

***Clostridium difficile* Enfeksiyonu: Epidemiyoloji, Risk Faktörleri, Patogenez, Klinik Özellikler, Tanı ve Tedavi**

***Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Clinical Features, Diagnosis and Therapy**

Abdullah KILIÇ

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
Gulhane Military Academy of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.12.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 26.03.2013

ÖZET

Clostridium difficile gram-pozitif, spor oluşturan anaerobik bir bakteridir. *C. difficile* antibiyotik ile ilişkili ishal ve kolitlerin en önemli nedenidir. *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) klinik spektrumu, hafif ishalden toksik megakolon, ileus, bağırsak perforasyonu ve psödomembranöz koliti içeren şiddetli intestinal hastalık tablosuna kadar oldukça değişken seyretmektedir. İleri yaş, hastanede kalış süresi ve özgün antibiyotiklere maruz kalma CDE için en yaygın risk faktörleridir. *C. difficile*'nin temel virülans determinantları toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) olup, CDE tanısı dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A ve/veya toksin B'nin tespit edilmesine dayanmaktadır. *C. difficile* ve toksinleri tespit etmek için günümüzde çeşitli laboratuvar testleri geliştirilmiştir. Hücre kültürü sitotoksite ve toksijenik kültür yöntemleri *C. difficile* toksinlerinin tespitinde referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak her iki yöntem de uygulanması güç, zaman alıcı ve uzman personel gerektiren yöntemlerdir. Bu nedenle çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında daha pratik ve hızlı olan enzim temelli immünojenik yöntemler, glutamat dehidrojenaz antijen testleri ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır. CDE tedavisinde ilk seçilecek antibiyotikler metronidazol ve vankomisinidir. Bu derleme yazıda, CDE epidemiyolojisi, klinik özellikleri, risk faktörleri, patojenitesi, tanı testleri ve tedavisi özetlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Clostridium difficile*; enfeksiyon; epidemiyoloji; patogenez; risk faktörü; tanı; tedavi.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium. *C. difficile* is the leading cause of antibiotic associated diarrhea and colitis. The clinical spectrum of *C. difficile* infection (CDI) is highly variable, ranging from mild diarrhea to severe forms of intestinal illness including toxic megacolon, ileus, bowel perforation, and pseudomembranous colitis. Advanced age, long duration of hospitalization, and exposure to certain antimicrobial agents are the most common risk factors for CDI. The main virulence determinants of *C. difficile* are toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin). Diagnosis of CDI is based on the identification of *C. difficile* toxin A or B in diarrheal stool. Various laboratory tests have been currently developed for the detection of *C. difficile* or its toxins in stool samples. The cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture have been regarded as the reference standard methods for the detection of *C. difficile* toxins. However, both of the reference methods are laborious, time consuming, and need expert personnel. Therefore, many microbiology laboratories use enzyme immunoassays, glutamate dehydrogenase antigen tests and real-time polymerase chain reaction (PCR) which are more rapid and practical. First-line antibiotics for CDI treatment are metronidazole and vancomycin. In this review, epidemiology, clinical spectrum, risk factors, pathogenesis, diagnostic methods and treatment of CDI have been summarized.

Key words: *Clostridium difficile*; infection; epidemiology; pathogenesis; risk factors; diagnosis; therapy.

GİRİŞ

Clostridium difficile gram-pozitif, spor oluşturan anaerobik bir basildir. Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-30'undan sorumlu tutulmaktadır. *C. difficile* ilk kez 1935 yılında sağlıklı bebeklerin dışkı florasından izole edilmiş ve izolasyonun zor olmasından dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiştir. *C. difficile*'nin en önemli özelliklerinden biri ısı ve kuruluğa karşı dirençli spor oluşturmaları ve bu formların hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmesidir¹. Spor formları hastanelerde kolayca yayılabilmekte ve uzun dönem bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilmektedir². Bu yazıda *C. difficile* enfeksiyonu (CDE), epidemiyolojisi, risk faktörleri, patojenitesi, kliniği, tanısı ve tedavisi yönünden tartışılmaktadır.

EPİDEMİYOLOJİ

Son yıllarda CDE, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada ve çoğu Avrupa ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bakteri %2-3 oranında sağlıklı kişilerin, %40-60 oranında da özellikle hastanede doğmuş olan yenidoğanların kolon florasında metabolik inaktif spor formunda bulunabilmektedir. İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabilirler³. 2000'li yılların başlarında CDE epidemiyolojisi dramatik olarak değişmiştir. Hastalığın sadece insidansı artmış, şiddeti de artmıştır. Kanada'da 1991 ile 2003 yılları arasında CDE insidansı her 100.000 kişiye 35.6 olgudan 156.3 olguya çıkmıştır. Kasım 2004 ile Nisan 2005 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışmada insidansın her 1000 hastada 4.6 olgu olduğu bildirilmiştir⁴. ABD'de de aynı şekilde artan bir CDE insidansı ve hastalık şiddeti bildirilmiştir. Bu oranlar 1996 ile 2003 yılları arasında neredeyse iki katına çıkmıştır. Hem Kanada hem de ABD'de epidemik izolat olarak bilinen ribotip 027 en sık izole edilen ribotip olmuştur. Ribotip 027 diğer izolatlardan 16-23 kat daha fazla toksin A ve B salgılamakta-

dır ve üçüncü toksin olan *binary* toksin oluşturmaktadır. Şu ana kadar ABD'nin 40 eyaletinden ve Kanada'dan ribotip 027 nedenli olgular ve salgınlar bildirilmiştir⁵. Ribotip 027 haricinde ABD'de ribotip 106 ile oluşan CDE ve salgınları artan oranda bildirilmeye başlanmıştır².

Avrupa'da da CDE artan oranda bildirilmeye başlanmıştır. 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 çalışma yapılmıştır. CDE insidansının 14 ülke arasında 10.000 hastada 0.13 ile 7.1 olgu arasında değiştiği ve 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 ifade edilmiştir. Aynı çalışmada ülkeler arasında da farklı ribotiplerin yaygın olduğu bildirilmiştir. Fransa'da 014, Almanya'da 168 ve 001, İngiltere'de 077, İrlanda'da 017 ve 156, İtalya'da 020, Hollanda'da 027, Polonya'da 017, İspanya'da 001, İsviçre'de 002 en yaygın izole edilen ribotipler olmuştur. Türkiye'de izole edilen sekiz izolat ribotip 001 olarak bildirilmiştir⁶. 2007 yılında yapılan bir araştırmada, 11 Avrupa Birliği ülkesi ve İsviçre'de 027 ribotipinin en etkili ribotip olduğu ve 027 prevalansının ülkeler arasında %11-100 arasında değiştiği vurgulanmıştır⁷. Çalışmadan bir yıl sonra *C.difficile* 027, 16 Avrupa ülkesinde salgınlara, Danimarka, İsveç, Norveç, Macaristan, Polonya, Avusturya ve İspanya gibi ülkelerde ise sporadik olgulara neden olmuştur⁵. 2008 yılında 34 Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan çalışmada CDE insidansının ortalama her 10.000 hasta gününde 4.1 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 65 farklı ribotip bulunmuş ve en sık olarak ribotip 014/020 (%16), 001 (%9), 078 (%8) ve 027 (%5) izole edilmiştir⁸. Son dönemlerde ribotip 027 Avusturalya, Kore, Singapur, Hong Kong, Japonya ve Kosta Rika'dan bildirilmiştir⁹. Diğer bazı ülkelerde de farklı ribotiplerin yaygın olarak bildirildiği görülmüştür. Kore'de yapılan çalışmada ribotip 018 (%26.4)¹⁰, İran'da ribotip 078 (%21)¹¹, Hong Kong'da ribotip 002 (%10.1)¹², en sık olarak bildirilen ribotipler olmuştur.

Hastane kaynaklı enfeksiyonların yanında toplum kaynaklı *C.difficile* tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır. ABD'de her yıl 100.000 kişide 6.9 ile 46 arasında değişen toplum kaynaklı *C.difficile* olgusu saptanmaktadır. Retrospektif bir çalışmada Kuzey Carolina'da toplum kaynaklı *C.difficile* oranının 2005 yılında %20 olarak tahmin edildiği ve bu oranın Avrupa ve Kanada'da benzer olduğu bildirilmiştir¹³.

RİSK FAKTÖRLERİ

C.difficile enfeksiyonunun gelişiminde ileri yaş, hastanede yatış ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Özellikle klindamisin, geniş spektrumlu sefalosporin veya florokinolon grubu antibiyotiklerin kullanılması bunların içinde en önemli risk faktörü olarak bilinmektedir¹⁴. Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmakta ve baskın hale geçen *C.difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksin salgılamaktadır¹⁵. Aztreonam gibi kolon florasındaki mikroorganizmaları etkilemeyen antibiyotiklerin kullanılması CDE için risk oluşturmamaktadır. Piperasilin-tazo-

baktam gibi antibiyotikler ise çoğu *C.difficile*'ye karşı etkili olduklarından daha az sıklıkla antibiyotik ile ilişkili ishale neden olmaktadır². İleri yaş (≥ 65) da, CDE için önemli risk faktörlerinden biridir. Bunun genel olarak yaşlılıkla birlikte toksinlere karşı oluşan immün sistemde zayıflamaya bağlı geliştiği düşünülmektedir. Hastanede bir hafta yatan hastalarda *C.difficile* ile kolonize olma oranı %15 iken, üç hafta kalan hastalarda bu oran %45'e çıkmaktadır¹⁵. Bu üç risk faktörü haricinde, proton pompa inhibitörü kullanılması, inflamatuvar bağırsak sendromu, immün süpresyon, tüp ile beslenme, kronik karaciğer hastalığı ve son dönem böbrek yetmezliği de CDE gelişimi için risk faktörlerindendir¹.

PATOGENEZ

C.difficile enfeksiyonlarında temel virülans faktörleri geniş klostridial sitotoksin ailesinin iki üyesi olan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)'dir. Her iki toksin de potansiyel sitotoksik aktivite gösterir ve 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 sekretuar ishal oluşmasına neden olmaktadır. Önceki çalışmalarda toksin A'nın CDE oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmekteyken, yapılan deneysel hayvan çalışmalarında toksin A negatif ve toksin B pozitif *C.difficile* izolatlarının da ciddi bir hastalık tablosu oluşturdukları görülmüştür. Bu çalışmalar, toksin B'nin toksin A gibi enterotoksin etkisi gösterdiğini ve hastalık oluşumunda esas faktör olduğunu düşündürmüştür¹⁶. Bu toksinler patojenik lokus olarak isimlendirilen genom bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır. Bu bölge, toksin A ve B'nin sentez ve düzenlenmesini sağlayan *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olmak üzere beş gen içermektedir. Patojenik olmayan *C.difficile* izolatları patojenik lokus gen bölgesini içermemektedir¹⁶. Yapılan çalışmalar TcdR'nin toksin gen ekspresyonunda önemli bir alternatif sigma faktörü olduğunu, TcdC'nin ise negatif bir düzenleyici olduğunu göstermiştir. TcdC, gen ekspresyonu için gerekli olan kor RNA polimeraz ile TcdR arasındaki ilişkiyi engelleyerek etkisini göstermektedir. Bu yüzden TcdC anti-sigma faktör olarak bilinmektedir. TcdE'nin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerden toksin salınımında etkili olduğu düşünülmektedir¹⁷. Virülans özelliği yüksek izolatlar, toksin A ve B haricinde aktine özgül ADP riboziltransferaz olan *binary* toksin veya CDT isimli üçüncü bir toksin üretmektedirler. Bu toksin patojenik lokus dışındaki CDT lokus bölgesinde bulunan *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanmaktadır. Hastalık oluşumunda bu toksinin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar, *binary* toksinin kolon hücre yüzeylerine klostridial yapışmayı artırmak için hücrelerinin dış yüzeylerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. Bu bulgular *binary* toksinin daha şiddetli hastalık oluşumunda önemli bir kolonizasyon faktörü olduğunu düşündürmüştür¹⁶.

KLİNİK ÖZELLİKLER

Antibiyotik ile ilişkili ishal semptomları antibiyotik tedavisi esnasında veya tedavi sonlandıktan sonraki sekiz hafta içinde ortaya çıkabilmektedir¹⁴. Hastalık asemptomatik kolonizasyondan, orta derece ishal, fulminant kolit ve hatta ölüme kadar giden klinik tablolar ile kendini gösterebilmektedir¹⁸.

Aseptomatik Kolonizasyon

Aseptomatik kolonizasyonda kolon *C.difficile* ile kolonizedir, ancak ishal gibi klinik bulgular oluşmamaktadır. Yapılan kültürde toksin pozitif *C.difficile* üremesi olmaktadır. Özellikle hastanelerin yüksek riskli bölümlerinde yatan ve antibiyotik alan hastaların %10-16'sı *C.difficile* ile kolonize hale gelebilmektedir¹⁶.

***Clostridium difficile* İshali**

Sıklıkla karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette ishal ile kendini göstermektedir. Halsizlik ve ateş nadir de olsa görülebilmektedir. Antibiyotik tedavisi esnasında, kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra oluşabilmektedir. En önemli laboratuvar bulguları lökositöz ve hipoalbüminemidir¹⁶.

***Clostridium difficile* Koliti**

En sık görülen CDE tablosudur. Psödomembranöz olmasa da klinik ciddi seyredebilmektedir. Hastalarda hafif ve orta şiddette karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık ve sulu ishal vardır. Sigmoidoskopide özgül olmayan yaygın veya yama tarzında psödomembransız eritematöz kolit tablosu görülebilmektedir¹⁶.

Psödomembranöz Kolit

C.difficile kolitinin klasik tipi olarak bilinmektedir. *C.difficile* kolitinden daha ağır seyreder; hastalarda şiddetli ishal ile birlikte sağ veya sol alt kadranda yoğun bir rahatsızlık hissi vardır. Hastaların endoskopik muayenelerinde genellikle kalın bağırsak proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı şeklinde ve kolorektal mukoza boyunca psödomembran dağılımları görülebilmektedir. Laboratuvar bulgusu olarak beyaz kan hücresi sayısı 20.000/μl üzerinde albümin seviyesi ise 3.0 g/dl veya daha az olarak izlenmektedir¹⁹.

Fulminant *C.difficile* Enfeksiyonu

Bu tablo ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüm gibi ciddi komplikasyonla seyredebilmekte ve CDE'li hastaların %2-3'ünde görülebilmektedir¹. Hastalar birkaç saat gibi kısa zaman içinde veya haftalar içinde fulminant CDE tablosuna girebilir. Burada hastanın yaşı, immün durumu, altta yatan başka hastalıkları ve bakterinin toksin durumu etkili olmaktadır. Hastalarda ishal, alt kadranda veya yaygın karın ağrısı ile birlikte şişkinlik vardır. Bazı hastalarda yüksek ateş, üşüme ve titreme belirtileri olabilmektedir. Zayıf prognozlu hastalarda peritonit belirtisi olabilecek şiddetli karın ağrısı veya 50.000/μl üzerinde beyaz kan hücre seviyesi veya 5 mmol/l üzerinde laktat seviyesi vardır. Hastalığın kontrol altına alınmasında erken tanı ve tedavi büyük önem taşımaktadır¹⁶.

Rekürrent CDE

Vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkması tablosu rekürrent CDE olarak adlandırılır. CDE'li hastaların %20'sinde rekürrent görülmektedir. Birinci rekürrentten sonra olguların %40'ında ikinci rekürrent, ikinci rekürrent oluşan hastaların %60'ında üçüncü rekürrent

görülebilmektedir. Rekürent olguları orijinal izolat veya farklı izolat ile oluşabilmektedir. Antibiyotik kullanmaya devam etme, antiasit kullanılması ve ileri yaş rekürent CDE gelişiminde risk faktörü olarak bilinmektedir¹.

C.difficile enfeksiyonlarında kolon dışı kan akımı enfeksiyonu, yara ve eklem enfeksiyonu gibi klinik bulgular oluşabilmektedir. Ayrıca irritabl bağırsak hastalığı ve reaktif artrit gibi reaktif veya postenfeksiyöz sendromlar ortaya çıkabilir¹⁶.

TANISAL TESTLER

Doğru, güvenilir ve hızlı tanı özellikle hastane kaynaklı CDE'lerin kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir. CDE tanısı, klinik özellikler ve laboratuvar testleri temelinde olmaktadır. Sadece toksin A ve/veya toksin B üreten isolatların hastalık yapma yeteneğinin olmasından dolayı dışkı örneklerinden toksinlerin tespit edilmesi tanıda önemli bir kriterdir. Hastanede antibiyotik ile ilişkili ishal gelişen hastaların yaklaşık %30'unda neden CDE olduğu için eğer uygun tanı testleri varsa, tanı testi yapmadan ampirik tedavi uygulanması uygun değildir²⁰. Hastalarda 36 saatte en az altı sulu ishal, 48 saat içinde sekizin üzerinde şekilsiz ishal veya iki gün için günde üç şekilsiz ishal olması klinisyenlere CDE varlığını düşündürmelidir²¹. Hücre kültürü sitotoksitesite yöntemi ve toksijenik kültür CDE tanısında referans yöntemler olarak bilinmektedir. 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 dehidrojenaz (GDH) ve toksinleri tespit eden enzim temelli immünolojik yöntemleri tercih etmektedir. Son dönemlerde ise direkt olarak klinik örnekten etkeni tanımlayan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri geliştirilmiştir²².

Örneklerin Toplanması ve Taşınması

Dışkı örnekleri alınır alınmaz laboratuvara steril kuru kapta 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. Eğer birinci örnek negatif ise ilave ishal örneği ile testin tekrarlanması faydalı olabilir. Üç farklı dışkı örneğinin test edilmesi pozitiflik olasılığını %10 civarında artırmasına rağmen maliyeti yükselttiğinden dolayı tavsiye edilmemektedir^{20,21}.

Enzim Temelli İmmünolojik Yöntemler (EIA)

İlk kez 1984 yılında *C.difficile* toksin A veya toksin A ve B'yi tespit etmek için kullanılmıştır²³. Referans yöntem ile karşılaştırıldıklarında hızlı, teknik olarak kolay ve düşük maliyetli oldukları için ABD'deki laboratuvarların %90'dan fazlasında kullanılmaktadırlar²⁰. EIA ile yapılan çalışmalarda, referans yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığın düşük, özgüllüğün ise duyarlılıktan daha yüksek olduğu görülmüştür. Eastwood ve arkadaşları²⁴ 600 dışkı örneği ile yaptıkları çalışmada, testlerin duyarlılıklarını %60-81, özgüllüklerini ise %91-99.4 arasında bildirmişlerdir. Crobach ve arkadaşları²², 13 farklı ticari EIA ile toksin A ve/veya toksin B tespit eden 34 çalışmayı değerlendirmişler; testlerin duyarlılıkları

nın %31-99, özgüllüklerinin ise %65-100 arasında olduğunu belirlemişlerdir. Turgeon ve arkadaşları²⁵, altı ticari EIA testini referans yöntem ile karşılaştırmışlar ve duyarlılığın %55-89, özgüllüğün ise %89-99 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

C.difficile toksinleri dışında, hem toksin oluşturan hem de oluşturmeyen *C.difficile* suşlarının ürettiği metabolik enzim olan GDH'yı tespit eden EIA testleri de vardır²⁶. Çoğu laboratuvar ilk basamağında GDH testi olan iki basamaklı algoritmayı kullanmaktadır. Bu algoritmada ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise takibinde toksin testi yapılması gerekmektedir. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise, ya hasta toksijenik olmayan bir *C.difficile* taşımakta veya toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir. Her iki test de pozitif ve hasta da semptomatik ise CDE tanısı konulmaktadır²⁷. Şu an piyasada hem GDH, hem de toksini tespit eden ve 30 dakikada sonuç veren C. Diff Quick Chek Complete (Techlab, ABD) kiti mevcuttur. Vasoo ve arkadaşları²⁸ 192 dışkı örneği ile yaptıkları çalışmada, C. Diff Quick Chek Complete testinin GDH komponentinin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %95.8 ve %89.6, toksin komponentinin duyarlılık ve özgüllüğünü ise sırasıyla %79.2 ve %100 olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada, 200 dışkı örneği C. Diff Quick Chek Complete testi ile araştırılmış ve her iki testin beraber olarak duyarlılığının %70.8 ve özgüllüğünün %97.4 olduğu bildirilmiştir²⁹.

Kültür

Kültür CDE tanısında kullanılan önemli yöntemlerden biridir ve salgın araştırmaları ve hastane izolatlarının epidemiyolojik amaçlı incelenmesinde esastır. Laboratuvarlarda genellikle *C.difficile* kültürü için sikloserin, sefoksitin ve fruktoz içeren selektif agar (CCFA) kullanılmaktadır. Bu besiyerine sporların üremelerini artırmak için taurakolat ve lizozim ilave edilebilmektedir. Kullanmadan önce agar plaklarını anaerobik ortamda tutmak bakterinin üremesini artırmaktadır. *C.difficile*, agar yüzeyinde düz yüzeyli, sarı, buzlu cam görünümünde ve etrafında sarı hale olan koloniler oluşturur. Kolonilerin tipik para-kresol (at ahır kokusuna benzer) kokusu vardır ve Wood ışığında floresan vermektedirler. Gram boyamada koloniler tipik olarak gram-pozitif veya değişken basil olarak görülmektedir. CCFA haricinde sikloserin mannitol kanlı agar (CMBA) ve çeşitli kan ürünlerinin ilavesi ile hazırlanmış sikloserin, sefoksitin agarlar da *C.difficile* izolasyonunda kullanılmaktadır²¹. 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 etmemektedir¹⁴. Organizma izole edildikten sonra toksin üretilip üretilmediğinin hücre kültürü sitotoksiste yöntemi veya PCR ile tespit edilmesi işlemine toksijenik kültür yöntemi adı verilmektedir³⁰.

Hücre Kültürü Sitotoksiste Yöntemi

Uzun dönemdir hücre kültürü sitotoksiste yöntemi klinik örneklerde toksin (toksin B) varlığını direkt olarak gösterdiği için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yön-

temle toksin B'nin 1.0 pg miktarı tespit edilebilir. Toksin varlığının *C.difficile* veya çapraz reaksiyon veren *Clostridium sordellii* antitoksini ile doğrulanması gerekmektedir. Sitotoksin tespitinde Vero, Hep 2, HeLa ve MRC-5 akciğer fibroblast hücre kültürleri kullanılmaktadır¹⁹. Özgüllüğü > %97, duyarlılığı %75-85 arasında olmasına rağmen, pahalı, zaman alıcı olması ve iyi gelişmiş laboratuvar gerektirdiğinden rutin laboratuvarlar tarafından tercih edilmemektedir¹⁴.

Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri

Nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleri *C.difficile* tanısında son dönemlerde sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde PCR ve *loop-mediated* izotermal amplifikasyon (LAMP) temelli yöntemler kullanılmaktadır. ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA); BD-GeneOhm Cdiff (BD, Franklin Lakes, New Jersey), Prodesse ProGastro Cd (Gen-Probe, Inc. San Diego, CA), Cepheid GeneXpert *C.difficile* (Cepheid, Sunnyvale, CA) ve Illumigene *C.difficile* (Meridian Diagnostics, Inc., Ohio) yöntemleri için onay vermiştir. Bu yöntemlerden ilk üçü gerçek zamanlı PCR temelli ve toksin B'yi tespit ederken, dördüncü test LAMP temellidir ve toksin A'yı tespit etmektedir²⁷. BD-GeneOhm Cdiff yönteminde manuel DNA ekstraksiyonu sonunda Cepheid SmartCycler cihazı ile amplifikasyon işlemi yapılmakta ve iki saat sonunda sonuç alınmaktadır. ABD'deki laboratuvarlarda en çok çalışılan moleküler testtir. Duyarlılığı %84-96, özgüllüğü ise %94-99 arasında değişmektedir¹⁶. ProGastro CD yönteminde, DNA izolasyonu bioMerieux NucliSENS easyMAG otomatik sistemi ile, amplifikasyon işlemi ise Cepheid SmartCycler II cihazında yapılmakta; sonuçlar yaklaşık 4 saatte alınmaktadır. Çalışmalarda duyarlılığı %77.3-95.7, özgüllüğü ise %99-100 olarak bildirilmiştir^{31,32}. Cepheid GeneExpert yöntemi GeneExpert cihazında gerçekleştirilmektedir. Eküvyon ile alınan dışkı örneği önce tampon içeren şişeye konulur, vortekslenir ve buradan alınarak kartuştaki örnek bölümüne aktarılır. DNA ekstraksiyonu, PCR ve tespit işlemlerinin hepsi kartuş içinde gerçekleşir; sonuçlar yaklaşık 29 dakika sonra elde edilir. Yapılan çalışmalar, bu yöntemin duyarlılığını %94-100, özgüllüğünü %93-99 olarak vermektedir³⁰. FDA tarafından onaylanmış diğer yöntem LAMP temelli Illumigene yöntemi olup, diğerlerinden farklı olarak toksin A'yı tespit etmekte ve DNA'yı çoğaltmak için gerçek zamanlı PCR teknolojisi kullanmamaktadır. PCR ile karşılaştırıldığında, basit, hızlı, özgül ve ucuz bir yöntemdir. LAMP teknolojisinde uygun primerlerin kullanımı ile DNA amplifikasyonu belirli bir ısı altında (60-65°C), termal döngü cihazı gerektirmeden olmaktadır. Ortamda bulunan polimeraz enzimi ile çift zincir DNA'lar pirofosfat iyonları oluşturmakta, oluşan pirofosfat iyonları ortama ilave edilen manganiz ile reaksiyona girerek, floresan metal indikatörü olan kalsein yardımıyla görünür hale gelmektedir. 30-60 dakikada oluşan renk değişikliği basit bir türbidimetre ile veya çıplak gözle tespit edilebilmektedir. Illumigene yönteminin duyarlılığı %93.3-95.2, özgüllüğü ise %96.6-99.7 arasında değişmektedir^{33,34}.

C.difficile enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı, hem hasta hem de bakterinin hastane içi yayılımının önlenmesi açısından önemlidir. Standartlar, sulu veya yarı katı dışkı örneklerinin önce GDH testi yapılması sonra da doğrulamak için toksijenik kültür veya hücre kültürü sitotoksiste yöntemi yapılmasını önermektedir. Amerika Mikrobiyoloji Cemiyeti ise tek başına NAA yöntemlerinin kullanılmasını desteklemektedir³⁵.

TEDAVİ

Tedavide en önemli yaklaşım hastalığa neden olduğu düşünülen antibiyotiğin kesilmesidir. Orta şiddetteki CDE'nin %25'inde 48 saat içinde semptomlarda azalma görülmektedir. Hastalara sıvı ve elektrolit takviyesi yapılmalıdır. Eğer antibiyotiğe devam edilmesi zorunlu ise klindamisin, sefalosporinler veya geniş spektrumlu penisilin dışı antibiyotiklerin tercih edilmesi önerilmektedir. Antiperistaltik ajanlardan kaçınılması gerekmektedir. Hafif ve orta şiddetteki olgularda başlangıç tedavisi olarak 500 mg oral metronidazolün günde üç kez, 10-14 gün kullanılması önerilmektedir. Metronidazol intoleransı veya alerjisi olan hastalar, hamile veya emziren kadınlar ile şiddetli enfeksiyonu olan hastalar, 125 mg oral vankomisini günde dört kez, 10-14 gün kullanmalıdır. Eğer olgunun durumu ciddi ve komplike ise, 500 mg oral vankomisin günde dört kez veya nazogastrik tüp artı 500 mg IV metronidazol her sekiz saatte bir verilmelidir^{36,37}. Fidaksomisin, *C.difficile*'ye etkili yeni bir geniş spektrumlu makrolid antibiyotiktir. FDA, Mayıs 2011 tarihinde fidaksomisinin *C.difficile* nedenli ishallerin tedavisinde kullanımına onay vermiştir. Tedavi maliyeti yüksek olmasına rağmen, yüksek riskli gruptaki hastalarda rekürent CDE oranını düşürdüğü için önemli bir antibiyotiktir. Doz olarak günde iki kez 200 mg oral olarak 10 gün önerilmektedir³⁷. CDE tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak probiyotikler, intestinal mikrobiyal flora transferi ve immünoterapi gibi tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Probiyotiklerin kullanılmasının özellikle kolon florasının dengesini sağlayarak CDE önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Fekal transplantasyon da, alternatif tedavi yaklaşımı olarak yine kolon florasını tamir etmek amacıyla sağlıklı vericilerden alınarak uygulanmaktadır. *C.difficile* kolonizasyonunda immün yanıt önemli olduğundan intravenöz immünglobulinler tedavi amaçlı olarak hastalara uygulanabilmektedir³⁸.

SONUÇ

C.difficile enfeksiyonlarının son zamanlarda tüm dünyada hem sıklığı hem de şiddeti artmıştır. Hastalığın risk faktörleri iyi bilinmekte olup, klinisyenlerin bu risk faktörlerine göre hastaları değerlendirmeleri önerilmektedir. Tanıda hızlı ve güvenilir testler mevcut olmasına rağmen optimal özgüllük sorunları yaşanabilmektedir. İlk seçilen ajan olan metronidazole karşı tedavi başarısızlığının artmasından dolayı yeni geliştirilen ilaçlar ile tedaviye yönelik çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10(6): 581-92.
2. Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8(1): 17-26.
3. Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. Lancet 2008; 371(9623): 1486-8.
4. Gravel D, Miller M, Simor A, et al. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. Clin Infect Dis 2009; 48(5): 568-76.
5. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 529-49.

6. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I; European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 2007; 13(11): 1048-57.
7. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, et al. Update of *Clostridium difficile* associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro Surveill 2007; 12(6): E1-2.
8. 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.
9. Tschudin-Sutter S, Widmer AF, Perl TM. *Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease. Curr Opin Infect Dis 2012; 25(4): 405-11.
10. Kim J, Kang JO, Kim H, et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in a tertiary-care hospital in Korea. Clin Microbiol Infect 2013; 19(6): 521-7.
11. Jalali M, Khorvash F, Warriner K, Weese JS. *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. BMC Res Notes 2012; 21(5): 159.
12. Cheng VC, Yam WC, Lam OT, et al. *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(11): 1371-81.
13. O'Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. Curr Opin Gastroenterol 2011; 27(1): 38-47.
14. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. J Am Geriatr Soc 2010; 58(8): 1556-64.
15. Leclair MA, Allard C, Lesur O, Pépin J. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. J Intensive Care Med 2010; 25(1): 23-30.
16. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 2009; 58(6): 403-10.
17. Carter GP, Rood JL, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. Trends Microbiol 2012; 20(1): 21-9.
18. Barnett JS. *Clostridium difficile*: a new look at an old but increasingly deadly infection. JAAPA 2012; 25(1): 32-6.
19. Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. Indian J Med Res 2010; 131: 487-99.
20. 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): 431-55.
21. 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.
22. 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): 1053-66.
23. 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): 781-8.
24. 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(10): 3211-7.
25. Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, et al. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 667-70.
26. 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): 194-8.
27. Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. Annu Rev Microbiol 2011; 65: 501-21.

28. Vasoo S, Stevens J, Portillo L, et al. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Microbiol Immunol Infect 2012 [Epub ahead of print].
29. Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, Nguyen A, Jackson MA, Selvarangan R. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pediatric stool samples: an evaluation of Quik Check Complete Antigen assay, BD GeneOhm Cdiff PCR, and ProGastro Cd PCR assays. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71(3): 224-9.
30. Carroll KC. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. Anaerobe 2011; 17(4): 170-4.
31. Stamper PD, Babiker W, Alcabasa R, et al. Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in clinical stool specimens. J Clin Microbiol 2009; 47(12): 3846-50.
32. Doing KM, Hintz MS. Prospective evaluation of the Meridian Illumigene™ loop-mediated amplification assay and the Gen Probe ProGastro™ Cd polymerase chain reaction assay for the direct detection of toxigenic *Clostridium difficile* from fecal samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 72(1): 8-13.
33. Boyanton BL Jr, Sural P, Loomis CR, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 640-5.
34. Bruins MJ, Verbeek E, Wallinga JA, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(11): 3035-9.
35. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? J Mol Diagn 2011; 13(6): 573-82.
36. Moyaenuddin M, Williamson JC, Ohl CA. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: current strategies for diagnosis and therapy. Curr Gastroenterol Rep 2002; 4(4): 279-86.
37. Kelly CP. Current strategies for management of initial *Clostridium difficile* infection. J Hosp Med 2012; 7 (Suppl 3): S5-10.
38. Badger VO, Ledebauer NA, Graham MB, Edmiston CE Jr. *Clostridium difficile*: epidemiology, pathogenesis, management, and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2012; 36(6): 645-62.