



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE POZİTİF HASTALARDA
NOROVİRÜS İNSİDANSININ ELİSA VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

HANİFE ŞURA ŞALCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ZEYNEP ARZU İLKİ

2020-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hanife Şura ŞALCI

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince, her konuda bana yardımcı ve yol gösterici olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlanarak akademik yönümün gelişmesinde büyük katkısı bulunan, güvenini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli öğretmenim ve tez danışmanım Prof. Dr. Zeynep Arzu İLKİ' ye sevgisi ve hoşgörüsünden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim esnasında değerli bilgilerini benimle paylaşan Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN'a, Prof. Dr. Münevver Ufuk HASDEMİR'e, Prof. Dr. Nurver ÜLGER'e, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU'na, Dr. Öğr Üyesi Burak AKSU'ya, Arş. Gör. Deniz GÜNEŞER'e, Uzm. Dr. Elvan SAYIN'a ve Uzm. Dr. Rabia Can SARINOĞLU'na en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren benimle güzel dostluklarını paylaşan, karamsarlığa düştüğüm anlarda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Ayfer GÜNER' e, Semra EMİNOĞLU' na, Sümeyye BORLAK' a ve Bermal TEKEŞ' e teşekkürü borç bilirim.

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, her zor anımda beni cesaretlendiren, başarımlarım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her konuda sonsuz özverileriyle beni minnettar kılan babam Yakup ŞALCI' ya annem Leyla ŞALCI' ya ve kardeşlerim Şevval ŞALCI ve Yusuf ŞALCI' ya şükranlarımı sunarım.

Hayatımı anlamlandıran, tanıştığımız andan beri mutlu ve zorlu her anımda elimden tutan ve beni destekleyen hayat arkadaşım Osman ASLAN' a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-120619-0209 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Hanife Şura ŞALCI

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER	vi
ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Gastroenterit.....	5
2.1.1.Patogenez.....	5
2.1.1.1.Gelişim Mekanizmaları.....	5
2.1.2.Etyoloji	6
2.1.2.1.Viral Gastroenterit	6
2.1.2.2.Bakteriyal Gastroenterit	7
2.1.2.3.Antibiyotiğe Bağlı İshaller	7
2.2. <i>Clostridioides (Clostridium)difficile</i>	7
2.2.1.Tarihçe	7
2.2.2.Tanım	8
2.2.3.Epidemiyoloji	8
2.2.4.Patogenez ve Klinik Özellikler	9
2.2.5.Risk Faktörleri	11
2.2.6.Tanı	11
2.2.6.1.Kültür	11

2.2.6.2.Seroloji	12
2.2.6.3.Moleküler Yöntemler	12
2.2.7.Tedavi	13
2.2.8. <i>Clostridium difficile</i> ve Gastroenterit Etkeni Virüslerin Koenfeksiyonu.....	14
2.3.Norovirüs	15
2.3.1.Tarihçe	15
2.3.2.Virüsün Yapısı ve Sınıflandırılması	15
2.3.3.Norovirüsün Replikasyonu	18
2.3.4.İmmunoloji ve Patogenez	19
2.3.5.Klinik Özellikler	20
2.3.6.Tanı	20
2.3.6.1.Elektron Mikroskopisi	21
2.3.6.2.Antijen Tarama	21
2.3.6.3.Antikor Tarama	22
2.3.6.4.Moleküler Tanı	22
2.3.7.Tedavi ve Korunma	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1.Gereç	24
3.1.1.Kullanılan Cihazlar ve Aletler	25
3.1.2.Kullanılan Ticari Kitler	25
3.2.Yöntem	25
3.2.1.Dışkı Örneklerinin Toplanması	25
3.2.2.Dışkıda Hızlı Tanı Kiti ile <i>Clostridium difficile</i> GDH ve Toksin Tayini.....	26
3.2.3.ELISA Yöntemiyle Norovirüs Antijeni Saptanması	27
3.2.4.İstatistiksel Analiz	29
3.2.5.Dışkıda RT-PCR Yöntemi ile Norovirüs Aranması	30

4.BULGULAR	36
4.1. Dışkıların toplanması ve değerlendirilmesi	36
4.2. Dışkıda norovirüs antijeni ELISA sonuçları	37
4.3. Dışkıda norovirüs gerçek zamanlı RT-PZR sonuçları	38
5.TARTIŞMA-SONUÇ	45
6.KAYNAKÇA	51
EKLER	63
EK 1. ETİK KURUL ONAY FORMU	63
EK 2. MAKALE GÖNDERİMİ	64
EK 3. ÖZGEÇMİŞ	65

KISALTMA VE SİMGELER

AGE: Akut Gastroenterit

C. difficile: *Clostridium difficile*

CFF: Cycloserine ve cefoxitin fructose agar

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

E. coli: *Escherichia coli*

EIA: Enzim Immunoassay

ELİSA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EM: Elektron mikroskopi

FUT: Fukoziltransferaz

GDH: Glutamat Dehidrogenaz

HBGA: Histo-kan Grubu Antijeni

HeLa: İnsan servikal kanser hücreleri

HEp-2: İnsan epidermoid karsinom hücre kültürü

IC: İmmunokromatografi

IgG: Immunglobulin G

Kb: Kilobaz

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Real-time RT-PCR: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyonlu Polymerase Chain
Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RIA: Radyo Immunoassay

RNA: Ribonükleik asit

RSHM: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi

ssRNA: single stranded RNA

VLP: Virus-like particle

Vpg: Viral protein Genom

VRE: Vankomisine Dirençli Enterokok



ŞEKİL, RESİM ve TABLO LİSTESİ

Şekil 1. <i>C. difficile</i> enfeksiyon basamakları	9
Şekil 2. Norovirüs proteinleri ve genomu	16
Şekil 3. Norovirüs kapsid yapısı	16
Şekil 4. Norovirüs büyük kapsid protein yapısı	17
Şekil 5. Norovirüs filogenetik ağaç	18
Şekil 6. Norovirüs Genogrup I-II	35
Şekil 7. Hasta yaş dağılım grafiği	36
Şekil 8. Tüm hastaların amplikasyon eğrileri	40
Şekil 9. Norovirüs pozitif sonuç (56 no lu örnek)	40
Şekil 10. Norovirüs negatif sonuç (8 no lu örnek)	41
Resim 1. CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH + Toksin A+B kiti	26
Resim 2. CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH + Toksin A + B kart test	26
Resim 3. CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH + Toksin A + B kart test sonuç okuma	27
Resim 4. 3 rd Generation RIDASCREEN Norovirüs kiti (R-Biopharm, Darmstdt, Almanya)	28
Resim 5. Spektrofotometre	30
Resim 6. RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PCR (R-Biopharm, Darmstdt, Almanya) kiti	31
Resim 7. Corbett Research RG-6000 Real Time PCR (QIAGEN) cihazı	31
Resim 8. Norovirüs elisa testinde görülen pozitif ve negatif örnekler	37
Tablo 1. RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PCR kit içeriği	33

Tablo 2. Master mix hazırlama tablosu	33
Tablo 3. Gerçek zamanlı RT-PCR profili	34
Tablo 4. Yaş gruplarına göre ELISA sonuçlarının dağılımı	38
Tablo 5. Yaş gruplarına göre gerçek zamanlı RT-PZR sonuçlarının dağılımı.....	39
Tablo 6. ELISA ve RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması	41
Tablo 7. Duyarlılık/ Özgüllük tablosu	43
Tablo 8. Norovirüs pozitif hastalara ait klinik bilgiler	44



ÖZET

***Clostridium difficile* pozitif hastalarda norovirüs insidansının elisa ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılması**

Hanife Şura Şalcı, Zeynep Arzu İlki, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

AMAÇ: Yapılan bu çalışmadaki amaç, *Clostridium difficile* toksin pozitif hasta örneklerinde norovirüs varlığını iki farklı yöntemle, ELISA ve Moleküler yöntemlerle saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM : Ocak 2019, Mart 2020 tarihleri arasında, *Clostridium difficile* toksin (CerTest, GDH + Toksin A+B (BIOTEC, İspanya)) hızlı tanı kiti ile pozitif bulunmuş 82 hasta örneği çalışmaya dahil edildi. Bu örneklerde iki yöntemle norovirüs varlığı araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında ELISA (RIDASCREEN Norovirüs kiti (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya)) ile norovirüs antijeni aranmıştır. İkinci aşamasında ise aynı örneklerde gerçek zamanlı RT-PZR yöntemi (Corbett Rotor-Gene 6000 HRM) kullanılarak nükleik asit aranmıştır.

BULGULAR: Çalışmaya dahil edilen toplam 82 örnekte ELISA ile norovirüs pozitifliği %3,7 (n:3) olarak bulunmuştur. Aynı örneklerin gerçek zamanlı RT-PZR sonucunda ise norovirüs pozitifliği %8, 5 (n:7) olarak değerlendirilmiştir. RT-PZR referans alındığında, ELISA testinin duyarlılığı %63,6, özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir.

SONUÇ : Çalışmamızda *C. difficile* toksin pozitif hastalarda % 8,5 oranında norovirüs ile koenfeksiyon görülmüş, bu azımsanmayacak oran literatürle uyumlu gözükmektedir. Klinisyenler özellikle uzun süreli yatış hikayesi, immun yetmezliği olan *C.difficile* toksin pozitif hastaları için olası norovirus enfeksiyonunu da akla getirmelidir. Uzun süren, tedavi etmekte zorluk yaşanan ishalli hastalarda, enteropatojenler arası etkileşimleri düşünmek, farklı tanı arayışlarına girmek ve tedaviyi buna göre yönlendirmek önemlidir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Clostridium difficile*, norovirüs, koenfeksiyon, ELISA, gerçek zamanlı RT-PCR

SUMMARY

Comparison of norovirus incidence with elisa and molecular methods in *Clostridium difficile* positive patients

Hanife Şura Şalcı, Zeynep Arzu İlki, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Objective: The aim of this study is to detect the presence of norovirus in *Clostridium difficile* toxin positive patients with two different methods, ELISA and Molecular methods.

Material and methods: Between January 2019 and March 2020, 82 patient samples found positive with the Rapid Diagnostic Kit of *Clostridium difficile* toxin (CerTest, GDH + Toxin A + B (BIOTEC, Spain)) were included. In these examples, norovirus was investigated by two methods. The first stage of the study was to search for norovirus antigen by ELISA (RIDASCREEN Norovirus kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany)). In the second stage, nucleic acid was searched in the same samples using the real-time RT-PCR method (Corbett Rotor-Gene 6000 HRM).

Results: Norovirus positivity was found as 3,7% (n: 3) by ELISA in a total of 82 samples included in the study. Norovirus positivity in real-time RT-PCR of the same samples was evaluated as 8,5% (n: 7). When the RT-PCR is taken as reference, the sensitivity of the ELISA test was 63,6% and the specificity was 100%.

Conclusion: In our study, co-infection with norovirus was observed with a rate of 8,5% in *C. difficile* toxin positive patients, and this rate is consistent with the literature. Clinicians should consider possible norovirus infection, especially for *C.difficile* toxin positive patients with immunodeficiency. It is important to consider interactions between enteropathogens, to search for different diagnoses and to direct treatment accordingly in patients with long-lasting diarrhea.

Keywords: *Clostridium difficile*, norovirus, coinfection, ELISA, real time RT-PCR

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gastroenterit, yaş fark etmeksizin bireylerin günlük yaşantısını etkileyen bir bağırsak enfeksiyonudur. İshal, bulantı ve bazı zamanlarda ateş en yaygın belirtileridir. Bir günde üç ve ya daha fazla dışkılamaya akut gastroenterit denir. Virüsler, bakteriler ve parazitler hastalığın sebebi olmaktadır. Dünya genelinde ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada çocuklarda ise ilk sırada yer almaktadır. Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) açıklamalarına çocuklarda göre her yıl yaklaşık 1,7 milyar vaka görülmektedir (WHO, 2017).

Akut gastroenterit etkenleri virüsler, bakteriler ve parazitler gibi mikrobiyal patojenler olabilmektedir. Bunların arasında en sık rastlanan etkenin virüsler olduğu bilinmektedir (Elliott, 2007). Viral kaynaklı gastroenteritin en önemli etkenleri rotavirüs ve norovirüs olarak gösterilmektedir. Norovirüs, özellikle çocuklarda, erişkinlerde ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Etkenler yaşa göre değişebilmektedir, özellikle yaşlılar (65 yaş üstü kişiler), hastanede yatış öyküsü, antibiyotik kullanımı, immun yetmezliği olan kişilerde *Clostridioides difficile* önem kazanmaktadır.

Clostridioides difficile (*C. difficile*) bağırsağı kolonize etmek için normal bağırsak mikrobiyotasının bozulmasından yararlanan, toksinleriyle hastalık semptomlarına neden olan gram pozitif, spor oluşturabilen anaerobik bir basildir. En önemli risk faktörü antibiyotik kullanımıdır. Florada dengesizliğe neden olan antibiyotik sonrası çoğalan *C. difficile*, sahip olduğu toksin A, toksin B ve *binary toksin* ile bağırsak mukozasının etkileyerek ishale neden olmaktadır. *C. difficile* kaynaklı enfeksiyonun tedavi adımlarından ilki sebep olan antibiyotiğin kesilmesidir. Semptomları hala devam eden vakalarda antimikrobiyal tedaviye başlanmaktadır. Önerilen tedavi metronidazol ve vankomisindir (Morinville ve ark., 2005).

Norovirüs, gastroenterite sebep olan, Caliciviridae ailesinden bir RNA virüsüdür. Centre for Disease Control and Prevention (CDC) verilerine göre, norovirüs 685 milyon AGE vakasına neden olur, 5 yaşın altındaki çocuklar arasında ise yaklaşık 200 milyon vaka vardır (CDC, 2018). 7 farklı serogrupta sınıflandırılmaktadır (GI-

VII). Dünya çapında norovirüs salgınlarının nedeni GII.4 (genogrup II genotip 4) suşlarıdır. Norovirüs enfeksiyonlarında spesifik tedavi olmadığı için destek tedaviden yararlanır.

Viral ve bakteriyal patojenler bağırsakta aynı veya farklı bölgeleri etkileyebilmektedir. Herhangi birinin varlığı başka patojenlerin çoğalmasına ve semptomlarının şiddetinde artışa neden olabilmektedir. Norovirüsün bağırsak epitel homeostazını etkileyerek *C. difficile* kolonizasyonuna ve toksin etkilerinde artışa neden olabileceğı düşünölmektedir (Lukkarinen ve ark., 2009).

Bu çalışmada, gastroenterit bulguları olan, Marmara Üniversitesi Eğıtim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş *C. difficile* toksin testi pozitif hastaların örneklerinde norovirüs varlığını Moleküler ve ELISA yöntemlerini kullanarak saptamayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Gastroenterit

İshal oldukça önemli bir sağlık sorunudur ve tüm dünyada enfeksiyona bağlı ölümler arasında ilk üç sıralama içerisinde (Kosek ve ark., 2003). Akut ishal bir anda başlayıp 14 gün içerisinde sonlanan, persistan ishal ise akut başlangıçlı fakat 14 günden uzun süren ishaldir. Kronik ishal ise bir aydan daha uzun süredir devam eden ishal çeşididir (Black RE, 1993; Branski D ve ark., 1996).

İshalle ilgili klinik durumlardan gastroenterit; midenin ve aynı zamanda ince barsağın etkilenmesi sonucu bulantı, ishal, kusma, karın ağrısı belirtileri gösteren klinik tablodur. Enterokolit ise ince ve kalın barsak mukozasının etkilendiği kusma ve bulantının olmadığı ateş, karın ağrısı ve ishalin bulunduğu klinik durumdur (Midilli, 1998; Çelik ve Turna, 1998).

2.1.1. Patogenez

2.1.1.1 Gelişim mekanizmaları

İshal 5 farklı mekanizma ile oluşabilir (Çelik ve Turna, 1998)

- a) Osmotik ishaller
- b) Sekretuar ishaller
- c) İnflamatuvar ishaller
- d) Motilite bozukluğuna bağlı ishaller
- e) Emilim yüzeyinin azalmasına bağlı ishaller

2.1.2. Etyoloji

Akut gastroenteritin etkenleri virüsler, bakteriler ve parazitlerdir. Bunların arasında en sık rastlanan etkenin virüsler olduğu bilinmektedir (Elliott, 2007).

2.1.2.1. Viral gastroenterit

50 yıl öncesine kadar ishalin etkenleri arasında virüsler yoktu. Dışkıda elektron mikroskopunun kullanılmasıyla virüsler saptanmaya başladı. 1972’de Norwalk ve 1978’ de rotavirüs varlığı kanıtlandı (Zarakolu ve ark., 1999).

Sözen ve arkadaşlarına göre viral etkene yönelik incelemelerin yapılması gereken durumlar; ateşin mevcut olmadığı fakat kusma ve karın ağrısının bulunduğu, dışkıda yapılan incelemelerde lökosit ve eritrositin görülmediği durumlardır (Sözen ve ark., 2014).

Akut gastroenterite neden olan virüsler olarak rotavirüs, adenovirüs, norovirüs, saprovirüs sayılabilir. 2009’ da Türkiye’nin birçok ilinden Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi (RSHM) Viroloji Merkez Laboratuvarına akut gastroenterit sebebi ile gelen gaita örneklerinde %44,2 viral etken, %6,8 birden fazla viral etken saptanmıştır. Bu sonuçlara göre Rotavirüs %16, Adenovirüs %4, Norovirüs (%57 GII ve % 18 GI), Astrovirüs %4 oranlarında ve %15,4’ ü ise koenfeksiyon olarak bulunmuştur (Albayrak ve ark., 2011).

Viral gastroenteritin epidemiyolojisine baktığımızda hem endemik hem de epidemik şekilde hastalığa neden olabilir. Norovirüs tüm yıl görülebilir ama kışın daha fazladır, adenovirüs ise tüm mevsimlerde görülebilme özelliğine sahiptir (Bates ve ark., 1993). Daha çok kış aylarında görülen rotavirüse bağlı ishaller ise özellikle gelişmekte olan ülkelerde 2 yaş altındaki çocuklarda ölümlere neden olabilir (Kurugöl ve Devrim, 2014).

2.1.2.2. Bakteriyel gastroenterit

Bakteriyel gastroenteritlere neden olan birçok bakteri mevcuttur. Bunlara örnek olarak *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli* vb. verilebilir (Wolf ve ark., 1993). Bakteriyel gastroenteritler de kontamine olmuş yiyecek ve suların oral yolla vücuda girmesiyle oluşur.

2.1.2.3. Antibiyotiğe bağlı ishaller

Antibiyotiğe bağlı ishaller; kişinin antibiyotik kullanımı sonrasında günde dört ve ya daha fazla kez dışkılaması olarak tanımlanır. Antibiyotikler barsak florasında bulunan mikroorganizma yoğunluğunu değiştirerek patojen olan mikroorganizmaların artışına neden olur. Bu patojenlerin barsak mukozası üzerinde yaptığı toksik ve alerjik etki sonucu ishal meydana gelir (Hogenauer ve ark., 1998).

Antibiyotikle ilişkili ishaller söz konusu olduğunda akla ilk gelen etken olan *Clostridioides (Clostridium) difficile*; semptomları daha hafif ishalden, ağır psödomembranöz enterokolite kadar gidebilecek ishallere neden olabilir. İki adet ekzotoksini vardır ve bunlar aracılığı ile mukozada hasara neden olmaktadır (Johnson ve Gerding, 1998; Dizer ve ark., 1998).

2.2. *Clostridioides (Clostridium) difficile*

2.2.1.Tarihçe

Clostridioides (Clostridium) difficile (C.difficile) ilk olarak 1935 yılında Hall ve O'Toole aracılığıyla yeni doğmuş bebeklerin dışkı örneklerinden izole edilmiştir. Adı,

bakterinin kültüre edilmesi zor olduğu için İngilizce anlamı ‘zor’ olan ‘difficult’ kelimesinden türetilmiştir (Pothoulakis ve LaMont, 1993). 1978’den önce *Clostridium difficile*’nin patojenitesi anlaşılamamıştır. İlk olarak Bartlett ve arkadaşları, pseudomembranöz kolitli hasta gaitalarında sitotoksinin *C.difficile* kaynaklı olduğunu tespit etmişlerdir (Bartlett ve ark., 1978). Son yıllarda *C.difficile* kaynaklı ishal vakaları dünya çapında artış göstermektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika’nın bazı ülkelerinde *C.difficile* NAP/BI/027 kökeni tespit edilmiştir. Virülansı yüksek ve ağır seyir eden enfeksiyonlara neden olan bu köken dünya ülkelerine karşı tehdit oluşturmaktadır (Cornely ve ark., 2012).

2.2.2.Tanım

C.difficile sahip olduğu ekzotoksinler ile hastalığa neden olan, anaerob, spor oluşturabilen, gram pozitif bir basildir. Sahip olduğu flagella sayesinde hareket yeteneğine sahiptir. Sporlar kendisi için uygun ortam koşullarını sağlayan barsakta vejetatif forma geçiş yapar. Uygun üreme sıcaklığı 37 °C dir. Bakterinin vejetatif formu sporlarının aksine alkol, ısı, antibiyotik ve eter gibi etkenlere karşı dayanıksızdır. *C.difficile* sağlık kuruluşlarında uzun süre canlılığını koruyabilmektedir (Bauer ve Kuijper, 2015).

2.2.3.Epidemiyoloji

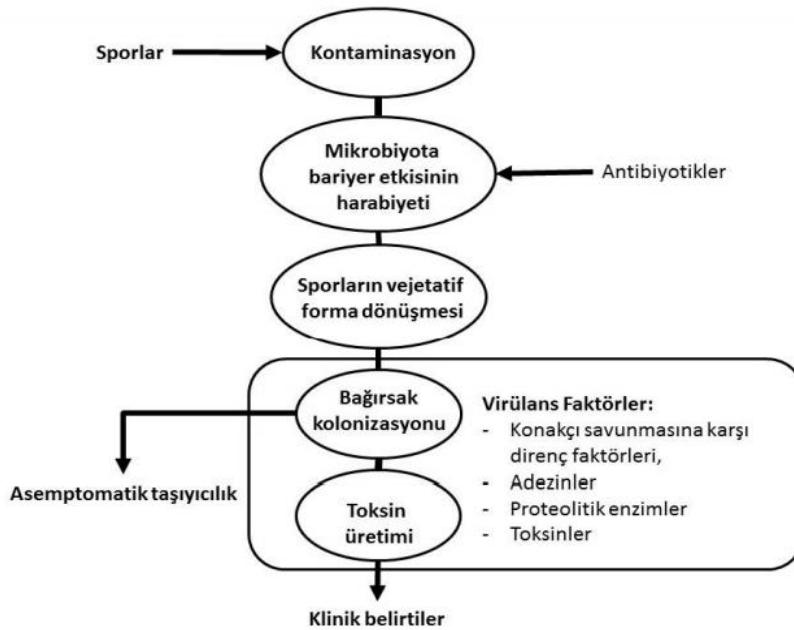
Antibiyotik kaynaklı ishal ve kolitler, antibiyotik kullanımının artması nedeniyle önemli derecede artış göstermiştir. *C.difficile* enfeksiyon insidansı ile beraber hastalığın şiddeti de giderek artmıştır (Bartlett, 2002). Yapılan bazı çalışmalar sonucu 1996-2003 yılları arasında Amerika’da *C. difficile* enfeksiyon insidansı ve şiddeti iki katına çıkmıştır. Ayrıca 1994-2004 yılları arasında ise *C.difficile* kaynaklı

enfeksiyon ölüm oranının dört katına çıktığı görülmüştür (McDonald ve ark., 2006; Redelings ve ark., 2007).

Avrupa *C. difficile* Çalışma Grubu'nun 2005 yılında sonuçlandığı bir çalışmada, 14 ülke ve 38 hastaneden alınan *C. difficile* toksin pozitif hasta örnekleri çalışılmış ve 345 adet farklı toksin pozitif *C. difficile* izolatu tanımlanmıştır. Aynı zamanda 66 adet farklı ribotiple karşılaşılmıştır. Türkiye' de 8 izolat bulunmuş ve hepsinin ribotip 001 olduğu görülmüştür (Barbut ve ark., 2007).

2.2.4. Patogenez ve klinik özellikler

Sağlıklı bir insanın kolon mikrobiyotasında 500'den fazla mikroorganizma çeşidi bulunmaktadır. Bunlar *C. difficile*'nin çoğalarak barsakta kolonize olmasını engellemektedir. Antibiyotik kullanımı sonrasında floradaki bakterilerin azalması *C. difficile* sporlarının vejetatif forma dönüşmesine ve çoğalmasına ortam hazırlar. Bakterilerin barsakta kolonizasyonunun ardından toksin üretimi başlar ve klinik belirtiler görülür (Janoir, 2015) (Şekil 1).



Şekil 1. *C. difficile* enfeksiyon basamakları (Janoir, 2015)

Patojen olarak kabul edilen *C. difficile* suşları, patojenite lokusunda bulunan *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından kodlanan Toksin A ve Toksin B' ye sahiptir. Patojenik lokusu mevcut olmayan *C. difficile* suşları hastalığa neden olmaz. Toksin A enterotoksin Toksin B ise sitotoksindir.

Bu toksinler, barsak epitel hücrelerine bağlandıktan sonra hücreye girerek hücre iskeletindeki Ras ve Rho proteinlerinin aktivasyonunu glikolizasyon yoluyla durdurur ve hücre iskelet yapısının yıkımına yol açar. Neticede artan permeabilite sonucu sekreter tipde ishal görülmektedir (Poxton ve ark., 2001; Johnson, 2009).

Patojenite lokusunda bulunmayan *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanan diğer bir toksin de '*binary toksin*' dir. Bu toksin *C. difficile*' nin bir hipervirulan endemik suşu B1/NAP1/027 (ribotip 027) tarafından üretilmektedir ve hastalığın şiddetinde artışa neden olduğu düşünülmektedir (Carroll ve Bartlett, 2015).

C.difficile kaynaklı enfeksiyonlarda, asemptomatik taşıyıcılıktan ölüme kadar giden bir klinik durum söz konusudur.

Asemptomatik taşıyıcılıkta *C.difficile* kolonizasyonu mevcuttur fakat ishal görülmez. Yeni doğmuş bebeklerde ve küçük yaştaki çocuklarda sık görülen bir klinik tablodur. Ayrıca hastanede tedavi gören hasta grubunun %15 'inde bu duruma rastlanır (Kuipers ve Surawicz, 2008).

C. difficile ishali, karın ağrısı ve orta şiddette, bol, sulu ishal şeklinde görülür.

Pseudomembranöz kolitte ise ateşle beraber uzun süreli kanlı, mukuslu ve lökositli ishal görülür. Aynı zamanda kalın bağırsakta pseudomembranlara rastlanır (Vaishnavi, 2010).

2.2.5.Risk faktörleri

C. difficile kaynaklı enfeksiyona zemin hazırlayan birçok risk faktörü vardır. Bunlardan en yaygın olanı antibiyotik kullanımıdır. Antibiyotikler, normal bağırsak mikrobiyotasını bozarak *C. difficile*’nin artışına sebep olur. Kullanılan antibiyotik grupları arasında klindamisin, penisilinler, sefalosporinler ve fluorokinolonlar en sık rastlanan antibiyotik gruplarıdır (Vecchio ve Zacur, 2012).

Risk faktörü oluşturan diğer durumlar ise; ileri yaş (65 ≥ yaş), uzun süre hastanede yatış, mide asiditesini azaltan ilaçlar, endoskopi, tüp ile beslenme ve immünsupresyondur (Mc Collum ve Rodriguez, 2012).

2.2.6.Tanı

C. difficile kaynaklı enfeksiyonun laboratuvar teşhisi, dışkıda toksin pozitif *C.difficile* varlığının ve ya dışkıda toksinin bulunmasını temel alır (Rodriguez ve ark., 2016). *C. difficile* varlığını saptamak için laboratuara gönderilen dışkı örnekleri sulu ve şekilsiz olmalıdır. Aynı gün içerisinde çalışılma imkanı bulunmayan örneklerin – 70 °C de muhafaza edilmesi gerekmektedir.

2.2.6.1.Kültür

Anaerobik ortamda dışkı kültürü: Bakterinin varlığını kanıtlamakta duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Fakat tek başına kullanılması yeterli değildir (Napolitano ve Edmiston, 2017). Bu yöntemin inkübasyon süresi anaerobik ortamda 2 günü bulmakta ve ayrıca teşhis edilen *C. difficle* suşunun toksijenik olup olmadığını belirlemek gerekmektedir.

Bakterinin izolasyonunda özel bir besiyeri olan cycloserine-cefoxitin-fructose (CFF) agar kullanılarak ekim yapılır ve anaerobik ortamda inkübasyona tabi tutulur. Besiyerinde bulunan cycloserine ve cefoxitin *C. difficile* üzerinde etkisizdir fakat gram pozitif ve gram negatif bakterileri yok eder (Martinez-Melendaz ve ark., 2017).

Dışkı kültüründe anaerob kanlı agar ve brucella agar da kullanılabilir (Geroling ve ark., 1995).

Hücre kültürü: *C. difficile*'nin ürettiği toksinlerin hücrelerde sitopatik etki oluşturmaya temeline dayanır. Bu yöntem daha çok toksin B' nin aktivitesini gösterir. Kullanılan hücre kültürleri; HeLa, Hep2 ve Vero' dur (Vaishnavi, 2010).

2.2.6.2.Seroloji

Glutamat dehidrogenaz (GDH); *C. difficile* tarafından üretilen ve dışkıya salınan bir enzimdir. Bu enzim *C. difficile* suşunun toksijenik olup olmadığını belirlemez. Sadece dışkıda *C. difficile* taraması için kullanılmaktadır.

Toksijenik *C. difficile*'nin ürettiği toksin A ve toksin B nin saptanmasına yönelik yapılan serolojik bir yöntem olan enzim immünassay (EIA), antikorlar kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Hücre kültürüne kıyasla duyarlılığı daha düşüktür fakat hızlı sonuç vermesi nedeniyle sıkça tercih edilmektedir (Rodriguez ve ark., 2016; Eastwood ve ark., 2009).

2.2.6.3.Moleküler yöntemler

PZR metotları moleküler temelli teşhis yöntemleridir ve çeşitli örneklerde mikroorganizmanın varlığının saptanmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemler kısa sürede sonuç verebilmektedir ve duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir.

C. difficile tcdA ve tcdB genlerinin belirlenmesine yönelik yapılan PZR testleriyle toksinin varlığı ve tipi saptanabilmektedir. Daha kesin bir sonuç için *C. difficile*’ e özgü 16s rRNA, gluD genleri ve toksin saptayan moleküler yöntemler tercih edilmelidir (Barbut ve ark., 2007; Yücesoy ve ark., 2007).

2.2.7.Tedavi

Gastrointestinal sistemin sahip olduğu flora, canlıyı zararlı sayılabilecek organizmalardan koruyabilmekte ve kolonize olmalarına mani olmaktadır (Usacheva ve ark., 2016).

C. difficile kaynaklı enfeksiyonun tedavi adımlarından ilki sebep olan antibiyotiğin kesilmesidir (Morinville ve ark., 2005).

Hastalığın tedavisi için kullanılan bir diğer önemli uygulama ise destek tedavisidir. İshal sonucu kaybedilen sıvı ve elektrolitin yerine konulması gerekmektedir (Koo ve ark., 2009).

Kullanılan antibiyotiğin kesilmesinin ardından semptomları hala devam eden vakalarda antimikrobiyal tedaviye başlanmaktadır. Önerilen tedavi metronidazol ve vankomisindir. Etkinlikleri benzerdir fakat metronidazolün daha ucuz olması ve vankomisinin sürekli kullanımında vankomisine dirençli enterekokların (VRE) artma ihtimalinin varlığı metronidazolu ilk tercih haline getirmiştir (Du Pont ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada makrolid grubu antibiyotiklerden fidaksomisin, *C. difficile* bakterisi üzerinde vankomisine kıyasla 8 kat daha etkili bulunmuştur (Napolitano, 2017).

Tedavi amaçlı olsa dahi kullanılan antibiyotikler normal floraya da zarar vererek süper enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Thielman ve Wilson, 2000).

2.2.8. *C. difficile* ve gastroenterit etkeni virüslerin koenfeksiyonu

Gastrointestinal sistemin mikrobiyal ekolojisi, takson çeşitliliğini, mikroorganizmaların aktivitelerini, birbiriyle ve konakçı ile ilişkisini içermektedir (sinerjik ve rekabetçi etkileşimler) (Zoetendal ve ark., 2004). Viral enfeksiyonların bir sonucu olarak, insan gastrointestinal sisteminin yerleşik mikrobiyotası, insan bağışıklığını ve fizyolojisini etkileyebilecek belirgin değişiklikler geçirmektedir (Ledder ve ark., 2007).

C. difficile bakteriyel yükü viral koenfeksiyonu olan hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Virüslerin, *C. difficile*'nin kolonizasyonu için bağırsak mikrobiyotasını ve ya doğuştan konakçı savunmasını bozarak uygun ortam koşulları sağladığı düşünülmektedir (El Feghaly ve ark., 2013). Virüs- *C. difficile* koenfeksiyonunun tespiti AGE için yönetim belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Gastroenteritin semptomlarındaki şiddeti belirleyen faktörler arasında koenfeksiyonun etkisi bazı çalışmalarda irdelenmiştir. Valentini ve ark. yüksek *C. difficile* koenfeksiyonu oranına dikkat çekmiştir ve koenfeksiyonu olan grupta monoenfeksiyonu olanlara kıyasla daha fazla dehidratasyonlu daha şiddetli klinik gözlemlenmişlerdir (Valentini ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise *C. difficile* ile virüs koenfeksiyonu mevcut hasta kliniği ile, *C. difficile* tek başına enfeksiyon etkeni olan hasta klinikleri olarak ayırt edilemezdi, ancak *C. difficile*'nin bakteriyel yükü, koenfeksiyonu olan vakalarda önemli ölçüde daha yüksek tespit edilmiştir (El Feghaly ve ark., 2013).

Çocuklarda *C. difficile* saptanması sadece kolonizasyon olup başka bir gastrointestinal patojen ile koenfeksiyonu hastalığın gerçek nedeni olabilir. İspanya'da gastroenteritli çocuklar ile yapılan bir çalışmada koenfeksiyona sahip olanların daha ciddi klinik tabloya sahip oldukları görülmüştür (Roman ve ark., 2003).

Yeni doğan ve bebeklerin bağırsak florasında enfeksiyöz olmayan *C. difficile* bulunabilmektedir. *C. difficile* toksin reseptörlerinin henüz olgunlaşmamış olması ve

ya anne sütünün koruyuculuğunun hastalık oluşumuna engel olduğu öngörülmektedir (Cooperstock ve ark., 1983; Tullus ve ark., 1989).

2.3.Norovirüs

2.3.1.Tarihçe

Virüs kaynaklı akut gastroenteritten ilk defa 1929’ da bahsedilmiştir ve hastalık için ‘kış kusması’ tabiri kullanılmıştır (Adler ve Zickl, 1969).

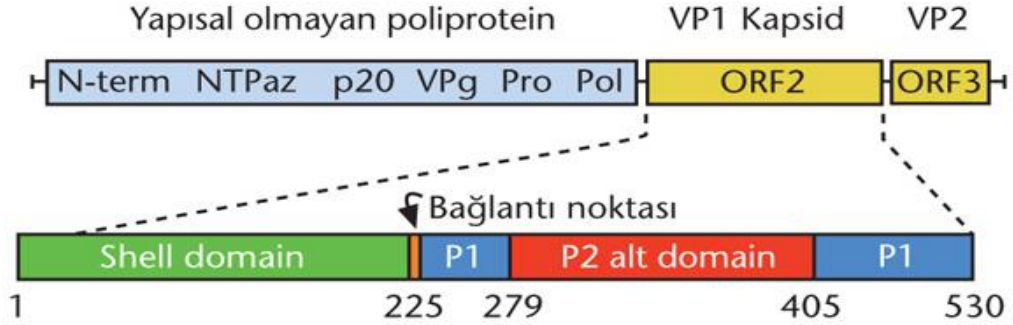
Norovirüs kaynaklı akut gastroenterit, 1968 yılında Amerika’ da Ohio eyaletinin Norwalk kasabasında bir ilköğretim okulundaki salgın ile görülmüştür. Bu salgındaki dışkı örneklerinin birkaç yıl sonra elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucu norovirüs patikülü keşfedilmiş ve ‘Norwalk virus’ adını almıştır (Kapikian ve ark., 1972). Görünümündeki düzgünlük sayesinde ‘küçük yuvarlak yapılı virüsler’ olarak isimlendirilmiştir. Neticede Uluslararası Virüs Taksonomisi 1999 yılında bu virüslere ‘Norovirüs’ adını vermiştir (Lewis ve ark., 1988).

2.3.2.Virüsün yapısı ve sınıflandırılması

Caliciviridae ailesi, gastroenterite sebebiyet veren elektron mikroskobu (EM) ile incelenebilen boyutları küçük virüslerden oluşur. Bunlar 5 grupta toplanır; vesivirüs, norovirüs, lagovirüs, sapovirüs ve nebovirüs (Green ve ark., 2000).

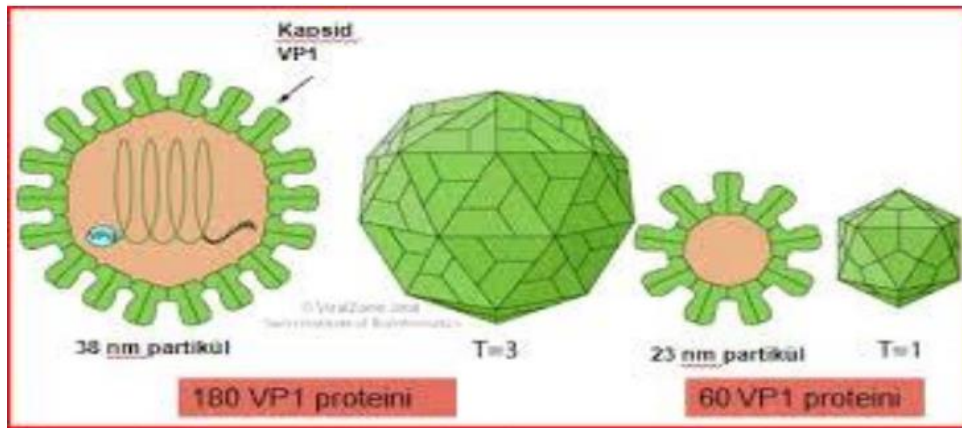
Norovirüsün sahip olduğu genom 7.7-8.0 kb uzunluğunda hemen hemen 7500 nükleotid barındıran tek iplikli pozitif polariteli RNA yapısındadır. Üç açık okunan bölge (Open reading frame-ORF) düzeninde organize olmuştur. ORF’ ler; yapısal olmayan proteinleri kodlamakta olan ORF1, büyük kapsid proteinleri kodlamakta

olan ORF2 ve küçük kapsid proteinlerini kodlayan ORF3 şeklinde sınıflandırılabilir (Şekil 2).



Şekil 2. Norovirüs proteinleri ve genomu (Pogan ve ark., 2018)

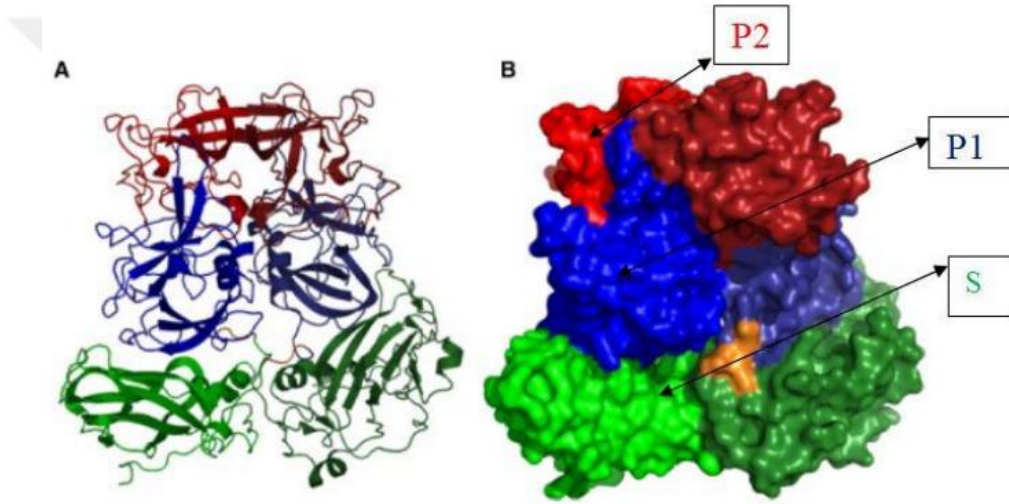
Norovirüs kapsidi, büyük kapsid proteinlerinin 90 dimerinin oluşturduğu 38 nm boyutunda ikozahedral yapıdadır. Her virüs partikülü 180 kapsomerden oluşur (Asanaka ve ark., 2005). Bu tanımlama kriyoelektron mikroskobu ve X-ray kristalografik çalışmalar sonucunda yapılmıştır (Zheng ve ark., 2006) (Şekil 3).



Şekil 3. Norovirüs kapsid yapısı (“Caliciviridae.” ViralZone. SIB Swiss Institute of Bioinformatics, a.n.d. Web. 7 Feb.2015)

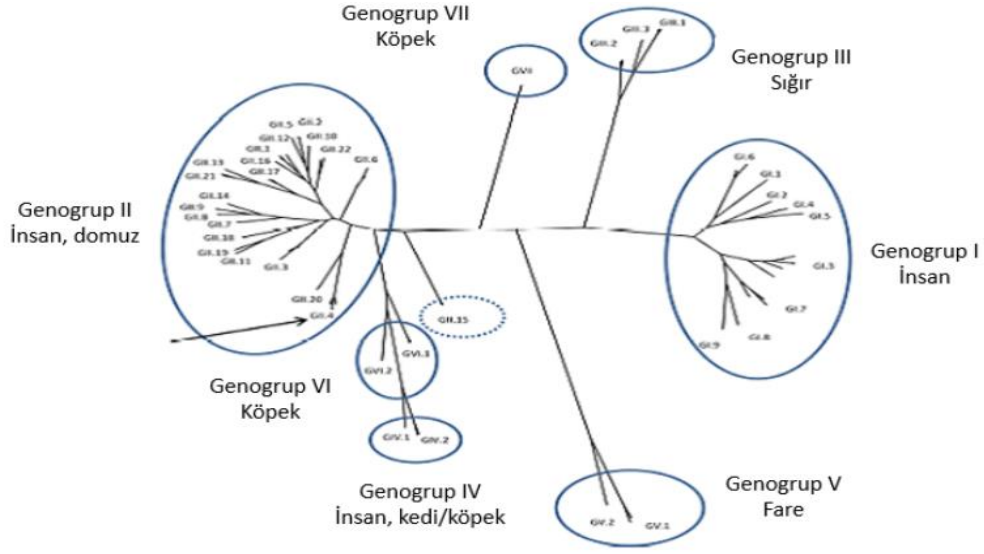
Büyük kapsid proteinleri iki bölümden oluşmaktadır. Bunlar S (kabuk) ve P (çıkıntı) dır. P bölümü de kendi içinde P1 ve P2 olarak ikiye ayrılır. Norovirüsün reseptörlere tutunma antijenik özelliğini belirleyen bölgesi P2' dir (Şekil 4).

Norovirüs zarfsız bir virüstür. Bundan dolayı dezenfektanlara ve ısıya nispeten dirençlidir. 60 °C de 30 dk' ya kadar, PH 2-7 de 180 dk'ya kadar dayanıklılık gösterir (Donaldson ve ark., 2008).



Şekil 4. Norovirüs büyük kapsid protein yapısı (Donaldson ve ark., 2008)

Norovirüs için tiplendirme çalışmaları 1970' li yıllarda ekipman yetersizliği sebebiyle güvenilir olarak gerçekleştirilememiştir. Fakat 1990' lı yıllara gelindiğinde gelişen teknolojiyle norovirüs için uygun moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Jiang ve ark., 1993). Norovirüs, viral kapsidlerinin filogenetik analizlerine göre 7 birbirinden farklı genogruba ayrılmıştır (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII). Ayrıca 41 genotipi mevcuttur (Vinjé, 2015) (Şekil 5).



Şekil 5. Norovirüs filogenetik ağaç (Vinjé, 2015)

2.3.3. Norovirüs replikasyonu

Norovirüs için uygun bir invitro ortamının eksikliği nedeniyle antiviral ilaçların gelişimi zaman almaktadır.

Norovirüste replikasyon stoplazmada gerçekleşir. Virüsün konak reseptörüne yapışması, virüsün klatrin proteininin bağımsız endositozuna aracı olur. İçeride virüs soyulur ve viral genomik RNA konak hücrenin stoplazmasında salınır. Viral protein genom (Vpg) viral RNA'dan uzaklaştırılır ve genomik tek zincirli RNA (ssRNA) (+)' dan bir antijenomik RNA sentezlenir. Antijenomik RNA transkripsiyonu ve replikasyonu gerçekleşir. Böylece viral mRNA'lar/yeni ssRNA(+) genomları elde edilir. Subgenomik RNA' nın translasyonu ile kapsid proteini elde edilir. Yeni virüs partiküllerinin paketlenerek hücreden salınımıyla replikasyon döngüsü tamamlanmaktadır (Katayamave ark., 2006).

2.3.4.İmmunoloji ve patogenezi

Norovirüs oldukça bulaşıcı bir virüstdür. Enfeksiyona neden olması için virüs partiküllerinden 10 kadarının vücuda girmesi yeterlidir. Virüsün bulaşı ise fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Daha çok kontamine olmuş yemeklerden, sudan veya insandan insana doğrudan bulaşabilir. Ayrıca enfekte kişilerin kusmuğundan da damlacık yoluyla bulaş gerçekleşebilmektedir (Ustaçelebi ve ark., 2004).

Norovirüs, vücuda girişinin ardından mideye geçiş yapar. Fakat asite dirençli oluşu sayesinde etkilenmeden ince bağırsağa ilerler. Replikasyonu mukoza epitelinde gerçekleşen virüs buradaki hücrelere zarar vererek villusun düzleşmesine neden olur. Hastalığın birinci gününde histopatolojik farklılaşmalar görülür ve 2 hafta içinde normale dönüş başlar. İshalin mekanizmasında yağ ve D-ksiloz emiliminde bozukluk, geçici hastalık boyunca sıvı sekresyonunda artış görülmektedir (Patel ve ark., 2008; Thornton ve ark., 2004).

Enterositlerinde histo-kan grubu antijeni (HBGA) barındıran ve 0 kan grubuna sahip insanların norovirüs kaynaklı gastroenterite daha duyarlı olduğu bulunmuştur. HBGA' ler virüslere karşı ligand görevi görerek enterositlere bağlanmasına neden olur. HBGA' lerini kodlayan fukoziltransferaz 2 (FUT) geni baskın olmayan bireylerde duyarlılık daha düşüktür (Mattison ve ark., 2018).

Bazı immünolojik deneylerde bağırsakta oluşan antikorların humoral veya hücreyel yanıtla bir savunma geliştirdiği gösterilmektedir (Parrino ve ark., 1977). Enfeksiyona karşı vücutta IgG, IgA ve IgM oluşturulmaktadır. Özgül ve uzun süreli olan IgG, kısa süreli olanlar ise IgA ve IgM dir (Öztürk, 2008). Kişilerdeki kazanılmış bağışıklık her suş için özeldir. Norovirüsün yarattığı genetik çeşitlilik sebebiyle yaşam boyu tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir (Matty ve ark., 2003).

2.3.5.Klinik özellikler

Norovirüs kaynaklı gastroenterit, 2 günlük inkübasyondan sonra çoğunlukla bulantı, kusma ve kansız sulu ishal şeklinde görülmektedir. Ayrıca kramp, karın ağrısı, halsizlik, ateş ve iştahsızlıkta karşılaşılan belirtiler arasındadır. Enfeksiyonun sonunda çoğunlukla tam iyileşme görülse de bazen ölümle sonuçlanabilmektedir (Minesh ve ShahAron, 2018).

Virüsle enfekte olmuş kişi 8 hafta süresince çevresine virüs yaymaktadır. Enfeksiyon %68 semptomatik %32 oranında asemptomatik olarak görülmektedir (Graham ve ark., 1994). Erişkinlerde ve çocuklarda görülen belirtiler farklılık gösterebilir. İshale sıklıkla erişkinlerde kusmaya ise çocuklarda rastlanmaktadır (Götz ve ark., 2001).

2.3.6 Tanı

Norovirüs tanısında hücre kültürü kullanılamamaktadır. Bu sebeple farklı yöntemler geliştirilmiştir; antijen testi, elektron mikroskopisi, antikör testi ve moleküler yöntemler (Shieh ve ark., 2000).

Virüs partiküllerinin taranacağı örnekler dışkı, serum, kusmuk olabilir. Eğer bir salgın durumu söz konusu ise gıdalarda ve suda da tarama yapılmaktadır. İncelenecek örnekler mutlaka +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmeli ve olabildiğince kısa sürede incelenecek laboratuara gönderilmelidir (Morris ve Waite, 1980).

2.3.6.1.Elektron mikroskobisi

Norovirüsün tanısında kullanılan ilk yöntem elektron mikroskobu (EM) ile incelemedir. Virüsün sahip olduğu fincan görünümüne benzer çentikler ile mikroskobide tanımlama yapılır. Bu yöntem kısmen avantajlı olsa da maliyetin yüksekliğı ve duyarlılığın düşük oluşu kullanım sıklığını azaltmaktadır (Vinjé, 2015).

2.3.6.2.Antijen tarama

Antijen varlığının saptanmasına yönelik uygulanan yöntem önceleri radyo immünoassay (RIA) iken ilerleyen zamanlarda yerini enzim immünoassay (EIA) almıştır. Bu testler tipe özgüdür ve aynı veya benzer genotipteki kökenleri saptayabilmektedir (Richards ve ark., 2003).

ELISA, rekombinant kapsid antijenlerine karşı hiperimmün antiserumlarının kullanımını temel alan bir yöntemdir. Saptayabilme kriteri 1 ml dışkıda $\sim 10^5$ viral partikül varlığıdır (Kele ve ark., 2011). Piyasada çeşitli ELISA testleri bulunmaktadır. Bunlar farklı duyarlılıkta ve özgüllükle olabilmektedir. Yeni testler geliştirmeye yönelik adımlarda antijen olarak virionlara benzerliğinden dolayı virüs benzeri partiküller (VLP) kullanılmaktadır (Shirato, 2011). Salgın durumunda fazla miktarda dışkı örneğinin çalışılmasında ELISA zamandan tasarruf sağlayabilir.

Antijen taramaya yönelik bir diğr yöntem ise immunokromatografidir. Prensipde enzim immunoassay'e benzer, kolay uygulanabilir, 15 dk gibi bir sürede sonuç verebilen ve özgüllüğü yüksek bir testtir (Ambert-Balay ve ark., 2013).

2.3.6.3.Antikor tarama

Rekombinant VPL' leri antijen görevinde kullanarak antikor varlığını saptayan EIA' lar IgM, IgA ve IgG yanıtlarının karakterizasyonu için geliştirilmiştir. Enfekte olduktan 9-11 gün sonra özgül IgA ve IgG antikorlarında artış görülmektedir. IgG için akut evre ve akut evre sonrasındaki titre 4 kat artış göstermektedir. Virüse özgü IgM ise 14 gün içinde saptanabilmektedir (Thornton ve ark., 2004).

2.3.6.4.Moleküler tanı

Norovirüs genomu 1990 yılında karakterize edilmiş ve moleküler tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Revers transkriptaz- PZR (RT-PZR) metodu ELISA ile karşılaştırıldığında daha az miktarda virüsü saptayabilmektedir (Atmar ve Estes, 2009).

Norovirüs kaynaklı enfeksiyonun tanısında kusmuk veya dışkıdan RT-PZR yöntemi ile viral RNA saptanması altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem pahalı bir yöntemdir teknik ekipman ve tecrübeli eleman gerektirmektedir (Gantzer ve ark., 1997). İlk etapta kullanılan primerler norovirüsün tüm genotiplerine hitap etmediği için istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bu sebeple ideal primer tanımlamaya yönelik bir çok çalışma mevcuttur (Jiang ve ark., 1999). Hali hazırda norovirüsün ORF1 ve ORF2 kesişim noktası en korunmuş genom bölgesi olmasından ötürü primer olarak kullanılmaktadır (Vinjé, 2015).

2.3.7.Tedavi ve korunma

Norovirüs kaynaklı gastroenteritte tedavi, diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi su ve elektrolit dengesini sağlamaktır. Norovirüse özgü kesin bir tedavi bulunmamakla beraber yapılan bazı çalışmalarda etkili olabilecek sonuçlar mevcuttur.

Antiprotozoal olarak piyasada var olan nitazoksanid' in antiviral özellikte olduğu görülmüştür (Rossignol, 2014). Yanıt alınan bir diğer tedavi ise immunglobulin tedavisidir (Chagla ve ark., 2013). Ayrıca norovirüs ile enfekte olmuş kişilerde BRAT diyeti uygulanması önerilmektedir. Bahsi geçen diyetteki yiyecekler muz(B), pirinç(R), elma sosu(A) ve tost/kraker(T)' dir (William, 2013).

Günümüzde norovirüste etkili onaylanmış bir aşı henüz mevcut değildir. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir (Bucardo-Rivera, 2008). Bireyler arası bulaşında fekal-oral yolla yayılması önlenmeli, el hijyenine ve kontamine olmuş yüzeylere dikkat edilmelidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan cihazlar ve aletler

Mikroplaka yıkayıcı (Bio Rad- PW40)

Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe, Türkiye)

Absorbans mikroplaka okuyucu (Bio Rad- PR 4100)

Mikrosantrifüj tüpleri (ISOLAB- P.P 1.5- P.P 2)

Steril plastik öze (10 µl)

Steril pipet ucu (0,5-10 µl, 1-200 µl, 0-1000 µl)

Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye) -80

Balon joje (250 ml, 500 ml, 1000 ml)

Mezür (100 ml, 500 ml, 1000 ml)

Otoklav (Nüve- OT 020)

Hassas Terazı (Scaltec)

Buzdolabı (Indesit) +4

Vortex (Heidolph, Almanya)

Distile su cihazı (Nüve NS 108)

Mikropipet Seti (Axygen- AP 10- AP100- AP10000)

TDB-120 Dry block thermostat (bioSan, Latvia)

Corbett Research RG-6000 Real Time PCR (QIAGEN)

3.1.2. Kullanılan ticari kitler

CerTest *Clostridioides (Clostridium) difficile* GDH + Toksin A+B kiti (BIOTEC, İspanya)

3rd Generation RIDASCREEN Norovirüs kiti (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya)

HigherPurity™ Viral RNA Extraction Kiti (Canvax, Meksika)

RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PCR (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya)

3.2. Yöntem

Çalışmamıza dahil edilen dışkı örneklerinde norovirüs varlığı iki yöntemle saptanmıştır.

1. ELISA
2. Real time RT-PZR

3.2.1. Dışkı örneklerinin toplanması

Marmara Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2019-Mart 2020 tarihleri arasında *Clostridium difficile* toksin taraması isteği ile gönderilmiş ve test sonucu pozitif çıkmış 82 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Dışkılar makroskobik açıdan değerlendirilip, sulu dışkılar mikroskobik olarak incelenmiştir. Kayıtlamada; örneğin sırası, hastanenin atadığı protokol numarası, ad ve soyad, cinsiyet, yine hastanenin belirlediği barkod numarası, tarih, doğum tarihi yer almıştır. Gaita örnekleri daha sonra -80 °C’de saklanmıştır.

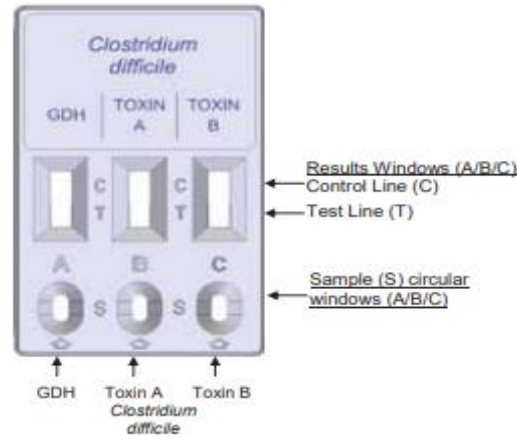
3.2.2. Dışkıda hızlı tanı kiti ile *Clostridium difficile* GDH ve toksin tayini

CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A + B kombo kart testi, dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* Glutamat Dehidrojenaz (GDH), Toksin A ve Toksin B'nin eşzamanlı kalitatif tespiti için kromatografik immünolojik bir testtir.

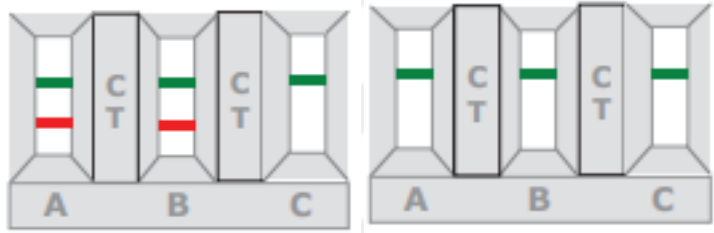


Resim 1. CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A+B kiti

Dışkı toplama tüpünün kapağı çıkarıldı ve yeterli numune alımı için çubuk kullanıldı. Yaklaşık 125 mg dışkı tüpe aktarıldı. Seyreltici ve dışkı örneğinin bulunduğu tüp kapatılıp sallandı. CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A + B kart test kullanmadan hemen önce kapalı torbasından çıkarıldı. A, B, C harfleri ile işaretlenmiş dairesel pencerelere 4'er damla damlatılıp sonuçları okuma için 10 dk beklendi.



Resim 2. CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A + B kart test



Resim 3. CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A + B kart test sonuç okuma

Kontrol çizgisi, yeşil bir çizgi olarak görünür. Testin doğru uygulandığını ve performansını gösterir, testin geçerli olması için görünmesi gerekir.

Yeşil çizginin ve kırmızı çizginin bulunması pozitif bir sonucu belirtir, bu durum *Clostridium difficile* GDH ve toksin A+B varlığını ifade eder. Sadece yeşil çizginin bulunması olumsuz sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.3. ELISA Yöntemiyle Norovirüs Antijeni Saptanması

Norovirüs antijenini tespit etmek için GI ve GII genotiplerini tayin edebilen, mikroplak ELISA kiti (RIDASCREEN, üçüncü jenerasyon, R-Biopharm, Darmstdt,

Almanya) kullanıldı. Dışkı örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra, ELISA kiti içindeki sulandırma tamponu ile %10 oranında sulandırıldı, santrifüjlendi ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışma prosedürüne göre diğer işlemler yapıldı. Sonuçlar hesaplandıktan sonra çalışmalardan elde edilen pozitif ve negatif kontrollerin sonuçlarına göre hesaplanan sınır değerler (cut-off) ile karşılaştırılarak pozitif ya da negatif olarak rapor edildi. Dışkı örneklerinde ELISA için BioRad PW40 yıkayıcı ve BioRad PR 4100 okuyucu kullanıldı. Santrifüj için Vortex (NM-110) cihazı kullanılmıştır.



Resim 4. 3rd Generation RIDASCREEN Norovirüs kiti

Norovirüs ELISA Test Prosedürü

1. Dışkı örnekleri çalışma öncesi oda sıcaklığına getirildi.
2. Tüm solüsyonlar ve mikrotateler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi (20 – 25 °C).
3. Distile su ile yıkama tampon solüsyonu 1:10 oranında dilüe edildi.

4. Örnek dilüsyon tampon solüsyonu ile gaita örnekleri 1:11 oranında dilüe edildi (Diluent 1).
5. İlk kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, ikinci kuyucuğa negatif kontrol (Diluent 1), diğer kuyucuklara sırayla 100 µl örneklerden eklendi.
6. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat 1 eklendi ve karıştırıldı.
7. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 60 dakika bekletildi.
8. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama tampon solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
9. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat 2 eklendi.
10. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dakika karanlıkta bekletildi.
11. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama tampon solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat eklendi.
13. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 15 dakika karanlıkta bekletildi.
14. Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu (sülfirik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu.
15. Plaktaki kuyucuklarda oluşan renk değişikliği spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri ölçüldü (Resim 5).
16. Negatif kontrolün ölçülen optik dansite (OD) değerinin üzerine 0.15 eklenerek “cutoff” değeri belirlendi.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 19. 0 istatistik programı kullanılmıştır. Veriler tanımlayıcı istatistiksel analizler kullanılarak sıklık ve yüzde, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanılarak sunuldu. Yaş grupları, cinsiyet gibi kategorik verilerin değişkenlerin karşılaştırılmasında ise

Ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ belirlenmiştir.



Resim 5. Spektrofotometre

3.2.5. Dışkıda RT-PZR Yöntemi ile Norovirüs Aranması

Dışkıda PZR ile norovirüs tespiti için RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PZR (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kiti kullanılmış olup, gerçek zamanlı PZR teknolojisine dayalı bir yöntem kullanan in vitro tanı amaçlı bir test kitidir. Norovirüs genogrup I (GI) ve genogrup (GII) ait RNA'yı kalitatif olarak tespit etmektedir. Real-time PZR amplifikasyonun erken safhalarından itibaren deteksiyon yapabilmeye imkan sağlar. Kit, olası RT-PZR inhibisyonunu belirlemek ve kit solüsyonlarının bütünlüğünü doğrulamak için, heterolog amplifikasyon sistemi (iç kontrol) içerir. RT-PZR teknolojisini temel alan test, RNA'yı cDNA'ya dönüştüren revers-transkriptaz enzimi kullanarak amplifiye DNA tespiti için hedef dizilerin amplifikasyonu ve hedefe özgü problemleri kullanan PZR yöntemidir. Gaitadan RNA ekstraksiyonu için HigherPurity™ Viral RNA Extraction Kiti (Canvax, Meksika) üreticinin açıklamaları doğrultusunda kullanılmıştır. PZR için Corbett Research RG-6000 Real Time PCR (QIAGEN) cihazı kullanılmıştır.



Resim 6. RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PCR (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kiti



Resim 7. Corbett Research RG-6000 Real Time PCR (QIAGEN) cihazı

Dışkıdan RNA izolasyonu

1. 25 µl Proteinaz K temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Tüpe 1/10 dilüe edilmiş numuneden 200 µl eklendi.
3. 200 µl Buffer BLY (5.6 µg carrier RNA içeren) eklendi ve vortekslenerek 20 saniye karıştırıldı.
4. Sıcak su banyosunda 56 °C de 20 dk inkübe edildi.
5. 250 µl etanol (%96-100) eklendi 15 saniye vortekslendi.
6. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Karışım minispin kolonuna aktarıldı 10000 rpm de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı boşaltıldı.
8. Minispin kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl Buffer WB1 eklendi. 12000 rpm de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı boşaltıldı.
9. Minispin kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl Buffer WB2 eklendi. 12000 rpm de 3 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı boşaltıldı.
10. Minispin kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl Buffer WB2 eklendi. 12000 rpm de 3 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı boşaltıldı.
11. Spin kolonunu kurutmak için, son hızda 3 dk ekstra santrifüjlendi.
12. Minispin kolonu yeni 1.5 ml lik yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Filtrenin üzerine 30-50 µl Elution Buffer ya da RNase- free su eklendi. Kapağı kapatılıp 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
13. Son hızda 1 dk santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı viral RNA içermektedir.
14. Ekstrasyondan sonra tüp buzda bekletildi. PCR adımı için -80 °C e saklandı.

RT-PZR Test protokolü

Tablo 1: RIDA®GENE Norovirus I & II real-time PCR kit içeriği

Kit Kodu	Reaktif	Miktar	Kapak Rengi
1	Reaksiyon Mix	2x 1050 µl	Sarı
2	Enzim Mix	1x 80 µl	Kırmızı
R	İnternal Control RNA	2x 1700 µl	Kahverengi
N	No Template Kontrol	1x 450 µl	Beyaz
P	Pozitif Kontrol	1x 200 µl	Mavi

1. Kontaminasyonu engellemek için tüm işlemler temiz bir PCR ortamında ve filtreli pipet ucu ile yapıldı.
2. Tüm reaktifler (Tablo 1.) ve örnekler kullanılmadan önce hafif vortekslendi. Uygun sıcaklıkta tutuldu.
3. Eppendorf tüpte master miks hazırlandı. Kesin olmayan pipetlemeyi telafi etmek için% 10 ek hacim hesaplandı.

Tablo 2: Master mix hazırlama tablosu

Master-Mix bileşenleri	Reaksiyon başına hacim	10 reaksiyon (% 10 ekstra)
Reaksiyon Mix	12.5 µl	137.5 µl
Enzim Mix	0.7 µl	7.7 µl
İnternal Control RNA	1.0 µl	11 µl
Toplam	21.1 µl	232.1 µl

4. Her reaksiyon şişesinde (tüp veya plaka) 20 µl Master-Mix pipetlendi.
5. Negatif kontrol: Önceden pipetlenen Master-Mix'e negatif kontrol olarak 5 µl No Template Kontrol eklendi.

Pozitif kontrol: Önceden pipetlenen Master-Mix'e 5 µl Pozitif Kontrol eklendi.

Örnek: Önceden pipetlenen Master-Mix'e 5 µl RNA-Extract eklendi.
6. Tüplerin kapakları kapatıldı. Real-time PCR cihazına yerleştirildi.
7. Hazırlanmış olan örnekler ve kontroller çalışılması için Gerçek Zamanlı Corbett Research RG-6000 PCR cihazı kullanıldı.
8. Tablo 3. te verilen programa göre PCR protokolü uygulandı.

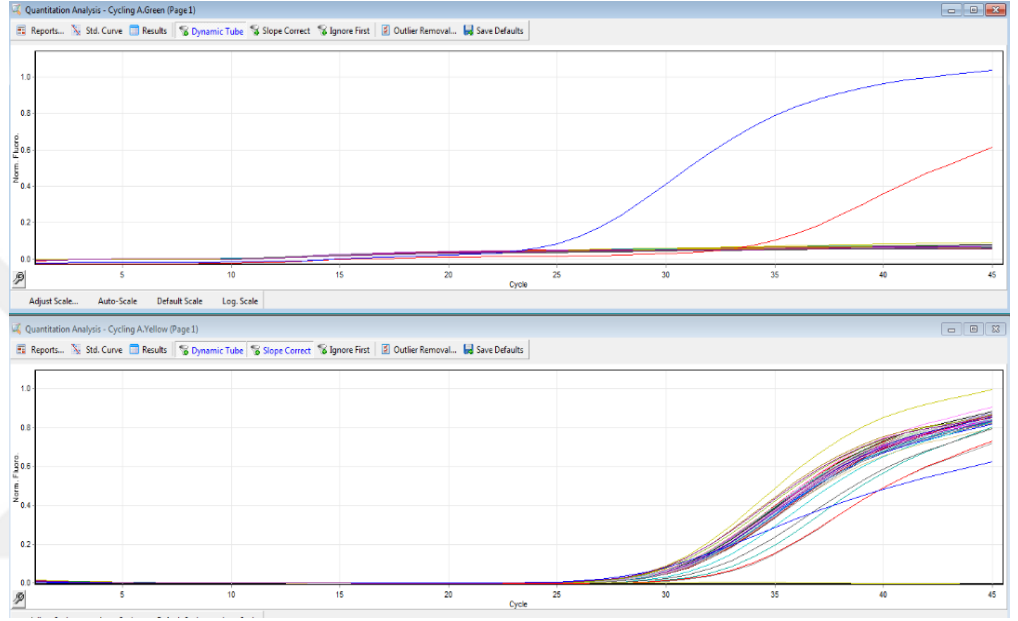
Tablo 3: Gerçek Zamanlı RT-PZR Profili

<u>Ters Transkripsiyon</u> İlk Denatürasyon	10 dk, 58 °C 1 dk, 95 °C
<u>Döngüleri</u> <u>PCR</u> Denatürasyon Primer bağlanması/Uzama	45 Döngü 15 saniye, 95 ° C 30 saniye, 55 ° C

Numunelerin analizi, üreticinin talimatlarına göre kullanılan gerçek zamanlı PZR cihazının yazılımı tarafından yapılmıştır.

9. Örnek RNA ve iç kontrol RNA'sı, tespit sisteminde bir amplifikasyon sinyali gösteriyorsa, norovirüs tespit edilmiştir.

10. Örnek RNA'nın bir amplifikasyon sinyali gösterdiği, ancak tespit sistemindeki iç kontrol RNA'sı için göstermediği durumda da norovirüs de tespit edilmiştir.
11. Örnek RNA'nın bir amplifikasyon sinyali göstermediği ancak sistemindeki iç kontrol RNA'sı sinyal gösterdiği durumlarda norovirüs tespit edilmemiştir.



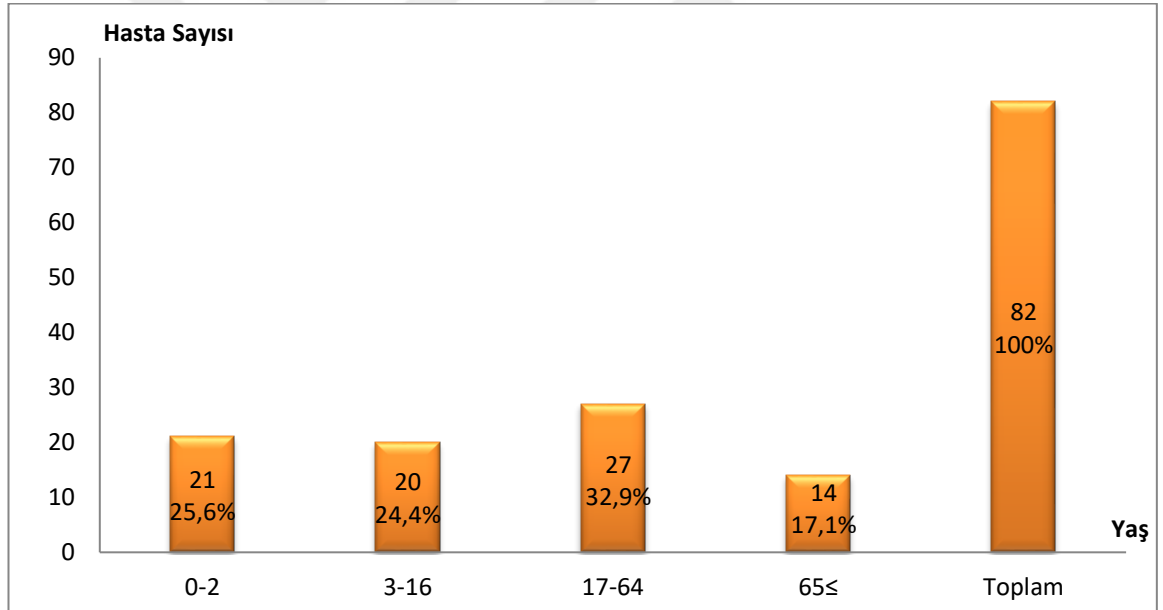
Şekil 6. Norovirüs Genogrup I-II

4. BULGULAR

4.1.Dışkıların toplanması ve değerlendirilmesi

Çalışmamıza *C. difficile* toksin testi (CerTest *Clostridium difficile* GDH + Toksin A+B kiti (BIOTEC, İspanya)) pozitif saptanan 82 örnekler dahil edildi.

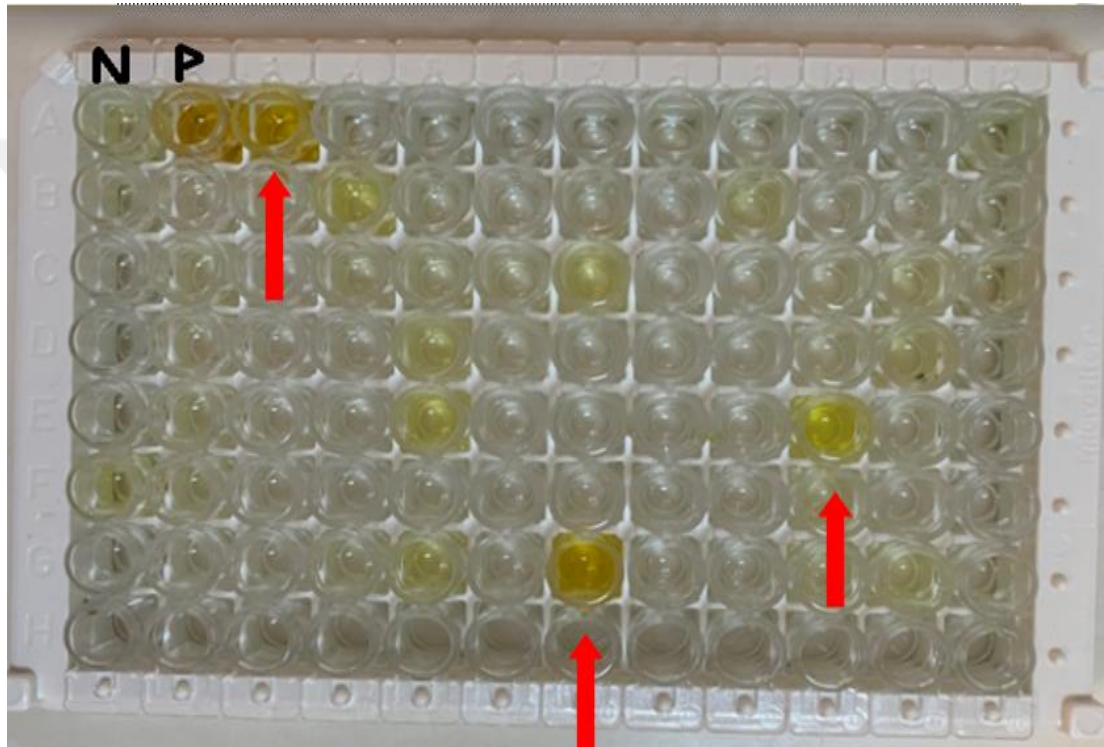
Mevcut hastaların yaş ortalaması 27,6'dır. Bunların 21'i (%25,6) 0-2 yaş, 20'si (%24,4) 3-16 yaş, 27'si (%32,9) 17-64 yaş ve 14'ü (%17,1) 65 yaş ve üzeri yaş grubunda yer almaktaydı. Yaş aralığı ise 0-83 arasında dağılım göstermektedir (Şekil).



Şekil 7. Hasta yaş dağılım grafiği

4.2.Dışkıda norovirüs antijeni ELISA sonuçları

Çalışmamız sonucu Ocak 2019- Mart 2020 tarihleri arasında toplanan hasta numunelerinde elisa ile norovirüs pozitif örnek sayısı 3 (%3,7), negatif örnek sayısı 79 (%96,3) olarak bulunmuştur (Tablo 4).



N: Negatif Kontrol P: Pozitif Kontrol

Resim 8. Norovirüs ELISA testinde görülen pozitif ve negatif örnekler

Tablo 4. Yaş gruplarına göre ELISA sonuçlarının dağılımı

Yaş	ELISA(+)	ELISA(-)	Toplam
0-2	0	21	21
3-16	2	18	20
17-64	0	27	27
65 ≤	1	13	14
Toplam	3	79	82
%	3,7%	96,3%	

Çalışmamızda kullanılan ELISA kiti (RIDASCREEN, 3rd generation, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kullanım kılavuzunda, sonuçların doğru ve güvenli olabilmesi için 450 nm’ de negatif kontrolün optik yoğunluk değerinin (OD) 0,2’den daha düşük ve pozitif kontrolün OD değerinin 0,8’den daha büyük olması gerektiği bildirilmiştir. Araştırmamızda negatif ve pozitif kontrol değerleri yukarıda belirtilen sınırlar içerisinde bulunmaktadır.

Yapılan hesaplamalar sonucu cut-off değerimiz 0,239 olarak bulunmuştur. Optik yoğunluk değerleri 3,007 2,877 ve 0,510 olan üç hasta sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.3. Dışkıda norovirüs gerçek zamanlı RT-PZR sonuçları

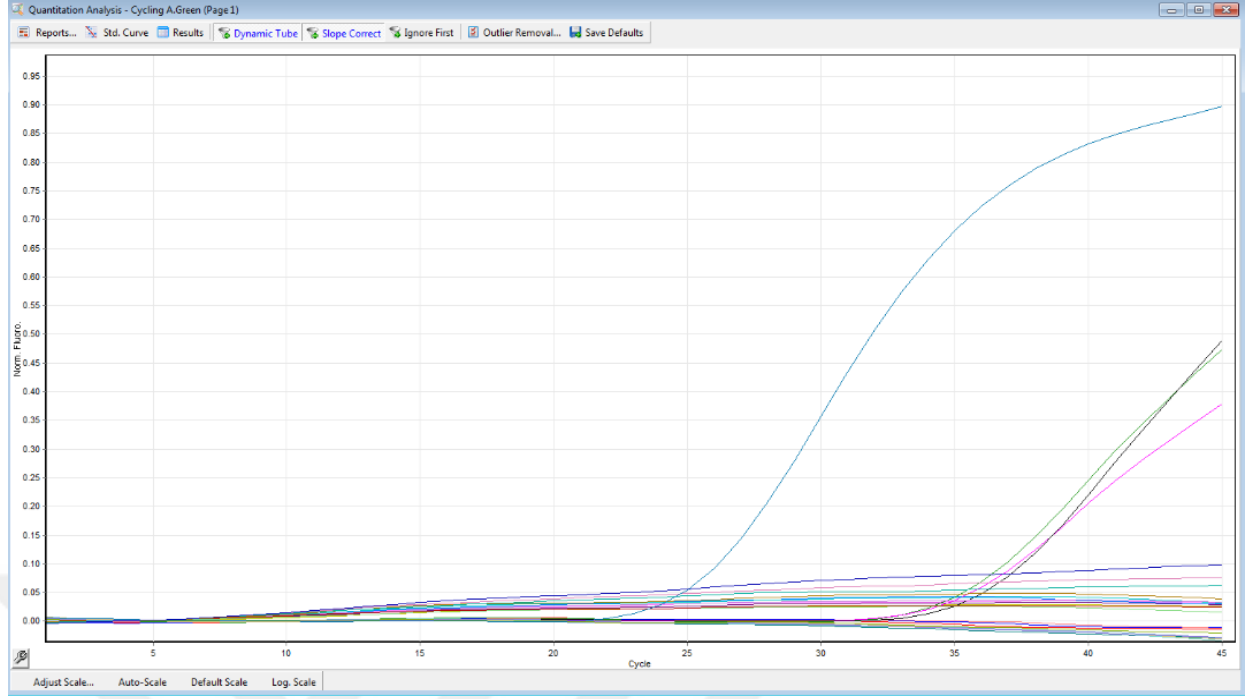
Çalışmamız sonucu Ocak 2019- Mart 2020 tarihleri arasında toplanan hasta numunelerinde gerçek zamanlı RT-PZR sonucu 7 örnek (%8, 5) norovirüs pozitif

olarak değerlendirilmiştir. Tespit edilen negatif örnek sayısı ise 75 (% 91, 5)' dir (Tablo 5).

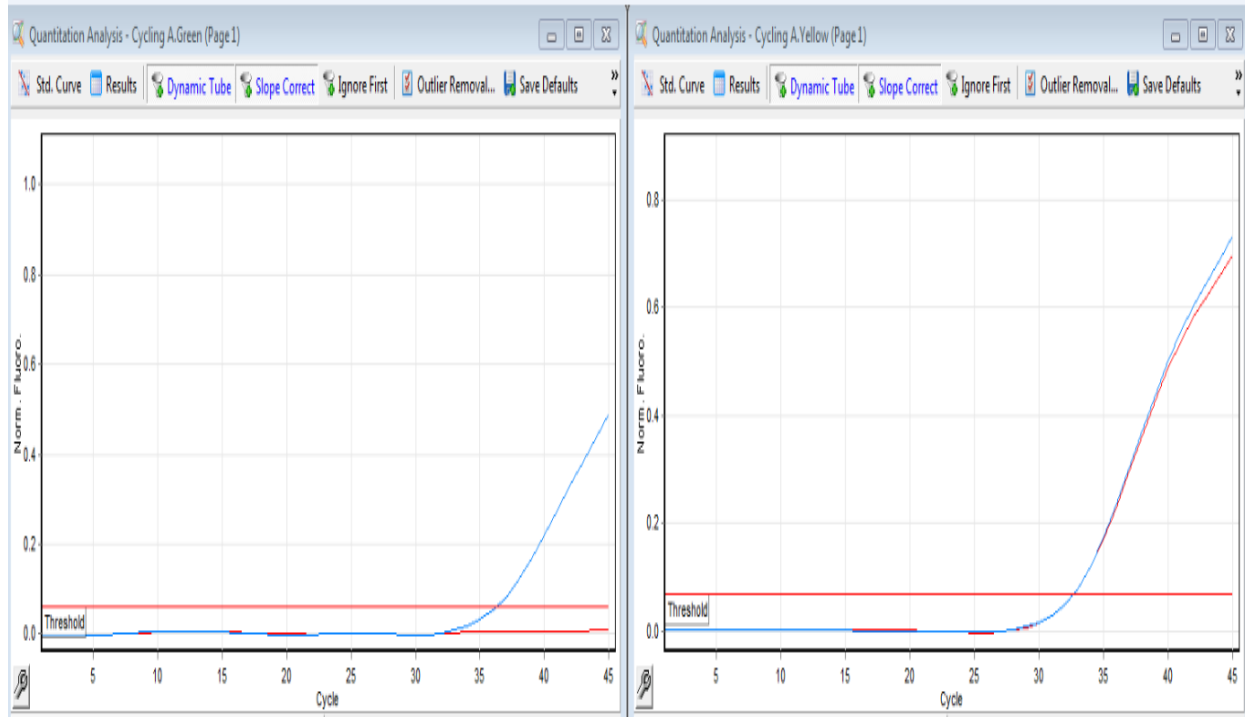
Tablo 5. Yaş gruplarına göre gerçek zamanlı RT-PZR sonuçlarının dağılımı

Yaş	RT-PZR(+)	RT-PZR(-)	Toplam
0-2	2	19	21
3-16	4	16	20
17-64	0	27	27
65 ≤	1	13	14
Toplam	7	75	82
%	8,5%	91,5%	

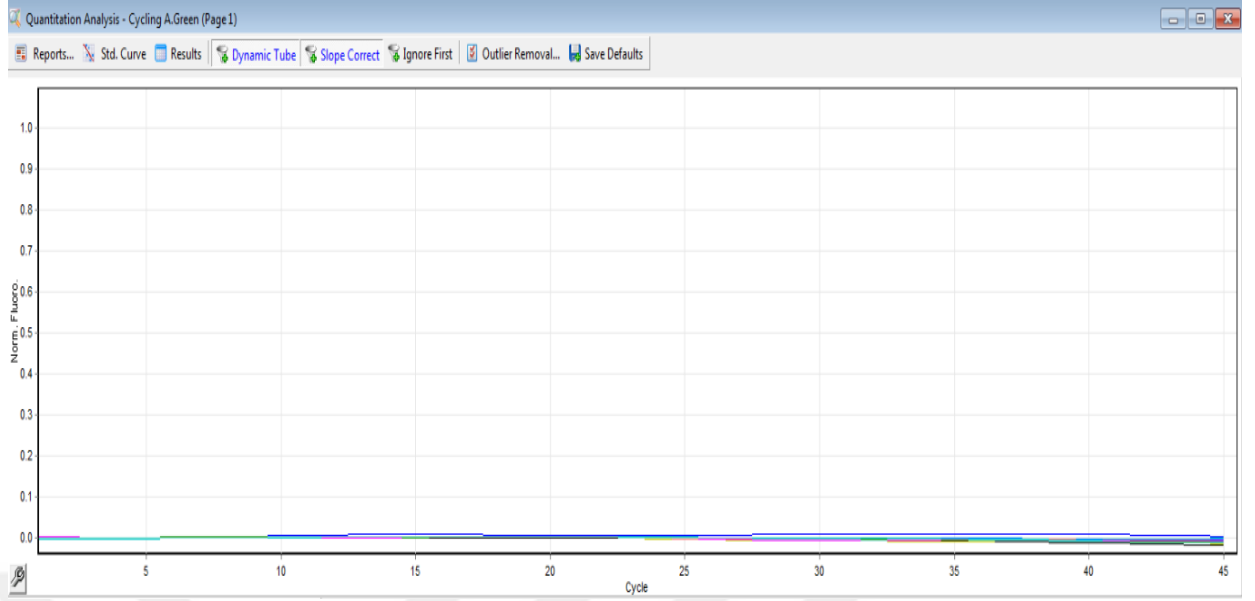
Gerçek zamanlı PZR cihazının yazılımı tarafından yapılan analiz sonucu yedi hastanın amplifikasyon sinyali gösterdiği belirlenmiş ve bu hasta örnekleri pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Tüm hastaların amplifikasyon eğrileri



Şekil 9. Norovirüs pozitif sonuç (56 no lu örnek)



Şekil 10. Norovirüs negatif sonuç (8 no lu örnek)

Örneklerden 3'ü RT- PZR ve ELISA ile pozitif, RT- PZR ile pozitif bulunmuş 4 örnek ise ELISA ile negatif olarak bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 6. ELISA ve RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması

ÖRNEK	REAL-TİME PZR SONUCU	ELISA SONUCU (OD)
1. Hasta	POZİTİF	3,007
2. Hasta	NEGATİF	<0,239
3. Hasta	NEGATİF	<0,239
4. Hasta	NEGATİF	<0,239
5. Hasta	NEGATİF	<0,239
6. Hasta	NEGATİF	<0,239
7. Hasta	NEGATİF	<0,239
8. Hasta	NEGATİF	<0,239
9. Hasta	NEGATİF	<0,239
10. Hasta	NEGATİF	<0,239
11. Hasta	NEGATİF	<0,239
12. Hasta	NEGATİF	<0,239
13. Hasta	NEGATİF	<0,239

14. Hasta	NEGATİF	<0,239
15. Hasta	NEGATİF	<0,239
16. Hasta	NEGATİF	<0,239
17. Hasta	NEGATİF	<0,239
18. Hasta	NEGATİF	<0,239
19. Hasta	NEGATİF	<0,239
20. Hasta	NEGATİF	<0,239
21. Hasta	NEGATİF	<0,239
22. Hasta	NEGATİF	<0,239
23. Hasta	POZİTİF	<0,239
24. Hasta	NEGATİF	<0,239
25. Hasta	NEGATİF	<0,239
26. Hasta	NEGATİF	<0,239
27. Hasta	NEGATİF	<0,239
28. Hasta	NEGATİF	<0,239
29. Hasta	NEGATİF	<0,239
30. Hasta	NEGATİF	<0,239
31. Hasta	NEGATİF	<0,239
32. Hasta	NEGATİF	<0,239
33. Hasta	NEGATİF	<0,239
34. Hasta	NEGATİF	<0,239
35. Hasta	NEGATİF	<0,239
36. Hasta	NEGATİF	<0,239
37. Hasta	NEGATİF	<0,239
38. Hasta	NEGATİF	<0,239
39. Hasta	NEGATİF	<0,239
40. Hasta	NEGATİF	<0,239
41. Hasta	NEGATİF	<0,239
42. Hasta	NEGATİF	<0,239
43. Hasta	NEGATİF	<0,239
44. Hasta	NEGATİF	<0,239
45. Hasta	NEGATİF	<0,239
46. Hasta	NEGATİF	<0,239
47. Hasta	NEGATİF	<0,239
48. Hasta	NEGATİF	<0,239
49. Hasta	NEGATİF	<0,239
50. Hasta	NEGATİF	<0,239
51. Hasta	NEGATİF	<0,239
52. Hasta	NEGATİF	<0,239
53. Hasta	NEGATİF	<0,239
54. Hasta	POZİTİF	<0,239

55. Hasta	POZİTİF	<0,239
56. Hasta	POZİTİF	2,877
57. Hasta	NEGATİF	<0,239
58. Hasta	NEGATİF	<0,239
59. Hasta	NEGATİF	<0,239
60. Hasta	NEGATİF	<0,239
61. Hasta	NEGATİF	<0,239
62. Hasta	NEGATİF	<0,239
63. Hasta	NEGATİF	<0,239
64. Hasta	NEGATİF	<0,239
65. Hasta	NEGATİF	<0,239
66. Hasta	NEGATİF	<0,239
67. Hasta	NEGATİF	<0,239
68. Hasta	NEGATİF	<0,239
69. Hasta	NEGATİF	<0,239
70. Hasta	NEGATİF	<0,239
71. Hasta	NEGATİF	<0,239
72. Hasta	NEGATİF	<0,239
73. Hasta	NEGATİF	<0,239
74. Hasta	NEGATİF	<0,239
75. Hasta	NEGATİF	<0,239
76. Hasta	POZİTİF	<0,239
77. Hasta	POZİTİF	0,510
78. Hasta	NEGATİF	<0,239
79. Hasta	NEGATİF	<0,239
80. Hasta	NEGATİF	<0,239
81. Hasta	NEGATİF	<0,239
82. Hasta	NEGATİF	<0,239

Tablo 7. Duyarlılık/ Özgüllük tablosu

	RT-PZR Pozitif	RT-PCR Negatif	Toplam
ELISA Pozitif	3	0	3
ELISA Negatif	4	75	79
Toplam	7	75	82

ELISA duyarlılık : $7 / 7+4 \times 100 = 63,6$

ELISA özgüllük : $75 / 75+0 \times 100 = 100$

RT-PCR referans alındığında, ELISA testinin duyarlılığı % 63,6, özgüllüğü % 100 olarak tespit edilmiştir (Tablo 7).

Norovirüs pozitif saptanan hastaların klinik bilgileri tablo 8’ da verilmiştir.

Tablo 8. Norovirüs pozitif hastalara ait klinik bilgiler

	1. Hasta	2. Hasta	3. Hasta	4. Hasta	5. Hasta	6. Hasta	7. Hasta
Yaş	2	4	3	1	3	3	83
S/P	P	S	S	S	S	S	S
İshal	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Karın ağrısı	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Ateş	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok
Bulantı/Kusma	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok
Antibiyotik kullanımı	Yok	Var	Var	Var	Var	Yok	Var
Altta yatan hastalık	Febril konvülzyon	Ventrikülit	Crohn hastalığı	Kanama diyatezi	İmmün yetmezlik	Pseudohipoaldosteronizm	Pnömoni

S: Servis P: Poliklinik

5. TARTIŞMA- SONUÇ

Akut gastroenteritler tüm dünyada ve ülkemizde hem çocukluk hem erişkin dönemde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada yılda yaklaşık 1 milyar 700 milyon, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 211-375 milyon akut ishal atağı geliştiği tahmin edilmektedir (Thielman, 2014).

Akut gastroenterit etkenleri arasında virüsler ilk sırayı alırken bakteriler ve parazitlerde etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde viral gastroenteritlerde en sık karşımıza çıkan etken Norovirüstür. AGE vakalarının dünya çapında %20' si norovirüs temellidir. Zarfsız, tek iplikli, pozitif polariteli RNA' ya sahip olan bu virüs ABD de ise her yıl yaklaşık 21 milyon vakaya neden olur (Ahmed ve ark., 2014). Ülkemizde Norovirus tanı testi klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak çalışılan bir test değildir. Literatüre göre, çocuklarda norovirüs gastroenteritleri, tüm akut gastroenteritlerin ortalama %14'ünden sorumludur. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde %14,6 (6/41) oranında çocuk hastalarda norovirüs pozitifliği saptanmıştır. Norovirüsün rutin tespiti hastanede enfeksiyon kontrolünü ve toplumda salgın tespitini kolaylaştırabilir (Said ve ark., 2008). *C.difficile* gram pozitif, toksin üretebilme yeteneğine sahip, sporlu bir bakteridir ve sebep olduğu enfeksiyonların şiddeti ve görülme sıklığı son on yılda giderek artmıştır (Britton ve Young, 2014). Özellikle ileri yaşlı hastalarda *C. difficile* 'nin PCR ribotipleri 078 ve NAP1/B1/027 hipervirülan suşlarının ortaya çıkması mortalite açısından önemlidir (O'Donoghue ve Kyne, 2011; Depestel ve Aronoff, 2013).

Viral gastroenteritin bağırsak mikroorganizma çeşitliliğini azaltması *C. difficile* enfeksiyonu için en önemli risk faktörü olan antibiyotik kullanımında görülene benzer bir etkiye neden olmaktadır (El Feghaly ve ark., 2013). Lukkarinen ve ark. norovirüsün bağırsak homeostazında yarattığı değişiklik nedeniyle *C. difficile* tarafından üretilen toksinlerin etkilerinin şiddetlenebileceğini öne sürmüştür

(Lukkarinen ve ark., 2009). Sağlık açısından önemlerine rağmen *C.difficile* ve norovirüs arasındaki ilişki hakkında çok fazla şey bilinmemektedir. Bunların koenfeksiyonları bildirilmiş olsa dahi kohort sayısı oldukça sınırlıdır (El Feghaly ve ark., 2013; Stockmann ve ark., 2015).

ABD’ de koenfeksiyon insidansını belirlemeye yönelik uygulanan bir çalışmada Ocak-Aralık 2015 ayları arasında 2257 dışkı incelenmiştir. En sık rastlanan patojen (275/2257) % 15,2 oranıyla *C. difficile* olmuştur. Bunların içinde *C. difficile* ve norovirüs koenfeksiyonu 22 (% 8) vakada görülmüştür (Murphy ve ark., 2016). 1 Şubat- 15 Mart 2012 ayları arasında yapılan bir çalışmada uzun süreli hasta bakımevlerinde (LTCF) akut gastroenterit şikayeti bulunan 30 hasta örneğinde patojen taraması yapılmış, 4 (%13,3) hastada *C. difficile* ve norovirüs koenfeksiyonuna rastlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre bu iki patojen arasında antagonistik bir ilişki mevcut olduğu ve birbirleriye yarışarak diğerinin patojenitesini sınırlandığı vurgulanmıştır (Ludwing ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz norovirüs ve *C.difficile* koenfeksiyon oranı benzer şekilde %8,5 (7/82) olarak bulunmuştur.

ABD, Mighigon’ da *C. difficile* ve norovirüs ile aynı anda enfekte olmuş hastaların klinik özelliklerini incelemek ve prevelansını belirlemek amaçlı yapılan bir çalışmada Ekim 2010- Ağustos 2013 tarihleri arası 18 yaşından büyük 384 hasta numunesi toplanmış, (40/384) % 10,5 oranında norovirüs + *C. difficile* ile koenfekte hastaya rastlanmıştır. Aynı zamanda koenfeksiyon durumunda *C. difficile*’ ye özgü semptomların (karın ağrısı, gaz, bulantı) norovirüs kaynaklı semptomlara baskın ve şiddetinde artış olabileceği öngörülmüştür (Stokely ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda, 18 yaş üstü hastalarda norovirüs ve *C. difficile* koenfeksiyonu mevcut hasta oranı %2,4 (1/41) olarak tespit edilmiş ve kliniğinde ateş, karın ağrısı ve bulantı semptomları gözlenmemiştir. Hastaların tümünde ishal şikayeti saptanmıştır.

Yenidoğan ve 2 yaş altı çocuklarda *C. difficile* saptanması genellikle asemptomatik kolonizasyon olarak değerlendirilmektedir. Çocuklarda *C. difficile* ve koenfeksiyonlarını irdelemek amacıyla yapılan bir literatür araştırmasında 31 farklı çalışma incelenmiştir. Çeşitli tanı yöntemleri kullanılarak test edilmiş 10,201 hastadan %16,1’ sında (n:1708) *C. difficile* toksin pozitif olarak sonuçlanmış,

bunlardan %9,6' sında *C. difficile* ile çeşitli viral patojenler arasında koenfeksiyon saptanmıştır. Koenfeksiyona yol açan viral patojenlerden %10' u norovirüs pozitif olarak bulunmuştur (De Graaf ve ark., 2015). Hollanda' da 2012-2014 yılları arasında okul öncesi çocuklarda koenfeksiyon risk faktörlerini tanımlama amaçlı yapılan bir çalışmada ise test edilen 822 örnekten 290'ında (%35,2) koenfeksiyon saptanmıştır. *C. difficile* ile enfekte hasta sayısı 80 (%9,7) dir. *C. difficile* norovirüs birlikte enfeksiyon oranı ise (13/80) % 16,2 olarak saptanmıştır (Pijnacker ve ark., 2018). İngiltere' de 1 Ocak 2005- 31 Aralık 2009 tarihleri arasında 0-16 yaş arası 75 *C. difficile* toksin pozitif hasta örnekleri analiz edilmiştir. 51 olguda viroloji testleri uygulanmış ve koenfeksiyona rastlanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen norovirüs ile koenfeksiyon oranı % 5,9' dur. (Pai ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise 0-16 yaş arası çocuk grubunda ise *C.difficile* toksin pozitif 41 hastanın 6 sında (%14,6) norovirüs ile koenfeksiyon tespit edilmiştir. Çalışmamızda yer alan hastaların yaş grupları irdelendiğinde en fazla oranın %14,6 ile çocuk yaş grubunda olduğu saptanmaktadır.

Salgın durumlarında patojenlerin koenfeksiyonlarında artış görülebilir. Ülkemizde 2008 yılına kadar 'salgın şeklinde' norovirüs bildirilmemiş, norovirüsün neden olduğu ilk salgın Aksaray, Şereflikoçhisar, Kırşehir ve Adana şehirlerinde Uyar ve arkadaşları tarafından bildirilen su kaynaklı salgındır (Uyar ve ark., 2008). Almanya' da 2002-2012 yılları arasında 44 norovirüs salgınının incelendiği bir çalışmada 9 (%20) salgında farklı oranlarda *C. difficile* ve norovirüs koenfeksiyonuna rastlanmıştır (Mattner ve ark., 2015). İngiltere' de 2013- 2014 yılları arasında 0-16 yaş arasında çocuklarda gastrointestinal patojen paneli (GPP) kullanılarak yapılan bir çalışmada test edilen 59 örnekte %36 oranında norovirüs pozitifliği tespit edilmiş, Norovirüs/ *C.difficile* koenfeksiyonu ise % 43 (n:9) olarak bulunmuştur (Less ve ark., 2019). Teksas' ta 2008 tarihinde 13 (%44,8) hasta 16 (%55,2) sağlık çalışanı toplam 29 dışkı örneğinde gerçekleştirilen tarama sonucunda %24,1 (n:7) oranında *C. difficile* toksin pozitifliği saptamıştır. Bu hastaların 5' inde norovirüs pozitifliği bulunmuştur (Koo ve ark., 2009). Bundan dolayı enfeksiyon kontroluna katkı sağlamak amacıyla konunun üzerinde durulması gerekmektedir.

ABD’ de rutin olarak rotavirüs aşısının uygulanmaya başlanması ardından norovirüs çocuklarda AGE’ nin baskın nedeni olmuştur (Chhabra ve ark., 2013). ABD’ nin Tennessee eyaletinde yeni aşı gözetim ağının (NVSN) bir parçası olarak 1 Ekim 2008- 30 Haziran 2011 tarihleri arasında 6 yaşından küçük 216 hasta numunesi toplanmıştır, multiplex moleküler test kullanılan çalışma sonucunda (35/216) % 16,2 *C.difficile* pozitif örnek saptanmıştır. Bu örneklerde norovirüs ile koenfeksiyon oranı %48,5 (n:17) olarak saptanmıştır (Nicholson ve ark., 2016). Benzer şekilde Kore’ de rotavirüs aşılmasının başlamasından 5-6 yıl sonra Ocak 2012- Aralık 2013 tarihleri arasında gerçekleştirilen bir çalışmada akut gastroenterit şikayeti ile başvuruda bulunan 4 yaş altı 415 çocuktan 38’ inde (%9,2) *C. difficile* tespit edilmiştir. *C. difficile* norovirüs koenfeksiyon oranı %34,2 (n: 13) olarak saptanmıştır (Kim ve ark., 2017). Bu çalışmalar bize rotavirüs aşısının kullanımından sonra çocuklarda norovirüs ile koenfeksiyon oranının rotavirüsün önüne geçtiğini ve viral antijen taramasında yer alması gerektiğini göstermektedir.

İmmün yetmezliği olan hastalar patojen ile enfekte olma durumunda belirgin morbidite yaşayabilmektedir (Green, 2014). Bu hastalarda koenfeksiyonlar daha büyük risk taşımaktadır. Bunu gösteren son yıllarda yapılmış bir kaç çalışma vardır. Yapılan retrospektif bir çalışmada 1 Ekim 2015- 31 Mayıs 2016 tarihleri arasında dışkı PZR’ ı norovirüs pozitif olarak sonuçlanmış örnekler incelenmiş, çalışma popülasyonu 0-110 yaş arası ve her iki cinsiyeti içermektedir. 100’ ü (%78) yetişkin 28’ i (%21,9) 18 yaş altı olmak üzere mevcut 128 örnekten 27’ sinde (%21,1) *C. difficile* saptanmıştır (Sacco ve ark., 2017). Çin’ de Nisan 2016- Nisan 2017 tarihleri arasında HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile enfekte 81 hastanın dışkıları analiz edilmiş, 55 (%68) hastada *C. difficile* tespit edilmiş ve % 16,3’ünde (n:9) *C. difficile* ve norovirüs koenfeksiyonu saptanmıştır (Siyuan ve ark., 2019). Bizim de olgularımız arasında 2’ si immün yetmezlikli olgulardır.

İzmir’ de Göktaş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Ocak 2015- Eylül 2016 tarihleri arasında 471 hastadan alınan dışkı örnekleri multipleks PZR testi kullanılarak değerlendirilmiş, % 48,8’ inde (230/471) etken tespit edilmiştir. Norovirüs ve *C. difficile* ortak enfeksiyona 2 (%0,8) örnekte rastlanmıştır (Göktaş ve ark, 2017).

Norovirus enfeksiyonlarının en önemli klinik belirtisi ishal ve kusma olarak bilinir. Ancak çalışmamızda koenfeksiyon saptanan hastaların retrospektif olarak klinik durumları incelendiğinde en önemli ortak nokta ishal şikayetleri olup, bulantı, kusma gibi şikayetlerinin olmaması dikkat çekicidir.

Rutin klinik testlerin bir parçası olan norovirus saptamaya yönelik testler, özellikle immun yetmezlikli, yaşlı, altta yatan hastalığı olan hastalar için enfeksiyonun prognozu açısından önem taşımaktadır. Dolayısıyla ülkemizde de norovirüs rutin klinik testlerin özellikle bu grup hastalar için çalışılması uygun olacaktır.

Kısa sürede yayılabilmesi ve hatta salgınlara yol açabilmesi nedeniyle gastroenteritlerin hızlı laboratuvar tanısı önem kazanmaktadır. Ülkemizde ELISA kullanılarak yapılan çalışmalarda norovirüs saptama oranı %8,5 ile - %22,8 arasında değişmektedir (Aksu, 2016; Altındış, 2016). Bölümümüzden yapılan bir başka çalışmada ELISA ile norovirüs antijeni sıklığı %2,1 olarak saptanmıştır (Mercan Y. Çocuklarda viral gastroenterit etkeni olan rotavirüs ve norovirüsün araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. A İlki). Literatüre baktığımızda, PZR yöntemiyle norovirüs saptama oranı ise %8,1 ile - %42,8 arasında değiştiği bildirilmiştir. Özkul ve ark. İstanbul'da gastroenteritli hastalarda ELISA ile norovirüs pozitifliğini %10, 5, gerçek zamanlı RT-PZR ile 15,1 oranlarında belirlemişlerdir (Özkul, 2011).

Her iki testinde avantajları ve dezavantajları mevcuttur. RT-PZR duyarlılık ve özgüllüğü yüksek ancak rutin laboratuvar için maliyeti yüksek ve deneyimli personel gerektirmektedir. ELISA ise kolay uygulanabilen, kısa sürede yapılan ve fiyatı daha uygun özgüllüğü yüksek bir testtir.

Bizim çalışmamızda Ocak 2019- Mart 2020 tarihleri arasında ELISA yöntemiyle tespit edilen norovirüs oranı % 3,7, gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle tespit edilen norovirüs oranı ise %8,5 tur. RT- PCR referans alındığında, ELISA testinin duyarlılığı %63,6, özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir ve bu sonuç literatürle uyumludur.

Çalışmamızda *C. difficile* toksin pozitif hastalarda % 8,5 oranında norovirüs ile koenfeksiyon görülmüş, bu azımsanmayacak oran literatürle uyumlu gözükmemektedir.

Klinisyenler özellikle uzun süreli yatış hikayesi, immun yetmezliği olan *C.difficile* toksin pozitif hastaları için olası norovirus enfeksiyonunu da akla getirmelidir. Uzun süren tedavi etmekte zorluk yaşanan ishalli hastalarda, enteropatojenler arası etkileşimleri düşünmek, farklı tanı arayışlarına girmek ve tedaviyi buna göre yönlendirmek önemlidir. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



6. KAYNAKÇA

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.* 1969;119(6):668-73.

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14: 725–730

Albayrak N, Yağcı-Çağlayık D, Altaş AB, Korukoğlu G, Ertek M. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2011;68(1): 9-15.

Altındış M, Bányai K, Kalayci R, Gulamber C, Koken R, Yoldas Y, Aykurt P, Martella V. Frequency of Norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scand J Infect Dis* 2009;41(9):685- 688.

Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol* 2013;56(3):194-8

Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *PNAS.* 2005; 102(29): 10327-10332.

Atmar RL, Estes MK. Human Caliciviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology.* 3 st ed. Washington: American Society for Microbiology; 2009; p. 1109-1121.

Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(11): 1048-57.

Bartlett JG, Chang TEW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing clostridia. *N Eng J Med.* 1978;298:531-4.

Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002;346:334-9

Bates PR, Bailey AS, Wood DJ, Morris DJ, Couriel JM. Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus and astrovirus gastroenteritis in children, *Journal of Medical Virology*. 1993;39(3):224-8.

Bauer MP, Kuijper EJ. Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29: 29-35.

Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection; Performances, result interpretation and cost effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015;53: 3723-7.

Black RE. Persistent diarrhea in children of developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. 1993;12 (9): 751-61.

Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006;193(3):413-21.

Branski D, Lerner A, Lebenthal E. Chronic diarrhea and malabsorption. *Pediatr Clin North Am* . 1996; 43 (2): 307-31.

Britton RA, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*. 2014;146: 1547–1553.

Bucardo-Rivera F. Pediatric rotavirus and norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Mikrobiol*. 2008; 46 (8): 2573-80.

Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile* implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:501-52.

Chagla Z, Quirt J, Woodward K, Neary J, Rutherford C. Chronic norovirus infection in a transplant patient successfully treated with enterally administered immune globulin. *J Clin Virol*. 2013;58(1):306-8.

Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis.* 2013;208: 790-800.

Cooperstock M, Riegle L, Woodruff CW. Influence of age, sex, and diet on asymptomatic colonization of infants with *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 1983;17: 830–833.

Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, Crook DW, Gorbach SL. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection fidaxomicin versus vancomycin. *Clin Infect.* 2012; 55(2):154-61.

Çelik AF, Turna H. İshalde patogenezi. In: Öztürk R eds. İshal. 13 st ed. İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği; 1998, p:36-49.

Degraaf H, Pai S, Burns D, Karas J, Enoch D, Faust S. Co-infection as a confounder for the role of *Clostridium difficile* infection in children with diarrhoea: a summary of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34(7):1281-7.

Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract.* 2013;26: 464–475

Dizer U, Beker CM, Hayat L. Antibiyotik Nedenli *Clostridium Difficile* İnfeksiyonunun Klinik Tanı Ve Tedavisi. *Flora* 1998; 3: 165-170.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews.* 2008; 225(1):190-211.

Du Pont HL, Garey K, Caeiro JP, Jiang ZD. New advances in *Clostridium difficile* infection: changing epidemiology, diagnosis, treatment and control. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21: 500-7.

Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays a real-time PCR assay for *Clostridium difficile* tcd B and a glutamate dehydrogenase detection assay to

cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3211-17.

Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. BMJ. 2007;334(7583):35-40.

El Feghaly RE, Stauber JL, Tarr PI, Haslam DB. Viral co-infections are common and are associated with higher bacterial burden in children with *Clostridium difficile* infection. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013;57: 813–816.

Gantzer C, Senouci S, Maul A, Levi Y, Schwartzbrod L. Enterovirüs genome in wastewater: concentration on glasswool and glasspowder and detection by RT-PCR. Journal of Virological Methods. 1997;65(2):265-271.

Geroling DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME. *Clostridium difficile* associated diarrhoea and colitis. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995;16(8):459-77.

Göktaş Ş, Aksoy A, Şamlıoğlu P. Akut Gastroenterit Etkenlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması. Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2017;9(1).

Götz H, Ekdahl K, Lindbäck J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. Clin Infect Dis 2001;33(5):622-8.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virüs infection of volunteers: new insights based on improved assays. The Journal Infectious Diseases. 1994;170(1):34–43.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. The Journal of Infectious Diseases. 2000; 181(2):322-330.

Green KY. Norovirus infection in immunocompromised hosts. Clinical microbiology and infection. 2014; 20(8):717-23.

Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH. Acute gastroenteritis surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emer Infect Dis*. 2013;19: 1305–1309.

Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1998;27(4):702-10.

Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*. 2015;37: 13-24.

Jiang W, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*. 1993; 195: 51-61.

Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*. 1999;83(1-2):145-54.

Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1998; 26(5):1027-34.

Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect*. 2009; 58(6): 403-10.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immunoelectron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis. *The Journal Virology*. 1972;10(5):1075-1081.

Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology*. 2006;151(7):1291-1308.

Kele B, Lengyel G, Deak J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70: 475-478.

Kim A, Chang JY, Shin S, Yi H, Moon JS, Ko JS, Oh S. Epidemiology and Factors Related to Clinical Severity of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children After the Introduction of Rotavirus Vaccination. *J Korean Med Sci*. 2017; 32(3):465-474

Koo HL, Koo DC, Musher DM, DuPont HL. Antimotility agents for the treatment of *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 598-605.

Koo HL, Ajami NJ, Jiang ZD, Dupont HL, Atmar PL, Lewis D, Byers P, Abraham P, Quijano RA, Musher DM, Young EJ. A Nosocomial Outbreak of Norovirus Infection Masquerading as *Clostridium Difficile* Infection. *Clin Infect Dis*. 2009;48 (7):75-7.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*. 2003;81 (3): 197-204.

Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *Lancet*. 2008;371:1486-8.

Kurugöl Z, Devrim İ. Gastrointestinal enfeksiyonlar. *J Pediatr Inf*. 2014;8: 71-81.

Kim A, Chang JY, Shin S, Yi H, Moon JS, Ko JS, Oh S. Epidemiology and Factors Related to Clinical Severity of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children After the Introduction of Rotavirus Vaccination. *J Korean Med Sci*. 2017; 32(3):465-474.

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 516–523

Lees E, Carrol E, Ellaby N, Roberts P, Corless C, Lenzi L, Darby A, O'Brien S, Cunliffe N, Turner M, Miyajima F, Pirmohamed M. Characterization of Circulating *Clostridium Difficile* Strains, Host Response and Intestinal Microbiome in Hospitalized Children With Diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(3):221-228.

Ludwig A, Sato K, Schirmer P. Concurrent outbreaks with coinfection of norovirus and *Clostridium difficile* in a long-term-care facility. *Epidemiol Infect*. 2013;141:1598–1603.

Lukkarinen H, Eerola E, Ruohola A. *Clostridium difficile* ribotype 027-associated disease in children with norovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28: 847–8.

Lewis DC, Lightfoot NF, Pether JV. Solid-phase immunoelectronmicroscopy with human immunoglobulin M for serotyping of Norwalk-likeviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;26(5):938-942.

Martínez-Meléndez A, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero R, Maldona HJ, Vılareal-Trevino L, Garza-Gonzalez E. Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *World J Gastroenterol* 2017; 23(9): 1552-1567.

Mattison CP, Cardemil CV, Hall AJ. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. *Expert review of vaccines*. 2018;17(9):773-784.

Mattner F, Guyot A, Henke-Gendo C. Analysis of norovirus outbreaks reveals the need for timely and extended microbiological testing. *J Hosp Infect*. 2015; 91(4):332-7

Matty AS de Wit, Marion PG, Koopmans, Yvonne THP van Duynhoven. Risk factors for Norovirus, sapporo-like virüs, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9(12):1563-1570.

Mc Collum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):581-92.

McDonald LC, Owings M, Jernigan, DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996- 2003. *Emerg Infect Dis*.2006;12: 409-15.

Midilli K. İnfeksiyöz ishal ve besin zehirlenmelerinin etiyolojisi ve epidemiyolojisi. In: Öztürk R eds. İshal. 13 st ed. İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği; 1998, p: 19-35.

Minesh P, ShahAron J. Norovirus Illnesses in Children and Adolescents. *Infectious Disease Clinic*. 2018;32(1):103-118

Morinville V, McDonald J. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in 200 Canadian children. *Can J Gastroenterol*. 2005; 19: 497-501.

Morris R, Waite WM. Evaluation of procedures for recovery of virüses from water. I. Concentration systems. Water Research. 1980;14(7):791-793.

Murphy CN, Fowler RC, Iwen PC, Fey PD. Evaluation of the BioFire FilmArray® GastrointestinalPanel in a Midwestern Academic Hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(4):747-754.

Napolitano LM, Edmiston CE Jr. Clostridium difficile disease: diagnosis, pathogenesis, and treatment update. Surgery. 2017; 162(2):325-348.

Nicholson M, Horn G, Tang Y, Vinjé J, Payne D, Edwards K, Chappell J. Using Multiplex Molecular Testing to Determine the Etiology of Acute Gastroenteritis in Children. J Pediatr. 2016;176: 50-56.

O'Donoghue C, Kyne L. Update on Clostridium difficile infection. Curr Opin Gastroenterol. 2011;27: 38–47.

Öztürk R. Norovirus ve diğer calicivirüsler. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3 st ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.

Pai S, Aliyu S, Enoch D, Karas JA. Five Years Experience of Clostridium Difficile Infection in Children at a UK Tertiary Hospital: Proposed Criteria for Diagnosis and Management. PLoS One. 2012; 7(12):e51728.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. The New England Journal of Medicine. 1977;297(2):86-89.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa JV, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerging Infectious Diseases. 2008;14(8):1224-1231.

Pijnacker R, Pelt W, Vennema H, Kortbeek L, Notermans D, Franz E. Clinical relevance of enteropathogen co-infections in preschool children: a population-based repeated cross-sectional study. Clin Microbiol Infect. 2019;25(8):1039.e7-1039. e13.

- Pogan R, Dülfer J, Uetrecht C. Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology*. 2018;31: 59-65.
- Pothoulakis C, LaMont JT. Clostridium difficile colitis and diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993;22: 623-37.
- Poxton IR, McCoubrey, J, Blair G. The pathogenicity of Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(8):421-7.
- Rathaur VK, Pathania M, Jayara A, Yadav N. Clinical study of acute childhood diarrhoea caused by bacterial enteropathogens. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(5): 01-5.
- Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L. Increase in Clostridium difficile– related Mortality Rates, United States, 1999–2004. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 1417–19.
- Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol*. 2003; 26: 109-115.
- Rodríguez C, Broeck JV, Taminau B, Delmee M, Daube G. Clostridium difficile infection: early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*. 2016; 97: 59-78.
- Rolfe RD, Helebian S, Finegold SM. Bacterial interference between Clostridium difficile and normal bacterial flora. *J Infect Dis*. 1981;143: 470–5.
- Roman E, Wilhelmi I, Colomina J, Villar J, Cilleruelo ML, Nebreda V. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J Med Microbiol*. 2003;52:435e40.
- Rossignol JF. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res* 2014;110: 94-103.
- Sacco K, Pongdee T, Binnicker M, Espy M, Pardi D, Khanna S, Josh A. Presence of Immune Deficiency increases the risk of Hospitalization in Patients with Norovirus Infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90(4):300-306.

Said MA, Perl TM, Sears CL. Healthcare epidemiology: gastrointestinal flu: norovirus in health care and long-term care facilities. *Clinical infectious diseases*. 2008;47(9):1202-8.

Shirato H. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens. *Jpn J Infect Dis*.2011; 64: 95- 103.

Shieh Y, Monroe SS, Fankhauser RL, Langlois GW, Burkhardt W, Baric RS. Detection of norwalk-like virüs in shellfish implicated in illness. *Journal Infectious Diseases*. 2000;181(2):360-366.

Siyuan Y, Min L, Jingwei C, Gang W, Yunao Z, Hongyu J, Hongshan W, Rui S, Linjun S, Huizhu W, Linghang W, Wenhao H. Diagnostic determination of Norovirus infection as one of the major causes of infectious diarrhea in HIV patients using a multiplex polymerase chain reaction assay. *International Journal of STD & AIDS*. 2019; 30 (6): 550-556.

Stockmann C, Rogatcheva M, Harrel B. How well does physician selection of microbiologic tests identify *Clostridium difficile* and other pathogens in paediatric diarrhoea? Insights using multiplex PCR-based detection. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21: 179 e9–15.

Stokely J, Niendorf S, Taube S, Hoehne M, Young V, Rogers M, Wobus C. Prevalence of Human Norovirus and *Clostridium Difficile* Coinfections in Adult Hospitalized Patients. *Clin Epidemiol*. 2016; 6: 8 253–260

Sözen H, Gönen İ, Beydilli H. An outbreak of norovirus gastroenteritis in a county in Turkey. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2014; 4(1): 26-9.

Thielman NM, Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med* 2014; 350: 38-47.

Thielman NM, Wilson KH. Antibiotic-associated colitis. In: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5 st ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000, p:1111- 26.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manage Response*. 2004;2(1):4-9

Tullus K, Aronsson B, Marcus S. Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8: 390–393.

Usacheva EA, Jin JP, Peterson LR. Host response to *Clostridium difficile* infection: diagnostics and detection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;7: 93-101.

Uyar, Y, Çarhan A, Özkaya E, Ertek M. Türkiye’de 2008 yılında ortaya çıkan ilk norovirus salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2008; 42: 607-615.

William FW. Norovirus infections-An overview. *Infectious Disease Update*. 2013;20: 14-26.

Wolf MK, Taylor DN, Boedeker EC, Hyams KC, Maneval DR, Levine MM. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from U.S. troops deployed to the Middle East. *J Clin Microbiol*. 1993;31(4):851-6.

Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res*. 2010;131: 48-799.

Valentini D, Vittucci AC, Grandin A, Tozzi AE, Russo C, Onori M, Menichella D, Bartuli A, Villani A. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32: 909-15.

Vecchio AL, Zacur GM. *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Cur Opin Gastroenterol*. 2012;28: 1–9.

Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical Microbiology*. 2015;53(2):373–381.

Yücesoy M, McCoubrey J, Brown R, Poxton RI. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. *Clin Microbiol Infect*. 2007;8: 413-18.

Zarakolu P, Aktepe OC, Güvener E.Çocukluk çağı ishallerinde etken olarak Campylobacter jejuni sıklığının araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni. 1999;33(3):157-161.

Zheng DP, Ando T, Fankauzer RL, Beard RZ, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology.2006; 346:312-323.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. J Nutr. 2004; 134: 465–472



EK 1. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI : Clostridium Difficile Pozitif Hastalarda Norovirus İnsidansının Elisa ve Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof.Dr. Zeynep Arzu İLKİ
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Şura ŞALCI
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 14.01.2019-13

Sayın; Prof.Dr. Zeynep Arzu İLKİ

13 protokol nolu "Clostridium Difficile Pozitif Hastalarda Norovirus İnsidansının Elisa ve Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılması" isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

F. Arıcıoğlu

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Doç.Dr. İlksen DEMİRBÜKEN

Prof. Dr. Dilek SAĞ

Prof.Dr. Hülya AŞCI

Prof.Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Prof.Dr. Nefise BAHÇECİK

Prof.Dr. Hakkı ARIKAN

Doç.Dr. M. Emrit UĞURLU

Doç.Dr. Betül OKUYAN

Av. Funda IŞIK

Av. Öncel Onur AKBAŞ



Marmara Üniversitesi Güleste
Kampüsü Sağlık Bilimleri
Enstitüsü 44085 Kadıköy /
İSTANBUL

0 (216) 414 44 22/12 (ö/akad.)

0 (216) 414 44 23

sa@h.opos@marmara.edu.tr
http://etik.kurumu.marmara.edu.tr

Ayresin İlgili İsim
Saklanması
TUTULMUŞTUR

EK 2. MAKALE GÖNDERİMİ



Makaleniz başarıyla alındı.

Gelen Kutusu x

JournalAgent - TERH <noreply@journalagent.com>
Alıcı: ben ▾

23 Haziran Sal 20:16 (3 saat önce)



Izmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi
Ref.: Ms. No. [TERH-91069], [Clostridium difficile pozitif hastalarda norovirus insidansının elisa ve molekuler yöntemlerle karşılaştırılması - Comparison of norovirus incidence with elisa and molecular methods in Clostridium difficile positive patients]

Sayın Hanife Sura Salcı,

'Clostridium difficile pozitif hastalarda norovirus insidansının elisa ve molekuler yöntemlerle karşılaştırılması - Comparison of norovirus incidence with elisa and molecular methods in Clostridium difficile positive patients' başlıklı makaleniz TERH-91069 referans numarasıyla kayıtlarımıza alınmıştır.

EK 3. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hanife Şura	Soyadı	ŞALCI
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	21.01.1994
Uyruğu	T.C	Tel	0531 617 71 13
E-mail	surasalcii@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/ Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2020
Lisans	Marmara Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
1 Stajyer biyolog	Dünya Göz Hastanesi	3 Ay
2 Stajyer biyolog	PharmaVision İlaç Firması	1 Ay

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi
İspanyolca	Az	Az	Az

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	Çok iyi
Excel	Çok iyi
PowerPoint	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

