapar. İnkübasyondan 48-72 saat sonra sporülasyona bağlı olarak merkezi beyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler gelişebilir. *C.difficile* bu besiyerinde spor oluşturmaz (3,10,15). Kökenlerin yaklaşık % 25 kadarı toksin yapmamaktadır; bu nedenle üretim sonrasında toksin bakılmayan hallerde tek başına kültürle hastalık tanısı için karar verilmemesi gerekir. Ayrıca kültürün sonuçları ancak 3-5 gün içinde alınmaktadır, bu nedenle rutin tanıda ağırlıklı yeri yoktur (14). Kültürde üreyen koloniler lateks aglütinasyon, gaz kromatografi veya biyokimyasal yöntemlerle idantifiye edilir (10).

*C.difficile* için kültür bazı durumlarda faydalıdır. Vankomisin ile tedavi edilen *C.difficile* ile ilişkili ishal olgularında gaitada toksin hızlı bir şekilde kaybolmaktadır fakat hastalar gaitalarıyla mikroorganizmayı atmaya devam etmektedirler. *C.difficile*'nin asemptomatik

taşıyıcılığı, *C.difficile* ile ilişkili ishal salgınlarının olduğu bölgelerde yaygındır. Kültür, epidemiyolojik çalışmalarda asemptomatik taşıyıcıları belirlemek için yararlıdır. Ayrıca kültür, nozokomiyal infeksiyonlar açısından serolojik testler ve moleküler tiplendirmede mikroorganizmanın elde edilmesi için gereklidir. *C.difficile* ile ilişkili ishal olgularının %30'undan fazlasında mikroorganizma gaita örneklerinden kültür ve toksin testi kombinasyonu ile tanımlanabilir (47).

### 2.5.3. Doku Kültürü Sitotoksikite Testi

Doku kültüründe toksin tayini ve nötralizasyonu (*C.difficile* veya *C.sordellii* antitoksinleri ile) işlemi günümüzde tanıda altın standarttır. Bu yöntemde, değişik hücre kültürleri üzerine gaita filtratının veya üretilmiş bakteri filtratının sitopatik etkisi araştırılır. Yöntemle 10 pikogram kadar sitotoksin saptanabilmektedir (14). Hep2 (human epithelial) hücreleri, CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri, insan embriyonik akciğer fibroblast (MRC 5, WI-38) hücreleri, insan amniyon hücreleri ve Afrika yeşil maymun böbreği (Vero) hücreleri gibi hücreler kullanılmaktadır. Bu amaçla, sıvı gaita örnekleri santrifüj 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 gaita örnekleri çalışmaya uygun olmadığından rutin işlemlerde en az on, hatta yüz kez dilüe edilmiş gaitalardan toksisite titreleri araştırılır. Nötralizan antikor (anti-*C.sordellii* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkar (10).

Doku kültürünün dezavantajı uzun sürede (2-3 gün) sonuç alınması, pahalı olması, standardizasyonun sağlanamamış olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve doğrulama için referans laboratuvarlarına gereksinimi olmasıdır. Bu yüzden pratik bir yöntem değildir. Her ne kadar altın standart kabul edilse de, toksin B'nin proteazlarla parçalanması sonucunda yalancı negatiflikler de görülebilmektedir. Doku sitotoksikite testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 98 ve %99'dur (10,45).

### 2.5.4. Lateks aglütinasyon testi:

Kültür veya sitotoksin saptanmasına alternatif olarak kullanılan basit ve hızlı bir testir. Önceleri testin toksin A'yı tespit ettiğine inanılmış, ancak yapılan araştırmalardan sonra toksijenik ve toksijenik olmayan *C.difficile*'lerin bir ürünü olan glutamat dehidrogenaz ile oluşturduğu gösterilmiştir. Testin diğer Clostridium türleri, *Peptostreptococcus anaerobius* ve *Bacteroides assaccharolyticus* ile çapraz reaksiyon verdiği gösterilmiş ve yalancı pozitif

sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir. Lateks aglütinasyon yöntemi uygulanacak gaita örneğinin dondurulmaması gerekmektedir. Diğer testlere göre duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeni ile yaygın kullanım alanı bulmamıştır. Sitotoksisite testleriyle karşılaştırıldığında duyarlılığı %71-92, özgüllüğü ise %80-93 arasındadır. Bu testin kullanımı, ne izolatın toksijenik olduğuna dair bilgiyi ne de epidemiyolojik çalışmalar için yararlı olabilecek suşun kendisini ortaya çıkarmaktadır (3,10,46).

#### **2.5.5. Floresan antikor yöntemi:**

Diğer Clostridium türleriyle çapraz reaksiyon verdiği için tek başına tanıda kullanılması önerilmemektedir (3).

#### **2.5.6. Moleküler yöntemler:**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), toksijenik *C.difficile*'yi saptamada kullanılmıştır. Toksin A veya B'nin gen bölgesine özel primer'ler kullanılmaktadır. Toksin A'nın, toksin B'nin ya da her ikisinin de gen bölgelerinin bir kısmının amplifikasyonu ile uygulanmaktadır (46). Oldukça duyarlı (%100) ve özgül (%96,7-100) bir yöntemdir. Fakat *C.difficile* kültürü gerektirmesi dezavantajdır. Bundan dolayı direkt gaitadan toksin saptamaya yönelik PCR yöntemi geliştirilmiştir. Fekal örneklerden toksin B'yi saptamaya yönelik "nested PCR" sitotoksin testiyle %99 uyumludur. Duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 96,3-100'dür. Uygulanması için uzman gerektirmesi, sitotoksin testine göre daha hızlı ve ucuz hale getirilememesi diğer dezavantajlarıdır (21).

Real-time polimeraz zincir reaksiyonu direk olarak gaitadan toksin genlerini saptamak için kullanılan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Hedeflenen genler, tcdB geni (toksin B üretimini düzenleyen gen) veya tcdC genidir (toksin A ve toksin B üretiminin kabul edilen negatif düzenleyicisi). tcdC genindeki baz çifti delesyonlarının, toksinin aşırı üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu delesyonlar da real-time PCR'la belirlenebilmektedir (48).

#### **2.5.8. Endoskopik tanı:**

Endoskopik inceleme sonuçları hafif ishali olan hastalarda normal olabilir veya orta derecede şiddetli olan olgularda non-spesifik kolit şeklindedir. Antibiyotikle ilişkili ishali olan hastalarda kolonda psödomembran bulgusu *C.difficile* koliti için patognomiktir. Yüzeyden kalkık, yeşilimsi 2-10 mm çapında normal mukoza ile çevrili lezyonlar tipiktir. Şiddetli olgularda lezyonlar birleşerek plaklar oluşturur (21). Sigmoidoskopi ya da kolonoskopiyle görüntüleme sırasında mukozanın sıklıkla eritematöz, ödemli ve nadiren kırılğan olduğu

gözlenir. Mikroskopik incelemede, iyi biçimlendirilmiş psödomembranın müsün, fibrin, polimorfonükleer lökositler ve dökülmüş epitel hücrelerinden oluştuğu görülmektedir. Psödomembranöz ve non-spesifik kolitin her ikisinde de rektal biyopsi örneğinin mikroskopisi, kolon epitelinin fokal nekrozunun yanı sıra lamina propria ve bazen submukozanın akut veya kronik inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonunu göstermektedir. Rektal biyopsiyle birlikte sigmoidoskopi sonuçları, antibiyotikle ilişkili ishalleri psödomembranöz kolit, non-spesifik kolit ve ishalin eşlik etmediği kolit olarak kategorize etmek için kullanılmıştır. Bazı hastalarda öncelikle ishal gelişmekte, bunu non-spesifik kolit izlemekte ve sonunda psödomembranöz kolit oluşmaktadır. Bu yüzden bu sınıflamada bir takım problemlerle karşılaşmıştır (12).

Endoskopinin en önemli dezavantajı duyarlılığının düşük olmasıdır. İshali olan, sitotoksin testi ve doku kültürü pozitif olan hastaların %49'unda psödomembranların görülmemesi, psödomembranöz kolitin hastalığın geç dönem bulgusu olmasına ve ilk tutulumun kolonun proksimal bölgelerinde olmasına bağlanabilir (21).

## **2.6. Clostridium difficile İnfeksiyonlarında Tedavi:**

Antibiyotikle ilişkili kolit veya ishalin tedavisinde ana yaklaşım, neden olan ilacın kesilmesidir. Psödomembranöz kolit olduğu kanıtlanmış olgularda semptomlar ve kolonik patolojik özellikler tedavinin kesilmesiyle bir-iki hafta içinde genellikle düzelmektedir. Vankomisin 7-10 günlük tedavide günde 4 kez 125-500 mg dozunda oral olarak verildiğinde *C.difficile*'nin tüm suşlarına karşı oldukça etkilidir. Semptomların oldukça hızlı iyileşmesini ve gaitadaki *C.difficile* toksininin kaybolmasını sağlar. Asemptomatik taşıyıcılar, *C.difficile* ile ilişkili hastalığın yeni nozokomiyal kaynağını oluşturmaktadır. *C.difficile*'nin yayılımını kontrol etmek için asemptomatik taşıyıcıları tedavi etme politikası denenmiştir. Tüm semptomatik ve asemptomatik taşıyıcılar vankomisinle tedavi edildikten sonra *C.difficile* ile ilişkili hastalığın sıklığında azalma olduğu gözlenmiştir (12,49).

Metronidazol, *C.difficile*'ye karşı oldukça etkilidir, fakat barsakta düşük düzeylere ulaşması kolit tedavisi için kullanımını sınırlandırmaktadır. İnflame barsak mukozası nedeniyle barsak lümenine salındığı veya barsaktan geçiş zamanının kısalması nedeniyle absorpsiyonunun azalmasının buna yol açtığı düşünülmektedir. Oral metronidazol, 7-14 gün boyunca, günde 4 kez 250 veya 500 mg dozunda *C.difficile* ile ilişkili hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (12,21,49). Oral tedaviyi tolere edemeyen hastalarda metronidazol intravenöz olarak kullanılabilir. İntravenöz verildiğinde ilaç safraya salınır ve inflamasyonlu kolon lümeninde *C.difficile* için etkin konsantrasyonlarda bulunur. Özellikle metronidazolün



oral kullanımıyla sistemik yan etkiler oluşabilir. Önemli sayılabilecek yan etkiler %1 hastada oluşur. Bulantı, kusma, metalik tat, uzamış tedavilerde periferik nöropati, alkol ile alındığında disülfiram benzeri reaksiyon bilinen yan etkileridir. Vankomisin ve metronidazolün *C.difficile* ile ilişkili hastalık için aynı derecede etkili olduğu gözlenmiştir. Fakat bu iki antibiyotiğin karşılaştırılabilir etkinliği ve metronidazolün düşük maliyetinden dolayı *C.difficile* ile ilişkili hastalığın başlangıcında metronidazol tedavi seçeneğidir. Vankomisin, daha ciddi olgular, gebeler ve metronidazolu tolere edemeyen hastalar için kullanılmaktadır (21,49).

Diğer tedavi seçenekleri olan basitrasın, teikoplanin ve fusidik asitin, metronidazol veya vankomisinle karşılaştırıldığında ek avantajları yoktur, bu ilaçlar metronidazol ve vankomisinden daha az etkilidir. Basitrasınle tedavi edilen hastalarda *C.difficile* taşıyıcılık oranının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Teikoplanin 2x100 mg, 10 günlük vankomisin tedavisi kadar etkili bulunmuştur (21,49). Antiperistaltik ajanlar tek başına veya spesifik tedavi ile birlikte kullanılmamalıdır. Bu ajanlar ishali azaltarak metronidazolün absorpsiyonunu artırır ve potansiyel olarak metronidazol tedavisinin başarısızlığına yol açar (46). Loperamid ve narkotik analjezikler kolondan toksinin klerensini geciktirir ve toksinin kolonu zedelemesini alevlendirir. (21). Kolestramin *C.difficile* toksinini bağlamakta ve teorik olarak tedavide etkili olabileceği umulmaktadır (12).

*C.difficile* ile ilişkili hastalık için araştırılan diğer stratejiler probiyotikler, bakteriyoterapi, adsorbanlar ve immunoterapidir. Probiyotiklerin bozulmayı takiben normal floranın restorasyonunu sağladığı, immün yanıtı uyardığı, patojenik toksinleri azaltan enzimlerin üretimini artırdığı kabul edilmektedir. *Lactobacillus species* ve *Saccharomyces boulardii*'nin antibiyotiklerle kombine verildiğinde antibiyotikle ilişkili ishal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Bazı klinik çalışmalar ve olgu sunuları, probiyotikleri rekürren *C.difficile* ile ilişkili hastalığın tedavisinde genellikle vankomisin veya metronidazolle kombine olarak incelemişlerdir. Adsorbanlar ise enterositlere bağlanıp hastalığa sebep olmadan önce kolon lümeninde *C.difficile* toksinlerini bağlamaktadır. İyon değiştiren eçineler, oligosakkaritler ve polimerlerin çeşitli tipleri adsorbanlara örnektir. Geçmişte yapılan çalışmalar konak immün yanıtının da *C.difficile* ile ilişkili hastalıkta önemli olduğunu bildirmişlerdir. Buna rağmen, immunoglobulin tedavisinin rolü randomize, kontrollü klinik çalışmalarda incelenmemiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda uygun kontrol gruplarının eksikliği, IgG tedavisinin düzenlenmesi, dozu ve süresi standardize edilmemiştir (49).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Mart 2009-Mayıs 2010 tarihleri arasında, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanımı hikayesi olan, antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen ve gaita örneğinin makroskopik incelemesinde yumuşak kıvamlı, sulu, kanlı ve/veya mukuslu örneği olan olgular çalışmaya alındı. Çalışma periyodu boyunca her hasta için cinsiyet, yaş, tanı, kullandığı antibiyotik ve süresi sorgulanarak kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen hastalarda ve alınan gaita örneklerinde şu özellikler arandı:

- 1) En az iki gün süren, günde üç kez veya daha fazla sayıda sulu ya da şekilsiz dışkılama olması
- 2) Semptomlar başlamadan 3 hafta öncesine kadar antimikrobiyal tedavi alınmış olması
- 3) Diğer bir ishal etkeninin saptanmamış olması
- 4) Antibiyotiğin kesilmesiyle semptomlarda düzelme görülmesi

Toplam 250 gaita örneğinde *C.difficile* toksin A-B varlığı araştırıldı. Toksin A-B pozitif bulunan örneklerden *C.difficile* kültürü yapılarak, bakterinin izolasyonu ve identifikasyonu sağlandı. Çalışmaya başlanmadan önce, antibiyotikle ilişkili ishal tanımı, örneğin uygunluğu ve *C.difficile* toksin A-B testi ile birlikte gaita mikroskopisi ve kültürünün de istenmesi gerektiğini bildiren bir bilgilendirme yazısı hazırlandı ve bütün kliniklere iletildi. Ayrıca, özellikle yoğun bakımlar olmak üzere, pek çok klinikte örneklerin alınması ile primer olarak ilgilenen asistan doktorlarla birebir görüşülerek bu konuda bilgi verildi.

Çalışmamız 09102028 nolu projeye Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş, fakültemiz Etik kurulunun 09.12.2009 tarih ve 2009/068 sayılı kararı ile onay almıştır.

**3.1. Örneklerin makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmesi:** Laboratuvara ulaşan örnekler ilk önce makroskopik inceleme yapıldı. Yumuşak kıvamlı, sulu ya da kanlı, mukuslu gaita örnekleri çalışmaya dahil edildi. Şekilli gaita örnekleri ise hastanın klinik yakınması olması durumunda çalışmaya alındı. Direk mikroskopik incelemede ise fizyolojik tuzlu su ile lam-lamel arası preparatlar hazırlandı. Eritrosit, lökosit varlığı ve parazit yönünden değerlendirildi. Ayrıca direkt incelemede yoğun maya hücreleri varlığı ve/veya psödohip oluşumu da incelendi. Tüm örneklerin, EMB agar, SS agar ve Selenit F besiyerine ekimi yapıldı. 37°C'de 24-48 saat aerop ortamda inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmalar konvansiyonel yöntemlerle idantifiye edilerek *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*

ve diğ er enterik bakteriler açısından araştırıldı. Böylece parazitik ve bakteriyel gastroenterit etkenleri ekarte edilmiş oldu.

### **3.2. *C.difficile* toksin A-B varlığının araştırılması:**

Gaita rnekleri, hava almayan kaplar ile taşınıp, alışılıncaya kadar 2-8°C’de muhafaza edildi. Örnekler alındıktan sonra en fazla 4 gün içerisinde çalışıldı. Bu süre içerisinde test edilmeyecek örnekler -20 C ve altındaki sıcaklıklarda saklandı. Üretici firmanın talimatlarına göre ELISA yöntemiyle “ImmunoCard Toxin A-B” (Meridian Diagnostics, *C.difficile* toksin A+B, Meridian Bioscience, Inc) *C.difficile* toksin A-B varlığı araştırıldı.

Çalışmaya başlamadan önce tüm test kartları, solüsyonları ve hasta örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Tüm bu bileşenler, oda sıcaklığında maksimum 60 dakika bekletildi. Çalışma şu şekilde yapıldı:

1. Her bir hasta rneği için birer test tüpü alındı.
2. Her bir test tüpüne 4’er damla (200’er l) rnek diluenti ilave edildi.
3. Her bir test tüpüne 3’er damla (150’şer l) enzim konjugantı ilave edildi.
4. Akışkan gaita örnekleri için; örnekler temiz bir transfer pipeti yardımıyla, pipet üzerinde işaretlenmiş ilk çizgiye kadar örnek alındı (25 l).
5. Pipete aktarılan gaita rneği bir tp içerisinde daha önce hazırlanan diluent konjugant karışımına eklendi. Pipet yardımıyla karıştırılıp 10 dakika vortekslendi. Katı gaita örnekleri için; tahta bir aktarma çubuğu yardımıyla küçük bir parça (2 mm kadar) gaita alınıp bir tp içerisinde daha önce hazırlanan diluent konjugant karışımına eklendi. Aplikatör ubuk yardımıyla karıştırılıp, 10 dakika vortekslendi. Her bir seyreltilmiş örnek 5+1 dakika 20-26°C’de inkübe edildi.
6. Her bir gaita rneği için 1 adet immnokard test kaseti kullanıldı. Test kasetleri ambalajlarından çıkartıldı ve ilgili hasta bilgileri kaset üzerine yazıldı.
7. Kullanmadan önce inkübe edilen seyreltilmiş örnekler 10 saniye vortekslendi.
8. Her bir seyreltilmiş örnekten, test kaseti üzerindeki her iki porta 150’şer l aktarıldı. Aktarım transfer pipeti ile gerçekleştirildi. Pipetler üzerinde yer alan ikinci çizgi 150 l’yi belirtmektedir.
9. Her bir test kaseti 5+1 dakika 20-26°C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda her reaksiyon portu tamamıyla ıslak görünümdedir.
10. Yıkama solüsyonu şişesi dik tutularak, test kaseti üzerindeki her iki porta 3’er damla yıkama solüsyonu aktarıldı.
11. Test kaseti yıkama solüsyonunu emincede substrat solüsyon şişesi dik tutularak, her iki porta 3’er damla substrat eklendi.

12. Her bir test kaseti 5 dakika 20-26°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 30 saniye içerisinde görsel olarak sonuçlar değerlendirildi.

13. Tüm kit bileşenleri kullanım sonrasında derhal buzdolabına kaldırıldı.

### Sonuçların Değerlendirilmesi:

**Pozitif test sonucu:** Kontrol ve test kuyularında mavi renk oluşumu

**Negatif test sonucu:** Kontrol kuyusunda mavi renk oluşumu ve test kuyusunda renk oluşmaması durumu.



**Resim I:** Pozitif test sonucu



**Resim II:** Negatif test sonucu

### 3.3. *C.difficile*'nin izolasyonu ve identifikasyonu:

*C.difficile* izolasyonunda, George ve arkadaşlarının geliştirdiği CCFA (cefoksitin-cycloserine fructose agar) seçici besiyeri olarak kullanılmaktadır (10). Gaita örneklerinin direkt olarak inoküle edildiği ilk CCFA'nın bileşiminde sikloserin (500 mg/lt), sefoksitin (16 g/lt), fruktoz, nötral kırmızısı indikatörü ve yumurta sarısı vardır. Sikloserin ve sefoksitin konsantrasyonlarının çok yüksek olmasına bağlı olarak birçok *C.difficile* suşunun inhibe olduğunun anlaşılması üzerine bu antimikrobiyal ajanların konsantrasyonlarının yarı dozlarını içeren modifikasyonları yapılmıştır. CCEY (cycloserine-cefoxitine-egg yolk) agar gibi CCFA'nın modifikasyonları geliştirilerek kullanıma girmiştir (10).

Buzdolabında +4°C’de bekletilen CCFA besiyerleri (Cycloserine-cefoxitin fructose agar) (*C.difficile* agar, BioMerieux, Fransa) ekim için kullanıldı. ELISA yöntemiyle

“ImmunoCard Toxin A-B” (Meridian Diagnostics, *C.difficile* toksin A+B, Meridian Bioscience, Inc) toksin A-B pozitif olan örnekler direkt olarak özeyle CCFA besiyerine (*C.difficile* agar, BioMerieux, Fransa) ekildi. Çalışmamızda standart suş olarak Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK) 06012, American Type Culture Collection (ATCC) 9689 *C.difficile* suşu kullanılmıştır.

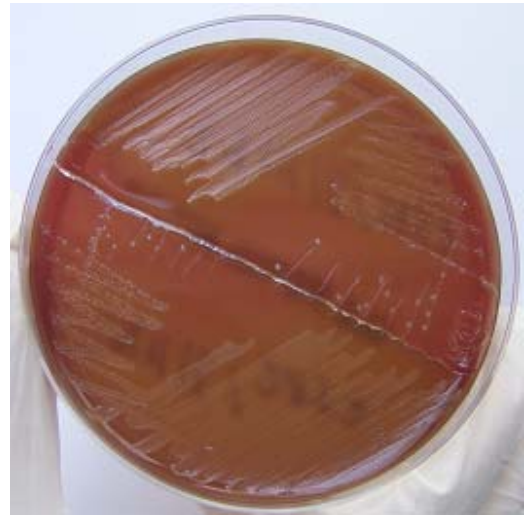
Ekimleri yapılan örnekler hemen jara (Anaero-Jar-Oxoid) yerleştirilerek anaerop ortam sağlandı ve 37°C’de 48 saat inkübe edildi. Anaerop inkübasyon amacıyla 2,5 lt’lik anaerop jar (Anaero-Jar-Oxoid) kullanıldı. Jarın içine ekim yapılan besiyerleri yerleştirildi. Anaerop ortamın oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla resazurin emdirilmiş kağıt stripler (Oxoid, Hampshire, England) dışardan gözlenebilecek şekilde jarın içine yerleştirildi. Anaerop atmosferi sağlamak amacıyla, 2,5 lt’lik jarda anaerop ortam oluşturabilecek özellikte olan Microbiology Anaerocult A (Merck, Darmstand, Germany) paketleri kullanıldı. Bu paketlerin üzerine 35 ml su ilave edildi ve jarın içine hemen yerleştirilip vakit kaybetmeden jarın ağzı kapatıldı.

Jarda ısı artışı olması, jar içinde buhar oluşması, dinlemekle kabarcıkların oluşmasına bağlı çıtırtı seslerinin duyulması ve resazurin emdirilmiş kağıt stribin renginin pembeden beyaza dönüşmesi durumunda anaerop ortamın oluştuğu kanaatine varıldı. Eğer stripte renk değişikliği 1-2 saat içinde oluşmamışsa yukarıda sayılan işlemler tekrarlandı. 37 °C’de 48 saat inkübasyon yapıldı. Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi resim III’de gösterilmiştir.

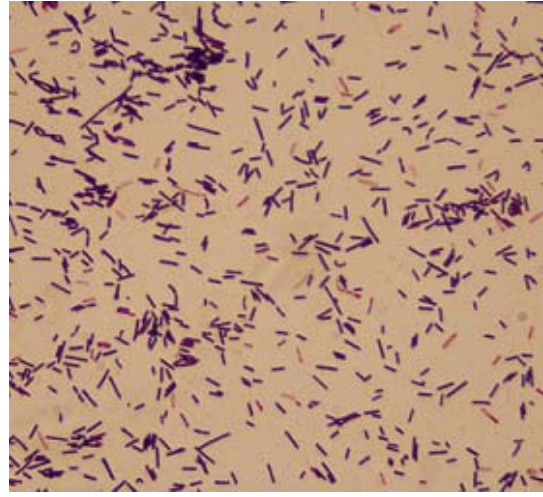
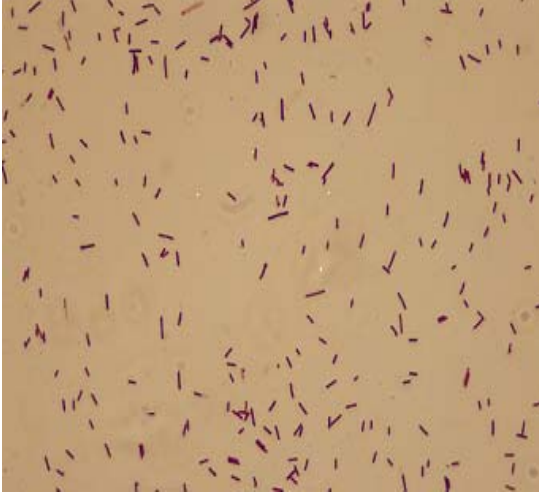
Etüvde 37 °C’de 48 saat inkübasyondan sonra jarın ağzı açıldı. CCFA besiyeri, *C.difficile*’ye özgü 2-5 mm çapında, kenarları yuvarlak, sarı-yeşilimsi kolonilerin varlığı açısından değerlendirildi. *C.difficile* kolonileri ultraviyole (UV) ışığı altında (360 nm dalga boyunda) CCFA üzerinde sarı-yeşil fluoresans verdi. İzole edilen *C.difficile* kolonilerinin CCFA besiyerindeki görünümü resim IV’te gösterilmiştir. Bu kolonilerden Gram boyama yapılarak 100’lük büyütmede immersiyon yağı ile yapılan incelemede gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basiller resim V’te gösterilmiştir.



**Resim III.** Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi: Solda anaerop ortam oluşmuş, sağda anaerop ortam oluşmamıştır. (çalışmamızdan).



**Resim IV:** İzole edilen *C.difficile* kolonilerinin CCFA besiyerindeki görünümü (çalışmamızdan).



**Resim V:** 100'lük büyütmede yapılan incelemede gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basillerin görünümü (çalışmamızdan).

### **3.4. İzole Edilen Anaerop Bakterinin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Tanımlanması İçin Yapılan İşlemler**

API 20A (Marcy-I, Etoile, France) paneli kullanılarak bakterinin çeşitli biyokimyasallara etkisi araştırıldı.

#### **3.4.1. API 20A (Marcy-I, Etoile, France) paneli ile identifikasyon:**

Bu panel bakterilerin aşağıdaki özelliklerini belirleyerek identifikasyonunu sağlamaktadır.

- İndol oluşturması ve üreaz aktivitesi
- Glikoz, mannitol, laktoz, sakkaroz, maltoz, salisin, ksiloz, arabinoz, gliserol, sellobiyoz, mannoz, melezitoz, rafinoz, sorbitol, ramnoz, trehalozdan asit oluşturmaları.
- Jelatin ve eskülini hidrolize etmeleri
- Katalaz aktivitesi.

Genç ve saf kolonilerden özeyle alınarak API 20 A kitinin özel besiyerine (API 20 A medium) inoküle edildi, homojenizasyon sağlandı ve Mc Farland 3 numaralı tüpünün bulanıklığında olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu steril pipetler ile mikro tüp denilen küçük bölmelerin hepsinin yarısını dolduracak şekilde (jelatin kuyucuğunun tamamı dolacak şekilde) dağıtıldı. İndol testi için ayrılan kuyucuğun yarısına kadar bakteri kültürü diğer yarısına ise sıvı parafin konuldu. 35-37°C de anaerop şartlarda 24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmeye alındı. Değerlendirme işlemi üretici firma tarafından hazırlanan API 20A kitapçığındaki değerlendirme tablosuna göre yapıldı.





**Resim VI.** İzole edilen mikroorganizmanın biyokimyasallara etkisinin API 20A ile değerlendirilmesi. (çalışmamızdan).

Klasik tanı testleriyle API 20A testinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilerek bakterilerin identifikasyonu yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya katılan 250 hastanın 142'si (%56,8) erkek, 108'i (%43,2) kadındır. Hastaların yaş ortalaması: 26,13 ±26,84'dir (kadın:28,03±27,19 ve erkek:24,68±26,57). Toplam 250 gaita örneğinin 10 (%4)'unda toksin A-B pozitif olarak saptandı. Gaita örneğinde toksin A-B pozitif bulunan 10 hastanın 8'i (%80) erkek, 2'si (%20) kadındır. Erkeklerde toksin varlığı %5,6 kadınlarda toksin varlığı ise %1,9 olarak bulundu. Araştırmaya katılan hastaların cinsiyetlerine göre toksin varlığının dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuçlar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo I: Araştırmaya katılan hastaların cinsiyetlerine göre toksin varlığının dağılımı:**

Cinsiyet	Toksın (+)		Toksın (-)		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Kadın</b>	2	1,9	106	98,1	108	100
<b>Erkek</b>	8	5,6	134	94,4	142	100
<b>Toplam</b>	10	4	240	96	250	100

\*Yüzde satır yüzdesidir, \* Pearson Chi-square değeri= 2.285, \* Serbestlik derecesi= 1, \*  $p=0.131$

Gaita örnekleri pediatri, dahiliye, cerrahi ve yoğun bakım kliniklerinden gönderilmiştir. Çalışmaya alınan örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı tablo 2'de gösterilmiştir.



**Tablo II: Çalışmaya alınan örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı:**

Klinik	Örnek	
	Sayı	%
<b>Pediyatrik Klinikler*</b>	130	52,0
<b>Dahili Klinikler**</b>	71	28,4
<b>Yoğun Bakım Üniteleri***</b>	41	16,4
<b>Cerrahi Klinikler****</b>	8	3,2
<b>Toplam</b>	250	100

\* Pediyatrik Klinikler: İnfeksiyon Hastalıkları, Hematoloji ve Onkoloji, Allerji ve İmmünoloji, Nöroloji, Göğüs Hastalıkları, Kardiyoloji, Endokrinoloji ve Metabolizma, Nefroloji, Gastroenteroloji

\*\* Dahili Klinikler: İnfeksiyon Hastalıkları, Hematoloji ve Onkoloji, Nöroloji, Göğüs Hastalıkları, Kardiyoloji, Endokrinoloji ve Metabolizma, Nefroloji, Gastroenteroloji, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon

\*\*\* Yoğun Bakım Üniteleri: Reanimasyon, Dahiliye, Kardiyoloji, Göğüs Hastalıkları, Çocuk, Kalp Damar ve Göğüs cerrahisi ve Acil Yoğun Bakım.

\*\*\*\* Cerrahi Klinikler: Genel Cerrahi, Kalp Damar ve Göğüs cerrahisi, Kadın hastalıkları ve Doğum, Üroloji ve Plastik ve Rekonstrüktif cerrahi.

Toksin A-B pozitif bulunan örneklerden kültür ekimleri yapıldı, 10 örnekten de *C.difficile* izole edildi ve tek koloni pasajları yapılarak bakterinin saf kültürü elde edildi. Fakat bu süreç içerisinde bakterinin oksijene maruziyeti sonucunda 10 suşun 4'ünde pasajlarda üreme görülmedi.

Toksin A-B pozitif bulunan 10 hastanın 4'ü 0-4, 1'i 10-24, 1'i 25-44, 1'i 45-64 yaş grubunda ve 3 hasta da 65 yaş üstündedir. Araştırmaya katılan hastaların yaş gruplarına göre toksin varlığının dağılımı tablo 3'de gösterilmiştir. Sonuçlar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo III: Araştırmaya katılan hastaların yaş gruplarına göre toksin varlığının dağılımı:**

Yaş Grubu	Toksın (+)		Toksın (-)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
0-4	4	4,3	89	95,7	93
5-9	0	0	29	100	100
10-24	1	5,0	19	95	20
25-44	1	3,8	25	96,2	26
45-64	1	2	49	98	50
65 ve üstü	3	9,4	29	90,6	32
<b>Toplam</b>	10	4	240	96	250

\*Yüzde satır yüzdesidir, \* Pearson Chi-square değeri= 4.212, \* Serbestlik derecesi= 5, \* p=0.519

Toksın A-B pozitif bulunan 10 hastanın 3'ü immün yetmezlik, 2'si malignite, 1'i pnömoni, 1'i gastroenterit, 1'i sepsis, 1'i menenjit, 1'i *C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı almıştır. Toksin pozitif çıkan hastaların tanılarına göre dağılımı tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo IV: Toksin pozitif bulunan hastaların tanılarına göre dağılımı:**

Tanı	Toksın pozitif çıkan hasta sayısı	
	Sayı	%
<b>İmmün yetmezlik</b>	3	30
<b>Malignite</b>	2	20
<b>Pnömoni</b>	1	10
<b>Gastroenterit</b>	1	10
<b>Sepsis</b>	1	10
<b>Menenjit</b>	1	10
<b><i>C.difficile</i> ile ilişkili hastalık</b>	1	10
<b>Toplam</b>	10	100

Toksın A-B pozitif bulunan 10 hastanın kullandıkları antibiyotikler ve kullanım süreleri şöyledir: 3 hasta seftriakson 14 gün, 2 hasta sefaperazon sulbaktam 10 gün, 1 hasta trimetoprim-sulfametoksazol/seftriakson/metronidazol/flukonazol 10 gün, 1 hasta teiloplanin/ amikasin/ meropenem 7 gün, 1 hasta sefotaksim 6 gün, 1 hasta netilmisin /tigesiklin 5 gün, 1 hasta seftriakson/oseltamivir 5 gün kullanmıştır. Toksin pozitif çıkan hastaların kullandığı antibiyotikler ve kullanım süreleri tablo 5'de gösterilmiştir.

**Tablo V: Toksin pozitif bulunan hastaların kullandıkları antibiyotikler ve kullanım süreleri:**

Antibiyotik	Toksin (+)		Kullanım süreleri
	Sayı	%	Gün
Seftriakson	3	30	14
Sefaperazon sulbaktam	2	20	10
TMP/SXT*/seftriakson/metronidazol/flukonazol	1	10	10
Teiloplanin/amikasin/meropenem	1	10	7
Sefotaksim	1	10	6
Netilmisin /tigesiklin	1	10	5
Seftriakson/ oseltamivir	1	10	5

\* TMP/SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

Toksin A-B pozitif bulunan 10 hastaya ait gaita örneklerinin 4'ü (%40) pediatrik kliniklerden, 3'ü (%30) dahili kliniklerden, 3'ü (%30) yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiştir. Kliniklere göre toksin pozitifliğinin dağılımı tablo 6'de gösterilmiştir.

**Tablo VI: Kliniklere göre toksin pozitifliğinin dağılımı:**

Klinik	Toksin (+)		Toksin (-)		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Pedriatrik Klinikler	4	3,1	126	96,9	130	100
Dahili Klinikler	3	4,2	68	95,8	71	100
Yoğun Bakım Üniteleri	3	7,3	38	92,7	41	100
Cerrahi Klinikler	0	0	8	100	8	100
<i>Toplam</i>	10	4,0	240	96,0	250	100

\*Yüzde satır yüzdesidir, \* Pearson Chi-square değeri= 1.806, \* Serbestlik derecesi=3, \* p=0.614

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*C.difficile*, infeksiyöz nozokomiyal ishallerde en sık tanımlanan ajandır ve antibiyotik kullanımının *C.difficile* ile ilişkili ishallerde en önemli risk faktörü olduğuna inanılmaktadır (50,51). Son zamanlarda *C.difficile* infeksiyonlarının insidansı ve önemi artmaktadır. Sadece toksinojenik suşlar toksin A ve/veya B üretimine bağlı olarak hastalığa neden olmaktadır. Salgınların gittikçe artan önemi, yüksek nüks oranı ve ciddi mortalitesi, 2003 yılında Kanada, ABD ve Avrupa'da yeni bir hipervirulan *C.difficile* suşunun saptanmasıyla bir kez daha ortaya çıkmıştır. Bu salgınların hipervirulan *C.difficile* 027 suşu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Hollanda'da 2005-2008 yılları arasında %3'ten %13'e artan sıklıkta yeni bir hipervirulan suş 078 tanımlanmıştır. Risk grupları, gebe kadınlar ve çocuklardan oluşmaktadır. Antimikrobiyal tedavi almanın da *C.difficile* infeksiyonlarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (48,50,52).

Ergen ve ark'nın ülkemizde yaptıkları çalışmada, nozokomiyal ishallerin insidansı, risk faktörleri ve antibiyotikle ilişkili ishalde *C.difficile*'nin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Nozokomiyal ishal sıklığı 5/1000 hasta yatışı ve 0,6/1000 hastanede kalış günü olarak bulunmuştur. 1 yıllık periyotta Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesine başvuran 18 yaş üstü ve hastaneye yatışından en az 3 gün sonra ishal gelişen kişiler çalışmaya alınmıştır. *C.difficile* toksin A-B varlığı ELISA yöntemiyle araştırılmış ve gaita örneklerinin *C.difficile* selektif agara (CDSA, Becton Dickinson) ekimi ve kültürü yapılarak, *C.difficile*'nin izolasyonu sağlanmıştır. 44 hasta nozokomiyal ishal tanısı almış ve nozokomiyal ishali olan hastaların 19'unda (%43) etken *C.difficile* olarak saptanmıştır. PCR ribotipleme yöntemiyle 4 suşun ribotip 002 ve 1 suşun da ribotip 012 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak antibiyotik kullanımının nozokomiyal ishal için önemli bir predispozan faktör olduğu ve nozokomiyal ishal ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık sıklığının Avrupa'daki oranlardan farklı olmadığı gösterilmiştir (50). Çalışmamızda ise hastanede yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanımı hikayesi olan ve antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen 250 hastanın gaita örneği incelenmiş, 10 (%4) hastada ELISA yöntemiyle *C.difficile* toksin A-B pozitifliği saptanmış ve toksin pozitif gaita örneklerinin CCFA besiyerlerine (*C.difficile* agar, BioMerieux, Fransa) ekimi yapılarak *C.difficile* izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda hasta sayısının sınırlı olması ve yatan hastalarda antibiyotikle ilişkili ishal gelişir gelişmez ampirik tedaviye başlanmasından dolayı toksin pozitifliği oranı daha düşük bulunmuştur. Toksin A-B pozitif bulunan 10 gaita örneğinden kültür yöntemiyle *C.difficile* izole edilmiş, tek koloni pasajları yapılarak bakterinin saf kültürü elde edilmiştir. Anaerob ortam gerektiren kültür yönteminin oldukça

kompleks oluşu ve prosedür gereği hata kaynaklarının fazla olabileceğinden dolayı üreyen suşların bir kısmında seri pasajlarda üreme görülmemiştir. İzole edilen *C.difficile* suşlarının anaerop kültür işleminin güçlüğü nedeniyle ilerleyen pasajlarda kaybedilmesi PCR ribotipleme yapma olanağını ortadan kaldırmıştır. Fakat çalışmamız ülkemizde yapılan benzer çalışmalar gibi bölgemizde nozokomiyal ishal sıklığını ve antibiyotikle ilişkili ishalde *C.difficile*'nin rolünün belirlenmesi için yapılan ilk çalışmadır.

Ürdün'de 2006-2007 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 3 günden daha uzun süre hastanede yatan ve antibiyotik kullanımı öyküsü olan 40 yaş üstü hastalardan 300 gaita örneği toplanmış, *C.difficile* varlığı ve toksinleri, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılmıştır. Hastaların %13,7'sinde gaita kültürlerinden *C.difficile* izole edilmiş, izolatların %73'ünün *tcdA* ve/veya *tcdB* toksin genlerini taşıdığı saptanmıştır. Sonuç olarak 3 günden daha uzun süre hastanede yatan, antibiyotik kullanımı öyküsü olan ve ishal gelişen hastalar arasında toksinojenik *C.difficile* izolatlarının oranı %23,8 olarak bulunmuştur (53). Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak selektif besiyerinde üreyen *C.difficile* suşlarında PCR yöntemiyle oligonükleotid primer sekansları kullanılarak *tcdA* ve *tcdB* gibi toksin genleri saptanmıştır. Çalışmamızda ise toksin varlığı ELISA yöntemiyle araştırılmış olup, üreyen suşlarda PCR yöntemiyle toksin genlerine bakılmamıştır. Fakat farklı yöntemler kullanılmış olsa da her iki çalışmada da hastanede yatan ve uzun süre antibiyotik kullanımı öyküsü olan hastalarda *C.difficile* ile ilişkili ishal gelişebileceği ortaya konmuştur.

Polonya'da yapılan bir çalışmada, 6 ay-8 yaş arası 18 HIV pozitif çocukta *C.difficile* ve toksinlerinin varlığı araştırılmıştır. Çocuklar daha önceden antimikrobiyal tedavi almışlardır. Gaita örnekleri toksin A ve B'yi saptayan antijen testi ve kültür ile değerlendirilmiştir. HIV ile infekte 18 çocuğun 3'ünde (%17) toksin A ve B pozitifdir. *C.difficile* toksin pozitif gaita örneklerinin üçünden izole edilmiştir. *C.difficile* pozitif 3 çocukta ağır ishal gelişmiştir. Kalan 15 gaita örneği ise toksin açısından negatiftir ve bu örneklerden *C.difficile* izole edilmemiştir (54). Çalışmamızda 10 yaş altı 4 hastada *C.difficile* toksin A ve B pozitif bulunmuş, bu hastaların 3'ünün immün yetmezlik tanısıyla izlendiği, 1'inin de menenjit nedeniyle antibiyotik tedavisi aldığı belirlenmiştir. İmmün yetmezlik tanısı alan hastalar, gelişen infeksiyonların tedavisi ve gelişebilecek infeksiyonların profilaksisi açısından kombine antibiyotik, antifungal ve antiviral tedavi almışlardır. Bu hastalarda 5 günden uzun süre antibiyotik kullanımı sonucunda ishal gelişmiş olması, immün yetmezlikle birlikte kombine antibiyotik, antifungal ve antiviral tedavinin *C.difficile* ile ilişkili ishale predispozan bir faktör olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda toksin A-B pozitif bulunan 10 hastadan 4'ünün 0-4 yaş grubunda, 3'ünün 65 yaş üstünde olması, 10 yaş altı ve 65 yaş üstü

popülasyonda hastanede yatış ile birlikte uzun süre kombine ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının *C.difficile* ile ilişkili hastalık açısından risk faktörü olabileceğini ortaya koymuştur.

Martirosian ve ark. (55) yaptıkları çalışmada *C.difficile* ile ilişkili ishal, kolit veya psödomembranöz kolit şüphesi olan 155 hastanın gaita örneğini *C.difficile* açısından araştırmışlardır. Kültür yöntemiyle 55 hastada *C.difficile* izole edilmiş, hızlı ticari enzim immünassay testlerle in vivo (fokal örneklerde) ve in vitro (izole suşlarda) toksin A varlığı değerlendirilmiştir. 22 gaita örneğinde toksin A pozitif bulunmuştur. İzole edilen suşların 17'sinde toksin A pozitif saptanmıştır. Çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak gaita örneklerinde toksin A-B varlığı, her iki toksini birlikte saptamaya yönelik "ImmunoCard Toxin A-B" (Meridian Diagnostics, *C.difficile* toksin A+B, Meridian Bioscience, Inc) ELISA yöntemiyle araştırılmış ve *C.difficile* toksin A-B pozitifliği %4 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda *C.difficile* infeksiyonu tanısı için her iki toksini birlikte saptamaya yönelik kitlerle çalışılmasının daha duyarlı ve etkin bir yöntem olabileceği belirlenmiştir.

Aygün ve ark (38)'nin çalışmasında antibiyotikle ilişkili ishal tanısı almış, hastanede yatmayan olgularda *C.difficile* toksin A-B varlığı ELISA yöntemiyle araştırılmış ve 70 olgunun 3'ünde (%4,3) pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda antibiyotikle ilişkili ishal düşünülen yatan hastalarda oran %4'tür. Her iki çalışmada da toksin pozitifliği oranının düşük olmasının nedeni olarak, *C.difficile* infeksiyonunun daha erken tanı konulup, ilgili antibiyotiğin kesilmesi ve ampirik metronidazol tedavisi başlanmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Boral ve ark. (19) yaptıkları çalışmada, *C.difficile* infeksiyonu ön tanısı ile 1998-2000 yılları arasında gönderilen 360 hastanın gaita örneğinde sadece toksin A'yı saptayan kitle, 2000-2002 yılları arasında gönderilen 400 gaita örneğinde ise, toksin A ve B'yi saptayan kiti kullanarak toksin varlığını araştırmışlardır. İlk çalışma döneminde toksin A varlığı hastaların %4,7'sinde, ikinci çalışma döneminde ise toksin A-B varlığı hastaların %12'sinde saptanmıştır. Sonuç olarak *C.difficile* infeksiyonlarının tanısında her iki toksini birlikte saptamaya yönelik kitlerin kullanılmasının uygun olacağını göstermişlerdir. Çalışmamızda ise toksin A-B varlığı, Boral ve ark'nın 2000-2002 yılları arasında kullandıkları gibi her iki toksini birlikte saptamaya yönelik kit kullanılarak ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Toksin pozitiflik oranları, bizim çalışmamızın sadece yatan hastaları kapsadığı göz önünde bulundurulacak olursa Boral ve ark'nın ayaktan hastaları da içine alan çalışmasının oranları ile paralellik göstermektedir.

Garcia ve ark.(56) 9 aylık periyotta yaptıkları kesitsel çalışmada 14 yaş üstü, hastanede yatan ve nozokomiyal ishal gelişen hastalarda *C.difficile* ve ELISA yöntemiyle toksin A-B varlığını araştırmışlardır. Çalışmaya katılan 4624 hastadan 156'sında (%3,7) nozokomiyal ishal gelişmiş, bu olguların 55'i (%35,2) *C.difficile* toksin A-B pozitifliğiyle birlikte *C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı almıştır. Lübnan'da yapılan başka bir çalışmada, hastanede yatan ve antibiyotik kullanımının ardından ishal gelişen 480 hastada sitotoksisite testleriyle toksin varlığı araştırılmış, bu hastaların 67,2'sinde (%14) pozitif sonuç elde edilmiştir (57). Çalışmamızda da kullanılan yöntem Garcia ve ark'nın çalışmasındakiyle benzer özellikler göstermektedir ve bununla birlikte gaita örneklerinde ELISA ile toksin A-B saptanması *C.difficile*'nin neden olduğu infeksiyonların belirlenmesinde pratik ve duyarlı bir yöntem olsa da olanağı olan laboratuvarların bu iki yöntemi birlikte uygulaması tanı duyarlılığını artıracaktır.

Garcia ve ark.'nın çalışmasında vurgulanan bir diğer nokta *C.difficile* ile infekte bir hasta ile aynı odayı paylaşmanın *C.difficile*'nin yayılımında belirgin bir etkisinin olmasıdır. Mikroorganizmanın yatak, banyo ve klozetlerde uzun süre canlı kalabileceği göz önünde bulundurulduğunda, hastane ortamının *C.difficile* infeksiyonlarının yayılımında önemli rol oynadığı açıktır. Ayrıca *C.difficile* sağlık çalışanlarının ellerinden de izole edilmiştir (56). Hastanemizde hasta odalarında çoklu yatakların bulunması, tuvaletlerin ortak kullanılması ve hijyen kurallarına gereken özenin gösterilmemesi infeksiyonun uzun süre hastanede yatan hastalar arasında yayılmasına neden olmaktadır.

Garey ve ark'nın Amerika'da üçüncü basamak bir hastanede yaptıkları çalışmada, hastanede yatan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda *C.difficile* infeksiyonu gelişimi için risk faktörleri araştırılmış ve 2 yıllık periyotta 54226 hastanın 392'sinde (%0,72) *C.difficile* toksini pozitif bulunmuştur. İleri yaş, hemodiyaliz, yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalış ve bu süre içinde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı *C.difficile* ile ilişkili hastalık açısından önemli risk faktörleri olarak gösterilmiştir (58). Çalışmamızda ise hastanede yatan, 10 yaş altı ve 65 yaş üstü, uzun süre kombine ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalar *C.difficile* ile ilişkili hastalık açısından risk grubu olarak belirlenmiştir.

Wüst ve ark.(59) İsviçre'de yaptıkları çalışmada, bir cerrahi servisinde *C.difficile* ile ilişkili ishal salgını boyunca 15 hastanın gaitasından *C.difficile* izole etmiş, moleküler yöntemleri kullanarak en az 12 izolatin fenotipinin aynı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca hastane ortamında, *C.difficile*'ye bağlı ishal ve psödomembranoz kolit olgularının nozokomiyal orijinli olabileceğini ve hastadan hastaya yayılabileceğini bildirmişlerdir.

*C.difficile*'nin yayılımında çevresel kontaminasyon önemli bir faktördür ve hastanın şiddetli ishali varsa özellikle vurgulanmaktadır. İnfekte bir hastanın gaitasının gramı başına yaklaşık  $10^5$ 'den fazla *C.difficile* sporu attığı ve sporların aylarca kontamine yüzeylerde canlı kalabileceği, ayrıca bu sporların pek çok dezenfektana da dirençli olduğu bildirilmiştir (60). Sağlık çalışanlarının elleri *C.difficile*'nin yayılımına daha çok neden olsa da kontamine yüzeylere temas da geçişe katkıda bulunmaktadır (61). Çalışmamızda 10 yaş altı grupta 4 hastada toksin A-B pozitifliği saptanması, bu hastaların gaita kültürlerinde *C.difficile*'nin izole edilmesi ve 4 hastanın da Çocuk İnfeksiyon Hastalıkları kliniğinde yatıyor olması *C.difficile*'ye bağlı ishal olgularının nozokomiyal orijinli olabileceğini ve hastadan hastaya yayılabileceğini göstermektedir.

Ovaran ve ark. (62) yaptıkları çalışmada, antibiyotik tedavisi gören ve antibiyotik kullanımından sonra ishal şikayeti başlayan 97 hastadan alınan gaita örneklerinde *C.difficile* varlığını CCFA'da kültür yöntemiyle, *C.difficile* toksin A varlığını ELISA yöntemiyle, *C.difficile* ortak antijeni varlığını ise lateks aglütinasyon yöntemiyle araştırmışlardır. 97 örneğin 19'unda (%19,6) *C.difficile* ortak antijeni varlığı gösterilmiş, 15'inde (%15,5) kültür pozitifliği bulunmuştur. Örneklerden 37'sinde CCFA kültür, lateks aglütinasyon ve ELISA yöntemleri aynı anda uygulanmıştır. 37 örnekten 6'sında (%16,2) toksin A pozitifliği, 8'inde (%21,6) ortak antijen pozitifliği, 5'inde (%13,5) ise kültür pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızda kullanılan yöntemler Ovaran ve ark.'nın çalışmasıyla benzerlik göstermekle birlikte lateks aglütinasyonu ile *C.difficile* ortak antijeni varlığının araştırılması toksik olmayan suşlar ve gaitadaki diğer anaerob bakterilerle pozitif reaksiyon verebilmesi nedeniyle tercih edilmemiştir.

Rüssmann ve ark.'nın çalışmasında, antibiyotikle ilişkili ishal tanısı almış 383 hastanın gaita örnekleri 3 farklı ELISA yöntemiyle ve ek olarak selektif besiyerinde *C.difficile* kültür yöntemiyle araştırılmış, 60 (%15,7) örnekte toksin A ve/veya toksin B pozitif bulunmuştur. Her iki toksini de saptayabilme özelliği olan bu testlerden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her üç testin de doğrudan gaita örneklerinde *C.difficile* toksin A ve B'yi saptamada elverişli olduğu bildirilmiştir (63).

Avrupa'da sekiz ülkede yapılan bir çalışmada *C.difficile* infeksiyonlarının tanısı için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemler araştırılmış, 212 laboratuvar dan %87,7'si rutin olarak *C.difficile* tanı testlerini kullandıklarını bildirmişlerdir. Kullanılan yöntemlerin %93'ünün toksin araştırma, %55'inin kültür ve %5,9'unun ise glutamat dehidrogenaz saptanması testi olduğu görülmüştür. Toksin araştıran laboratuvarlarda enzim immünosay ve sitotoksisite testlerinin kullanım oranı sırayla %79 ve % 17,3 olarak



bulunmuştur. Bu çalışmada, *C.difficile* infeksiyonlarının tanısında ülkeler arasında yöntem ve strateji farklılıkları, tanı için net bir klavuzun olmamasına ve hekimlerin *C.difficile*'ye gereken önemi vermemesine bağlanmıştır. Tanı için kesin bir rehberin olması, *C.difficile* ile ilişkili infeksiyon insidansı ve epidemiyolojisinin bir ülkeden diğerine veya bir hastaneden başka bir hastaneye doğru bir şekilde karşılaştırılmasını yapmak için birinci basamağı oluşturacaktır (64).

Norveç'te yapılan bir çalışmada iki farklı hastanede *C.difficile* ile ilişkili hastalık insidansı, bu duruma yol açan antibiyotikler ve infeksiyon kontrol önlemleri karşılaştırılmış, antibiyotik kullanımının azaltılmasının *C.difficile* ile ilişkili ishal oranını azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Bu amaç için nokta prevalans çalışmaları yapılmış, *C.difficile* ile ilişkili hastalık açısından en önemli risk faktörünün antibiyotiklere maruziyet olduğu ve sefalosporinler ve klindamisin gibi belirli antibiyotiklerin kullanımının azaltılmasının *C.difficile* ile ilişkili ishal oranını azalttığı bildirilmiştir (65). Çalışmamızda ise toksin A-B pozitif bulunan ve gaita kültürlerinden *C.difficile* izole edilen hastalar arasında üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Hastanelerde *C.difficile* ile ilişkili hastalık oranını azaltmak için akılcı antibiyotik kullanımı ve infeksiyon kontrol önlemlerine odaklanılması gereklidir.

Roveh ve ark.'nın yaptıkları retrospektif bir çalışmada, hastaneden kazanılmış *C.difficile* toksin pozitif ishallerle ilişkili risk faktörleri araştırılmış, yaş, cinsiyet, antibiyotik kullanımı, hastanede veya bakımevlerinde kalma gibi değişkenler incelenmiştir. Hastaneden kazanılmış toksin pozitif ishalleri kadınların oranının erkeklerden %10 daha yüksek olduğu saptanmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir (66). Çalışmamızda ise erkeklerde toksin varlığı %5,6, kadınlarda toksin varlığı ise %1,9 olarak bulunmuş olup bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Roveh ve ark.'nın çalışmasında, 65 yaş üstü popülasyonda *C.difficile* ile ilişkili hastalık sıklığı genç popülasyona göre daha fazla bulunmuş ve kolon içeriğinin *C.difficile* üremesini genç insanlarda yaşlılara göre daha etkin bir şekilde inhibe ettiği iddia edilmiştir (66). Çalışmamızda da toksin pozitif 10 hastanın 3'ü 65 yaş üstündedir. Bu durumun ileri yaşa bağlı konak savunmasının azalması, altta yatan hastalıklar, uzun süre hastanede yatış ve komplike tedavilerle ilişkili olabileceği öngörülmüştür. Roveh ve ark.'nın çalışmasında 3. kuşak sefalosporinlerin, piperasillin-tazobaktam veya karbapenemlere göre *C.difficile* ile ilişkili hastalığa daha çok neden olduğu saptanmıştır. Bu bulgu bizim çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir.

Uzun yıllar boyunca *C.difficile*'ye bağlı infeksiyonların sadece yetişkinleri etkileyen bir hastalık olduğuna, çocuklar için problem oluşturmayacağına inanılmıştır. Fakat son

zamanlarda yapılan çalışmalar daha önce belirtilenin aksine *C.difficile* ile ilişkili hastalığın çocuklarda daha sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. 5 günlükten 17 yaşa kadar olan çocuklarda hastalık rapor edilmiştir. Gastrointestinal yoldaki normal mikrofloranın bozulması (antibiyotiklerle ilişkili veya ilişkisiz), yaş, immün yanıt, diyet, altta yatan hastalıklar, eşlik eden infeksiyonlar ve malignite risk faktörleri olarak belirlenmiştir (67). Çalışmamızda 3'ü immün yetmezlik tanısıyla izlenen, 1'i de menenjit nedeniyle antibiyotik tedavisi alan 10 yaş altı 4 hastada *C.difficile* toksin A ve B pozitif bulunmuş, gaita kültürlerinden *C.difficile* izole edilmiştir. Bu sonuçlara göre malignitelerin immün yetmezliğe sebep olabileceği, bundan dolayı kemoterapi alan ve eşlik eden infeksiyonlar için antimikrobiyal tedavi alan hastalarda *C.difficile* toksinine bağlı ishal gelişebileceği ortaya konmuştur. Bu çocuklarda sıklıkla tedavi amaçlı 3. kuşak sefalosporinlerle birlikte immün yetmezliğe sekonder gelişebilecek fırsatçı infeksiyonların profilaksisi için trimetoprim-sulfametoksazol gibi antibiyotiklerin, flukonazol gibi antifungallerin ve oseltamivir gibi antivirallerin kullanıldığı gözlenmiştir.

Bazı klinik çalışmalar, *C.difficile* infeksiyon oranlarıyla florokinolon kullanımı arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte bu çalışmaların çoğu, özellikle sefalosporinler ve makrolidler gibi antimikrobiyal sınıflarını *C.difficile* infeksiyonlarına neden olabilecek risk faktörleri olarak belirlemişlerdir. Makrolid grubu antibiyotikler hastane ortamında hemen hemen hiç tek başlarına kullanılmamaktadır ve sefalosporinler ve makrolidler büyük olasılıkla kombine kullanılmaktadır (68). Çalışmamızda toksin pozitif hastalar arasında en sık kullanılan antibiyotığın 3. kuşak sefalosporinler olduğu bunu meropenem, amikasin, teikoplanin, netilmisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklerin tedavi veya profilaktik amaçlarla çeşitli antifungal ve antivirallerle kombinasyonlarının izlediği saptanmıştır. Toksin pozitif hastalar arasında florokinolon kullanımına rastlanmamıştır.

Arjantin'de yapılan bir çalışmada 104 gaita örneği, toksin varlığı açısından gaita toksin assay ve/veya toksijenik kültür yöntemleriyle çalışılmış, 40 (%38,5) örnekte pozitif, 64 (%61,5) örnekte ise negatif sonuç alınmıştır. 40 örneğin 26'sında (%65) her iki yöntemle pozitif sonuç elde edilmiştir. 11 örnekte (%27,5) toksin assay negatif fakat kültürde üreme olmuş, 1 (%2,5) örnekte de toksin assay pozitif, kültürde üreme olmamıştır. Bu çalışmada *C.difficile* ile ilişkili hastalığın hastanelerde önemli bir sağlık problemi olduğu, epidemiyolojisini değerlendirmek ve yayılımını önlemek için sıkı kontrol önlemleri alınması gerektiği bildirilmiştir (69).

Weiss ve ark. (70) Kanada'da yaptıkları çalışmada, 2002-2004 yılları arasında yeni bir *C.difficile* klonunun yaptığı büyük boyuttaki salgının bazı antibiyotik gruplarının aşırı kullanımıyla ilişkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Quebec'teki 5 enstitüde antibiyotik

tüketim paternleri incelenmiş olup bunların 3'ü salgından etkilenmiş, 2'si etkilenmemiştir. Çalışmanın sonucunda kullanılan antibiyotiğin tipi ve kullanım miktarıyla enstitünün seviyesi ve salgının büyüklüğü arasında bir korelasyonun olmadığı görülmüştür. Enstitülerdeki hematoloji kliniklerinin tek yataklı odalardan oluştuğu, infeksiyon kontrol önlemlerinin sıkı bir şekilde uygulandığı ve sporlarla çevresel kontaminasyonun minimal olduğu bundan dolayı hastaların kolonizasyon riskinin düşük olduğu bildirilmiştir. Bu, sıkı infeksiyon kontrol önlemlerinin yeni bir klonun yayılımında bariyer görevi yaptığını göstermektedir. Çalışmamızda toksin pozitif hastalarda, karbapenemler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin hem tek başlarına hem de diğer antibiyotiklerle kombine olarak kullanılması, bundan dolayı floranın baskılanması, çok yataklı odalarda çevresel kontaminasyon oranının yüksek olması, hastadan hastaya yayılım ve infeksiyon kontrol önlemlerine gerektiği kadar uyulmaması *C.difficile* ile ilişkili hastalık gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Changela ve ark. yaptıkları vaka kontrol çalışmasında *C.difficile* ile ilişkili ishal gelişiminde antibiyotik kullanımı ve bazı hastaların ko-morbidite riskleri değerlendirilmiştir. Belli bir süre içerisinde hastanede yatan ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık geliştiren hastalar aynı periyotta hastanede yatan ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı almamış kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Demografik özellikler, hastane odaları, ko-morbid durumlar, antibiyotik kullanımı ve mortalite oranı ile ilgili bilgi toplanmıştır. Her iki grupta da cinsiyet ve yaş benzerdir. Ko-morbid durumlar, malignite ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarını içeren vaka grubu ile anlamlı bir korelasyon göstermiştir. Vaka grubunda en sık kullanılan antibiyotikler, levofloksasin, intravenöz vankomisin, klindamisin ve piperasilin-tazobaktam'dır. Mortalite oranı vaka grubunda daha yüksektir (71). Çalışmamızda yaş, cinsiyet gibi durumların *C.difficile* ile ilişkili hastalık gelişiminde anlamlı bir faktör olmadığı bunun yanı sıra altta yatan hastalık ve buna bağlı kullanılan geniş spektrumlu ve kombine antibiyotiklerin risk faktörü olabileceği belirlenmiştir. 3. kuşak sefalosporinler, toksin pozitif hastalar arasında en sık kullanılan antibiyotiktir, ayrıca teikoplanin, amikasin, meropenem, netilmisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklerin intravenöz olarak tek başlarına veya gereken durumlarda çeşitli antiviral ve antifungallerle kombine şekillerinin kullanımı da *C.difficile*'ye bağlı ishal olgularında sık rastlanmıştır.

*C.difficile* ile ilişkili ishali olan hastalar başlangıçta toplum içinde semptom geliştirebilirler ve hastaneye yatıştan sonra tanı alabilirler. Amerika'da şu anda ulusal sürveyans sistemi ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık için standardize edilmiş olgu tanımı yoktur, hastalığın insidansı ve epidemiyolojisi ile ilgili temel veriler de sınırlıdır. Price ve ark. (72) Amerika'da yaptıkları çalışmada, üçüncü basamak bir hastanede 48 saat ve daha uzun süre

hastanede yatıştan sonra nozokomiyal *C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı alan olgularla, hastanede yatıştan 48 saat içerisinde tanı alan olguları karşılaştırıp *C.difficile* ile ilişkili hastalığın insidansını ve epidemiyolojisini belirlemişlerdir. Sonuç olarak *C.difficile* ile ilişkili hastalığın değişen epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi için sürveyans sistemi ve hastanede yatış süresini de kapsayan standardize edilmiş bir olgu tanımı oluşturulması gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Almanya'da 2007 yılında 12 aylık bir periyotta 34 hastanede 2856 hastayı kapsayan bir çalışma yapılmıştır. Olguların %73'ünün nozokomiyal olduğu ve %8,4'ünün de ciddi olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Hastaneler arasında nozokomiyal olguların ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık insidansının geniş bir yelpazede görüldüğü ve bunun lokal diagnostik prosedürler ve infeksiyon kontrol önlemlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabileceği belirlenmiştir (73). Ülkemizde de *C.difficile* ile ilişkili hastalığın insidansı ve epidemiyolojisini bildiren oldukça az çalışma vardır. Çalışmamız Konya bölgesinde bu konuyla ilgili olarak yapılan ilk çalışmadır. *C.difficile* infeksiyonlarının önemi, risk faktörleri, erken tanı olanakları ve korunma yöntemleri açısından klinisyenlere faydalı olacaktır.

Geçmişteki çalışmalar yenidoğanlarda *C.difficile*'nin asemptomatik kolonizasyon oranını yüksek olarak belirlemişlerdir ve bu çalışmalara göre çocuklarda ishal geliştiğinde *C.difficile* olası etyolojik ajan olarak düşünülmemiştir. Günümüzde, dünya çapında pediatrik morbidite and mortalitede ishal ve akut gastroenteritlerin önemi bildirilmiş ve çocuklarda *C.difficile* ile ilişkili hastalık epidemiyolojisini içeren çalışmalar yapılmıştır. Bugün daha önce belirtilenin aksine *C.difficile* çocuklarda önemli bir etyolojik ajan olarak değerlendirilmektedir (74). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler hastanemizde *C.difficile* infeksiyonlarının pediatrik yaş grubunda yetişkinlere oranla daha yüksek insidansa sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra 65 yaş üstü erişkinler de *C.difficile* infeksiyonları açısından oldukça yüksek risk altındadır. Bu popülasyondaki artmış riskin nedeni olası multiple komorbid durumlar kadar konak savunması ve yaşla ilişkili olarak değişen fekal floraya da bağlıdır (75). Çalışmamızda toksin A-B pozitif bulunan 10 hastanın 3'ünün 65 yaş üstünde olması *C.difficile* ile ilişkili ishal sıklığının pediatrik yaş grubu arasında yaygın olduğu kadar geriatric yaş grubunda da yaygın olabileceğini göstermektedir. Starrs ve ark. (76) da özellikle yaşlı popülasyonda *C.difficile* ile ilişkili ishale hastanelerde gittikçe artan bir yük olduğu kanısına varmışlardır. Sefotaksim gibi 3. kuşak sefalosporinlerin diğer yaygın kullanılan antibiyotiklerle karşılaştırıldığında *C.difficile* ile ilişkili ishale daha çok predispoze olduğunu saptamışlardır. Renal yetmezlik, gastrik asit süpresyonu ve laksatif kullanımı gibi diğer faktörler de riski artırabilmektedir. Hastalığı önlemek için bu popülasyonda dikkatli

antibiyotik kullanımı ve infeksiyon kontrol önlemlerine gereken önemin verilmesi *C.difficile*'nin çevresel kontaminasyona bağlı yayılımı ve lokal salgınları azaltacaktır.

*C.difficile* ile ilişkili hastalıkta diğer bir risk faktörü de abdominal cerrahidir. Postoperatif *C.difficile* ile ilişkili hastalık oranları, üzerinde çalışılan cerrahi hasta popülasyonuna ve yapılan operasyonun tipine göre %0,2 ile %8 arasında değişmektedir. Southern ve ark. (77) yaptıkları çalışmada postoperatif *C.difficile* ile ilişkili hastalık gelişme riskinin preoperatif antibiyotik ve proton pompa inhibitörü kullanımı, daha önce hastanede yatış, düşük albumin düzeyi ile arttığını bulmuşlar ve özellikle 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, florokinolonlar, klindamisin ve imipenem/meropenem gibi antibiyotikler ve postoperatif *C.difficile* ile ilişkili hastalık arasında güçlü bir ilişki olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda cerrahi kliniklerde yatan, preoperatif antibiyotik kullanan ve *C.difficile* ile ilişkili hastalık düşünülerek gaita örneği gönderilen 8 hastanın hiç birinde toksin A-B pozitifliği saptanmamıştır. Bundan dolayı hastanemizde *C.difficile* ile ilişkili hastalığın çoğunlukla daha uzun süreli antibiyotik tedavilerinin yapıldığı ve hastaların ko-morbid faktörlere bağlı olarak daha uzun süre izlendiği dahili ve pediatrik kliniklerde cerrahi kliniklerine göre daha yaygın olduğu söylenebilir.

Polonya'da yapılan bir çalışmada acil serviste yatan hastalar arasında *C.difficile* infeksiyonlarının sıklığı araştırılmış, 56 gaita örneğinin 18'inden *C.difficile* izole edilmiş, ELISA yöntemiyle bunların 11'inin toksin A-B pozitif *C.difficile* suşu olduğu ve *C.difficile* pozitif hastaların amoksisilin/klavulanat, sefalosporinler ve aminoglikozidler ile tedavi edildiği saptanmıştır. Çalışmanın ileri aşamalarında moleküler yöntemlerle suşların fenotipik ve genotipik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre *C.difficile*'nin potansiyel kaynağı olan acil servisteki hastaların hastanenin diğer servislerine devredilmeden önce *C.difficile* açısından da araştırılmaları gerektiği önemle belirtilmiştir (78).

Türkiye'de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, toksin pozitiflik oranları tablo VII'de gösterilmiştir.

Prospektif surveyans çalışmalarında asemptomatik hastanede yatan hastalar arasında *C.difficile*'nin hastaneden kazanılma oranı % 18-21 olup, bu hastaların çoğu klinik olarak hasta olmamaktadır. *C.difficile*'nin hastaneden kazanılma oranı hastanede yatış süresi ile doğru orantılıdır ve bu oran bir çalışmada hafta başına yaklaşık olarak %8 olarak gösterilmiştir. Nozokomiyal *C.difficile* infeksiyonlarını kontrol etmek ve önlemek için uygulanan infeksiyon kontrol önlemleri başlıca *C.difficile*'nin yayılımını önlemek ve yayıldığı takdirde klinik hastalığın oluşumunu önlemeyi kapsamaktadır.

**Tablo VII:** Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda toksin pozitiflik oranları

Araştırmacılar	Yıl	Yer	Toplam örnek sayısı	Toksın (+) örnek	
				Sayı	%
Ovaran ve ark. (62)	1993-4	İstanbul, GATA	37	6	16,2
Martirosian ve ark. (55)	1999	Polonya	155	22	14,1
Aygün ve ark. (38)	2000	İstanbul, Cerrahpaşa Tıp.	70	3	4,3
Legaria ve ark. (69)	2000-1	Arjantin	104	40	38,5
Boral ve ark. (19)	2000-2	İstanbul, İstanbul Tıp.	400	48	12
Martirosian ve ark. (78)	2001-2	Polonya	56	11	19,7
Martirosian ve ark. (54)	2002	Polonya	18	3	17
Ergen ve ark. (50)	2004-5	Bursa, Uludağ Üniv.	44	19	43
Garcia ve ark. (56)	2005-6	Peru	156	55	35,2
Garey ve ark. (58)	2005-7	Amerika	54226	392	0,72
Rüssmann ve ark. (63)	2006	Almanya	383	60	15,7
Çalışmamız	2009-10	Konya, Selçuk Üniv.	250	10	4

Bariyer önlemleri, eldiven giyme, el yıkama, çevresel dezenfeksiyon, elektronik rektal termometrelerin hastadan hastaya uygulanırken değiştirilmesi, asemptomatik *C.difficile* taşıyıcılarının vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilmeleri gibi önlemlerdir. Bu önlemler arasında sadece personelin eldiven giymesi ve elektronik rektal termometrelerin hastadan hastaya uygulanırken değiştirilmesinin *C.difficile* ile ilişkili hastalık oranlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (79). Mc Donald ve ark. (80) hastanelerde *C.difficile* infeksiyonlarının yayılımını önlemek için temas önlemleri alınması gerektiğini belirtmişlerdir. Bunlar, eldiven giyme, *C.difficile* ile ilişkili ishali olan hastaların izole edilmeleri, tek kullanımlık gereçlerin uygulanması veya farklı hastalar arasında kullanılacaksa dezenfekte edilmesi ve *C.difficile* sporlarını ortadan kaldıran çevresel temizliktir. Ayrıca klinisyenlerin de hastanelerde *C.difficile* infeksiyonlarının yayılımının önlenmesine katkıda bulunmaları gerekmektedir. Çünkü antimikrobiyal kullanımı tek başına en önemli risk faktörüdür ve akılcı

antimikrobiyal kullanımı *C.difficile* infeksiyonlarının kontrolünde klinisyenlerin başlıca sorumluluğudur.

*C.difficile* sporları yüzeylerde uzun süre canlılığını koruduğu için hastaneler ve bakım evleri infeksiyonun başlıca kaynağını oluşturmaktadırlar. Geçiş sıklıkla kontamine yüzeylere temas eden sağlık personelinin elleri yoluyla olmaktadır. Hastanelerde *C.difficile* yayılımını azaltmak için mikroorganizmanın çevreden eliminasyonunu sağlayan uygun temizlik prosedürleri gerekmektedir. Hacek ve ark. (81) 2005 yılında San Diego'daki 3 hastanede *C.difficile* gaita testi pozitif hastalardaki artışa bağlı olarak *C.difficile* ile ilişkili hastalığı önlemek ve kontrol altına almak için infeksiyon kontrol önlemlerini yeniden gözden geçirmişlerdir. Buna bağlı olarak *C.difficile* ile kontamine hastane odalarının temizliğinde dilüe sodyum hipoklorid kullanımının nozokomiyal *C.difficile* infeksiyonu oranını azaltmada önemli ve devamlı bir etki yaptığını ortaya koymuşlardır.

Kanada'da geçmişte bildirilen *C.difficile* ile ilişkili hastalık salgınları *C.difficile* infeksiyonlarının profilini değiştirmiştir. *C.difficile* infeksiyonlarının gittikçe artan insidansı ve infekte hastaların değişen profiliyle karşılaşılması üzerine, Mc Farland ve ark. yaptıkları çalışmada *C.difficile* ile ilişkili hastalığın epidemiyolojisi ve tedavisiyle ilgili güncel kavramları yeniden değerlendirmişler ve infeksiyon kontrol önlemlerini artıran öneriler gündeme getirmişlerdir. Buna göre hastanelerde *C.difficile* ile ilişkili hastalığın kontrolü 5 stratejik duruma bağlıdır: gözetim programları, yayılımın engellenmesi, *C.difficile* sporlarına maruziyeti en aza indirme, akılcı antibiyotik kullanımı ve etkin tedavi (82). Hastanemizde de nozokomiyal *C.difficile* infeksiyonlarının önlenmesi için sağlık personeline konuyla ilgili eğitim verilmesi, eldiven kullanımı gibi bariyer önlemlerinin uygulanması, asemptomatik *C.difficile* taşıyıcılarının tedavi edilmesi ve ortak kullanılan gereçlerin hastadan hastaya uygulanırken değiştirilmesi ve hijyene dikkat edilmesi gerekmektedir. Hastanelerde, antibiyotik kullandıktan sonra ishal gelişen hastalarda diğer infeksiyon etkenlerinin ekarte edilmesi ve *C.difficile*'nin erken tanı ve tedavisinin sağlanması için klinisyenlerin bu etkenden şüphelenmesi, tanı algoritmini bilmesi ve laboratuvarla iyi bir diyalogun sağlanması gerekmektedir.

Nozokomiyal *C.difficile* infeksiyonları sağlık sistemi açısından oldukça yüksek maliyet ile ilişkilidir. Vonberg ve ark. (36) 2006 yılında Almanya'da bir üçüncü basamak hastanede yaptıkları vaka kontrol çalışmasında *C.difficile* ile ilişkili hastalığın hastaneye maliyetini araştırmışlar, hasta başına maliyetin ortalama 33,840 avro olduğunu bulmuşlardır. Spencer ve ark (83)'a göre ise *C.difficile* infeksiyonlarının maliyetiyle ilgili elde edilen veriler yeterince açık olmamakla birlikte bir tahmine göre ortalama büyüklükte bir hastanede her yıl 100

olgunun yaklaşık olarak 400,000 £ ve 2100 iş gücü kaybına neden olduğu öne sürülmüştür. Her iki çalışmada da klinisyenlerin hastalığın maliyetinin farkında olmaları gerektiği ve uygun infeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının hastalığın yayılımını azaltacağı vurgulanmıştır. Sonuç olarak;

1. Türkiye’de ishal olgularında bilinen etyolojik ajanların yanı sıra *C.difficile*’nin de dikkatle araştırılması gerekmektedir.
2. Çalışmamızda hastanede yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanımı hikayesi olan ve antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen 250 hastanın 10’unda (%4) *C.difficile* toksin A-B pozitifliği saptanmıştır. Böylece hastanemizde *C.difficile* ile ilişkili hastalığın varlığı gösterilmiş olup, epidemiyolojisi ve risk faktörleri değerlendirilmiş, nozokomiyal yayılımını önlemek için yapılması gerekenler ortaya konmuştur.
3. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, 10 yaş altı ve 65 yaş üstü popülasyonda hastanede yatış ile birlikte uzun süre kombine ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı *C.difficile* ile ilişkili hastalık açısından önemli bir risk faktörüdür.
4. Üçüncü kuşak sefalosporinler, toksin pozitif hastalar arasında en sık kullanılan antibiyotiktir. Meropenem, amikasin, teikoplanin, netilmisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklerin tedavi veya profilaktik amaçlarla çeşitli antifungal ve antivirallerle kombinasyonlarının kullanımı da *C.difficile*’ye bağlı ishal olgularında diğer bir risk faktörü olarak belirlenmiştir.
5. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu mikroorganizmayı saptayan tetkiklerin rutin tanı testleri arasında yer almaları gereklidir.
6. Antibiyotikle ilişkili ishal düşünülen olgularda gaita örneklerinde ilk önce direk mikroskopi yöntemiyle parazitik infeksiyon etkenleri, rutin gaita kültürleriyle diğer bakteriyel infeksiyon etkenleri ekarte edilmelidir. Ardından toksijeniteyi belirlemek için ELISA toksin A-B testi yapılmalı, testin pozitif çıktığı durumlarda erken tedavi ve izolasyon için kliniğe haber verilmelidir.
7. Toksin pozitif örnekler selektif besiyeri olan CCFA besiyerine ekilmeli anaerop şartlarda inkübe edilmelidir.
8. *C.difficile* ile ilişkili hastalık hastanelerde önemli bir sağlık problemidir ve bu infeksiyonun epidemiyolojisini değerlendirmek ve yayılımını önlemek için sıkı kontrol önlemleri alınması gerekmektedir.
9. Hastanelerde *C.difficile* ile ilişkili hastalık oranını azaltmak için klinisyenlerin başlıca sorumluluğu akılcı antibiyotik kullanımı ve infeksiyon kontrol önlemlerine gereken önemin verilmesidir.



## 6. ÖZET

**Amaç:** Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hastanesinde yatan, antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen hastalarda *C.difficile* varlığı araştırılarak, risk faktörlerinin ve epidemiyolojisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Mart 2009-Mayıs 2010 tarihleri arasında, çeşitli kliniklerde yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanan, antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen 250 hastanın gaita örneği makroskopik ve mikroskopik olarak incelendi. ELISA yöntemiyle *C.difficile* toksin A-B varlığı araştırıldı ve pozitif bulunan örnekler CCFA besiyerine ekildi. Ekimleri yapılan örnekler hemen jara yerleştirilerek anaerop ortam sağlandı ve 37°C’de 48 saat inkübe edildi. CCFA besiyeri, *C.difficile*’ye özgü 2-5 mm çapında, kenarları yuvarlak, sarı-yeşilimsi kolonilerin varlığı açısından değerlendirildi. Bu kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basiller görüldü. API 20A paneli kullanılarak bakterinin biyokimyasal özellikleri araştırılarak tanı konuldu.

**Bulgular:** Toplam 250 gaita örneğinin 10 (%4)’unda toksin A-B pozitif olarak saptandı. Bakterilerin oksijene maruziyeti sonucunda 10 suşun 4’ünde üreme görülmedi. Pozitif bulunan 10 hastanın 8’i (%80) erkek, 2’si (%20) kadındır. Bu hastalara ait gaita örneklerinin 4’ü (%40) pediatrik kliniklerden, 3’ü (%30) dahili kliniklerden, 3’ü (%30) yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiştir. Toksin A-B pozitif bulunan 10 hastanın 4’ü 0-4, 1’i 10-24, 1’i 25-44, 1’i 45-64 yaş grubunda ve 3 hasta da 65 yaş üstündedir. Pozitif bulunan hastalardan 3’ü immün yetmezlik, 2’si malignite, 1’i pnömoni, 1’i gastroenterit, 1’i sepsis, 1’i menenjit, 1’i *C.difficile* ile ilişkili hastalık tanısı almıştır. Bu hastaların en sık kullandığı antibiyotiğin 3. kuşak sefalosporinler olduğu; bunu meropenem, amikasin, teikoplanin, netilmisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklerin izlediği saptanmıştır.

**Sonuç:** Günümüzde *C.difficile* ile ilişkili hastalık geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz biçimde kullanıldığı hastanede yatan hastalarda önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu mikroorganizmayı saptayan tetkiklerin rutin tanı testleri arasında yer almaları gereklidir. Hastanelerde *C.difficile* ile ilişkili hastalık oranını azaltmanın başlıca yolu akılcı antibiyotik kullanımı ve infeksiyon kontrol önlemlerine gereken önemin verilmesidir.

**Anahtar kelimeler:** *Clostridium difficile*, antibiyotikle ilişkili ishal, toksin A-B

## 7. ABSTRACT

**Objective:** *C.difficile* is investigated in patients thought to be antibiotic-associated diarrhea at Selcuk University Meram Medical Faculty hospitals and aimed to identify risk factors and epidemiology.

**Materials And Methods:** Between March 2009-May 2010, stool samples of 250 patients hospitalized at different clinics and using antibiotics at last three weeks and thought to be antibiotic associated diarrhea were examined macroscopically and microscopically. *C.difficile* toxin A-B was investigated by ELISA and positive samples were inoculated on cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA). Inoculated samples immediately placed in a jara and were incubated at 48 hours at 37°C in anaerobic conditions. CCFA medium was evaluated for the presence of *C.difficile* colonies which were 2-5 mm in diameter, yellow-greenish color and with rounded edges. Gram staining was done from these colonies. Gram-positive bacilli were seen with terminal and subterminal spores. Using API 20A panel biochemical properties of the bacteria was investigated and diagnosed.

**Results:** 10 (4%) of 250 stool samples were found to be *C.difficile* toxin A-B positive. As a result of exposure to oxygen, growth was not seen in 4 of 10 strains of bacteria. Positive in 8 (80%) of the 10 patients were male, 2 (20%) were female. 4 (40%) positive stool samples of 10 patients were from pediatric clinics and 3 (30%) were from internal medicine clinics and 3 (30%) were from intensive care units. 4 of 10 patients with positive toxin A-B were age group of 0-4, 1 patient was 10-24, 1 patient was 25-44, 1 patient was 45-64 and 3 patients were over 65 years. 3 of 10 patients with positive *C.difficile* toxin A-B had immunodeficiency, 2 patients had malignancy, 1 patient had pneumonia and 1 patient had gastroenteritis, 1 patient had sepsis, 1 patient had meningitis and 1 patient was diagnosed as *C.difficile* associated disease. The most frequently used antibiotics among toxin-positive patients were third generation cephalosporins. A variety of antibiotics such as meropenem, amikacin, teicoplanin, netilmicin and tigecycline were found to follow third generation cephalosporins.

**Conclusion:** Today, at hospitals, *C.difficile* associated disease and broad-spectrum antibiotics commonly used in inappropriate manner in hospitalized patients constitutes a major health problem. Tests that detect these microorganisms are required to take place among the routine diagnostic procedures at clinical microbiology laboratories. The main way of reducing the rate of *C.difficile* associated diseases at hospitals is to take necessary attention to rational use of antibiotics and infection control measures.

**Key words:** *Clostridium difficile*, antibiotic associated diarrhea, toxin A-B

## 8. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, meslek hayatıma katkılarından dolayı hocalarım; Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e, Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, tezimin istatistiksel verilerinin oluşturulmasında emeği geçen Sayın Prof. Dr. Tahir Kemal ŞAHİN'e, Nükleer Tıp rotasyonum sırasında yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Oktay SARI, Sayın Yrd. Doç. Dr. Güngör TAŞTEKİN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa SERDENGEÇTİ'ye tezimi 09102028 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatım boyunca hep yanımda olan ve benden desteğini, sabrını ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## 9. KAYNAKLAR

1. Bilgehan H. Gram olumlu sporlu anaerob basiller. In: Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2000: 364-99.
2. Kıyan M. Clostridium Türleri In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1735-47.
3. Kıyan M. Anaerop, sporlu, Gram pozitif basiller. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:624-49.
4. Gürler N, Anaerop bakteriler. In: Bozkaya E, Ağaçfidan A, Bal Ç, Berkiten R. Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2005:98-125.
5. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, Philadelphia: Elsevier, 5th ed 2005; Chapter 57: 889-910
6. Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B. Detection of *Clostridium difficile* in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. Transplantation Proceedings 2007;39: 2812-5.
7. Lipson SM, Tortora G, Tempone A, Fedorko DP, Spitzer ED. Rapid detection of *Clostridium difficile* in stool using the VIDAS *C.difficile* Toxin A II assay. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2003;45:117-21.
8. Rexach CE, Tang-Feldman YJ, Cantrell MC, Cohen SH. Epidemiologic surveillance of *Clostridium difficile* diarrhea in a freestanding pediatric hospital and a pediatric hospital at a university medical center B. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2006;56: 109-14.
9. Fawley WN, Parnell P, Verity P, Freeman J, Wilcox MH. Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom Epidemic Strain (PCR Ribotype 1). Journal of Clinical Microbiology 2005;43(6):2685-96.
10. Ardıç N. Clostridium difficile infeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. Klimik Dergisi 2004;17(3):142-5.
11. Mikolajczyk FM, Martirosian G, Tang YJ, Silva J. Genotyping of *Clostridium difficile* isolates from a hospital in Warsaw: A Preliminary Study. Int J Infect Dis 1997; 2:88-90.
12. George WL. Antimicrobial agent-associated colitis and diarrhea. West J Med 1980 133 (2):115-23
13. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büğet E. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishallerli çocukların gaitalarında *C.difficile*'nin araştırılması. Klimik Derg 1994;7(2):105-7 .
14. Öztürk R. Antibiyotik ilişkili ishal: Tanı ve Tedavi. ANKEM Derg 2004; 18 (Ek 2): 82-6.
15. Baron JE, Peterson LR, Finegold SM. Anaerobic Gram Positive Bacilli. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology, California: Mosby, 9th ed 1994; Chapter 36: 505-23.
16. Koneman WE, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger CP, Winn CW. The Anaerobic bacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 5th ed 1997; Chapter 16: 878-944.
17. Ülgen N. Anaerop Bakteriyolojide Moleküler Biyolojik Çalışmalar. XXXIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Bodrum, 21-25 Ekim 2008: 243-8.
18. Mutters R, Nonnenmacher C, Susin C, Albrecht U, Kropatsch R, Schumacher S. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. Journal of Hospital Infection 2009; 71: 43-8.
19. Boral ÖB. *Clostridium difficile* infeksiyonu ön tanılı hastaların gaita örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002;32:220-4.
20. Vanpoucke H, Baere TD, Claeys G, Vanechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six rapid assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. Clin Microbiol Infect Dis 2001;7:55-64.
21. Taşova Y. İnal AS. Psödomembranöz Enterokolit. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H. Önemli ve Sorunlu Anaerob Bakteri İnfeksiyonları, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2005:169-97.
22. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 405-10.

23. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005; 366: 1079-84.
24. Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, Carman RJ, Genheimer CW, Gleaves CA, et al. Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(8): 3837-40.
25. Persson S, Torpdahl M, Olsen K E P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 1057-64.
26. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* Gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46(6):1996–2001.
27. Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with Phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1048–57.
28. McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW, Zheng L. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40:265-72.
29. Ulutan F. Akut ishalleri hastaya yaklaşım In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 745-65.
30. Barbut F, Richard A, Hamadı K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38(6): 2386-8.
31. Heimesaat MM, Granzow K, Leidinger H, Liesenfeld O. Prevalence of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium perfringens* enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhea. *Infection* 2005; 33: 340-4.
32. Reyes RC, John MA, Ayotte DL, Covacich A, Milburn S, Hussain Z. Performance of TechLab C. diff quik chek™ and TechLab C. difficile tox A/B II™ for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 59:33-7.
33. Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren A, et al. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 33: 339-42.
34. Pépin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec, *CMAJ* 2005; 173(9):1-6.
35. Kõnönen E, Rasinpera M, Virolainen A, Mentula S, Lyytikäinen O. Diagnostic trends in *Clostridium difficile* detection in Finnish microbiology laboratories, *Anaerobe* 2009; 15:261-5.
36. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S, Gastmeier P: Costs of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Journal of Hospital Infection* 2008; 70:15-20.
37. McDonald LC. *Clostridium difficile*: Responding to a new threat from an old enemy. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2005;26(8):672-5.
38. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 39-41.
39. Gammal AE, Scotto V, Malik S, Caseya KC, Cody R, Alcida DV, et al. Evaluation of the clinical usefulness of *C. difficile* toxin testing in hospitalized patients with diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2000; 36:169–73.
40. Akova M. Antibiyotikle ilişkili ishalde epidemiyoloji ve risk faktörleri, *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 2): 80-1.
41. Deneve C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;33:(S1)524-8.
42. Bartlett JG. Narrative Review: The new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006;145:758-64.
43. McCusker ME, Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC. Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9(6):730-3.

44. Yip C, Loeb M, Salama S, Moss L, Olde J. Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:572-5.
45. Bartlett JG ve Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46(S1):512-8.
46. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J. *C. difficile* associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16(8): 459-77.
47. Federko DP, Williams EC. Use of CCFA (cefoxitin-cycloserine fructose agar) and L- Proline-Aminopeptidase (PRO-Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35(5):1258-9.
48. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1053-66.
49. McFarland LV. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *Journal of Medical Microbiology* 2005;54:101-11.
50. Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E, Sınırtas M, Alver O, Heper Y, et al. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Médecine et maladies infectieuses* 2009; 39:382-7.
51. Delmee M, Broeck JV, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea: a plea for culture. *Journal of Medical Microbiology* 2005;54:187-91.
52. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*, *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;34:516-522.
53. Nasereddin LM, Bakri FG, Shehabi AA. *Clostridium difficile* infections among Jordanian adult hospitalized patients, *Am J Infect Control* 2009; 37(10):864-6.
54. Martirosian G, Popielskac J, Marczyński M. Occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of HIV-infected children in Poland. *Anaerobe* 2003; 9:295-7.
55. Martirosian G, Belkum AV, Pituch H, Woszczatynski PO, Mikolajczyk FM. Are Rapid immunoassays for in vivo detection of toxin A sufficient for diagnostic purposes of *Clostridium difficile*-associated diseases? *Anaerobe* 2000;6:15-9.
56. Garcia C, Samalvides F, Vidal M, Gotuzzo E, Dupont HL. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a peruvian tertiary care hospital. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5): 802-5.
57. Katz DA, Lynch ME, Littenberg B. Clinical prediction rules to optimize cytotoxin testing for *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. *Am J Med* 1996;100:487-95.
58. Garey KW, Dao-Tran TK, Jiang ZD, Price MP, Gentry LO, DuPont HL. A clinical risk index for *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients receiving broad-spectrum antibiotics. *Journal of Hospital Infection* 2008; 70:142-7.
59. Wüst J, Sullivan NM, Hardegger U, Wilkins TD. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 16(6): 1096-1101.
60. Wilcox MH. *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003;17(3): 475-93.
61. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(5): 739-50.
62. Ovaran C, Çavuşlu Ş, Özsoy MF, Keskin K, Yenen OŞ. Antibiyotige bağlı ishallerde *C. difficile*'nin yeri, *Klimik Derg* 1996;9(1): 15-7.
63. Rüssmann H, Panthel K, Bader RC, Schmitt C, Schaumann R. Evaluation of three rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 115-9.
64. Barbut F, Delmee M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, et al. A European Survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(10): 989-96.
65. Berild D, Smaabrekke L, Halvorsen DS, Lelek M, Stahlsberg EM, Ringertz SH. *Clostridium difficile* infections related to antibiotic use and infection control facilities in two university hospitals. *Journal of Hospital Infection* 2003; 54: 202-6.

66. Raveh D, Rabinowitz B, Breuer GS, Rudensky B, Yinnon AM. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive nosocomial diarrhea. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006;28: 231–7.
67. Pituch H. *Clostridium difficile* is no longer just a nosocomial infection or an infection of adults. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 33(S1): 542-5.
68. Weiss K. *Clostridium difficile* and fluoroquinolones: is there a link? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;33:529-32.
69. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* 2003; 9: 113–6.
70. Weiss K, Bergeron L, Bernatchez H, Goyette M, Savoie M, Thirion D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea rates and global antibiotic consumption in five Quebec institutions from 2001 to 2004. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 30: 309-14.
71. Changela U, Cannon JP, Aneziokoro C, Shah PS, Thottapurathu L, Lentino J. Risk factors and mortality associated with *Clostridium difficile*-associated diarrhoea at a VA hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24: 562-6.
72. Price MF, Dao-Tran T, Garey KW, Graham G, Gentry LO, Dhungana L, et al. Epidemiology and incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea diagnosed upon admission to a university hospital. *Journal of Hospital Infection* 2007; 65: 42-6.
73. Gastmeier P, Weitzel-Kage D, Behnke M, Eckmanns T. Surveillance of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with the German nosocomial infection surveillance system KISS (CDAD-KISS) *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 33(S1): 519 -23.
74. Rexach CE, Tang-Feldman YJ, Cantrell MC, Cohen SH. Epidemiologic surveillance of *Clostridium difficile* diarrhea in a freestanding pediatric hospital and a pediatric hospital at a university medical center. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2006; 56:109-14.
75. Crogan NL, Evans BC. *Clostridium difficile*: An emerging epidemic in nursing homes, *Geriatric Nursing* 2007;28(3):161-4.
76. Starr JM, Impallomeni M. Risk of diarrhea, *Clostridium difficile* and cefotaxime in the elderly. *Biomed & Pharmacother* 1997;51:63-7.
77. Southern WN, Rahmani R, Aroniadis O, Khorshidi I. Postoperative *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Surgery* 2010;148(1):24-30.
78. Martirosian G, Szczesnya A, Silva J. *Clostridium difficile* in emergency room. *Anaerobe* 2005; 11: 258–61.
79. Gerding DN. Colonization for the Prevention of *Clostridium difficile* Disease. *Anaerobe* 1999; 5: 195-9.
80. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12(3):409-15.
81. Hacek DM, Ogle AM, Fisher A, Robicsek A, Peterson LR. Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. *Am J Infect Control* 2010; 38(5):350-3.
82. McFarland LV, Beneda HW, Clarridge JE, Raugi GJ. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am J Infect Control* 2007;35(4):237-53.
83. Spencer RC. Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC)* 1998; 41:5-12.