

Hastanede yatan ishaller hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi

Investigation of *Clostridium difficile* toxin in stool samples of patients hospitalized for diarrhea and analysis of the risk factors

Hande KOSTUL¹, Nuran DELİALİOĞLU¹, Elif ŞAHİN-HORASAN²,
Gürol EMEKDAŞ¹, Candan ÖZTÜRK¹, Necdet KUYUCU³

ÖZET

Amaç: Hastanede yatan özellikle geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda *Clostridium difficile* ilişkili ishal görülmektedir. *C. difficile*'nin patojenik suşları toksin A ve toksin B olmak üzere iki ekzotoksin oluşturmaktadır. Bu toksinler kolon mukozasında hasarlanma ve inflamasyona sebep olmaktadır. Kendini sınırlayan hafif bir ishalden ağır seyirli psödomembranöz enterokolite kadar değişen bir klinik tablonun gelişmesi söz konusudur. Antibiyotik kullanımı dışında ileri yaş, gastrointestinal endoskopi, nazogastrik tüpün varlığı, antiülser ilaç kullanımı, altta yatan ciddi hastalıklar, immün sistemin baskılanması, yoğun bakım ünitesi ve uzun süreli hastanede yatış diğer risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Kesin tanı; dışkıdan *C. difficile*'nin üretilmesi ve hücre kültüründe sitopatik etkiyi saptayarak toksin yapımının gösterilmesi ile konur. Ancak rutinde bu her zaman mümkün olmadığı için enzim immunoassay yöntemi ile toksinin gösterilmesi daha sık kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada hastanede yatan ve ishaller hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde bağırsak florası, *C. difficile* Toksin A ve B varlığı ve risk faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmaya Eylül 2010-Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli kliniklerinde yatan ve ishaller hastalardan gönderilen 158 dışkı örneği dahil edilmiştir. Bu hastaların dışkı örneklerinde Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemiyle *C. difficile* toksin A/B araştırılmıştır.

ABSTRACT

Objective: The diarrhea related with the *Clostridium difficile* is seen especially in the patients hospitalized and using broad spectrum antibiotics. Pathogenic strains of *C. difficile* produce two exotoxins, toxin A and toxin B, which cause colonic mucosal injury and inflammation. It is possible to observe a clinical picture ranging from a mild self-limiting diarrhea to severe course of pseudomembranous enterocolitis. Besides antibiotic intake; advanced age, gastrointestinal endoscopy, presence of a nasogastric tube, receiving anti-ulcer medication, severe underlying illness, immunosuppression, intensive care unit and prolonged hospital stay are considered as other risk factors. The accurate diagnosis is established by producing *C. difficile* from the feces and demonstration of the toxin by determining the cytopathic effect in cell culture production. Since, this is not always possible in routine practice, demonstration of the toxin with enzyme immunoassay is a method used more often. The aim of this study was to investigate the intestinal flora from stool specimens of hospitalized patients and patients having diarrhea, existence of *C. difficile* toxin A and B and to determine the related risk factors.

Method: Stool specimens of 158 diarrhea patients hospitalized in various clinics which were sent to Department of Medical Microbiology Laboratory from Mersin University Medical Faculty Hospital between September 2010 and October 2011 were included in this study. Toxin A/B of *C. difficile* were investigated in the stool specimens of these patients with Enzyme-Linked

¹ Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

² Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

³ Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, MERSİN



İletişim / Corresponding Author : Nuran DELİALİOĞLU

Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

Tel : +90 324 241 00 00-2351

E-posta / E-mail : nurandel@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 31.03.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 30.07.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.36024

Kostul H, Delialioğlu N, Şahin-Horasan E, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Hastanede yatan ishaller hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 182-90.

Ayrıca bu örnekler mikroskopik olarak incelenmiş ve rutin bakteriyolojik kültürü yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmanın sonucunda; 18 (%11,4) hastada *C. difficile* toksin A/B pozitif olarak bulunmuş ve bu hastaların 15 (%83,3)'inin beta-laktam - beta-laktamaz inhibitörü grubu (penisilin, sefalosporin ve karbapenem) antibiyotik kullandığı görülmüştür. Toksin pozitif hastaların dışkı kültürlerinin bir tanesinde *Candida albicans* ürerken 17'sinde normal bağırsak flora bakterilerinin ürettiği tespit edilmiştir. Toksin pozitif ve negatif hastalarda incelediğimiz çeşitli risk faktörlerinden penisilin kullanımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Sonuç: *C. difficile* hastanede yatan ve antibiyotik kullanan hastalarda ortaya çıkan ishallerde öncelikle akla gelmelidir. Bu amaçla dışkı örneklerinden toksin A ve B hızlı tanısı için özgülük ve duyarlılığı yüksek olan testler kullanılabilir. Sonuç olarak toksin pozitif olguların erken tanısı spesifik tedaviye başlanması ve etkili enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, toksin, ishal

Fluorescent Assay (ELFA) method. In addition, these samples were examined microscopically and routine bacteriological cultures were done.

Results: As a result of this study, *C. difficile* toxin A/B is found as positive in 18 (11,4%) patients and 15 of these patients (83,3%) had used, beta-lactam - beta-lactamase inhibitor group (penicillins, cephalosporins, and carbapenems) antibiotics. One of the toxin positive patients had *Candida albicans* while normal intestinal flora bacteria were grown in 17 of them. Using of penicillin was found to be statistically significant among the various risk factors studied in toxin positive and toxin negative patients.

Conclusion: *C. difficile* should be considered as the main cause of diarrhea particularly occurred in patients hospitalized and used antibiotics. For this purpose, tests which has high sensitivity and specificity may be used for rapid diagnosis of A and B toxins in stool samples. As a result, early detection of toxin positive cases will provide initiation of specific therapy and the implementation of effective infection control measures.

Key Words: *Clostridium difficile*, toxin, diarrhea

GİRİŞ

Clostridium difficile Gram pozitif sporlu anaerob basildir. Sağlıklı yetişkinlerin %0-3'ünün, sağlıklı yenidoğanların %25-80'inin dışkısında bulunmaktadır. Hastanede yatan hastaların %20'sinde; psödomembranöz koliti olan hastaların ise %95-100'ünde dışkıda *C. difficile* pozitif olarak bildirilmektedir. *C. difficile* ilişkili kolit en yaygın görülen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir (1). *C. difficile* sporları, kolonizasyon gelişmiş hastalardan ya da çevrelerindeki kişilerden temas sonucu alınabilmekte, çoğu zaman hastane personelinin elleri aracılığıyla taşınmaktadır. Elle taşınma önemli bir bulaş şekli olarak düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hastane personelinin eldiven kullanması sonucunda *C. difficile*'ye bağlı ishallerde beş kat azalma görüldüğü belirtilmiştir. *C. difficile* ısıya dirençli sporları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmektedirler (2). *C. difficile*

ilişkili kolit patogenezinde başlangıç antibiyotiklerle kolonun normal bakteriyel florasının bozulmasıdır. Bu durum *C. difficile* kolonizasyonuna sebep olmaktadır. Hastanede antibiyotik alan hastaların bulunduğu çevrede *C. difficile* yüksek orandadır. Yetişkin ve iki yaş üstündeki çocuklarda normal kolon mikroflorası *C. difficile* kolonizasyonunu engellemektedir (1).

C. difficile ilişkili enfeksiyon patogenezinde primer risk faktörleri; 65 yaş üstü, son üç ay içinde antibiyotik kullanımı ve hastanede yatmadır. Sekonder risk faktörleri arasında nazogastrik tüp uygulanması, sigara kullanımı, asit azaltan ajanlar (proton pompa inhibitörleri, H2 reseptör antagonistleri), malign hastalıklar, kemoterapi alınması bulunmaktadır (3). Antibiyotik aracılıklı diyarelerin %20'den fazlası ve antibiyotik ilişkili kolitlerin %60-75'inden ve psödomembranöz

kolitlerin %95'inden fazlasında *C. difficile* etken olarak bildirilmektedir (4). *C. difficile* ilişkili diyare ve kolitle sıklıkla ilişkili antibiyotikler ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler ve klindamisinidir. *C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde ilk seçilen antibiyotik metranidazoldur. Normal kolon florasının yeniden oluşumu *C. difficile* kolonizasyonunu engeller ve klinik iyileşme oluşur. *C. difficile* patojenik suşları, toksin A enterotoksin ve toksin B sitotoksin olmak üzere iki potent toksin oluşturur. Her iki toksin de insan kolon epitel hücrelerine bağlanır ve hasar verir. Kolon mukozasında inflamasyon ve psödomembranlar oluşur. *C. difficile* enfeksiyonu klinik olarak asemptomatik taşıyıcılıktan, megakolon ve perforasyonların olduğu fulminan kolite kadar uzanabilir. Bunun sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte bakteri virulans faktörlerden çok konak faktörlerin önemli olduğu görünmektedir. Diyare genellikle antibiyotik tedavisi başladıktan 4-9 gün sonra oluşmaktadır. Hastaların üçte birinde antibiyotik kesildikten sonra diyare başlar. Kanser kemoterapisi kolonun mikroflorasını bozabilir ve kolonizasyon, diyare ve enfeksiyona yol açabilir (1).

Clostridium difficile ilişkili hastalık hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur ve mortalite oranı %6-15 olarak bildirilmektedir. Bu enfeksiyonun hastanede yayılımının kontrol altına alınması gereklidir. Özellikle komplike enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisi alan hastalar daha sıklıkla enfeksiyona maruz kalmaktadır. Hastalığın doğru tanısı hastaların yönetilmesinde; yayılımının kontrol altına alınmasında ve sürveyans bilgilerinin elde edilmesinde önemlidir. *C. difficile* tanısında referans metod dışının hücre kültürünün yapılması ve sitotoksisitenin antiserumlarla inhibisyonu ile gösterilmesidir. Bu test 2-3 günde tamamlanmaktadır. Günümüzde *C. difficile* toksin tanısında hızlı metodlar geliştirilmiştir. Her iki toksini tespit edebilen ticari testler bulunmaktadır. Diğer tanı metodları polimeraz zincir reaksiyonu ve glutamat dehidrogenaz varlığının araştırılmasıdır (5).

Bu çalışmada çeşitli kliniklerde yatan ve ishali hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde *C. difficile*

toksin A ve B varlığının ve çeşitli risk faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 2010 - Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerde yatan ishali hastalardan gönderilen dışkı örnekleri çalışmaya alınmıştır. Bu dönemde yatan hastalardan toplam 878 adet dışkı örneği gönderilmiş olup bunlardan sulu, mukuslu ve yumuşak kıvamlı olan 158 adeti çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerin 47'sinin hasta yatışından bir gün sonra; 111'inin ise iki gün ve sonrasında geldiği tespit edilmiştir. Dışkı örnekleri makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Makroskopik incelemede dışkıların kıvamına, kan ve mukus olup olmadığına bakılmıştır. Mikroskopik incelemede ise eritrosit-lökosit varlığı ve protozoon kist-trofozoitleri araştırılmıştır. Bakteriyolojik kültür için örnekler kanlı agar, Eosin Methylene Blue (EMB) agar, Salmonella-Shigella (SS) agar ve Sabouraud Dextrose Agar besiyerlerine ekilmiştir. Bir miktar dışkı örneği steril 2 ml'lik iki adet ependorf tüpe alınarak *C. difficile* Toksin A/B araştırılması yapıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Besiyerleri etüde 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürde üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojisi değerlendirilerek kolonilerden Gram boyama yapılmış ve mikroskopta incelenmiştir. Gram pozitif bakterilerin identifikasyonunda katalaz, koagülaz ve eskülin hidrolizi testleri, Gram negatif enterik bakterilerin identifikasyonunda ise klasik biyokimyasal yöntemler ve gerektiğinde otomatize bakteri identifikasyon sistemi (VITEK, bioMérieux) kullanılmıştır. Maya üremesi tespit edilen dışkı örneklerine germ tüp testi ile *Candida albicans* ve non-albicans ayrımı yapılmıştır.

Clostridium difficile Toksin A/B aranması

Dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A/B varlığının araştırılması için *C. difficile* Toksin A/B

kiti (lot numarası: 1000335200) kullanılarak (VIDAS, bioMérieux, Fransa) Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemi ile VIDAS cihazında (bioMérieux, Fransa) firmanın önerdiği prosedüre göre çalışılmıştır. Testin prensibi; iki adım enzim immunoassay sandviç yöntemi ve bir floresan okumadır. Çalışma öncesi dışkı örnekleri santrifüj edilerek homojenize edildikten sonra test stripindeki uygun kuyucuğa eklenerek cihaza yerleştirilmiştir. Testin tüm adımları cihazda otomatik olarak çalışılmış ve yaklaşık test 75 dakika içinde tamamlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılıma uymayan sürekli değişkenler medyan [çeyreklikler] şeklinde özetlenmiş ve grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testinden yararlanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Analizler MedCalc v.12.2.1. ve SPSS 11.5 paket programlarında yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 158 hastanın 86 (%54,4)'si erkek 72 (%45,6)'si kadındı. Bunların 84 (%53)'ü 0-18 yaş grubu, 54 (%34)'ü 19-64 yaş grubu ve 20 (%12,6)'si 65 ve üzeri yaş grubunda idi. *C. difficile* toksin A/B pozitifliği 18 (%11,4) hasta örneğinde saptanmıştır. Bunların yaş gruplarına göre dağılımında 16 (%88,8)'sinin çocuk yaş grubunda, iki hastanın (%11,2) yetişkin yaş grubunda olduğu tespit edilmiştir. *C. difficile* toksin pozitif hastaların yaşlarına göre dağılımı; 2'si 0-6 aylık, 7'si 6-12 ay, 1'i 5 yaş ve 6'sı 10-13 yaş arasında, yetişkin iki hasta ise 33 ve 56 yaşlarında idi.

Dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde; toksin pozitif bir örnekte *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* kistleri ve toksin negatif altı örnekte *E. histolytica* / *E. dispar* kist ve trofozoitleri, bir örnekte ise *Giardia intestinalis* kistleri görülmüştür. Dışkı örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Tablo 1'de

görülmektedir. Dışkı mikroskopisinde lökosit toksin pozitif hastaların altı (%33,3)'sında ve toksin negatif hastaların 52 (%37)'sinde lökosit görülmüştür.

Tablo 1. Hastaların dışkı kültürlerinde izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Kültür Sonucu	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
	n (%)	n (%)
Normal flora bakterileri*	17 (94,5)	128 (91,4)
<i>Candida</i> spp.	1 (5,5)	9 (6,4)
<i>Salmonella</i> spp.	-	2 (1,5)
<i>Shigella</i> spp.	-	1 (0,7)
Toplam	18 (100)	140 (100)

* *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp. vb.

Çalışmadaki hastaların hastanede yatış süresi içinde aldıkları antibiyotiklere bakıldığında ilk sırayı sefalosporinler almakta onu karbapenemler takip etmekte daha sonra da sırayla florokinolonlar, penisilin, beta laktam+beta laktamaz inhibitörleri ve diğer antibiyotikler de bunları izlemektedir. *C. difficile* toksin A/B pozitif bulunan hastaların daha önce kullandığı antibiyotiklere bakıldığında beşinin (%28,5) penisilin grubu, üçünün (%16,5) sefalosporin grubu, üçünün (%16,5) karbapenem, ikisinin (%11,0) beta-laktam + beta-laktamaz inhibitörü, birinin (%5,5) penisilin + sefalosporin ve birinin (%5,5) sefalosporin + karbapenem kombinasyonu aldığı tespit edilmiştir. Toksin pozitif tespit edilen üç hastanın ise antibiyotik kullanım öyküsü bulunmadığı saptanmıştır (Tablo 2). Penisilin alanların almayanlara göre 6,34 kat daha fazla *C. difficile* toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. (OR= 6,34 (1,81 - 22,24) $p = 0,004$). Antibiyotik kullanım süreleri ($p = 0,659$) bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Yatış süresince antibiyotik kullanma süresi ortanca değeri (medyanı) 15 gün olarak belirlenmiştir. Hastaların dışkı örneklerinde antibiyotiğe başladıktan ortanca 6,6 gün (min 0 - max 40 gün) sonra toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. Yatıştan sonra pozitiflik için geçen süre ise ortanca değeri 10,4 gün (min 0 - max 58 gün) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2. Hastaların hastanede yattıkları süre içerisinde kullandıkları antibiyotikler

Antibiyotik Grupları	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	Sayı (%)	Sayı (%)	
Penisilin	5 (28,5)	8 (5,7)	0,006
Sefalosporin	3 (16,5)	57 (40,7)	0,080
Karbapenem	3 (16,5)	24 (17,2)	0,777
Beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü	2 (11,0)	11 (7,8)	0,986
Penisilin-Sefalosporin	1 (5,5)	5 (3,5)	0,810
Sefalosporin-Karbapenem	1 (5,5)	10 (7,1)	0,808
Florokinolon	-	16 (11,5)	
Aminoglikozit	-	2 (1,5)	
Glikopeptit	-	1 (0,7)	
Nitroimidazol	-	5 (3,6)	

Tablo 3. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların risk faktörlerinin değerlendirilmesi

Risk Faktörleri	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	Sayı (%)	Sayı (%)	
Hematolojik malignite	4 (22)	46 (33)	0,519
Nazogastrik tüp	4 (22)	15 (11)	0,304
Anti-ülser tedavi	8 (44)	76 (54)	0,591

Biyokimyasal test sonuçlarına bakıldığında toksin pozitif hastaların dördünde (%22,2) yüksek değerlerde lökosit varlığı ve 10 (%55,5)'unda yüksek C-reaktif protein (CRP) varlığı saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastalarda *C. difficile* için risk faktörlerinden olan hematolojik malignitesinin ve nazogastrik tüp uygulamasının ve altta yatan herhangi bir hastalığının olup olmadığı ve antiülser tedavi (proton pompa inhibitörü, H2 antagonist veya her ikisi) alıp almadıklarının dağılımı Tablo 3'de verilmiştir.

TARTIŞMA

C. difficile hastanede yatan hastalarda gelişen diyarelerin en yaygın sebeplerindendir. *C. difficile*'ye bağlı ishal sıklığını araştırmak için ülkemizde yapılan çalışmalarda toksin A-B pozitifliğinin %3,2 ile %24 arasında olduğu görülmektedir (6 - 15). Bizim çalışmamızda *C. difficile* toksin A/B %11,4 oranında pozitif olarak tespit edilmiştir.

C. difficile'ye bağlı ishal oluşumunda en önemli risk faktörü antibiyotik kullanımıdır. *C. difficile* ilişkili diyare ve kolit sıklıkla ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler ve klindamisin gibi antibiyotiklerle ilişkilidir (1). Erçis ve arkadaşları *C. difficile*'ye bağlı ishalin, hastaların büyük bir kısmında (32/68) beta laktam - beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının kullanımı sonucunda geliştiğini, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) izlediğini saptamışlardır (9). Altındiş ve arkadaşları *C. difficile* toksin pozitif hastaların %84,6'sının ampisilin - sulbaktam, %7,7'sinin ise kotrimoksazol - SXT ve makrolid antibiyotik kullandığını belirlemişlerdir (11). Altuğlu ve arkadaşları toksin A pozitif bulunan hastaların beşinin üçüncü kuşak sefalosporin, birinin trimetoprim-sulfametoksazol ve birinin de siprofloksasin kullanmakta olduğunu saptamışlardır (16). Avustralya'da yapılan *C. difficile* ile ilişkili ishal olgularının incelendiği epidemiyolojik bir çalışmada; 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının

kontrol altına alınması ile *C. difficile* ilişkili ishal olgularının azaltılabileceği bildirilmiştir (17).

C. difficile'ye bağlı ishalin oluşmasına neden olan diğer bir risk faktörü, altta yatan ciddi bir hastalığın varlığıdır. Kronik hastalığı olanların daha sık ve daha uzun süre hastanede yatmaları sebebiyle *C. difficile* ile kolonize olma ihtimali artmaktadır (18). Ercis ve arkadaşları *C. difficile* toksin A/B pozitif tespit ettikleri olguların %52,9'unda altta yatan bir hastalığın olduğunu, bunları da kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı, böbrek yetmezliği ve kanser olarak belirlediğini bildirmişlerdir (9). Altuğlu ve arkadaşları toksin A pozitif bulunan hastaların operasyon geçirmek, politravma, vaskülit, solid tümör, organik fosfat zehirlenmesi, beyin içi kanaması, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi nedenlerden dolayı yoğun bakımda yatmakta olduğunu tespit etmişlerdir (16). Çalışmamızda, *C. difficile* toksin A/B pozitif 18 hastanın dördünde (%22,2) hematolojik malignite ve dördünde (%22,2) nazogastrik tüp olduğu tespit edilmiştir. Hematolojik malignitenin olması ve nazogastrik tüp uygulaması ile *C. difficile* toksin A/B'nin pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. *C. difficile* toksin A/B'nin pozitifliği ile anti ülser ilaç tedavisi alımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,591$). Hastanede yatış süreleri ($p=0,317$) bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir.

Antibiyotik ilişkili ishal vakalarında sıklıkla karın ağrısı, ateş, lökositoz, dışkıda lökositler ve hipotalbüminemi görülmektedir (4). Antibiyotiğe bağlı ishal olguları sıklıkla kendini sınırlama eğilimindedir. İshal sıklıkla sulu, mukusludur ve kan bulunmaz. Kolit olgularında ise sistemik bulgular, dışkıda lökosit ve eritrosit tespit edilmektedir (19). Bizim çalışmamızda; mikroskopik incelemede toksin pozitif 18 örneğin ikisinde (%11) eritrosit, beşinde (%27) lökosit, birinde hem eritrosit ve hem lökosit varlığı saptanırken beş örneğin (%27) makroskopik görüntüsünün mukuslu olduğu görülmüştür. Kan lökosit değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,164$). CRP değerlerinin toksin negatif hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CRP değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,038$) (Tablo 4). Bunun nedeninin hastaların altta yatan diğer hastalıklarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Salmonella türleri, *C. perfringens* tip A, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* ve *C. albicans* gibi diğer enterik patojenlerde antibiyotik ilişkili diyare ile karışabilir. Klinik semptomları olan hastalarda *C. difficile* negatif bulunduğu bu patojenler araştırılmalıdır (4). Altuğlu ve arkadaşlarının çalışmasında hastaların 21'ine bakteriyolojik kültür yapılmış, sadece bir tanesinde *Shigella flexneri* izole edilmiş. Toksin A pozitif hastaların hiçbirinde patojen bir bakteri saptanmamıştır (16). Aygün ve arkadaşları

Tablo 4. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların risk faktörlerinin değerlendirilmesi

Biyokimyasal Testler	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	medyan [çeyrekliiler]	medyan [çeyrekliiler]	
Lökosit	11.115 [6030 - 15120]	8.055 [3240 - 12790]	0,164
CRP yüksek	12,50 [2,00 - 51,50]	45,00 [9,75 - 145,75]	0,038

Salmonella, *Shigella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* varlığını araştırmak için aynı zamanda bakteriyolojik kültür yapmışlardır. Fakat hiçbirinde bu bakterilere rastlanmamış hepsinde normal flora elemanlarının ürediği görülmüştür (10). Çalışmamızda toksin pozitif hastaların birinde (%5,5) *C. albicans* ve 17 (%94,5)'sinde normal flora bakterileri üremiştir.

Dışkıda *C. difficile* toksin araştırması için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilmesidir. Doku kültürü ile toksin araştırılması zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Birçok merkezde enzim immunoassay (EIA); toksin A ve B'yi saptamada hızlı sonuç alınması nedeniyle rutin uygulamada tercih edilen bir yöntemdir (20). *C. difficile* tanısında önceleri toksin A ve sonra toksin A ve toksin B araştırılan EIA testleri yaygın olarak kullanılmaktaydı. Son zamanlarda tanıda *C. difficile* hücre duvar antijeni glutamat dehidrogenaz (GDH) testinin toksin A ve B EIA'den daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. *C. difficile* tanısında test algoritmasının değerlendirildiği bir çalışmada; sitotoksin nötralizasyon testi referans yöntem olarak kullanıldığında hızlı immunokromotografik testlerle GDH ve toksin A ve B taranması ile bir saat içinde örneklerin %90'ında doğru sonuç alındığı, kalan %10 örnekte ise algortimada üçüncü bir testin gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu testin sitotoksin nötralizasyonu, toksijenik kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu ile toksin ve toksin genlerinin araştırılmasından birinin olabileceği bildirilmektedir. ABD'de 2004 yılında *C. difficile* tanısında laboratuvarların kullandığı

testler değerlendirildiğinde; %42'si katı faz EIA ile *C. difficile* toksin A ve B, %26'sı hızlı immunokromotografik testler ile toksin A/B veya/ve GDH araştırdıkları bildirilmiştir. Hızlı immunokromotografik testlerdeki gelişmelerle 2008 yılında %46 laboratuvar bu metodu kullanırken, %43'ünün EIA metodlarını kullanmakta olduğu tespit edilmiştir (21).

Sonuç olarak; çocuk yaş grubunda toksin pozitifliği daha yüksek oranda belirlenmiş ve toksin pozitif grupta penisilin kullanımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Araştırılan diğer risk faktörleri (hematolojik malignitenin olması, nazogastrik tüp uygulaması, anti ülser ilaç tedavisi) ve hastanede yatış süreleri bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Bunun sebebinin toksin pozitif gruptaki hasta sayısının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. *C. difficile* hastanede yatan ve başta antibiyotik kullanan hastalarda gelişen ishallerde öncelikle akla gelmelidir. Tanı için toksin oluşumunun gösterilmesi gereklidir. Rutin laboratuvarlarda *C. difficile* toksin tespiti için duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan EIA testleri veya immunokromotografik yöntemler tercih edilebilir. Böylece toksin pozitif hastalar belirlenerek bulaşmayı önlemek için izole edilmesi ve uygun tedavi alması sağlanır. Aynı zamanda çevresel hijyen ve el yıkama gibi enfeksiyon kontrol önlemleri alınarak *C. difficile*'nin hastane ortamında hastalar arasında yayılımı önlenmiş olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın istatistik analizlerinin yapılmasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Arzu KANIK ve Arş. Gör. Didem DERİCİ'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kelly CP, LaMont T. *Clostridium difficile* infection. Annu Rev Med, 1998; 49: 375-90.
2. Di Persio JR, Varga FS, Conwell DL, Kraft JA, Kozak KJ, Willis DH. Development of a rapid enzyme Immunoassay for *Clostridium difficile* Toxin A and Its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. J Clin Microbiol, 1991; 29(12): 2724-30.
3. Stanley JD, Bartlett JG, Dart BW IV, Ashcraft JH. *Clostridium difficile* infection. Curr Probl Surg, 2013; 50(7): 302-37.
4. Coté GA, Buchman AL. Antibiotic-associated diarrhoea. Expert Opin Drug Saf, 2006; 5(3): 361-72.
5. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: A systematic review. Lancet Infect Dis, 2008; 8(12): 777-84.
6. Boral ÖB. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanımlı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2002; 32(3-4): 220-4.
7. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. ANKEM Derg, 2002; 16(1): 82-4.
8. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2011; 45(1): 1-10.
9. Ercis S, Ergin A, Haşçelik G. *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal olgularının 6 yıllık değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul, 2004; 38(1-2): 45-50.
10. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2003; 33(1): 39-41.
11. Altındiş M, Usluer S, Çiftçi İH, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe OC. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2007; 41(1): 29-37.
12. Tunçcan ÖG, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda *Clostridium difficile* toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi. Mikrobiyol Bul, 2008; 42(4): 573-83.
13. Gündem SV, Özdemir M, Baysal B, Baykan M. Antibiyotik ilişkili ishal olgularında toksijenik *Clostridium difficile* varlığının ve risk faktörlerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2012; 42(2): 73-7.
14. Ayarç AO, Özakin C, Oral B, İlbaşı AR, Sınırtaş M, Sığırlı D, et al. İshalleri olgularında *Clostridium difficile* toksin pozitifliğinin retrospektif analizi. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2012; 42(1): 10-15.
15. Lale Z, Doğruman Al F, Fidan I, Adıyaman G, Yeşilyurt E, Özkan S, et al. İshalleri hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin A/B sıklığının araştırılması. ANKEM Derg, 2013; 27(2): 55-9.
16. Altuğlu İ, Aydemir Ş, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Bilgiç A. Antibiyotikle ilişkili nozokomiyal diyarelerde *Clostridium difficile* Toksin A araştırılması. Turkish Journal of Infection, 2001; 15(4): 495-7.
17. Thomas C, Stevenson M, Williamson DJ, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: Epidemiological data from Western Australia associated with a modified antibiotic policy. Clin Infect Dis, 2002; 35(12): 1457-62.
18. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect, 2001; 7(8): 405-10.
19. Aygün G. Antibiyotiğe Bağlı İshaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 1087-93.
20. Özinel MA. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak *Clostridium difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 2001; 5(3): 251-4.
21. Schmidt ML, Gilligan PH. *Clostridium difficile* testing algorithms: What is practical and feasible? Anaerobe, 2009; 15(6): 270-73.