



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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
CLOSTRİDİUM DIFFİCİLE KÖKENLERİNDE TOKSİN  
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. RUKİYE ARIN TABAKCI**

**UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2014**



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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
CLOSTRİDİUM DIFFİCİLE KÖKENLERİNDE TOKSİN  
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. RUKİYE ARIN TABAKCI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Nurver TOPRAK ÜLGER**

**İSTANBUL 2014**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfalar

Önsöz.....	i
Özet .....	ii
Özet (İngilizce) .....	iii
Kısaltmalar dizini .....	iv
Tablolar dizini.....	v
Şekiller dizini.....	vi
1.Giriş ve amaç .....	1
2.Genel Bilgiler .....	2
2.1.Tarihçe .....	2
2.2. Mikrobiyolojik özellikler.....	5
2.3.Virulans ve toksinler .....	6
2.3.1.Toksin A.....	6
2.3.2. Toksin B .....	7
2.3.3. <i>Binary</i> toksin .....	7
2.4. Patogenez.....	8
2.5. Epidemiyoloji .....	10

2.6. Risk faktörleri .....	12
2.7. Klinik .....	14
2.7.1. Asemptomatik taşıyıcılık.....	14
2.7.2. Pseudomembranöz olmayan kolit.....	14
2.7.3.Pseudomembranöz kolit.....	15
2.7.4. Fulminant Pseudomembranöz kolit .....	15
2.8. Tanısal testler .....	15
2.8.1.Toksin aramaya yönelik testler .....	16
2.8.1.1. Doku Kültürü .....	16
2.8.1.2. Enzim temelli immunolojik yöntemler.....	17
2.8.2. Latex aglutinasyon testleri .....	17
2.8.3. Moleküler yöntemler .....	18
2.8.4. Kültür.....	18
2.9. Tedavi.....	19
2.10. Relaps .....	21
2.11. Korunma .....	21
<b>3.Gereç ve Yöntem.....</b>	<b>22</b>
3.1.Gereçler .....	22
3.1.1. Standart Kökenler .....	22
3.1.2. Besiyerleri .....	22
3.1.3. Kimyasal maddeler .....	23
3.1.4. PCR malzemeleri .....	23

3.1.5. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri .....	24
3.2.Yöntemler .....	25
3.2.1. Çalışma kökenleri .....	25
3.2.1.1.Dahil edilme kriterleri .....	25
3.2.1.2.Dışlama kriterleri .....	26
3.2.2. Dışkı örneklerinden toksin A ve toksin B'nin saptanması.....	26
3.2.3. Dışkı örneklerinden <i>C.difficile</i> izolasyonu ve tanımlanması .....	26
3.2.4. <i>C.difficile</i> kökenlerinden DNA izolasyonu .....	27
3.2.5. PZR kullanılarak toksin genlerinin saptanması .....	27
3.2.6.Verilerin analizi ve raporlama .....	29
3.2.7.Etik kurul onayı .....	29
<b>4.Bulgular .....</b>	<b>30</b>
<b>5.Tartışma .....</b>	<b>37</b>
<b>6.Sonuç ve öneriler .....</b>	<b>42</b>
<b>6.Kaynaklar .....</b>	<b>43</b>

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Güner Söyletir'e, Prof. Dr. Münevver Ufuk Hasdemir'e , Prof. Dr. Ayşegül Karahasan'a, Prof. Dr. Nilgün Çerikçioğlu'na, Doç. Dr. Zeynep Arzu İlki'ye ve Dr. Burak Aksu'ya

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden bu yana her konuda bilgi ve desteğini ama en önemlisi güler yüzünü esirgemeyen, gece gündüz demeden sorularımı yanıtı bırakmayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurver Toprak Ülger'e,

Tüm asistan arkadaşlarım, hastane ve diğer bölüm çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan ve benden manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem başta olmak üzere tüm aileme,

Bazen işimi zorlaştıran ama bu dönemdeki tek neşe kaynağım olan çocuklarım Enes ve Eren'e ve hiçbir zaman elimi bırakmayan canım eşim Dr. Mustafa Tabakcı'ya,

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Rukiye Arın Tabakcı

## ÖZET

Son 20 yılda gerek hastane, gerekse toplum kaynaklı *Clostridium difficile* enfeksiyon insidans ve mortalitesinde belirgin bir artış görülmektedir. Bu çalışmada, hastanede yatanlarda gelişen veya toplum kaynaklı ishali olan hastalarda toksijenik *C. difficile* insidansının ve izolatların toksin gen profillerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Marmara Üniversitesi Hastanesinden, Ağustos 2011- Ağustos 2013 tarihleri arasında ishali olan 2740 hastanın dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerden *C.difficile* toksin varlığı, ticari bir enzim bağlı floresan çalışma (ELFA- VIDAS, Biomerieux, France) kiti ile araştırılmıştır. Dışkı örneklerinin aynı zamanda seçici besiyerinde ve anaerop ortamda kültürü yapılmıştır, İzole edilen organizmalar MALDI-TOF MS (VITEK MS, BioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış, toksinA, toksin B ve *binary* toksin genleri "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmiştir. Seksen dört hastanın dışkı örneğinden *C.difficile* üretilmiştir. Bu hastaların 76'sında toksin A ve toksin B genleri (*tcdA+/tcdB+*) saptanmıştır, ancak izolatlar arasında varyant kökenlere (*tcdA-/tcdB+*) veya *binary* toksin genine sahip olanlara rastlanmamıştır. Toksin A/B gen pozitiflik görülme oranı hastanede yatan hastalarda %6,6, toplum kaynaklı ishali olanlarda ise %1 bulunmuştur. Elde ettiğimiz verilere göre, şu an için varyant kökenler veya *binary* toksin genine sahip kökenlerle ilgili bir risk mevcut olmamakla birlikte, ileride oluşabilecek salgınların önlenmesinde veya kontrolünde bu tip araştırmaların sürdürülmesi ve izolatların özelliklerinin yakından izlenmesinin önemi büyüktür.

**Anahtar sözcükler:** *Clostridium difficile*; toksin A; toksin B; binary toksin.

## ABSTRACT

The incidence and mortality rate of hospital and community-acquired *Clostridium difficile* infection have increased remarkably during the last two decades. This study was designed to investigate the incidence of toxigenic *C. difficile* and toxin gene profiles of strains isolated from community and hospitalized patients with diarrhea. The stool specimens collected from 2740 patients at Marmara University Hospital, between August 2011- August 2013, were included to the study. The presence of *C.difficile* toxins in the samples has been screened by a commercial enzyme linked fluorescent assay (ELFA- VIDAS, Biomerieux, France). Stool samples were also cultivated on selective medium at anaerobic conditions, and the isolates were identified by MALDI-TOF MS (VITEK MS, BioMerieux, Fransa) system. In-house polymerase chain reaction was performed to investigate the presence of toxin A, toxin B and binary toxin genes. Stool specimens from 84 patients yielded *C.difficile* in culture. *Clostridium difficile* isolates from 76 of these patients were found positive for toxin A and toxin B genes (*tcdA+*/*tcdB+*), however there were neither variant strains (*tcdA-*/*tcdB+*) nor binary toxin gene positive isolates among tested bacteria. The incidence of toxinA/B gene positivity among hospitalized and community acquired patients were 6.6% and 1%, respectively. The current data have indicated that for the time being there were no risk for isolates producing new toxin variants or binary toxin, however, continuous monitorization of such *C.difficile* strains is of crucial importance in order to detect the emergence of those strains and establish necessary control and preventive measures.

**Key Words:** *Clostridium difficile*; toxin A; toxin B; binary toxin.

## **KISALTMALAR DİZİNİ**

**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri

**CCFA:** Cikloserin Cefoksitin Fruktoz Agar

**CDE:** Clostridium difficile enfeksiyonu

**CLO:** Clostridium difficile agar

**EIA :** Enzim immunoassay

**ELFA:** Enzim Linked Fluorescent assay

**FDA:** Food and Drug Administration

**NAP-1:** North American pulsotype 1

**GDH:** Glutamat dehidrogenaz

**LAMP:** Loop-mediated izotermal amplifikasyon

**MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

**NAA:** Nükleik asit amplifikasyon

**NG:** Nasogastrik

**NPD:** Negatif prediktif değer

**PMK:** Pseudo Membranöz Kolit

**PPD:** Pozitif prediktif değer

**PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** *Clostridium difficile*' ye bağlı ishal oluşmasında risk faktörleri

**Tablo 2.** Polimeraz zincir reaksiyonu ve sekanslama primerleri

**Tablo 3.** Bölümlere göre toksin isteği ve *Clostridium difficile* izole edilme oranları

**Tablo 4.** Toksin (+) klinik ve poliklinik hastalarının çeşitli risk faktörlerinin değerlendirilmesi

**Tablo 5.** Dışkıdan ve kültür filtratından ELFA yöntemiyle toksin saptanmasının PZR ile karşılaştırılması

**Tablo 6.** Toksin saptayan çeşitli yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Clostridium difficile* kolonileri

Şekil 2. *Clostridium difficile* enfeksiyonunu patogenezinde toksinler ve inflamasyon

Şekil 3. *Clostridium difficile* toksinlerinin gen regülasyonu

Şekil 4. *Clostridium difficile* basillerinin mikroskopik görünümü

Şekil 5. Toksin A +/B+ bazı hastaların gen durumunun agaroz jeldeki görünümü

Şekil 6. Örnek kökenlerin *cdt A* ve *cdt B* gen durumunun agaroz jeldeki görünümü

Şekil 7. Toksin saptayan bazı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerop bir bakteri olan *Clostridium difficile*, sağlıklı insanların %3'ünün barsak mikrobiotasında bulunabilir. Hastanede yatan hastaların barsaklarında bulunma oranı %7-11'e kadar artabilir (1). Normal barsak mikrobiyotası *C.difficile* kolonizasyon ve enfeksiyonunu önlemede en önemli bariyer rolünü üstlenmektedir. Sağlıklı bireyler, kolon mikrobiyotasının bu koruyucu etkisinden dolayı genellikle *C.difficile* enfeksiyonlarına (CDE) karşı dirençlidir. Ancak mikrobiotanın, özellikle antianeorobik bir ajan olan klindamisin, penisilin ve sefalosporin gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere maruziyeti sonucunda *C.difficile* karşı olan bu koruyucu mekanizma ortadan kalkar ve *C.difficile* çoğalıp hastalığa sebep olabilir.

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar içerisinde önemli bir paya sahip *C.difficile*, antibiyotik ile ilişkili ishal ve kolitin en önemli etkenidir. *Clostridium difficile* bu durumların yaklaşık % 15-25'inden, pseudomembranöz kolitlerin (PMK) ise % 99'undan sorumludur. *Clostridium difficile* enfeksiyonları, kendini sınırlayan hafif ishalden PMK, toksik megakolon, intestinal perforasyon, septik şok hatta ölüme kadar gidebilen klinik durumlara sebep olabilir (2, 3). Yukarıda bahsettiğimiz üzere geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı *C.difficile* ile ilişkili enfeksiyon (CDIE) gelişmesinde en önemli predispozan faktörü oluşturmaktadır. Ancak antibiyotik kullanımının yanısıra uzun süre hastanede yatış, ileri yaşlılık, yoğun bakımda yatma, proton pompa inhibitörü gibi antiülser ilaçların, antineoplastik ve immünsüpresiflerin kullanılması, radyasyon, nazogastrik tüpler, barsak temizliği ve karın içi cerrahi gibi gastrointestinal girişimler de CDE oluşmasını kolaylaştırıcı faktörlerdir (1, 4).

Sadece toksin üretebilen *C. difficile* kökenleri CDE'ye yol açabilirler. Klasik bilgilere göre *C.difficile* kromozomu'nun patojenite lokusunda (*Paloc*) bulunan *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından kodlanan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)

hastalığın patogenezinin sorumludur. Toksik *C.difficile* suşları genellikle her iki toksini birlikte üretirler. Bununla birlikte ilk kez 1990'lı yılların başlarında toksin A-, toksin B+ (Toksine A-/B+) varyant kökenler tanımlanmıştır (5, 6). Alfa ve ark. (7) bu suşların hastanelerdeki salgınlardan sorumlu oldukları hakkında ikna edici kanıtlar sunmuşlardır. Ayrıca, bazı ülkelerde hastane salgınlara neden olan, enzimatik ve bağlayıcı bileşenlerinin *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlandığı toksin A ve B'den farklı, "binary toksin" üreten kökenler bildirilmiştir (8). Dünyada bu yüzyılın başından beri CDİE dramatik olarak artmaktadır. Bu artışta, yüksek relaps oranlarıyla birlikte daha ciddi hastalıklara sebep olan, *binary* toksin üretimi bulunan hipervirulan suşların önemli bir payına sahip oldukları düşünülmektedir (9).

Çalışmamızda laboratuvarımıza toksin araştırılması isteği ile gönderilen veya toksin bakılması istemi yapılmamış, gerek hastanede yatan gerekse polikliniğe başvurmuş ishalli hastaların lökositli dışkı örneklerinden izole edilen *C.difficile* kökenleri ile ilgili aşağıdaki amaçlar hedeflenmiştir;

- ✓ Elde edilen izolatlarda toksin A, toksin B ve *binary* toksin varlığını araştırmak,
- ✓ Toksik *C.difficile* üretilen hastane ve toplum kaynaklı hastaların risk faktörlerini değerlendirmek.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

*Clostridium difficile* tanımlanmadan önce, 1893 yılında Finney tarafından mide operasyonu sonrası postmortem olarak difteritik psödomembranlar gösterilmiştir (10). *C. difficile* ise ilk defa 1935 yılında Hall ve O'toole tarafından "Anaerob gram pozitif basil" olarak tespit edilmiştir. Bu bakteri üretilmesi zor olduğu için "*Bacillus difficilis*" olarak rapor edilmiştir (11). Bu çalışmada bakterinin

sağlıklı yenidoğan infantların %50'sinin kolon mikrobiyotasında mevcut olduğu belirtilmiştir.

Yine Hall ve O'toole tarafından 1937 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, kemirgenler için ciddi intraperitoneal sorunlara sebep olmakla birlikte yüksek derecede ölümcül bir toksin ürettiği gösterilmiştir. Ancak, histotoksik klostridial sendromla ilişkisi saptanamadığı için insan patojeni olarak düşünülmemiştir (12). 1950-1970 yıllarında antibiyotik kullanımının artması sonrası antibiyotik ilişkili ishal ve kolit vakaları daha sık gözlemlenmeye başlamıştır. 1962 yılında Smith ve King'in yaptıkları araştırmada çeşitli anatomik bölgelerdeki enfeksiyonlarda saptanan *C.difficile*'nin herhangi bir sıra dışı özellik göstermediği belirtilmiştir (13). Ancak, gastrointestinal sistem göz önüne alınmamıştır. Bu yüzden, başka bir histotoksik klostridial sendrom olan PMK ile ilişkisinin saptanması 1978'e kadar gecikmiştir (14).

Sebebi saptamak için kemirgen modelleri üzerinde bir çok çalışma yapılmış, antibiyotikle birlikte bütün kemirgenlerde "ıslak kuyruk" ve ölümcül çekitis (çekum iltihabı) gelişmiştir. Yapılan çalışmalarda özellikle hamsterların çok zayıf oldukları ve klindamisin verilmesiyle 3-5 gün içinde çoğunun öldüğü gözlemlenmiştir (15, 16). Dışkı çalışmalarında gazlı gangren antitoksini tarafından nötralize edilen bir toksinin yüksek titrelerde ( $10^{-5}$  dilüsyonda) varlığının gösterilmesi histotoksik klostridia rolünü anlamada en önemli ipucu olmuştur (17, 18). Sonraki çalışmalarda gazlı gangren anti-toksininin aktif komponentinin anti-*C.sordelli* toksini olduğunun gösterilmesi, *C.sordelli*'nin etken olduğunun zannedilmesine yol açmıştır (18). Ancak, etkilenen hastalardan veya hamsterlardan alınan örneklerle yapılan dışkı kültürlerinde bu ajan saptanamamıştır. Etkenin antijenik bir toksin üreten başka bir klostridium türü olduğu düşünülmüş ve araştırmalar sonucu 1978'de bu türün *C.difficile* olduğu anlaşılmıştır (19).

İlk olarak 1978 yılında PMK ve antibiyotik ilişkili ishal tanımlanmış, vakaların çoğunda *C. difficile* etken olarak saptanmıştır. Klindamisin kullanımı ile semptomların daha erken ortaya çıktığı gösterilmiştir (20). 1979 yılında *C. difficile*'ye bağlı PMK'nın ilk basamak tedavisi olan vankomisin uygulanmıştır. İngiltere Sağlık Güvenliği Komitesi, PMK'nın en sık nedeni olarak belirlenen

klindamisin ve linkomisinin kullanımını kısıtlamışlardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1980'lerde en önemli nozokomiyal ishal etkeni olarak tanımlanmıştır.

1980'lerin ortasında, CDE antibiyotiklerin ciddi bir komplikasyonu olarak modern tıpta yerini almıştır. En yaygın indükleyici ajanların, geniş spektrumlu sefalosporinler ve klindamisin olduğu, Enzim Immun Assay'in (EIA) standart test olduğu, oral vankomisin veya metronidazol'un ise standart tedavi olduğu kanısına varılmıştır. Bunun yanı sıra vakaların %90-95'i nozokomiyal olduğu ve %20-25'inde relapslar gözlemlendiği anlaşılmıştır (21).

Tedavide, oral vankomisin düşünülmüştür. Keighley ve arkadaşlarının yaptığı randomize çalışmada bu ilacın plaseboya açıkça üstün olduğu ispatlanmıştır (22). Bağırsaklarda emildiği ve bu sayede kolon içindeki konsantrasyonu *C. difficile* için şu ana kadar kaydedilen en yüksek Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK) değerinden 100 kattan daha fazla olduğu saptanmıştır (22-24). Amerika "Food and Drug Administration" (FDA), vankomisini *C.difficile* enfeksiyonu (CDE) tedavisi için onaylamış ve 2011 yılında fidaxomisine kadar başka hiçbir ilaç FDA tarafından CDE için onaylanmamıştır. 1989 ve 1992 yılları arasında klindamisin'in yoğun kullanılması sonucu klindamisin dirençli (J suşu) suş, ABD hastanelerinde salgınlara sebep olmuştur. 2003-2006 yılları arasında da, standart tedaviye dirençli, relapslara sebep olan, daha şiddetli CDE saptanmıştır (25).

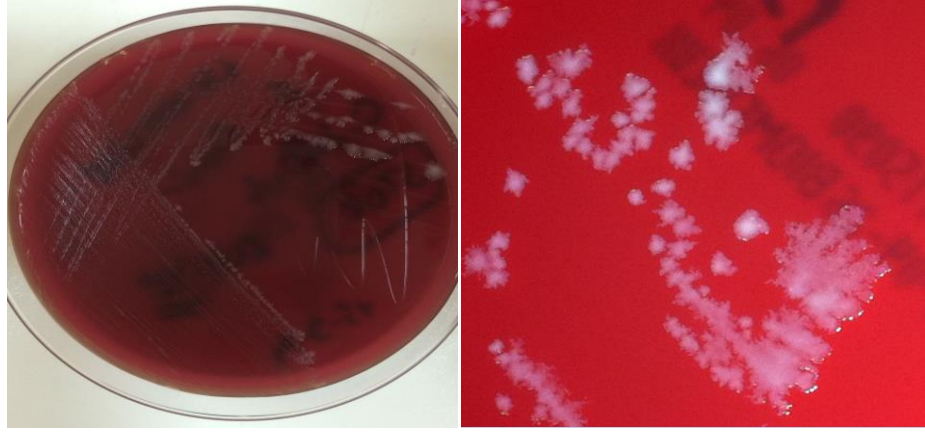
Klinik olarak çok daha ciddi şekilde seyreden, çoğunlukla Avrupa, Kanada ve ABD'de tespit edilen CDE salgınının ortaya çıkmasına kadar CDE ile alakalı çok az yeni bilgi vardır (26-28). Bu salgın genel olarak "North American pulsotype 1"(NAP-1) (Diğer adıyla ribotip 027 ve B-1) olarak adlandırılan tek bir suşa bağlanmıştır. ABD'de, hastalık oranı 3.5 kat, mortalite 4 kat artmıştır (28). Bu durum patofizyoloji, önlem, saptama ve tedavi üzerine önem veren *C.difficile*'e yönelik sağlam yeni bir ilginin gelişmesine neden olmuştur.

*Clostridium difficile* enfeksiyonu ile ilgili daha güncel gelişmelere baktığımızda, multiple relapsları olan hastalar için gayta transplantasyonunun artan bir şekilde kullanımını, altın standart tanı testinin olmayışıyla birlikte toksijenik

*C.difficile* taşıyıcılığının Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testiyle tespitinin başladığını ve CDE'yi daha iyi önleyebilmek için gelişmiş yöntemlere olan ihtiyacın devam ettiğini görmekteyiz (29, 30).

## 2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

*Clostridium difficile* 0,5 µm eninde ve 3-5 µm boyunda, gram pozitif zorunlu anaerop basillerdir. Ancak, eski kültür kolonilerinden yapılan boyamalarda gram negatif olarak görülebilmektedir. Kapsülsüz ve peritrik kirpikleri ile zayıf hareketlidir. İnaktif spor üretir, zorlu çevre koşullarında yıllarca ve hatta yüzyıl boyunca canlı olarak kalabilir. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan sporlar muhtemelen insana bulaşta ortak kaynaklardır (31). Bakteri bedeninden daha geniş olan sporları, oval ve subterminal yerleşimlidir. Spor nadiren terminal yerleşim gösterebilmektedir (31, 32). Buna bağlı olarak mekik, davul tokmağı ve raket görünümü alırlar. Üremek için kan, serum, yumurta sarısı ve fruktoz bulunan besiyerlerine ihtiyaç gösterir. En sık kullanılan besiyeri Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA) besiyeridir. 35 °C'de, 48 saatlik inkübasyon sonunda hafif kabarık, kenarları düzensiz, 1-3 mm çaplı koloniler meydana gelir (32), (Şekil 1). Bu besiyerinde 24 saat içinde oluşan koloniler 360 nm. ultraviyole ışık altında incelenirse, etrafının açık yeşilden sarıya kadar değişen bir hale ile çevrili olduğu görülür. İçerdiği p-hidroksifenilasetik asitten p-krezol açığa çıkararak, kendine özgü at pisliği kokusu oluşturmaktadır (33).



Şekil 1. *Clostridium difficile* kolonileri

### 2.3. Virulans ve Toksinler

*Clostridium difficile* enfeksiyonu, bakterinin ürettiği eksotoksinlerle olmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen *C. difficile* izolatlarının %75'i toksin üretir (32). *C. difficile* toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) denilen iki farklı toksin üretmektedir. Toksin A, 308 kDa molekül ağırlığında bir enterotoksin olup ana patojenik komponenti oluşturur. Toksin B ise 270 kDa ağırlığında, sitotoksik etkiye sahip kısımdır. Toksin A da sitotoksik etkilidir, ancak toksin B'nin sitotoksik özelliği, toksin A'ya göre 100 ile 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Her iki toksinde protein yapısında olup asitlere, proteolitik enzimlere ve ısıya duyarlıdır (32, 34, 35).

Bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücrelerine girdikten sonra hücrenin aktin iskeletini etkileyip hücre ölümüne neden olurlar (35). Toksinler, aynı zamanda bazı sitokinlerin salgılanmasına, bunun sonucunda inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açarlar (35, 36). Her ne kadar toksin üretmeyen suşlar hastalığa neden olmasa da, toksijenik her suş da hastalık yapmamaktadır. Bu durumun, suşlar arasındaki farklardan, konaktaki toksin reseptörlerinin ve immun yanıt farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (32).

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

### **2.3.1. Toksin A**

Toksin A, enterotoksin ve nötrofiller için kemotaktik özellikte olup, sitokinlerin salınımı ile ileuma polimorfonükleer nötrofillerin infiltrasyonunu uyarır. Ayrıca hücreler arası sıkı bağlantının bozulmasına neden olarak sitopatik etki yapar ve bu bağırsak duvarında permeabilite artışı ve arkasından da ishale neden olur (34).

Toksin A, enterosit membranı üzerinde bulunan glikoprotein reseptörlerine bağlanarak, hücre içine girer. Fibriler aktini değiştirerek konak hücrede yuvarlaklaşmaya neden olur. Kolon mukoza hücreleri arasındaki bağlantılar kopar ve yaygın harabiyet gelişir. Sonuçta, bağırsaktan lümene proteinden zengin bir eksuda sızar. Oluşan harabiyet toksin B'nin mukoza hücrelerine penetre olmasını daha da kolaylaştırır (32).

Toksin A, enterositler dışındaki diğer hücreler üzerine de etki gösterebilmektedir. Makrofaj ve mast hücrelerini aktive edip, nötrofillerin mobilizasyonuna yol açar. Sonuçta mukoza hasarı ile birlikte etkilenen bağırsak segmenti içine nötrofiller hücum eder. Bu nedenle toksin A, kolera toksininin aksine monosit, nötrofil ve dökülmüş enterositler içeren proteinden zengin bir dışkılamaya sebep olur. Hemorojiye bağlı olarak dışkıda bazen kanda bulunabilmektedir (32).

### **2.3.2. Toksin B**

Toksin B, toksin A'nın inflamasyona uğrattığı dokulara penetre olarak

mukozada çok ciddi lezyonların gelişmesine neden olur. Toksin B'nin sitotoksik etkisi toksin A'ya göre 100-1000 kat daha fazladır. Bağırsak mukoza hücrelerinde toksin B için spesifik reseptör bulunmamaktadır.

### **2.3.3. Binary toksin**

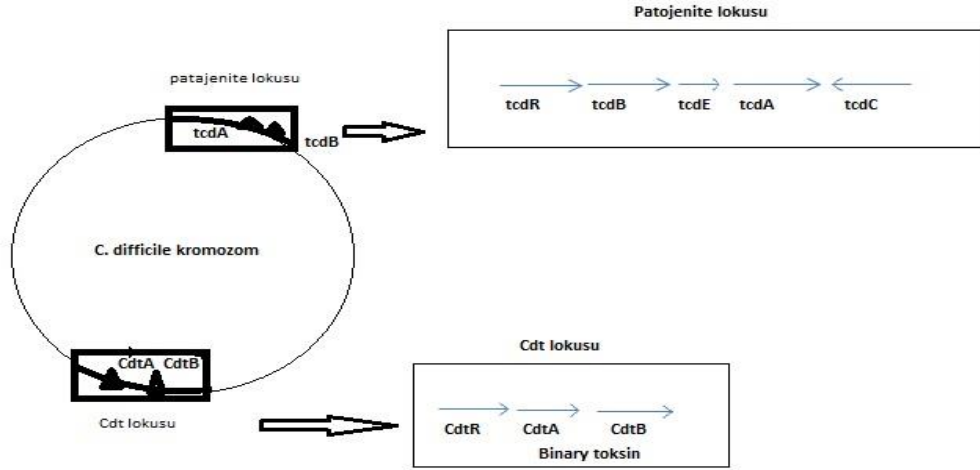
İlk kez Popoff ve ark. tarafından 1988 yılında PMK'lı bir hastadan izole edilmiştir (37). Yapılan çalışmalarda bu kökenin (CD 196), aktin spesifik ADP-ribozil transferaz ürettiği ve *C.perfringens*'in I-toksin'ine yapı ve aktivite olarak benzerlik gösterdiği saptanmıştır (38, 39). Aktin spesifik ADP ribozil transferaz (CDT), iki birbirinden bağımsız protein birimden oluşmuştur, bunlar enzimatik komponent CDT a (48 kDa) ve bağlanma komponenti CDT b (99 kDa) olarak adlandırılmıştır. Bağlanma komponenti, bir hücre yüzey reseptörüne sahiptir. Enzimatik komponent, hücre içinde aktinin ADP'sinin ribozillenmesini katalizliyerek hücre iskeletinin bozulmasına neden olmaktadır (39, 40). Toksinin sitotoksik etkisi, *Vero* hücrelerinde yuvarlaklaşma, aktin flamanında depolarizasyon varlığıyla gösterilebilir. *Binary* toksin geninin tanımlanması, semptomatik hastalardan izole edilen bazı nontoksijenik A-/B- kökenlerin oluşturduğu ciddi kliniği açıklamaya yardım etmiştir. Bu toksine sahip kökenlerin prevalansı çeşitli çalışmalarda %1.6'den %5.5'e kadar değişmektedir ve patogenezdaki rolü hala araştırılmaktadır (40).

### **2.4. Patogenez**

Normal kolonik mikrobiyotanın bozulmasına sebep olan antimikrobiyal tedavi, CDE oluşmasına zemin oluşturur (41). Endojen ve egzogen *C. difficile* sporları ile kontaminasyondan sonra, sporlar normal vejetatif formlara dönüşür ve bu formlar katlanarak hızlıca ürerler. *C. difficile*, daha sonra barsak hücrelerini kaplayan



yüzden *tcdC* anti-sigma faktör olarak bilinmektedir (46-49). Virülans özelliği yüksek izolatlar, toksin A ve B haricinde aktine özgül ADP ribozil transferaz olan *binary* toksin veya CDT isimli üçüncü bir toksin üretmektedirler. Patojenik lokus dışındaki CDT lokus olarak adlandırılan bölgede, bu toksinin genleri olan *cdtA* ve *cdtB* genleri ve bir düzenleyici proteinin geni bulunmaktadır. (49) (Şekil 3).



Şekil 3. *Clostridium difficile* toksinlerinin gen regülasyonu (42. kaynaktan yararlanılmıştır)

## 2.5. Epidemiyoloji

Antibiyotik ile ilişkili diyare ve kolitler, antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanılmasından hemen sonra ortaya çıkmaya başlamıştır (41). 1978 yılında, vakaların çoğunda *C. difficile* etken patojen olarak tanımlanmıştır. İlk *C. difficile* vakaları geniş olarak klindamisine atfedilmektedir (41, 50). Klindamisin önemli bir suçlu ajan olarak etkisini devam ettiriyorken, penisilin ve sefalosporinlerin fazlaca kullanımı vakalarda bu antibiyotik sınıflarının ön plana çıkmasına yol açtı. 1989 ve 1992 yılları arasında ABD’de, dört hastanede geniş salgınlara yol açan klindamisine oldukça dirençli bir suş (“*J suşu*”) gösterildi (25).

*Clostridium difficile* enfeksiyonu, 2000’li yılların başından bu yana daha sık görülmeye başlamış ve bu dönemde gelişen enfeksiyonların, önceleri tanımlanmış olanlara göre daha ciddi seyretmiş olduğu ve standart tedaviye daha fazla direnç

gösterdikleri, aynı zamanda relaps olasılıklarının da daha fazla olduğu görülmüştür. Bu enfeksiyon oranlarındaki ve enfeksiyon ciddiyetindeki artış, kuzey Amerika ve Avrupa'nın tamamında meydana gelmiştir ve bu durumun oluşmasında florokinolon direncine sahip, daha fazla toksin üreten hipervirulan "NAP1/BI/027" olarak adlandırılan suşun etkili olduğu bildirilmiştir (26, 27).

Kanada'da 2000'li yılların başlarında CDE'nin şiddetinde ve sıklığında bir artış gözlemlenmiştir (26, 28). 2003 yılında yayımlanan retrospektif bir çalışmada 1991'den beri özellikle 65 yaş üstü vakalarda 100.000'de bir insidansın 4 kat arttığı gösterilmiştir (51). Bu salgınla eş zamanlı olarak, ABD'de altı eyalette bulunan sekiz hastanedeki salgınlara işaretten, hastalık kontrol ve önleme merkezleri *C. difficile*'nin ciddiyetine ve sıklığına dikkat çekmiştir (52, 53). 1997 ve 2007 yılları arasında, ABD'de, gastroenterit ile ilişkili ölümlerin ana sebebinin *C. difficile* olduğu savunulmuştur (54).

Kanada ve ABD'deki bu salgınlardan sonra, aynı ribotip 027 suşu Avrupada da saptanmıştır (55, 56). Hollanda da 2005'den beri ribotip 078'e bağlı gelişen CDE'ler ortaya çıkmıştır. Bu suşa bağlı olarak gelişmiş olan enfeksiyonlar, ribotip 027 ile benzer şiddette hastalığa yol açmış olmakla birlikte, daha genç popülasyonda gelişmiş ve daha fazla toplum kaynaklı olduğu saptanmıştır (57). 2006 ve 2009 yılları arasında, hastanede yatan 1366 Hollandalı hasta arasında CDE'nin 30 günlük mortalitede 2.5 kat artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (58). Avrupa *C.difficile* Çalışma Grubu tarafından 2005 yılında 14 ülke ve 38 hastanenin katılımı ile, ishal olan ve toksijenik kültür sonucu pozitif olan hastaların dahil edildiği bir çalışmada CDE insidansının, 10.000 hastada 0.13 ile 7.1 olgu arasında değiştiği gösterilmiştir. Ortalama insidansın her 10.000 hastada 2.45 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 354 toksijenik *C.difficile* izolatı tanımlanmış, bu izolatların 66 farklı ribotipe sahip olduğu ve %6'sını ribotip 027'nin oluşturduğu söylenmiştir. Aynı çalışmada, Türkiye'de izole edilen sekiz izolatın ribotip 001 olduğu belirlenmiş (59).

*Clostridium difficile* sporlarının yenmesi ile fekal-oral yol aracılığıyla oldukça taşınabilir bir organizmadır. *C difficile* odalar, sağlık çalışanlarının

kıyafetleri ve elleri gibi hastane ortamlarından kolay bir şekilde üretilebilir (60, 61). Enfeksiyonlar ayrıca, hastanedeki oda arkadaşlarından birbirlerine kolayca taşınabilir. Ancak salgın olmadığı dönem, hastanedeki semptomatik hastaların bütününden *C. difficile* taşınması aracılığıyla olan enfeksiyonların yol açtığı söylenemez (62, 63). Sağlıklı kişilerde *C. difficile* taşıyıcılık oranları % 3 iken, hastanede yatan erişkin hastaların %20-50'sinde meydana gelebilir (64, 65). Hastanede yatan ishali olmayan, 259 hastanın bulunduğu bir çalışmada % 15'nin toksijenik bir *C. difficile* suşu ile kolonize olduğu % 6'sının da non-toksijenik bir suş ile kolonize olduğu saptanmış, saşırtıcı olarak toksijenik *C. difficile* ile kolonize hastalar ve kolonize olmayanlar arasında hastane yatışı ve antibiyotik maruziyeti açısından fark görülmemiştir (66).

Toplum ile ilişkili enfeksiyonlar, tanıdan 1 yıl önce hastane yatışının olmaması olarak tanımlanır. Toplum kaynaklı CDE'ler sık görülen enfeksiyonlardır ve yıllar içerisinde bu enfeksiyonlarda kayda değer bir artışın olduğu göze çarpmaktadır (67-69). Minesotada 1991 ve 2005 yılları arasında CDE'ye neden olan vakaları inceleyen bir çalışmada, hem hastane kaynaklı, hem de toplum kaynaklı enfeksiyon insidansında dramatik olarak bir artış olduğu görülmüştür. Tespit edilen 385 hastanın %41'nin toplum kaynaklı olduğu belirlenmiştir (68).

Antibiyotik maruziyeti olmadan ve son zamanlarda hastane yatışı olmadan da CDE gelişebilir. CDE'nin meydana gelmesinde kaynak olarak perakende gıda ürünleri ve evcil hayvanlarının rol aldığı öne sürülür (70). Ancak, *C. difficile* taşınmasında onların rolü tam olarak bilinmemektedir.

## **2.6. Risk Faktörleri**

*Clostridium difficile* enfeksiyonlu hastaların tanınması ve acil tedavisi için yüksek risk popülasyonunun belirlenmesi faydalıdır. CDE gelişmesinde etkili olan risk faktörleri, birincil ve ikincil risk faktörleri olarak sınıflandırılır (71). En önemli birincil risk faktörleri; erkek cinsiyet, 65 üstü yaş ve antimikrobiyal tedavi olarak sayılabilir. İkincil risk faktörleri ise komorbidite ve altta yatan kronik hastalıkları

içerir. İnflamatuvar barsak hastalığı, immun yetersizlik ve HIV enfeksiyonları, kötü beslenme, düşük albumin seviyesi (<2.5 g/dL), neoplastik hastalıklar, kistik fibrozis ve diyabet, CDE'nin gelişmesinde rol alabilecek olan çeşitli durumlardır (71).

En yaygın olarak tanınmlanan risk faktörü olan geniş spektrumlu antibiyotik kullanılması, normal mikrobiyotanın gelişmesini bozar ve toksijenik *C. difficile* kökenlerinin üremesine neden olur. Bundan dolayı, antimikrobiyal tedavi CDE gelişmesinde merkezi rol oynar. Antibiyotiklerin herhangi bir çeşidi CDE'ye neden olabilir, ancak temel olarak klindamisin, sefalosporinler, florokinolonlar, penisilin grubu antibiyotikler, makrolidler, ko-trimaksazol ve tetrasiklinler gibi antibiyotikler CDE gelişiminde rol oynamaktadır. CDE tedavisinde, ilk seçenek olarak kullanılan metranidazol ve vankomisin kendileri de CDE'ye sebep olabilirler (71, 72).

Kanser kemoterapi ilaçları, antimikrobiyal aktivite göstermesinden dolayı artmış CDE riski ile ilişkili olabilir (71-73). Yayımlanan çelişkili sonuçlara ve antibiyotiklerden daha az önemli olmalarına rağmen, proton pompo inhibitörleri ve H2 reseptör blokörleri de CDE gelişmesinde risk faktörü olarak düşünülür (71, 72). Ayrıca, bu risk faktörlerinin haricinde, Nasogastrik (NG) tüp ile beslenme, endoskopi, barsakların mekanik temizliği gibi nedenler de risk oluşturabilmektedirler (74). Kontamine yiyeceklerin yenmesi de CDE için önemli bir risk faktörüdür (73). Tablo 1, *C. difficile*' ye bağlı ishal gelişmesinde etkili olan çeşitli risk faktörlerini göstermektedir.

Bireysel Faktörler	Girişimsel ve Çevresel Faktörler
• İleri yaş	• Endoskopi gibi gastrointestinal işlemler
• Altta yatan hastalık	• Nazogastrik tüp uygulaması
• Uzun süre antibiyotik kullanımı	• Yoğun bakım ünitesinde izlem
• Çoklu antibiyotik tedavisi	• Uzun süre hastanede yatış
• Antiülser tedavi	• Karın içi cerrahi tedavi
• Antineoplastik ajan kullanımı	• Barsakların mekanik temizliği

**Tablo 1. *Clostridium difficile*' ye bağlı ishal oluşmasında risk faktörleri**

## **2.7. Klinik**

*Clostridium difficile* enfeksiyonu asemptomatik taşıyıcılık, kendini sınırlayan ishal, ciddi ishal, PMK, toksik megakolon, hatta ölüme kadar giden birçok klinik seyir ile ilişkilendirilebilmektedir. Klinik seyirdeki bu farklılık, şuşlar arasındaki farklılardan, konaktaki toksin reseptörlerinin farklılığından yada kişinin bakteriye gösterdiği immün yanıt farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (75).

### **2.7.1. Asemptomatik taşıyıcılık**

Sağlıklı yenidoğanların yarısı veya daha fazlası, erişkinlerin %1'den azı, asemptomatik taşıyıcıdır. Ancak bazı durumlarda antibiyotik tedavisi görenlerde kolonizasyon oranı %25'e kadar çıkmaktadır. Hastanede enfekte olmuş hastaların büyük kısmı asemptomatik olup çevreyi kontamine ederler.

### **2.7.2. Psödomembranöz olmayan kolit**

Hastalarda hafiften orta dereceye kadar değişen bir ishal vardır (32). Günde 10'dan fazla dışkılama ve dışkı incelemesinde lökosit ve eritrosit varlığı mevcuttur. Bulantı, kusma, ateş, dehidratasyon, lökositöz görülmektedir (76). Antibakteriyel ajanın kesilmesi ile ishal sıklıkla son bulur.

### 2.7.3. Psödomembranöz kolit

Klinik olarak daha belirgin ishal, karında duyarlılık ve sistemik bulgularla karakterize olan bu formda, bağırsaklarda 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar bulunur. Plaklar fibrin, mukus, nekrotik mukozal hücreler ve nötrofillerden ibaret eritematöz bir yapı gösterir. Lezyonlu bölgelerin yanındaki doku normal veya hafif eritemlidir. Psödomembranlar tipik olarak rektum ve sigmoid kolona lokalizedir. Sistemik bulgularda, dışkıda eritrosit ve lökosit saptanabilir (77). PMK genelde altta yatan hastalığı olan, immunsupresif olgularda ve yaşlılarda görülür. Sıklıkla PMK olguları, tedavinin ilk günlerinde ortaya çıkmaktadır. Şiddetli karın ağrısı, ateş, lökositoz uyarıcı olmalıdır. Dışkıda bol lökosit ve eritrosit görülür. Tanı 2-10 mm çok sayıda psödomembranların görülmesiyle konulur (77). Tedavi edilmeyen olgularda ölüm görülebilir.

### 2.7.4. Fulminant psödomembranöz kolit

Daha nadir görülen bir formdur. Hastalarda letarji, ateş, taşikardi, şiddetli karın ağrısı mevcuttur. Toksik megakolon gelişirse dışkılama sayısı azalır veya hasta hiç dışkı çıkaramaz (32). Hastanın fizik muayenesinde akut karın bulguları mevcuttur. Kolon perforasyonu, peritonit tablosu hatta ölümle sonuçlanabilir (32)

## 2.8. Tanısal Testler

*Clostridium difficile*, hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedenleri arasında yer almaktadır. CDE tanısı hastanın öyküsü, klinik özellikleri ve laboratuvar testleri ile konulmaktadır. Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı CDE'lerin kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir. Sadece toksin

pozitif izolatların hastalık yapma yeteneğinin olmasından dolayı, dışkı örneklerinden toksinlerin tespit edilmesi tanıda önemli bir kriterdir. Toksijenik kültür ve sitotoksik yöntem, *C.difficile* saptamada en duyarlı yöntemdir. Ancak, her iki yöntem de uzun zaman almakta, uzman teknik personel ve özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Bu yüzden de çoğu laboratuvar, duyarlılığı düşük olmasına rağmen bunların yerine glutamat dehidrogenaz (GDH) ve toksinleri tespit eden enzim temelli immünolojik yöntemleri tercih etmektedir. Son dönemlerde ise direkt olarak dışkı örneğinden, *C.difficile* saptayan gerçek zamanlı PZR yöntemleri geliştirilmiştir (78).

Isı değişikliğiyle veya enzim etkisiyle toksin yapısındaki bozulma ihtimalinden dolayı dışkı örnekleri alınır alınmaz laboratuvara gönderilmelidir. Örnek, steril kuru kaptan ve herhangi bir transport sıvısı eklenmeden gönderilmelidir. Rektal sürüntü örnekleri toksin testi için tavsiye edilmemesine rağmen, ishalsiz ileuslu hastalarda örnek olarak kullanılabilir. Semptomların başlangıcında alınan bir veya iki örnek, genellikle tanı için yeterlidir.

### **2.8.1. Toksin Aramaya Yönelik Testler**

*Clostridium difficile* enfeksiyonu tanısı, klinik semptomları ile uyumlu hastaların dışkı örneklerinde enterotoksin ve sitotoksinin gösterilmesi ile doğrulanmaktadır. Bu amaçla doku kültürü, lateks aglütinasyon testleri, Enzim Linked İmmunoassay (ELISA) ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (34).

#### **2.8.1.1. Doku kültürü**

Dışkı örneklerinde 10 pg'lik sitotoksin miktarlarını saptayabilen doku kültürleri, toksin varlığını araştırmada altın standart olarak kabul edilir. Bu yöntemde, *Hep2*, *CHO*, *HeLa* ve *Vero* gibi hücre kültürleri kullanılmaktadır. Sıvı dışkı örnekleri santrifüje edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar hücre kültürü kaplarına eklenir. İnkübasyon sonrası, ışık mikroskopunda sitopatik etki

(yuvarlaklaşma) aranır. Nötralizan antikor (anti-*C.sordelli* antiserum) eklendiğinde bu sitopatik etki ortadan kalkması ile tanı konulur. Özgüllüğü ve duyarlılığı çok yüksek bir yöntemdir ancak uzun sürede sonuç alınması, uygulanmasının zor, zahmetli ve pahalı olması dezavantajıdır (79).

### **2.8.1.2. Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler**

Dışkı örneklerinde, toksin aramaya yönelik geliştirilmiş yöntemlerdir. İlk kez 1984 yılında *C.difficile* toksin A veya toksin A ve B'yi tespit etmek için kullanılmıştır (35). Bu amaçla geliştirilen birçok ticari kit mevcuttur. EIA ile yapılan çalışmalarda, duyarlılığın %63-99, özgüllüğün ise %75-100 arasında olduğu saptanmıştır (80). Dışkı örneklerindeki 100-1000 pg oranındaki toksin miktarını saptayabildiği için yalancı negatiflik oranı yüksektir. Bunun yanı sıra referans yöntem ile karşılaştırıldıklarında kısa sürede sonuç vermesi, teknik olarak kolay ve düşük maliyetli oldukları için günümüzde birçok klinik laboratuvarında kullanılan alternatif bir yöntemdir.

### **2.8.2. Lateks Aglütinasyon Testleri**

Toksin A ve Toksin B araştıran ticari, hızlı lateks aglütinasyon testleri bulunmaktadır. *Clostridium difficile* toksinleri dışında, hem toksin oluşturan hem de oluşturmayan *C.difficile* suşlarının bir yüzey protein olan GDH'yı tespit eden, EIA testleri de vardır (81). Bu yöntem ile dışkıda GDH varlığı gösterilebilir. Testin pozitif olması ile, suşun toksin üretimini saptayabilen ikinci yöntem ihtiyacı duyulur. Bu nedenle bazı laboratuvarlar ilk basamakta GDH testi olan iki basamaklı algoritma kullanmaktadır. Ancak şu an piyasada hem GDH, hem de toksini tespit eden ve 30 dakikada sonuç veren kitler mevcuttur.

### 2.8.3. Moleküler Yöntemler

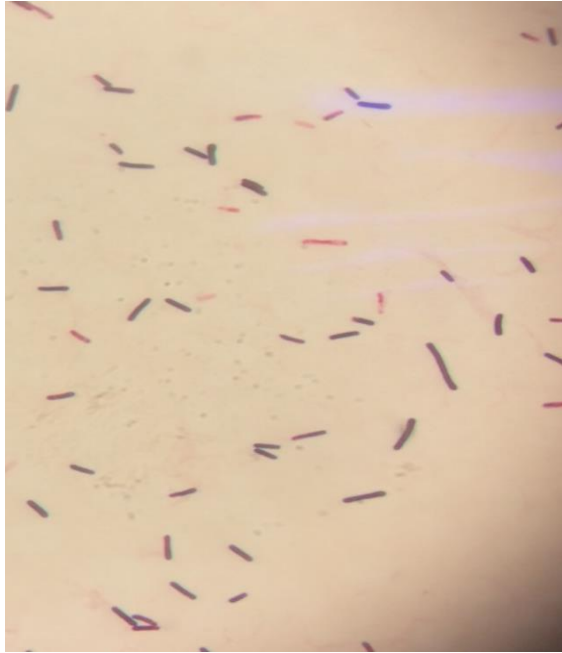
Bu yöntem bir enzim (polimeraz) aracılığıyla amplifikasyon sonucunda hasta örneklerindeki az miktardaki *C. difficile* DNA'sının amplifiye ederek saptanabilir hale getirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla DNA problemleri geliştirilmiştir. Toksik gene yöneltilmiş primerlerle yapılan farklı PZR temelli uygulamalar ile duyarlı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (76). Uygun çift primer seti kullanıldığında toksin A+/B+, toksin A-/B+, toksin A-/B- ve *binary +* suşlar birbirinden ayrılabilir. Direkt dışkı örneğinden çalışılır. DNA ekstraksiyonu amplifikasyon ve PCR işlemlerinin hepsi kartuş içerisinde gerçekleşir. 30 dk-2 saat gibi çok kısa bir sürede sonuç vermesi en büyük avantajıdır. Bunun yanı sıra, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan tanı yöntemleridir. Ancak maliyetinin yüksek ve kompleks oluşu ile birlikte uygun altyapı ve teknik deneyime ihtiyacın olması en büyük dezavantajıdır (82).

### 2.8.4. Kültür

*Clostridium difficile* enfeksiyonu tanısında kullanılan önemli yöntemlerden birisi kültürdür. Laboratuvarlarda genellikle *C.difficile* kültürü için sikloserin, sefoksitin ve fruktoz içeren ve seçici bir agar olan CCFA kullanılmaktadır. Bu besiyerine sporların üremelerini artırmak için taurakolat ve lizozim ilave edilebilmektedir. Kullanmadan önce agar plaklarını anaerobik ortamda tutmak bakterinin üremesini artırmaktadır. *Clostridium difficile* 24-48 saatlik anaerob ortamdaki inkübasyon sonunda agar yüzeyinde düz yüzeyli, sarı, buzlu cam görünümünde ve etrafında sarı hale olan koloniler oluşturur (Şekil 1). Bu kolonilerin Wood ışığı altında incelendiğinde sarı-yeşil floresan verdiği gözlemlenmektedir. Kolonilerin P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asitlerden dolayı kendilerine has at ahır kokusuna benzer bir kokusu vardır. Gram boyamada koloniler tipik olarak gram-pozitif veya değişken ve bazen de sporlu basil olarak

görülmektedir (Şekil 4). CCFA haricinde sikloserin mannitol kanlı agar (CMBA) ve çeşitli kan ürünlerinin ilavesi ile hazırlanmış CCFA'lar da *C.difficile* izolasyonunda kullanılmaktadır (60). Kültürün duyarlılığı yüksektir, ancak kültür işlemlerinin uzun zaman alması, işlemin pahalı olması ve üreyen kökenin toksijenik olup olmamasının ayırt edilememesi kullanımı kısıtlayan dezavantajları arasında sayılmaktadır. Bundan dolayı, özgülüğü %90'ın üzerinde olmasına rağmen çoğu laboratuvar rutinde kültürü tercih etmemektedir (83). İzole edilen *C.difficile* kökenlerinin toksin üretip üretmediğinin hücre kültürü sitotoksisite yöntemi veya PCR ile tespit edilmesi işlemine toksijenik kültür yöntemi adı verilmektedir (84).

**Şekil 4. Clostridium difficile basillerinin mikroskopik görünümü**



## 2.9. Tedavi

*Clostridium difficile*'ye bağlı ishal ve PMK tedavisinde ilk adım, mümkünse antibiyotik tedavisinin kesilmesi veya antibiyotik devamı kesinlikle gerekli ise düşük riskli antibiyotiklerle değiştirilmesi, hastanın dehidrate kalmasını önleyecek şekilde

sıvı elektrolit replasmanıdır. Bu durumda antiperistaltik tedavi, toksin birikimi ile mukoza harabiyetini artırabileceğinden kullanılmamalıdır (32,85).

*Clostridium difficile* kommensal bir bakteri olduğundan büyük bir konak savunması ile karşılaşmaz. Normal flora dengesini yeniden sağlama ve devam ettirme ile iyi bir konak savunması sağlamak, eğer mümkünse sürekli akım halinde antibiyotik tedavisi yapılmalıdır (86).

Hafif olgularda çoğu zaman sıvı ve elektrolit replasmanı yeterli olurken, ağır olgular tedavi gerektirebilmektedir. Antibiyotik tedavisinde ilk seçilecek ilaç metronidazol'dür (Oral, 4x250 mg/gün). Metronidazol tedavisine cevap vermeyen veya ilacı tolere edemeyen hastalarda, vankomisine (oral, 4x250 mg/gün) geçilmelidir (32). *C. difficile*'ye bağlı ishal vakalarında metronidazol veya vankomisin ile tedavi için endikasyonlar; *C. difficile* toksin testinin pozitif sonuçlandığı, kolit kliniğinin olduğu, ateş, lökositoz ve endoskopide karakteristik bulguların saptandığı, ciddi ishalin görüldüğü ve sebep olan ajanın kesilmesine rağmen ishalin devam ettiği veya esas enfeksiyonun tedavisi için antibiyotik tedavisinin devam etmesinin gerekli olduğu vakalardır (85).

*Clostridium difficile*'ye bağlı ishal kliniği çoğu durumda vankomisin veya metronidazole yanıt vermektedir. Ancak tedaviye uyumdaki sıkıntılar, alternatif tanı gibi durumlar ile birlikte ileus veya toksik megakolon gelişmesi durumunda ilacın hedef alana ulaşmasında sorun olabileceğinden, yetersiz tedavi cevabı gözlenebilir. İleus gelişen hastalar için antibiyotiğin kolon lümenine transport, oral vankomisinin daha yüksek dozları (günde 4 kere 500 mg) veya vankomisin ya da metronidazolün oral veya anal yolla uygulanması ile artırılabilir. Tedaviye cevapsız bazı ciddi vakalarda nadiren kolektomiye gidilebilir.

İdeal olarak *C. difficile* kolon lümenine sınırlı olduğundan, antibiyotik tedavisi oral olarak verilmelidir. Eğer intravenöz tedavi gerekli ise kolonda ilacın ulaşılan konsantrasyonları göz önüne alındığında, sadece metronidazolün etkin olduğu bulunmuştur. Tedaviden beklenen cevap, ateşin bir gün içerisinde, ishalin dört-beş günde düzelmesidir. Metronidazol gerek maliyetinin düşük olması, gerekse vankomisin kullanımının hastane kaynaklı vakalarda enterokoklarda vankomisin

direncini potansiyel olarak indüklenme riski nedeni ile ön planda tercih edilen tedavidir (85). Semptomatik iyileşme, 72 saat içinde görülmeye başlar, ishal ve enterokolit tablosu 10. günden sonra olguların %95'inde tamamen ortadan kalkar (32).

## 2.10. Relaps

Tedavinin tamamlanmasından sonra, hastaların %20-30 kadarında relapslar meydana gelebilmektedir, çünkü antibiyotikler *C. difficile*'nin sadece vejetatif formlarını öldürmektedir, sporlar ise antibiyotiklere dirençlidir. Aynı antibiyotik ile ikinci kez tedavi sıklıkla başarılıdır, ancak birden fazla relapslar bazı hastalarda bildirilmiştir. Organizma, hastanelerde özellikle enfekte hastalara yakın alanlarda (örn; yataklar, banyolar vb.) oldukça yaygın bulunduğu için hastalığı engellemek oldukça zordur. Bu sebeple organizma çevreyi aylarca kontamine edebilmekte ve nozokomiyal *C. difficile* salgınlarının başlıca kaynağı olabilmektedir (34).

Çalışmalar ve metaanalizler, özellikle son yıllarda klasik antibiyotik tedavilerinin yeterince etkin olmadığını ortaya koymaktadır. İlk öneri olarak sunulan oral metronidazol kullanımı ile yeterli sonuç alınmadığı belirtilmekte ve yeni alternatif yaklaşımlar aranması gündeme getirilmektedir. Oral teikoplanin, bu konuda etkili görülmektedir fakat glikopeptid direnci yönünden dikkatli olunması gereken bir antibiyotik olduğu unutulmamalıdır (77).

## 2.11. Korunma

*Clostridium difficile* hastane ortamında sorun yaratacak önemli bir ishal etkenidir. *C. difficile*'ye bağlı ishalin gelişiminin önlenmesi amacı ile bağırsak florasının bozulmasına sebep olan antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması ve yatan

bir hastada *C. difficile* vakası saptandığı zaman, çapraz enfeksiyonu önlemek amacı ile enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumun artırılması gereklidir (85).

Hastanelerde, *C. difficile* kaynaklı ishal olgularına bağlı olarak enfeksiyonun yayılması; temas izolasyonu önerileri, uygun çevre temizliği ve el yıkamaya uyum ile önlenebilmektedir. Hastanede klindamisin ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının kısıtlanması ile birlikte piperasilin-tazobaktam değişimi *C. difficile* ishallerini ve PMK olgularını önlemekte etkili bulunmuştur. Antibiyotik tedavisi ile birlikte probiyotik uygulamasının, (özellikle *S. boulardii*) antibiyotiğe bağlı ishal oluşumunu önlediği birçok çalışma ve metaanalizlerde gösterilmiş olmasına rağmen, rutin kullanım için yeni çalışmalara gereksinim olduğu bildirilmektedir. Özellikle riskli, immunsupresif, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *S. boulardii* kullanımı sonrası fungemiler gelişebilme riski olduğu hatırlanmalıdır (77).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1.Gereçler**

##### **3.1.1. Standart kökenler**

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

\* HU 10010 *C. difficile*, binary toksin (+) kontrol kökeni; Prof. Dr. Elizabeth Nagii (Macaristan) tarafından temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Besiyerleri**

1. *Clostridium difficile* Agar (Biomerieux)

2. %5 koyun kanlı agar (Biomerieux)
3. Skim milk (Oxoid, Birleşik Krallık)
4. Kıymalı besiyeri (Oxoid)

### **3.1.3. Kimyasal Maddeler**

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

### **3.1.4. PCR Malzemeleri**

1. 2X PCR Master karışımı (Fermentas)
2.  $\lambda$  DNA ( MBI Fermentas )
3. Agaroz (Prona)
4. 10xTBE tampon ( Tris, EDTA, Borik asit)
5. 1xTBE tampon ( Tris, EDTA, Borik asit)
6. DNaz ve RNaz içermeyen Beyaz pipet ucu (2  $\mu$ l ) (USA-Scientific)
7. DNaz ve RNaz içermeyen Sarı ve mavi pipet uçları (500,200,100  $\mu$ l) (Axygen)
8. PCR tüpü, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen, 0.2 ml (Axygen)
9. Mikrotüp, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen 1.5 ml (Axygen)
10. Lambda DNA (Fermentas)
11. Trizma Base (Sigma)
12. DNaz - RNaz içermeyen distile su ( MBI Fermentas )

13. *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* revers ve forward primerleri (IDT)
14. Eldiven ( Beybi )
15. Tek kullanımlık steril özeler (Peel here)

### **3.1.5. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri**

1. Tek kanallı otomatik pipetler (Pipetmen, Isotherm, Thermo)
2. Etüv (Memert)
3. Pasteur fırını (Memert)
4. Otoklav (Hirayama)
5. Buzdolabı (Arçelik)
6. 20 °C Dondurucu (Arçelik )
7. -80 °C Dondurucu (iShin)
8. Hassas terazi (Sartorius)
9. Kaba terazi (Scaltec)
10. Vorteks (Yellow line)
11. Su banyoları (Memert)
12. Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO RAD)
13. pH metre cihazı (Hana Instruments)
14. Mikrodalga fırın (Beko)
15. Elektforez cihazı (Biometra)
16. UV görüntüleyici (Vilber Lourmant)
17. Santrifüj (Hettich)
18. Kurutma kağıdı
19. Steril eküvyon
20. Cam balonlar
21. Cam tüpler
22. Süporlar
23. Pastör pipeti

24. Deney tüpü
25. Mikroskop
26. Anaerop jarlar

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Çalışma Kökenleri

Ağustos 2011 - Ağustos 2013 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örneklerinden izole edilen *Clostridium difficile* kökenleri (n=84) çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta kaynaklı kökenlerin kullanılması nedeniyle çalışmamız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirilmiştir. Kökenlerin tanımlanmasında geleneksel yöntemler ve Malditof Mass Spektrometri (MS) (bioMérieux) otomatize sistemleri kullanılmıştır. Kökenlere ait hastaların bilgileri (örneğin gönderildiği birim, yaş, cinsiyet, örneğin alındığı tarih gibi) hastanemizin bilgisayar sistemi (HYBS) kullanılarak elde edilmiştir.

Çalışma kökenleri ve kontrol kökenleri gliserollü skim milk stok besiyeri içeren tüplerde, -80°C'de saklanmıştır. Genotipik ve fenotipik karakterlerinin araştırılması için kökenler -80°C'den alınarak, %5 koyun kanlı agar'a pasajlanmıştır.

Laboratuvarımıza toksin isteği ile gelen dışkı örnekleri, ayrıca poliklinikten gelen ve lökosit saptanan tüm dışkı örnekleri aynı şekilde işleme alınmıştır. Toksin sonucu ne olursa olsun izole edilen her bir *C. difficile* kökenleri için klinik semptomlar, biyolojik parametreler, risk faktörleri, (antimikrobiyal tedavi, gastrointestinal prosedürler, önceki hastane yatışları) endoskopik ve radyolojik tetkik, tedavi ve sonuçlarını içeren klinik data formları doldurulmuştur.

### 3.2.1.1. Dahil edilme kriterleri:

- Diyare nedeniyle polikliniğe başvuran, klinik semptomlarından dolayı enteropatojenik mikroorganizmalar için dışkı kültürü istenen, örneklerinden lökosit saptanan ve *C.difficile* izole edilen tüm hastalar.
- Hastanede yatan veya polikliniğe başvuran, klinik semptomlarından dolayı *C. difficile* infeksiyonlarından şüphelenilen ve dışkı örneklerinden *C. difficile* toksin A (*tcdA*) ve/veya B (*tcdB*) pozitif saptanan tüm hastalar.
- Hasta başına sadece 1 örnek kabul edilmiştir.

### 3.2.1.2. Dışlama kriterleri:

2 yaşın altındaki hastalar çalışmaya alınmamıştır.

## 3.2.2. Dışkı örneklerinden toksin A ve toksin B saptanması

İşleme alınan dışkı örneklerindeki *Clostridium difficile* kökenlerine ait toksin A ve toksin B otomatize edilmiş bir serolojik test kullanılarak saptanmıştır (VIDAS, Biomerieux, France). Dışkı örnekleri üretici firmanın önerisi doğrultusunda ilk önce testin solüsyonunda homojenize edilerek, 12.000 rpm'de en az 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra test kitine santrifüj edilen örnekten 300 µl süpernatant yerleştirilerek test çalışılmış, toksin A ve toksin B varlığı tespit edilmiştir.

## 3.2.3. Dışkı örneklerinden *C. difficile*'nin izolasyonu ve tanımlanması

Dışkı örnekleri önce *C.difficile* için seçici bir besiyeri olan *Clostridium difficile* agara (CLO, Biomerieux, France) ve seçici olmayan besiyeri olan Hektoen

Enterik agara, (Biomerieux, France) ekilmiştir. Ardından alkol şok uygulaması için örneklerden 1:1 dışkı-alkol karışımı hazırlanıp, 30-60 dk oda ısısında bekletildikten sonra bu karışımdan *Clostridium difficile* agara (CLO, Biomerieux, France) ekimi yapılmıştır. Plaklar aneorobik ortamda 24-48 saat inkube edilip, inkübasyon sonunda *Clostridium difficile*'den şüphelenilen koloniler saflaştırmak için seçici olmayan %5'lik koyun kanlı besiyerine ekilmiştir. Üreyen *C.difficile* kolonilerine 365 nm ultraviole ışığı altında bakılmış ve sarı-yeşil flöresans yaptığı gözlemlenmiştir. Kolonilerinden preparat hazırlanmış ve subterminal sporlu gram pozitif basiller görülmüştür. Kütle spektrometre teknolojisi olan VITEK MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight - MALDI-TOF) (Biomerieux, France) ile doğrulaması yapılmış ve %99.9 güvenilirlik oranıyla *Clostridium difficile* olarak tanımlanmıştır.

Üreyen *C.difficile* kolonilerinden sıvı besiyeri olan beyin kalp infüzyon (BHI) agara besiyerine ekimi yapılmış ve 48 saatlik inkübasyon sonunda bu karışımdan Enzim Linked Fluorescent Assay (ELFA) (VIDAS, Biomerieux, France) yöntemiyle toksin varlığı araştırılmıştır.

#### **3.2.4. *Clostridium difficile* kökenlerinden DNA izolasyonu**

*Clostridium difficile* DNA izolasyonu için saflaştırılmış *Clostridium difficile* kolonileri kullanılmıştır. Bu kolonilerden DNAaz ve RNAaz içermeyen 200 µl suda 1-2 Mc-farland bulanıklığında bir süspansiyon oluşturulmuş ve 95°C'de 20 dk kaynatılarak hücre duvarlarının parçalanması sağlanmıştır. 10.000 devirde 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısım bakteri DNA'sı olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5. PZR kullanılarak toksin genlerinin saptanması**

Toksin A (*tcdA*), toksin B (*tcdB*), ve *binary* toksin (*cdtA,cdtB*) genleri spesifik primerler kullanılarak PZR metoduyla araştırılmıştır. PZR için kullanılan primerler (Tablo 2) ve reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir.

**Tablo 2.Toksin genlerine özgü primerler**

Hedef	Primer	Sequence 5'-3'	Ref.
Toxin A	tcdA-F	5'-GGACATGGTAAAGATGAATTC -3'	Kato N (87)
	tcdA-R	5'-CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT -3'	
Toxin B	tcdB-R	5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	
	tcdB-F	5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	
<i>Binary</i> toxin	CdtA-R	5'-AGGATTATTTACTGGACCATTTG-3'	Stubbs S (38)
	CdtA-F	5'-TGAACCTGGAAAAGGTGATG-3'	
	CdtB-R	5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC-3'	
	CdtB-F	5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-3'	

***tcdA* genleri için PZR reaksiyon koşulları :**

Reaksiyon karışımı:  
PCR Master karışımı 25 µl  
TcdA-F 1 µl  
TcdA-R 1 µl  
Distile su 18 µl  
DNA 5 µl

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

Toplam hacim: 50 µl

***tcdB* genleri için PZR reaksiyon koşulları:**

Reaksiyon karışımı:

Reaksiyon koşulları:

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

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

} 35 döngü

Toplam hacim: 50 µl

### **Binary toksin *cdtA* geni için PZR reaksiyon koşulları:**

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

Reaksiyon koşulları:  
94°C'de 45 sn  
52°C'de 1 dk  
75°C'de 80 sn

} 35 döngü

Toplam hacim: 50 µl

### **Binary toksin *cdtB* geni için PZR reaksiyon koşulları :**

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

Reaksiyon koşulları:  
94°C'de 45 sn  
52°C'de 1 dk  
75°C'de 80 sn

} 35 döngü

Toplam hacim: 50 µl .

### **3.2.6. Veri analizi ve raporlama**

Veriler SPSS Windows version 15.0 yazılımı ile analiz edilecektir. Pearson ki-kare, Fisher's exact, Kolmogorov-Smirnov, Student-t testi, ANOVA, Kruskal

Wallis veya Mann-Whitney U testleri uygun olarak kullanılmış ve  $p < 0.05$  olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3.2.7. Etik Kurul Onayı

09.2012.0065 protokol no'lu çalışmamız, Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek, B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/120118649 sayılı yazısı ile onaylanmıştır.

## 4. BULGULAR

İki yıllık zaman diliminde 2740 farklı hastadan gelen toplam 4880 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların 84'ünde ( %3.1) *C. difficile* kökeni izole edilmiştir. *Clostridium difficile* izole edilen bu hastaların 40'ı ( % 47. 6) erkek, 44'ü (%52.4) kadındır. Yaş ortalaması 30.45 ( $\pm$ standart sapma,  $\pm$ 27.94) olarak saptanmıştır, hastaların 40'ı (%47.6) 2-18 yaş grubunda, 30'u (35.7) 19-65 yaş grubunda, 14'ü (%16.7) ise 65 yaş üstü grubunda yer almaktadır.

Örnekleri işleme alınan hastaların bölümlere göre dağılımları şöyledir: 1747'si (%63.8) polikliniklerden, 473 (%17.2) dahili bilimlerden, 280'i (%10.2) pediatri kliniğinden, 140'ı (%5.1) yoğun bakım ünitesinden, 100'ü (%3.6) ise cerrahi bilimlerden gelmiştir (Tablo 3).

Bölgümlere göre *C.difficile* kökeni izole edilen hastaların sayısı ise şöyledir; 24'ü pediatri, 22'si dahili bilimler, 9'u cerrahi bilimler servislerinden, 11'i ise yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardır. Poliklinik hastalarının ise 18'inde *C.difficile* izole edilmiştir (Tablo 3). *Clostridium difficile* izole edilme sıklığı değerlendirildiğinde poliklinik hastalarının %1'inde (18/1747), hastanede yatan hastaların ise %6.6'sında (66/993) bakteri izole edilmiştir.

**Tablo 3. Bölümlere göre dışkı örneği gönderilen hastaların dağılımı ve *Clostridium difficile* izole edilen örnek sayısı**

Örneklerin geldiği bölümler		Örneklerin bölümlere göre dağılımı hasta sayısı ve oranı (%)	Bölümlere göre <i>C.difficile</i> izole edilen hasta sayısı	
Poliklinik		1747 (63.8)	18	
SERVİSLER	Dahili Bilimler	473 (17.2)	22	66
	Pediyatri	280 (10.2)	24	
	Cerrahi Bilimler	100 (3.6)	9	
	Yoğun Bakım	140 (5.1)	11	
TOPLAM		2740 (100)	84	

Olguların 39'unda (%46.4) ishal dışında herhangi bir semptom bulunmamıştır. Geri kalan hastaların ise ishalle birlikte 12'sinde (%14,3) ateş, 21'inde (%25.0) karın ağrısı, 12'sinde (%14.3) ise her iki semptom da bulunmaktadır. İshal süreleri açısından incelendiklerinde ise hastaların 14'ünde (%16.7) ishal 2 günden daha az, 43'ünde (%51.2) 2-7 gün ve 27'sinde (%32.1) ise 7 günden daha uzun seyretmiştir. Dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde; hastanede yatan hastalardan gelen örneklerin 30'unda (%35.7) lökosit saptanmazken, 14'ünde (%16.7) nadir, 22'sinde (%26.2) orta yoğunlukta, 18'inde (%21.4) ise yoğun olarak lökosit saptanmıştır. Bir hastanın dışkı örneğinde yoğun, 7 hastada nadir eritrositler görülmüş, diğer 76 (%90.5) örnekte ise eritrosit saptanmamıştır. *Clostridium difficile* izole edilen 84 hastanın dışkı örneklerinin hiçbirinde başka bir enteropatojen ürememiştir.

*Clostridium difficile* izole edilen hastaların antibiyotik kullanımları sorgulandığında; hastaların 46'sında antibiyotik kullanma öyküsü bulunmaktadır. Hastaların 16'sında (%34,7) tekli, 18'inde (%39,1) ikili ve 12'sinde (%26,0) ise üç ve üzeri antibiyotik kullanımı söz konusudur. Kullanılan antibiyotikler içerisinde en sık olarak 23'ünde (%27.4) sefalosporinler, 19'unda (% 22.6) penisilin grubu antibiyotikler ve 16'sında (%19.0) karbapenemler gibi betalaktam grubu antibiyotiklerin kullanıldığı göze çarpmaktadır. Bunun dışında florokinolonlar 9, aminoglikozidler 8 ve glikopeptidler ise 7 hastada kullanılmıştır (sırasıyla; % 10.7,

% 9.5 ve % 8.3). İkili antibiyotik olarak 3 hasta penisilin-kinolon, 2 hasta penisilin-aminoglikozid ve 2 hasta sefalosporin-aminoglikozid olmak üzere en sık kombinasyonun beta laktam grubu antibiyotiklerle kinolon veya aminoglikozidler arasından seçildiği görülmektedir. Üç ve üzeri antibiyotik kullanan hastalar için ise sıklıkla betalaktam-karbapenem-glikopeptid, karbapenem-glikopeptid-aminoglikozid, kolistin-karbapenem-linezolid veya glikopeptid-karbapenem-kinolon gibi kombinasyonların seçildiği görülmektedir.

Çalışmaya alınan klinik örneklerden izole edilen 66 *C.difficile* kökenin 61'inde toksin varlığı saptanmıştır. Polikliniklerden gelen örneklerden izole edilen 18 *C.difficile* kökeninin ise 15'inde toksin pozitifliği saptanmıştır.

Toksin pozitif *C.difficile* kökenlerinin izole edildiği örneklerin 51'nde (%67.1) lökosit varlığı görülmüşken, toksin negatif örneklerin 3'ünde (%37.5) lökosit varlığı saptanmıştır. Ancak toksin pozitifliğiyle lökosit varlığı arasında herhangi bir bağlantı saptanmamıştır.

Çalışmaya alınan toksin pozitif poliklinik ve klinik kaynaklı hastaların ayrı ayrı risk faktörleri incelenmiştir. Dışkılarından toksin pozitif *C.difficile* üretilen 15 poliklinik hastasının daha genç bir hasta grubundan (yaş ortalaması 21) olduğu gözlenmiştir. Toksin pozitif *C.difficile* izole edilen 61 klinik hastasının ise yaş ortalaması 34 olarak hesaplanmıştır. Poliklinik hastalarından 2-18 yaş grubuna ait hasta sayısı 10 (%66.6), 18-65 yaş grubuna ait hasta sayısı ise 5 (%33.3)'dir. İleri yaş olarak hesaplanan >65 yaş grubuna sahip hasta ise bulunmamaktadır. Klinik hastalarından ise 2-18 yaş grubuna ait hasta sayısı 26 (%42.6), 18-65 yaş grubuna ait hasta sayısı 21 (%34.4), 65 yaş üstü hasta sayısı ise 14 (%22.9) olarak saptanmıştır (Tablo 4).

Hastanede yatan, toksijenik *C.difficile* izole edilen hastalarda en fazla görülen risk faktörü 57 (%93.4) hastada görülmesiyle hastanede uzun süre yatış olduğu görülmektedir. Kronik hastalık varlığı 47 (%77), uzun süre antibiyotik kullanımı 39 (%63.9), çoklu antibiyotik kullanımı 28 (%45.9), antineoplastik ilaç kullanımı 16 (%26.2), ileri yaşlılık 14 (%22.9), NG tüp veya endoskopi uygulanması 19 (%31.1) diğer sık görülen risk faktörleri arasında yer almaktadır (Tablo 4).

Son bir yılda hastaneye yatış öyküsü olmayan ve toplum kaynaklı CDE olabileceği düşünülen 15 poliklinik hastasının risk faktörleri irdelendiğinde: ensik görülen risk faktörleri, 4'er hastada görülmesiyle antibiyotik kullanımı ve kronik hastalık varlığıdır. Kronik hastalıkların ikisi inflamatuvar barsak hastalığı (n:2), diğerleri ise kronik böbrek yetmezliği (n:1), HSP (n:1)'dir. Antiülser tedavi, malignite ve kemoteropatik tedavi diğer görülen risk faktörlerindedir (Tablo 4).

**Tablo 4. Toksik Clostridium difficile izole edilen hastane ve poliklinik hastalarının çeşitli risk faktörlerinin değerlendirilmesi**

		Klinik örnekler (n:61) Hasta sayısı- Oran (%)	Poliklinik k. örnekler (n:15) Hasta sayısı- Oran (%)
<b>Risk faktörleri</b>			
<b>Yaş ortalaması</b>		<b>34.1</b>	<b>21.0</b>
<b>Yaş</b>	2-18	26 (42.6)	10 (66.6)
	18-65	21 (34.4)	5 (33.3)
	>65	14 (22.9)	0
<b>Ab. Kullanımı</b>	Uzun süre ab. kullanımı	39 (63.9)	4 (26.6)
	Çoklu ab. kullanımı	28 (45.9)	1 (6.6)
<b>Kr. hastalık varlığı</b>	K. inflamatuvar barsak hast.	2 (3.3)	2 (13.3)
	Diğer	45 (73.7)	2 (13.3)
<b>Uzun süre hastane yatışı</b>		57 (93.4)	
Yoğun bakım ünitesinde yatış		12 (19.7)	
<b>Antineoplastik ilaç kullanımı</b>		16 (26.2)	2 (13.3)
<b>Antiülser tedavi</b>		13 (21.3)	1 (6.7)
<b>Malignite</b>		15 (24.6)	2 (13.3)
<b>KBY</b>		4 (6.6)	1 (6.7)
<b>Antiülser tedavi</b>		13 (21.3)	1 (6.7)
<b>NG tüp, endoskopi</b>		19 (31.1)	0
<b>NSAİİ kullanımı</b>		3 (4.9)	0
<b>Karın içi cerrahi</b>		12 (19.7)	0
<b>HIV</b>		2 (3.3)	0

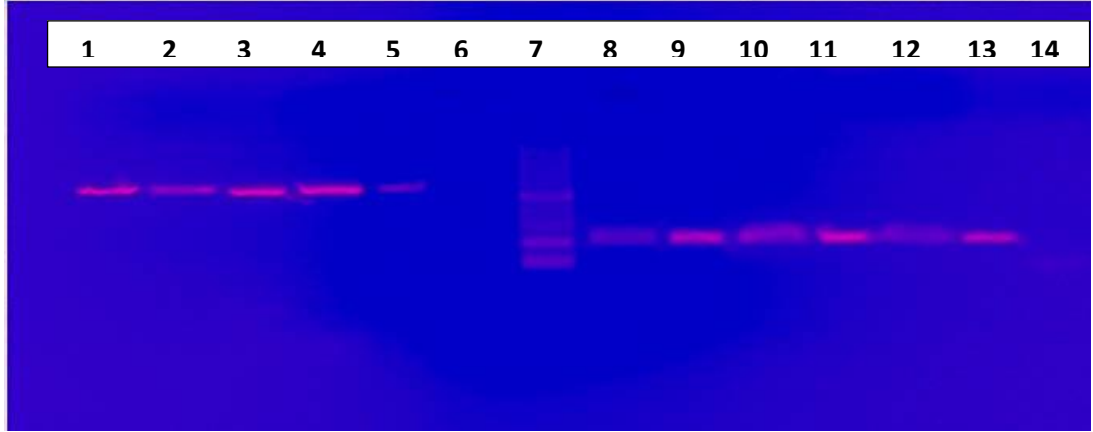
*Clostridium difficile* izole edilen 84 hastanın 8'inin toksin bakılması istemi bulunmadığı ve dışkılarında lökosit saptandığı için kültür işlemine alındığı görülmüştür. Toksin çalışılması isteği olan 76 hastanın dışkisından ELFA yöntemiyle toksin varlığı araştırıldığında 38'inde toksin saptanmıştır. Toksikjenik kültür işlemi sonrası kültür filtratları toksin varlığı yönünden ELFA yöntemiyle yeniden araştırıldığında, 84 *C.difficile* izolatının 74'ünde (%88.1) toksin pozitifliği saptanmıştır. Toksin bakılması istemi bulunmayan 5'i poliklinik, 3'ü hastanede yatan toplamda 8 hastanın tamamında toksin pozitifliği saptanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 5. Dışkıdan ve kültür filtratından ELFA yöntemiyle toksin saptanmasının PZR ile karşılaştırılması**

	<b>toksin (+)</b>	<b>toksin(-)</b>	<b>Toksin isteği olmayan</b>
<b>ELFA (dışkı)</b>	38	38	
<b>ELFA (kx filtratı)</b>	74	10	8
<b>PZR</b>	76	8	8

Seksen dört *C. difficile* kökeninde PZR yöntemiyle toksin genleri araştırıldığında, 76 hasta izolatında (%90.5) Toksin A ve Toksin B genleri pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, çalışmamızda toksin A-/B+ olan varyant bir suşa saptanmamıştır (Şekil 5).

**Şekil 5. Toksin A+/B+ bazı hastaların gen durumunun agaroz jeldeki görünümü**



**1-4:** *tcdA* geni (+) hastalar

**8-12:** *tcd B* geni (+) hastalar

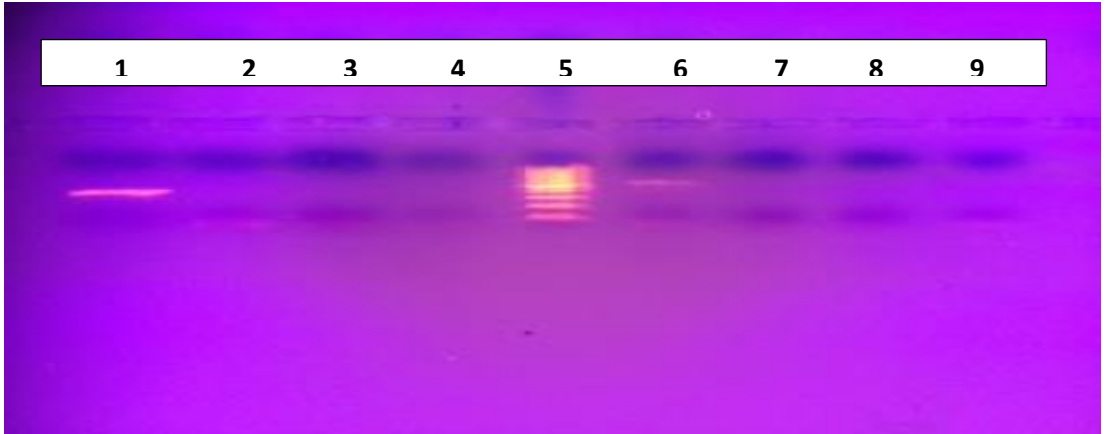
**5,13:** (+) kontroller (NCTC 11223 *C.difficile* toksin A/B + kontrol köken)

**6,14:** (-) Kontroller

**7:** DNA ladder

İzolatların hiçbirisinde *binary* toksin geni saptanmamıştır (Şekil 6).

**Şekil 6. Örnek kökenlerin *cdt A* ve *cdt B* gen durumunun agaroz jeldeki görünümü**



**1,6:** *cdt A* ve *cdt B* (+) kontrol kökenleri (HU 10010 *C.difficile*, *binary* toksin (+) kontrol kökeni)

**2-3,7-8:** *cdt A* ve *cdt B* geni (-) örnek hastalar

**5:** DNA ladder

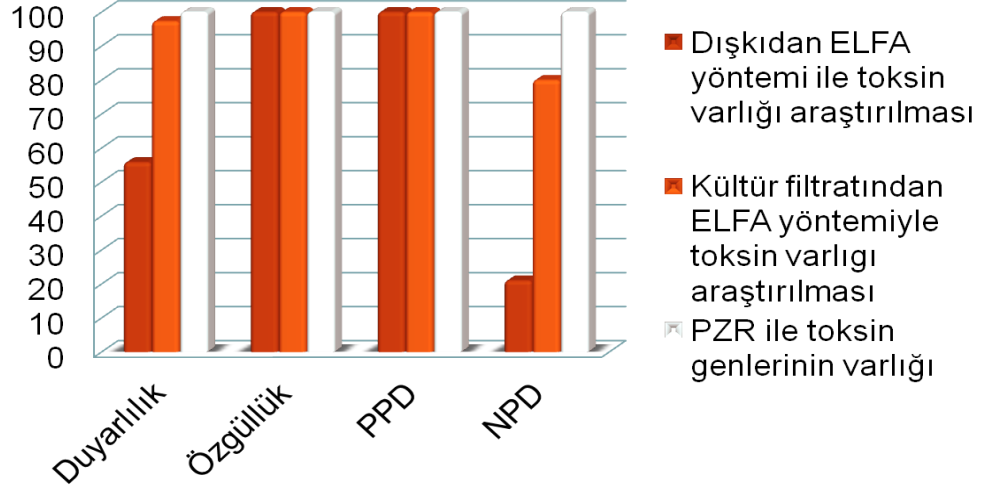
**4,9:** (-) kontrol

Dışkıdan toksini belirlemek için kullanılan ELFA yönteminin, kökenlerden direkt çalışılarak toksin A ve toksin B genini saptayan PZR' ye göre duyarlılığı % 55.8, özgüllük %100, PPD % 100 ve NPD de % 21 olarak tespit edilmiştir (Şekil 7) (Tablo 6).

Çalışmamızda toksijenik kültür ile toksin varlığını saptamada ELFA yönteminin PZR yöntemine göre duyarlılığı % 97.3, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri (PPD) % 100 ve negatif prediktif değeri (NPD) %80 dir (Şekil 7) (Tablo 6), Bu değerler direkt dışkı örneğinden toksin saptamada kullanılan aynı yönteme göre daha yüksek ve PZR'ye daha yakın bulunmuştur.

**Tablo 6. Toksini dışkıdan veya kültür filtratında saptamada ELFA yönteminin duyarlılık ve özgüllüklerinin PZR sonuçlarıyla karşılaştırılması**

	Pozitiflik	Negatiflik	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD	NPD
<b>ELFA Dışkı (76)</b>	38	38	55.8	100	100	21
<b>ELFA Kx filtratı (84)</b>	74	10	97.3	100	100	80
<b>PZR (84)</b>	76	8	100	100	100	100



Şekil 7. Farklı durumlarda ELFA ile toksin saptanması ve toksin gen varlığının PZR ile belirlenmesi; yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada hastanede yatan hastalardan, *C. difficile* toksin varlığının araştırılması isteğiyle laboratuvara gönderilen ve polikliniklerden ishal etkeni patojenlerin belirlenmesi için kültür isteminde bulunulan, direk bakısında lökosit tespit edilen dışkı örnekleri ele alınmıştır. İki yıllık zaman diliminde 2740 hastadan toplam 4880 dışkı örneği çalışılmış, 84 hastadan (% 3.1) *C. difficile* kökeni izole edilmiş ve bu kökenlerin de 76'sında toksin A ve toksin B genleri saptanmış, ancak *binary* toksin genlerine rastlanmamıştır.

*Clostridium difficile* enfeksiyonu tüm dünyada hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ciddi bir sağlık sorunudur. Bu bakteriye bağlı enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde belirgin bir artış gözlenmektedir (88-90). Kanada, ABD ve Avrupa ülkelerinde son on yılda CDE insidansında 2-4 misli artış olduğu bildirilmiştir (90- 92). Birleşik Krallık'tan yayımlanan verilere göre, CDE'ye bağlı ölümlerde belirgin artış olduğu, ölüm oranının metisiline dirençli *Staphilococcus aerus'* a bağlı ölüm oranına göre 5 misli daha fazla olduğu tespit edilmiştir (9, 92).

Ülkemizde yapılan, *C. difficile* toksin varlığını araştıran bazı çalışmalar farklı oranlarda toksin pozitifliği belirlemişlerdir. Büyükbaba ve ark. (93), İmmunoCard Toksin A (Meridian Diagnostic) yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada 360 hastanın dışkı örneğinde toksin A varlığını % 4.7, daha sonraki dönemde ELİSA yöntemiyle yaptıkları başka bir çalışmada ise 400 hastada Toksin A/B varlığını %12 olarak saptamışlardır. Aygün ve ark. (94) ise hastalarının dışkı örneklerinde, ELISA yöntemiyle toksin A/B pozitiflik oranını % 3.2 bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi hem poliklinik hem de hastanede yatan hastaların ele alındığı bir çalışmada; Altındış ve ark. (95) toplam 91 hastanın 13'ünde (%14.3) toksin A/B'yi pozitif olarak belirlemişlerdir.

Hastanemizde 1996 yılında, Söyletir ve ark.'nın (96) yapmış oldukları bir

çalışmada, *C.difficile* kolonizasyon oranı % 6.9 (14/202) bulunmuştur. Daha sonra 2006-2008 yılları arasında Deniz ve ark.'nın (35) gerçekleştirdikleri çalışmada ise 633 hastaya ait dışkı örneğinin 30'unda (%4.7) "ImmunoCard Toxins A&B EIA" kiti ile toksin A/B tespit edilmiştir. Aynı zamanda çalışmaya alınan tüm dışkı örneklerine toksijenik kültür uygulanmış, hastaların 50'sinden *C.difficile* üretilmiş, ve bu kökenlerin 36'sında (%5.7) toksin A ve toksin B genleri tespit edilmiş, *binary* toksin geni bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda, 2740 hastanın 84'nde (%3.1) *C.difficile* kökeni izole edilmiş kökenlerin 76'sında (%2,8) toksinA/B gen pozitifliği saptanmıştır. Hastanemizde daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında toksijenik *C.difficile* oranında belirgin bir azalma varmış gibi görülmektedir. Ancak hasta grubumuz göz önüne alındığında, örneklerin % 63.8'inin poliklinik hastalarından ishal etkeni patojen bakterilerin araştırılması amacıyla gönderildiği, bu hastaların ise sadece %1'inde (18/1747) *C. difficile* üretildiği, dolayısıyla genel ortalamanın düşük olması poliklinikten gelen örnek sayısının fazla olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Nitekim, hastanede yatan ve toksin çalışılması isteğiyle gönderilen dışkı örneklerinde, *C.difficile* izole edilme oranı % 6,6 (66/993) bulunmuştur. Hastanede yatan hastalarda *C.difficile* bulunma oranımız, farklı yöntemler kullanıldığı için ülkemizin diğer merkezlerindeki verileriyle kıyaslama pek sağlıklı olmayacaktır, ancak hastanemizin daha önceki verileriyle kıyaslandığında sonuçlarımızda belirgin bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla bu durum hastanemizde CDE oranında önemli bir artışın olmadığına işaret etmektedir.

Son yıllarda pek çok dünya ülkesinde CDE artışına paralel olarak hastanelerde, *C.difficile* ribotip 027 NAP1/BI ve *tcdA-/tcdB+* gibi birtakım varyant izolatlarla bağlı salgınlar da yüksek oranda görülmüştür. Yüksek mortaliteye neden olan bu virülan kökenlerin, ülkeler arasında yaygınlığı değişkenlik göstermektedir (52, 97, 98). Bizim bilgimize göre, şu ana kadar ülkemizden varyant kökenlerin ve *binary* toksin pozitif kökenlerin varlığını bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmıştır. Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 14 Avrupa ülkesinin yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, toksijenik 354 suşun % 24.3'ü varyant gene sahip ve bu toksijenik kökenlerin %17.2'si de *binary* toksin gen ekspresyonu sergileyen suşlar

olduğu gösterilmiştir. Ancak, ÷lkemizden g÷nderilen izolatların hiçbirinde bu genlere rastlanmamıştır (99). Uludağ Üniversitesi'nden Ergen ve ark. (100) tarafından geręekleřtirilen, hastane kaynaklı ishallerde ve CDE'de *binary* toksin pozitifliği saptanmamıştır Aynı şekilde, hastanemizde daha önce Deniz ve ark.'ın (35) yaptığı çalışmada, *C.difficile* izolatlarının hiçbirinde *binary* toksin veya varyant genine rastlanmamıştır.

Klasik bilgilere göre *Clostridium difficile* enfeksiyonları hastane kaynaklıdır. Ancak toplumdan kazanılmış CDE oranında da belirgin bir artış olduğu ve sanılandan daha yaygın hale geldiği vurgulanmaktadır (101). Farklı ÷lkelerden, toplumdan kazanılmış % 11-28 oranlarında CDE bildirilmiştir (102, 103). ABD'de yapılmış güncel çalışmalarda toplum kaynaklı CDE insidansı 100.000 vaka yılı başına 6.9-46 olarak belirlenmiştir (9). Toplum kaynaklı CDE olgularını gözden kaşırmamak adına ESCMID tarafından önerilen algoritmanın uygulanması önemlidir (78). ESCMID'in önerisine göre; infektif ishalleri olan ve herhangi bir enteropatojen bakteri retilenemeyen olgularda, hastanın yaşına, daha önce antibiyotik alıp almadığına, altta yatan ölümcül bir hastalığının bulunup bulunmadığına, başka bir tedavi uygulanıp uygulanmadığına, hastane veya toplum kaynaklı olup olmadığına bakılmaksızın şekilsiz dışkuların CDE yönünden incelenmesi gerekir. Laboratuvarımızda yapılan uygulamaya göre direk bakısında lökosit bulunan dışkı örnekleri, klinisyen isteği gözetilmeksizin diğer enterik patojenlerin yanısıra toksijenik *C. difficile* yönünden de araştırılmaktadır. Toksik C.*difficile* yönünden pozitif sonuç alındığında klinisyen bilgilendirilir, böylece klinik öneme sahip olabilecek olguların gözden kaşmaması sağlanır. Yaptığımız bu çalışmada, 1747 poliklinik hastasının 15'inde (yaklaşık %1) toksijenik *C.difficile* tespit edilmiştir. Her ne kadar toplum kaynaklı CDE oranımız kk gibi görülse de ölümlerle sonuçlanabilecek bu enfeksiyonun atlanmaması yönünden önemli bir uygulama olduğuna inanıyoruz.

Son yıllarda pediatri hastalarında CDE görülme sıklığında belirgin artışlar kaydedilmiştir. Normalde sağlıklı yenidoğanların yarısı veya daha fazlasında asemptomatik *C. difficile* taşıyıcılığı bulunmaktadır, bu oran iki yaşını tamamlayan çocuklarda %4'e kadar azalmaktadır. Dışkı analizinde toksijenik *C.difficile* varlığı

her zaman CDE olduğunu göstermez, özellikle bir yaşın altındaki bebeklerde toksin pozitifliğinin klinik bulgularla destekleniyor olması gerekir (104). Ülkemizde Oğuz ve ark.'ın gerçekleştirdikleri çalışmada, pediatri hastalarında hastane kaynaklı ishal gelişmesinde *C. difficile* önemli bir role sahip bulunmuştur (105). Bizim çalışmada iki yaşını tamamlamış ve daha ileri yaşa sahip olanlar değerlendirmeye alınmıştır. Gerek hastanede yatan gerekse poliklinikten gelen örneklerin çoğunluğu 2 ila 18 yaşındaki hastalardan alınmıştır.

Antibiyotik kullanımının, CDE oluşumunda en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (85). Çalışmamızda gerek hastane gerekse poliklinik hastalarından toksijenik *C. difficile* izole edilenlerde, risk faktörlerinden antibiyotik kullanımı ilk sıralarda gelmektedir. *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal gelişmiş hastaların kullandıkları antibiyotikler, ülkeden ülkeye hatta aynı ülkede hastaneler arasında farklılıklar göstermektedir. Hastanemizde daha önce yapılan çalışmada, en sık betalaktam grubu antibiyotiklerin kullanıldığı gösterilmiştir (35). Bu çalışmada antibiyotik kullanım oranı %63.9 bulunmuştur ve betalaktam antibiyotikler (*C. difficile* kökeni izole edilmiş hastaların %27.4'ünün sefalosporinler, %22.6'sının penisilin grubu ve %19 karbapenemler) birinci sırada yer almaktadır. Ayrıca, çoklu antibiyotik kullanım oranı %45.9 tespit edilmiştir.

*Clostridium difficile* enfeksiyonunu kolaylaştıran risk faktörlerinden bir diğeri uzun süre hastanede yatış öyküsüdür (91, 97). Bu çalışmada hastanede yatan hastalarda uzun süreli hastanede yatmanın yanısıra, yoğun bakım ünitesinde bulunma, malignite varlığı, nazogastrik tüp, endoskopi ve batin içi cerrahi girişimi, antineoplastik, antiülser tedavisi diğer önemli virülans faktörleri de bulunabilmektedir. Toksik *C. difficile* tespit edilen poliklinik hastalarında bulunan risk faktörleri arasında kronik barsak hastalıkları, malignite ve antineoplastik ilaç kullanımı önemli yere sahiptir (Tablo 4).

Toksijenik *C. difficile*'yi saptamak için izole edilen suşlardan veya dışkı örneklerinden yapılan sitotoksik analizler, toksin A/B'nin saptanmasında altın standart olarak kabul edilir (106). Ancak, sitotoksik analizler için doku kültürü laboratuvarına gereksinimin duyulması, yöntemin zor, zahmetli, zaman alıcı ve pahalı olması nedeniyle, dünyada pek çok laboratuvarında, özgüllüğü ve duyarlılığı

daha düşük ancak kullanımı kolay, daha hızlı sonuç veren EIA tercih edilmektedir (117). Hastanemiz rutin laboratuvarında da dışkıda *C. difficile* toksini varlığı EIA ile araştırılmış, yıllar içinde çeşitli EIA kitleri denenmiştir. Deniz ve ark. (35) 2008 yılında. “ImmunoCard Toxins A&B EIA” kiti ile yaptığı çalışmada, dışkı örneklerinden toksini belirleme açısından testin duyarlılığı %85.7, özgüllüğü %100, PPD’si %100, NPD’si ise %99 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda, gerek dışkıdan gerekse toksijenik kültürün, kültür filtratından toksin varlığı günümüzde rutinde uygulanan ELFA (VIDAS, Biomerieux) yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda, toksin varlığının araştırılması isteğiyle gelen dışkı örnekleri değerlendirildiğinde, dışkıda toksin pozitif bulunup, *C. difficile* izole edilemeyen örnek olmamıştır. İzolatlarından PZR ile toksin geni saptanan 76 örneğin 38’inde (%50) toksin A/B pozitif saptanmıştır. Buna göre testin dışkıda toksini belirleme duyarlılığı % 55,8, özgüllüğü %100, PPD % 100 ve NPD ise % 21 olarak tespit edilmiştir. Ancak toksin geni bulunan izolatların kültür filtratlarından toksin varlığı araştırıldığında, PZR yöntemine göre aynı testin duyarlılığı % 97.3, özgüllüğü % 100, PPD’si % 100 ve NPD’si %80 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki ELFA (VIDAS, Biomerieux) yönteminin özgüllük ve duyarlılık oranları Eastwood ve ark.’nın (107) yaptığı çalışmadaki oranlarla benzerlik göstermektedir. Ancak, dışkıdan toksin varlığının belirlemede bulduğumuz oranlar, Deniz ve ark.’nın (35) sonuçlarıyla farklılık göstermektedir ve bu durum çalışmalarda farklı kitlerin kullanılmış olmasına bağlanmaktadır.

Sonuçlarımıza göre dışkı örneklerinden toksin varlığını belirlemede ELFA (VIDAS, Biomerieux) yönteminin düşük duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir. Rutinde dışkı örneğinden toksin saptanamayıp, izole edilmiş *C.difficile* kökenlerinden ise toksin pozitifliğinin saptanabildiğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Bu durumun dışkı örneğinin uygun koşullarda ve zamanında laboratuvara taşınmamasından kaynaklanabileceği, ısı değişikliğiyle veya dışkıdaki enzimlerin etkisiyle toksin yapısındaki bozulmaya bağlı testlerin negatif sonuç verebileceği kabul edilmektedir (8, 108). Laboratuvarımızda toksin varlığı aranan dışkı örnekleri aynı zamanda toksijenik kültür yönünden işleme alınmakla yalancı negatif (çalışmamızda 38 hasta) sonuçların önüne geçilmiş olmaktadır.

Bu çalışmamızda ESCMID kriterlerini esas alarak, hekimin toksin araştırılması istemi olmaksızın, laboratuvarımıza kültür isteği ile gönderilen hastanede yatan hastaların ve poliklinik hastalarının lökositli dışkı örneklerini toksijenik *C. difficile* yönünden araştırmakla, hekimin gözünden kaçan veya aklına gelmeyen ya da toplum kaynaklı CDE tanısında klinisyene önemli ölçüde yardımcı olduğumuzu düşünüyoruz. Örneğin *C. difficile* izole edilen 84 hastanın 8'inde toksin araştırılması isteği yapılmamıştır ancak, ESCMID kriterleri ölçü alındığı için dışkı örnekleri çalışılmıştır. Toksijenik *C. difficile* üretilen 8 hastanın klinik bulguları değerlendirildiğinde 3'ünde hastane kaynaklı, 5'inde ise toplum kaynaklı CDE varlığı tespit edilmiş, klinisyen ile sürdürülen iyi iletişim sayesinde bu hastaların uygun şekilde tedavi edilmesine yardımcı olunmuştur.

Laboratuvar koşullarında *binary* toksini saptayabilen herhangi bir EIA testi henüz geliştirilmemiştir. Toksin A ve B gibi *binary* toksin de hücre kültürlerinde sitotoksik aktiviteye sahiptir (40). Hastanemizde hücre kültürlerinde sitotoksik etki çalışılmamaktadır. Ancak özgün primerler kullanarak PZR ile *binary* toksinini çoğaltarak tanıya gidebilmekteyiz. İzolatlarımız toksin genleri yönünden yakından izlenmektedir, son altı yıldır izole ettiğimiz *C. difficile* kökenlerinde *binary* toksin genine rastlanmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan *C. difficile* toksini bakılması istemiyle gelen, poliklinik hastalarından patojenik enterik bakteri varlığının araştırılması için gönderilen ve direk bakısında lökosit bulunan dışkı örnekleri incelemeye alınmıştır. Hastanede yatan hastalardan toksijenik *C. difficile* görülme oranı %6.6, poliklinik hastalarında ise yaklaşık %1 bulunmuştur. Hastaların hiç birinde *binary* toksin geni veya A-/B+ varyant izolatına rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yaptığımız çalışma verileriyle benzerlik göstermektedir. Bu durum şimdilik hastanemizde önemli bir *C. difficile* salgını olmadığını göstermektedir. ESCMID kriterlerini ölçü olarak uyguladığımız tanı yöntemlerinin ve klinisyenlerle sağlanan iyi iletişimin bu olumlu sonuçta payının

olduğunu düşünuyoruz. Ancak çalışmamızın birtakım eksiklikleri bulunmaktadır. İzolatlarımızın antibiyotik duyarlılık durumlarının ve genotiplerinin belirlenmesi, hastanemizin epidemiyolojik verilerinin çıkarılması ile bu eksik yönlerin giderilmiş olacağına inanıyoruz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Poutanen, S.M., Simor, A.E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Can. Med. Assoc. J. 2004;171: 51–58.
2. Janvilisri T, Scaria J, Chang YF. Transcriptional profiling of *Clostridium difficile* and Caco-2 cells during infection. J Infect Dis 2010;202: 282–290.
3. Hung YP, Tsai PJ, Hung KH, Liu HC, Lee CI, Lin HJ, Wu YH, Wu JJ, Ko WC. Impact of Toxigenic *Clostridium difficile* Colonization and Infection among Hospitalized Adults at a District Hospital in Southern Taiwan. *Plos one* 2012;7(8): e42415.
4. Vaishnavi C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. Indian J Med Microbiol, 2009;27: 289-300.
5. Borriello SP, Wren BW, Hyde S, Seddon SV, Sibbons P, Krishna MM, et al. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. Infect Immun 1992;60: 4192-4199.
6. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD, Depitre C, Corthier G. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. Infect Immun. 1992;60: 4633-4639.
7. Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000;38: 2706-2714.

8. Rupnik M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. Clin Microbiol Infect. 2001;7(8): 417-420.
9. Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Mint NP. The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. International Journal of Medical Microbiology. 2010;300(6): 387–395
10. Bartlett JG. Pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated colitis. Ed: Sleisenger MH, Fordtran JS. Gastrointestinal and Liver Disease. 6th Edition, pp: 195-230, Saunders Company, Philadelphia, USA, 1998.
11. I.C. Hall, E. O'Toole Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child. 1935;49(2): 390–402.
12. J.G. Bartlett, T.W. Chang, M. Gurwith, S.L. Gorbach, A.B. Onderdonk. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med. 1978; 298(10): 531–534.
13. Pepin J, Valiquette L, Cosette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. CMAJ. 2005;173(9): 1037-1042
14. Stanley JD, Barlett JG, Dart BW, Ashcraft JH. *Clostridium difficile* infection, Current Problems in Surgery. 2013;50(7): 302-307.
15. Chang TW, Gorbach SL, Bartlett JB. Neutralization of *Clostridium difficile* toxin by *Clostridium sordellii* antitoxins. Infect Immun. 1978;22(2): 418–422.
16. Yolken RH, Whitcomb LS, Marien G, et al. Enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* antigen. J Infect Dis. 1981;144(4): 378.
17. Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J Infect Dis. 1984;149(5): 781–788.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: preventing *Clostridium difficile* infections. Morb Mortal Wkly Rep. 2012;61(9): 157–162.
19. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. Ann Intern Med. 1974;81(4): 429–433

20. Taylor NS, Bartlett JG. Partial purification and characterization of a cytotoxin from *Clostridium difficile*. Rev Infect Dis. 1979;1(2): 379–385.
21. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. Gastroenterology. 1981;81(1): 5–9.
22. Keighley MR, Burdon DW, Arabi Y. Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhoea. Br MedJ. 1978;2: 1667–1668.
23. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: progress and challenges. Ann NYAcad Sci. 2010;1213: 62–69.
24. Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH. *Clostridium difficile*: a European perspective. J Infect. 2013;66(2): 115–128.
25. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. N Engl J Med 1999; 341:1645.
26. Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis 2005; 41:1254.
27. He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet 2013; 45:109.
28. Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med 2005; 353:2442.
29. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005;18(2): 247–263
30. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. 2010;467(7316):711–713
31. Bilgehan H. *Clostridium difficile*. Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. s. 361-363, 9. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1995.
32. Kıyan M. Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. Temel ve Klinik

Mikrobiyoloji. s. 645-649, 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.

33. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, et al. Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manuel. 5th. Edition, pp 95-101, Star Publishing Company, California, USA, 1993.
34. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Clostridium difficile*. (Çev: Başustaoğlu AC) s. 377-389. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010
35. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde Yatan ishaller Hastalardan izole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2011; 45(1):1-10.
36. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7(8):421-427.
37. Popoff, MR, EJ Rubin, DM Gill and P Boquet. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988; 56: 2299-2306.
38. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (*binary toxin*) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 186(2): 307-312.
39. Gonçalves C, Derce D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a *binary toxin* (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 1933-1939.
40. Rupnik M, Grabner M, Geric B. *Binary toxin* producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 2003;9(6): 289-294.
41. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*. An enteric disease. *Ann Intern Med* 2006;145:758-64.
42. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33: 24-28.

43. Shen A. *Clostridium difficile* toxins: Mediators of inflammation. *J Innate Immun.* 2012;4:149–158
44. Von Eichel-Streiber C, Sauerborn M, Thlestam M. Large clostridial cytotoxins – a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol.* 1996;4:375-382.
45. Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol.* 2008;57:685-689.
46. Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2001;50:613-619.
47. Mani N, Lyras D, Barroso L, Howarth P, Wilkins T, Rood JI, et al. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J Bacteriol* 2002;184:5971-5978.
48. Dupuy BMS. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors. *Res Microbiol.* 2006;157:201-205.
49. Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol.* 2007;64:1274-1288.
50. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, et al. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology.* 1978; 75:778.
51. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ.* 2004; 171:466.
52. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005; 353:2433-2441.
53. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:273.

54. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, et al. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clin Infect Dis* 2012; 55:216.
55. Goorhuis A, Van der Kooi T, Vaessen N, et al. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2007; 45:695.
56. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, et al. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(6):2.
57. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1162.
58. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, et al. All-cause and disease-specific mortality in hospitalized patients with *Clostridium difficile* infection: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; 56:1108.
59. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011; 377(9759): 63-73.
60. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J Jr. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16(8): 459-77.
61. Kim KH, Fekety R, Batts DH, et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1981; 143:42.
62. Curry SR, Muto CA, Schlackman JL, et al. Use of multilocus variable number of tandem repeats analysis genotyping to determine the role of asymptomatic carriers in *Clostridium difficile* transmission. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1094.

63. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 2013; 369:1195.
64. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320:204.
65. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007; 45:992.
66. Alasmari F, Seiler SM, Hink T, et al. Prevalence and risk factors for asymptomatic *Clostridium difficile* carriage. *Clin Infect Dis* 2014; 59:216.
67. Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* 2005; 294:2989.
68. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, et al. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:89.
69. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, et al. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med* 2013; 173:1359.
70. Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis* 2010; 51:577.
71. Goudarzi M, Goudarzi H, Alebouyeh M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates in Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013;15(8): 704–711.
72. Vecchio AL, Zacur GM. *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2012;28(1): 1–9.
73. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect*. 2009; 58(6): 403-10.

74. McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(6): 581-92.
75. Ovaran C, Çavuşlu Ş, Özsoy MF, Keskin K, Yenen OS. Antibiyotiğe Bağlı Diyarelerde *Clostridium difficile*'nin Yeri. Klimik Derg. 1996; 9(1):15-17.
76. Öztürk R. Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve Tedavi. Ankem Derg. 2004;18(2):82-86.
77. Aygün G. Antibiyotiğe Bağlı ishaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. s. 1087-1093, 2.cilt, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
78. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect 2009; 15(12): 1053-1066.
79. Borriello SP and Wilcox HM. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. JAC. 1998;41:67-69.
80. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. J. Antimicrob Chemother. 1998;41:47-57.
81. Garimella PS, Agarwal R, Katz A. The utility of repeat enzyme immunoassay testing for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review of the literature. J Postgrad Med. 2012; 58(3): 194-198.
82. Ardıç N. *Clostridium difficile* İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. Klimik Dergisi. 2004, 17(3):142-145.
83. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities:a review. J Am Geriatr Soc. 2010; 58(8): 1556-1564.
84. Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. Anaerobe. 2011;17(4): 170-4.
85. Çaylan R. Antibiyotikle ilişkili ishaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Cilt 2, istanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008:1060-1064.

86. Koçak BT. Çocuk Kliniğine Gastroenterit Tanısıyla Yatırılan Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü. İstanbul 2008.
87. Kato N, Ou CY, Kato H, et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(1): 33-37.
88. Wiström J, Norrby SR, Myhre EB. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. J Antimicrob Chemother, 2001; 47(1):43-50.
89. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: past and present perspectives. Gut Microbes. 2010; 1(1): 58-64.
90. Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerg Infect Dis. 2007; 13(9): 1417-1419.
91. Gilca R, Hubert B, Fortin E, et al. Epidemiological patterns and hospital characteristics associated with increased incidence of *Clostridium difficile* infection in Quebec, Canada. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31:939–947.
92. Elixhauser, A., Jhung, M., 2008. *Clostridium difficile*-associated disease in US hospitals, 1993–2005. In: HCUP Statistical Brief No. 50, April 2008. US Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD, Available :accessed March 23, 2009.
93. Büyükbaba B. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2003;32: 220-224.
94. Aygün G, Aslan M, Yağar H, Altaş K. Hastanede Yatarken Gelişen İshal Olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B Araştırılması. Ankem Derg, 2002; 16(1):82-84.
95. Altındış M, Usluer S, Çiftçi Hİ, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe CO. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bült. 2007;41:29-37.

96. Söyletir G, Eskitürk A, Kilic G, Korten V, Tozun N. *Clostridium difficile* acquisition rate and its role in nosocomial diarrhea at a university hospital in Turkey. *Eur J Epidemiol* 1996; 12(4): 391-394.
97. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31(5): 431-455.
98. Bauer M, Notermans D, van Benthem B, et al. ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011; 377:63–73.
99. 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;13:1048-1057.
100. Ergen EK, Akalin H, Yilmaz E, Sinirtaş M, Alver O, Heper Y, Ozakin C, Bakker D, Ener B, Mistik R, Helvacı S, Kuijper EJ. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Med Mal Infect*. 2009;39:382-387.
101. Hirshon JM, Thompson AD, Limbago B, McDonald LC, Bonkosky M, Heimer R, Meek J, Mai V, Braden C. *Clostridium difficile* infection in outpatients, Maryland and Connecticut, USA, 2002-2007. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1946-1949
102. Kutty PK, Woods CW, Sena AC, et al. Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:197–204.
103. Lambert PJ, Dyck M, Thompson LH, Hammond GW. Population-based surveillance of *Clostridium difficile* infection in Manitoba, Canada, by using interim surveillance definitions. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:945–951.

104. Schutze GE, Willoughby RE; Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics. *Clostridium difficile* infection in infants and children. *Pediatrics*. 2013;131:196-200.
105. Oğuz F, Uysal G, Daşdemir S, Oskovi H, Vidinlisan S. The role of *Clostridium difficile* in childhood nosocomial diarrhea. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(10):731-733
106. Carroll KC, Loeffelholz M. Conventional versus molecular methods for the detection of *Clostridium difficile*.. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49:49-52.
107. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3211-3218.
108. Bouza E, Pelaez T, Alonso R, Catalan P, Munoz P, Creixems RM. “Second-look” cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. *J Hosp Infect*. 2001; 48(3): 233-237.