


Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2023;16(3):461-472

doi: 10.26559/mersinsbd.1266092

Hastane kaynaklı ishallerde Clostridioides (Clostridium) difficile araştırılması

 Eyyüp Kaya¹,  Candan Öztürk¹,  Seda Tezcan Ülger¹,
 Hamide Kaya¹,  Sebahat Aslan Tek¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mersin, Türkiye

Öz

Amaç: Clostridioides difficile enfeksiyonu, sağlık hizmeti ile ilişkili bir enfeksiyon olup özellikle hastanede yatan hastalar için önemli mortalite ve morbidite kaynağıdır. Çalışmamızda; hastane kaynaklı ishallerde C. difficile insidansını belirlemek için yatan hastaların gaita örneklerinde C. difficile izolasyonu ve toksin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Çalışmaya, Ekim 2020-Temmuz 2021 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesi'nde çeşitli servislere yatırılan, en az iki gün boyunca günde üçten fazla gevşek veya sulu dışkılama yapan, iki yaş üzerinde 85 hasta dahil edilmiştir. Sızdırmaz kaplarda toplanan gaita örneklerinde, 24-48 saat içinde 'Epilisa Fecal C. difficile Toksin A/B ELISA kiti (Epitope Diagnostics, Inc. ABD) kullanılarak C. difficile toksin A/B varlığı araştırılmıştır. İlave olarak gaita örnekleri; sikloserin, sefoksitin, amfoterisin-B içeren C. difficile agar (Biomerieux, Fransa), ChromID C. difficile agar (Biomerieux, Fransa) ve %5 koyun kanlı Columbia agar (Biomerieux, Fransa) besiyerlerine ekilmiştir. Besiyerleri 37°C'lik etüvde anaerop ortamda 48-72 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. C. difficile olarak tanımlanan kolonilerden Schaedler Anaerop buyyona (Oxoid, İngiltere) ekim yapılmış ve 48-72 saatlik anaerop inkübasyonun sonunda ELISA yöntemiyle toksin varlığı araştırılmıştır. **Bulgular:** Çalışmamızda ELISA toksin A/B pozitifliği %4.7 (4/85) olarak bulunmuştur. Anaerop kültürde üreyen altı (%7.1) C. difficile izolatının üçünde toksin varlığı saptanmıştır (p=1.000). Hasta popülasyonumuzda CDE sıklığının %3.5 (n=3) olduğu belirlenmiştir. Toksik kültür referans test olarak alındığında, ELISA Toksin A/B testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %100, %98.8, %75 ve %100 olarak belirlenmiştir. **Sonuç:** Antibiyotik kullanımı ve hastane yatışı ile ilişkili olan CDE'nun önlenmesinde akılcı antibiyotik kullanımı ve uygun enfeksiyon kontrol programlarının göz önünde bulundurulması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Hastane kaynaklı, ishal, Clostridioides difficile, toksin A/B, anaerop kültür

Yazının geliş tarihi: 17.03.2023

Yazının kabul tarihi: 07.07.2023

Sorumlu yazar: Eyyüp Kaya, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin/Türkiye. Tel: 0324 2337180-1437, E-posta: ekaya_80@yahoo.com

****Not:** Çalışma 28-29 Nisan 2022 tarihinde Mersin Üniversitesinde yapılan I. Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Sempozyumunda sözel bildiri olarak sunulmuştur. Çalışma, 4.11.2022 kabul tarihli 'Hastane Kaynaklı Ishallerde Clostridioides (Clostridium) difficile Araştırılması' başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

Investigation of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in patients with hospital-acquired diarrhea

Abstract

Aim: *Clostridioides difficile* infection is a healthcare-associated infection and is an important source of mortality and morbidity, especially for hospitalized patients. In our study, we aimed to determine the incidence of *C. difficile* in hospital-acquired diarrhea by isolating *C. difficile* and investigating the presence of toxin in stool samples of hospitalized patients. **Method:** The study included 85 patients over two years of age who had loose or watery stools more than three times a day for at least two days and hospitalized in various wards at Mersin University Hospital between October 2020 and July 2021. Stool samples collected in sealed containers were analyzed for the presence of *C. difficile* toxin A/B using the 'Epilisa Fecal *C. difficile* Toxin A/B ELISA Kit' (Epitope Diagnostics, Inc. ABD) within 24-48 hours. In addition, stool samples were cultured on *C. difficile* agar containing cycloserine, cefoxitin, amphotericin-B (Biomerieux, Fransa), ChromID *C. difficile* agar (Biomerieux, Fransa) and 5% sheep blood Columbia agar (Biomerieux, Fransa) media. The media were incubated in an anaerobic environment at 37°C for 48-72 hours and then evaluated. The colonies identified as *C. difficile* were inoculated on Schaedler Anaerobic Broth (Oxoid, İngiltere) and after 48-72 hours of anaerobic incubation, the presence of toxin was investigated by ELISA method. **Results:** ELISA toxin A/B positivity was found to be 4.7% (4/85) in our study. Six (7.1%) *C. difficile* isolates were isolated in anaerobic culture and the presence of toxin was detected in three of them (p=1.000). The frequency of CDE in our patient population was determined to be 3.5% (n=3). When toxigenic culture was taken as the reference test, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of ELISA Toxin A/B test were determined as 100%, 98.8%, 75% and 100%, respectively. **Conclusion:** Rational antibiotic use and appropriate infection control programs should be considered in the prevention of CDE, which is associated with antibiotic use and hospitalization.

Keywords: Hospital-acquired, diarrhea, *Clostridioides difficile*, toxin A/B, anaerobic culture

Giriş

Clostridioides (Clostridium) difficile (*C. difficile*), hastane kaynaklı ve antibiyotik ilişkili ishallerin en yaygın nedenlerinden biridir. *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) hafif olabildiği gibi yaşamı tehdit edici olan fulminant kolit, pseudomembranöz enterokolit gibi ciddi seyirli hastalıklara hatta toksik megakolondan %25-40'a varan oranlarda ölüme neden olabilmektedir.^{1,2} *C. difficile*, Gram pozitif, anaerop, spor oluşturan bir bakteridir. *C. difficile* sağlıklı bireylerin %3'ünde, yenidoğanların %15-20'sinde ve hastanede yatan bireylerin %10-30'unda bağırsak florasının bir parçası olarak bulunabilmektedir.^{3,4}

C. difficile enfeksiyonu gelişmesinde, antibiyotik kullanımı önemli bir risk faktörüdür. Birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler, patojen organizmalarla birlikte normal bağırsak florasını da baskılamaktadır.⁵

Sadece toksin salgılayan *C. difficile* suşları enfeksiyona yol açmaktadır. Toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) CDE patogenezinin sorumludur.⁶ Hipervirülan suşlar, toksin A ve toksin B dışında, aktine özgül bir ADP riboziltransferaz aktivitesine sahip binary toksin denilen üçüncü bir toksin üretmektedirler. Binary toksinler birçok toksijenik *C. difficile* suşu tarafından da üretilmektedir.⁷

Sporlar CDE'nin bulaşmasında ve nüksetmesinde önemli rol oynamaktadır. *C. difficile* sporları, enfekte bireylerin ve asemptomatik taşıyıcıların dışkılamasıyla atılmakta ve hastane ortamında kontaminasyona yol açmaktadır. *C. difficile* sporları, hastane yüzeyleri ve ekipmanları gibi cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilmektedir. Dolayısıyla potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olarak işlev görebilmektedir.⁸

Toksijenik kültür ile hücre kültürü sitotoksin testleri kesin tanı için altın standart olarak kabul edilmektedir ancak *C. difficile*'nin laboratuvar tanısı için, glutamat dehidrojenaz (GDH) antijeni ve ELISA toksin A/B testini içeren algoritmada nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanılması önerilmektedir.⁹

Avrupa *C. difficile* Çalışma Grubu (ESGCD)'nin öncülüğünde ülkemizin de dahil olduğu 14 farklı ülkeden ishali ve toksijenik kültür sonucu pozitif olan 38 hastanenin katıldığı bir çalışma yapılmış, 14 ülkenin CDE insidansı 0.13-7.1/10.000, ortalama insidans ise 2.45/10.000 kişi başı olarak tespit edilmiştir.¹⁰ CDE 2003'ten önce az sayıda bildirilmiştir, ancak 2003'ten sonra Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Kanada'da birden çok CDE salgını bildirilmiştir.^{7,11} ABD'de 2017 yılında 223.900 vaka, 12.800 ölüm meydana gelmiş olup 1 milyar USD değerinde ek maliyet oluşmuştur. Avrupa'da ise *C. difficile* kaynaklı 123.997 vaka, 3.700 ölüm meydana gelmiş ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında en çok görülen sekizinci mikroorganizma olarak bildirilmiştir.¹²

Çalışmamızda; hastane kaynaklı ishallerde *C. difficile* insidansını belirlemek için yatan hastaların gaita örneklerinde *C. difficile* izolasyonunun ve toksin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 01/04/2020 tarihli 2020/267 sayılı karar numarası ile onaylanmıştır. Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021-1-TP3-4337 numarası ile desteklenmiştir.

Hasta Seçimi

Çalışmaya, Ekim 2020-Temmuz 2021 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesi'nde çeşitli servislere yatırılarak tedavi edilen en az iki gündür antibiyotik tedavisi alan, en az iki gün boyunca günde üçten fazla gevşek veya sulu dışkılama yapan iki yaş üzerindeki 85 hasta dahil edilmiştir.

Çalışma için hastalardan veya ebeveynlerinden onay alınmıştır. Çalışmaya iki yaş altındaki hastalar, katı kıvamlı gaita örnekleri, rektal sürüntü örnekleri ve kolonoskopik örnekler dahil edilmemiştir. Her hastaya ait sadece bir gaita örneği çalışılmıştır.

Gaita örnekleri, serum fizyolojik ile lam-lamel arasında mikroskopik incelenmiş, eritrosit ve lökosit varlığı yönünden değerlendirilmiştir.

Toksin A/B Varlığının Saptanması

C. difficile toksin A/B'nin kalitatif tespiti için sandviç ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) prensibi ile çalışan Epilisa Fecal *C. difficile* Toksin A/B ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc. ABD)'i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Hastalardan alınan gaita örnekleri, 2-8°C'de muhafaza edilmiş, 24-48 saat içinde çalışılmıştır.

Anaerob Kültür

Gaita örnekleri, 1:1 oranında %96'lık etil alkol ile karıştırılarak oda ısısında 45-60 dk vortekslenmiş ve 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Sedimentten 100'er µl alınarak sikloserin, sefoksitin amfoterisin-B içeren *Clostridium difficile* agar (CLO) (Biomerieux, Fransa), ChromID *C. difficile* agar (CDIF) (Biomerieux, Fransa) ve fenotipik karakterizasyon için %5 koyun kanlı Columbia agar (COS) (Biomerieux, Fransa) besiyerlerine ekilmiştir. Çalışmamızda standart suş olarak Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı (RSKK)'ndan temin edilen American Type Culture Collection (ATCC) 9689 *C. difficile* suşu kullanılmıştır.

Besiyerleri, anaerob ortam sağlayıcı (Genbox Anaero, kuru system, Biomerieux, Fransa) ve resazürin indikatör (Anaer İndikatör, Biomerieux, Fransa) 2.5 L anaerobik kavanoza (Biomerieux, Fransa) yerleştirilmiştir. Besiyerleri 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübe edilmiştir. Kenarları 2.5 mm çapında filamantöz, topaklanmış cam benzeri, opak görümlü, tipik at pisliği kokusu, Gram pozitif basil ve katalaz testi negatif olan koloniler VITEK® 2 Compact cihazı ile tanımlanmıştır.

C. difficile olarak tanımlanan kolonilerden Schaedler Anaerop buyyona ekim yapılmış ve 48-72 saatlik inkübasyonun sonunda ELISA yöntemiyle toksin varlığı araştırılmıştır. İzolatlar %16 gliserollü triptik soy buyyonda (Oxoid, İngiltere) -20°C'de saklanmıştır.¹³

İstatistiksel Analiz

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Hastanın kemoterapi alıp almamasına, toksijenik kültür ve ELISA testlerine göre sürekli ölçümler arasındaki farklılıklar için Student *t* testinden yararlanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir.

Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar için ise Pearson ki-kare ve Fisher Exact ki-kare testlerinden yararlanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. Ayrıca, kültür testi ile ELISA testleri arasındaki uyum için Cohen Kappa istatistiğinden yararlanılmıştır. Testlere ait duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

Bulgular

Çalışmamızda *C. difficile*'ye bağlı ishal insidansı, 1000 hasta kabulü için 35.3 ve

1000 hastane yatış günü için ise 4.2 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 85 hastanın 36'sı (%42.4) kadın, 49'u (%57.6) erkektir. Toplam seksen beş hastanın yaş aralığı 3-87, yaş ortalaması 43.5 ± 24.1 olarak bulunmuştur. Erkeklerin yaş ortalaması 39.1 ± 23.8 , kadınların ise 49.5 ± 23.4 olarak hesaplanmıştır ($p=0.049$). Hastaların servislere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Hastaların 29'unda (%34.1) karın ağrısı, 10'unda (%11.8) ateş, dördünde (%4.7) ise her iki semptom birlikte bulunmaktaydı. Mikroskopik incelemede gaita örneklerinin 62'sinde (%72.9) lökosit ve eritrosit saptanmazken, 14'ünde (%16.5) yoğun lökosit, dokuzunda (%10.6) az sayıda lökosit saptanmıştır. Hastaların 10'unun (%11.8) gaita örneğinde yoğun eritrosit, 13'ünde (%15.3) nadir eritrosit görülmüştür. Çalışmaya dahil edilen hastaların 27'sinde (%31.8) lökositoz, 42'sinde (%49.4) hipoalbuminemi, 28'inde (%33.0) serum kreatinin seviyesi >1.5 mg/dL'nin üzerindedir (Tablo 2).

Anaerop kültür ile 85 hastanın 20'sinde (%23.5) *Clostridium* türleri izole edildi. VİTEK 2 (Biomeriux, Fransa) sistemi ile yedisi (%8.2) *C. clostridioforme*, altısı (%7.1) *C. difficile*, ikisi (%2.3) *C. novyi*, ikisi (%2.3) *C. sordelli*, biri (%1.2) *C. baratii*, biri (%1.2) *C. sporogenes* ve biri (%1.2) *C. subterminale* olarak tanımlandı.

Tablo 1. Hastaların servislere göre dağılımı

Servis	Erişkin (n=65)		Servis	Çocuk (n=20)	
	Sayı (n)	%		Sayı (n)	%
Tıbbi onkoloji	14	21.5	Ç. Onkoloji	6	30.0
Gastroenteroloji	11	16.9	Ç. Hematoloji	5	25.0
Genel cerrahi	11	16.9	Ç. Enfeksiyon Hastalıkları	5	25.0
Hematoloji	10	15.4	Ç. Nefroloji	4	20.0
Nefroloji	10	15.4			
Enfeksiyon Hastalıkları	5	7.7			
Nöroloji	4	6.2			
Toplam	65	100.0	Toplam	20	100.0

Tablo 2. Hastalara ait klinik ve biyokimyasal veriler

Hasta verileri	Referans Değer	Sayı (n)	Yüzde (%)	p
WBC (x10 ³ /µL)	<11	58	68.2	0.476
	>11	27	31.8	
Albumin (g/dL)	<3	42	49.4	0.394
	>3	43	50.6	
Kreatinin (mg/dL)	<1.5	57	67.0	0.308
	>1.5	28	33.0	
Karın Ağrısı	Yok	56	65.9	0.462
	Var	29	34.1	
Ateş	Yok	75	88.2	0.776
	Var	10	11.8	
Gaitada PMNL	Yok	62	72.9	0.525
	Var	23	27.1	
Gaitada RBC	Yok	62	72.9	0.385
	Var	23	27.1	

Çalışmamızda ELISA toksin A/B pozitifliği %4.7 (n=4) olarak bulunmuştur. Anaerop kültürde üreyen altı (%7.1) *C. difficile* izolatının, üçünde toksijenik kültür ile toksin varlığı saptanmış, kalan üçünde ise saptanmamıştır (p=1.000). Hasta popülasyonumuzda CDE sıklığı %3.5 (n=3) olarak belirlenmiştir (Tablo 3).

Toksijenik kültürü pozitif olan iki erişkin hastanın biri nefroloji, diğeri hematoloji hastası olup yaş ortalamaları 65'tir. Toksikjenik kültürü pozitif olan 7 yaşındaki hasta pediyatrik onkoloji hastasıdır. Kültürde *C. difficile* üremesi olan ve ELISA toksin A/B pozitif bulunan bir hastanın toksijenik kültürü negatif bulunmuş olup yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmiştir. Bu hasta 23 yaşındaki bir gastroenteroloji hastası idi. Toksikjenik *C. difficile* izolatlarının izole edildiği gaita örneklerin ikisinde lökosit varlığı görülürken, non-toksijenik örneklerde ve toksin pozitif olan bir hasta örneğinde lökosit saptanmamıştır (Tablo 4).

CDE pozitif hastalarda lökositöz %33.3 (n=1), CDE negatif hastalarda ise %31.7 (n=26) oranında (p=1.000); CDE pozitif hastalarda hipoalbuminemi %66.7 (n=2), CDE negatif hastalarda %47.1 (n=40) oranında (p=0.611); >1.5 mg/dL'nin üzerindeki serum kreatinin düzeyi CDE pozitif hastalarda %33.3 (n=1), CDE negatif hastalarda ise %33 (n=28) oranında (p=1.000) belirlenmiştir (Tablo 5).

ELISA toksin A/B testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; %100 (30.48-100.0), %98.8 (93.37-99.80), %75 (20.34-95.88) ve %100 (95.5-100.0) olarak belirlenmiştir (Cohen Kappa=0.851; p<0.001).

Çalışmamızda kemoterapi alan 2/33 hastada hem ELISA toksin A/B hem de toksijenik kültür yöntemi ile pozitiflik saptanmış olup bu grupta CDE oranı %6.1'dir. Kemoterapi almayan 52 hastanın birinde (%1.9) CDE tespit edilmiştir (p=0.373) (Tablo 5).

Tablo 3. C. difficile toksin A/B ve toksijenik kültür test sonuçları

Cinsiyet	ELISA Toksin A/B						Toksijenik Kültür						
	Toksin (+)		Toksin (-)		Toplam		Cinsiyet	Toksin (+)		Toksin (-)		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kadın	2	5.6	34	94.4	36	100	Kadın	1	2.8	35	97.2	36	100
Erkek	2	4.1	47	95.9	49	100	Erkek	2	4.1	47	95.9	49	100
Toplam	4	4.7	81	95.3	85	100	Toplam	3	3.5	82	96.5	85	100

Tablo 4. Toksin pozitif bulunan hastaların demografik özellikleri

No	Cinsiyet	Yaş	Bölüm	Altta Yatan Hastalık	Antibiyotik	KT/RT	Karın Ağrısı	Ateş	Gaitada Lökosit	WBC (x10 ³ /µL)	Albumin (g/dL)	Serum Kreatinin (mg/dL)	ELISA Toksin A/B	Kültür*
1	K	23	GE	Hemoroid, Chron	CIP, MET, ONZ	-	-	-	-	9.28	3.1	0.51	+	-
2	E	7	Çocuk Onkoloji	ALL	CIP, MEM, TEİ	KT	-	-	-	0.49	2.44	0.14	+	+
3	E	53	Hematoloji	AML, Hemoroid	CRO, MEM, PPI	KT	+	-	+	8.65	3.44	0.56	+	+
4	K	77	Nefroloji	DM, KAH, KBY	AMS, MEM, PPI	-	+	-	+	13.83	2.18	2.86	+	+

ALL: Akut lenfoblastik lösemi, AML: Akut miyeloid lösemi, AMS: Ampisilin sulbaktam, CIP: Siproflaksasin, CRO: Seftriakson, DM: Diabetes mellitus, GE: Gastroenteroloji, KAH: Kronik akciğer hastalığı, KBY: Kronik böbrek yetmezliği. KT/RT: Kemoterapi/Radyoterapi, MEM: Meropenem, MET: Metronidazol, ONZ: Ornidazol, PPI: Proton pompa inhibitörü, TEİ: Teikoplanin, *Toksijenik Kültür

Tablo 5. CDE pozitif ve negatif hastaların klinik özellikleri

Parametre	CDE Pozitif hastalar % (n)	CDE negatif hastalar % (n)	p
Lökositoz (>11 x10 ³ /µL)	33.3 (n=1)	31.7 (n=26)	1.000
Hipoalbuminemi (< 3 g/dL)	66.7 (n=2)	47.1 (n=40)	0.611
Kreatinin (> 1.5 mg/dL)	33.3 (n=1)	33 (n=28)	1.000
Kemoterapi alan	6.1 (n=2)	93.9 (n=31)	0.373
Kemoterapi almayan	1.9 (n=1)	98.1 (n=51)	0.506

Tartışma

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *C. difficile* toksin A/B pozitiflik oranı %3.2-24 arasında değişmektedir.¹⁴ ELISA toksin A/B pozitiflik oranları, Hindistan'da %10-17 arasında olup Avrupa'da %30'a kadar değişebilmektedir. Farklı çalışmalarda *C. difficile* prevalansı, ishali olmayan hastalarda %2-4 ve ishali hastalarda %7-30 civarındadır.¹⁵

C. difficile enfeksiyonlarının insidansı ve şiddeti 2000'li yılların başlarında artış göstermiştir. Bu artışa özellikle moksiflaksasin gibi florokinolonlara dirençli ve enzimatik ve bağlayıcı komponentlerinin *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlandığı binary toksin oluşturan BI/NAP1/027 ribotipi, Kanada, ABD, Avrupa, Doğu Asya ve Avustralya gibi ülkelerde salgınlara neden olmuştur. Bu salgınlara, *C. difficile* suşlarının global olarak sürveyans ihtiyacını arttırmıştır.¹⁶

Büyükbaba Boral'ın¹⁷ 1998-2000 yılları arasında yaptığı çalışmada, 360 hastanın gaita örneğinde toksin A sıklığı %4.7 iken, 2000-2002 yılları arasındaki çalışmada 400 hastada toksin A/B varlığını %12 olarak saptamıştır. Bu çalışmada 2000 yılı sonrası görülen yüksek pozitiflik oranı, 2000 yılı öncesinde sadece toksin A'yı saptayan kitin kullanılması ve toksin A-/B+ varyantların belirlenememesine bağlanmıştır. Çalışmalar, her iki toksini tespit edebilen kitlerin kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır.

ELISA testi yüksek özgüllüğe sahiptir. Testin pozitif olması için gaitada, hem toksin A hem de toksin B'den 100-1000 pg bulunması gerekmektedir.¹⁸ Gaitadaki toksin A/B miktarı belirli bir sınırın altında ise yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Çalışmamızda kullanılan kitin analitik duyarlılığı yaklaşık 25.000 pg/ml'dir. Kullanılan kitlerin duyarlılık farkından kaynaklı yanlış negatifler ortaya çıkmış olabilir. Yanlış negatif sonuçların, numunenin uygunsuz saklanması nedeniyle toksinlerin proteolitik ayrışmasından da kaynaklanabileceği belirtilmiştir.¹⁹ Çalışmamızda, örnekler 2-8°C'de muhafaza edilmiş olup 24-48 saat içinde çalışıldığından toksin ayrışma olasılığının ihmal edilebileceği kanaatindeyiz.

Kostul ve ark.²⁰ 2010-2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesi'nde 158 gaita örneğini incelemiş, 18 (%11.4) hastada *C. difficile* toksin A/B pozitif bulmuştur. 16 (%88.8)'sının 0-18 yaş grubu, bunlardan dokuzunun 0-2 yaş aralığında olduğu saptanmıştır. Deniz ve ark.nın²¹ 2011 yılındaki çalışmasına dahil edilen 1-18 yaş grubundaki 20 hastanın 13'ünde (%65) toksijenik kültür pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak <2 yaş çocuklarda da *C. difficile* toksin varlığının araştırıldığı görülmektedir ancak bazı kaynaklar bu yaş grubunda *C. difficile* araştırmanın klinik önemini olmadığını belirttiğinden bu yaş grubu çalışmamıza dâhil edilmemiştir.^{22,23} Yüksek ELISA toksin

A/B oranlarının çocuklardaki yüksek *C. difficile* kolonizasyonuna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Altındış ve ark.²⁴ 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada, dahiliye (%41.7), enfeksiyon hastalıkları (%15.3) ve cerrahi/anestezi/yoğun bakım ünitelerindeki (%12) toplam 91 hastadan alınan gaita örneklerinde *C. difficile* toksin A/B araştırmışlar ve 13 (%14.3) hastada pozitiflik tespit etmişlerdir. Andrés-Lasheras ve ark.²⁵ 2019 yılındaki çalışmasında tespit edilen dokuz toksijenik izolatın beşi (%55.6) acil servis, üçü (%33.3) dahiliye ve biri (%11.1) gastroenteroloji hastalarından izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda CDE saptanan hastaların biri nefroloji (%1.2), biri hematoloji (%1.2) ve biri çocuk onkolojisi (%1.2) bölümlerinde yatan hastalardır.

Şahin ve ark.²⁶ 2017 yılında Hematoloji ve Onkoloji birimlerine başvuran toplam 135 hastanın 12'sinde (%8.9), malignite nedeniyle kemoterapi alan hastaların sekizinde (%9.4) *C. difficile* toksin A/B pozitif saptamıştır. Hung ve ark.²⁷ 2021 yılında 528 CDE tanısı almış hastanın dahil edildiği çalışmada hastaların 77'sinde hematolojik onkolojik malignite olduğunu vurgulamıştır. Çalışmamızda kemoterapi alan 33 hastanın ikisinde hem ELISA toksin A/B hem toksijenik kültür yöntemi ile pozitiflik saptanmış olup, bu grupta CDE oranı %6.1'dir. Kemoterapi almayan 52 hastanın birinde (%1.9) CDE tespit edilmiştir (p=0.373).

Er ve ark.²⁸ 2016 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde CDE sıklığını 0.78/10.000 hasta-gün ve 0.78/1.000 hasta olarak bulmuştur. Avrupa'da 10.000 hasta günü için CDE insidansı 3.2 vaka olarak bulunmuştur.²⁵ Çalışmaya dahil edilen yatan hastalardaki toksijenik kültürü pozitif olgular yatan hasta sayısı/yatılan gün sayısı olarak değerlendirildiğinden çalışmamızda; *C. difficile*'ye bağlı ishal insidansı, 1000 hasta kabulü için 35.3 ve 1000 hastane yatış günü için ise 4.2 olarak tespit edilmiştir (p<0.001).

Özyurt ve ark.¹⁹ 2016 yılındaki çalışmasında EIA toksin A/B testi ile %5.5 (n=11) pozitiflik saptamıştır. Öksüz ve ark.²⁹ 2017 yılında *C. difficile* toksin A/B ELISA kiti

ile %2.8 (n=3) oranında pozitiflik bulmuştur. Xiao ve ark.³⁰ 2020 yılında toksijenik *C. difficile* insidansını %17.3 (n=26) olarak bulmuştur. Çalışmamızda ELISA toksin A/B pozitifliği %4.7 (n=4) olarak bulunmuştur. Hasta popülasyonumuzda CDE sıklığı %3.5 (n=3) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki sonuçların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. ELISA toksin A/B pozitiflik oranlarındaki farklılığı; kullanılan kitlerin yöntem/uygulama farklılığına, çalışmaya dahil edilen hastaların yaş grubunun değişkenliğine, gaita örneklerinin saklanma koşullarına ve inceleme farklılıklarına, sağlık merkezlerinin antibiyotik yönetim politikalarının farklılığına, hastaların yatış süreleri ve kronik hastalıkların varlığı gibi nedenlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Ülkemizde ve çeşitli ülkelerde ELISA toksin A/B testleri kullanılarak yapılan çalışmalarda test duyarlılığı %45-99, özgüllüğü %75-100 arasında bildirilmiştir.³¹ Özyurt ve ark.¹⁹ 2016 yılında EIA toksin A/B testinin PPD ve NPD sırasıyla %100 ve %98.9 olarak bulmuştur. Xiao ve ark.³⁰ 2020 yılında ELISA toksin A/B testinin PPD ve NPD'leri sırasıyla %100.0 ve %88.4 olarak tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda, ELISA toksin A/B testinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD sırasıyla; %100 (30.48-100.0), %98.8 (93.37-99.80), %75 (20.34-95.88) ve %100 (95.50-100.0) olarak belirlenmiştir. Toksijenik kültür testi referans olarak alındığında ELISA toksin A/B testi ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum olduğu tespit edilmiştir (Cohen Kappa=0.851; p<0,001). Bulgularımız CDE tanısında ELISA toksin A/B testinin güvenilir olduğunu göstermiştir ancak ELISA toksin A/B pozitif olduğunda bu sonucun toksijenik kültür veya moleküler yöntemlerle doğrulanması gerektiği bilinmektedir.

Vishwanath ve ark.³² 2013 yılında *C. difficile* kültür pozitiflik oranını %8 olarak tespit etmiştir. Lall ve ark.¹⁵ ishal olmayan kontrol hastalarında kültür pozitifliğini %0 olarak bulmuştur. Andrés-Lasheras ve ark.²⁵ 2019 yılında kültür yöntemi ile izole edilen 14 (%10.2) izolatın 9'unun (64.3) toksijenik olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda *C. difficile* kültür pozitifliği %7.1 (n=6),

toksijenik kültür pozitifliği ise %3.5 (n=3) olarak bulunmuştur.

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) ve Amerika Sağlık Epidemiyoloji Derneği (SHEA) tarafından 2017 yılında yayınlanan kılavuzlarda, lökosit 15.000 hücre/mL veya serum kreatininin >1.5 mg/dL olan hastalar şiddetli CDE olarak kabul edilmiştir.⁹ Lee ve ark.³³ 2021 yılında toksijenik kültürü pozitif ve negatif olan hastalar arasında lökosit ve serum kreatinin düzeyi yüksekliği açısından anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Çalışmamıza dâhil edilen hastaların ikisinde hafif - orta, birinde ise şiddetli CDE görülmüştür. Çalışmamızda *C. difficile* üreyen ve üremeyen hastalar arasında albumin, kreatinin ve lökosit düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Bu değerlerin sürekli değişkenler olmasından dolayı normalden düşük veya yüksek olabilmektedir.

Çeşitli enfeksiyonların tedavide kullanılan antibiyotikler ülkeler, hastaneler ve hatta farklı servislerde bile değişiklik gösterebilmektedir. Çoğu antibiyotiğin kullanımı CDE patogenezi ile ilişkilendirilmiş, özellikle 2., 3., 4. kuşak sefalosporinler, karbapenemler, florokinolonlar ve klindamisin hastane kaynaklı CDE için en yüksek riski teşkil ettiği bulunmuştur.³⁴ Lee ve ark.³³ toksijenik kültürü pozitif tespit edilen 158 hastanın 79'unda (%50) sefalosporinlerin (seftazidim/seftriakson, sefepim, sefuroksim, sefazolin), 29'unda (%18.4) karbapenemlerin, 20'sinde (%12.7) glikopeptidlerin, 17'sinde (%10.8) penisilinlerin kullanıldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca 38 (%24.1) hastanın proton pompa inhibitörü (PPI), 27 (%17.1) hastanın H₂ reseptör antagonisti, 41 (%25.9) hastanın steroid kullandığını bildirmişlerdir. Hung ve ark.²⁷ toksijenik *C. difficile* izole edilen 77 hastanın 31'inde (%40.3) sefalosporinlerin (sefazolin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim), 18'inde (%23.4) penisilinlerin, altısında (%7.8) karbapenemlerin, altısında (%7.8) florokinolonların, dördünde (%5.2) glikopeptidlerin, 32'sinde (%41.6) PPI, yedisinde (%9.1) H₂ reseptör blokörü ve 20'sinde (%26.0) steroid kullanıldığını

belirtmişlerdir. Çalışmamızda kemoterapi alan hastalardan biri (%50) üçlü antibiyotik (siproflaksasin, meropenem, teikoplanin), diğer biri (%50) ikili antibiyotik (seftriakson, meropenem) kullanımının yanısıra PPI kullanmıştır. Kemoterapi almayan hasta ikili antibiyotiğin (ampisilin sulbaktam, meropenem) yanı sıra PPI de kullanmıştır (Tablo 4).

İleri yaştaki hastalarda CDE riskinin fazla olması, yaşa bağlı olarak gelişen kronik rahatsızlıkların varlığı, bağışıklık sisteminin zayıflaması sonucu nötrofillerin öldürme yeteneğinin (fagositoz) azalması, fekal floradaki değişiklikler ve toksinlerin nötralize edilememesi gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir.¹⁵ Hung ve ark.²⁷ çalışmalarındaki CDE pozitif hastaların altısında (%7.8) hipertansiyon, beşinde (%6.5) diabetes mellitus, ikisinde (%2.6) kronik böbrek yetmezliği, birinde (%1.3) kongenital kalp yetmezliği, birinde (%1.3) siroz gibi kronik rahatsızlıkları risk faktörleri olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda toksijenik kültürü pozitif saptanan hastalarda; ALL (1/3), AML (1/3), hemoroid (1/3), diabetes mellitus (1/3), kronik akciğer hastalığı (1/3) ve kronik böbrek hastalığı (1/3) komorbidite olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Çalışmamızın kısıtlılıklarından biri bütçe yetersizliği nedeniyle *C. difficile* dışındaki diğer bakteriyel, paraziter ve viral ishal etkenlerinin araştırılmamış olmasıdır. Diğer yandan pandemi süreci nedeniyle örneklem büyüklüğü 85 olarak belirlenmiş olup; antibiyotik duyarlılıkları, hücre kültürü sitotoksite testi, toksin B geni (tcdB), binary toksin genleri (cdtA ve cdtB) ve *tcdC* geninde nükleotid 117'de tek baz delesyonu araştırılmamıştır.

Sonuç

Sonuç olarak çalışmamız Mersin Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaları temsil eden tek merkezli bir çalışmadır. Bulgularımızın, gelecekte yapılacak olan çalışmalara kaynak teşkil edebileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ve ülkemizde yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi CDE görülme oranları şimdilik düşüktür. Ancak

mevcut durum, hipervirülan suşlarla değişebilir ve CDE ciddi bir sorun haline gelebilir. Sağlık hizmetlerinde *C. difficile*'nin önlenmesi için etkili bir enfeksiyon kontrol programı önem taşımaktadır. El hijyeni, hasta izolasyonu, çevre temizliği ve antimikrobiyal yönetim, CDE'yi önlemenin temel taşlarıdır.

Ülkemizde *C. difficile* konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Gelecekte ortaya çıkabilecek hipervirulent *C. difficile* kaynaklı oluşabilecek enfeksiyonların tespiti ve kontrolü açısından, her hastanenin kendi tanı ve takip sistemini oluşturması, daha uzun süreli takip edilen, kapsamlı, çok merkezli ve sürveyans çalışmalarına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Yazar Katkıları: Tasarım ve Planlama: EK, CÖ, STÜ, HK, SAT, Verilerin Toplanması: EK, CÖ, STÜ, HK, SAT, Verilerin Analizi: EK, CÖ, STÜ, HK, SAT, Makalenin Yazımı ve Düzenlemesi: EK, CÖ, STÜ, HK, SAT.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Mali Destek: Çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021-1-TP3-4337 numarası ile desteklenmiştir.

Teşekkür: İstatistiksel analiz bölümünde ve verilerin değerlendirilmesinde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı Doç. Dr. Semra ERDOĞAN'a teşekkür ediyoruz.

Kaynaklar

1. Wu KS, Syue LS, Cheng A, et al. Recommendations and guidelines for the treatment of Clostridioides difficile infection in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53(2):191-208. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.002>
2. Bamba S, Nishida A, Imaeda H, et al. Successful treatment by fecal microbiota transplantation for Japanese patients with refractory Clostridium difficile infection: a prospective case series. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019;52(4):663-666. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.027>
3. Butt T, Raza S, Malik SN, Naqvi M. Risk factors for Clostridium difficile infection in patients on antibiotics. *Pak J Phytopathol.* 2017;28(1):1-5.
4. Zarandi ER, Mansouri S, Nakhaee N, Sarafzadeh F, Iranmanesh Z, Moradi M. Frequency of antibiotic associated diarrhea caused by Clostridium difficile among hospitalized patients in intensive care unit, Kerman, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;10(3):229-234.
5. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in Clostridium difficile infection. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):23-42. <https://doi.org/10.1177/2049936115622891>
6. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. 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.* 2011;31(5):431-455. <https://doi.org/10.1086/651706>
7. Labbe AC, Poirier L, Maccannell D, et al. Clostridium difficile infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2008;52(9):3180-3187. <https://doi.org/10.1128/AAC.00146-08>
8. Edwards AN, Karim ST, Pascual RA, Jowhar LM, Anderson SE, McBride SM. Chemical and stress resistances of Clostridium difficile spores and vegetative cells. *Front Microbiol.* 2016;7:1698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698>
9. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America

- (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis*. 2018;66(7):e1-e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
10. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(11):1048-1057. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01824.x>
 11. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet Infect Dis*. 2005;366(9491):1079-1084. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67420-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67420-x)
 12. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. <https://ndc.services.cdc.gov/wp-content/uploads/Antibiotic-Resistance-Threats-in-the-United-States-2019.pdf>
 13. Çitil BE. *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal yönünden risk grubundaki olguların dışkıda toksin saptama yöntemleri ve anaerob kültür ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Ankara, Türkiye, 2006.
 14. Şamlıoğlu 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. <https://dx.doi.org/10.5505/TurkHijyen.2022.77785>
 15. Lall S, Nataraj G, Mehta P. Use of culture and ELISA based toxin assay for detecting *Clostridium difficile* a neglected pathogen: A single-center study from a tertiary care setting. *J Lab Physicians*. 2017;9(4):254-259. https://doi.org/10.4103%2FJLP.JLP_157_16
 16. Adler A, Bradenstein R, Block C, et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 83(1):21-24. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.05.015>
 17. Büyükbaba Boral Ö. *Clostridium difficile* infeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2003; 32:220-224.
 18. Bhattacharya MK, Niyogi SK, Rasaily R, et al. Clinical manifestation of *Clostridium difficile* enteritis in Calcutta. *J Assoc Physicians India*. 1991;39(9):683-684.
 19. Özyurt Ö. Akdeniz üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde yatan iki yaş ve üzeri hastalarda *Clostridium difficile* ilişkili ishallerin toksijenik kültür, gdh enzim, toksin a/b ve PZR ile toksin genlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya, Türkiye, 2016.
 20. Kostul H, Delialioğlu N, Horasan EŞ, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Antibiyotik kullanan hastalarda bağırsak florasının incelenmesi ve *Clostridium difficile* toksin araştırılması. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2015;72(3):183-190. DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.36024
 21. Deniz U, Ulger N, Aks B, Karavus M, Soyletir G. Investigation of toxin genes of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitalized patients with diarrhoea at Marmara University Hospital. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(1):1-10.
 22. Sandora TJ, Fung M, Flaherty K, et al. Epidemiology and risk factors for *Clostridium difficile* infection in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(7):580-584. <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e31820bfb29>
 23. Tai E, Richardson LC, Townsend J, Howard E, McDonald LC. *Clostridium difficile* infection among children with cancer. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(7):610-612. <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e31820970d1>

24. Altindis M, Usluer S, Ciftci H, Tunc N, Cetinkaya Z, Aktepe OC. Investigation of the presence of *Clostridium difficile* in antibiotic associated diarrhea patients by culture and toxin detection methods. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41(1):29-37.
25. Andrés-Lasheras S, Martín-Burriel I, Aspiroz C, et al. Incidence and characterization of *Clostridium difficile* in a secondary care hospital in Spain. *Rev Esp Enferm Dig.* 2019;111(5):338-344. <https://doi.org/10.17235/reed.2018.5288/2017>
26. Şahin M. Hematoloji-Onkoloji servisinde yatan ve ayaktan takip edilen hastalarda *Clostridium difficile* görülme sıklığı. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, 2017.
27. Hung YP, Tsai CS, Tsai BY, et al. *Clostridioides difficile* infection in patients with hematological malignancy: A multicenter study in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021;54(6):1101-1110. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.02.002>
28. Er A. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin ve Onkoloji Hastaneleri'nde Yatırılarak Tedavi Edilen Hastalarda Gelişen *Clostridium difficile* İnfeksiyonu Sıklığının Ve Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi.Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye, 2016.
29. Öksüz Ş, Danış A, Öztürk E, Çalışkan E, Akar NK, Sungur MA. Uzun Süre Hastanede Yatan Hastalarda *Clostridium difficile* Kolonizasyonunun Araştırılması. *Anadolu Klin.* 2017;22(3):177-182. DOI: 10.21673/anadoluklin.298926
30. Xiao Y, Liu Y, Qin X. Comparative Study of *Clostridium difficile* Clinical Detection Methods in Patients with Diarrhoea. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2020;8753284. <https://doi.org/10.1155%2F2020%2F8753284>
31. Murray R, Boyd D, Levett P, Mulvey M, Alfa M. Truncation in the tcdC region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infect Dis.* 2009;9:103. <https://doi.org/10.1186%2F1471-2334-9-103>
32. Vishwanath S, Singhal A, D'Souza A, Mukhopadhyay C, Varma M, Bairy I. *Clostridium difficile* infection at a tertiary care hospital in South India. *J Assoc Physicians India.* 2013;61(11):804-806.
33. Lee CC, Lee JC, Chiu CW, Tsai PJ, Ko WC, Hung YP. Clinical significance of toxigenic *Clostridioides difficile* growth in stool cultures during the era of nonculture methods for the diagnosis of *C. difficile* infection. *Microbiol Spectr.* 2021;31;9(2):e0079921. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00799-21>
34. Slimings C, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):881-891. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt477>