

Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan *Clostridium difficile* Toksin B sonuçlarının değerlendirilmesi

Evaluation of *Clostridium difficile* Toxin B results by polymerase chain reaction from stool specimens

Pınar ŞAMLIOĞLU¹ (ID), Arzu BAYRAM¹ (ID), Güliz DOĞAN¹ (ID)

ÖZET

Amaç: *Clostridium difficile*, fekal-oral yolla yayılan Gram-pozitif, anaerop, spor oluşturan bir bakteridir. Asemptomatik taşıyıcılık veya hafif diyareden psödomembranöz enterokolit gibi hayatı tehdit eden hastalıklara kadar çeşitli klinik tablolara neden olur. *C. difficile*, Amerika'da ve Avrupa'da antibiyotikle ilişkili ishale neden olan hastane enfeksiyonunun en yaygın nedenidir. A ve B olarak isimlendirilen iki toksin üretebilir. Toksin üreten suşlar megakolon, perforasyon veya septik şoka neden olan daha ciddi hastalık tablosuna yol açabilmektedir. Tanıda uygulaması daha kolay, hızlı sonuç elde edebileceğimiz, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip moleküler yöntemlerin kullanılması son yıllarda yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu çalışmada dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanan *C. difficile* sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Laboratuvarımıza *C. difficile* enfeksiyonu şüphesiyle Ocak 2017 ile Eylül 2018 tarihleri arasında gelen 109 dışkı örneği GeneXpert *C. difficile* PZR (Cepheid, CA, AD) yöntemi ile test edilmiştir. Elde

ABSTRACT

Objective: *Clostridium difficile* is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming bacterium that spreads via the fecal-oral route and causes asymptomatic carriage or mild diarrheal diseases such as pseudomembranous enterocolitis. *C. difficile* is the commonest cause of nosocomial and antibiotic-associated diarrhea in North America and Europe. It can produce two toxins called A and B. Strains producing toxins can lead to a more serious disease picture that causes megacolon, perforation or septic shock. The use of molecular methods with high specificity and sensitivity has become widespread in recent years. The use of molecular methods with high specificity and sensitivity, which are easier to apply in diagnosis, and to obtain rapid results, has become widespread in recent years. In this study, it was aimed to evaluate *C. difficile* results determined by polymerase chain reaction (PCR) from stool samples.

Methods: 109 fecal samples that came to our laboratory between January 2017 and September 2018 on suspicion of *C. difficile* infection were tested with the GeneXpert *C. difficile* PCR (Cepheid, CA, AD)

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Pınar ŞAMLIOĞLU

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenişehir İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : pinar.samlioglu@saglik.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 15.08.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 20.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.77785

Şamlioğlu P, Bayram A, Doğan G. Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan *Clostridium difficile* Toksin B sonuçlarının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 209 - 216

edilen veriler pozitif, negatif veya geçersiz sonuç olarak yorumlanmıştır.

Bulgular: Toplam 109 örnek test edilmiştir. Dışkı örneklerinin 66 (% 61)'sı erkek, 43 (%39)'ü kadın hastalara aittir. Örnek istenen hastaların 25 (%23)'ü 65 yaş üstü 36 (%33)'sı 18 yaşın altındaydı. Gelen örneklerin 26 (%24)'sı yoğun bakım ünitelerinden, 60 (%55)'i servislerden ve 23 (%21)'ü polikliniklerden laboratuvarımıza gelmiştir. 109 dışkı örneğinden 9 (%8)'u *C. difficile* PZR testiyle toksin B pozitif, 100 (%92)'ü negatif bulunmuştur.

Sonuç: Nosokomiyal diyarelerin en önemli nedeni *C. difficile*'dir. Enfeksiyonun temel predispozan faktörü antibiyotik kullanımınıdır. Profilaksi veya tedavi amacıyla bir doz bile olsa antibiyotik kullanılması *C. difficile* enfeksiyonu gelişmesi için yeterli olabilmektedir. PZR ile hızlı ve doğru tanı konması tedaviye erken başlanması açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *C. difficile*, ishal, psödomembranöz enterokolit, PCR

method. The data obtained are interpreted as positive, negative or invalid results.

Results: A total of 109 samples were tested. 66 (61%) of the stool samples belonged to male and 43 (39%) female patients. Twenty-five (23%) of the patients were under the age of 18 and 36 (33%) under the age of 18 years. Of the samples, 26 (24%) were from intensive care units, 60 (55%) were from services and 23 (21%) were from polyclinics. It was found 109 from stool samples. 9 (8%), *C. difficile* PCR test toxin B positive, 100 (92%) negative.

Conclusion: The most important cause of nosocomial diarrhea is *C. difficile*. The main predisposing factor of infection is the use of antibiotics. Prophylaxis or even one dose of antibiotic therapy may be sufficient for the development of *C. difficile* infection. Rapid and accurate diagnosis by PCR is important for early initiation of treatment.

Key Words: *C. difficile*, diarrhea, pseudomembranous enterocolitis, PCR

GİRİŞ

Clostridium difficile Gram-pozitif, anaerop, sporlu bir basildir. Komplikasyonsuz hafif ishal, ölümcül seyredabilen toksik megakolon ve kolon perforasyonuna kadar değişen farklı klinik sonuçlar ile ilişkilidir. *C. difficile*, hastane kaynaklı ishalin başlıca nedenidir. Artmış morbidite-mortaliteye neden olabilen salgınlardan sorumludur (1, 2). 1978 yılında ilk defa "Psödomembranöz kolit" ve "antibiyotik ile ilişkili ishal" olgularında *C. difficile* tanımlanmış ve özellikle klindamisin ve linkomisin kullanımı ile semptomların daha erken görüldüğü bildirilmiştir. Sağlıklı bir yetişkinde kolonun bakterisi

florası genellikle *C. difficile* kolonizasyonuna dirençlidir. Ancak, normal kolon florası değiştiğinde kolonizasyona karşı bu direnç kaybedilir. Kolon florasındaki bozulmanın en yaygın risk faktörü antibiyotiklere maruz kalmaktır (3,4).

C. difficile ilişkili enfeksiyon patogeneğinde primer risk faktörleri; 65 yaş üstü olmak, son üç ay içinde uzun süreli antibiyotik kullanımı ve uzun süre hastanede yatmaktır. Sekonder risk faktörleri arasında ise hastaya nazogastrik tüp uygulanması, sigara kullanımı, asit azaltan ajanlar (proton pompa inhibitörleri, H2 reseptör antagonistleri), malign hastalıklar, kemoterapi tedavisi bulunmaktadır (5). Sağlıklı yetişkinlerin %0-3'

ünün, sağlıklı yenidoğanların %25-80' inin dışısında bulunmaktadır. Hastanede yatan hastaların %20 'sinde; psödomembranöz koliti olan hastaların ise %95-100' ünde dışıda *C. difficile* pozitif olarak bildirilmektedir. *C. difficile* ilişkili kolit en yaygın görülen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir (6).

C. difficile'nin en önemli özelliklerinden biri ısı ve kuruluğa karşı dirençli spor oluşturması ve bu formların hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmesidir. Spor formları hastanelerde kolayca yayılabilmekte ve uzun dönem bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilmektedir (7).

C. difficile'nin toksin A ve toksin B üreten toksijenik suşları olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşları da vardır. Toksin üreten *C. difficile* suşları yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

Temel virülans faktörleri toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) potansiyel sitotoksik aktivite gösterir. Hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive ederler. Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekreteruar ishal oluşmasına neden olmaktadır (9). Etki mekanizmaları benzer olan bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücresine girmekte ve hücrede aktin iskeletini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Toksinlerin, aynı zamanda birtakım sitokinlerin salgılanmasına, böylece enflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açtıkları da anlaşılmıştır (10).

Son yıllarda, toksin A ve toksin B dışında "hipervirulent" ve florokinolona dirençli suşların neden olduğu *C. difficile* salgınları da görülmüştür (11).

C. difficile'nin tanımlanmasında hücre kültürü, sitotoksisite nötralizasyon testleri, toksijenik kültür, toksin-antijen tanımlama, nükleik asit amplifikasyon testleri ve toksin genlerinin tanımlanması gibi çeşitli laboratuvar tanı yöntemleri mevcuttur. Sitotoksik

kültür özel laboratuvar donanımı gerektiren, zaman alıcı emek yoğun bir yöntemdir (12). ELISA yöntemi daha ucuz, daha hızlı olduğu ve daha çabuk sonuç verdiği için tercih edilmektedir (13). ELISA yöntemi hızlı sonuçlanır, kullanımı kolaydır, ancak düşük duyarlılığa sahiptir (14).

Son yıllarda *C. difficile* toksin B genini doğrudan hedef alan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları geliştirilmiştir. Bu moleküler yöntem ELISA yöntemiyle karşılaştırıldığında daha yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahiptir.

C. difficile enfeksiyonlarına hızlı ve doğru bir şekilde tanı konması, hem hastaya hızlı tedavi başlanması bakımından hem de bakterinin hastane içi yayılımının önlenmesi açısından çok önemlidir (15).

Bu çalışmada hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gelen dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile saptanan *C. difficile* sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında *C. difficile* enfeksiyonu şüphesi olan kişilerden alınan 109 dışkı örneği gerçek zamanlı (RT)-PZR yöntemi ile test edilmiştir. Dışkı örnekleri test öncesi eğer hemen çalışılmayacaksa 2°C - 4°C arasında saklanmıştır. Analizler sırasında bakterinin yapısında bulunan toksin B genini (tcdB) saptamayı hedefleyen GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, AD) *C. difficile* test sistemi kullanılmıştır.

GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, AD) *C. difficile* test sistemi *C. difficile* şüphelenilen hastalardan gelen (sıvı veya yumuşak) dışkı örneklerinden toksin B gen dizilerinin hızlı tespiti için kullanılan in vitro tanı testidir. Otomatik RT-PZR kullanılır. Sistem testleri çalıştırmak ve sonuçları

görüntülemek için önceden yüklenmiş bir yazılımdır.

Kullanılan bir kartuş, reaktifleri ve numune işlem kontrollerini içerir. Numune işlem kontrolünde; SPC ve PCC olarak adlandırılan iki kontrol mevcuttur. **SPC: Sample Processing Control;** Hedef bakterilerin yeterli bir şekilde işlenmesini kontrol etmek ve test içindeki inhibitörlerin varlığını izlemek için kullanılır. **PCC: Probe Check Control;** Prob kontrolüdür. Reaktif rehidrasyonunu ve boya stabilitesini kontrol etmek için kullanılır. Kartuşta PCR tüpünün dolmasını, probu doğrular

Test çalışmasına başlarken örneği kartuşa eklemek için her ikisi ambalajından çıkarılıp dışı örneği alınmış eküvyon numune reaktifi içine yerleştirildi. Şişenin kapağı kapatılıp yüksek hızda 10 sn vorteksleildi. Kartuş kapağı açılıp temiz bir transfer pipeti ile numune reaktifinin tüm içeriği Xpert *C. difficile* test kartuşunun içine boşaltıldı. Reaktif 1, kullanılacak kartuşun birinci bölümüne, reaktif 2, kartuşun ikinci bölümüne eklendi. Tekrar vorteksleildi. Kartuş kapağı kapatılıp barkodu tarandı ve RT-PZR çalışması için GeneXpert cihazına yerleştirildi. Numuneyi kartuşa ekledikten sonra 30 dakika içinde test başlatıldı. İşleminin sonunda elde edilen veriler pozitif, negatif veya geçersiz olarak yorumlandı.

BULGULAR

Araştırmada 66 (% 61)'sı erkek, 43 (%39)'ü kadın hastalara ait toplam 109 örnek test edilmiştir. Örnek istenen hastaların 25 (%23)'ünün 65 yaş üstü 36 (%33)'sının 18 yaşın altında olduğu görülmüştür. Örneklerin 26 (%24)'sı yoğun bakım ünitelerinden, 60 (%55)'i servislerden ve 23 (%21)'ü polikliniklerden laboratuvarımıza gelmiştir. Test edilen 109 dışı örneğinden 9 tanesi (%8) *C. difficile* PZR testiyle toksin B pozitif bulunurken, 100 tanesinin (%92) negatif olduğu tespit edilmiştir.

Test sonucu pozitif olduğu saptanan 9 hastadan 6'sının 18 yaşın altında olduğu, bu hastaların birinin erkek, beşinin kadın oldukları belirlenmiştir. Hastaların dördü Çocuk Gastroenteroloji servisinde, ikisi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları servisinde tedavi altındaydı. Test sonucu pozitif çıkan üç hastadan biri 88 yaşında kadın hasta olduğu, Anestezi Yoğun Bakım'da bulunduğu, diğer ikisi ise 71 ve 87 yaşlarında erkek hastalar oldukları, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde tedavi gördükleri belirlenmiştir.

Tablo 1'de hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı, Tablo 2'de *C. difficile* GeneXpert PZR sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 1. Hastaların yaş-cinsiyet dağılımı

	Sayı	Yüzde
18 yaş altı	36	%33
65 yaş üstü	25	% 23
Kadın	43	%39
Erkek	66	% 61

Tablo 2. *C. difficile* GeneXpert PCR sonuçları

109 örnek	Sayı	Yüzde
<i>C. difficile</i> PCR POZİTİF	9	%8
<i>C. difficile</i> PCR NEGATİF	100	%92

TARTIŞMA ve SONUÇ

C. difficile, enfeksiyöz nazokomiyal ishallerde en sık tanımlanan ajandır. Antibiyotik kullanımının *C. difficile* ile ilişkili ishallerde en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (15). *C. difficile*'yi bu derece önemli yapan spor yapabilme özelliği ve sporlarının enfektivitelerini kaybetmeden çevrede uzun süre canlı kalabilmesidir. (16). Nükleik asit amplifikasyon testleri hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılık ve özgünlükleri nedeniyle *C. difficile* teşhisi için Amerika Birleşik Devletleri'nde tercih edilen yöntem haline gelmiştir (17,18). Dışkıda *C. difficile* toksin araştırması için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilmesidir. Doku kültürü ile toksin araştırılması zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir(19).

Japonya'da yapılan bir çalışmada dört aylık süre içinde çeşitli hastanelerde yatan 124.484 hastada PZR yöntemiyle dışkı kaynaklı *C. difficile* toksini araştırıldığı, toksin B pozitif 23 (% 13,8) izolat bulunduğu bildirilmiştir (20). Çalışmamızda ise 100 hastadan 9 (%8)'unda *C. difficile* toksin B saptanmıştır. Geranato ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, bizim de çalışmamızda kullandığımız Cepheid GeneXpert yöntemiyle çalışıldığı ve 310 örnekten 55 (%17,7)'inde *C. difficile* toksin B pozitif saptandığı belirtilmiştir (21).

Sadeghi Fard ve ark. tarafından yapılan çalışmada *C. difficile*'nin toksijenik suşlarının prevalansı %6,1, Lotfian ve ark., tarafından yapılan bir başka çalışmada ise %5,8 olarak bildirilmiştir (22, 23). Bu sonuçları bizim çalışmamızla kıyasladığımızda

oldukça düşük oranlar olarak değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada *C. difficile* diyare ile hastanede yatan hastaların %18,2'inden izole edilmiştir. Bu bizim çalışmamızla kıyaslandığında oldukça yüksek bir orandır (24). Garcia ve ark'ın Brezilya'da yaptığı bir çalışmada, ishallerde hastalarda toksijenik *C. difficile* suşlarının prevalansı %13,8 olarak bildirilmiştir (25). Sachu ve ark. Hindistan'da PZR ile 660 hastadan %9,7'inde *C. difficile* pozitif bulmuştur (26). Almanya'da yapılan bir çalışmada diyareli hastalarda *C. difficile* prevalansı %11,1 olarak saptanmıştır (27).

C. difficile'ye bağlı ishal sıklığını araştırmak için ülkemizde yapılan çalışmalarda toksin A-B pozitifliğinin %3,2 ile %24 arasında olduğu bildirilmektedir (5). Bu çalışmada *C. difficile* pozitiflik oranı %8 bulunmuş olup Türkiye'den bildirilen çalışmalar ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Kültür yöntemi, ELISA ve RT-PZR'ın karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda PZR yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Barbut ve ark. toplam 52 hastanın 38 (%32,5)'inde kültürü negatif olmasına rağmen PZR ile *C. difficile* pozitif saptadıklarını bildirmişlerdir (28).

150 hastanın sonuçlarının değerlendirildiği bir başka çalışmada PZR için duyarlılığın %99,1, kültür yöntemi için ise %51 olduğu belirtilmiştir (29). Bir Avrupa çalışmasında, duyarlılığın RT-PZR'de % 100, ELISA yönteminde % 58,8 olduğu bildirilmiştir (30).

Anaerop kültür yapma imkanı olan laboratuvarlarda *C. difficile* izolasyonu selektif besiyerleri kullanılarak yapılmakla birlikte, uzun zaman alması ve işlemin pahalı olmasından dolayı

çoğu laboratuvar tarafından tercih edilmemektedir. Ayrıca, rutin kültür ile üreyen *C. difficile* izolatlarının toksijenik olup olmadıklarının ayrımı yapılamamaktadır. Bu nedenle özgüllüğü %90'ın üzerinde olmasına rağmen çoğu laboratuvar rutinde kültürü tercih etmemektedir (31). Çalışmamızda gelen dışkıların anaerob kültürleri yapılmadığı için yöntem karşılaştırması yapılamamıştır.

Sonuç olarak *C. difficile* hastanede yatan hastalarda antibiyotikle ilişkili ishalin en sık görülen sebebi olarak değerlendirilmektedir. PZR ile hızlı ve doğru tanı konması tedaviye erken başlanması açısından önem taşımaktadır. Xpert CD testinin en önemli avantajı hızlilik ve uygulama kolaylığıdır. Test sadece 45 dakika sürer. Ayrıca hastanede kalış süresinin azalmasının toplam maliyet ve ekonomik yükü de azaltacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Salman E, Levent B, Karahan ZC. Toksin pozitif *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ve moleküler karakterizasyonu: Türkiye'den Hipervirülan Suşların Varlığı ile İlişkili İlk Bildirim. Mikrobiyol Bul 2017; 51(3): 236-46.
2. Jamal W , Pauline EM, Rotimi VO. Comparative performance of the GeneXpert *C. difficile* PCR assay and *C. diff* Quik Chek Complete kit assay for detection of *C. difficile* antigen and toxins in symptomatic community-onset infections. Int J Infect Dis 2014; 29: 244-8
3. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *C. difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog. 1995;19(4): 203-13.
4. Sambol SPMM, Merrigan D, Lyerly DN Gerding, Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *C. difficile* that causes human clinical disease. Infect. Immun 2000;68(10): 5480-7
5. Kostul H, Delialioğlu N, Horasan EŞ, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Hastanede yatan ishalleri hastaların dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 183 - 90
6. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *C. difficile*. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3601-5

7. Kılıç A. C. *difficile* Enfeksiyonu: Epidemiyoloji, Risk Faktörleri, Patogenez, Klinik Özellikler, Tanı ve Tedavi. Mikrobiyol Bul 2013; 47(3): 556-66.
8. Fawley WN, Parnell P, Verity P, Freeman J, Wilcox MH. Molecular epidemiology of endemic *C. difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom Epidemic Strain (PCR Ribotype 1). J Clin Microbiol 2005; 43(6): 2685-96
9. Johnson S. Recurrent *C. difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 2009; 58(6): 403-10.
10. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen *C. difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1): 1-10.
11. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. tcdC genotypes associated with severe TcdC: truncation in an epidemic clone and other strains of *C. difficile*, J Clin Microbiol. 2007 ;45(1):215-21.
12. Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GenOhm C diff real-time PCR assay with two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *C. difficile* infection. J Clin Microbiol 2010; 48(1): 109-14.
13. Kim H, Jeong SH, Kim M, Lee Y and Lee K. Detection of *C. difficile* toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of *C. difficile* infection. J Med Microbiol 2012; 61: 274-7.
14. Wilcox MH. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *C. difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2012; 18(6): 13-20.
15. Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E, Sınırtas M, Alver O, Heper Y, et al. Nosocomial diarrhea and *C. difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. Med Mal Infect 2009; 39(6): 382-7.
16. Delmee M, Broeck JV, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *C. difficile* associated diarrhoea: a plea for culture. J Med Microbiol 2005; 54: 187-91.
17. Tunçcan ÖG, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda *C. difficile* toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 573-83.
18. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *C. difficile* infections. Am J Gastroenterol.2013; 108(4): 478-98.
19. Özinel MA. Hastane infeksiyonu etkeni olarak *C. difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 2001; 5(3): 251-4.
20. Tokimatsu I, Shigemura K, Osawa K, Kinugawa S, Kitagawa K, Nakanishi N et al. Molecular Epidemiologic Study of *C. difficile* Infections in University Hospitals: Results of a Nationwide Study in Japan. J Infect Chemother. 2018; 24(8): 641-7.
21. Granato PA, Hansen G , Herding E , Chaudhuri S , Tang S , Garg SK et al. Performance comparison of the cobas Liat and Cepheid GeneXpert systems for *C. difficile* detection. PLoS ONE 2018;13(7): 1-7.
22. Sadeghifard N, Salari M, Ghassemi M, Shirazi M, Feizabadi M, Kazemi B, et al. Prevalence of *C. difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients with nosocomial diarrhea. Iran J Public Health 2005; 34(4): 67-72.
23. Lotfian S, Douraghi M, Aliramezani A, Ghourchian S, Sarrafnejad A, Zeraati H. Detection of *C. difficile* in Fecal Specimens: a comparative evaluation of nucleic acid amplification test and toxigenic culture. Clin Lab 2016; 62(10): 1887-92.
24. Gorenek L, Dizer U, Besirbellioglu B, Eyigun C, Hacibektasoglu A, Van Thiel D. The diagnosis and treatment of *C. difficile* in antibiotic-associated diarrhea. Hepatogastroenterology 1999; 46(25): 343-8.
25. Garcia LB, Uzeda MD. Occurrence of *C. difficile* in fecal samples of children in Rio de Janeiro RJ,Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1988; 30(6): 419-23.

26. Sachu A, Dinesh K, Siyad I, Kumar A, Vasudevan A, Karim S. A prospective cross sectional study of detection of *C. difficile* toxin in patients with antibiotic associated diarrhoea. Iran J Microbiol 2018; 10(1): 1- 6.
27. Arvand M, Ruscher C, Bettge-Weller G, Goltz M, Pfeifer Y. Prevalence and risk factors for colonization by *C. difficile* and extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in rehabilitation clinics in Germany. J Hosp Infect 2018; 98(1): 14-20.
28. Barbut F, Monot M, Rousseau A, Cavelot S, Simon T, Burghoffer B, et al. Rapid diagnosis of *C. difficile* infection by multiplex real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(10): 1279-85.
29. Berry N, Sewell B, Jafri S, Puli C , Vagia S, Lewis A M, et al. Real-time polymerase chain reaction correlates well with clinical diagnosis of *C. difficile* infection. J Hosp Infect 2014;87(2):109-14.
30. Jong E, Jong AS, Bartels CJ, Biggelaar C, Melchers WJ, Sturm PD. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *C. difficile* toxin A and B genes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(9): 2219-25.
31. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *C. difficile* infection in long-term care facilities: a review. J Am Geriatr Soc 2010; 58(8): 1556-64.