



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Clostridium difficile* KLİNİK İZOLATLARININ
ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ, MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ, TOKSİN GENLERİ VE
FAJLARININ ARAŞTIRILMASI**

İnci DURUKAN

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17/07/2023
İnci DURUKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i>	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	5
2.1.3. Virülans Özellikleri ve Patogenezi	6
2.1.4. Toksinleri	7
2.1.5. Enfeksiyonları	9
2.1.5.1. Asemptomatik Kolonizasyon	9
2.1.5.2. <i>C. difficile</i> ile ilişkili İshal (CDAD)	10
2.1.5.3. <i>C. difficile</i> ile ilişkili Kolit (CDAC)	10
2.1.5.4. Psödomembranöz Kolit	10
2.1.5.5. Fulminan Kolit	11
2.1.6. Laboratuvar Tanısı	11
2.1.6.1. Kültür	12
2.1.6.2. Hücre Kültürü Sitotoksikite Yöntemi (CCNA)	13
2.1.6.3. Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler (EIA)	13
2.1.6.4. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)	14

2.1.7. Tedavi ve Korunma	15
2.1.8. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonu için Risk Faktörleri	16
2.1.9. Epidemiyoloji	16
2.2. <i>C. difficile</i> 'de Kullanılan Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler	18
2.2.1. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA)	18
2.2.2. PCR Ribotipleme	18
2.2.3. Çoklu Lokus Değişken Tandem Tekrar Sayısı Analizi (MLVA)	18
2.2.4. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST)	18
2.2.5. Yeni Nesil Tiplendirme	19
2.2.6. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE; Pulsed-fields Gel Electrophoresis)	19
2.3. Bakteriyofajlar	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Çalışma Grubu	21
3.1.2. Araç ve Gereçler	21
3.1.3. Sarf Malzemeler	21
3.1.4. Kimyasallar	22
3.1.5. Besiyerleri	22
3.1.6. Solüsyonlar	24
3.1.6.1. PZR İşleminde Kullanılan Solüsyonlar	24
3.1.6.2. Agaroz jel Elektroforezi için Kullanılan Solüsyonlar	24
3.1.6.3. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Örnek Toplanması	26
3.2.2. Örneklerin Saklanması	26
3.2.3. <i>C. difficile</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	26
3.2.4. DNA İzolasyonu	26
3.2.5. Master Mix Hazırlanması	26
3.2.6. Toksin Genlerinin Araştırılması	27
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	28
3.2.8. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE)	28
3.2.8.1. Bakterilerin Hazırlanması	28

3.2.8.2. Bakterinin Agaroza Gömülmesi	28
3.2.8.3. Bakteri Lizisi ve Yıkama	29
3.2.8.4. Restriksiyon Enzimi ile DNA'nın Kesilmesi	29
3.2.8.5. Elektroforez Aşaması	30
3.2.8.6. Sonuçların Görüntülenmesi ve Analizi	30
3.3.9. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	30
3.2.9.1. Gradyent Test	30
3.2.9.2. Agar Dilüsyon Yöntemi	31
3.2.10. Bakteriyofaj İzolasyonu	31
3.2.10.1. PZR ile Bakteriyofaj Holin Geni Tarama	31
3.2.10.2. İndükleme ile Lizojenik Faj İzolasyonu	32
4. BULGULAR	33
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler	33
4.2. <i>C. difficile</i> İzolatları	33
4.3. Toksin Genlerinin PZR ile İncelenmesi	37
4.3.1. <i>tcdA</i> Geninin Amplifikasyonu	37
4.3.2. <i>tcdB</i> Geninin Amplifikasyonu	37
4.3.3. <i>cdtA</i> Geninin Amplifikasyonu	38
4.3.4. <i>cdtB</i> Geninin Amplifikasyonu	38
4.4. İzolatların PFGE Yöntemiyle Klonal İlişkilerinin Araştırılması	39
4.5. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi	41
4.6. <i>C. difficile</i> 'nin Bakteriyofajları	42
4.6.1. PZR ile Bakteriyofaj Holin Geni Taraması	42
4.6.2. İndükleme ile Lizojenik Faj İzolasyonu	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	60
EKLER	77
Ek 1. Etik Kurul Onayı	78
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	27
Tablo 2.	Toksin genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler	27
Tablo 3.	<i>C. difficile</i> miyovirüsleri ve sifovirüsleri holin gen primerleri	32
Tablo 4.	<i>C. difficile</i> izolasyon sayıları	34
Tablo 5.	<i>C. difficile</i> immunokromatografik kart testlerinin sonuçları, istek yapılan tarih ve birimler	35
Tablo 6.	İzolatların toksin gen profili	39
Tablo 7.	İzolatların antimikrobiyal MİK değerleri	41
Tablo 8.	Faj-Konak spektrumu	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	<i>C. difficile</i> 'nin PaLoc ve CdtLoc'da genlerin dizilimi	9
Şekil 2	CDE teşhisi için örnek bir algoritma	15
Şekil 3.	Örneklerin kliniklere göre dağılımı	36
Şekil 4.	İmmunokromatografik kart test ile toksin sonuçları	36
Şekil 5.	<i>C. difficile</i> izolatlarının PFGE profillerinin dendogramı	40



RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	CCFA besiyerinde ve UV ışığı altında <i>C. difficile</i> kolonileri	33
Resim 2.	<i>C. difficile</i> izolatının gram boyama görüntüsü	34
Resim 3.	<i>tcdA</i> geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü	37
Resim 4.	<i>tcdB</i> geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü	37
Resim 5.	<i>cdtA</i> geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü	38
Resim 6.	<i>cdtB</i> geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü	38
Resim 7.	PFGE jel elektroforez görüntüsü	39
Resim 8.	<i>C. difficile</i> izolatında gradiyent ve agar dilüsyon test örneği	41
Resim 9.	Miyovirüs ve Sifovirüs holin genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Resim 10.	Faj-konak spektrumu damlatma yöntemi	42

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

atm	Atmosfer
bp	Base pair
°C	Santigrat derece
CCNA	Sitotoksisite nötralizasyon testi
CCFA	Sikloserin sefoksitin fruktoz agar
CDE	<i>C. difficile</i> enfeksiyonu
CDT	Binary toksin
CdtLoc	Binary Toksin kodlama locusu
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidyum bromür
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EIA	Enzim immüno analizler
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GDH	Glutamat dehidrojenaz
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrofotometry
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
NAAT	Nükleik asit amplifikasyon testi
PaLoC	Patojenite lokusu
PFGE	Değişken alanlı (pulsed-field) jel elektroforezi
PMC	Psödomembranöz kolit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Revolutions per minute
TcdA	Toksin A
TcdB	Toksin B
TE	Tris EDTA
TBE	Tris borik asit EDTA

UV	Ultraviyole
WGS	Tüm genom dizileme
Simgeler	
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Formüller	
H₂S	Hidrojen Sülfür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit

ÖZET

***Clostridium difficile* Klinik İzolatlarının Antimikrobiyal Direnci, Moleküler Epidemiyolojisi, Toksin Genleri ve Fajlarının Araştırılması**

Sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların önde gelen nedeni ve küresel olarak halk sağlığına yönelik önemli bir tehdit olarak kabul edilen *Clostridioides (Clostridium) difficile*, hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilen anaerobik, sporlu, gram pozitif bir basildir. Bu çalışmada, *C. difficile* izolasyonu; izolatların toksin genlerinin, antimikrobiyal direncinin, klonal ilişkisinin ve bakteriyofajlarının araştırılması amaçlanmıştır. Aralık 2017-Ekim 2020 tarihleri arasında toksin araştırılan 825 dışkı örneğinin anaerobik kültürü yapılmış ve izolatlar geleneksel yöntemlere ilaveten MALDI-TOF MS (Bruker, Almanya) ile tanımlanmıştır. Kırk üç *C. difficile* izolatının antimikrobiyallere direnci gradiyent test ve agar dilüsyon yöntemi ile, toksin genleri ve bakteriyofajları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile, klonal ilişkisi değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) ile araştırılmıştır. İzolatların vankomisine %100, metronidazole %100, moksifloksasine %90 ve klindamisine %60 oranında duyarlı olduğu bulunmuştur. Eritromisin, tigesiklin ve fidaksomisinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sırasıyla, 0.25-≥256 µg/mL, ≤0.016-0.047 µg/mL ve 0.008-0.25 µg/mL arasında saptanmıştır. İzolatların 14 (%32.6)'ünde *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB* genleri pozitif, 11 (%25.6)'inde *tcdA*, *tcdB* ve *cdtB* genleri, 18 (%41.9)'inde *tcdA* ve *tcdB* genleri tespit edilmiştir. PZR ile izolatların 31'inin Miyovirüs, 17'sinin Sifovirüs ve 10'unun her iki holin genini birlikte taşıdığı belirlenmiştir. Mitomisin C ile indüklenen 38 izolat en az bir konağı enfekte etmiştir. PFGE ile 43 izolatın benzerliği %39.3 olarak belirlenmiş, çoklu klonal grupların varlığı ve sadece toplam altı izolatın, kaynağa bakılmaksızın (yani klinik ve poliklinik) %100 benzer olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, literatür araştırmasına göre, ülkemizde *C. difficile* izolatlarının PFGE ile klonal ilişkilerinin, fidaksomisine duyarlılığının ve bakteriyofajlarının saptandığı ilk çalışmadır. Elde edilen bulguların ve daha fazla klinik izolatla yapılacak kapsamlı çalışmaların, *C. difficile* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına, önlenmesine, tedavisine katkı sağlayabileceği ve CDE'nin küresel sağlık sistemi üzerindeki yükünü azaltabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, Bakteriyofaj, *Clostridioides (Clostridium) difficile*, PFGE, Toksin genleri

ABSTRACT

Investigation of the Antimicrobial Resistance, Molecular Epidemiology, Toxin Genes and Phages in Clinical Isolates of *Clostridium difficile*

Clostridioides (Clostridium) difficile, the leading cause of healthcare-associated infections and globally recognised as a significant threat to public health, it is an anaerobic, spore-bearing, gram-positive bacillus that can cause life-threatening infections. The aim of this study was to isolate *C. difficile* and investigate toxin genes, antimicrobial resistance, clonal relationship and bacteriophages of the isolates. Anaerobic culture of 825 faecal samples investigated for toxins between December 2017 and October 2020 was performed and isolates were identified by MALDI-TOF MS (Bruker, Germany) in addition to conventional methods. Forty-three *C. difficile* isolates were investigated for antimicrobial resistance by gradient test and agar dilution method, toxin genes and bacteriophages by polymerase chain reaction (PCR) and clonal relationship by variable-field gel electrophoresis (PFGE). The sensitivities of the isolates for vancomycin, metronidazole, moxifloxacin and clindamycin were 100%, 100%, 90% and 60%, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of erythromycin, tigecycline and fidaxomicin were determined between 0.25- $\geq$ 256 μ g/mL, $\leq$ 0.016-0.047 μ g/mL and 0.008-0.25 μ g/mL, respectively. Fourteen (32.6%) of the isolates were positive for *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* genes, 11 (25.6%) were positive for *tcdA*, *tcdB*, *cdtB* genes and 18 (41.9%) were positive for *tcdA*, *tcdB* genes. By PCR, it was determined that 31 of the isolates carried Myovirus, 17 carried Syphovirus and, 10 carried both holin genes together. The 38 isolates positive by PCR were induced with Mitomycin C and phage lysates were shown to infect at least one host. The similarity of 43 isolates by PFGE was 39.3%, the presence of multiple clonal groups and only six isolates in total were found to be 100% similar regardless of source (i.e. clinic and outpatient). According to the literature, this is the first study in Turkey in which clonal relationships, susceptibility to fidaxomicin and bacteriophages of *C. difficile* isolates were determined by PFGE. We believe that the findings obtained and comprehensive studies with more clinical isolates may contribute to a better understanding of the epidemiology, prevention and treatment of *C. difficile* infections and reduce the burden of CDE on the global health system.

Keywords: Antibiotic resistance, Bacteriophage, *Clostridioides (Clostridium) difficile*, PFGE, Toxin genes

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Clostridioides (Clostridium) difficile, hafif ve/veya şiddetli ishal, kolon perforasyonu, psödomembranöz kolit, toksik megakolon ve ölüme kadar değişebilen çeşitli klinik tablolara neden olan, gram pozitif, anaerob, sporlu bir bakteridir (1). *C. difficile* tarafından üretilen başlıca virülans faktörleri, toksin A ve toksin B olarak bilinen ve çoğu virülan izolat tarafından kodlanan iki büyük klostridial toksindir. Toksin A ve toksin B, kromozomun patojenite lokusu veya PaLoc olarak bilinen ≈ 19.6 kb'lik bir bölgesinde yer alan sırasıyla *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından kodlanır (2). Epidemik tipler, *tcdA* ve *tcdB*'ye ek olarak binary toksini de kodlar. Binary toksin, pozitif düzenleyicisi *CdtR*'yi de kodlayan belirli bir genomik lokusta (*CdtLoc*) *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanır (3).

C. difficile enfeksiyonunun (CDE) etkeni olan bakteri, birçok ülkede sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyon ve ishalin önde gelen nedenlerinden biridir. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), *C. difficile*'yi ilk olarak 2013 yılında daha sonra 2019 yılında yayınladığı antibiyotiğe dirençli patojenler arasında, acil tehdit listesine almıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl 200.000'den fazla hastaneye yatış ve 1 milyar ABD doları tutarında sağlık hizmeti maliyeti ile ilişkilidir (4-6). CDE'den, altta yatan hastalıkları olan ve yakın zamanda antibiyotik tedavisi alan yaşlı hastalar daha çok etkilenmekte, bu da hastanede yatış süresinin uzamasına ve aşırı mortaliteye neden olmaktadır. Son yıllarda, sağlık tesislerinin dışından da CDE vakaları bildirilmektedir. Nozokomiyal CDE'nin aksine, toplumdaki hastalar daha genç, antibiyotik kullanım sıklığı daha az ve maruz kalma yolları genellikle bilinmeyen hastalardır (7).

C. difficile izolatları, PCR-ribotipleme, değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE), restriksiyon endonükleaz analizi (REA) ve çoklu lokus değişken tandem tekrar sayısı analizi (MLVA) gibi tiplendirme yöntemleri kullanılarak ayırt edilebilir. Her bakteri türünde olduğu gibi, farklı coğrafi bölgelerde ve zaman aralıklarında farklı türler baskın olabilmektedir (8). Bu tiplendirme yöntemlerinin kullanımı, *C. difficile*'nin tanımlanmış izolatlarının son on yılda ortaya çıktığını, baskın olduğunu ve bunun birçok ülkede salgınlara yol açtığını ortaya koymuştur. Bu salgınlara neden olan izolatlar, insanlarda REA tipi BI/PFGE tipi NAP1/ribotip 027 (BI/NAP1/027) ve hayvanlarda ribotip 078 izolatlarıdır (9).

C. difficile enfeksiyonlarının tedavisi için önerilen başlıca antibiyotikler; metronidazol, vankomisin ve fidaksomisinidir. Enfeksiyonu tetikleyen antibiyotiklerin

kullanımının durdurulması ve klinik gözlem, antibiyotiklerin neden olduğu çok hafif CDE'yi tedavi edebilir. Hafif ve orta derecede CDE'li hastalar oral metronidazol ile tedavi edilebilirken, şiddetli veya komplike enfeksiyonlar için oral vankomisin önerilir (1). CDE tedavisinde kullanılan metronidazol ve vankomisin dahil olmak üzere hemen hemen her antibiyotik CDE gelişimi ile ilişkilendirilmektedir. Geniş spektrumlu penisilinler ve sefalosporinler, klindamisin ve florokinolonlar, CDE'yi diğer antibiyotiklere göre daha yüksek oranda tetikleme riskine sahiptir (10).

Antimikrobiyal direnci *C. difficile*'de de tehdit oluşturmaktadır. Az sayıda olsa bile metronidazol, vankomisin, fidaksomisin, meropenem ve piperasilin-tazobaktam karşı direnç bildirilmiştir. CDE tedavisinde alternatif ilaçlardan biri olan tigesiklin direnci, rifampisin direncinden daha düşüktür. CDE gelişimi için yüksek riskli antimikrobiyaller olan ikinci nesil florokinolonlar ve klindamisin yüksek düzeyde direnç görülmektedir. Amoksisilin/klavulanata karşı hemen hemen hiç direnç görülmediği, insan klinik *C. difficile* izolatlarının beşte birinde tetrasiklin direnci olduğu bildirilmiştir (11).

Antibiyotiklere karşı gelişen dirençler çoklu ilaca dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bakteriyofajlar (fajlar) ile yeni-eski bir antibakteriyel strateji olan faj tedavisi geliştirilmektedir. Fajlar, çoklu ilaca dirençli enfeksiyonları azaltabilen çoklu antibakteriyel efektör işlevlere sahip virüslerdir (12). Fajların dar konakçı aralıklarına sahip olmaları terapötik fajların kullanımındaki önemli avantajlardandır. Fajlar, CDE'yi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan ve aynı zamanda bağırsak disbiyozunu şiddetlendiren vankomisin gibi bazı antibiyotiklerin sergilediği geniş spektrumunun aksine dar spektrumludur. *C. difficile*'de faj tedavisi, fajlar tarafından sıklıkla sergilenen oldukça spesifik bakteriyel konakçı aralıklarından yararlanarak *C. difficile*'i ortadan kaldırılacak, ancak mikrobiyotaya zarar vermeyecektir (13).

C. difficile günümüzde ciddi oranda artış gösteren bir patojendir. *C. difficile* toksinlerini tespit etmek için birçok ticari hızlı enzim immünolojik test mevcuttur. Uygulanmaları kolay, aynı günde hızlı sonuç veren ve nispeten ucuz olduklarından yaygın olarak kullanılırlar, ancak bu testlerin duyarlılığı daha düşüktür. Toksikojenitenin saptanmasıyla ilişkili dışkı kültürü, potansiyel olarak daha yararlı bir tanı testidir, ancak izolasyon için özel besiyeri, yoğun emek ve uzun zaman gerektirir. Anaerobik kültür yapılan ve anaerobik izolatların duyarlılığını araştıran laboratuvar sayısı da azdır. *C. difficile* için rutin dışkı kültürünün yapılmaması, epidemiyolojisi, antimikrobiyal direnci

gibi birçok özelliği ile ilgili bilgilerin sınırlı kalmasına neden olmuştur. Rutin incelemelerde dışkı örneklerinde toksin tarama testleri ile toksin saptanamamasına karşın, kültür işlemi ile *C. difficile* izole edilebilmekte, antibiyotik direnci saptanabilmekte, salgın araştırması ve izolatların epidemiyolojik incelemesi yapılabilmektedir. Son yıllarda artan direnç oranları ve dramatik olarak değişen epidemiyolojisi de kültür yapılmasını gerekli hale getirmektedir (14-17).

Hastalığın daha ciddi seyirine, yüksek nüks ve ölüm oranlarına neden olan hipervirülan izolatların ortaya çıkması ile birlikte *C. difficile* ile ilişkili ciddi hastalıkların artışı hız kazanmıştır (18). Hipervirülan izolatların belirlenmesi, yayılım potansiyeli nedeniyle ulusal ve uluslararası düzeyde büyük önem taşımaktadır (19).

C. difficile enfeksiyon tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan metronidazol ve vankomisine direnç giderek artmaktadır (11). 2011 yılından itibaren kullanılmaya başlanan fidaksomisin *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisi için özgül ve dar spektrumlu bir antibiyotik seçeneğidir (20). Fidaksomisin duyarlılığı ile ilgili, dünyada sınırlı sayıda çalışma varken Türkiye’de ise çalışma bulunmamaktadır (11).

C. difficile izolatlarında son yıllarda antibiyotiklere karşı artan direnç karşısında, yeni alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Yeni tedavi yaklaşımlarından birisi olan faj terapisinin temelini, bakteriyofaj izolasyonu oluşturmaktadır (13).

Bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarına toksin araştırılması için gelen dışkı örneklerinden *C. difficile* izolasyonu; izolatların toksin genlerinin, antimikrobiyal dirençlerinin, klonal ilişkisinin ve bakteriyofajlarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridioides (Clostridium) difficile*

2.1.1. Tarihçe

İlk kez 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından emzirilen bebeklerin dışkıları üzerinde yapılan mikrobiyolojik bir çalışmada tanımlanmıştır. Araştırma ve izolasyondaki zorluklar nedeniyle, bu anaerobik basil ilk kez tanımlandığında *Bacillus difficilis* olarak adlandırılmıştır (21, 22). 1937'de bu yeni anaerobik bakterinin birkaç izolatının, tavşan ve kobay gibi hayvanlarda toksin ürettiği gösterilmiş ve patojeniteleri saptanmıştır (23). Yeniden sınıflandırılan bakteri *C. difficile* ismi ile 1938'de *Clostridium* cinsine dahil edilmiştir (22). 1940 yılında bir yaştan altındaki bebeklerde yapılan bir çalışmada %15,4 oranında *C. difficile* enfeksiyonu bildirilmiştir (24). Farklı laboratuvarlardan insanlarda patojen olduğu belirlenemeyen *C. difficile* izolatı izole edildiği bildirilmiştir. *C. difficile*'nin insan vücudunda karakteristik toksinini düzenli olarak üretmediği veya insan vücudunun bu toksinin öldürücü etkisine karşı belirgin bir şekilde duyarlı olmadığı düşünülmüştür (25).

Perirektal apsesi olan bir hasta da *Bacteroides fragilis* ve *C. difficile* enfeksiyonlarına karşı immün yanıt, aglütinasyon testleri, Ouchterlony tekniği ve indirekt immünofloresan (IFL) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Her üç yöntem de *B. fragilis*'e karşı antikor gösterirken, *C. difficile*'ye karşı antikorlar sadece indirekt IFL tekniği ile gösterilmiştir (26). 1976'da bebek ve yetişkinlerin dışkılarından *C. difficile*'yi izole etmek için %0.1-0.4 p-kresol içeren Reinforced Clostridial Medium (RCM) besiyeri kullanılmıştır (27).

Psödomembranöz kolit (PMC) ilk olarak 1893 yılında genç bir kadında ameliyat sonrası komplikasyonu olarak antibiyotiklerin keşfinden önce tanımlanmıştır. Tedesco ve ark.'ları (28) 1974'te, 200 klindamisin kullanıcısının değerlendirildiği prospektif bir çalışmada, %21'inde ishal ve endoskopi sonucunda yaklaşık yarısında (%10) PMC olduğunu bildirmişlerdir. Antibiyotik kullanımına bağlı PMC olabileceği ihtimalini ortaya koymuşlardır. 1977'de ABD'deki bir laboratuvarında, PMC hastalarının dışkısında *C. sordellii* antitoksin tarafından nötralize edilen bir toksin tanımlanmıştır. İngiltere'den Larson ve Price tarafından da benzer bir çalışma yayınlanmıştır (29-31).

Mart 1978’de, toksijenik Clostridia’nın PMC’nin nedeni olduğu bildirilmiştir. Nisan 1978’de *C. sordellii* antitoksin tarafından nötralize edilen bir PMC hastasının dışkılarından *C. difficile* izolasyonu yapıldığı gösteren çalışma yayınlanmıştır. Mayıs 1978’de PMC’li çok sayıda hastanın dışkılarından *C. difficile* izolasyonu bildirilmiştir (31). Daha sonrasında *C. difficile*’yi bildiren bir dizi çalışma yayınlanmış ve 1990’ların patojeni haline gelmiştir. 2000’lerin başında, Avrupa ve Kuzey Amerika’da yeni bir hipervirulent suş olan PCR-ribotip 027’nin ortaya çıkmasıyla ilişkili olarak CDE’nin insidans, şiddet ve ölüm oranında artış rapor edilmiştir. *C. difficile*, sağlık bakım ortamlarında antibiyotiğe bağlı enfeksiyonların başlıca nedeni olarak kabul edildiğinden, artık dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (22).

Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılmasıyla *C. difficile*’nin *Peptostreptococcaceae* familyası ile yakından ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle, *C. difficile*’nin yeni bir *Peptoclostridium* cinsine atfedilmesi ve *C. difficile*’nin *Peptoclostridium difficile* olarak yeniden adlandırılması önerilmiştir. Yeni önerilen *Peptoclostridium* cinsi, Gram pozitif, hareketli, spor oluşturan zorunlu anaeroblardır. Tüm suşlar mezofilik veya termofiliktir, nötr ila alkali pH’da büyür ve oksidaz ve katalaz-negatiftir. Genomik DNA’nın G+C içeriği %25 ila 32 mol arasında değişmektedir (22).

Spor oluşturan, toksin üreten basil 2016 yılında resmi olarak *Clostridioides difficile* olarak yeniden adlandırılmıştır. Yeni isim, bu tür ile *Clostridium* cinsinin diğer üyeleri arasındaki taksonomik farklılıkları yansıtmaktadır (10, 32).

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Gram pozitif, peritrik kamçılara sahip, genellikle hareketli, 0.5-1.9x3.0-16.9 µm boyutlarındadır. Oval şekilde sporlar subterminal yerleşim göstermektedir. Spor germinasyonuna %0.1 sodyum taurokolat yardımcı olur. *C. difficile*’nin sporları ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Bu özellik, olumsuz ortamlarda uzun süre hayatta kalma ve dezenfeksiyona direnç sağlar. Uygun koşullarda spor oluşumu tersine çevrilir ve bakteriler vejetatif forma döner. Kolonileri 2-5 mm, dairesel, bazen rizoid, düz veya düşük konveks, opak, grimsi veya beyazımsıdır. Uzun dalga boyundaki ultraviyole ışık altında uçucu bir soluk yeşil floresan üretir. Tipik özelliklerinden biri de p-kresol üretiminin neden olduğu at gübresine benzer kokusudur. Büyüme için optimum sıcaklık 30-37°C’dir, bununla birlikte 25°C ve 45°C’de de gerçekleşebilir. Fruktozu kullanabilirler, amigdalin, arabinoz, galaktoz, glikojen, inositol, inülin, laktoz, maltoz, melezitoz, rafinoz, ramnoz, riboz, nişasta ve

sukrozu kullanamazlar. Sellobiyoz, salisin, sorbitol, trehaloz ve ksilozun kullanımı için zayıf reaksiyon gerçekleşir. Prolin, aspartik asit, serin, lösin, alanin, treonin, valin, fenilalanin, metiyonin ve izolösin büyüme için kullanılır; δ -aminovalerat ve a-aminobutirat üretilir. Hubert ve ark.'ları, karbon ve enerji kaynağı olarak seçilmiş aminoasitler, eser miktarda fruktoz (%0.1), büyüme uyarıcısı olarak %2 safra, 16 pg/ml sefoksitin ve 500 μ g/ml streptomisin içeren bir ortam ile florayı azaltarak, dışkıdan izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İzolasyonunda sikloserin, sefoksitin, fruktoz ve yumurta sarısı içeren agar daha sık kullanılan bir besiyeridir. Pepton yeast ekstrakt glukoz (PYG) agar kültürlerinde bol miktarda gaz ve suşa bağlı H₂S üretir. Amonyak üretir (32, 33).

2.1.3. Virülans Özellikleri ve Patogenez

Dirençli sporlar tarafından kontaminasyondan sonra enfeksiyon gelişmesi için ana risk faktörü, sporların germinasyonuna izin vererek bağırsak mikrobiyotasının bozulması ve bariyer etkisinin zarar görmesidir. Bu, esas olarak geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımından sonra ortaya çıkar. Bağırsak kolonizasyonunun, konakçı yanıtına karşı bakteriyel direnç ve mukozaya bakteriyel adhezyon tarafından yönetilmesi muhtemeldir (34).

Mukozal yüzeyleri kolonize eden bakteriyel patojenler, bu bölgelerde bol miktarda bulunan antimikrobiyallere karşı direnç kazanmıştır. Mukozal yüzeylerde bulunan ana antimikrobiyallerden biri, bakterilerin peptidoglikan omurgasını hidrolize eden bir muramidaz olan lizozimdir. Peptidoglikan omurgasının bölünmesi, enfeksiyon bölgesinde peptidoglikan da dahil olmak üzere bakteriyel fragmanları serbest bırakan bakteri hücre ölümüne ve lizise yol açar (35). *C. difficile*, *in vitro* olarak lizozime doğal olarak oldukça dirençlidir ve bu durum peptidoglikanın yüksek deasetilasyon hızıyla ilişkili olabilir (36). Ho ve ark.'ları (37), GlcNAc kalıntısının daha fazla deasetilasyonunun alt inhibitör lizozim konsantrasyonları tarafından indüklendiğini ve lizozime karşı ek direnç seviyesine doğrudan katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Deasetilasyona deasetilaz PdaV (CD630_15560) aracılık eder ve Ekstra Sitoplazmik Fonksiyon (ECF) sigma faktörü σ^V tarafından düzenlenir.

Pozitif yükleri negatif yüklü bakteriyel membranlarla etkileşimi kolaylaştıran katyonik antimikrobiyal peptitler (CAMP) bir diğer antimikrobiyallerdir. Teikoik asitlerin D-alanil esterifikasyonu ile bakteri yüzeyinin pozitif yükünün artması CAMP'lerin etkinliğini azaltan bir durumdur. Hücre duvarında gerçekleşen bu modifikasyona *dlt*

operonu aracılık eder. *C. difficile*'in erken konakçı immün yanıtlarından kaçmasının da önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (38, 39).

Konak bakteri adezyonu, yüzey proteinleri olan bakteriyel adezinler ile gerçekleşmektedir. *C. difficile* adezinlerinin önemli bir kısmı Cwp ailesine aittir. SLP proteinleri, Cwp84 sistein proteaz, Cwp66 adezini, CwpV proteini, fibronektin bağlayıcı protein Fbp68, kollajen bağlayıcı protein CbpA, Lipoprotein CD630_08730 ve ısı şok proteini GroEL önemli adezinlerdir. *C. difficile* bir flagella sayesinde hareket özelliğine sahiptir. *C. difficile*, abiyotik yüzey üzerinde bir biyofilm oluşturabilir, ancak sağlamlığı suşlar arasında değişir. Hareket özelliği ve biyofilm oluşturma yeteneğinin patogeneze yardımcı olduğu düşünülmektedir (34).

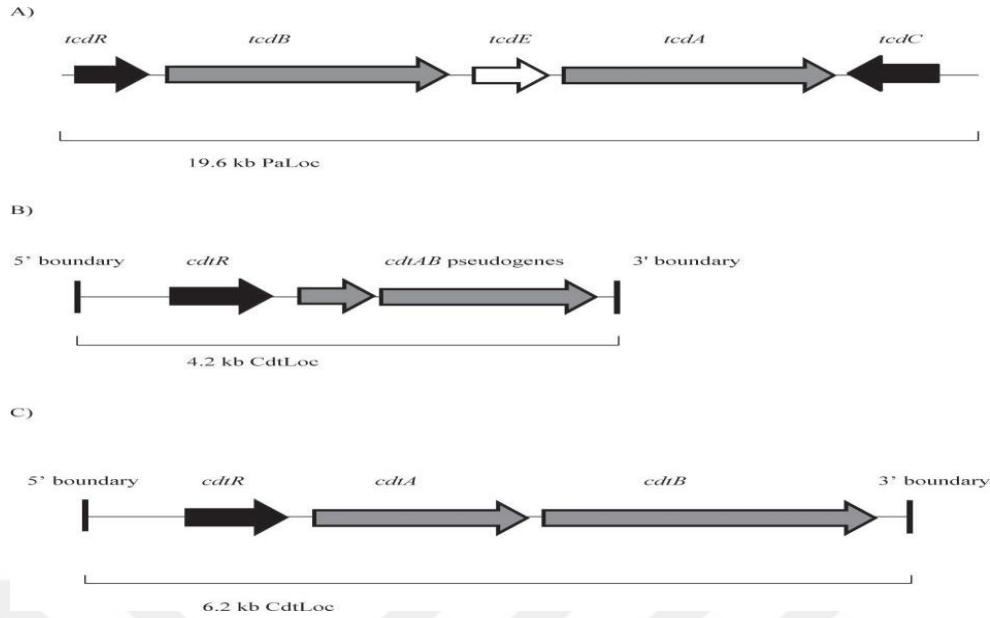
2.1.4. Toksinleri

C. difficile toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB), hücre iskeleti organizasyonunda ve diğer hücre fonksiyonlarda yer alan GTP bağlayıcı proteinleri (RHO alt ailesi) inaktive eden glukosiltransferazlardır. Bu aktivite, bu toksinlerin bağırsak geçirgenliğini değiştirmek ve CDE ile ilişkili karakteristik inflamasyona aracılık etmek üzere hareket ettiği birincil mekanizmadır (33, 40, 41).

C. difficile'nin iki temel toksini; 308 kDa büyüklüğünde olan TcdA ve 270 kDa büyüklüğünde olan TcdB'dir. Konak hücrelerde Rho, Rac ve Cdc42'yi etkisiz hale getiren glukosiltransferazlardır. TcdA ve TcdB toksinleri, *Clostridium sordellii* öldürücü toksin (TcsL) ve hemorajik toksin (TcsH) ve *Clostridium novyi* alfa toksini (Tcn α) ile birlikte büyük clostridial toksinler grubunu oluşturur. TcdA ve TcdB, kromozomda patojenite bölgesinde kodlanır. Çevresel uyaranlara yanıt olarak geç log ve durağan fazlarda ifade edilir. *tcdA* ve *tcdB*'yi kodlayan genler ≈ 19.6 kb'lik bir patojenite lokusunda yer alan tekli açık okuma çerçevelerinde bulunur. *tcdA*, 8.133 nükleotit ve *tcdB*, 7.098 nükleotitlik bir dizi ile yakın bir konumdadır ve aynı yönde kopyalanır. Bu patojenite lokusu üzerinde yer alan toksin üretilmesi veya hücreden salınmasında önemli rol aldığı düşünülen üç açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. *tcdC*, *tcdA*'nın sonrasında bulunur, *tcdA* ve *tcdB* genlerinin tersi yönünde kopyalanır. *tcdC* erken eksponansiyel fazda yüksek oranda eksprese edilir ancak büyüme durağan faza geçtikçe azalır. Bu azalış, TcdA ve TcdB'nin artışına karşılık geldiği için TcdC'nin toksin üretiminin negatif düzenleyicisi olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. *tcdD*, *tcdB*'nin öncesinde bulunur ve her iki toksin geniyle koordineli olarak ifade edilir. TcdD, DNA bağlayıcı proteinlere benzer ve deneysel

olarak *tcdA* ve *tcdB*'nin promotör bağlayıcı bölgelerini içeren promotör reporter füzyonlarının ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. TcdD, toksin ekspresyonunun pozitif düzenleyicisi olarak görev yapabilir. TcdD'nin ekspresyonu çevresel koşullara duyarlıdır, glikoz tarafından baskılanır ve durağan fazda önemli ölçüde artar. TcdE'yi kodlayan gen, *tcdB* ve *tcdA* arasında konumlanır, holin proteinleri ile homoloji gösterir. *C. difficile* hücre duvarının geçirgenleştirilmesi yoluyla TcdA ve TcdB'nin salınmasını kolaylaştırdığı tahmin edilmektedir (40, 42, 43).

C. difficile'nin TcdA ve TcdB'nin aktin değiştirici aktivitesinin aynı zamanda ADP-ribosiltransferaz aktivitesinin bir sonucu olup olmadığı araştırılmıştır. ADP-ribosiltransferaz aktivitesi, sitotoksinite (TcdB) ve enterotoksiniteye (TcdA) ek olarak binary toksine sahip tek izolat keşfedilmiştir. 1977'de bu toksinin enzimatik aktivitesini (CDTa) ve bağlanmasını (CDTb) kodlayan genler dizilenmiştir. Cdt lokusu veya CdtLoc olarak adlandırılan 6.2'lik bölge hem toksin genlerini (*cdtA* ve *cdtB*) hem de düzenleyici proteini (*cdtR*) kodlayan geni içermektedir. CDT, ikili ADP-ribosile edici toksinler ailesine aittir. Bu toksin ailesinin diğer üyeleri, *C. botulinum* C2 toksini, *C. perfringens* iota toksini, *C. spiroforme* toksini ve *B. cereus/thuringiensis* vejetatif insektisit proteinlerdir. Tüm bu toksinler iki ayrı toksin bileşeninden oluşur. Bir bileşen, biyolojik olarak aktif bileşendir. Aktini modifiye etmek için ADP-ribosiltransferaz aktivitesine sahiptir ve ikinci bileşen, toksinin konakçı hücrelere bağlanmasında yer alır. Enzim bileşeninin sitozole translokasyonundan sorumludur (44).



Şekil 1. *C. difficile*'nin PaLoc ve CdtLoc'da genlerin dizilimi (Mathur'dan, 45)

2.1.5. Enfeksiyonları

C. difficile enfeksiyonlarının belirtileri çok çeşitlidir. Asemptomatik taşıyıcılıktan yaşamı tehdit eden toksik megakolona kadar değişen geniş bir klinik yelpaze gösterir. Enfeksiyon ve kolonizasyon, ciddi semptomların gelişmesi için tek ön koşul değildir. Gerekli olan, mikrobiyotanın büyük ölçüde bozulması, risk faktörleri ve mikrobiyotanın bozulmasında önemli bir role sahip olan antibiyotiklerin kullanılmasıdır (46, 47).

C. difficile toksinleri için pozitif testlerin, aktif hastalığın göstergesi olduğu ve toksinlerin klinik semptomlardan sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Toksin testleri pozitif olan hastalar semptomsuz olabileceğinden, CDE teşhisinde toksin testleri tek başlarına yeterli değildir. Semptomatik CDE tanısı için, ishal semptomlarının varlığı (ardışık 24 saat veya daha kısa sürede üç veya daha fazla şekilsiz dışkı) ve *C. difficile* toksinleri için pozitif bir dışkı testi sonucu veya toksijenik *C. difficile* tespiti, psödomembranöz koliti gösteren kolonoskopik bulguların olması gerekmektedir (48).

2.1.5.1. Asemptomatik Kolonizasyon

C. difficile veya *C. difficile* toksinlerinin varlığı asemptomatik CDE olarak kabul edilmektedir. Asemptomatik *C. difficile* kolonizasyonunda ilk aşama, *C. difficile* sporlarının yutulmasıdır. Sporlar mide asidinde hayatta kalır ve kolonun anaerobik ortamında vejetatif hücrelere dönüşür. Vejetatif *C. difficile* hücreleri, kolonik hücre dışı

matrisin flagella ve enzimatik bozunmasını kullanarak kalın bağırsaktaki mukus tabakasına nüfuz eder. Vejetatif *C. difficile* hücreleri ile kolonizasyonun meydana gelmesi için, genellikle bu bakteriye karşı kolonizasyon direnci sağlayan normal bağırsak mikrobiyotasında bir bozulma olmalıdır (48).

Bu durum hastane ortamında özellikle yoğun bakım ve cerrahi bölümlerinde tedavi gören hastalarda çok hızlı yayılmaktadır. Asemptomatik vakaların çoğu herhangi bir klinik bulgu vermeden ilerler. *C. difficile*'nin taşıyıcılık evresinde, hastalığın semptomlarının şiddeti ve sıklığı sınırlıdır. Asemptomatik taşıyıcıların tedavisi önerilmemektedir (47).

2.1.5.2. *C. difficile* ile ilişkili İshal (CDAD)

Hastanelerde gelişen ishal vakalarının büyük bir kısmının etkeni *C. difficile*'dir. İshal çoğunlukla enfeksiyondan 48-72 saat sonra ortaya çıkar. Şiddetli karın ağrısı ve kramplar da ishale eşlik eder. Günde 10-15 bağırsak hareketi ile birlikte çok sayıda dışkılama elektrolit ve su dengesinde değişikliklere neden olur (47).

2.1.5.3. *C. difficile* ile ilişkili Kolit (CDAC)

Semptomlar *C. difficile* ile ilişkili ishalde görülenlere benzerdir. Ayrıca semptomlara pireksi ve lökositoz (beyaz küre sayısı $15 \times 10^9/L$) eşlik eder. Fizik muayenede, CDAC'de en sık görülen bulgu abdominal hassasiyettir.. Önemli düzeyde dehidrasyon ve dışkıda gizli kan testi pozitif olabilir. Kolonoskopide, bağırsak duvarında eritematöz mukoza, belirgin friabilite ve temas halinde kanama gibi ayırt edici değişiklikler gözlemlenebilir (47).

2.1.5.4. Psödomembranöz Kolit

C. difficile enfeksiyonunun en iyi bilinen şeklidir. Endoskopi sırasında kolon mukozasında ve bazen terminal ileumda erken tanı için temel teşkil eden karakteristik sarı bir plak görülebilir. Bu plaklar, serum proteinleri, mukus ve enflamatuar hücrelerin salınımını tetikleyen mukoz membranların küçük ülserasyonlarıdır. Lezyondan alınan biyopsilerde lenfositler bulunur. Eşlik eden semptomlar arasında şiddetli karın ağrısı, dehidrasyon ve sıklıkla hipoalbuminemi ($<30 \text{ mg/L}$) bulunur. Enfeksiyonun potansiyel toksik etkilerinden dolayı, psödomembranöz kolitli hastalarda uygun tıbbi tedavinin başlatılması esastır. İyileşen hastaların yaklaşık %10-25'inde nüksler meydana gelir. Sıklıkla, re-enfeksiyon çok daha şiddetli olabilir ve müteakip psödomembranöz kolit ataklarına daha büyük bir yatkınlık vardır (47).

2.1.5.5. Fulminan Kolit

Genel olarak, kolitin doğal ilerlemesi, kişinin bir tedavi planı tasarlamasına ve izlemesine izin verir; ancak bazen fulminan bir form gelişebilir. İnflamatuvar bağırsak hastalığının bu formu, hastaların sadece %3-8'inde gelişir. İshal, hastalığın seyrine bağlı olarak, günde birkaç epizottan gastrointestinal sistemin tamamen tıkanmasına ve dilatasyonuna kadar önemli ölçüde değişebilir. İkinci durumda, bu hastalarda ölüm oranı çok yüksek olduğundan ve özellikle yaşlı hastalarda %60'a ulaşabildiğinden, acil cerrahi müdahale gerekir (47).

2.1.6. Laboratuvar Tanısı

C. difficile enfeksiyon tanısı *C. difficile*'nin mikrobiyolojik kanıtları ile doğrulanan belirti ve semptomların bir kombinasyonuna dayanır. Başka bir nedenin yokluğunda toksin üreten *C. difficile* ve toksinin dışkıda bulunması, psödomembranöz koliti gösteren kolonoskopik, histopatolojik bulguların varlığı ile tanı konulur. Laboratuvar testleri tek başına asemptomatik kolonizasyon ile enfeksiyonun klinik semptomları arasında ayırım yapamaz (33, 49, 50).

Açıklanamayan ve 24 saat içinde yeni başlayan ≥ 3 şekilsiz dışkısı olan hastalar, CDE testi için tercih edilen hedef popülasyondur. Bebeklerde toksijenik *C. difficile*'nin asemptomatik taşıyıcılığının yüksek prevalansı nedeniyle, yenidoğanlarda veya ≤ 12 aylık diyareli bebeklerde CDE testi asla rutin olarak önerilmemelidir. *C. difficile* testi, diğer enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan nedenler ekarte edilmedikçe 1-2 yaşındaki ishalleri çocuklarda rutin olarak yapılmamalıdır. ≥ 2 yaşındaki çocuklarda, uzamış veya kötüleşen ishali ve risk faktörleri veya ilgili maruziyetleri bulunan hastalar için *C. difficile* testi önerilir. Epidemiyolojik çalışmalar dışında aynı ishal epizodu sırasında tekrar testi (7 gün içinde) ve asemptomatik hastalarda dışkı testi yapılmamalıdır (51).

C. difficile enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılabilecek birçok farklı yaklaşım vardır; ancak, tanı için en iyi standart laboratuvar testi belirlenmemiştir. CDE'nin laboratuvar tanısı, mikroorganizmanın kendisini hedefleyen kültür ve glutamat dehidrojenaz (GDH) antijen testi, dışkıda *C. difficile* toksinlerinin varlığını hedefleyen sitotoksikite nötralizasyon testi (CCNA), enzim immünoanalizleri (EIA'lar) ve toksin genlerini hedefleyen moleküler yöntemler gibi birkaç teşhis yöntemi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır. CDE'yi teşhis etmek için tercihen iki veya üç aşamalı

bir algoritma gerçekleştirilir. Pozitif bir birinci test, bir veya iki doğrulama testi veya bir referans yöntemle onaylanır (33, 49).

Sitotoksin tespiti, özellikle ABD’de birçok araştırmacı tarafından standart tanı olarak savunulmaktadır, ancak optimal bir sonuca ulaşmak için hem kültür hem de toksin tespiti gereklidir. Dışkı örneklerinde doğrudan gaz sıvı kromatografisi (GLC), lateks aglütinasyon veya bilgisayarlı tomografi taraması gibi dolaylı testler önerilmiştir. Fakat bu testler, laboratuvar testlerine ek olarak kullanılmadıkça kabul edilecek yeterli duyarlılık ve özgüllüğe ulaşmamaktadır. Optimal bir bakteriyolojik tanı için, epidemiyolojik araştırma durumu dışında sadece sıvı dışkı kabul edilmelidir. Sitotoksin aktivitesinin hızlı bir şekilde kaybolması nedeniyle, testlerin hızlı bir şekilde gerçekleştirilemediği durumda, sadece taze numuneler işlenmeli ve bunlar 4°C veya altında saklanmalıdır (52). Hızlı CDE tanımlanması, hastalığın ilerlemesini önlemek için uygun ve hızlı tedavi ve ek nozokomiyal vakaların insidansını azaltmak için zamanında enfeksiyon kontrol müdahaleleri için oldukça önemlidir (33).

2.1.6.1. Kültür

C. difficile’nin patojenitesinin belirlenmesinden sonra, dışkı örneklerinden izolasyon için CCFA (sikloserin sefoksitin fruktoz agar) adlı seçici bir agar halen laboratuvar da kültür işlemi için kullanılmaktadır. Seçici ajanlar, 500 mg/L konsantrasyonda sikloserin ve 16 mg/L konsantrasyonda sefoksitindir. Bazı çalışmalarda, bu konsantrasyonlar sırasıyla 250 ve 8 mg/L’ye düşürülmüştür. Besiyeri orjinal formülünde kan yerine yumurta sarısı içermektedir. Dışkılar doğrudan ekilerek anaerobik ortamda 48 saat inkübe edilir. Plakların anaerobik ön inkübasyonu, izolasyon oranını da artırabilmektedir. Besiyerine %0.1 konsantrasyonda saf sodyum taurokolat veya kolatın eklenmesi daha iyi bir spor germinasyonu sağlar. *C. difficile* kolonileri, buzlu cam görünümlü tipik morfolojiye sahiptirler ve at gübresine benzeyen tipik kokuları spesifikler. Besiyerine bağlı değişmekle birlikte ultraviyole ışık altında koloniler sarı-yeşil veya açık yeşil floresan renkte görülmektedir. *C. difficile*, büyük miktarlarda bütirik ve izo-kaproik asit içeren tipik bir GLC profili gösterir. Ancak bu tür cihazlar pek çok laboratuvar da bulunmamaktadır (52).

Dışkı örneklerinden *C. difficile*’nin geri kazanımını artırmak için kültür yöntemlerinde, ısı veya alkol şoku ön işleme tekniklerini ve sıvı besiyeri zenginleştirme adımlarını içermektedir. Mevcut besiyerlerinin kusurlu seçiciliği ve hem toksijenik hem de

toksijenik olmayan (yani, patojenik olmayan) *C. difficile*'nin dışkıdan izolasyonundan dolayı spesifik değildir. Şüpheli tüm izolatların alt kültürleri yapılmalı ve toksin genlerinin varlığını veya toksin proteinlerinin ekspresyonunu tespit etmek için bir doğrulama testi yapılmalıdır. *C. difficile* için dışkı kültürü yavaştır ancak suşların toksijenite açısından test edilmesine yardımcı olur ve epidemiyolojik araştırmaları yürütmenin tek yoludur (33, 52-54).

2.1.6.2. Hücre Kültürü Sitotoksisite Yöntemi (CCNA)

Sitotoksin tespiti, genellikle *C. difficile* enfeksiyonlarının teşhisi için standart olarak kabul edilir. Spesifikliğı artırmak için bir antitoksin kullanılarak *C. difficile* toksin B'nin nötralizasyonuna dayanan, doğrudan hücre sitotoksisite testidir. Bu yöntem, dışkı örneklerinde pikogram seviyelerinde toksini saptar ve kültürlenmiş hücrelerin tek tabakasına hazırlanmış bir dışkı örneğinin (seyreltilmiş, tamponlanmış ve filtrelenmiş) eklenmesiyle gerçekleştirilir. *C. difficile* toksin B varsa, doku kültüründe hücrelerin yuvarlaklaşmasıyla karakterize sitopatik bir etkiye sahiptir. Bu testte, 48 saatte hücrelerin $\geq 50\%$ 'sinde karakteristik değişiklikler görülürse ve etki antitoksin tarafından engellenirse sonuç pozitif kabul edilir. Sitotoksik olan toksin B bu etkiden toksin A'ya göre daha fazla sorumludur. Vero, Hep2, fibroblast, CHO ve HeLa hücreleri sitotoksin tespitinde kullanılan hücre hatlarıdır. Yöntemin birçok avantajı olup, duyarlı ve spesifiktir. Ayrıca diğer Clostridial toksinleri saptayabilir. CCNA tarihsel olarak, özellikle toksin EIA'ları olmak üzere diğer tahlillerin karşılaştırılmasında altın standart olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, dışkı kültürü teknikleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında duyarlılığı %67 kadar düşük olabilir. Öte yandan, EIA'ye kıyasla nispeten yavaştır. Özellikle az sayıda örnek işleniyorsa, hem zaman alıcı hem de pahalı olan hücre hatlarını koruma gerekliliğı, başka bir dezavantajdır. Bu testin sonuçlarının yorumlanması özeldir ve tecrübe gerektirmektedir. CCNA'nın diğer bir önemli sınırlaması, özellikle negatif sonuçlar için sonuç verme süresinin örnek laboratuvara geldikten sonra 72 saat gibi uzun sürmesidir (33, 52, 54).

2.1.6.3. Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler (EIA)

C. difficile tanısında, enzim temelli immünolojik yöntemler ilk olarak 25 yıl öncesinde TcdA'yı saptamak için tasarlanmıştır. Daha sonrasında TcdA, TcdB, bakteriyel antijen GDH'yi veya kombinasyonlarını saptayan testler, CDE için en yaygın kullanılan tanısal testler arasında yerini almaktadır. CCNA veya toksijenik kültür ile

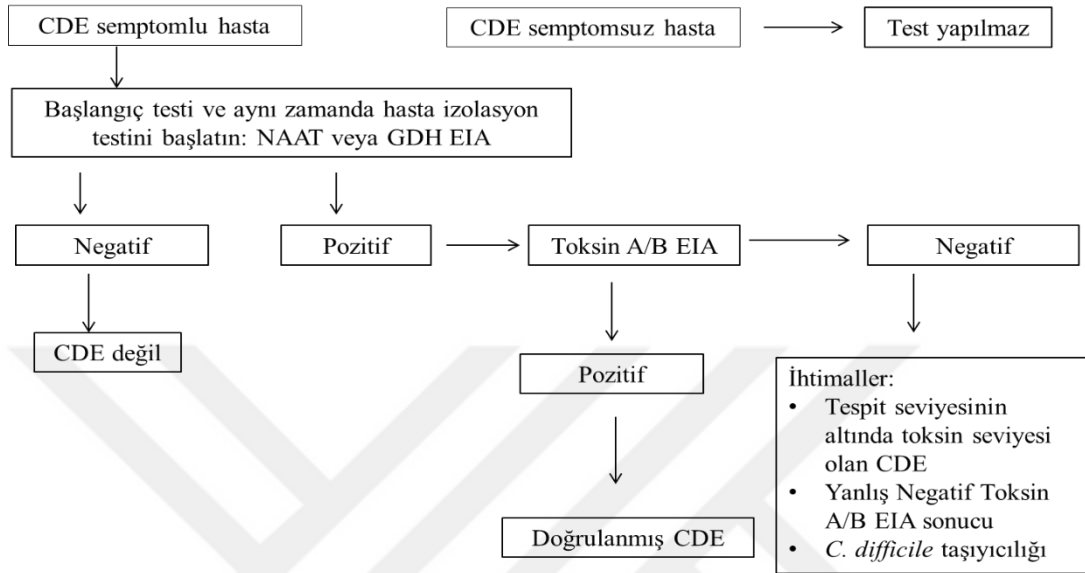
karşılaştırıldığında, bu testler hızlı, daha az zahmetli ve uzmanlık istemeyen yönüyle avantaj sağlarlar. Fakat özellikle toksinleri tespit etmek için tasarlanmış olanların, bir teşhis yöntemi olarak tek başına kullanım için yeterli duyarlılıktan yoksun olduğu anlaşılmıştır. GDH’i saptayan EIA’lar daha iyi duyarlılık gösterir ancak daha az spesifiktir. Çünkü GDH hem toksijenik hem de toksijenik olmayan *C. difficile* izolatları ve ayrıca yakından ilişkili *Clostridium* türleri tarafından eksprese edilir. GDH artı TcdA ve/veya TcdB kombinasyonlarını saptayan testler genellikle daha iyi performans gösterir (33, 55-60).

Çeşitli çalışmalarda, toksijenik kültür ve toksijenisitenin tespiti, CDE’nin teşhisi için en hassas ve spesifik teknik olarak gösterilmiştir. Dışkı örneklerinin CCFA’da kültürünün ardından sitotoksin testi veya EIA ile pozitif kolonilerin toksijenitesinin *in vitro* tayini yapılır. EIA kitlerinin toksijenik kültüre karşı çoğu karşılaştırması, EIA’ların daha düşük performans gösterdiğini göstermiştir. Daha az duyarlı olmakla birlikte, EIA’lar aynı gün içinde sonuç verir ve bir tarama testi olarak kullanılabilir. EIA’lar kültürle birleştirilmeli ve pozitif bir kültürde negatif EIA sonucu olduğunda izole edilen izolattan EIA testi yapılarak tekrarlanmalıdır (52).

2.1.6.4. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT’ler), *C.difficile* için ilk kez yaklaşık 15 yıl önce kullanılmaya başlanılmıştır. Fakat testlere ilginin artışı CDE’nin klinik ve epidemiyolojik önemi ile doğru orantılıdır. Dışkı örneklerinde *C. difficile*’nin tespiti için hem gerçek zamanlı PZR hem de DNA teknolojilerinin döngü aracılı izotermal amplifikasyonunu kullanan NAAT’ler ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır ve klinik laboratuvarlar tarafından kullanılmaktadır. FDA onaylı kitler arasında GeneOhm (BD), proGastro (Prodesse), GeneXpert (Cepheid) ve Illumigene (Meridian) *C. difficile* gibi testler bulunmaktadır. Bu testlerden sonuç almak, çoğunlukla yalnızca birkaç saat sürer. Genel olarak FDA onaylı tüm testler, toksin EIA’larından çok daha hassas olup, yüksek özgüllük göstermektedir. Bu yöntemler dışkıda toksijenik *C. difficile* ile ilişkili genleri tespit ederken, geleneksel CCNA’lar ve EIA’lar dışkıda *C. difficile* toksinlerinin varlığını saptar. Uzun süreli bakım hastalarının %50’ye kadarının toksijenik *C. difficile* ile asemptomatik olarak kolonize olabileceği düşünüldüğünde, moleküler yöntemler kullanılırken klinisyen ve laboratuvarın ortak çalışması oldukça önemlidir. Diğer bir dezavantajı, moleküler testler diğer testlere göre daha maliyetlidir (33,

61). Alınan tüm numuneler için tek başına bir NAAT yerine, çok adımlı bir algoritmanın parçası olarak bir dışkı toksin testi ile kullanılması önerilmektedir. Amplifikasyon testi veya NAAT ve toksin testi gibi kombinasyonlar kullanılmalıdır (51).



Şekil 2. CDE teşhisi için örnek bir algoritma (Czepiel’den, 10)

2.1.7. Tedavi ve Korunma

Açıkça antibiyotik kullanımının neden olduğu, çok hafif CDE dışındaki enfeksiyon durumlarında antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Önerilen başlıca antibiyotikler metronidazol, vankomisin ve fidaksomisinidir. Çoklu tekrarlayan CDE için fekal transplantasyon tavsiye edilir. Kolon perforasyonu ve/veya sistemik inflamasyon ve antibiyotik tedavisine rağmen klinik durumun kötüleşmesi durumunda, kolon lavajı ile birlikte total abdominal kolektomi veya diverting loop ileostomi önerilmektedir (49).

C. difficile enfeksiyonu yatarak ve ayakta tedavi ortamlarında yaygın bir ishal nedenidir. Son birkaç yılda, CDE’nin tedavi spektrumunda önemli değişiklikler görülmektedir. En önemlisi CDE başlangıç epizodu için metronidazol kullanımı yerine, fidaksomisin ve bezlotoxumab eklenmesi ve mikrobiyal replasman tedavileridir (62).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından CDE için onaylanmamış olmasına rağmen, metronidazol eski IDSA (2010) ve güncel ACG (2013) ve ECCMID (2009 ve 2014) kılavuzlarında hafif ve orta dereceli CDE için oral birinci basamak tedavide önerilmektedir. Fakat son çalışmalar oral vankomisine göre metronidazolun etkisinin daha

düşük olduğunu göstermektedir. Hamile ve emziren kişilerde metronidazol önerilmez. Yaşlılarda veya ek hastalığı olan hastalarda metronidazol kullanılmamalıdır. 2018’de yayınlanan güncellenmiş IDSA kılavuzlarında, metronidazol, sadece vankomisin veya fidaksomisin yokluğunda, hafif veya orta dereceli CDE’nin ilk epizodu için önerilmektedir. İntravenöz metronidazol, fulminan CDE’de vankomisin (oral veya rektal veya her ikisi) ile birlikte endikedir (49, 51, 63-65).

Vankomisin CDE tedavisinde FDA onayına sahiptir. Fulminan olmayan CDE’de günde dört kez olmak üzere 125 mg dozda 10 gün oral vankomisin standart tedavi olarak kullanılmaktadır. Oral vankomisinin zayıf emilimi, sınırlı sistemik maruziyete ve dışkıda yüksek konsantrasyona ulaşmasına neden olmaktadır. Bu yüzden fulminan enfeksiyon dışında yüksek konsantrasyonlarda kullanımı önerilmez (65).

Fidaksomisin, minimum sistemik absorpsiyona, gram-pozitif aerobik ve anaerobik bakterilere karşı dar bir aktivite spektrumuna ve normal bağırsak mikrobiyotası üzerinde daha az etkiye sahip, oral bir makrosiklik antibiyotiktir. Fidaksomisin, *C. difficile*’ye karşı bakterisidaldir. Metronidazol ve vankomisin bakteriyostatiktir (65-67).

2.1.8. *C. difficile* Enfeksiyonu için Risk Faktörleri

En önemli risk faktörü antibiyotik kullanımıdır. Klindamisin, sefalosporinler, karbapenemler ve florokinolonlar başta olmak üzere tüm antibiyotikler CDE ile ilişkilendirilmektedir. Antibiyotik sayısı ve kullanım süresi riski artıran faktörlerdendir. Antineoplastik ajanlar, hastane veya huzurevi bakımı, ilerlemiş yaş, altta yatan hastalık (Kanser, böbrek yetmezliği, vb.), gastrointestinal müdahaleler gibi durumlar enfeksiyon riskini artırabilmektedir (68).

2.1.9. Epidemiyoloji

C. difficile enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, özellikle hipervirülan BI/NAP1/027 olarak tanımlanan salgın izolatlarının ortaya çıkmasından sonra önemli ölçüde değişmiştir. Bu izolat, Kuzey Amerika, Kanada ve Avrupa’da büyük salgınlara neden olmuş ve Avrupa’da diğer PCR-ribotiplerinin (014, 001 ve 078 gibi) yerine geçmiştir (1, 69).

2005 yılında 14 ülkeden toksijenik kültür sonucu pozitif olan hastalar ile Avrupa *C. difficile* çalışma grubu bir çalışma gerçekleştirmiştir. 354 toksijenik izolat tanımlanmış, bu izolatların %6’sını ribotip 027’nin oluşturduğu ve 66 farklı ribotipe sahip oldukları tespit

edilmiştir. Çalışmaya Türkiye’den dahil edilen sekiz izolat ribotip 001 olarak tanımlanmıştır (14, 70).

Arjantin, Brezilya, Meksika, Şili ve Kosta Rika’daki çalışmaların çoğu, çeşitli kronik durumlar nedeniyle hastanede yatan yetişkin popülasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Hastanede yatan popülasyonlar bu çalışmaların temel amacı olsa da, toplumdan edinilmiş CDE yaygınlık oranlarının %18.7 ile %30 arasında değiştiği bulunmuştur. Asya’da CDE epidemiyolojisi, TcdA-negatif, TcdB-pozitif varyant izolatlarla bağlantılı olarak değişmektedir; en yaygın olarak bildirilen ribotipler 017 ve 018’dir. Japonya’da retrospektif bir çalışmada, 10.000 hasta günü başına 3.31 vaka olan insidansın, 10.000 hasta günü başına 4.1 ila 9.8 vaka olan Kuzey Amerika veya Avrupa’dan daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Fakat 30 günlük tüm nedenlere bağlı ölüm oranı %15 olduğu, hastaların %51.62’sinde ciddi CDE geliştiği ve bu oranların diğer ülkelere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Güney Kore’de 2004’ten 2008’e kadar, ülke çapında yapılan bir araştırma, CDE insidansının 1.000 yetişkin başvuru başına 1.7 vakadan 1.000 yetişkin başvuru başına 2.7 vakaya yükseldiğini göstermiştir. Baskın ribotipler 017 ve 018 olmak üzere, Kuzey Amerika ve Avrupa’da daha yaygın olan 027 ve 078 ribotipleri de bildirilmiştir ve en yaygın binary toksin pozitif izolatlar da 078 ribotipte tespit edilmiştir. CDE, Çin’de hastanelerde diyare durumunda enfeksiyon tanı testleri içerisinde bulunmamaktadır, bu durum da insidansının saptanmasında az sayıda çalışma bulunmasına sebep olmaktadır. Antibiyotiklerle tedavi edilen hastanede yatan hastalarda, ishal örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kültüre göre %30 *C. difficile* pozitifliği bildirilmiştir. Japonya ve Kore’deki çalışmalarla uyumlu olarak, baskın PCR-ribotipi 017 (%48), ardından 046 (%14) ve 012 (%14); epidemik PCR-ribotipleri 027 ve 078 gözlenmiştir (71-77).

2008 yılında 34 Avrupa ülkesinden 106 laboratuvarın dahil edildiği çalışmada ise, CDE insidansı hastaneler arasında değişmekle birlikte ortalama 10.000 hasta günü başına 4.1 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada 65 farklı PCR-ribotipi tanımlanmış olup, en sık ribotip 014/020 saptanmış, ribotip 027’nin prevalansı %5 bulunmuştur. Çalışmada Türkiye’den test edilen 105 hastadan 4 (%4)’ünde toksin pozitif bulunmuş ve ortalama 10.000 hasta gününde 0.0 (0.0-0.6) olarak belirlenmiştir (78).

2.2. *C. difficile*'de Kullanılan Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler

C. difficile'nin tiplendirilmesi için şu anda kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri, darbeleri alan jel elektroforezi (PFGE), çoklu lokus değişken tandem tekrar sayısı analizi (MLVA), PCR-ribotipleme, restriksiyon endonükleaz analizi (REA) ve multilokus dizi tiplendirmesi (MLST)'dir (79).

2.2.1. Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA)

Restriksiyon endonükleaz analizi (REA), kromozomal DNA'nın kesici bir enzim kullanılarak kesilmesidir. Kesilen DNA parçaları agaroz veya poliakrilamid jellerde standart elektroforez ile ayrılır. REA'da HindIII enziminin kullanılması ABD'de de en yaygın tiplendirme yöntemidir. Zaman alıcı ve çok sayıda bantların varlığı nedeniyle yorumlanması zor bir yöntemdir (79, 80).

2.2.2. PCR-ribotipleme

PCR-ribotipleme, 16S rRNA geninin 3' ucunu ve 23S rRNA geninin 5' ucunu hedef alan primerler kullanılarak 16S-23S rRNA intergenik ara bölgesinin (ISR) amplifikasyonudur. *C. difficile* için kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinin en yaygınıdır. *C. difficile* genomu, hem sayıları hem de intergenik bölgelerinin büyüklüğü bakımından farklılık gösteren çok sayıda 16S-23S rRNA operonu içerir. Böylece bu bölgelerin amplifikasyonu ve ardından elektroforetik ayrımından oluşmaktadır (79).

2.2.3. Çoklu Lokus Değişken Tandem Tekrar Sayısı Analizi (MLVA)

Çoklu lokus değişken tandem tekrar sayısı analizi (MLVA), genom boyunca dağılmış olan değişken sayıdaki tandem tekrarları (VNTR) hedef alır. Çoklu tandem tekrar (TR) lokusları PZR ile hedeflenir ve lokus başına kopya sayısı dizileme veya fragman analizi ile belirlenir. Kullanılan TR lokusu sayısı 2 ila 12 arasında değişkenlik göstermektedir. TR lokusu sayısı ne kadar fazla olursa yöntem de o kadar ayırt edici olmaktadır (79).

2.2.4. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST)

Multilokus dizi tiplendirmesi (MLST), genellikle yedi housekeeping geninin 400 ila 500 bp'lik intragenik sekanslarını kullanarak bir alelik profil vermek için her gene bir alelik tipin atanmasını içermektedir. Virülans genleri bazen dahil edilse de, genellikle housekeeping genler kullanılır. *C. difficile* için ilk MLST şemasında, evrimsel ilişkileri

analiz etmek amacıyla yedi housekeeping gen (*aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk* ve *sodA*), daha sonra özellikle epidemiyolojik analizler için geliştirilen bir yedi housekeeping gen seti (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* ve *tpi*) kullanılmaktadır (79, 81, 82).

2.2.5. Yeni Nesil Tiplendirme

Tüm genom dizilemenin, (WGS) maliyetinin düşmesi ile geleceğin altın standart tiplendirme yöntemi olması kaçınılmazdır. WGS verilerinin tek nükleotid polimorfizm analizi, incelenen türler arasında ortak olan genlerin incelenmesini ve esasen MLST'nin büyük ölçekte gerçekleştirilmesini içermektedir. Bu yöntem hali hazırda salgın araştırmaları ve büyük epidemiyolojik çalışmalar için kullanılmaktadır (79).

2.2.6. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE; Pulsed-fields Gel Electrophoresis)

Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE), kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmesi ve bir fingerprint oluşturmak için bu parçaların elektroforez ile ayrılmasına dayanan bir yöntemdir. Üçüncü nesil PFGE'de büyük parçaları verimli bir şekilde ayırmak için counter-clamped homogenous electric field (CHEF) kullanılmaktadır. Kurulum maliyeti yüksektir ve karmaşık, yavaş protokollerle yapılmaktadır. 1990'larda çoğu patojenin tiplendirilmesinde CHEF ile PFGE, büyük ölçüde ABD'de PulseNet'in (www.cdc.gov/pulsenet/) oluşturulması ile altın standart haline gelmiştir. PFGE'nin *C. difficile* tiplemesi için ayırım gücünün yüksek ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır. Fakat işlem sırasında DNA'nın bozunması ve yorumlanamayan jel görüntüleri oluşturması nedeniyle izolatların önemli bir oranı bu teknikle tiplendirilemez. Bu sorunlara rağmen, PFGE ABD ve Kanada'da CDC tarafından *C. difficile* için birincil tiplendirme yöntemi olarak benimsenmiştir ancak çok sayıda izolatın tiplendirmesi gerçekleştirilememiştir. Tiplendirilemeyen izolatlar için modifiye bir PFGE protokolü tasarlanmıştır. Dünyanın farklı diğer birçok bölgesinde ise, diğer yöntemler PFGE'nin yerini almıştır. *C. difficile* PFGE için en sık kullanılan restriksiyon endonükleaz *Sma* I'dır, ancak farklı enzimler de zaman zaman kullanılmaktadır (79, 83).

2.3. Bakteriyofajlar

C. difficile enfeksiyonlarının, son 20 yılda artan insidansı ile direnç oranları ve çok sayıda yaklaşımın ortaya çıkmasıyla bu enfeksiyona karşı mümkün olan en iyi tedavinin belirlenmesine odaklanılmıştır (1, 84, 85). Bakteriyosinlerin ve bakteriyofajların özellikle *C. difficile*'i hedef aldığı gösterilmiştir (1).

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bakterilerin bulunduğu her ortamda bulunabilirler, memeli bağırsağı bunlardan sadece biridir. Her bir fekal madde gramı başına 10^{13} - 10^{14} bakteri içermektedir ve bu fajlar için önemli bir rezervuardır. İnsan bağırsağı, çoğu bakteriyofaj olmak üzere dışkı gramı başına 10^8 adede kadar viral partikül içerebilmektedir (86).

Bakteriyofajlar, 1917'de keşfedildikten sonra bakteriyel hastalıkların tedavisinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmıştır (13). Bakteriyofajlar, elektron mikroskobu ve gelişen sekans yöntemleri ile nükleik asit kompozisyonları ve morfolojilerine göre Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi tarafından 1971'de sınıflandırılmıştır. 2012'de bakteriyofajlar 7 takım ve 96 aile olarak kabul edilmiştir. Clostridial türlerin bakteriyofajları genellikle Caudovirales takımında yer almaktadır (87).

Faj terapisi *C. difficile* için de araştırılması gereken konulardan biridir ve uygun fajların geliştirilmesi zor olmakla birlikte çekici bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Fajlar, hücre reseptörlerine bağlanarak DNA'sını hücre içine aktarmakta ve replikasyondan sonra hücre eriyerek yeni fajlar ortaya çıkmaktadır. Bu enfeksiyon ve lizis süreci, tüm hedef hücreleri öldürene kadar devam etmektedir. CDE tedavisinde faj terapisi, faj-bakteriyel etkileşiminin spesifik olması, bağırsak mikrobiyotasını etkileme ihtimalinin az olmasından dolayı bir avantaj olarak düşünülmektedir. Ayrıca, fajlar enfeksiyonda kendi kendini sınırlayan bir şekilde çoğalmaktadır. Fajlar, çoğu antibiyotiğin aksine dar spektruma sahiptir. Antibiyotiklerin *C. difficile* biyofilmlerini yok etmede etkisiz olduğu bildirilmiştir. Fajlar, bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapılarını spesifik kodladıkları enzimleri ile parçalamayı gerçekleştirebilmektedir. *C. difficile* fajlarının da *C. difficile*'nin biyofilmine uygun spesifik enzimsel yeteneklere sahip olmasının mümkün olduğu tahmin edilmektedir (13).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3. 1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Aralık 2017-Ekim 2020 tarihleri arasında toksin araştırılması için gönderilen 825 dışkı örneği çalışmada kullanıldı.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; dikey model otoklav (Kermanlar, İstanbul), pastör fırını (Nüve FN 500, Türkiye), su banyosu (FG Bode & Co., Almanya), sınıf II biyogüvenlik kabini (Powtech, Türkiye), 4°C buzdolabı (Profilo), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya), -80°C soğutucu (New Brunswic Scientific Mod U570 premium, Thermo, ABD), 37°C'lik etüv (Memmert M 421, Almanya), otomatik pipetler (20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Gilson, ABD), pipetman (İsolab, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), çalkalayıcı su banyosu (Nüve ST402, Almanya), manyetik karıştırıcı (yellow^{line} MSC basic C, ABD), vorteks (Isolab, Almanya), santrifüj (Sigma, Almanya), MALDI-TOF MS (Bruker, Almanya), CrystalSpecTM nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD), mikrodalga fırın (Vestel MW-23, Çin), buz makinesi (Hoshizaki, Japonya), hassas terazi (EMB 200-3, Kern & Sohn GmbH, Almanya), termal döngü cihazı (Techne TC-512, İngiltere), elektroforez sistemi (RunOneTM güç kaynağı ve Embi Tec RunOneTM elektroforez tankı, ABD) elektroforez tankı (OWL Scientific Easy-CastTM mini jel elektroforez sistemi model B1A, ABD), dijital güç kaynağı (Owl Separation Systems-Lighting VoltTM Power Supply model OSP-300, ABD), ultraviyole (UV) illuminatör (Cleaver Scientific, MUV21-254/312, İngiltere), ışık mikroskobu (Olympus CX31, Japonya), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad, ABD), Chef-DR III Pulsed Field Jel elektroforez sistemi (Bio-Rad, ABD), VersaDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD), deiyonize su cihazı (Barnstead, İstanbul) ve distile su cihazı (GFL, Ankara) gibi cihazlar kullanıldı.

3.1.3. Sarf Malzemeler

AnaeroPack ve kilitli poşetler (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Japonya), ependorf tüpler (1.5 mL), PZR tüpleri (0.25 mL), otomatik mikropipet uçları (10, 200 ve 1000 µL), cam erlenmayer ve cam şişeler (100, 250, 500, 1000 mL), mezür (100, 250, 500,

1000 mL), falkon tüpler (15 ve 50 mL), vida kapaklı deney tüpleri, lam, lamel, plastik petri kapları (90 mm çaplı), test tüp standı (Isolab, Almanya), selüloz asetat filtre (0.22 µm por çaplı), serolojik pipetler (5, 10, 25 mL), pamuklu eküvyon kullanıldı.

3.1.4. Kimyasallar

Çalışmada, Agar (Acumedia, ABD), *C. difficile* Agar base (LiofilChem, İtalya), *C. difficile* supplement (LiofilChem, İtalya), Brain Heart Infusion Broth (Merck, Almanya), Yeast ekstrakt (Merck, Almanya), Defibrine koyun kanı, Brucella kanlı agar (Sigma-Aldrich, Almanya), Proteoz pepton (Becton Dickinson Company, ABD), Disodyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya), Potasyum dihidrojen fosfat (Merck, Almanya), Sodyum klorür (Riedel de Haen, Almanya), Magnezyum sülfat (Merck, Almanya), Mannitol (Carlo erba, İtalya), Nötral kırmızı (Merck, Almanya), Sodyum taurocholate (Serva, Almanya), L-sistein (Amresco, ABD), Gram boyama seti (GBL Convastain IVD), Tris base (Merck, Almanya), Glasiyel asetik asit (Merck, Almanya), Gliserol (Riedel de Haen, Almanya), Bromfenol mavisi (Merck, Almanya), Ksilen siyanol (Sigma, Almanya), Etidyum bromür (Sigma, Almanya), Tris HCl (AppliChem, Almanya), Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Bio Basic INC, ABD), Sodyum hidroksit (Merck, Almanya), Deoksikolat (Oxoid, İngiltere), N-lauroilsarkozin (Sigma, Almanya), Lizozim (AppliChem, Almanya), Mutanolisin (Sigma, Almanya), Borik asit (Bio Basic INC, ABD), ProteinazK (AppliChem, Almanya), RNase (Biomatik, Kanada), Formaldehit (Promega, ABD), SmaI (New England Biolabs Inc., ABD), SeaKem düşük erimeli agaroz (Lonza, ABD), PZR master mix (5x HOT FIREPol® Blend Master Mix), Primerler (Sentebiolab, Türkiye), 100 bp DNA marker (Grisp, Portekiz), Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı.

3.1.5. Besiyerleri

Sikloserin Sefoksitin Fruktoz Agar (CCFA)

Üretici firmanın önerdiği şekilde *C. difficile* base agar'dan 34.6 g tartıldı, 500 mL distile suda çözüldü. Sterilizasyon için 1.2 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 50-55°C soğuduktan sonra %0.1 sodyum taurokolat, %5 koyun kanı ve 1 şişe (2 mL) *C. difficile* supplement (D-cycloserine 125 mg, cefoxitin 4 mg) ilave edildi ve steril petri plaklara dökülerek donduruldu.

Brain Heart Infusion Broth (BHI)

Üretici firmanın önerdiği şekilde Brain heart infusion broth besiyerinden 37 g ve yeast ekstraktı 5 g tartıldı ve 1000 mL distile suda çözöldü, pH 7.4'e ayarlandı. Ardından 121°C'de 1.2 atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra son konsantrasyonları sırasıyla %0.03 ve %0.1 olacak şekilde L-sistein, sodyum taurokolat eklendi.

C. difficile Mannitol Taurocholate Broth

Proteoz pepton 40 g, Disodyum hidrojen fosfat 5 g, Potasyum dihidrojen fosfat 1g, Sodyum klorid 2 g, Magnezyum sülfat 0.10 g, Mannitol 6 g, Nötral kırmızı 0.03 g, Sodyum taurokolat 1 g ve L-sistein 0.50 g tartıldı ve 1000 mL distile suda çözöldü, pH 7.3 'ye ayarlandı. Vida kapaklı cam tüplere 10 mL hacimlere bölündü ve 1.2 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

Hemin ve Vitamin K1 ilaveli Brucella Kanlı Agar (BKA)

Üretici firmanın önerdiği şekilde 43.1 g tartıldı ve 1000 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklavda 1.2 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve %5 koyun kanı ilave edildi. Petri plaklara 20 mL dağıtıldı ve donduruldu.

Brain Heart Infusion Agar (BHI)

Üretici firmanın önerdiği şekilde 52 g Brain heart infusion agar (BHA) tartıldı ve 1000 mL distile suda çözöldü, pH 7.4'e ayarlandı. Ardından 121°C'de 1.2 atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra petri plaklara dökölen besiyerleri donduktan sonra çalışmaya kadar 4°C' da saklandı.

%0.75 Yumuşak agar BHI

Brain Heart Infusion Agar besiyerinden 3.7 g ve 0.75 g agar 100 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklavda 1.2 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra çalışmaya kadar 4°C' da saklandı.

3.1.6. Solüsyonlar

3.1.6.1. PZR İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

Primerler

Liyofilize haldeki primerler üretici firmanın önerileri doğrultusunda stok konsantrasyonu 100 pmol/ μ L olacak şekilde steril distile su ile çözüldü. Her bir primerin son konsantrasyonu 10 pmol/ μ L olması için 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine stok çözeltiden 20 μ L ve üzerine 180 μ L steril distile su eklendi ve -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.6.2. Agaroz jel Elektroforezi için Kullanılan Solüsyonlar

50X TAE Tamponu

Beher içerisinde 242 g Tris Base, 57.1 ml glasiyel asetik asit, 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 700 mL distile su ile manyetik karıştırıcıda çözülüp berraklaştıktan sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve pH metre ile pH 8.0-8.5'e ayarlandı, otoklav ile steril edildi.

Etidyum Bromür

Son konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde Etidyum bromür (EtBr) homojen bir şekilde çözüldü ve koyu renkli cam şişede oda ısısında saklandı.

3.1.6.3. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar

Tris HCl

Solüsyonun konsantrasyonu 1 M olması için 31.52 g Tris HCl 200 mL distile su içerisinde çözüldü, pH 8.0 ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

EDTA

Solüsyonun konsantrasyonu 0.5 M olması için 29.2 g EDTA 200 mL distile su içerisinde homojen hale gelene kadar çözüldü, NaOH pelleti ile pH 8.0'e ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Tris-EDTA (TE) Tamponu

Steril cam şişe içerisinde 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde 1 M Tris HCl'den 5 mL, 0.5 M EDTA'dan 1 mL alınarak steril distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2X Hücre Lizis Solüsyonu

Son konsantrasyonları, 12 mM Tris, 2 M NaCl, 200 mM EDTA, %1 Brij 58, %0.4 Deoksikolat, %5 Sarkozil olacak şekilde hazırlandı. Solüsyon için 1 M Tris-HCl (pH 8.0) solüsyonundan 1.2 mL, 5 M NaCl'den 40 ml, 0.5 M EDTA (pH 8.0) solüsyonundan 40 mL, 1 g Brij 58, 0.4 g Deoksikolat, 5 g Sarkozil ve 100 ml steril ultrasaf su ile dil e edildi.

PIV Solüsyonu

Hazırlamak için 1 M Tris-HCl (pH 8.0) solüsyonundan 5 mL, 5 M NaCl'den 100 mL alınarak steril ultrasaf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

Lizozim

Son konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde 100 mg lizozim tartıldı ve 5 mL TE tamponu içerisinde     ld . 250  L hacimlerde santrifüj tüplerine bölünerek -20 C'de saklandı.

Mutanolisin

Son konstarasyonu 5 U/ L olacak şekilde 1 mL TE tamponu içerisinde liyofilize haldeki Mutanolizin     ld . Kullanılınca kadar 50  L hacimlerde santrifüj tüplerine bölünerek -20  C'de saklandı.

5X TBE Tamponu

Distile su içerisinde 54 g Tris Base, 27.5 g Borik Asit ve 3.72 g EDTA manyetik karıştırıcı yardımıyla     l p berrakla tıktan sonra hacmi 1000 mL' ye tamamlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

Proteinaz K (10 mg/mL)

Proteinaz K 100 mg tartıldı ve 10 mL steril distile su içerisinde     ld . Küçük hacimlere bölünerek kullanınca kadar -20  C'de saklandı.

ES Solüsyonu

Solüsyonu hazırlamak için 500 mL 0,5 M EDTA içerisinde 50 g Sarkozil       ld .

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek Toplanması

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Aralık 2017-Ekim 2020 tarihleri arasında toksin araştırılması için gönderilen dışkı örnekleri toplandı.

3.2.2. Örneklerin Saklanması

Dışkı örneklerinden yöntemde yapılan modifikasyon ile yaklaşık 200 µL alınarak serum fizyolojik ve fosfat tampon çözeltisi içerisine aktarıldı ve iki ayrı tüp 1 mL olarak -20°C, -80°C'de saklandı (88).

3.2.3. *C. difficile* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Önceden -80°C'de saklanan dışkı örneklerinden bir öze ile direkt olarak CCFA besiyerine ekim yapıldı. Alfa ve ark.'larının alkol şok yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Sporların germinasyonunun sağlanması amacı ile dışkı örneği 1:1 oranında %96'lık etanol ile karıştırıldı ve vortekslendi. Bir saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısmı atıldıktan sonra pelet kısmından CCFA besiyerine ekim yapıldı. Ekim yapılan plaklar anaerob ortam sağlayan anaerob gaz poşetleri içerisinde 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı (89).

Bakterilerin identifikasyonu, geleneksel yöntemler (koloni morfolojisi, karakteristik koku, gram boyama) ve MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile yapıldı (90). *C. difficile* olarak tiplendirilen izolatlar %10 gliserol içeren BHI besiyerinde -80°C'de saklandı (70). Saklanan izolatların diğer çalışmalar için yeniden canlandırma aşamasında, örnekler *C. difficile* Mannitol Taurocholate Broth'a aktarılarak anaerob ortamda 37°C'de 24 saat zenginleştirme yapıldı (91, 92).

3.2.4. DNA İzolasyonu

EcoPURE Genomic DNA Kit (Ecotechbiotech, Türkiye) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izalasyonu yapıldı.

3.2.5. Master Mix Hazırlanması

PZR reaksiyonunda kullanılan Master Mix'in içerisinde bulunan bileşenler ve miktarları Tablo 1'de verildi. DNA hariç bileşenler belirtilen miktarlarda alınarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve 30 sn vorteks yardımı ile karıştırıldı. Her bir örnek için 0.2 mL'lik PZR

tüplerine 18 µL dağıtıldı. Negatif kontrol olarak steril su, pozitif kontrol olarak *C. difficile* ATCC BAA1870 izolatına ait DNA ve her örnek için üzeri numaralandırılmış tüplere 2 µL DNA otomatik pipet yardımı ile aktarıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 1. Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X FIREPol Master Mix	4 µL	1X
Forward Primer (10pmol/mL)	0.6 µL	0.3 µM
Reverse Primer (10pmol/mL)	0.6 µL	0.3 µM
DNA	2 µL	0.1-10 ng/ µL
H ₂ O	12.8 µL	

3.2.6. Toksin Genlerinin Araştırılması

Toksin A için *tcdA*, Toksin B için *tcdB* ve binary toksin için *cdtA* ve *cdtB* genlerinin varlığı Tablo 2’de verilen primerler kullanılarak PZR ile araştırıldı. Polimeraz zincir reaksiyon koşulları; 94 °C’de 10 dakika, 35 siklus 94 °C’de 50 saniye, 58 °C’de 40 saniye, 72 °C’de 50 saniye ve son 72 °C’de 3 dakikadır (93).

Tablo 2. Toksin genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Adı	Sekans (5’-3’)	Ürün uzunluğu (bp)
<i>tcdA</i>	<i>tcdA</i> -F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	629
	<i>tcdA</i> -R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
<i>tcdB</i>	<i>tcdB</i> -F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	410
	<i>tcdB</i> -R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	
<i>cdtA</i>	<i>cdtA</i> -F739A	GGGAAGCACTATATTAAAGCAGAAGC	221
	<i>cdtA</i> -F739B	GGGAAACATTATATTAAAGCAGAAGC	
<i>cdtB</i>	<i>cdtA</i> -R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	262
	<i>cdtB</i> -F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	
	<i>cdtB</i> -R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

%2'lik elektroforez jeli için, 2 gr agaroz 100 mL 1X TAE içerisinde mikrodalga fırında ara ara karıştırılarak agarozun tamamen erimesi sağlandı. Agaroz 55°C'ye kadar soğutuldu ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklendi. Düz bir zemin üzerinde tarak yerleştirilmiş olan jel kabına baloncuk oluşturulmadan döküldü. Donan jel tarak çıkarılıp yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Her kuyucuğa sırasıyla örneklerden 5 µL yükleme yapıldı. İlk 15 dakika örnekler kuyucuktan çıkana kadar 75 voltta daha sonra 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

3.2.8. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE)

3.2.8.1. Bakterilerin Hazırlanması

PulseNet PFGE protokolünde modifikasyonlar yapılarak (94, 95); saklanan *C. difficile* izolatları tek koloni pasajı için %5 koyun kanlı agar ekildi ve anaerob koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Saf üreyen plaklardan tek koloni alınıp 10 mL maya ekstraktlı BHI broth'a aktarıldı ve anaerob koşullarda bulanıklaşmaya kadar inkübe edildi. Lizozim (20 mg/mL) ve Mutanolizin (5 U/µL) -20°C'den çıkarıldı. Önceden 37±2°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosuna 2X Hücre lizis solüsyonu, buz içerisinde de PIV solüsyonu yerleştirildi. Kültürler buz üzerinde 50 mL'lik falkon tüplere aktarıldı ve 1500 g 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Her örnek için 3.6 mL PIV solüsyonu ve 400 µL %37'lik Formaldehit karışımı hazırlandı. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı çamaşır sulu atık kutusuna boşaltıldı. Her bir bakteri pellete Formaldehit içeren PIV solüsyonundan 4 mL eklendi ve nazıkçe süspanse edildi. Daha sonra 15 dakikada bir hafifçe çalkayarak 1 saat buz üzerinde tutuldu ve 1500 g 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant kabin içerisinde atık kabına boşaltıldı ve buz üzerinde 4 mL PIV solüsyonu içerisinde yeniden süspanse edildi ve santrifüj yapıldı. Bu aşama en az iki tekrarlı şekilde yapıldı.

3.2.8.2. Bakterinin Agaroz Gömülmesi

Agaroz blokları hazırlamak için kullanılacak %1.8'lik agaroz için 0,18 g düşük erimeli agaroz tartıldı ve 10 mL TE tamponu içerisinde hafifçe karıştırıldı. Mikrodalga yardımıyla çözdürüldü. Önceden 55±2°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda kullanılıncaya kadar bekletildi. Lizis karışımı hazırlamak için 500 µL önceden ısıtılmış 2X hücre lizis solüsyonu, 0.2 µL RNase (100 mg/mL), 4 µL Mutanolisin ve 50 µL lizozimden koyuldu. Her bakteri pelleti 500 µl lizis karışım ile yeniden süspanse edildi ve

numaralandırılmış santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücre süspansiyonuna 500 µl düşük erimeli agaroz eklendi ve birkaç kez pipetle karıştırıldı. Pipet yardımıyla agaroz kalıplarına aktarıldı. Agaroz kalıpları en az 15 dakika 4°C’de bekletilerek agarozun donması sağlandı.

3.2.8.3. Bakteri Lizis ve Yıkama

Hücre lizis karışımı için 2 mL 2X Hücre Lizis solüsyonu, 2 mL distile su, 0.8 µl RNase (100 mg/mL), 16 µl Mutanolisin ve 200 µl Lizozimden alındı. Hazırlanan karışımdan her örnek için 4 mL önceden ısıtılmış 50 mL’lik falkon tüplere aktarıldı ve donan agaroz kalıpları lizis solüsyonunun içerisine alındı. Falkon tüpler çalkalamalı su banyosunda 37°C’de ve yaklaşık 60 rpm’de gece boyunca inkübe edildi.

Bir şişe distile su ve iki şişe TE tamponu 50 ± 2 °C bir sıcak su banyosuna koyuldu. Agaroz kalıpların içinde olduğu lizis solüsyonu çamaşır suyu bulunan atık kabına boşaltıldı. Her bir falkona 4 mL önceden ısıtılmış TE tamponu eklendi ve TE tamponu atık kabına boşaltıldı. ProteinazK son konsantrasyonuna uygun hacmi belirlemek için “(ProteinazK stok kons.) (X) = (0.1 mg / ml) (4 ml)” formülü kullanıldı. ProteinazK eklenen ES solüsyonundan her bir falkona 4 mL aktarıldı. Falkon tüpler 50°C’de yaklaşık 60 rpm’de 3 saat çalkalama sıcak su banyosunda inkübe edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Lizis solüsyonu atık kabına boşaltıldı. Falkon tüplere 10 mL önceden ısıtılmış distile su eklendi ve 50°C’de yaklaşık 60 rpm’de 10 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi ve kullanılan distile su atık kabına boşaltıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı. Her 50 mL’lik falkon tüpe 20 mL önceden ısıtılmış TE tamponu eklendi ve 50°C’de yaklaşık 60 rpm’de 10 dakika inkübe edildi ve TE tamponu atık kabına boşaltıldı. TE tamponu ile yıkama dört kez tekrarlandı. Agaroz kalıplar 1 mL TE tamponu içerisinde kullanılıncaya kadar 4°C’de saklandı.

3.2.8.4. Restriksiyon Enzimi ile DNA’nın Kesilmesi

Agaroz kalıplar 2.0-2.5 mm genişliğinde kesilerek mikrosantirüfj tüplerine koyuldu. Her bir örnek için 200 mL *Sma*I tamponu eklendi. Çalkalamalı su banyosunda 25°C’de 10 dakika inkübasyonun ardından tampon pipet yardımıyla aspire edildi. Sonrasında üzerine her bir izolat için 200 µL *Sma*I enzim karışımı koyuldu. Çalkalamalı su banyosunda 37°C’de bir gece inkübe edildi.

3.2.8.5. Elektroforez Aşaması

Elektroforez aşaması için %1 (wt/vol) konsantrasyona sahip jel, pulsed-field certified agarose plus 0.5X TBE tamponu ile çözülerek hazırlandı. Sıcak su banyosunda jelin 45-50°C aralığında sabit sıcaklıkta kalması sağlandı. Agarozun eşit dağılımı için düz bir zemin üzerinde bulunan ve kesim işlemi gerçekleştirilen agaroz plugların yerleştirildiği tarağın olduğu kasete agaroz dökülerek jel donmaya bırakıldı. Yaklaşık 30 dakika sonra donan jelden tarak agarozdan uzaklaştırıldı. Son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde tiyoüre yürütme tamponu içerisine eklendi. CHEF-DR III sistemi kullanılarak gerçekleştirilen elektroforez işlemi için; içerisinde 2 L 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına jel yerleştirildi. Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 40 sn, vuruş açısı 120, akım 6 V/cm² ve toplam süre 20 saat agaroz jel yürütüldü.

3.2.8.6. Sonuçların Görüntülenmesi ve Analizi

Jeli görüntülemek için 400 mL ultra saf suya 10 mg/mL'lik EtBr solüsyonundan 40 µL eklenerek solüsyon hazırlandı ve 30 dakika boyandı. Boyayı uzaklaştırmak için jel bir saat 400 mL ultra saf su içerisinde bekletildi. VersaDoc™ görüntüleme sistemi ile jel görüntülendi ve fotoğrafı çekildi. Elde edilen PFGE bant profillerinin küme analizi, UPGMA yöntemi ile %1.1 optimizasyon ve %1.1 tolerans kullanılarak Dice benzerlik katsayısı ile Bionumerics yazılım sistemi (version 8.0; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium) ile dendrogram oluşturularak analiz edildi. >%80 benzerliğe sahip olan suşlar tek bir pulstotip olarak değerlendirildi (96).

3.2.9. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

3.2.9.1. Gradyent Test

Klonal ilişkilerine göre seçilen 30 izolat tek koloni pasajı için BKA ekildi. İnkübasyon sonunda izolatlar bakteri yoğunluğu CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD), cihazı kullanılarak 1.0 McFarland olarak ayarlandı. Eküvyon yardımıyla Hemin ve K1 vitamin ilaveli BKA'a ayarlanan süspansiyondan yayma ekim yapıldı. Daha sonra belirli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş ticari gradiyent test şeritleri plak yüzeyine yerleştirildi ve anaerob ortamda 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gradiyent testin inhibisyon elipsini kestiği değer Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlendi. Vankomisin sonuçları "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" kriterlerine, klindamisin ve

moksifloksasin sonuçları “Clinical and Laboratory Standard Institute” kriterlerine ve metronidazol hem EUCAST hem de CLSI kriterlerine göre yorumlandı (97, 98).

3.2.9.2. Agar Dilüsyon Yöntemi

Fidaksomisin stok solüsyonu, “Hacim (mL) = (Ağırlık (mg) x Potens (µg/mg)) / Konsantrasyon (µg/mL)” formülü ile en yüksek konsantrasyonun 10 katı şeklinde hazırlandı. En yüksek konsantrasyondan başlanarak steril su ile 160-0.08 µg/mL aralığında dilüsyonlar hazırlandı. Otoklavlanmış BKA önceden ısıtılmış sıcak su banyosunda 50°C’ye soğutuldu ve %5 olacak şekilde koyun kanı eklendi. Antibiyotik dilüsyonlarından 2 mL ve %5 koyun kanlı BKA’dan 18 mL alınarak son konsantrasyonları 16-0.008 µg/mL olacak şekilde petri plakları hazırlandı. Kontrol olarak antibiyotik ilavesiz %5 koyun kanlı BKA petri plağına döküldü. İzolatların tamamı BKA ekildi ve 48 saat sonra kolonilerden bakteri yoğunluğu CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD) cihazı kullanılarak 0.5 McFarland olarak ayarlandı. Her örnekten petri plaklarının üzerine 10 µL damlatıldı. Antibiyotik ilaveli plaklar ve üreme kontrolü için antibiyotiksiz plaklardan biri anaerob ortamda, diğeri kontaminasyon kontrolü için aerob ortamda 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üremenin olmadığı ilk plaktaki antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi (99, 100).

MİK50 değerleri olarak test edilen bakteri izolatlarının %50’sinin üremesini inhibe eden en düşük MİK değeri alındı. MİK90 değeri olarak test edilen bakteri izolatlarının %90’ının üremesini inhibe eden MİK değeri alındı (101).

3.2.10. Bakteriyofaj İzolasyonu

3.2.10.1. PZR ile Bakteriyofaj Holin Geni Tarama

İzolatlarda bakteriyofaj varlığını belirlemek amacıyla, *C. difficile* miyovirüsler ve sifovirüslerin holin gen dizilerindeki korunmuş bölgelere karşı Shan ve ark.’larının önerdiği PZR primerleri ve koşulları kullanıldı (102). Miyovirüsler ve sifovirüsler holin gen primer çiftleri Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. *C. difficile* miyovirüsleri ve sifovirüsleri holin gen primerleri

Primer Adı	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)
CDHmyoF	TATACCAGAGCAGTTRCTRA	227
CDHmyoR	CMTCCCTTCAAYTGTTTGTA	
CDHsiphoF	TTATGCGCTTTGCTRTTYAA	150
CDHsiphoR	MGTTTTTCATTGCTCCCATTT	

3.2.10.2. İndükleme ile Lizojenik Faj İzolasyonu

PZR ile tarama sonucunda en az bir gen açısından pozitif olan izolatlar Mitomisin C ile indüklenerek lizojenik faj izolasyonu yapıldı. Bunun için üretilen kolonilerden sıvı kültüre ekim yapıldı. Sıvı kültür log faza geldiği zaman *C. difficile* kültürüne son konsantrasyon 3 µg/ml olacak şekilde Mitomisin C ilave edildi. 24 saat sonra 11000 rpm 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Filtratlar, faj partiküllerini konsantre etmek için polietilen glikol (PEG) 8000 ve NaCl bir gece 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 11000 rpm 15 dakika santrifüj edilen lizatlardan geriye kalan pellet SM buffer içerisinde çözüldü.

Lizatlarda faj varlığını gözlemlemek için damlatma metodu ile faj taraması yapıldı. Bunun için sıvı besiyerinde 16-18 saat log faza gelen *C. difficile* kültürü 0.01 M CaCl₂, 0.01 M MgCl₂ ilave edilmiş %0.75 yumuşak agar BHI besiyerine karıştırıldı ve BHI agar plaklarının üzerine döküldü. Donan agar üzerine 5 µL faj lizatlarından damlatıldı ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda damlatılan alanlardaki zon faj olarak değerlendirildi (69, 102, 103).

4. BULGULAR

4.1.Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler

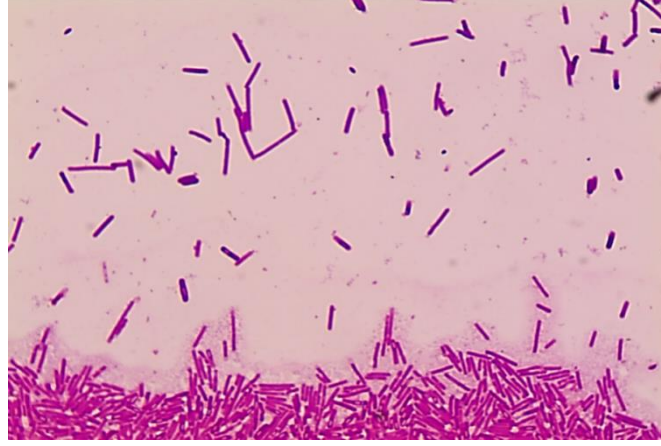
Aralık 2017- Ekim 2020 tarihleri arasında immunokromatografik kart test ile *C. difficile* toksin araştırılmasına gelen 825 dışkı örneği saklandı. İmmunokromatografik kart test ile 14 örnek Toksin A, 115 örnek Toksin B pozitif ve 40 örnek Toksin A ve B pozitif olmak üzere toplam 169 örnek toksin pozitifti. Çalışmaya dahil edilen toplam 825 örneğin %20.48'i immunokromatografik kart test ile en az bir toksin açısından pozitifti.

4.2. *C. difficile* İzolatları

169 örnek toksin pozitif ve 656 örnek toksin negatif olmak üzere toplam 825 örneğin kültür işlem sonucunda 52 (%7.92) toksin negatif, 14 (%8.28) toksin pozitif örnekten 66 (%8) hastaya ait toplam 56 *C. difficile* izolatu geleneksel yöntemler (koloni morfolojisi, kendine özgü kokusu, gram boyama) ve MALDI-TOF MS ile tanımlanarak -80°C'de saklandı. *C. difficile* izolatlarının CCFA besiyerinde ve UV ışığı altında koloni morfolojisi Resim 1'de ve gram boyama görüntüsü Resim 2'de verildi.



Resim 1. CCFA besiyerinde ve UV ışığı altında *C. difficile* kolonileri



Resim 2. *C. difficile* izolatının gram boyama görüntüsü

Kültür işlemine alınan örnek sayısı, örneklerin toksin test sonuçları, izole edilen *C. difficile* sayısı ve yüzdesi Tablo 4’de verildi.

Tablo 4. *C. difficile* izolat sayıları

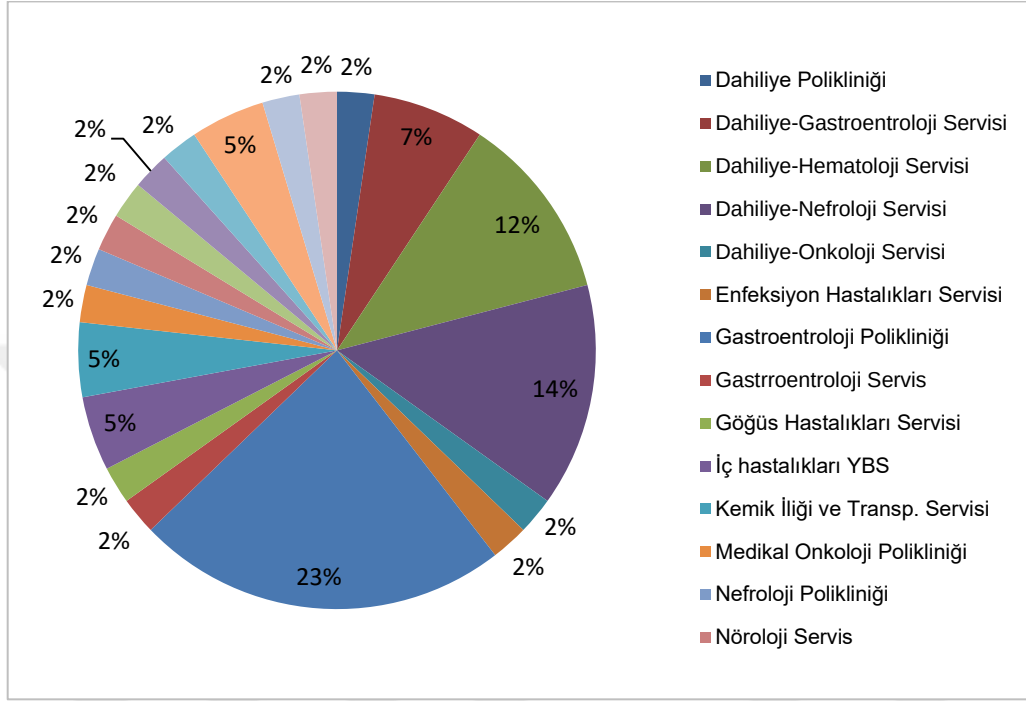
	Örnek sayısı (n)	<i>C. difficile</i> izolat sayısı (n/%)
Toksin pozitif	169	14 (8.28)
Toksin negatif	656	52 (7.92)
Toplam	825	66 (8)

İlk izolasyondan sonra saklanan 56 *C. difficile* izolatından stoktan canlandırma işlemi sonunda 43 hastaya ait 43 izolat canlandırıldı. Çalışma grubu olarak belirlenen 43 *C. difficile* izolatına ait gönderildikleri birim, tarih ve immunokromatografik kart test sonuçları Tablo 5’te gösterildi. Çalışmaya dahil edilen örneklerin ait olduğu hasta grubunun yaş ortalaması erkeklerde 46.12, kadınlarda 50.92’ydi. Hastaların 16’sı (%37.2) erkekler, 27’si (%62.8)’ini kadınlar oluşturmaktaydı.

Tablo 5. *C. difficile* immunokromatografik kart testlerinin sonuçları, istek yapılan tarih ve birimler

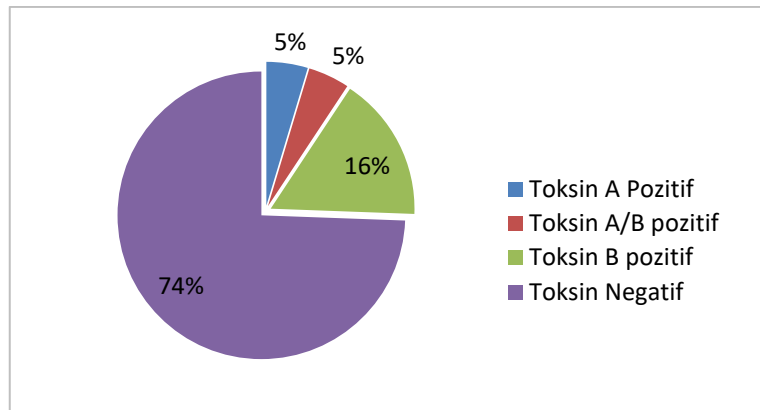
İzolat No	Tarih	İmmunokromatografik kart test	Birimi
CD01	03.01.2018	Toksin A Pozitif	Dahiliye-Nefroloji Servisi
CD02	17.01.2018	Toksin Negatif	İç hastalıkları YBS
CD03	09.04.2018	Toksin Negatif	Kemik İliği ve Transp. Servisi
CD04	18.04.2018	Toksin Negatif	Dahiliye-Onkoloji Servisi
CD05	19.04.2018	Toksin B zayıf Pozitif	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
CD06	25.04.2018	Toksin B Pozitif	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
CD07	23.07.2018	Toksin Negatif	Kemik İliği ve Transp. Servisi
CD08	03.09.2018	Toksin Negatif	Dahiliye-Nefroloji Servisi
CD09	28.09.2018	Toksin B Pozitif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD10	01.10.2018	Toksin Negatif	Pediatrici(Adölesan) Servisi
CD11	12.10.2018	Toksin Negatif	Pediatrici Gastroenteroloji Pol.
CD12	14.10.2018	Toksin Negatif	Dahiliye-Hematoloji Servisi
CD13	07.11.2018	Toksin B pozitif	Gastroenteroloji Servis
CD14	26.11.2018	Toksin Negatif	Pediatrici Acil Polikliniği
CD15	12.12.2018	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD16	11.01.2019	Toksin Negatif	Göğüs Hastalıkları Servisi
CD17	15.01.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Hematoloji Servisi
CD18	22.01.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD19	25.01.2019	Toksin Negatif	Pediatrici (Süt çocuğu) servisi
CD20	30.01.2019	Toksin A/B pozitif	Dahiliye-Hematoloji Servisi
CD21	06.02.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Hematoloji Servisi
CD22	06.02.2019	Toksin Negatif	Organ Nakli Polikliniği
CD23	18.02.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD24	19.02.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD25	04.03.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD26	07.03.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Hematoloji Servisi
CD27	08.03.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD28	12.03.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
CD29	12.03.2019	Toksin Negatif	Dahiliye Polikliniği
CD30	22.03.2019	Toksin A pozitif	Dahiliye-Nefroloji Servisi
CD31	30.03.2019	Toksin Negatif	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi
CD32	02.04.2019	Toksin Negatif	İç hastalıkları YBS
CD33	02.05.2019	Toksin B pozitif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD34	02.05.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Nefroloji Servisi
CD35	09.05.2019	Toksin B pozitif	Sağlık Kurulu
CD36	17.07.2019	Toksin Negatif	Pediatrici (Adölesan) Servisi
CD37	18.07.2019	Toksin Negatif	Dahiliye-Nefroloji Servisi
CD38	22.07.2019	Toksin Negatif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD39	23.07.2019	Toksin Negatif	Medikal Onkoloji Polikliniği
CD40	19.08.2019	Toksin Negatif	Nefroloji Polikliniği
CD41	28.08.2019	Toksin Negatif	Nöroloji Servis
CD42	04.11.2019	Toksin B pozitif	Gastroenteroloji Polikliniği
CD43	25.09.2020	Toksin A/B pozitif	Dahiliye-Nefroloji Servisi

Çalışma grubundaki izolatların 17 (%39.53)'si polikliniklerden ve 26 (%60.47)'si servislerden gelen örneklerden izole edildi. Örneklerin kliniklere göre dağılımı Şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. Örneklerin kliniklere göre dağılımı

Çalışmaya dahil edilen izolatların immunokromatografik kart test ile toksin sonuçları; 2 Toksin A pozitif, 7 Toksin B pozitif/zayıf pozitif, 2 Toksin A ve B pozitif ve 32 Toksin negatifti (Şekil 4).

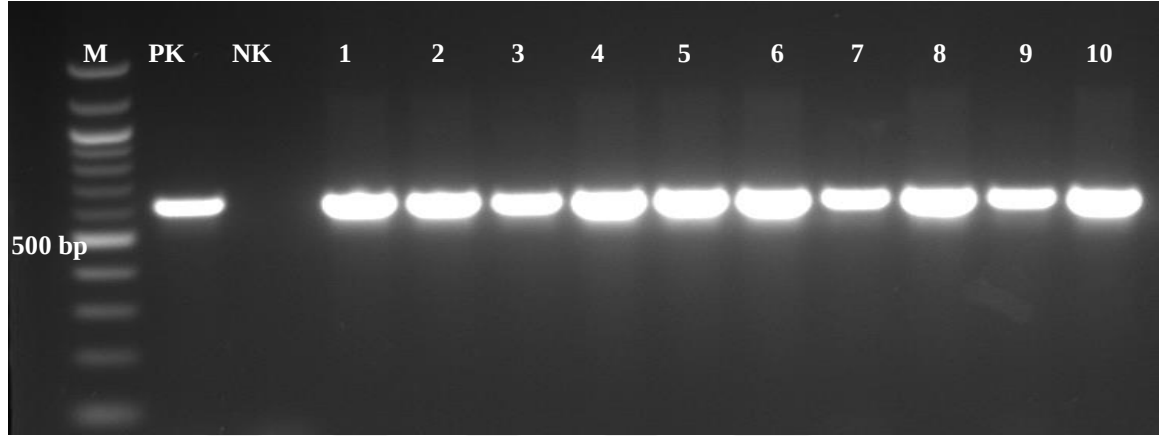


Şekil 4. İmmunokromatografik kart test ile toksin sonuçları

4.3. Toksin Genlerinin PZR ile İncelenmesi

4.3.1. *tcdA* Geninin Amplifikasyonu

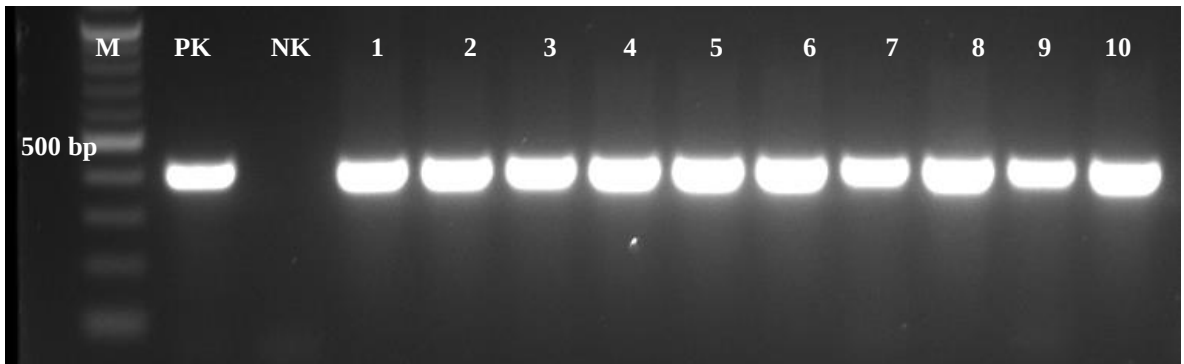
tcdA genine özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 43 *C. difficile* izolatının tamamında (%100) 629 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı (Resim 3).



Resim 3. *tcdA* geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M; 100 bp DNA Marker, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif Kontrol, 1-10; *C. difficile* izolatları)

4.3.2. *tcdB* Geninin Amplifikasyonu

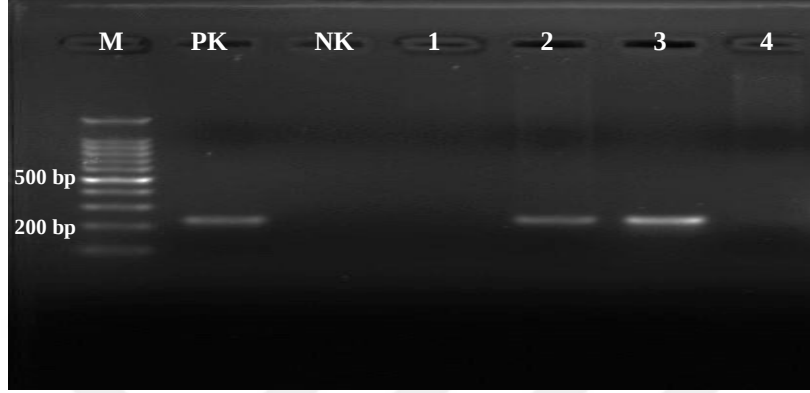
tcdB genine özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 43 *C. difficile* izolatının tamamında (%100) 410 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı (Resim 4).



Resim 4. *tcdB* geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M; 100 bp DNA Marker, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif Kontrol, 1-10; *C. difficile* izolatları)

4.3.3. *cdtA* Geninin Amplifikasyonu

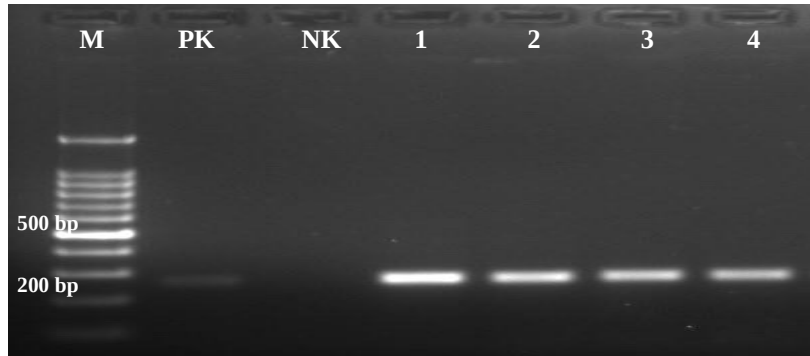
cdtA genine özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 14 *C. difficile* izolatında (%32.6) 221 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı (Resim 5).



Resim 5. *cdtA* geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M; 100 bp DNA Marker, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif Kontrol, 1-4; *C.difficile* izolatları)

4.3.4. *cdtB* Geninin Amplifikasyonu

cdtB genine özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 25 *C. difficile* izolatında (%58.1) 262 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı (Resim 6).



Resim 6. *cdtB* geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M; 100 bp DNA Marker, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif Kontrol, 1-4; *C. difficile* izolatları)

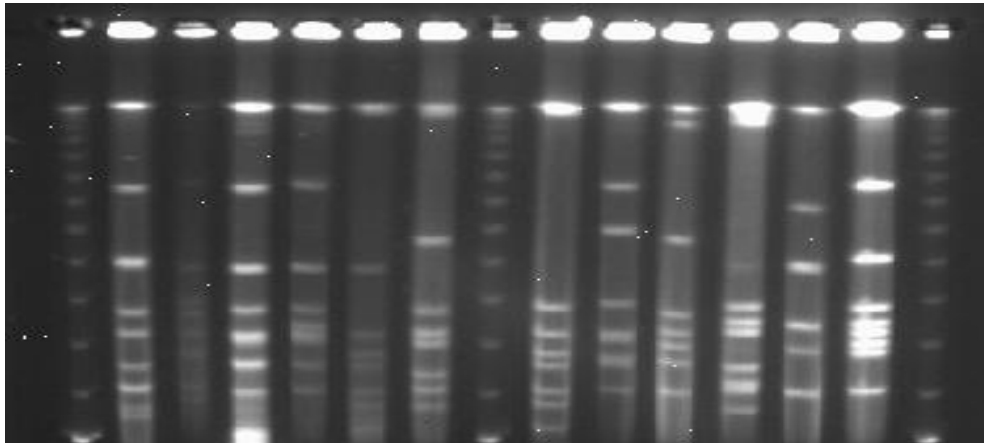
Kırk üç izolatta *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB* toksin genlerinin birlikte bulunma durumları Tablo 6'da verildi.

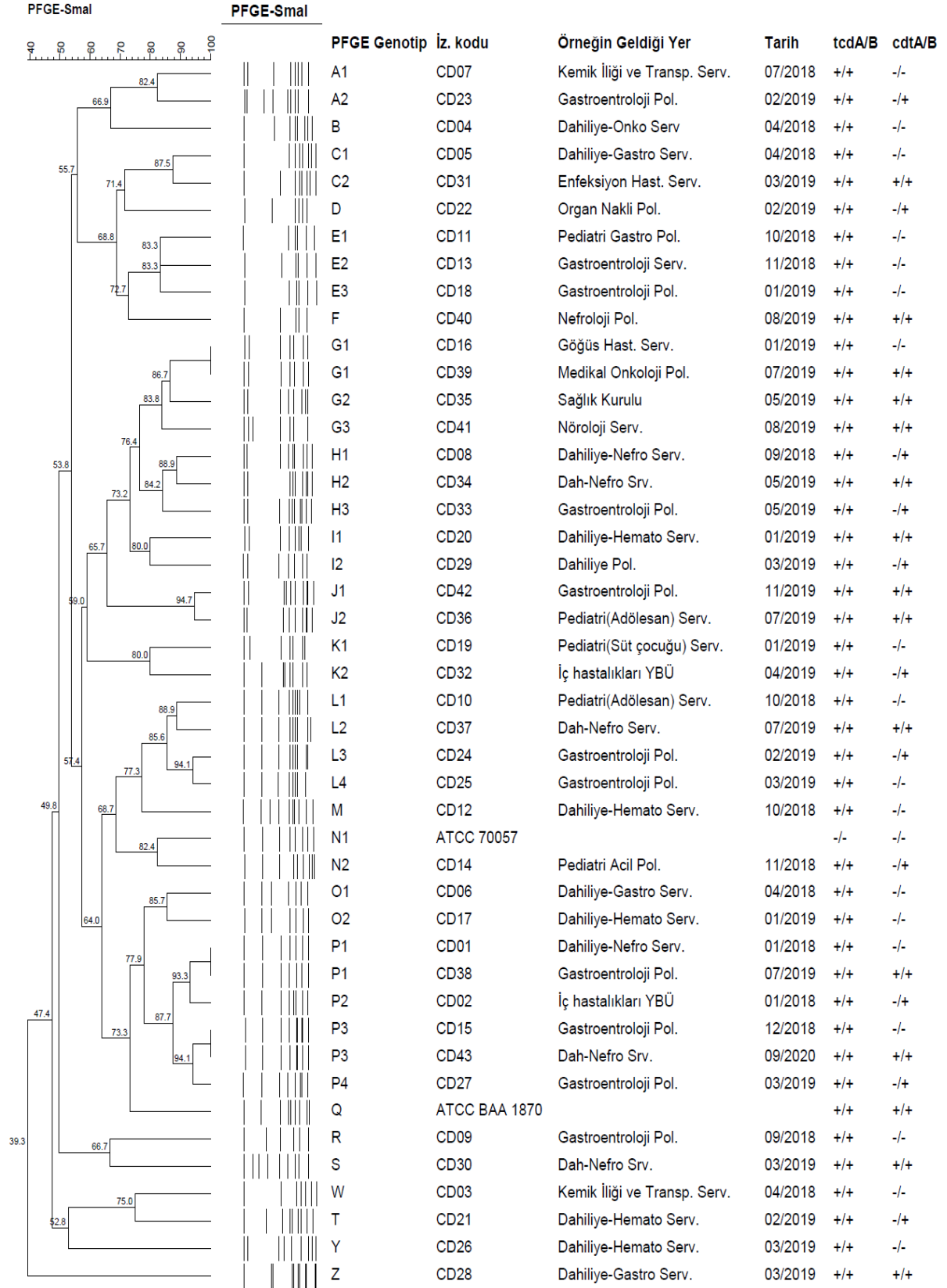
Tablo 6. İzolatların toksin gen profili

Toksin Profili	Gen	Binary toksin % (n)			
		<i>cdtA</i> +	<i>cdtA</i> +	<i>cdtA</i> -	<i>cdtA</i> -
		<i>cdtB</i> +	<i>cdtB</i> -	<i>cdtB</i> +	<i>cdtB</i> -
<i>tcdA</i> +	<i>tcdB</i> +	32.6 (14/43)	0	25.6 (11/43)	41.8 (18/43)

4.4. İzolatların PFGE Yöntemiyle Klonal İlişkilerinin Araştırılması

C. difficile ATCC 700057 ve ATCC BAA1870 ile 43 klinik *C. difficile* izolatının klonal ilişkisi PFGE yöntemi ile belirlendi. İzolatların bir grubuna ait PFGE jel görüntüsü Resim 7’de verildi. PFGE ile tiplendirmesi yapılan 43 izolatın benzerliği %39.3 olarak belirlendi. İzolatlar 23 ana grup ve bu gruplarda 31 alt gruba ayrıldı. Pulsotip P (n=6) en büyük kümeyi oluşturmaktaydı ve içerisindeki alt tiplerde yer alan izolatlar %87.7 oranında benzerlik gösterdi. Pulsotip C’de (n=2) %87.5, pulsotip L’de (n=4) %85.6 ve pulsotip O’da (n=2) %85.7 benzerlik saptandı. Pulsotip H’da (n=3) %84.2, pulsotip G’de (n=4) %83.8, pulsotip E’de (n=3) %83.3, pulsotip N’de (n=2) %82.4, pulsotip I’da (n=2) ve pulsotip K’da (n=2) %80 oranında benzerlik bulundu. Pulsotip J’de (n=2) yer alan izolatlar %94.7 oranında benzerlik gösterdi. G1 (n=2), P1 (n=2) ve P3 (n=2) alt tiplerinde birbirleriyle %100 benzerlik gösteren ikişer izolat saptandı. Klinik ve poliklinik hasta izolatları arasında identik ve yüksek oranda benzer bant paternleri saptandı. İzolatların 11’i özgül (singleton) PFGE profili gösterdi. İzolatların tamamının dendogram görüntüsü Şekil 5’te verildi.

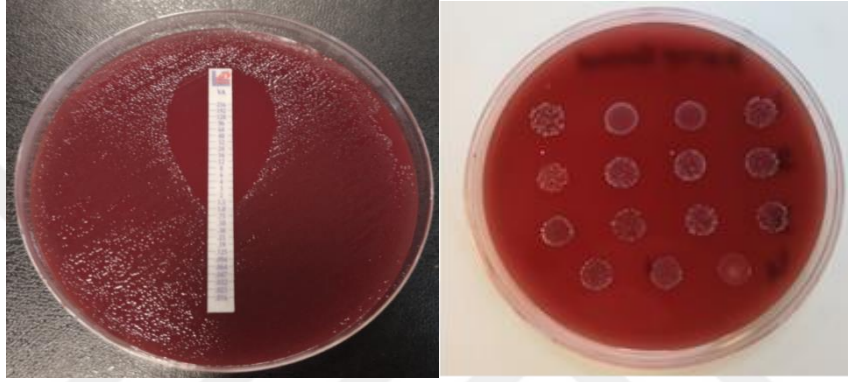
**Resim 7.** PFGE jel elektroforez görüntüsü



Şekil 5. *C. difficile* izolatlarının PFGE profillerinin dendrogramı

4.5. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

İzolatların EUCAST kriterlerine göre, vankomisine %100; CLSI kriterlerine göre moksifloksasine %90 ve klindamisine %60; hem EUCAST hem de CLSI kriterlerine göre metronidazole %100 duyarlı olduğu bulundu. EUCAST ve CLSI’da sınır değerleri bulunmayan eritromisin, tigesiklin ve fidaksomisin MİK değerleri sırasıyla, 0.25-≥256 µg/mL, ≤0.016-0.047 µg/mL ve 0.008-0.25 µg/mL arasında saptandı. Antimikrobiyallerin MİK değer aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri Tablo 7’de verildi.



Resim 8. *C. difficile* izolatında gradiyent şerit ve agar dilüsyon test örneği

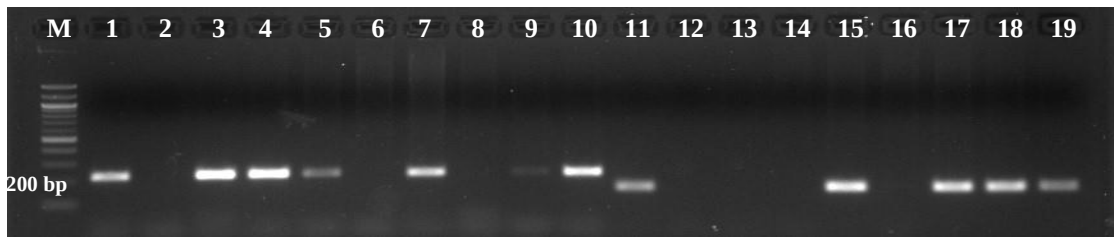
Tablo 7. İzolatların antimikrobiyal MİK değerleri

	MİK değer aralığı (µg/mL)	MİK50 (µg/mL)	MİK90 (µg/mL)
Vankomisin	0.38 - 2	1.5	1.5
Moksifloksasin	0.25 - ≥ 32	1	1.5
Klindamisin	0.19 - ≥ 256	2	6
Metronidazol	0.064 – 0.5	0.25	0.38
Eritromisin	0.25 - ≥ 256	1	4
Tigesiklin	≤ 0.016 - 0.047	0.032	0.047
Fidaksomisin	0.008 - 0.25	0.06	0.25

4.6. *C. difficile*'nin Bakteriyofajları

4.6.1. PZR ile Bakteriyofaj Holin Geni Taraması

Profaj taşıyıcılığını saptamak için bir işaret olan holin geni, Miyovirüs ve Sifovirüs PZR ile izolatların 31 (%72.1)'inde Miyovirüse özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 227 bp büyüklüğünde, 17 (%39.5)'sinde Sifovirüse özgül primerlerle yapılan amplifikasyon sonucu 150 bp büyüklüğünde tanımlandı. İzolatların 10 (%23.3)'ünün her ikisini birlikte taşıdığı belirlendi (Resim 9).



Resim 9. Miyovirüs ve Sifovirüs holin genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M; 100 bp DNA Marker, 1-11; Pozitif kontrol, 2-12; Negatif Kontrol, 3-10,13-19; *C. difficile* izolatları)

4.6.2. İndükleme ile Lizojenik Faj İzolasyonu

PZR ile en az bir holin gen taşıdığı belirlenen 38 izolat Mitomisin C ile indüklendi. 43 *C. difficile* izolatı ve 2 ATCC izolatına karşı 38 faj lizatı damlatıldı. Faj lizatları en az bir konağı enfekte etti. Fajların konak spektrumu damlatma yöntemi ile belirlendi (Resim 10). En çok konağı enfekte eden fajlar ve sırasıyla enfekte ettikleri konak sayısı (Çalışma izolatı+ATCC); CD02, CD07, CD37, CD38, CD42 ve 36+2, 40+2, 38+2, 29+1, 32+1 olarak gözlendi (Tablo 8). En duyarlı konaklar 27 faja duyarlı CD20, 26 faja duyarlı CD43, 23 faja duyarlı CD31, 21 faja duyarlı CD21 ve 21 faja duyarlı CD32'iydi.



Resim 10. Faj-konak spektrumu damlatma yöntemi

Tablo 8. Faj ve konak spektrumu

Faj/konak	CD01	CD02	CD03	CD04	CD05	CD06	CD07	CD08	CD09	CD10	CD11	CD12	CD13	CD14	CD15	CD16	CD17	CD18	CD19	CD20	CD21	CD22	CD23	CD24	CD25	CD26	CD27	CD28	CD29	CD30	CD31	CD32	CD33	CD34	CD35	CD36	CD37	CD38	CD39	CD40	CD41	CD42	CD43	700057	BAA1870	konak sayısı
φCD 01	+		+		+	+		+	+				+		+	+	+								+			+		+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21+		
φCD 02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+			+	+	+	+	+	++		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	36+2	
φCD 03																	+																						+						2	
φCD 04																	+								+														+			+			4	
φCD 05	+	+	+	+	+		+						+							+	+			+				+									+				+	+	+	+	14+2	
φCD 06			+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+					+	+				+						+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25+1		
φCD 07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40+2	
φCD 08		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+				+			+		+	+					+	+	+				+	+		+	+	+	+	+	23	
φCD 09	+	+									+	+		+											+									+	+						+				8	
φCD 10				+							+	+	+	+													+				+		+	+						+	+	+	+	+	11+2	
φCD 11			+		+	+	+	+	+	+	+		+		+		+			+	+				+	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25+2		
φCD 12							+				+	+		+						+	+											+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	14+1		
φCD 13																	+																						+						2	
φCD 14																	+																						+						2	
φCD 15				+		+					+	+	+	+					+	+	+				+	+		+	+		+		+	+		+			+	+	+	+	+	+	19+2	
φCD 16			+		+	+	+	+	+		+	+		+	+					+	+										+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	20+2		
φCD 17											+	+		+	+						+	+			+											+	+	+					+	+	9+1	
φCD 18												+								+	+																							+	+	3+1
φCD 19			+				+											+	+	+				+					+	+			+	+		+					+				11	

[illegible][illegible]

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

C. difficile kırk yılı aşkın süredir insanlarda önemli enterik patojenlerden biri olmuştur. Genellikle enfeksiyon, gastrointestinal sistem mikrobiyotasının antimikrobiyallerin kullanımı sonrası bozulması ile ilişkilidir. *C. difficile*'nin öncelikle hastane kaynaklı bir enfeksiyon olduğu düşünülmekteydi. Son zamanlarda, toplumla ilişkili vakaların ortaya çıkması CDE'nin sadece hastane kaynaklı bir enfeksiyon olmadığını göstermektedir. Hastane kaynaklı CDE vakalarının çoğunluğunun genetik olarak birbirinden farklı olduğunu düşündüren tüm genom dizilimi ile birlikte, *C. difficile*'nin rezervuarlarının hastane dışından da olabileceğine dair güçlü kanıtlar ortaya çıkmıştır. CDE'nin bulaşmasında hastaneler önemli bir rol oynamakla birlikte, toksijenik *C. difficile* izolatlarının sıklıkla izole edildiği gıdalar ve çevre gibi ortamlar önemli rezervuarlardır (104, 105).

Toplum kaynaklı CDE için, olası rezervuarların insanlar, hayvanlar (domuz ve sığırlar), besin kaynakları ve çevre (atık su gibi) olduğu düşünülmektedir. Toplum kaynaklı CDE insidansındaki artış için, aile üyeleri aracılığıyla maruziyet en büyük faktördür. Sağlıklı bebeklerde genellikle hem toksijenik hem de toksijenik olmayan *C. difficile* izolatları kolonize olur ve iki yaşından küçük çocuklarla temas, toplum kaynaklı CDE için bir risk faktörü olabilir. Ayrıca Kanada'da yapılan prospektif bir çalışmada, toplum kaynaklı CDE ile ilişkili izolatların hastaneden edinilen CDE'den ayırt edilemeyeceği öne sürülmüştür (106, 107).

C. difficile izolatlarının küresel epidemiyolojik verilerinin kesin olarak elde edilmesi, sürekli değişen prevalans verileri ve sürveyans uygulamalarındaki farklılıklar nedeniyle oldukça zordur. Avrupa epidemiyolojik verileri, rapor edilen CDE insidansında büyük farklılıklar olduğunu göstermektedir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi tarafından yapılan 34 Avrupa ülkesinin 106 laboratuvarının dahil olduğu bir araştırmada, ağırlıklı ortalama insidansı 10.000 hasta günü başına 4.1 olarak bildirilmiş olup, ülkelerde insidans oranların 0.0-36.3 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Latin Amerika, Asya ve Afrika'da CDE'ye ilişkin güncel ve kapsamlı epidemiyolojik veriler sınırlıdır (46, 78, 108, 109).

2000'li yılların başında CDE epidemiyolojisinde önemli bir değişiklik meydana gelmiştir. Ayrıntılı sürveyans verileri olan çoğu ülkede, CDE oranları, tedaviye yanıt ve CDE'nin sonuçlarında belirgin değişiklikler olmuştur (109). NAP1/BI/RT027 olarak

bilinen, *C. difficile*'nin 'hipervirülan' florokinolon dirençli bir izolatı Kuzey Amerika'da ortaya çıkmıştır (110) ve Kanada'da CDE insidansı çarpıcı biçimde dört kat artarken, mortalite üç katına çıkmıştır. Kısa bir süre sonra, ABD ve Avrupa'da *C. difficile* RT 027'nin neden olduğu CDE salgınları rapor edilmiştir ve vakalar iki katına ulaşmıştır. O yıllardan beri, *C. difficile* RT 027, Kanada'nın tüm eyaletlerinde, çoğu Avrupa ülkesinde ve ABD'de ≥ 40 eyaletteki hastanelerden bildirilmiştir (111-115).

C. difficile enfeksiyonunun epidemiyolojisi, hipervirülan suşların hızlı bir şekilde ortaya çıkmasından kaynaklı patojenitesi, antibiyotik direnci ciddi anlamda değişmiştir ve yeni verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Genellikle *C. difficile* tanısı için hızlı tanı testleri ile toksin A ve B belirlenmektedir. Anaerob bakterilerin rutin olarak kültürü yapılmadığı ve antimikrobiyal duyarlılığı belirlenmediği için antimikrobiyal direnci ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Ülkemizde anaerob çalışmaların kısıtlı olması, *C. difficile* ile ilgili verilerin oldukça yetersiz kalmasına sebep olmaktadır (15, 16, 18, 109, 116).

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarına Aralık 2017-Ekim 2020 tarihleri arasında immunokromatografik kart test ile *C. difficile* toksin araştırılması için gelen dışkı örneklerinden *C. difficile* izole edilerek özellikleri belirlenmiştir. İmmunokromatografik kart teste ile 169'u (%20.48) toksin pozitif ve 656'sı (%79.52) toksin negatif olmak üzere toplam 825 örneğin kültür işlemi sonucunda, 52 (%7.92) toksin negatif, 14 (%8.28) toksin pozitif örnekten 66 (%8) hastaya ait toplam 56 *C. difficile* izole edilmiştir. Stoktan canlandırma işlemi sonucunda 43 *C. difficile* izolatı çalışılmıştır. Çalışma izolatlarının 17'si (%39.53) polikliniklerden ve 26'sı (%60.47) servislerden gelen örneklerden izole edilmiştir. Servislerden izole edilen izolat yüzdesi fazla olsa bile %39.53 ile polikliniklerden izole edilen izolat sayısı dikkat çekici düzeyde yüksektir.

2011-2012 yıllarında, Çek Cumhuriyeti'ndeki üç bölgesel hastanede, CDE insidansı 2011'de 100.000 kişi başına 145, 146 ve 24 vaka ve 2012'de 100.000 kişi başına 177, 258 ve 67 vaka olarak tespit edilmiştir (117).

Lessa ve ark.'ları (118), ABD'de 10 coğrafi bölgede toplam 15.461 *C. difficile* enfeksiyon vakasının %65.8'inin sağlık bakımıyla ilişkili olduğunu fakat sadece %24.2'sinin hastanede yatış sırasında başladığını tespit etmişlerdir. *C. difficile* enfeksiyonu tanısından sonra elde ettikleri verilere göre; ABD'deki tahmini *C. difficile* enfeksiyonu sayısı 453.000'dir. İnsidansın, kadınlar, beyazlar ve 65 yaş üstü kişilerde daha yüksek

olduğu tahmin edilmektedir. *C. difficile* enfeksiyonunun tahmini ilk nüks sayısı 83.000 ve tahmini ölüm sayısı 29.300 olarak hesaplanmıştır.

Karaaslan ve ark.'ları (119) çalışmalarına, Ocak 2012-Aralık 2014 tarihleri arasında hastaneye yatan 12196 çocuk hastayı dahil etmişlerdir. Hastaneye yatıştan 48 saat sonra diyare gelişen 986 (%8) çocuk hastayı CDE açısından araştırmışlar ve 100 (%0.8) çocukta CDE geliştiğini belirlemişlerdir. Hastanede yatan çocuklarda CDE insidansını 2012, 2013 ve 2014 yıllarında sırasıyla 4/1000, 9/1000 ve 9/1000 hasta olarak bildirmişlerdir.

Öksüz ve ark.'ları (120), Temmuz-Eylül 2015 tarihleri arasında, Düzce Üniversitesi'nde hastanede yatış süresi 72 saatten daha fazla olan 77 hastanın dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A/B varlığını ELISA yöntemi ile araştırmışlardır. Yetmiş yedi hastaya ait 104 örneğin üçünde (%2.8) *C. difficile* toksin A/B pozitif olduğu bildirilmiştir.

Yoldaş ve ark.'ları (121), 95 hastanın dışkı örneğini kullanarak *C. difficile* tespiti için kullanılan toksin A/B için bir enzim immünolojik (EIA), glutamat dehidrojenaz (GDH) için bir EIA ve toksin genleri için PZR testlerini karşılaştırmışlardır. GDH'ı 28 örnekte, toksin A/B'yi dokuz örnekte, toksin genlerini altı örnekte pozitif bulmuşlardır. Toksik *C. difficile* oranı %5.1'dir. Hipervirulent izolat NAP-1 ve binary toksin varlığı bildirilmemiştir.

Lale ve ark.'ları (122), Ocak-Ağustos 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmada 592 dışkı örneğinde enzim immünoassay yöntemi (ELISA) ile *C. difficile* toksin A/B pozitifliğini % 24 olarak bildirmişlerdir. Son yıllarda önceki 12 hafta içinde hastaneye yatış öyküsü olmayıp da semptomlar olan veya hastaneye yatıştan sonra ≤ 48 saat içinde semptomlar başlayan olarak tanımlanan, daha önce nadir görülen toplum kökenli CDE ortaya çıkmıştır (104, 108). ABD'de yapılan bir çalışmada, toplum kökenli CDE'nin, 1991'den 2005'e dört kat artış gösterdiği ve tüm CDE vakalarının %41'ini oluşturduğu bildirilmiştir (123).

Otuz dört Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan bir çalışmada, tüm CDE vakalarının %14'ünü toplum kökenli CDE vakaları oluşturmuştur (78). Özellikle, toplum kökenli CDE vakaları, genellikle daha genç ve sağlıklı olmaları; sağlık bakım ortamları veya hastanede yatan hastalarla önceden temas ve sıklıkla antimikrobiyal kullanım öyküsü olmamaları nedeniyle, geleneksel CDE risk faktörlerinden yoksundur (124).

Çalışmamızdaki örneklerin ait olduğu hasta grubunun yaş ortalaması erkeklerde 46.12, kadınlarda 50.92'dir. Hastaların %37.2'sini erkekler, %62.8'ini kadınlar oluşturmaktadır. Literatürde de benzer çalışmalarda %51.3-71.8 değişen oranlarda kadın hastalar baskındır ve çalışma sonuçlarımız literatür ile uyumludur (70, 107).

C. difficile suşlarının, A, B ve CDT (A+/-, B +/- ve CDT +/-) toksinlerinin tüm kombinasyonları keşfedilmiştir. PaLoc ve CdtLoc'un toksinotiplerini ve gen evrimini anlamak, beklenen hastalık ilerlemesini tanımlamak ve en uygun klinik yanıtı sağlamak için önemli bir başlangıç adımıdır. Bununla birlikte, CDE döngüsünün diğer birçok bileşeni nedeniyle, toksinotip, hastalık şiddeti veya CDE'nin salgın yapısı ile her zaman öngörülebilir bir şekilde korelasyon göstermez (125).

Çalışmamızda 43 *C. difficile* izolatında; toksin A için *tcdA*, toksin B için *tcdB*, binary toksin için *cdtA* ve *cdtB* genlerinin varlığına bakılmıştır. Tüm izolatlarda *tcdA* ve *tcdB* geni saptanmıştır. Binary toksini kodlayan *cdtA* ve *cdtB* genlerinin amplifikasyonu sonucu 14 (%32.6) izolatta hem *cdtA* hem de *cdtB* geni, 11 (%25.6) izolatta sadece *cdtB* geni saptanmıştır. İzolatların 14 (%32.6)'ünde *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB* genleri pozitif, 11 (%25.6)'inde *tcdA*, *tcdB* ve *cdtB* genleri pozitif, 18 (%41.8)'inde *tcdA* ve *tcdB* genleri pozitif olarak tespit edilmiştir.

Kim ve ark. (71) yaptığı çalışmada da, 408 *C. difficile* izolatından 337'si (%82,6) toksijenik olduğu, 232 (%56.9) izolatın toksin A ve toksin B pozitif, 105 (%25.7) izolatın toksin A negatif, toksin B pozitif ve 29'unun (%7.1) binary toksin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları ile benzer şekilde, Tüm CDT+ izolatlar toksin A ve B pozitif bulunmuştur. Çalışılan hastanelere göre toksijenik izolatların iyileşme oranları %70-100 arasında değişmektedir.

Kore'de, 2009'da ilk kez RT027 ile şiddetli ve tekrarlayan CDE vakaları bildirilmiştir (126). Kim ve ark.'larının (127) yaptığı çalışmada 462 *C. difficile* izolatının %56.1'inde toksin A ve toksin B pozitif, %21.4'ünde toksin A negatif ve toksin B pozitif, dokuz izolatta binary toksin geni tespit edilmiştir. A-B+ izolatlarda daha yüksek florokinolon direncinin olmasının, bu izolatların artmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Toksin A tespiti tek başına *C. difficile* ile ilişkili hastalığı teşhis etmede yetersiz kalabilmektedir.

Güney Kore'de Şubat-Mayıs 2017 arasında izole edilen örneklerden yapılan çalışmada, 331 *C. difficile* izolatının 257'sini (%77.6) toksijenik olduğu, ve binary toksin

üreten izolatların prevalansının %5.1 (13/257) olduğu bildirilmiştir. Toplam 52 farklı ribotip (RT) içinde, en yaygın ribotipin tüm izolatların %25.1'ini oluşturan RT018 olduğu, diğer yaygın ribotiplerin RT014/020, RT002, RT012 ve toksik olmayanlarda yaygın olan RT010 olduğu saptanmıştır. 331 izolatın 257'sinin (%77.6) toksijenik, bunların 223'ünün A+B+CDT-, 21'inin A-B+CDT- ve 13'ünün A+B+CDT+ olduğu tespit edilmiştir (128).

Gonçalves ve ark.'ları (129), 288 hastaya ait 369 *C. difficile* izolatını inceledikleri çalışmalarında, 20 hastadan izole edilen 22 (%6) izolatın binary toksin genlerini taşıdığını ve 369 izolatın 214 (%57.9)'ünde *tcdB*'yi kodlayan toksin geninin varlığını göstermişlerdir.

Persson ve ark.'ları (93), Danimarka'da yaptıkları çalışmada, 159 izolatın 36'sının *tcdA*+, *tcdB*+, *cdtA*+/*cdtB*+, birinin *tcdA*+, *tcdB*-, *cdtA*+/*cdtB*+, 98'inin *tcdA*+, *tcdB*+, *cdtA*-/*cdtB*- ve 24'ünün toksijenik olmayan *tcdA*-, *tcdB*-, *cdtA*-/*cdtB*- profilinin olduğunu göstermişlerdir. Delesyon çalışmaları ile 26 izolatın *tcdA*'da 700-bp delesyon içerdiğini ve 39 suşun *tcdC*'de en az bir olası inaktivasyon özelliği içerdiğini ortaya koymuşlardır. Binary toksin genlerinin yaygınlığını %23 olarak bildirmişlerdir. *tcdA*+, *tcdB*+, *cdtA*+/*cdtB*+ profiline sahip izolatların RT027 dışında sekiz farklı ribotipe ait olduğunu belirtmişlerdir.

Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada, mevcut 64 *C. difficile* izolatının %60.9'unu ribotip 176 olarak sınıflandırmışlardır. 176 ve 078 ribotiplerine ait 41 izolatın tümünün, binary toksin pozitif ve Ribotip 176 düzenleyici gen *tcdC*'de 18-bp'lik delesyon taşıdığını bildirmişlerdir (117).

Kılıç ve ark.'ları (130), Houston'da hastalardan alınan 351 dışkı örneği ile yaptıkları çalışmada, multipleks real-time PZR kullanarak 55 (%15.6) örneğin *C. difficile* varlığı açısından pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan 48'ini (%87.2) toksijenik (46 *tcdA* ve *tcdB* pozitif, ikisini sadece *tcdB* pozitif) ve 11'ini (%22.9) *cdtA* pozitif tespit etmişlerdir.

Ankara'da yapılan bir çalışmada, izolatların hepsinin *tcdA* ve *tcdB* genlerini taşıdığı ve bir (%1.6) izolatın *cdtA* ve *cdtB* genlerini taşıdığı belirtilmiştir. *cdtA* ve *cdtB* genleri pozitif olan bir izolatın *tcdC* geninde 54 bp'lik delesyon ve tek nükleotit değişimi ve 12 (%19.6) izolatın *tcdC* geninde tek nükleotit değişimlerinin olduğunu göstermişlerdir. Türkiye'de insan izolatlarında ilk hipervirülen izolatı bildirmişlerdir (131).

Deniz ve ark.'ları (132), Marmara Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmada toksin pozitif 36 izolatın tamamında *tcdA* ve *tcdB* genlerinin pozitif olduğunu, binary toksin geni taşıyan izolat olmadığını bildirmişlerdir.

Özgen ve ark.'ları (133), buzağı ve kuzulardan alınan dışkı örneklerinden elde ettikleri *C. difficile* izolatlarında CDT+ pozitifliğini bildirmişlerdir. Buzağı örneklerinden 35 izolatın 22'sinin toksijenik olduğunu ve bunların 10'u (%45.5) A+B+CDT+, 12'si (%54.5) A-B+CDT- toksin profiline sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Kuzulardan alınan örneklerden 15 izolatın 6'sının toksijenik olduğu ve 5'nin (%83.3) A-B-CDT+, 1'inin (%16.6) A-B+CDT- toksin profili gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hampikyan ve ark.'larının Marmara Bölgesi'nde bulunan dokuz farklı ilde bulunan mezbahalardan aldıkları sığır ve koyun karkaslarından *C. difficile* izolasyonu yapmışlardır. Karkas örneklerinden 247 sığır karkasının 83'ünde (%33.6) ve 308 koyun karkasının 78'inde (%25.3) bakteri izole etmişlerdir. Toplam 161 *C. difficile* izolatının 76'sında (%42.7) *tcdA* geni, 69'sında (%42.9) *tcdB* geni ve 131'inde (%81.4) *cdtA/B* genlerinin pozitif olduğunu tespit etmişlerdir (134).

İlk kez 21. yüzyılın başlarında hipervirülen suşlarda tanımlanan binary toksin, artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir (125). Türkiye'de yapılan çalışmalarda klinik izolatlarda *cdtA/B* gen pozitifliğinin %0-1.6 arasında olduğu bildirilmiştir (131, 132). Hayvan izolatlarında pozitiflik oranı %45.5-%83.3 olarak, et ürünlerinden izole edilen örneklerde bu oran %81.4-86.4 olarak bildirilmiştir (133-135). Çalışmamızda da klinik izolatların %32.6'sında *cdtA* ve *cdtB* genleri pozitif, %25.6'sında *cdtB* geni pozitif olarak tespit edilmiştir. *cdtA/B*'nin %58.2 oranında pozitifliği, klinik izolat açısından Türkiye'de bildiren pozitiflik oranlarına göre oldukça yüksek olmakla birlikte, hayvan ve gıda örneklerinde bildirilen oranlarla benzerdir. Çalışmamızın sonuçları, binary toksin üreten klinik izolatların yayılım potansiyeli nedeniyle ülkemiz için bir risk oluşturmaya başladığını ve klinik izolatlarla daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

İzolatların tiplendirilmesi ve CDE epidemiyolojisinin incelenmesi için çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. İlk kullanılan yöntem serotiplendirmeyken, sonrasında yerini PFGE almıştır. PZR ribotiplendirme artık altın standart yöntemdir; bununla birlikte MLST şemaları geliştirilmiş ve son dönem de yeni dizileme teknolojileri kullanılmaya başlanılmıştır (136).

Kanada hastanelerinde yapılan çalışmada, 4143 hastada 117 (%2.8) sağlık bakımıyla ilişkili *C. difficile* enfeksiyonu ve 123'ünde (%3) kolonizasyon bildirilmiştir. Sağlık bakımıyla ilişkili *C. difficile* enfeksiyonu olan hastalarda %62.7 ve kolonizasyonu olanlar da %36,1 Kuzey Amerika PFGE tip 1 (NAP1) izolatının varlığı belirlenmiştir (137). Thornton ve ark.'ları (107), toplum kaynaklı CDE izolatlarının PFGE analizini yapmışlardır. Hem NAP1 (%22.5) hem de NAP 4 (%20)'ün en yaygın gruplar olduğunu, bunu NAP 2/11 (%12.5), NAP 12 (%10) ve NAP 6'nın (%10) izlediğini bildirmişlerdir. İzolatlar metronidazol ve vankomisine duyarlı bulunmuştur.

Nisan 2016 ile Ağustos 2017 arasında, İran Tahran'da, *C. difficile* enfeksiyonundan şüphelenilen hastalardan, kaldığı odaların yüzeylerinden, ekipmanlarından ve havasından toplam 700 dışkı örneği ve 1435 çevresel örnekten çok merkezli bir çalışma yapılmıştır. Klinik örneklerden 43 (%6.14) ve çevresel örneklerden 2 (%0.13) *C. difficile* izolatı elde edilmiştir. Yapılan PFGE analizi sonucu, *C. difficile* izolatları arasında 28 özgül ve 2 yaygın tip olmak üzere 30 farklı pulsotip olduğu bildirilmiştir (138).

Sisakhtpour ve ark.'ları (139), İran'da klinik örneklerden zenginleştirilmiş anaerobik kültür yoluyla toplam 29 *C. difficile* izolatını incelemişlerdir. Bunlardan 22'sinde (%4.8) toksin A ve B (*tcdA*, *tcdB*) ve binary toksin (*cdtA*, *cdtB*) saptanmıştır. Agar dilüsyon metodu ile vankomisine %18.1 ve metronidazole %9 direnç olduğunu ve tüm izolatların rifampisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. PFGE analizine göre, izotların 11 kümeye ve 13 alt tipe ait olduğunu belirlemişlerdir.

Oka ve ark.'ları (95), 73 *C. difficile* izolatının 11 ribotipe ve 12 ana PFGE tipine ayrıldığını bildirmişlerdir. R2 (%42.5), R1 (%19.2) ve R4 (%17.8) ribotiplerinin baskın olduğunu tespit etmişlerdir. Kırk dokuz izolatın PFGE majör P1 alt tipine (%67.1) ve 11 izolatın P3 alt tipine (%15.1) ayrıldığı ve bu 2 tipin izolatların %80'inden fazlasını oluşturduğunu tespit etmişlerdir. PFGE yöntemini uygulama sırasında bazı izolatlarda gözlemlenen DNA bozulmasının, 200 µM'lik bir son konsantrasyonda tiyoüre ilavesiyle tamamen çözülebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer DNA bozulması problemi, tiyoüre ilavesi ile çözüme ulaştırılmıştır.

Nicholas ve ark. (140), iki Kore hastanesinden 70 toksijenik *C. difficile* izolatının genetik çeşitliliğini toksinotipleme, ribotipleme, MLST ve PFGE kullanılarak araştırmışlardır. Yetmiş *C. difficile* izolatı beş toksinotip, 19 ribotip, 16 sekans tipi (ST) ve 33 pulsotip olarak sınıflandırılmıştır. Ribotip 018'in (n = 38) tüm *C. difficile* izolatları, her

iki hastanede de en yaygın ST olan ST17 olarak sınıflandırılmıştır. Bununla birlikte, ST17 (ribotip 018) *C. difficile* izolatları hastaneye göre farklılık gösteren pulsotipler sergilemiştir. ST2 (ribotip 014/020), 8 (ribotip 002), 17 (ribotip 018) ve 35 (ribotip 015) her iki hastanede de tespit edilirken, diğer ST'ler her hastaneye özgüdür.

Tayland'da yapılan bir çalışmada, 53 toksijenik *C. difficile* izolatu üç farklı tiplendirme yöntemi ile analiz edilmiştir. MLST ile 11 dizi tipi (STs), PCR-ribotipleme ile 13 ribotip ve PFGE ile dört PFGE tipi belirlemişlerdir. Daha önce tanımlanmış altı ST ve Tayland'a özgü beş yeni ST (ST66, ST67, ST68, ST69 ve ST70) bildirmişlerdir. PCR-RT'lerinde en yaygın olanlar, UK 017 (ST45) (%45.3) ve UK 014/020 (ST33) (%24.5)'dir. Çalışmada aynı ST ve PFGE tipine ait izolatlarda, PZR ile yapılan taramada *tcdA* ve *tcdB* genlerinin pozitifliğinde farklılıklar görülmüştür (141). İnsan, at, sığır ve domuzlardan izole edilen 73 *C. difficile* izolatının incelendiği diğer bir çalışmada da, aynı PFGE tipine ait sığır izolatlarında, binary toksin pozitifliğinde farklılıklar bulunmaktadır (142).

Ülkemizde *C. difficile* izolatlarının epidemiyolojisinin PFGE yöntemi ile araştırıldığı çalışma ile literatürde karşılaşılmamıştır. Çalışmamızda *C. difficile* ATCC 700057 ve ATCC BAA1870 ile 43 klinik *C. difficile* izolatının klonal ilişkisi PFGE yöntemi ile belirlenmiştir. PFGE ile tiplendirmesi yapılan 43 izolatın benzerliği %39.3 olarak bulunmuştur. Tiplendirilen izolatlar 23 pulsotip ve 31 alt gruba ayrılmıştır. Pulsotip P (n=6) en büyük kümeyi oluşturmuştur ve izolatlar arasında %87.7 benzerlik bulunmuştur. Pulsotip J'de (n=2) %94.7, pulsotip C'de (n=2) %87.5, pulsotip L'de (n=4) %85.6 ve pulsotip O'da (n=2) %85.7, pulsotip H'da (n=3) %84.2, pulsotip G'de (n=4) %83.8, pulsotip E'de (n=3) %83.3, pulsotip N'de (n=2) %82.4, pulsotip I'da (n=2) ve pulsotip K'da (n=2) %80 benzerlik saptanmıştır. G1 (n=2), P1 (n=2) ve P3 (n=2) alt tiplerinde birbirleriyle %100 benzerlik gösteren ikişer izolat saptanmıştır. İdentik PFGE paterni görülen ikili izolatların biri poliklinik diğeri yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların 10'u özgül (singleton) PFGE profili göstermiştir. PFGE analiz sonuçları, çoklu klonal grupların varlığını ve izolatların yüksek genetik çeşitliliğini göstermiştir. Klinik ve poliklinik hasta izolatlarında, identik ve benzerlik oranı yüksek PFGE bant paternleri görülmesi, toplum ve hastane kaynaklı izolatların ilişkili olabileceğini düşündürmekle birlikte, bu sonucun desteklenmesi için, hastaların 12 hafta içinde hastaneye yatış öyküsü olup olmadığı ve hastaneye yatıştan ≤48 saat içinde semptomların başlayıp başlamadığı gibi çalışmamızın içermediği, ek verilere ihtiyaç

bulunmaktadır. İdentik ve benzerlik oranı yüksek izolatların saptanması, CDE'nin önlenmesinde gerekli önlemlerin alınmasının önemini ortaya çıkarmıştır. Enfeksiyon oluşumunda çeşitli risk faktörleri, kaynakları ve bakterinin hayatta kalma kabiliyeti göz önüne alındığında, CDE'nin önlenmesi farklı önlemlerin birlikte kullanılmasını gerektirir. Hızlı tanı, aktif sürveyansla birlikte hastane bazlı bir enfeksiyon kontrol programı, el hijyeni, hasta izolasyonu ve temas önlemleri, antimikrobiyal yönetim ve uygun dezenfeksiyonla çevresel kontaminasyonu azaltmak gibi önlemler *C. difficile* yayılımını azaltmakta etkili yöntemlerdir (1).

Antimikrobiyal direnç (AMR), modern tıbbın en büyük tehditlerinden biridir. Önemli bir sorun olan gıda hayvanlarının küresel antimikrobiyal tüketiminin 2030 yılına kadar %67 oranında artacağı tahmin edilmektedir (143). Antimikrobiyal kullanımının büyüme destekleyici olarak hayvanlarda yasaklanması, dirençli patojenlerin yanı sıra *C. difficile*'nin yayılmasının azaltılmasında da etkili olacaktır (105). Tüm hükümet sektörlerinde odaklanmış müdahaleler ve işbirlikleri olmadan, AMR 2050 yılına kadar tahmini on milyon ölümden ve 210 trilyon ABD Doları'na varan yıllık küresel gelir kaybından sorumlu olabilir (144).

Özellikle son 10 yılda *C. difficile* salgınlarının sayısı morbidite ve mortalite oranıyla birlikte artmıştır. Birden fazla antimikrobiyal ilaca dirençli *C. difficile* izolatlarının ortaya çıkması ve yayılması, potansiyel tedavi seçeneklerinin yanı sıra CDE'yi önlemeyi de zorlaştırmaktadır. Çoğu *C. difficile* izolatının metronidazol ve vankomisine duyarlılığı devam etmektedir. Çeşitli antimikrobiyallere karşı dirençli *C. difficile* vakaları da bildirilmiştir. Ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin ve florokinolonlar gibi antimikrobiyallerin çoğu CDE için yüksek riskle ilişkilendirilmektedir (104).

Diğer patojenlerin aksine, *C. difficile*'deki AMR bazı özelliklere sahiptir. AMR genellikle enfeksiyonların tedavisinde zorluklara yol açar ve CDE tedavisi de bir zorluk olsa da, bu tür bir zorluk, ağırlıklı olarak CDE tedavisi için kullanılan antimikrobiyallere (vankomisin, metronidazol ve fidaksomisin) karşı direnç nadir kaldığından, AMR'ye bağlı değildir (104, 145, 146). Bunun yerine, AMR CDE'nin patogeneğinde ve yayılmasında önemli bir rol oynar çünkü *C. difficile*'in konakçıda antimikrobiyal maruziyette hayatta kalmasına izin verirken, seçicilik AMR izolatlarının ortaya çıkmasına ve yayılmasına izin verir. Birkaç AMR izolatı salgınlarda PCR-ribotipleri (RT) 017 klindamisin ile, RT 017 ve

027 florokinolonlarla, RT 027 rifampisinle ve RT 078 tetrasiklinlerle ilişkilendirilmiştir (110, 147-150).

Lee ve ark.'larının (151) çalışmasında, *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal direnç oranları: klindamisin, %81; sefotetan, %19; moksifloksasin, %42; imipenem, %8; siprofloksasin, %100; eritromisin, %80 olarak belirlenmiştir. 001, 017 ve 018 ribotipleri klindamisin ve eritromisine %100; 017 ve 018 ribotipleri, moksifloksasine karşı sırasıyla % 85 ve %100 direnç göstermiştir. Diğer ribotiplerle karşılaştırıldığında, ribotip 018'in en yüksek, ribotip 014/020 en düşük antimikrobiyal dirence sahip olduğu belirtilmiştir.

Kim ve ark.'larının (71) yaptığı çalışmada, izolatların tümü sefoksitine dirençli ve biri hariç tümü piperasilin ve piperasilin-tazobaktama duyarlıdır. İzolatlarda antimikrobiyal direnç oranları imipeneme %25, sefotetana %34, moksifloksasine %42, ampisiline %51 ve klindamisine %60 olarak tespit edilmiştir. İzolatlarda metronidazole veya vankomisine direnç gözlenmediği belirtilmiştir. Dünyanın diğer bölgelerinde önemli salgınlara neden olan 027 ve 078 ribotipleri Asya'da nadir görülmektedir. Bununla birlikte, varyant toksin A negatif ve toksin B pozitif ribotip 017 izolatları, birkaç Asya ülkesinde salgınlara neden olmuştur.

Byun ve ark.'ları (128) yaptıkları çalışmada, tüm toksijenik izolatların metronidazol ve vankomisine duyarlı ($MIC \leq 2$ mg/L) olduğunu bildirmişlerdir. Toksijenik izolatların %24'ü rifaksimine, %48'i ampisiline, %46'sı sefotetana, %64'ü klindamisine, %54'ü imipeneme, %6'sı tetrasikline ve %52'si moksifloksasine dirençlidir. Kloramfenikole ve tetrasikline duyarlılık oranları sırasıyla %97 ve %87'dir. Moksifloksasin ve rifaksim için, toksijenik izolatların, toksik olmayan izolatlardan daha dirençli olduğu gözlenmiştir. RTs018, 002, 017 ve 369 ribotipleri, çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek MİK'ler göstermiştir ve çoklu ilaç direnci de yaygındır.

Imwattana ve ark.'ları (152), dünya genelinde izole edilmiş izolatlardan oluşan 10330 kamuya açık *C. difficile* genomunu ayrıntılı analiz ederek *C. difficile*'deki AMR'yi genomik olarak ortaya koymuşlardır. Değerlendirilen 10330 *C. difficile* genomundan 4532'sinin (%43.9) en az bir antimikrobiyal sınıf için edinilmiş direnç genleri içerdiklerini ve en az bir dirençli izolata sahip beş ana dalda 89 ST olduğunu tespit etmişlerdir. 28 ST'de toplam 901 izolat (%8.7), üç veya daha fazla antimikrobiyal sınıf için direnç belirleyicileri barındırmış ve bu nedenle multidrug resistant (MDR) olarak sınıflandırılmıştır. Spesifik AMR belirleyicileri ile üç büyük epidemik *C. difficile* ST'si

arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve florokinolon direncinin ST1, tetrasiklin direncinin ST11 ve makrolid-linkosamid-streptogramin B (MLS_B) direncinin ST37 ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'dan gelen izolatlarla karşılaştırıldığında Avustralya/Yeni Zelanda'dan gelen *C. difficile* izolatlarının en düşük AMR prevalansına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Florokinolonların Avustralya ve Yeni Zelanda dışında yaygın kullanılması, direnç prevalansında da önemli farka sebep olmaktadır.

Chatedaki ve ark.'ları (153), 2012-2015 yılları arasında Yunanistan'da yaptıkları çalışmada 88 *C. difficile* izolatının, ST37 ve ST11 yaygın olmak üzere 27 sekans tipinden (ST) oluştuğunu tespit etmişlerdir. Tüm izolatların, vankomisin ve metronidazole duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. *C. difficile* izolatlarının, moksifloksasin, eritromisin, klindamisin, rifampisin ve tetrasikline sırasıyla %71.6, %65.9, %61.4, %36.4 ve %23.9 oranında dirençli olduğunu bulmuşlardır. İzolatların %45.5'i eritromisin, klindamisin ve moksifloksasine direnç gösteren MDR'dir ve bunların 28'i rifampisine de dirençlidir.

Salman ve ark.'ları (131) yaptıkları çalışmada, 2012-2014 yıllarında Ankara'daki üç laboratuvarından elde ettikleri 61 adet *C. difficile* izolatlarının tamamının metronidazol ve vankomisine duyarlı, moksifloksasine MİK değeri üç (%4.9) izolatta >8 µg/mL ile, dirençli olduğunu bildirmişlerdir. MİK50 ve MİK90 değerleri, eritromisin ve klindamisin için sırasıyla 1.5 µg/mL, 2 µg/mL; 3 µg/mL ve 4 µg/mL'dir.

2011-2016 tarihleri arasında 28 Avrupa ülkesinden 5 yıl boyunca, %95'i (n=3338) toksin pozitif olan 3499 izolat incelenmiştir. Çalışmada toplam 264 farklı PZR ribotipi saptanmıştır. RT027, 1-5 yılları arasında ortalama %11.4'lük bir prevalansla en sık izole edilen RT olarak bulunmuştur. 1 ila 5 yıl arasındaki hemen hemen tüm izolatların fidaksomisine (≤ 1 mg/L) duyarlı olduğu ve genel geometrik ortalama MİK değerinin 0.04 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Fransa'da 5. yılda tek bir fidaksomisin dirençli izolat (MIC ≥ 4 mg/L) elde edilmiş ve RT344 olarak bulunmuştur. Beş yıl için geometrik ortalama MİK'ler metronidazol ve vankomisin için sırasıyla 0.46 mg/L ve 0.70 mg/L olarak bildirilmiştir. Azalmış metronidazol duyarlılığı esas olarak RT027 ve RT198 ribotiplerinde gözlenmiştir. Hem moksifloksasin hem de klindamisine direncin, katılan tüm ülkelerde yaygın ve belirgin olduğu, ancak yıllar ve ülkeler arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Tigesikline karşı azalmış duyarlılığın (MİK > 0.25 mg/L) az olduğu; bununla

birlikte, geometrik ortalama MİK'lerin RT012'de dikkat çekici olarak yükseldiği tespit edilmiştir (154).

Beran ve ark.'larının (117) çalışmasında, *C. difficile* izolatlarının vankomisin ve metronidazole karşı duyarlı, %65.1'inin moksifloksasine dirençli olduğu tespit edilmiştir. MLVA sonuçlarına göre, izolatların genetik olarak ilişkili olduğu ve sağlık tesisleri arasında bulaşma olduğu bildirilmiştir.

Sayın ve ark.'larının (116), Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde toksijenik 93 *C. difficile* izolatı ile yaptıkları çalışma sonuçlarına göre; izolatların tamamı metronidazol, vankomisin, ampisilin-sulbaktam, tetrasiklin ve meropenem duyarlı bulunmuştur. İzolatların seftriaksona %58.1, klindamisine %35.5 ve moksifloksasine %20.4 duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. MİK50 ve MİK90 değerleri tigesiklinde 0.125-0.25 mg/L, eritromisinde 1-2 mg/L, linezolidde 2-2 mg/L ve doksisisiklinde 0.062-0.125 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Muratoğlu ve ark.'ları (135) yaptıkları çalışmada, Türkiye'deki 319 et ürünü örneğinden 22'sinde (%6.9) *C. difficile* izole etmişler ve 22 izolattan 9'unu (%40.9) RT027 olarak tanımlamışlardır. 22 izolatta *tcdA*, *tcdB* ve *cdtA/B* genlerini sırasıyla 22'sinde (%100), 22'sinde (%100) ve 19'unda (%86.4) tespit etmişlerdir. Amoksisilin-klavulanik asit, tetrasiklin ve vankomisine izolatların tamamının, metronidazole ise 21 (%95.4) izolatın duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda izolatların hepsinde imipenem ve sefotaksim direnci gözlemişlerdir.

Fidaksomisin *C. difficile*'ye karşı bakterisidaldir. Fidaksomisinin, gram negatif aeroblara ve anaeroblara veya mayalara karşı çok az aktivitesi vardır veya hiç yoktur. 1323 *C. difficile* izolatının sekiz invitro çalışmasının sonuçları göre, fidaksomisin MİK değer aralığının $\leq 0.001-1 \mu\text{g/mL}$ ve MK90'nin $0.5 \mu\text{g/mL}$ olduğu gösterilmiştir (66). ABD'de 925 *C. difficile* izolatına karşı fidaksomisin MİK aralığının $\leq 0.004-1 \mu\text{g/mL}$ ve MİK90 değerinin $0,5 \mu\text{g/mL}$ olduğu bildirilmiştir (100).

Çalışmamızdaki *C. difficile* izolatlarının MİK değerleri; vankomisin, moksifloksasin, klindamisin, metronidazol, eritromisin, tigesiklin ve fidaksomisin için sırasıyla, $0.38-2 \mu\text{g/mL}$, $0.25-\geq 32 \mu\text{g/mL}$, $0.19-\geq 256 \mu\text{g/mL}$, $0.064-0.5 \mu\text{g/mL}$, $0.25-\geq 256 \mu\text{g/mL}$, $\leq 0.016-0.047 \mu\text{g/mL}$ ve $0.008-0.25 \mu\text{g/mL}$ arasında tespit edilmiştir. Antibiyotiklerin MİK50 ve MİK90 değerleri; vankomisin, moksifloksasin, klindamisin, metronidazol, eritromisin, tigesiklin ve fidaksomisin için sırasıyla, $1.5-1.5 \mu\text{g/mL}$, $1-1.5$

$\mu\text{g/mL}$, 2-6 $\mu\text{g/mL}$, 0.25-0.38 $\mu\text{g/mL}$, 1-4 $\mu\text{g/mL}$, 0.032-0.047 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.06-0.25 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. EUCAST kriterlerine göre izolatlar, vankomisine %100, CLSI kriterlerine göre moksifloksasine %90 ve klindamisine %60, metronidazole hem EUCAST hem de CLSI kriterlerine göre %100 duyarlı bulunmuştur. Çalışmamız literatür incelemesine göre, ülkemizde *C. difficile* izolatlarının fidaksomisine duyarlılığının saptandığı ilk çalışmadır.

Tedavide en sık kullanılan iki ajan olan vankomisin ve metronidazol de dahil olmak üzere, neredeyse tüm antimikrobiyallerin CDE'yi tetikleyebileceği düşünülmektedir. Antibiyotik dışı alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Enfeksiyonların tedavisinde veya antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılan bütün faj ve saflaştırılmış faj bileşenlerinin son zamanlardaki başarısı, faj tedavisinin yeniden gözden geçirilmesine neden olmuştur (155).

Mahony ve ark.'ları (156), 94 *C. difficile* izolatını tarayarak farklı morfoloji ve konak aralığına sahip faj 41 ve faj 56 olarak isimlendirdikleri iki ılıman bakteriyofaj izole etmişlerdir.

Clostridium türlerinin fajları daha önce tanımlanmış olmasına rağmen, *C. difficile* fajları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. 56 klinik *C. difficile* izolatından üçünde, Mitomisin C ile indüklendikten sonra ϕC2 , ϕC5 , ϕC6 ve ϕC8 çift sarmallı DNA fajları izole edilmiştir. Süperenfeksiyon ve DNA analizleri fajlar arasında akrabalık olduğunu ortaya koymuş, ϕC2 'nin kısmi dizilimi, *C. difficile* suşu CD630 ile nükleotid homolojisi göstermiştir (155).

Tayland'da yapılan bir çalışmada, Mitomisin C ile indükleme sonucu, 12 klinik *C. difficile* izolatından ΦHR24 , ΦHN10 , $\Phi\text{HN16-1}$, $\Phi\text{HN16-2}$ ve ΦHN50 'den oluşan beş ılıman fajı başarıyla indüklemişlerdir. Duyarlı konak bulmak için 92 *C. difficile* izolatını test etmişler ve izolatların %0-6.5'i gibi nispeten dar bir konak aralığı sergilediğini ortaya koymuşlardır (157).

Nale ve ark.'ları (158), 91 *C. difficile* RT027 klinik izolatından profaj araştırmışlardır. Altmış üç Myoviridae ve üç Siphoviridae'ye ait morfolojik olarak farklı kuyruklu bakteriyofajlar tanımlamışlardır. Dört izolatta ikili faj taşıyıcılığı tespit etmişlerdir. Ek olarak, tüm izolatlarda indüklenebilir faj kuyruğu benzeri partiküllerin (PT-LP'ler) varlığını bildirmişlerdir.

Holin geni, değişken bir orta bölüm ile her iki terminalde korunan tüm dizili faj genomlarında bulunan tek gendir. *C. difficile* için sekans özgüllüğü nedeniyle tanısal bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu sekansa dayalı işaretleyici, *C. difficile*'nin tanımlanmasını ve aynı zamanda faj taşıma bilgilerini sağlayacaktır. Potansiyel olarak, holin belirteci, şu anda *C. difficile* fajlarının karakterizasyonu problem olan faj izolasyonu ve saflaştırması olmadan çevrede faj varlığını/yokluğunu araştırmak için de avantaj sağlayacaktır (102). Shan ve ark.'ları (102), *C. difficile*'ye özgü iki set dejenere PZR primeri tasarlayarak miyovirüs ve sifovirüs taraması yapmışlardır. On altı klinik *C. difficile* ribotipinde, PZR ile 15'inin Miyovirüs pozitif ve 2'sinin de Sifovirüs pozitif olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda, PZR ile izolatların 31'inin Miyovirüs, 17'sinin Sifovirüs ve 10'unun her ikisini birlikte taşıdığı belirlenmiştir. PZR ile pozitif olan 38 izolat Mitomisin C ile indüklenmiştir. En çok konağı enfekte eden fajlar ve sırasıyla enfekte ettikleri konak sayısı (Çalışma izolatı+ATCC); CD02, CD07, CD37, CD38, CD42 ve 36+2, 40+2, 38+2, 29+1, 32+1 olarak gözlenmiştir. En duyarlı konaklar 27 faja duyarlı CD20, 26 faja duyarlı CD43, 23 faja duyarlı CD31, 21 faja duyarlı CD21 ve 21 faja duyarlı CD32'dir. İzole edilen bakteriyofajların geniş konak spektrumuna sahip olması önemli bir avantajdır.

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar bulunmaktadır. Çalışma sonuçlarımız, Aralık 2017-Ekim 2020 tarihleri arasında, toksin araştırılması için hastanemizin laboratuvarına gönderilen 825 dışkı örneğinden izole edilen 43 suşun verilerini içermektedir. Bulgularımız yayılım potansiyeli nedeniyle ülkemizin verilerini de kısmen yansıtmakla birlikte temelde bölgemizin verileri ile sınırlıdır. Daha fazla merkezin ve suşun dahil edildiği, ulusal ve uluslararası verileri daha kapsamlı bir şekilde yansıtacak çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamız ekonomik kısıtlılıklardan dolayı klinik örneklerle sınırlıdır. Çevresel örnekler, gıda örnekleri ve hayvan örnekleri gibi diğer örnekleri içeren çalışmalar, CDE'nin epidemiyolojisinin anlaşılmasına daha fazla katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda, klinik ve poliklinik hasta izolatlarında, identik ve benzerlik oranı yüksek PFGE bant paternleri görülmesi, toplum ve hastane kaynaklı izolatların ilişkili olabileceğini düşündürmekle birlikte, çalışmamız bu sonucun desteklenmesi için, hastaların 12 hafta içinde hastaneye yatış öyküsü olup olmadığı ve hastaneye yatıştan ≤ 48 saat içinde semptomların başlayıp başlamadığı gibi izolatların toplum kaynaklı olup olmadığını gösteren verileri ve diğer epidemiyolojik verileri içermemektedir. PFGE sonuçlarının klasik epidemiyolojik verilerle birlikte yorumlanması daha faydalı olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda binary toksin geni taşıyan izolatlar, ülkemizde klinik izolatlar için bildirilen verilere göre daha yüksek saptanmış olup, yayılım potansiyeli nedeniyle ülkemiz için bir risk oluşturmaya başladığını göstermektedir. PFGE ile çoklu klonal grupların varlığı saptanmıştır. Klinik ve poliklinik hasta izolatlarında identik ve benzerlik oranı yüksek PFGE bant paternlerinin bulunması, toplum ve hastane kaynaklı izolatların ilişkili olabileceğini göstermektedir. Klonal ilişkili izolatlar saptanması ve toksin pozitifliğinin yüksek bulunması, bu konuda daha kapsamlı epidemiyolojik araştırmalara ihtiyaç olduğunu ve yayılımın engellenmesi için gerekli önlemlerin alınması gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızda tedavide önerilen başlıca antibiyotikler olan metronidazole ve vankomisine direnç ile fidaksomisin için yüksek MİK değerleri ($\leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$) saptanmazken, klindamisine karşı yüksek oranda direnç (%40) saptanması, bölgemizde antibiyotik direncinin tedavi için henüz bir risk oluşturmadığını ve izlenmesi gerektiğini; klindamisin direncinin CDE gelişimi için risk oluşturduğunu ve dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir. Geniş spektrumlu fajların izole edilmiş olması da faj tedavisine yönelik çalışmalara kaynak teşkil edebilir. Ülkemizde anaerobik bakteriyoloji çalışmalarının az olması nedeniyle, *C. difficile* konusundaki veriler son derece sınırlıdır. Tez çalışmamız literatür araştırmasına göre, ülkemizde *C. difficile* izolatlarının PFGE ile klonal ilişkisinin, fidaksomisine duyarlılığının ve bakteriyofajlarının saptandığı ilk çalışma olup, *C. difficile* izolatlarının toksin genleri, antimikrobiyal duyarlılıkları, klonal ilişkisi ve bakteriyofajları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Elde edilen bulguların ve daha fazla klinik izolatla yapılacak çok merkezli çalışmaların, *C. difficile* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına, önlenmesine, tedavisine katkı sağlayabileceği ve CDE'nin küresel sağlık sistemi üzerindeki yükünü azaltabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016). *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers 2: 1-20.
2. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature 467: 711-713.
3. Smits WK (2013). Hype or hypervirulence: A reflection on problematic *C. difficile* strains. Virulence 4: 592-596.
4. Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB (2022). *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. Nat Rev Microbiol 20: 285-298.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States [online]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States [online]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
7. Hensgens MPM, Dekkers OM, Demeulemeester A, Buiting AGM, Bloembergen P, van Benthem BHB, Le Cessie S, Kuijper EJ (2014). Diarrhoea in general practice: When should a *Clostridium difficile* infection be considered? Results of a nested case-control study. Clin Microbiol and Infect 20: O1067-O1074.
8. Rupnik M (2008). Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. FEMS Microbiol Rev 32: 541-555.
9. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes 5: 579-593.
10. Czepiel J, Drózd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, Goldman S, Wultańska D, Garlicki A, Biesiada G (2019). *Clostridium difficile* infection: review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 38: 1211-1221.
11. Sholeh M, Krutova M, Forouzesh M, Mironov S, Sadeghifard N, Molaeipour L, Maleki A, Kouhsari E (2020). Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis.

Antimicrob Resist Infect Control 5: 1-11.

12. Luong T, Salabarria AC, Roach DR (2020). Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going? Clin Ther 42: 1659-1680.
13. Hargreaves KR, Clokie MRJ (2014). *Clostridium difficile* phages: still difficult? Front Microbiol 5: 1-14.
14. Kılıç A (2013). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors, pathogenesis, clinical features, diagnosis and therapy. Mikrobiyol Bul 47(3): 556-566.
15. Simor AE (2010). Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. J Am Geriatr Soc 58: 1556-64.
16. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I (2015). Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 31: 4-10.
17. Bouza E, Aguado JM, Alcalá L, Almirante B, Alonso-Fernández P, Borges M, Cobo J, Guardiola J, Horcajada JP, Maseda E, Mensa J, Merchante N, Muñoz P, Pérez Sáenz JL, Pujol M, Reigadas E, Salavert M, Barberán J (2020). Recommendations for the diagnosis and treatment of *Clostridioides difficile* infection: An official clinical practice guideline of the Spanish Society of Chemotherapy (SEQ), Spanish Society of Internal Medicine (SEMI) and the working group of Postoperative Infection of the Spanish Society of Anesthesia and Reanimation (SEDAR). Rev Esp Quimioter 33: 151-175.
18. Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP (2010). The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol 300: 387-95.
19. Clements AC, Magalhaes RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. Lancet Infect Dis 10: 395-404.
20. Elaldi N (2015). Ufuktaki yeni antibiyotikler. Flora 20: 1-9.
21. Hall IC, O'toole E (1935). Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 49: 390-402.
22. Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmée M, Daube G (2016). *Clostridium difficile* infection: early history, diagnosis and molecular strain typing methods.

Microb Pathog 97: 59-78.

23. Snyder ML (1937). Further studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'Toole). J Infect Dis 60: 223-231.
24. Snyder ML (1940). The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age. J Infect Dis 66: 1-16.
25. Smith LD, King EO (1962). Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J Bacteriol 84: 65-67.
26. Danielsson D, Lambe DW, Persson S (1972). The immune response in a patient to an infection with *Bacteroides fragilis* ss. *fragilis* and *Clostridium difficile*. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol 80(5): 709-712.
27. Hafiz S, Oakley CL (1976). *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. J Med Microbiol 9: 129-136.
28. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH (1974). Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med 81: 429-433.
29. Larson H, Price A (1977). Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. Lancet 2: 1312-1314.
30. Rifkin GD, Fekety FR, Silva J (1977). Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralised by *Clostridium sordellii* antitoxin. Lancet 2(8048): 1103-1106.
31. Gerding DN (2009). *Clostridium difficile* 30 years on : what has, or has not, changed and why? Int J Antimicrob Agents 33: 2-8.
32. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe 40: 95-99.
33. Kufelnicka AM, Kim TJ (2011). Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 52: 1451-1457.
34. Janoir C (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. Anaerobe 37: 13-24.
35. Davis KM, Weiser JN (2011). Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. Infect Immun 79: 562-570.

36. Peltier J, Courtin P, El Meouche I, Leme L, Chapot-Chartier MP, Pons JL (2011). *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *J Biol Chem* 286(33): 29053-29062.
37. Ho TD, Williams KB, Chen Y, Helm RF, Popham DL, Ellermeier D (2014). *Clostridium difficile* Extracytoplasmic function factor σ^V regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect immun* 82(6): 2345-2355.
38. Revilla-guarinos A, Gebhard S, Mascher T, Zúñiga M (2014). Defence against antimicrobial peptides : different strategies in Firmicutes. *Environ Microbiol* 16(5): 1225-1237.
39. McBride SM, Sonenshein AL (2011). The dlt operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* 157: 1457-1465.
40. Voth DE, Ballard JD (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 247-263.
41. Just I, Selzer J, von Eichel-streiber C, Aktories K (1995). The low molecular mass gtp-binding protein rho is affected by toxin a from *Clostridium difficile*. *J Clin Invest* 95(3): 1026-31.
42. Tan KS, Wee BY, Song KP (2001). Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 50(7): 613-619.
43. Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C (1997). Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem* 244(3): 735-742.
44. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5(1): 15-27.
45. Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Paul Ross R, Hill C (2014). The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 5(6): 696-710.
46. Burke KE, Lamont JT (2014). *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease.

Gut Liver 8(1): 1-6.

47. Kazanowski M, Smolarek S, Kinnarney F, Grzebieniak Z (2014). *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities-a systematic review. Tech in Coloproctol 18(3): 223-232.
48. Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Riley TV, Paterson DL, Foster NF, Huber CA, Clements ACA (2015). Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. BMC Infect Dis 15: 1-11.
49. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2014). European society of clinical microbiology and infectious diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 20(2): 1-26.
50. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN (2015). Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. JAMA 313(4): 398-408.
51. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould C V, Kelly C, Loo V, Sammons JS, Sandora TJ, Wilcox MH (2018). Clinical practice guidelines for clostridium difficile infection in adults and children: 2017 update by the infectious diseases society of America (IDSA) and society for healthcare epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 66(7): 987-994.
52. Delmée M (2001). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 7(8): 411-416.
53. Delmée M, Broeck J V, Simon A, Janssens M, Avesani V (2005). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. J Med Microbiol 54: 187-191.
54. Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrlin J, Ikpeama I, Carroll KC (2009). Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol 47(2): 373-378.
55. Schmidt ML, Gilligan PH (2009). *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? Anaerobe 15(6): 270-273.

56. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B (2010). Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 48(2): 606-608.
57. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M (2009). Comparison of nine commercially available clostridium difficile toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol 47(10): 3211-3217.
58. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE (2008). Comparison of real-time PCR for detection of the tcdC gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 46(6): 1996-2001.
59. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, Krishna S (2008). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. Lancet Infect Dis 8(12): 777-784.
60. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM (2010). Evaluation of the C.Diff quik chek complete assay, a new glutamate dehydrogenase and a/b toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol 48(6): 2082-2086.
61. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RLP, Donskey CJ (2007). Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. Clin Infect Dis 45(8): 992-8.
62. Saha S, Khanna S (2019). Management of *Clostridioides difficile* colitis: insights for the gastroenterologist. Therap Adv Gastroenterol 12: 1-15.
63. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland L V., Mellow M, Zuckerbraun BS (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 108(4): 478-498.
64. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). Clin Microbiol Infect 15(12): 1067-1079.

65. Cho JM, Pardi DS, Khanna S (2020). Update on Treatment of *Clostridioides difficile* Infection. Mayo Clin Proc 95(4): 758-769.
66. Goldstein EJC, Babakhani F, Citron DM (2012). Antimicrobial activities of fidaxomicin. Clin Infect Dis 55: 143-148.
67. Venugopal AA, Johnson S (2012). Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 54(4): 568-574.
68. Guh AY, Kutty PK (2018). *Clostridioides difficile* Infection. Ann Intern Med 169(7): ITC49-ITC64.
69. Sekulovic O, Garneau JR, N  ron A, Fortier L (2014). Characterization of temperate phages infecting *Clostridium difficile* isolates of human and animal origins. Appl Environ Microbiol 80(8): 2555-2563.
70. Barbut F, Mastrantonio P, Delm  e M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, European Study Group on Clostridium difficile (ESGCD) (2007). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 13(11): 1048-1057.
71. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin M, Kim M, Shin HB, Uh Y, Lee H, Lee K (2010). Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. Korean J Lab Med 30(5): 491-497.
72. Honda H, Yamazaki A, Sato Y, Dubberke ER (2014). Incidence and mortality associated with *Clostridium difficile* infection at a Japanese tertiary care center. Anaerobe 25: 5-10.
73. Kim YS, Han DS, Kim YH, Kim WH, Kim JS, Kim HS, Kim HS, Park YS, Song HJ, Shin SJ, Yang SK, Ye BD, Eun CS, Lee KM, Lee SH, Jang BI, Jung SA, Cheon JH, Choi CH, Huh KC (2013). Incidence and clinical features of *Clostridium difficile* infection in Korea : a nationwide study. Epidemiol Infect 141(1): 189-194.
74. Kim J, Kang JO, Pai H, Choi TY (2012). Association between PCR ribotypes and antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolates from healthcare-associated infections in South Korea. Int J Antimicrob Agents 40(1): 24-29.

75. Hawkey PM, Marriott C, Liu WE, Jian ZJ, Gao Q, Ling TKW, Chow V, So E, Chan R, Hardy K, Xu L, Manzoor S (2013). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a major chinese hospital: an underrecognized problem in Asia? J Clin Microbiol 51(10): 3308-3313.
76. Galaydick J, Xu Y, Sun L, Landon E, Weber SG, Sun D, Zhou J, Sherer R (2015). Seek and you shall find: prevalence of *Clostridium difficile* in Wuhan, China. Am J Infect Control 43(3): 301-302.
77. Shin JH, Chaves-Olarte E, Warren CA (2016). *Clostridium difficile* infection. Microbiol Spectr 4(3): 10.1128.
78. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, ECDIS Study Group (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 377(9759): 63-73.
79. Collins DA, Elliott B, Riley TV (2015). Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile*. Pathology 47(3): 211-218.
80. Tenover FC, Akerlund T, Gerding DN, Goering R V, Bostrom T, Jonsson A, Wong E, Wortman AT, Persing DH (2011). Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. J Clin Microbiol 49(5): 1831-1837.
81. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland J-F, Pons J (2004). Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. J Clin Microbiol 42(6): 2609-2617.
82. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJM, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE (2010). Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 48(3): 770-778.
83. Alonso R, Martín A, Peláez T, Marín M, Rodríguez-Creixéms M, Bouza E (2005). An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol 54: 155-157.
84. Spigaglia P (2016). Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Infect Dis 3(1): 23-42.

85. Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang Y, Sun X (2017). Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 55(7): 1998-2008.
86. Fortier L, Sekulovic O (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. Virulence 4(5): 354-365.
87. Sangster W, Hegarty JP, Stewart DB (2014). Phage therapy for *Clostridium difficile* infection: an alternative to antibiotics? Semin Colon Rectal Surg 25: 167-170.
88. Carson KC, Boseiwaqa LV, Thean SK, Foster NF, Riley TV (2013). Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens-a comparison of chromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. J Med Microbiol 62(9): 1423-1427.
89. Alfa MJ, Olson N, Murray B (2014). Fecal specimens for *Clostridium difficile* Diagnostic Testing are Stable for up to 72 hours at 4°C. J Med Microb Diag 3(2): 3-5.
90. Kim YJ, Kim SH, Park H-J, Park H-G, Park D, Song SA, Lee HJ, Yong D, Choi JY, Kook J, Kim HR, Shin JH (2016). MALDI-TOF MS is more accurate than VITEK II ANC card and API Rapid ID 32 A system for the identification of *Clostridium* species. Anaerobe 40: 73-75.
91. Tyrrell KL, Citron DM, Leoncio ES, Merriam CV, Goldstein EJ (2013). Evaluation of cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA), CCFA with horse blood and taurocholate, and cycloserine-cefoxitin mannitol broth with taurocholate and lysozyme for recovery of *Clostridium difficile* isolates from fecal samples. J Clin Microbiol 51(9): 3094-3096.
92. Özgen EK (2018). Genç çiftlik hayvanlarının ishal vakalarından, *Clostridium difficile*'in izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. Doktora tezi, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji (Veterinerlik) Ana Bilim Dalı, Kırıkkale
93. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP (2008). 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 14(11): 1057-1064.

94. Centers for Disease Control and Prevention (2013). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Clostridium botulinum* Definitions and Terms [online]. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/c-botulinum-protocol-508c.pdf>.
95. Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, Takahashi M, Tanaka M, Taguchi H, Watanabe T, Inamatsu T, Kamiya S (2012). Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. J Clin Microbiol 50: 915-921.
96. Burnham CAD, Carroll KC (2013). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clin Microbiol Rev 26(3): 604-630.
97. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.
98. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 32th Informational Supplement (2022). CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania USA.
99. Aydemir Ş, Çöplü N, Gülay Z, Gür, Hasdemir U, Karahan ZC, Karatuna O, Kayacan ZÇ, Söyletir G (2016). Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: uygulama, yorum ve uzman kurallar. Turk Mikrobiyol Cem Derg 46: 2-10.
100. Snyderman DR, Mcdermott LA, Jacobus N V, Thorpe C, Stone S, Jenkins SG, Goldstein EJC, Patel R, Forbes BA, Mirrett S, Johnson S, Gerding DN (2015). U.S.-based National Sentinel Surveillance Study for the epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrheal isolates and their susceptibility to fidaxomicin. Antimicrob Agents Chemother 59(10):6437-6443.
101. Kowalski RP, Yates KA, Romanowski EG, Karenchak LM, Mah FS, Gordon YJ (2005). An ophthalmologist's guide to understanding antibiotic susceptibility and minimum inhibitory concentration data. Ophthalmology 112: 1987.
102. Shan J, Patel K V, Hickenbotham PT, Nale JY, Hargreaves KR, Clokie MRJ (2012). Prophage carriage and diversity within clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. Appl Environ Microbiol 78(17): 6027-6034.

103. Nale JY, Spencer J, Hargreaves KR, Buckley AM, Trzepin P, Douce GR, Clokie MRJ (2016). Bacteriophage combinations significantly reduce *Clostridium difficile* growth in vitro and proliferation in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 60(2): 968-981.
104. Banawas SS (2018). *Clostridium difficile* infections: a global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms. *BioMed Res Int* 8414257.
105. Lim SC, Knight DR, Riley T V (2020). *Clostridium difficile* and one health. *Clin Microbiol Infect* 26(7): 857-863.
106. Fu Y, Luo Y, Grinspan AM (2021). Epidemiology of community-acquired and recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Therap Adv Gastroenterol* 14: 1-11.
107. Thornton CS, Rubin JE, Greninger AL, Peirano G, Chiu CY, Pillai DR (2018). Epidemiological and genomic characterization of community-acquired *Clostridium difficile* infections. *BMC Infect Dis* 18(1): 443.
108. Curcio D, Cané A, Fernández FA, Correa J (2019). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Ther* 8(1): 87-103.
109. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev* 23(3): 529-549.
110. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB, D'Arc S, Brazier J, Brown D, Coia JE, Douce G, Gerding D, Kim HJ, Koh TH, Kato H, Senoh M, Louie T, Mitchell S, Butt E, Peacock SJ, Brown NM, Riley T, Songer G, Wilcox M, Pirmohamed M, Kuijper E, Hawkey P, Wren BW, Dougan G, Parkhill J, Lawley TD (2013). Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 45(1): 109-113.
111. Pépin J, Valiquette L, Alary M, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 171(5): 466-472.
112. Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L (2007). Increase in *Clostridium difficile*-

- related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis* 13(9): 1417-1419.
113. Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH (2013). *Clostridium difficile*: a European perspective. *J Infect* 66(2): 115-128.
114. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH (2008). Increase in Adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality Rate, United States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* 14(6): 929-931.
115. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7(7): 526-536.
116. Sayın E, Bilgin H, Söyletir G, Toprak NÜ (2020). Türkiye'deki bir üniversite eğitim ve araştırma hastanesinde elde edilen toksijenik *Clostridioides difficile* izolatlarına antimikrobiyallerin in vitro etkisi. *Mikrobiyol Bul* 54(3): 368-377.
117. Beran V, Kuijper EJ, Harmanus C, Sanders IM, van Dorp SM, Knetsch CW, Janeckova J, Seidelova A, Barekova L, Tvrdik J, Chmelar D, Ciznar I (2017). Molecular typing and antimicrobial susceptibility testing to six antimicrobials of *Clostridium difficile* isolates from three Czech hospitals in Eastern Bohemia in 2011-2012. *Folia Microbiol* 62(5): 445-451.
118. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN, McDonald LC (2015). Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 372(9): 825-834.
119. Karaaslan A, Soysal A, Yakut N, Akkoç G, Demir SO, Atıcı S, Toprak NU, Söyletir G, Bakır M (2016). Hospital acquired *Clostridium difficile* infection in pediatric wards: a retrospective case-control study. *Springerplus* 5(1): 1329.
120. Öksüz Ş, Danış A, Öztürk E, Çalışkan E, Kılıç Akar N, Sungur MA (2017). The Investigation of *Clostridium difficile* Colonization in Long Term Hospitalized Patients. *Anatolian Clin* 22(3): 177-182.
121. Yoldaş Ö, Altındış M, Cufalı D, Aşık G, Keşli R (2016). A diagnostic algorithm for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Balkan Med J* 33(1): 80-86.

122. Lale Z, Dogruman Al F, Fidan I, Adiyaman G, Yesilyurt E, Ozkan S, Caglar K (2013). The Investigation of Frequency of *Clostridium difficile* Toxin A/B in Stool Samples of Patients with Diarrhea. *Ankem Derg* 27(2): 55-59.
123. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Patricia P, Orenstein R, Sauver JLS, Harmsen WS, Zinsmeister AR (2012). The Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 107(1): 89-95.
124. Kuntz JL, Chrischilles EA, Pendergast JF, Herwaldt LA, Polgreen PM (2011). Incidence of and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: a nested case-control study. *BMC Infect Dis* 11: 194.
125. Abeyawardhane DL, Godoy-Ruiz R, Adipietro KA, Varney KM, Rustandi RR, Pozharski E, Weber DJ (2021). The importance of therapeutically targeting the binary toxin from *Clostridioides difficile*. *Int J Mol Sci* 22(6): 2926.
126. Tae CH, Jung S, Song HJ, Kim S, Choi HJ, Lee M, Hwang Y, Kim H, Lee K (2009). The first case of antibiotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Korea. *J Korean Med Sci* 24(3): 520-524.
127. Kim H, Riley T V, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, Chong Y, Park J (2008). Increasing prevalence of Toxin A-negative, Toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 46(3): 1116-1117.
128. Byun J, Kim H, Lim J, Kim D, Hoon S, Hwan J, Ah Y, Hee J, Seob K, Uh Y (2019). A nationwide study of molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridioides difficile* in South Korea. *Anaerobe* 60: 102106.
129. Gonçalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit J-C (2004). Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 42(5): 1933-1939.
130. Kilic A, Alam MJ, Tisdell NL, Shah DN, Yapar M, Lasco TM, Garey KW (2015). Multiplex real-time PCR method for simultaneous identification and toxigenic type characterization of *Clostridium difficile* from stool samples. *Ann Lab Med* 35(3): 306-313.
131. Salman E, Levent B, Karahan ZC (2017). Antimicrobial susceptibilities and

molecular characterization of toxin-positive *Clostridium difficile* Isolates: the first report on the presence of hypervirulent strains from Turkey. Mikrobiyol Bul 51(3): 236-246.

132. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G (2011). Investigation of Toxin Genes of *Clostridium difficile* Strains Isolated from Hospitalized Patients with Diarrhoea at Marmara University Hospital. Mikrobiyol Bul 45(1): 1-10.
133. Özgen EK, Yıldırım M (2021). Isolation and identification of *Clostridium difficile* from cases of diarrhea in young farmanimals, and the determination of antimicrobial susceptibility. Turk J Vet Anim Sci 45(2): 266-271.
134. Hampikyan H, Bingol EB, Muratoglu K, Akkaya E, Cetin O, Colak H (2018). The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. Meat Sci 139: 120-124.
135. Muratoglu K, Akkaya E, Hampikyan H, Bingol EB, Cetin O, Colak H (2020). Detection, characterization and antibiotic susceptibility of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in meat products. Food Sci Anim Resour 40(4): 578-587.
136. Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, Baines SD, Camacho-Ortiz A, Garza-González E (2020). Molecular epidemiology of predominant and emerging *Clostridioides difficile* ribotypes. J Microbiol Methods 175: 105974.
137. Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Béliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A (2011). Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. N Engl J Med 365(18): 1693-1703.
138. Aliramezani A, Talebi M, Golbabaei F, Baghani A, Marjani M, Afhami S, Hajabdolbaghi M, Boroumand MA, Kuijper EJ, Douraghi M (2019). Characterization of *Clostridioides difficile* isolates recovered from hospitalized patients and the hospitals environment and air: a multicenter study. Anaerobe 59: 154-158.
139. Sisakhtpour J, Savaheli MF, Khodaparast S, Khoramabadi N, Mobarez AM (2021). Phenotypical and genotypical comparison of *Clostridium difficile* Isolated from clinical samples: homebrew DNA fingerprinting versus antibiotic susceptibility testing (AST) and Clostridial toxin genes. Can J Infect Dis Med Microbiol 7386554.

140. Nicholas A, Kim YK, Lee WK, Selasi GN, Na SH, Kwon H Il, Kim YJ, Lee HS, Song KE, Shin JH, Lee JC (2017). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from two Korean hospitals. PLoS One 12(3): e0174716.
141. Ngamskulrungroj P, Sanmee S, Pusathit P, Piewngam P, Elliott B, Riley T V., Kiratisin P (2015). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a large teaching hospital in Thailand. PLoS One 10(5): e0127026.
142. Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD, Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, Songer JG, Gröhn YT, Chang YF (2009). Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin. J Bacteriol 191(2): 3881-3891.
143. van Boeckel, Thomas P Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci USA 112(18): 5649-5654.
144. Dadgostar P (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. Infect Drug Resist 12: 3903-3910.
145. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health 109(7): 309-318.
146. van Beurden YH, Nieuwdorp M, van de Berg PJEJ, Mulder CJJ, Goorhuis A (2017). Current challenges in the treatment of severe *Clostridium difficile* infection: early treatment potential of fecal microbiota transplantation. Therap Adv Gastroenterol 10(4): 373-381.
147. Imwattana K, Knight DR, Kullin B, Collins DA, Putsathit P, Kiratisin P, Riley TV (2020). Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile* ribotype 017. Expert Rev Anti Infect Ther 18(1): 17-25.
148. Kuijper EJ, Weerdt J de, Kato H, Kato N, van Dam AP, van der Vorm E, Weel J, van Rheenen C, Dankert J (2001). Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20(8): 528-534.
149. Curry SR, Marsh JW, Shutt KA, Muto CA, O'Leary MM, Saul MI, Pasculle AW,

- Harrison LH (2009). High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. Clin Infect Dis 48(4): 425-429.
150. Dingle KE, Didelot X, Quan TP, Eyre DW, Stoesser N, Marwick CA, Coia J, Brown D, Buchanan S, Ijaz UZ, Goswami C, Douce G, Fawley WN, Wilcox H, Peto TEA, Walker AS, Crook DW (2019). A role for tetracycline selection in recent evolution of agriculture-associated *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078. mBio 10(2): e02790-18.
 151. Lee J, Lee Y, Lee K, Riley T V, Kim H (2014). The changes of PCR ribotype and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a tertiary care hospital over 10 years. J Med Microbiol 63(6): 819-823.
 152. Imwattana K, Rodríguez C, Riley TV, Knight DR (2021). A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. Microb Genom 7(11): 000696.
 153. Chatedaki C, Voulgaridi I, Kachrimanidou M, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Petinaki E (2019). Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance of Greek *Clostridium difficile* clinical isolates. J Glob Antimicrob Resist 16: 53-58.
 154. Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicolson S, Shearman S, Clark E, Palacios-fabrega JA, Wilcox M, Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group (2020). Five-year Pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: the extended ClosER study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 39(1): 169-177.
 155. Goh S, Riley TV, Chang BJ (2005). Isolation and characterization of temperate bacteriophages of *Clostridium difficile*. Appl Environ Microbiol 71(2): 1079-1083.
 156. Mahony DE, Bell PD, Easterbrook KB (1985). Two Bacteriophages of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 21(2): 251-254.
 157. Phothichaisri W, Ounjai P, Phetruen T, Janvilisri T, Khunrae P, Singhakaew S, Wangroongsarb P, Chankhamhaengdech S (2018). Characterization of bacteriophages infecting clinical isolates of *Clostridium difficile*. Front Microbiol 9: 1701.

158. Nale JY, Shan J, Hickenbotham PT, Fawley WN, Wilcox MH, Clokie MRJ (2012). Diverse temperate bacteriophage carriage in *Clostridium difficile* 027 strains. PLoS One 7(5): e37263.





EKLER

164.

2. Abdurahman MA, Tosun İ, **Durukan İ**, Khorshidtalab M, Kılıç AO (2018). Four temperate bacteriophages from Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* show broad bactericidal and biofilm removal activities. Kafkas Univ Vet Fak Derg 27 (1):29-36.

BİLDİRİLER

1. **Durukan İ**, Bayramoğlu G, Tosun İ. Bir Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen Clostridioides difficile İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları, 6. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Hibrid Kongresi, PS-066, 20-24 Ekim 2021, Online.
2. **Durukan İ**, Bayramoğlu G, Tosun İ. Investigation of Toxin Genes of *Clostridioides difficile* Isolates, International Health Areas Congress 2021(IHAC'21), Oral Presentation pp. 182-183, September 18th-19th, 2021, Online.
3. **Durukan İ**, Bayramoğlu G, Tosun İ. *Clostridium difficile* isolation from toxin-investigated stool specimens, 3rd International Human Microbiota: In Health And Diseases Congress, PP-01, November 7-9 2019, İstanbul, TURKEY.
4. **Durukan İ**, Ulucam Atay G, Cora M, Sağlam Ertunga N, Kılıç AO. Mağarlardan İzole Edilmiş ve Antibiyotik Direnç Geni Taşıyan Gram-Negatif Bakterilerin MALDI-TOF MS Ve 16s rRNA Dizi Analizi ile Tanımlanması, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, SS-048, 4-8 Kasım 2018, Antalya, TÜRKİYE.
5. **Durukan İ**, Bayramoğlu G, Tosun İ, Kaklıkkaya N, Aydın F. Investigation of the antimicrobial effects of Nigella sativa l. seeds on the Multiple resistant clinical isolates", 10th Balkan Congress of Microbiology, November 16th-18th, 2017, Sofia, BULGARIA.
6. **Durukan I**, Khorshidtalab M, Karahan D, Tufekci EF, Bayramoglu G, Kilic AO. Identification of a lytic bacteriophage from waste water infecting clinical isolates of Klebsiella spp., 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, pp.39-39, November 13th-15th 2015, Thessaloniki, GREECE.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. 3rd International Human Microbiota: In Health and Diseases Kongresi, 2019- Kayıt ve Konaklama bursu
2. 10th Balkan Congress of Microbiology, 2017- Young scientist grant
3. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2017- En iyi 2. Bildiri Ödülü