



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE
KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE CLOSTRİDİUM DIFFİCİLE
VE TOKSİN GENLERİNİN PCR İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma ATASOY

Samsun

Şubat-2015



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE
KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE CLOSTRIDIUM DIFFICILE
VE TOKSİN GENLERİNİN PCR İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma ATASOY

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU

Samsun

Şubat-2015

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FATMA ATASOY tarafından Yrd. Doç. Dr. ALİ GÜCÜKOĞLU danışmanlığında hazırlanan “Modifiye Atmosfer Paketli Sığır Kıyma ve Kuşbaşı Örneklerinde *Clostridium Difficile* ve Toksin Genlerinin PCR ile Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 19/01/2015 tarihinde yapılan sınav ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Oktay GENÇ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Gökür TERZİ GÜLEL
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Yrd.Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Doç. Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanmasında ve yürütülmesinde hiçbir zaman desteğini ve önerilerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOğLU ile tez savunma jürimde yer alan değerli hocalarıma Őukranlarımı sunarım.

Son olarak manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve sevgili eőim Günay ATASOY'a teőekkür ederim.

Bu alıőma PYO.VET.1904.12.003 kod numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilim Araştırma Projesi Komisyonu tarafından desteklenmiőtir.



ÖZET

MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE CLOSTRIDIUM DIFFICILE VE TOKSİN GENLERİNİN PCR İLE BELİRLENMESİ

Amaç: Bu yüksek lisans tez çalışmasında konvansiyonel yöntem ve PCR tekniği ile modifiye atmosfer paketli (MAP) sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *Clostridium difficile* prevalansı, izolatlardaki toksin gen tipinin belirlenmesi ve metronidazol, vankomisin ve klindamisin antibiyotiklerine dirençliliklerinin tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada sığır orjinli modifiye atmosfer paketli 50 kuşbaşı ve 50 kıyma örneği Samsun ili kasap ve marketlerinden rastgele toplanmıştır. *C. difficile*'nin izolasyon ve identifikasyonu Boer ve ark. (2011)'nin belirledikleri klasik kültür tekniğine göre, izolatlarının doğrulanması ve toksin genlerinin tespiti Lemee ve ark. (2004)'nin belirledikleri yöntemlere göre multipleks PCR (mPCR) ile tamamlanmıştır. İzolatların antibiyotik direnç profilinin belirlenmesinde ise CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standartları esas alınmıştır.

Bulgular: 50 sığır kıyma örneğinin 2'sinde (% 4), 50 sığır kuşbaşı örneğinin 1'inde (% 2), *C. difficile* etkeni saptanmıştır. mPCR ile yapılan moleküler değerlendirmede ise, konvansiyonel yöntemle belirlenen toplam 5 izolat mPCR ile *tpi* geni üzerinden *C. difficile* olarak doğrulanmıştır. İzolatlarının toksijenik özelliklerine bakıldığında 5 izolatın 3 tanesi toksijenik karakterde olup 2'sinde *C. difficile* tip B (*tdcB*), 1'inde ise *C. difficile* tip A (*tdcA*) toksin geni tespit edilmiştir. Fenotipik antibiyotik direnç profilinde ise klindamisine karşı yalnızca *C. difficile* tip A (*tdcA*) toksin genini içeren izolat dirençli bulunurken, tüm izolatlar vankomisine ve metronidazole karşı duyarlı bulunmuştur.

Sonuç: Araştırma sonucunda modifiye atmosfer paketli (MAP) sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *C. difficile* etkeni, toksin tipi ve antibiyotik dirençlilik profili Türkiye'de ilk kez belirlenmiştir. Çalışma sonucunda hayvansal orjinli gıdalarda tespit edilen *C. difficile* etkenin halk sağlığı için potansiyel bir tehlike olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik dirençlilik, *Clostridium difficile*, MAP kıyma, MAP kuşbaşı, Multipleks PCR.

Fatma ATASOY, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Şubat-2015

ABSTRACT

**DETECTION OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE AND TOXIN GENES IN
SAMPLES OF MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGED MINCED AND
CUBED MEAT BY PCR**

Aim: In this master thesis conventional methods and PCR technique is used to know the prevalence of *Clostridium difficile* in samples of modified atmosphere packaged (MAP) minced and cubed meat, determining the genotype of toxins in the isolates and aimed determination of sensitivity to metronidazole, vancomycin and clindamycin antibiotics.

Material and Method: In the study 50 modified atmosphered packaged minced meat and 50 cubed meat samples of bovine origin were collected randomly from the butcher and market in Samsun. Isolation and identification of *C. difficile* with classical culture technique performed according to Boer and others (2011), confirmation of isolates and toxin genes with multiplex PCR (mPCR) conducted according to Lemee and others (2004). Antibiotic resistance profile of isolates determined based on CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standarts.

Results: Such that in 2 of 50 (4 %) minced meat samples and in 1 of 50 (2 %) cubed meat samples *C. difficile* strains has been identified. With the mPCR molecular evaluations, a total of five isolates known by conventional method were confirmed by mPCR was verified *C.difficile* type gene. When *C. difficile* isolated properties evaluated 3 out of 5 shows toxigenic character, 2 in the *C. difficile* type B (*tdcB*), 1 in *C. difficile* type A (*tdcA*) toxin genes have been identified. When antibiotic resistance profile phenotypically analysed, only *C. difficile* type A (*tdcA*) toxin gene was found resistant against clindamycin all isolates were sensitive to vancomycin and metronidazole.

Conclusion: As results of research in modified atmosphere packaged (MAP) minced and cubed meat samples strain, toxin type and antibiotic resistance profile is determined for the first time in Turkey. The result of this study demonstrated that *C. difficile* strain detected in food of animal origin could be a potential danger to public health.

Keywords: Antibiotic resistance, *Clostridium difficile*, MAP cubed beef, MAP minced beef, Multiplex PCR.

Fatma ATASOY, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, February-2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ABD: Amerika Birleşik Devletleri
- ABF: Antimicrobial Free
- ADP: Adenozin di Fosfat
- AI-57: Austrian Isolate (Avusturya izolatı)
- CCFA: Cycloserin-Cefoxitine-Egg Yolk Fructose Agar
- CDB: *Clostridium Difficile* Selective Medium
- CDE: *Clostridium Difficile* Enfeksiyonları
- CDI: *Clostridium Difficile* İnfeksiyonları
- CDMN: *Clostridium Difficile* Moxolactam Norfloxacin
- CDT: *Clostridium Difficile* Toksin (Binary toksin)
- CHO: Chinese Hamster Ovary (Çin Hamster Yumurta Hücreleri)
- CIPAR: Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
- CMA: Cycloserine-Mannitol Agar
- CMBA: Cycloserine-Mannitol Blood Agar
- CO₂: Karbondioksit
- EIA: Enzim Immünoassay
- EVA: Etilen Vinil Asetat
- EVOH: Etilen Vinil Alkol Kopolimerleri
- Fab: Fragment Antigen Binding- Antijen Bağlayan Kısım
- FL: İnsan Amnion Hücreleri
- H₂: Hidrojen
- HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları)
- Hep2: Human Epithelial (İnsan Epitel Hücresi)
- Kb: Kilobaz Çifti
- kDa: Kilo Dalton
- MAP: Modified Atmosphere Packaged (Modifiye Atmosfer Paketleme)
- MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MMA: Mastitis-Metritis-Agalaksiya
mm: Milimetre
ml: Mililitre
mPCR: Multiplex PCR (Multipleks PCR)
MRC 5: İnsan Embriyonik Akciğer Fibroblast Hücreleri
nm: Nanometre
N₂O : Azot di Oksit
OPP: Orient Edilmiş Poli Propilen
PA: Poliamid (Naylon)
PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PE: Polietilen
PET: Polietilen Tereftalat
PMG, PYG: Pepton-Maya Özütü-Glikoz
PMK: Pseudomembranöz Kolit
pg: Pikogram
PVC: Polivinilklorid
TNF α : Tümör Nekroze Edici Faktör Alfa
UV: Ultraviyole
Vero: Afrika Yeşil Maymun Böbrek hücreleri
WI-38: İnsan Embriyonik Akciğer Fibroblast Hücreleri
 μ g: Mikro gram

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	10
2. GENEL BİLGİLER	14
2.1. <i>Clostridium difficile</i>	14
2.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	16
2.3. Virülens Faktörleri ve Toksin Özellikleri.....	18
2.4. Patogenez.. ..	20
2.5. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonları.....	23
2.5.1. Aseptomatik Kolonizasyon	23
2.5.2. <i>C. difficile</i> İshali.....	23
2.5.3. <i>C. difficile</i> Koliti (Psödomembransız kolit).....	24
2.5.4. Psödomembranöz Kolit (PMK).....	24
2.5.5. Fulminant Kolit	24
2.6. Laboratuvar Tanı	25
2.6.1. Biyokimyasal Yöntemler.....	25
2.6.2. Radyolojik Yöntemler	26
2.6.3. Mikrobiyolojik Yöntemler.....	26
2.6.4. Toksin Aramaya Yönelik Testler	27
2.6.5. İmmünoyagnostik Testler.....	28
2.6.6. Moleküler Yöntemler	29
2.7. Koruma ve Kontrol	30
2.8. <i>C. difficile</i> 'nin Epidemiyolojisi	30
2.8.1. İnsanlarda <i>C. difficile</i>	31
2.8.2. Hayvanlarda <i>C. difficile</i>	36
2.8.3. Çevrede <i>C. difficile</i>	43
2.8.4. Hayvansal Kaynaklı Gıdalarda <i>C. difficile</i>	45
2.8.5. Bitkisel Kaynaklı Gıdalarda <i>C. difficile</i>	53
2.9. Antibiyotiklere Direnç	54

2.10. Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP)	59
3. MATERYAL METOT	63
3.1. Materyal	63
3.1.1. <i>C. difficile</i> 'nin İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar	64
3.1.2. <i>C. difficile</i> İzolatlarının PCR ile Doğrulanmasında Kullanılan Kimyasallar	66
3.1.3. <i>C. difficile</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri	67
3.2. Metot	68
3.2.1. <i>C. difficile</i> 'nin İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	68
3.2.1.1. Ön Zenginleştirme.....	69
3.2.1.2. Sedimentasyon Eldesi	70
3.2.1.3. Katı Besiyerine Ekim.....	71
3.2.1.4. <i>C. difficile</i> İdentifikasyonu	72
3.2.1.4.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Bakı	72
3.2.1.4.2. Test Kiti ile Pozitif Sonucun Doğrulanması.....	73
3.2.1.5. <i>C. difficile</i> İzolatlarının <i>tpi</i> Gen Varlığı Üzerinden PCR ile Komfirmasyonu ve İzolatlarında <i>tcdA</i> ve <i>tcdB</i> Toksin Gen Varlığının Multipleks PCR ile Belirlenmesi.....	74
3.2.1.5.1. DNA Ekstaksiyonu	75
3.2.1.5.2. PCR ile Mixer Hazırlanışı	75
3.2.1.5.3. Amplifikasyon Programı	76
3.2.1.5.4. Elektrofez İşlemi ve Agar Hazırlanışı	76
3.2.1.6. Antibiyotik Dirençlilik Tespiti.....	76
4. BULGULAR.....	78
4.1. Klasik Kültür Tekniği Sonuçları.....	78
4.2. İzolatların PCR ile Doğrulanması ve Toksin Genlerinin Araştırılması	79
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	82
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	108

1. GİRİŞ

Tükettiğimiz etin besleyicilik değerinin yüksekliği yanında, çok kolay bozulabilen bir gıda olması, üretimi, çeşitli ürünlere işlenmesi ve muhafazası sırasında diğer gıdalarla mukayese edilemeyecek ölçüde dikkat gerektirmektedir (Gökalp ve Yetim, 1988). Çünkü etin biyolojik özellikleri ve hazırlanma teknolojisi, çeşitli mikroorganizmaların bulaşmasına ve bunların çoğalmasına son derece uygun bir ortam oluşturmaktadır. Etin kendine özgü niteliklerinin korunabilmesi, öncelikle kesim ve üretim aşamasındaki hijyenik kurallara uyulması ile mümkün olabilmektedir (Yetim, 1985). Araştırmalar, etlerin hazırlanmasından tüketimine kadar geçen sürede, karkasın çeşitli yollarla kontamine olmasından başka çalışanların elleri, giysileri, bıçaklar, işleme makinaları gibi alet, ekipman ve diğer çevresel faktörlerden oldukça yüksek sayıda mikroorganizmanın bu ürünlere bulaştığını göstermiştir (İnal, 1976; Gökalp ve Yetim, 1988).

Günümüzde sığır eti güvenliği, üretimin tüm aşamalarında uygulanan kontrol önlemlerini içeren bir çiftlikten sofraya gıda güvenliği sistemi temelinde sağlanmaktadır. Mezbahalarda kesim ve parçalama sırasında sığır karkaslarının kontaminasyonu kaçınılmazdır. Bu nedenle, sığır karkaslarında bulunabilecek patojenleri elimine etmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır (Buncic, 2009).

Et üretim miktarlarına bakıldığında Dünya dana eti üretim miktarlarının 2010-2013 döneminde artış gösterdiği görülmektedir. 2010 yılına göre dana eti üretimi yaklaşık 1 milyon ton artarak 2013 yılında 58.620 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Üretimdeki en büyük payı ise yaklaşık % 20 oranla Amerika Birleşik Devletleri (ABD) oluşturmaktadır. Türkiye’de büyükbaş kırmızı et üretimine bakıldığında toplam üretim miktarı 2010 yılından itibaren sürekli artış göstermiş, 2010 yılında 618.584 bin ton olan üretim miktarı % 41 artışla 2013 yılında 869.292 bin tona ulaşmıştır (Tablo 1) (Anon, 2014b).

Tablo 1. Dünyadaki ve Türkiye’deki kırmızı et (sığır eti) üretim miktarları (Anon, 2014a; Anon, 2014b)

	2010	2011	2012	2013	2014 (Tahmini)
Dünya (1000 ton)	57.576	57.422	57.623	58.620	58.856
Türkiye (ton)	618.584	644.906	799.344	869.292	945.360

Gıdaların muhafazasında vakum paketlenme ve gazla paketlenme günümüzde en yaygın kullanılan ambalajlama yöntemleridir. Bu ambalajlama yöntemlerinin prensibi, eşit sıcaklık koşulları altında gıda kalitesinin devamlılığının sağlanması amacıyla çevresinde bulunan gazların doğal kompozisyonunun değiştirilmesine dayanır (Brody, 1989). Gazla paketlenme yöntemlerinden biri olan Modifiye Atmosfer Paketlenme (MAP) teknolojisi raf ömrünü artırmak amacıyla ilk defa 1920’lerde kullanılmaya başlanmış, 1930’lu yıllarda ise karkas ve meyve transportu sırasında CO₂ kullanılarak raf ömrünün arttırıldığı bildirilmiştir (Coventry ve ark. 1998). MAP teknikleri kullanılarak et ve et ürünlerinin raf ömründe % 50-400 artış sağlanabileceğini ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır (Gün ve ark., 1996; Kennedy ve ark., 2004; Han, 2005).

Günümüzde gıda tüketiminde tercihler doğrultusunda tazelik ve pratikliğin ön planan çıkması MAP’a olan talebi gün geçtikçe daha da artmakta, buna bağlı olarak kullanım alanları da yaygınlaşmaktadır (Phillips, 1996). Çiğ ve pişmiş et-et ürünleri, tavuk, balık, kabuklu su ürünleri, sebze, meyve, taze pasta, unlu mamüller, süt ürünleri, sandviç, cips, kahve, çay gibi pek çok gıda maddesi için MAP tekniği kullanım alanı bulmuştur (Davies, 1999; Phillips, 1996).

C. difficile, insanlar için patojen olan ekzotoksin üreten Gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerob basildir (Lipson ve ark., 2003; Kawecki ve ark., 2007). Toksin A ve toksin B üreten toksijenik suşları olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşları da vardır. Toksin üreten *C. difficile* suşları yetişkin insanlarda antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak bildirilmektedir. Nozokomiyal bir ajan olması ve uygun olmayan antibiyotik kullanımlarının sık görülmesi, bu bakteri ile her yıl milyonlarca insanın enfekte olmasına yol açmaktadır (Murray ve ark., 2005; Fawley ve ark., 2005; Rexach ve ark., 2006). *C. difficile*, doğada yaygın olarak bulunan, uygun

olmayan koşullarda sporulasyonla hayatını sürdürebilen nozokomiyal patojen olarak rapor edilmektedir (Büyükbaba, 1994; Kıyan, 1999).

Mikroorganizmanın insana geçişi oral fekal yol ile olur. *C. difficile* sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak bulunur ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur (Barbut ve Petit, 2001). Yapılan çalışmalarda *C. difficile* etkeni birçok araştırmacı tarafından gıdalarda identifiye edilmiştir. Rodriquez ve ark. (2007) Kanada’da 60 parça et örneğinin 12’sinde (% 20) *C. difficile* varlığını ortaya koymuşlar ve 11 izolatında toksijenik karakterde olduklarını saptamışlardır. Aynı araştırmacıların 2009 yılında yaptıkları benzer çalışmada 149 parça et ve 65 sığır pirzola etinde sırasıyla % 6.7 (10/145) ve % 4.6 (3/65) oranında *C. difficile* saptamışlar ve elde ettikleri 13 örneğin 10’unda toksijenik yapıyı kaydetmişlerdir.

Songer ve ark. (2009) Arizona’da yaptıkları araştırmada toplam 88 et örneğinin (sığır parça et, koyun parça et ve hindi eti) 37’sinde (% 42) *C. difficile* saptamışlardır. Jöbstl ve ark. (2010) Avusturya’da yaptıkları çalışmada analiz ettikleri 100 kırmızı et örneğinin 3 tanesinde *C. difficile* varlığını ortaya koymuşlardır. Weese ve ark. (2010) perakende olarak satışı yapılan tavuk etlerinde % 12.8) oranında *C. difficile* izole etmişlerdir. Sepulvida Diaz ve ark. (2013) Minnesota’da 25 farklı perakende market ve kasaplardan topladıkları 342 adet çiğ et örneğinde (sığır, domuz, kanatlı) *C. difficile* prevalansını % 8.5 oranında bildirmişlerdir.

Metcalf ve ark. (2011) yerel marketlerden alınan 86 çeşit deniz ürünü ve balık ürününü incelemişler ve çalışma sonucunda % 4.8 *C. difficile* izole etmişlerdir.

Hayvan ve insan orjinli *C. difficile* izolatlarının genotipik varyasyon benzerliğini ortaya koymaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Arroyo ve ark. (2005) at, köpek ve insan izolatlarının genotipik yakınlığını ortaya koydukları çalışmada 20 insan izolatının 15’inde, 92 köpek izolatının 58’inde, 21 at izolatının 5’i ile benzer genotipik yapıda olduğunu ortaya koymuşlardır.

Keel ve ark. (2007) Kuzey Amerika’da sığır, köpek, at ve domuz izolatlarını insan izolatlarıyla karşılaştırdıkları çalışmalarında domuz ve sığır izolatlarından elde ettikleri ribotip 078’in predominant olduğunu belirlemişler ve sığır izolatları içinde % 94’lük, domuz izolatları içinde ise % 83’lük bir kısmı oluşturduğunu açıklayarak 6

ribotipin insan ve atlarda ortak, 3 ribotipin ise insan ve domuzlarda ortak olduğunu bildirmişlerdir. Yine Koene ve ark. (2012) Hollanda'da yaptıkları çalışma sonucunda insan ve hayvanlardan izole edilen *C. difficile* ribotip 078 izolatları arasında genetik benzerlik olduğunu, buna karşın *C. difficile* ribotip 012 ve *C. difficile* ribotip 014 izolatları arasında genetik farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir.

Rodriguez-Palacios ve ark. (2006-2007) Kanada'da yaptıkları çalışmada enteritli sığırlardan elde ettikleri izolatların % 80'ninin insan izolatlarıyla benzerlik gösterdiğini benzer şekilde et örneklerinden izole ettikleri 12 adet *C. difficile* izolatının 8'inin insan izolatı ile benzer genotipik yapıda olduğunu ortaya koymuşlardır. Varshney ve ark. (2014) Pensilvanya'da yaptıkları çalışma sonucunda insan ve hayvan etlerinden elde edilen izolatlarda genotipik ve fenotipik farklılıklar olmasına karşın, hayvan etlerinden izole edilen bazı izolatların ribotip türlerinin (ribotip 078, PA05, PA16 ve PA229), toksin genlerinin, *tcdC* gen boyutlarının ve antibiyotik direnç profillerinin insan izolatlarıyla benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda küçük değişiklikler yapılmakla beraber metronidazol veya vankomisin *C. difficile* enfeksiyonlarının standart tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Her iki antibiyotığın eşit etkiye sahip olduğu, bununla beraber tedavide metronidazolun kullanılması sırasında klinik yanısızlıklar söz konusu olduğu bildirilmektedir. Palaez ve ark. (2002) ilki 1994 yılında yapılan iki farklı çalışmada % 6 ile % 9 oranında metronidazole dirençli bakteri saptamışlardır. İsrail'de yapılan bir çalışmada ise % 2 oranında direnç bildirilmiştir (Bisharaa ve ark., 2006). Zidaric ve ark. (2012) etkenin metronidazole karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. İlk yüksek vankomisin duyarlılığı ilk kez 1996'da tanımlanmıştır (Wong ve ark., 1999). Daha sonra Pelaez ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada % 3.1 oranında duyarlılık bildirilmiştir. O zamandan günümüze kadar duyarlı izolat sayısında yavaş ama gittikçe yükselen bir artış söz konusudur. Diğer antibiyotiklere direnç ülkelere göre farklılık göstermekle beraber değişik oranlarda bildirilmiştir. En fazla direnç klindamisineritromisin grubunda görülmekte ve yıllar içinde giderek artmaktadır. Klindamisine direnç, Almanya'da 2003 yılında % 36 iken 2007 yılında % 65; İsveç'te 2006 yılında % 43.7 iken 2009 yılında % 65; Kanada'da 2006 yılında % 14.7 iken 2008 yılında % 90.9 bulunmuştur (Bourgault ve ark., 2006; Huang ve ark., 2009).

Toksin üreten *C. difficile* suşları insanlarda antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak bildirilmektedir. Yapılan literatür taramalarında hayvansal orjinli izolatlarla insan izolatları arasında büyük bir benzerlik bulunması nedeniyle bulaşmada kontamine hayvansal gıda faktöründe son yıllarda tartışılan konular arasına girmektedir. Söz konusu etkenin hayvansal gıdalardan insanlara bulaşma olasılığı nedeniyle bu tez çalışması düşünülmüştür. Bu amaçla çalışmada, Samsun ilinde bulunan yerel kasap ve marketlerde satışa sunulan modifiye atmosfer paketli kuşbaşı ve kıyma etlerinden numuneler rastgele toplanmıştır. Toplam 100 adet araştırma materyalini, modifiye atmosfer paketli kuşbaşı (50 adet) ve kıyma örnekleri (50 adet) oluşturmuştur. Numunelerin farklı partilerde olmasına dikkat edilerek soğuk zincir altında laboratuvara getirilen örnekler 25'şerli gruplar halinde analiz edilmiştir. MAP paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerindeki *C. difficile*'nin izolasyon ve identifikasyonu Boer ve ark. (2011)'nin belirledikleri klasik kültür tekniğine göre yapılmıştır. Klasik kültür tekniği ile tanımlanan *C. difficile* izolatlarının PCR ile doğrulanmasında ve elde edilen izolatların toksin genlerinin tespiti Lemee ve ark. (2004)'nin belirledikleri yöntemlere göre multipleks PCR metodu ile tamamlanmıştır. İzolatların antibiyotik direnç profilinin belirlenmesinde ise CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standartları esas alınarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridium difficile*

Clostridium genusunu doğada yaygın olarak bulunan çoğunluğu anaerob, endospor oluşturan, katalaz negatif, Gram pozitif, çoğu mezofilik özellikte basiller oluşturmaktadır. Yüz civarında türü tanımlanmış olup bunlardan ancak 25 türün enfeksiyöz karakterde önemi belirlenmiştir. En önemli türler *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* ve *C. difficile*'dir. Ayrıca *C. septicum*, *C. ramosum*, *C. novyii*, *C. histolyticum* ve *C. bifermentas* gibi türleride klinik örneklerden izole edilmektedir (Bilgehan, 2000; Kıyan, 2002; Gürler, 2005; Murray, 2005; Mc Clane ve ark., 2006).

Filogenetik açıdan sınıflandırıldığında heterojen bir yapıya sahip Clostridium cinsinin son 10 yıl içinde yapılan 16S rRNA gen sekansı çalışmalarına göre, 19 kümeye ve 11 gruba ayrıldığı görülmektedir. Clostridium cinsinin temelini içinde klinik öneme sahip pek çok Clostridium türü bulunduran homoloji grup 1 oluşturmaktadır. Son yapılan rRNA gen analiz sonuçlarına göre ise Clostridium'lar 5 yeni cins ve 11 yeni türde toplanmıştır. Clostridium'lar *Firmicutes* şubesinde yer almakta ve en az 12 neslin yer aldığı heterojen bir grubu oluşturmaktadır (Murray, 2005).

Clostridium difficile'ye ait patolojik bulgular ilk kez Finney tarafından 1893 yılında gerçekleştirilen bir mide operasyonu sonrası postmortem olarak mukozada difterik psödomembranlar şeklinde tespit edilerek tanımlanmış ancak *Staphylococcus aureus* olduğu düşünülmüştür (Donald, 2000; Thielman ve ark., 2010). *Clostridium difficile* türü ise ilk kez 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından 0-1 yaş arası çocukların bağırsak florasından saptanmıştır ve *Bacillus difficilis* olarak tanımlanmıştır (Hall ve O'Toole, 1935).

1940'ta Synder, 22 sağlıklı infantın 10'unun gaitasından *Bacillus difficilis* izole ettiğini rapor etmiştir. Saf kültürü eldesi oldukça güç olduğundan bakteriye güç (difficult) anlamına atfen "Difficile" ismi verilmiştir (Kıyan, 1999).

1950-1970 yılları arasında yapılan çalışmalarda önemli aşamalar kaydedilmiş ve antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak gelişen antibiyotik ilişkili ishal/kolit vakaları daha sık gözlemlenmeye başlamıştır. 1977 yılında Bartlett ve ark.'nın hamsterler üzerinde yaptıkları çalışmada antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *C. difficile*'nin rol oynadığı bildirilmiş, hamsterlarda görülen enterokolitle klindamisin ve linkomisin kullanımının ilişkili olduğu, klindamisin kullanımına bağlı olarak ishalin daha erken ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Yine 1977 yılında Larson ve Price, Pseudomembranöz Kolit (PMK) olgusunun toksine bağlı olabileceğini belirtmişler ve yaptıkları çalışmada toksin oluşumuna bağlı görülen sitopatik etkiyi görmüşlerdir. 1979'da *C. difficile*'ye bağlı PMK'nın ilk basamak tedavisi olarak vankomisin uygulanmıştır. İngiltere Sağlık Güvenliği Komitesi tarafından PMK'nın en sık nedeni olarak belirlenen klindamisin ve linkomisinin kullanımı kısıtlanmıştır (Pepin ve ark., 2005).

1981 yılında Taylor ve ark., antijenik ve biyolojik özellikleri farklı olan ikinci bir toksini (Toksin A) bildirmişlerdir. Bununla beraber Libby ve Wilkens (1981) etkene ait her iki toksini “Toksin A” ve “Toksin B” olarak immunlojik özellikleriyle tanımlamıştır.

1980’lerden itibaren, ABD’de en önemli nozokomiyal ishal etkeni olarak *C. difficile* tanımlanmış, 1989-1992 yıllarında klindamisinin yoğun kullanılması ile klindamisine dirençli suş ile (J suşu) ABD hastanelerinde salgınlar meydana gelmiştir.

1988 yılında Popoff ve ark., tarafından nonsitojenik karakterdeki 3. toksin olan CDT (Binary toksin) tanımlanmıştır.

2003-2006 yıllarına gelindiğinde daha şiddetli, standart tedaviye dirençli nüksleri yüksek olan *C. difficile* infeksiyonları tanımlanmıştır (Pepin ve ark., 2005).

C. difficile gıdalarda ilk kez 1996 yılında Brada ve ark.’nın yaptıkları bir çalışmada (vakum paketli etler üzerinde) tespit edilmiştir. 2006 yılından bu yana yapılan çalışmalarda etkene gıdalarda sıklıkla rastlanması etkenin bir zoonotik olduğunu düşündürmektedir. Günümüzde çalışmalar devam etmektedir.

2.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

C. difficile, Gram pozitif, anaerobik, subterminal sporlu, kapsülsüz patojen bir bakteridir. 0.5-2 µm eninde, 3-17 µm boyunda, ince, uzun, düz peritrik flagellaları ile hareketli bir yapıya sahiptir (McClane ve ark., 2006). Sporların şeklinden dolayı bakteri tenis raketine benzer bir görünüme sahiptir. Genç kültürlerde daima Gram pozitif boyanırken eskimiş kültürlerde Gram negatif boyanır. Dokudan hazırlanan preparatlarda tek tek veya kısa zincirler halinde, katı besiyerlerinde ise filamentöz yapıda görüldüğü bildirilmiştir (Bilgehan, 1994; Kıyan, 1999). *C. difficile*’nin üreme koşulları ve bazı biyokimyasal özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. *C. difficile*'nin üreme koşulları ile bazı biyokimyasal özellikleri (Kıyan, 1999; Murray ve ark., 2005)

Özellik	Açıklama
CO ₂ - H ₂	10 %
N ₂ O	80 %
Sıcaklık	25-45 °C (opt. 30-37 °C)
pH	7 – 7.2
Glikoz, Fruktoz	Pozitif
Mannitol, Mannoz	Pozitif
Katalaz, Süperoksit Dismutaz	Negatif
Oksidaz, İndol	Negatif
Üreaz, Lesitinaz	Negatif
Lipaz	Negatif
At Kanında Hemoliz	Pozitif
Koyun ve İnsan Kanında Hemoliz	Negatif

C. difficile adi besiyerlerinde üreyebilir ancak kan, fruktoz ve yumurta katkılı besiyerlerinde daha kolay üreme gösterir. Uygun besiyerlerine ekimi takiben 48 saatlik bir inkübasyon süresi sonunda 1-3 mm çapında S tipi koloniler oluştuğu görülür. Oluşan bu koloniler, 360 nm'lik ultraviyole (UV) ışığı altında incelendiğinde renkleri açık yeşilden sarıya kadar değişebilen bir hale ile çevrili olup buzlu cam görünümünde oldukları tespit edilmiştir (Bilgehan 1994; Ondedonk ve ark., 1995). Pepton-maya özütü-glikoz (PMG, PYG) besiyerinde asetik, izobutirik, butirik, valerik, izovalerik, izokaproik, formik, laktik asitler üretir ve trozini para-kresole çevirebilir. Bunun sonucu olarak besiyerinde spesifik cresol kokusu (at veya fil gübresine benzer) oluşur ve bu ayırt edici bir özellik kabul edilir (Bilgehan, 1994; Summanen ve ark., 1993; Akan, 1993). Bu özelliklerinden yola çıkılarak, Cycloserine-Mannitol Agar (CMA), Cycloserine-Mannitol Blood Agar (CMBA), Cycloserin-Cefoxitine-Egg Yolk Fructose Agar (CCFA) gibi besiyerleri, “seçici-ayırıcı besiyerleri” olarak kabul edilmektedir. Hızlı tanıda bu besiyerlerinde oluşan tipik koloniler (CCFA besiyerinde sarı renkli 360 nm ultraviyole ışığı ile floresans veren büyük koloniler ya da kanlı agarda 3-5 mm, düzensiz, kristal görünümünde, hemoliz yapmayan, rizoid koloniler) değerlendirilir (Bilgehan, 1994; Ondedonk ve Allen, 1995).

Bakterinin izolasyon oranını artırmaya yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların temel işlevi etkenin sporlu formunun vejetatif formuna dönüştürülmesini sağlamaktır. Dışkı örneğinin 70-80 °C'lik benmaride 20 dakika tutarak ya da 1/1 oranında saf etil alkol ile karıştırıp sonra oda ısısında en az 45 dakika bekleterek yapılan işlemin kontaminant çoğu bakteriyi öldürerek izolasyonu önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir (Knoop ve ark., 1993; Ondedonk ve ark., 1995; Kıyan 2005). CCFA Besiyerine % 0.1-0.2 oranında sodium taurocholate ilavesinin yine izolasyon oranını arttırdığı bildirilmiştir (Wilson ve ark., 1982).

2.3. Virülens Faktörleri ve Toksin Özellikleri

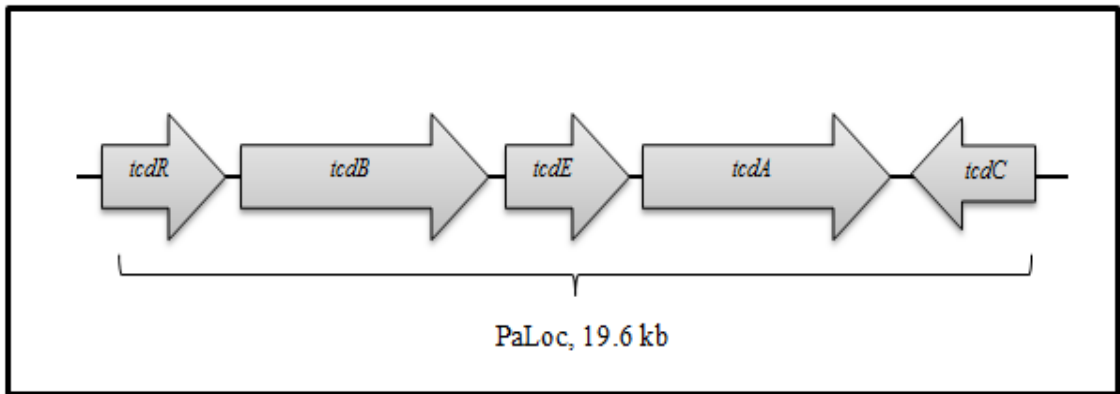
Virülens faktörlerinin içerisinde 2 önemli toksini yer almaktadır. Bunlar enterotoksik etkili “toksin A” ve sitotoksik etkili “toksin B”dir (Thelestam ve ark., 2000). Bazı *C. difficile* suşları tarafından üçüncü bir toksin olan “binary toksin (CDT)” salgılanmaktadır. Ancak bu toksinin etkileri henüz net olarak açıklanamamıştır (Shen, 2012).

Toksin üretimlerinin yanında etkenin bağırsak hücrelerine bağlanmasını ve lümeninde ilerlemesini kolaylaştıran bazı faktörlerde virülensde rol oynar. Etkene ait vejetatif hücreler kolona ulaştığında proteazlar tarafından bağırsak lümenine salgılanan mukus ve flagellaların yardımıyla *C. difficile* hücreleri mukus boyunca hareket eder ve etkenin yayılması kolaylaşır. Yine epitel hücrelerindeki adezinler ve yüzey molekülleri etkenin bağlanmasında regülatör etki gösterir (Deneve ve ark., 2009). Son olarak etkenin spor oluşturma özelliği de virulensinde rolü olan diğer faktörler arasında gösterilmektedir (Gürler, 2005).

C. difficile'nin spor formları normal şartlarda çevrede metabolik olarak inaktif halde bulunur ancak üremelerini sağlayan uygun ortamda spor formlar vejetatif forma dönüşür. Oluşan vejetatif formlar gelişme sürecine girer ve sporların dirençlilik özelliği kaybolur. Sürecin gelişmesi ya farklı bileşikler tarafından indüklenerek ya da sporlara ait membrandaki reseptörlerin duyarlı hale gelmesiyle oluşur (Burns, 2010). Gıdalarda etken ve sporlarının inaktive olmasını ya da azalmasını sağlamak için belirli derecelerde pişirme uygulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada parça sığır etlerinde 85 °C'ye

ısıtıldığında inhibitör etki gözlenmekle beraber etken tekrar üretilebilirken, 96 °C’de 1-2 dakikalık ısıtmada etken sayısı 6 log₁₀ düzeyinde azalmaktadır (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011).

Toksin A’nın molekül ağırlığını 308 kDa, toksin B’ninkini ise 270 kDa olarak tespit edilmiştir (Barrasso ve ark., 1990). Toksin A ve toksin B 20 kb uzunluğundaki patojenik lokus olarak bilenen gen bölgesinde bulunan *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından kodlanır (Rupnik ve ark., 1998). Bu genlere ek olarak *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olmak üzere 3 yardımcı gen de bu bölgede bulunur. Bunlardan *tcdR* geni toksin üretimini pozitif yönde indükleyici etki gösterirken *tcdC* geni negatif yönde indükleyici etki gösterir (Rupnik ve ark., 2009). *tcdE* geni ise kodladığı proteinlerle toksin A ve toksin B’nin *C. difficile*’nin hücre zarından geçişine yardım eder (McDonald ve ark., 2005). Binary toksin ADP-riboziltransferaz aktivitesi içermekle birlikte 2 subüniteden oluşur (CdtA ve CdtB) ve *C. perfringens* tarafından üretilen iota toksin ile benzerlik gösterir (Stubbs ve ark., 2000; Voth ve Ballard, 2005). Binary toksin *cdtA*, *cdtB* ve regülatör gen olan *cdtR*’yi içeren 4.3 kb uzunluğundaki genomik bölge tarafından kodlanılır (Rupnik, 2009). Ancak toksinin etkileri henüz net olarak açıklanamamıştır. Toksinin endositoz ile kolon epitel hücrelerinden bağırsak lümenine girdiği ve ADP-ribozil enziminden 1 üniteyi aktin monomerlerine transfer ederek aktin polimerizasyonunu önlediği düşünülmektedir (Shen, 2012). *C. difficile*’ye ait genlerin patojenik lokus üzerindeki görünümü Şekil 1’ deki gibidir (Diaz, 2013).



Şekil 1. *C. difficile*’ye ait genlerin patojenik lokus üzerinde yerleşimi (Diaz, 2013)

Toksin A ve toksin B benzer etkilere sahip olmakla beraber yapısal olarak homoloji gösterirler (Taşova ve ark., 2005). Bununla beraber patojenik olarak toksin B, toksin A'ya kıyasla 1000 kat daha güçlü bulunmuştur ve 100 kat daha aktif bir enzimatik aktiviteye sahiptir. Toksin A'nın toksin B'den önemli bir farkı bağırsakta sıvı salınımını arttırabilmesidir (Boriello, 1998).

Toksinler özellikle logaritmik fazın sonu ile durgunluk fazın başında salgılanmakla beraber sporülasyon sırasında toksin üretimi gerçekleşmez. Bununla beraber toksin üretiminin, ısı, glikoz, aminoasit konsantrasyonu ve biyotin varlığı ile ilişkili olarak değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (Thielman, 2000; Poxton ve ark., 2001).

Toksinler karboksil ucunda devamlı tekrar eden üniteler içerir. Toksin A ve toksin B'nin karboksi terminal bölgeleri benzer glikoziltransferaz aktivitesine sahiptir. Toksin A, hücrenin bu karbonhidrat reseptörlerine bağlanarak girerken, toksin B'nin reseptörleri belirlenememiştir. Her iki toksin nükleik asitlere bağlanabilir. Ayrıca, toksin A'nın nonspesifik monoklonal antikorlara da Fab (Fragment antigen binding-Antijen bağlayan kısım) kısımlarından bağlanabildiği gösterilmiştir (Poxton ve ark., 1996). Yenidoğanlarda bakteri ve toksinin varlığı yüksek oranlarda saptanması, hastalık bulgularının olmayışı reseptörlerin yeterince gelişmemesi, kolostrumun olası koruyucu etkisi ya da reseptörleri örten ince bir tabakanın varlığı ile açıklanmaktadır (Drummond ve ark., 2003). Bu toksinlerin sitotoksik aktiviteleri ve bunlara karşı gelişen yangıal yanıt ishali histopatolojisini oluşturmaktadır. Toksinlerin hücre membranındaki reseptörlere bağlanması toksik etkiyi oluşturur. Her iki toksin mukozada inflamasyona yol açar; nötrofil, monosit ve dökülen enterositleri içeren proteinden zengin bir eksüdat salgımasına neden olurlar. İzolatların yaklaşık % 25'i toksin üretmemektedir ve dolayısıyla bu türdeki etkenin ishal ve kolite neden olmadığı ifade edilmektedir (Mikolajczyk ve ark., 1997; Murray ve ark., 2005).

2.4. Patogenez

Mikroorganizmanın insana bulaşması fekal-oral yol ile olur. Etkenin spor formları çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak yıllarca bulunur

ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur (McFarland, 1989). Yapılan çalışmalarda etkenin sporları birçok araştırmacı tarafından gıdalarda da identifiye edilmiştir. Dolayısıyla kontamine gıdaların enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Songer ve ark., 2009).

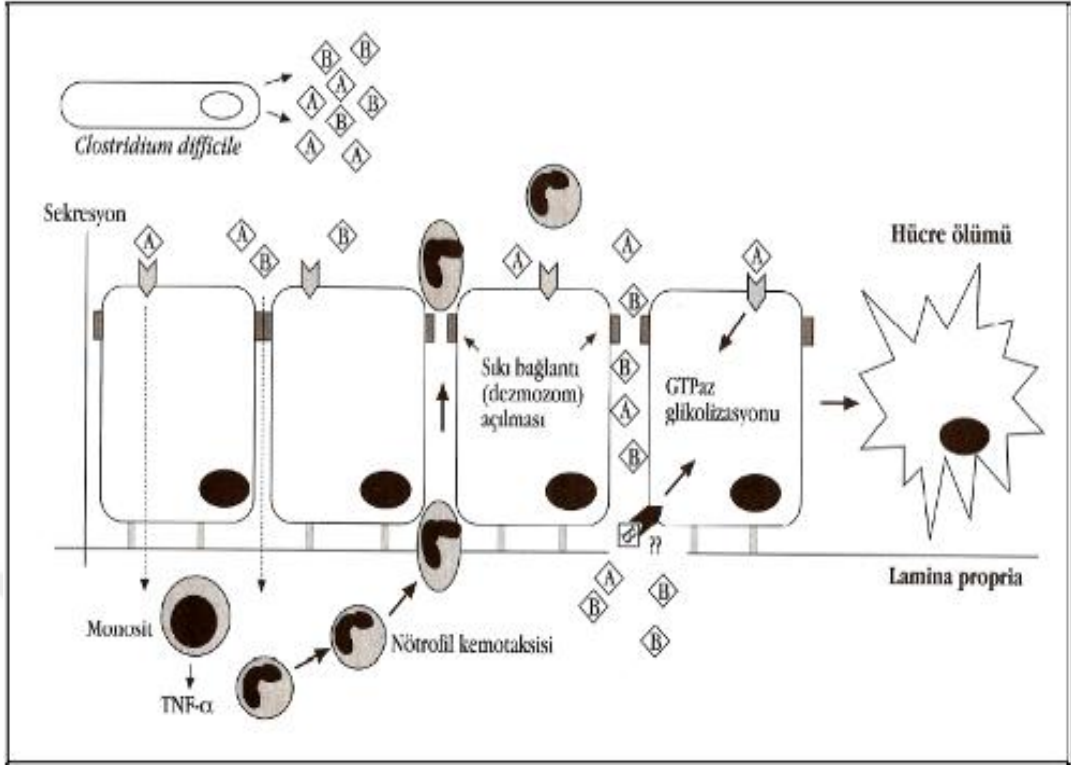
İnkübasyon süresi hakkında kesin veriler olmamaklar birlikte bir çalışmada inkübasyon süresinin 7 günden az olduğu bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1990). Etkenin bulaşmasını takiben patagonezinin gelişiminde önemli bir koşul kolon florasının baskılanmış olmasıdır. Bu baskının oluşmasında antibiyotikler ve antineoplastikler önemli rol oynar (Thielman, 2010). *C. difficile* ile ilişkili ishalde rol oynayan risk faktörleri Tablo 3’de özetlenmiştir. Alınan etkenin vejetatif formları mide asit ortamından etkilenip canlılığını yitirirken aside dirençli spor formları mideyi geçerek ince bağırsağa ulaşır. Bağırsağa geldiklerinde safra asidine maruz kalan sporlar terminal ileumda vejetatif forma dönerler ve kolon lümeninde çoğalırlar. Klinik durum, adhezyon, hidrolitik enzim sekresyonu ve konak faktörleri gibi diğer virülens faktörlerine bağlıdır. Suş toksijenikse, hemen hemen tüm olgularda eş zamanlı olarak toksin A ve toksin B üretilmekte, sıvı sekresyonu, yangı ve mukozal hasar oluşmaktadır (Barbut ve ark., 2001; Taşova ve ark., 2005).

Tablo 3. *C.difficile* ile ilişkili ishalde rol oynayan risk faktörleri (Anand ve Glatt, 1993; Loo ve ark., 2011)

Risk Faktörleri
İleri yaş (özellikle 65 yaş üstü)
Hastanede kalma süresi
Antibiyotik kullanımı
Kanser tedavisi
Üremi
Nazogastrik ve endotrakel tüp varlığı
Mide - Bağırsak operasyonları
Altta yatan ikinci bir hastalığın varlığı ve şiddeti (AIDS, kanser vb.)
Mide asiditesini azaltan ilaçlar
Hastane hijyeni

Toksinler kolon epitelinin lümenal tarafındaki spesifik reseptörlere bağlanır ve endositoz yoluyla hücre içine alınırlar. Hücre içinde toksinlerin hedefi, aktin hücre iskeletinin bütünlüğünden sorumlu sinyal molekülleri olan rho proteinleridir (Kyne ve ark., 2001; Poxton, 2001). Toksin A ve B tarafından bir glikoz ünitesi düşük molekül ağırlığında glikoziltransferaz içeren Rho proteinlerine transfer olur ve sonucunda Rho proteinleri inaktive olur (Thelestam ve ark., 2000). Bu proteinlerin inaktivasyonu sonucu hücre etkilenir, aktin hücre iskeletinin bütünlüğü bozulur ve protein sentezi inhibe olur. Toksinler bağırsak epitelinden endositoz yoluyla bağırsak lümenine geçer. Hücreler yuvarlaklaşır, bağlantılar kırılır ve sonuçta hücre ölümü, sıvı sekresyonu ve yangı meydana gelir (Voth ve Ballard., 2005).

Toksin A ve B ayrıca tümör nekroze faktör alfa (TNF α) ve proinflamatuvar interlökinlerin salgılanmasına neden olarak inflamatuvar yanıtı ve psödomembran gelişimine yol açar; bununla birlikte kapiller permeabilite ve peristaltizm artışına da neden olurlar (Yasin ve ark., 2001; Kyne ve ark., 2001; Poxton, 2001). Toksin A, fosfolipaz aktivitesi ile prostaglandin ve lökotrienlerin sentezini uyarır. Villöz uçlarda ve mukozada lezyonlar, erozyon oluşturur. Bu hasar sonucu kanlı, visköz bir sıvı yanıtı belirir. Ayrıca, toksin A nötrofiller için güçlü bir kemotaktik ajandır. Toksin B ise hücreler üzerinde öldürücü etki gerçekleştirir (Poxton ve ark., 1996; Borriello, 1998). *C. difficile* toksinlerinin bağırsakta oluşturduğu etkiler Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. *C. difficile* toksinlerinin bağırsağa etkileri (Poxton, 2001; Drummond, 2003)

2.5. *C. difficile* Enfeksiyonları

2.5.1. Asemptomatik Kolonizasyon

Enfeksiyonun bu formunda klinik bulgurun etkisi görülmezken mikroskopik incelemelerde kolon lümeninin *C. difficile* ile kaplı olduğu ve yapılan kültür sonucunda da *C. difficile* üremesi tespit edilmektedir (Johnson, 2009). Sağlıklı yenidoğanların yaklaşık % 50'sinin erişkinlerin % 1'inden azının asemptomatik taşıyıcı olduğu bildirilmiştir. Ancak antibiyotik tedavisi gören kişilerde bu kolonizasyon oranının % 15-25'lere çıktığı bildirilmiştir (Bartlett ve ark., 2008).

2.5.2. *C. difficile* İshali

Enfeksiyonun en sık görülen klinik formudur. Karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette ishal ile kendini gösteren klinik tabloda halsizlik ve ateş de nadir olsa

da görülen diğer semptomlar arasında yer alır. Antibiyotik kullanımıyla ilişkili olarak tedavisi esnasında, kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra ishal oluşabilmektedir. En önemli laboratuvar bulguları lökositöz ve hipoalbuminemi (Johnson, 2009).

2.5.3. *C. difficile* Kolut (Psödömembransız Kolit)

C. difficile'ye bağlı ishal olgularının çoğu bu tiptir. Psödömembranöz bulgular görünmese dahi klinik seyir ciddi seyredebilmektedir. Karşılaşılan klinik semptomlar arasında hafif ve orta şiddette karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık ve sulu ishal yer alır. Yapılan sigmoidoskopide hastalığa özgül olmayan yaygın ya da yama tarzında psödömembransız eritematöz kolit tablosu ile karşılaşılabilmektedir (Johnson, 2009).

2.5.4. Psödömembranöz Kolit (PMK)

Klinik semptomlar psödömembransız kolite benzerlik göstermekle beraber görülen klinik semptomların daha ağır seyretmesi ve patolojik bulgu olarak bağırsakta psödömembranların görülmesiyle psödömembransız formdan ayrılır. Hastalarda şiddetli ishal ile birlikte karında duyarlılık hissi vardır. Yapılan endoskopide genellikle kalın bağırsağın proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı şeklinde ve kolorektal mukoza boyunca psödömembran dağılımları görülebilmektedir (Vaishnavi, 2010). Plakların yapısını fibrin, mukus, nekrotik mukozal hücreler ve nötrofillerden oluşturur. Gaita mukuslu, sulu ve pis kokulu olmakla birlikte kan da içerebilir (Taşova ve ark., 2005). Hastalığın şiddetli seyreden formlarında görülen komplikasyonlar dehidratasyon, hipoalbuminemi, elektrolit bozukluğu, megakolon toksemisi, bağırsak perforasyonu ve ölüme kadar varabilir (Taşova ve ark., 2005).

2.5.5. Fulminant (Şiddetli) Kolit

C. difficile enfeksiyonu görülen hastaların % 2-3'ünde ileus, megakolon, kolon perforasyonu ve ölüme kadar varabilen ciddi komplikasyonlar seyredebilmektedir (Mc Collum, 2012). Hasta birkaç saat veya haftalar içinde hastalığın fulminant formuna girebilir. Bu durumun seyrinde hastanın yaşı, immünite durumu, altta yatan başka

hastalığın olup olmadığı ve bakterinin toksin durumu etkili olmaktadır. Hastalarda ishal, karında duyarlılık, ağrı ve şişkinlik vardır. Bazı hastalarda yüksek ateş, üşüme ve titreme görülebilir (Johnson, 2009).

Relaps (Rekürent CDE)

C. difficile ishalinin ilk periyodunda başarılı olarak tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar ishal ve diğer semptomların ortaya çıkmasıyla beraber relaps (nüks) gelişir. CDE'li hastaların % 15-20'sinde relaps görülmektedir. Birinci relapstan sonra olguların % 40'ında ikinci relaps, ikinci relaps oluşan hastaların % 60'ında üçüncü relaps görülebilmektedir. Devam eden antibiyotik kullanımı, antiasit kullanımı ve ileri yaş rekürent formun gelişiminde risk faktörü olarak görülmektedir (Mc Collum, 2012). Bunlarla birlikte enfeksiyonun özellikle metronidazol veya vankomisin ile yapılan tedavi sonrasında ortaya çıkması etkenin bu antibiyotiklere duyarlı olduğunu göstermekle beraber mikroflorayı bozup *C. difficile* ile reinfeksiyona eğilimi artırıyor olabileceği ihtimalini düşündürmektedir (Taşova ve ark., 2005).

2.6. Labaratuvar Tanı

2.6.1. Biyokimyasal Yöntemler

Rutin Biyokimyasal Testler

Lökositoz, ciddi hastalarda gelişen enteropatiye bağlı olarak dehidratasyon, protein kaybı sonucunda ortaya çıkan hipotalbüminemi ve diğer bazı elektrolit anomalileri saptanabilir. Yine fekal lökositlerin saptanması nonspesifik bulgular arasında yer alır (Fry, 2000; Bartlett, 2002).

Kromatografik Yöntemler

Anaerob bakterilerin metabolizmaları sonucu uçucu spesifik metabolitler oluşturması özelliğinden yararlanılarak tanıya gidilebilmektedir (Nonhoff ve ark., 1995). Gaz-Likit Kromatografisi, Gaz Kromatografisi, Kitle Spektroskopisi yöntemleriyle oluşan bu metabolitler saptanabilmektedir (Bartlett, 1996; Probert, 2004). Bu yöntem ile dışkıdan *C. difficile* için özgül izovalerik asit, izokaproik asit veya p-krezol saptanarak tanı konulabilir (Fekety, 1997). Basit, hızlı ve çok güvenilir, diyagnostik bir testtir (Nonhoff ve ark., 1995; Fekety, 1997).

2.6.2. Radyolojik Yöntemler

Abdominal radyografi ve bilgisayarlı tomografi *C. difficile* enfeksiyon tanısında yardımcı olsada nonspesifik bulgular olduğundan bu amaçla kesin tanıya götürecekt en çok tercih edilebilecek radyolojik inceleme endoskopidir (Bartlett, 2002). Abdominal radyografide kolon ve sekumdaki dilatasyonlar, incebağırsaktaki gaz ve su seviyesi görülebilir. Bilgisayarlı tomografide ise kolondaki kalınlaşmalar ve katlanmalar görülebilir (Fry, 2000). Yapılan endoskopik muayenede antibiyotikle ilişkili ishali olan hastalarda kolonda psödomembran bulgusu *C. difficile* koliti için patognomik olarak kabul edilir. Yüzeiden kalkık, yeşilimsi 2-10 mm çapında normal mukoza ile çevrili lezyonlar tipiktir. Şiddetli olgularda lezyonlar birleşerek plaklar oluşturur (Taşova ve ark., 2005).

2.6.3. Mikrobiyolojik Yöntemler

Kültür tanıda kullanılan en önemli yöntemlerden biri olmakla beraber salgın araştırmaları ve hastane izolatlarının epidemiyolojik amaçlı incelenmesinde esas testlerden kabul edilir (Strelaw ve ark. 1989). *C. difficile* izolasyonunda, Cefoxitin-Cycloserine Fructose Agar (CCFA) seçici besiyeri olarak kullanılmaktadır. Bileşimini, sikloserin (500 mg/l), sefoksitin (16 mg/l), fruktoz, pH indikatörü olarak nötral kırmızısı ve yumurta sarısı oluşturur. Sikloserin ve sefoksitin konsantrasyonlarının yüksek olmasına bağlı olarak birçok *C. difficile* suşunun inhibe olduğunun anlaşılması üzerine

bu antimikrobiyal ajanların konsantrasyonlarının yarı dozlarını içeren modifikasyonları yapılmıştır. Sikloserin ve sefoksitin, besiyerini selektif hale getirir. *C. difficile* fruktozu fermente ettiğinden dolayı ayırt edici özelliği vardır (Federko ve ark., 1997; Ardiç, 2004). *C. difficile* izolasyon oranı gaita örneklerinin ısı veya alkolle işleme tabi tutulduktan sonra CCFA'ya pasajlarının yapılması ile artmaktadır. *C. difficile* kolonileri ultraviyole (UV) ışığı altında (366 nm dalga boyunda) CCFA üzerinde sarı-yeşil floresans verir. P-krezol, volatil yağ asitleri ve özellikle izokaproik asidlere bağlı olarak şekillenen tipik at veya fil gaitası kokusu tespit edilir. *C. difficile* kolonileri tipik olarak gri, opak, 24-48 saatte non-hemolitiklidir. Fakat bazı suşları alfa-hemoliz yapabilir. İnkübasyondan 48-72 saat sonra sporülasyona bağlı olarak merkezi beyaz veya hafif gri olan ayırt edici koloniler gelişebilir. *C. difficile* bu besiyerinde spor oluşturmaz (Akan, 1993, Ondedonk ve ark., 1995; Thielman, 2000). Kültür sonuçları 3-5 gün içinde sonuçlandığından rutin tanıda ağırlıklı olarak kullanılmamaktadır (Öztürk, 2004). Kültürde üreyen mikroorganizmaların identifikasyonu için lateks aglütinasyon, gaz kromatografi veya biyokimyasal yöntemler kullanılır (Ardiç, 2004).

2.6.4. Toksin Aramaya Yönelik Testler

Doku Kültürü Testleri

Doku kültüründe toksin tayini ve toksin nötralizasyonu (*C. difficile* veya *C. sordellii* antitoksinleri ile) tanıda altın standart olarak kabul görmektedir. Yöntemde, gaita filtratının veya üretilmiş bakteri filtratının değişik hücre kültürleri üzerine sitopatik etkisi incelenir. Yöntemle 10 pikogram düzeyine kadar sitotoksin saptanabilmektedir (Öztürk, 2004). Kullanılan hücre kültürleri Hep2 (insan epidermoid karsinoma hücreleri), CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri, MRC 5, WI-38 (insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri), FL (insan amniyon hücreleri) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek) hücreleri gibi kültürlerdir (Sullivan ve ark., 1982; Lysterly ve ark., 1988).

Bir başka yöntemde ise sıvı dışkı örnekleri santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant, filtrelerden geçirilerek bakteriden arındırılır. Elde edilen filtrattan bir miktar saydam hücre kültürü kaplarına ilave edilir. 37 °C'de 24-48 saat anaerob

ortamda inkübasyona bırakılır. Işık mikroskopunda incelenerek sitopatik etki (yuvarlaklaşma) aranır. Normal dışkı örnekleri çalışmaya uygun olmadığı için rutin işlemlerde en az on kez dilüe edilmiş dışkılarından toksin titreleri araştırılır (Lyerly ve ark., 1988; Thielman, 2000; Bartlett, 2002).

Testin dezavantajı uzun sürede sonuç alınması, pahalı olması, standardizasyonunun sağlanamamış olması, her laboratuvarında uygulanamaması ve doğrulama için referans laboratuvarına, yorumlamak için uzmana gereksinim duyulmasıdır. Bu nedenle pratik bir yöntem değildir (Manabe ve ark., 1985; Bartlett, 2002).

2.6.5. İmmüno diyagnostik Testler

Enzim immünoassay (EIA)

Yüksek düzeylerde özgüllük ve duyarlılığa sahip olması, kısa sürede sonuç vermesi, uygulanabilirliğinin daha kolay ve zahmetsiz olması nedeniyle tanıda alternatif bir yöntem olarak önerilir (Dipersio ve ark., 1991, Liensenfeld, 1994). Ancak yöntemle 100-1000 pg toksin A veya B saptanabilmektedir. % 10-20 oranında yalancı negatiflik söz konusudur (Bartlett, 2002). Uygulama da mevcut kitler genellikle toksin A'yı saptamaya yöneliktir ancak *C. difficile* suşlarının % 1-2'si toksin A üretmediği bilindiğinde daha iyi sonuç almak adına toksin A ve B'yi birlikte saptayabilen kitlerin tercihi önerilmektedir (Fry, 2000; Bartlett, 2002).

Lateks Aglütinasyon Testi

Hızlı, basit ve ucuz bir testtir. Bu testlerin esası toksin A'yı saptamaya yönelik olsada tüm *C. difficile* suşları tarafından salgılanan metabolik enzim ve ortak bir antijen olan glutamat dehidrogenaz enzimi de saptanabilmektedir. Diğer testlere oranla duyarlılığının ve özgüllüğünün düşük olması nedeni ile yaygın kullanım alanı bulamamıştır (Fry, 2000).

İmmünokromatografik Testler

Toksin A'yı saptamaya yönelik kısa sürede sonuç veren tarama testleri olup bazı çeşitleri glutamat dehidrogenaz enzimini de saptar. Duyarlılıkları düşük olup tanı amaçlı tek başına kullanılması önerilmemektedir (Fedorko ve ark., 1999; Alfa ve ark., 2002).

2.6.6. Moleküler Yöntemler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Yöntem toksin A, toksin B ya da her ikisinin de gen bölgelerinin bir kısmının polimeraz enzimi yardımı ile amplifikasyonu sonucunda saptanır hale getirilmesi esasına dayanır (Gerding, 1995). Son yıllarda monoklonal *C. difficile* antikoru ile kaplanmış manyetik boncukların dışkı örneği ile inkübe edilmesi, daha sonra bu boncukların mıknatıs yardımı ile çıkarılması ve toksin B genine özgül primerlerle PCR'da işleme sokulması esasına dayanan immüno manyetik-PCR testi geliştirilmiştir (Wolfhagen,1994).

Oldukça duyarlı ve özgül kabul edilen yöntem de uygulama için kültür gerektiğinden duruma alternatif olarak direkt dışkıdan toksin tesbite yönelik PCR yöntemi geliştirilmiştir. Duyarlılığı % 96.3 ve özgüllüğü sırasıyla % 100 olarak bulunmuştur. Ancak uygulamanın uzman gerektirmesi, sitotoksin testine göre daha hızlı ve ucuz hale getirilememesi dezavantajlarıdır (Taşova, 2005).

Real-time PCR direkt olarak gaitadan toksin genlerini saptamak için kullanılan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Hedeflenen genler, *tcdB* geni (toksin B üretimini düzenleyen gen) veya *tcdC* genidir (toksin A ve toksin B üretiminin kabul edilen negatif düzenleyicisi). *tcdC* genindeki baz çifti delesyonlarının, toksinin aşırı üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu delesyonlar da real-time PCR'la belirlenebilmektedir (Crobach, 2009).

2.7. Korunma - Kontrol

C. difficile enfeksiyonlarının günümüzde hızla artış göstermesi ve salgınlara neden olması enfeksiyondan korunmaya yönelik tedbirlerin artması gerektiğinin kanıtıdır. *C. difficile* etkeni, antibiyotikle ilişkili ishal olgularının başında görülürken, son zamanlarda toplum kökenli enfeksiyonların insidensinde artış olması, yapılan çalışmalarda etkenin gıdalarda, evcil hayvanlarda tespit edilmesi etkenin zoonoz olabileceği konusunda fikirler ortaya çıkarmıştır.

Enfeksiyonun gıdalardan ve çevreden geçişlerinin tespit edilmesi hijyen uygulamalarının önemini arttırmaktadır. Bu konu da gıda işletmeleri gıda ürünlerinin üretiminden tüketime ulaşıncaya kadar tüm aşamalarda asgari hijyenik şartlara uyum sağlamalı ve gıda güvenliğini tehlikeye atacak durumların önüne geçmelidir. Bu durumun sağlanmasında sağlıklı hammadde tedariki, üretim boyunca analizler yapılması, soğuk zincirli ürünlerde uygun muhafaza sağlanması, personel hijyeni, işletme hijyeni gibi uygulamalar başta gelmelidir. Özetle gıda işletmelerinde HACCP sistemi hayata geçirilmelidir.

İnsanlarda antibiyotiğe bağlı ishal olgularının önlenmesinde öncelikle bilinçli antibiyotik uygulaması başta gelir. Hastalara antibiyogram yapılarak uygun antibiyotik seçilmeli, birden fazla antibiyotik kullanımından sakınılmalıdır. Yine bu hastalar da tedavi aşamasında hijyenik koşullar sağlanarak bulaşma önlenmelidir.

2.8. *C. difficile*'nin Epidemiyolojisi

C. difficile; insanlarda, hayvanlarda, gıdalarda, su ve toprakta olmak üzere pek çok alanda bulunmaktadır. Mikroorganizmanın insana geçişi oral-fekal yol ile olur. Sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak bulunur ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur. Yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı (et ve süt ürünleri) gıdalara ek olarak salata ve sebzelerde de yüksek oranda izole edilmiştir. Deniz ürünleri ve balıklarda da tespit edilmektedir (Barbut ve Petit, 2001).

C. difficile 'ye bağlı ishal olaylarında artış yaşanması, araştırmacıları bu bakterinin gıda zehirlenmelerinde rolü olan zoonotik bir etken olduğuna dair çalışmalar

yapmaya yöneltmiştir. Günümüzde bu konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yer almakta, hayvanların ve hayvansal kaynaklı gıdaların bu bakterinin rezervuarı olabileceği düşünülmektedir. Son yapılan çalışmalarda *C. difficile*' nin hayvansal gıdalarda ve perakende olarak satılan etlerde identifiye edilmesi, *C. difficile* kaynaklı bakteri infeksiyonlarında gıdaların potansiyel olarak rol oynadığını gösterir niteliktedir. Kontaminasyonda canlı hayvan rezervuarlarının yanı sıra çevre ve hayvansal gıdalarında kaynak oluşturabileceğine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Flemming ve ark., 2009).

2.8.1. İnsanlarda *C. difficile*

C. difficile enfeksiyonları son yıllarda artarak özellikle ABD, Kanada ve Avrupa ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarla bakterinin sağlıklı kişilerde % 2-3 oranında, özellikle hastanede doğmuş olan yenidoğanların kolon florasında % 40-60 oranında metabolik inaktif spor formunda bulunabildiği belirlenmiştir. İnsanların bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfekte olabileceği tespit edilmiştir (Kuijper ve ark., 2008). Mortalite düzeyi tanıyı takiben 30 gün içerisinde % 6.9 ve 1 yıl içerisinde % 16.7 olarak bildirilmiştir.

1991 ile 2003 yılları arasında Kanada'da yapılan bir çalışmada *C. difficile* insidensi 100.000 kişide 35.6 olgudan 156.3 olguya yükselmiştir (Gravel ve ark., 2009).

Katz ve ark. (1996) Lübnan'da yaptıkları bir çalışmada, hastanede yatan ve antibiyotik kullanımının takiben ishal gelişen 480 hastada toksin varlığını araştırmışlar, bu hastaların 67'sinde (% 14) pozitif sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Arjantin'de yapılan bir çalışmada 104 dışkı örneği toksin varlığı açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda 40 (% 38.5) örnekte pozitif, 64 (% 61.5) örnekte ise negatif sonuç alınmıştır (Legaria ve ark., 2003).

Martirosian ve ark. (2003) Polonya'da yaptıkları bir araştırmada 6 ay-8 yaş arası, 18 HIV pozitif olan ve daha önceden antibiyotik tedavisi almış çocuklarda

C. difficile ve toksinlerinin varlığı belirlemeyi hedeflemişler ve çalışmanın sonucunda 3/18 (% 17) oranında toksin A ve B izole ettiklerini bildirmişlerdir.

2004-2005 yılları arasında Kanada'da yapılan bir çalışmada insidensin 1000 hastada 4.6 olgu olduğu kaydedilmiştir (Gravel ve ark., 2009). ABD'de yapılan çalışmalarda yine etkenin insidens ve şiddetinde 1996 ile 2003 yılları arasında ortalama 2 kat artış görülmüştür. Hem Kanada hem de ABD'de yapılan çalışmalarda ortak olarak ribotip 027 majör olarak belirlenen ribotip olarak tespit edilmiş ve ribotip 027'nin diğer izolatlardan 16-23 kat daha fazla toksin A ve B salgıladığı ve üçüncü toksin olan binary toksini oluşturduğu görülmüştür (Ananthkrishnan, 2011).

2005 yılında Avrupa *C. difficile* Çalışma Grubu tarafından 14 ülke ve 38 hastanenin katılımı ile, ishal olan ve toksijenik kültür sonucu pozitif olan hastaların dahil edildiği bir çalışma yapılmıştır. *C. difficile* enfeksiyonu insidensinin 14 ülke arasında 10.000 hastada 0.13-7.1 olgu arasında değiştiği ve ortalama insidensin her 10.000 hastada 2.45 olgu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 354 toksijenik *C. difficile* izolatı tanımlanmıştır. Tanımlanan bu izolatların 66 farklı ribotipe sahip olduğu ve ribotip 027'nin bu ribotiplerin % 0.6'sını oluşturduğu görülmüştür. Aynı çalışmada sonucunda ülkeler arasında da farklı ribotiplerin bulunduğu görülmüştür. Bu ribotiplerdirme sonucu izole edilen en yaygın ribotipler tespit edildikleri bölgelere göre; Fransa-014, Almanya-168 ve 001, İngiltere-077, İrlanda-017 ve 156, İtalya -020, Hollanda-027, Polonya-017, İspanya-001, İsviçre-002 dir. Türkiye'de ise izole edilen 8 izolat ribotip 001 olarak bildirilmiştir (Barbut, 2007).

2007 yılında 11 Avrupa Birliği ülkesini ve İsviçre'yi içine alarak yapılan çalışmada ribotip 027'nin en etkili ribotip olduğu ve prevalansının ülkeler arasında % 11-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (Kuijper ve ark. 2007). Yapılan çalışmadan bir yıl sonra *C. difficile* ribotip 027, 16 Avrupa ülkesinde salgınlara, Danimarka, İsveç, Norveç, Macaristan, Polonya, Avusturya ve İspanya gibi ülkelerde ise sporadik olgulara neden olmuştur (Freeman ve ark., 2010).

Garcia ve ark. (2007) 14 yaş üstü, hastanede yatan ve nozokomiyal ishal gelişen hastalarda *C. difficile* ve toksin A-B prevalansını belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda incelenen 4624 hastadan 156'sında (% 3.7)

nozokomiyal ishal gelişmiş, bu olguların 55'inde (% 35.2) *C. difficile* toksin A-B pozitifliği tespit edilmiştir.

2008 yılında 34 Avrupa ülkesindeki 106 laboratuvarı kapsayan çalışmada *C. difficile* enfeksiyonlarının insidensinin ortalama her 10.000 hasta için günde 4.1 olgu olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda 65 farklı ribotip bulunmuş ve en sık olarak ribotip 014/020 (% 16), 001 (% 9), 078 (% 8) ve 027 (% 5) belirlenmiştir (Bauer ve ark., 2011).

Nasreddin ve ark. (2009) Ürdün'de yaptıkları çalışmada 3 günden daha uzun süre hastanede yatan ve antibiyotik kullanımı geçmişi olan 40 yaş üstü hastalardan elde edilen 300 gaita örneğini *C. difficile* varlığı ve toksinleri yönünden incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hastaların % 13.7'sinin gaita kültürlerinden *C. difficile* izole edilmiş, tespit edilen izolatların % 73'ünde ise *tcdA* ve/veya *tcdB* toksin genlerinin varlığı saptanmıştır.

Hong Kong'da yapılan bir araştırmada ise % 10.1 oranında ribotip 002 tespit edilmiştir (Cheng ve ark., 2011).

İran'da Jalali ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada % 21 oranında ribotip 078 saptanmıştır.

Kore'de Kim ve ark. (2013)'nın yaptıkları bir çalışmada % 26.4 oranında *C. difficile* ribotip 018 bildirilmiştir.

Türkiye'de Beşirbellioğlu ve ark. (1999) hastanede uzun süreli yatan hastalarda *C. difficile* kolonizasyonu gelişim riskini belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında farklı hastalıklar nedeniyle hastanede 30 gündür yatmakta olan, diyare yakınması olmayan ve *C. difficile* kolonizasyonu açısından hiçbir predispozan faktöre (kemoterapi, antibiyotik, endoskopi, vb.) maruz kalmamış, 37 kişi araştırılmış ve *C. difficile*'nin bir hastane enfeksiyon etkeni olup olmadığı irdelenmiştir. Bu grupta yer alan hastaların dışkı örnekleri *C. difficile* toksin A yönünden araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hastaneye ilk yatışlarında alınan fekal örneklerinin hiç birinde *C. difficile* izole edilememiştir. Ancak hastaneye yattıklarından 30 gün sonra ise tekrar alınan

örneklerde 4 hastanın (% 10.81) dışıklarından *C. difficile* izole edilmiş ve toksin A pozitif bulunmuştur.

2001-2006 yılları arasında ülkemizde yapılan bir çalışmada antibiyotik kullanımı ile ilişkili kanlı ishalli 21 hasta izlenmiş ve 6 hastada (% 29) *C. difficile* toksin A ve B tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2012).

Aygün ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada nozokomiyal ishalli 226 hastayı incelemiş ve sonucunda % 5.5 oranında toksin A veya toksin B saptamışlardır.

Gürsoy ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada lateks aglutinasyon testi ile toksin A ile *C. difficile* varlığına bakmışlardır. Yapılan çalışmaların sonucunda, nozokomiyal ishalli hastalarda % 14, ayakta tedavi gören ishalli erişkin hastalarda % 27.7 oranında etken saptamışlar, kronik yangılı barsak hastalarında etken tespiti sağlıklı gönüllülerde asemptomatik taşıyıcılık % 3.3 oranında görülmüştür.

Tunçcan ve ark.'nın (2008) yaptıkları çalışmada 149 hastanın 21'inden (% 14.09) *C. difficile* toksin A tespit edilmiştir. *C. difficile* toksin A/B ise 149 hastadan 34 hastada (% 22.8) tespit edilmiştir.

Ergen ve ark. (2009) 2004-2005 yılları arasında tespit edilen nozokomiyal vakalarda insidensi 1000 hastane gününde 0.6 ve her 1000 hastada 5 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca hastalık öncesinde kemoterapi uygulamasının önemli bir predispoze faktör olduğu bildirmiştir. *C. difficile* oranı ise nozokomiyal ishalli hastalarda % 43 olarak belirlenmiştir. Yapılan PCR çalışması ile de 4 suş ribotip 002 ve 1 suş ribotip 012 olarak saptanmıştır.

Gündem (2010) Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan, son 3 hafta içinde antibiyotik kullanımı öyküsü olan, antibiyotiğe bağlı ishal düşünülen olgularda ve gaita örneğinin makroskopik incelemesinde yumuşak kıvamlı, sulu, kanlı ve/veya mukuslu belirtileri olan 250 hastaya ait dışkı örneğini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda toplam 250 gaita örneğinin 10 (% 4)'unu toksin A-B pozitif olarak saptamışlardır.

Lale ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Ocak-Ağustos 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen, ishalli

hastalara ait yumuşak kıvamlı veya sulu mukuslu dışkı örneklerinden oluşan toplam 592 örneği incelemişlerdir. Çalışma sonucunda farklı bölümlere ait çalışma örneklerinin 142'sinde (% 24) *C. difficile* toksin A-B saptanmıştır.

Son dönemlerde *C. difficile* 027 ribotipi Avusturalya, Kore, Singapur, Hong Kong, Japonya ve Kosta Rika'da bildirilmiştir (Tschudin-Sutter ve ark., 2012).

2005 yılından itibaren Avrupa da 078 ribotipine bağlı enfeksiyonlar görülmeye başlamıştır. Yapılan araştırmalarla bu suşun ribotip 027'e benzer şiddette hastalığa neden olduğu görülmüştür. Hollanda'da 2005-2008 yılları arasında 1687 hasta örneğinde yapılan çalışmada ribotip 078 kaynaklı enfeksiyonların % 3'ten % 13'e çıktığını ortaya konmuştur (Goorhuis ve ark., 2008). ABD'de her yıl 100.000 kişide 6.9-46 arasında değişen toplum kaynaklı *C. difficile* olgusu bildirilmektedir. Yapılan bir araştırmada Kuzey Carolina'da toplum kaynaklı *C. difficile* oranının 2005 yılında % 20 olarak tahmin edildiği ve bu oranın Avrupa ve Kanada'da benzer olduğu bildirilmiştir (O'Donoghue ve ark., 2011). Toplum kökenli enfeksiyonlar daha çok genç sağlıklı kişilerde ve daha çok bayanlarda görülmekle birlikte antibiyotik maruziyeti, asit süpresyonu, kanser durumlarında da daha fazla görülebilmektedir. Ayrıca antibiyotik maruziyeti olmadan da evcil hayvan teması, perakende gıda ürünleri ile de görülebilmektedir (Goorhuis ve ark., 2008). *C. difficile*'nin neden olduğu salgınlar yıllara göre Tablo 4'de özetlenmiştir (Tunçcan, 2008).

Tablo 4. *C. difficile* Salgınları (Tunçcan, 2008)

Yıl	Salgının Görüldüğü Yer
2003	Hipervirulent suş-2 salgın - Montreal, Quebec and Calgary, Alberta, Kanada.
2003 - 2005	İngiltere-salgın-NAP1/027 suşu
2007 - 2008	İrlanda-31 ölümcül vaka
2007	Finlandiya-027 suş- 115 hasta(10'u fetal)
2010	Danimarka-027 suş-138 ölümcül hasta
2010	Avustralya-2 yıl sonra bu suş Yeni Zelanda da saptanmış
2011	Kanada- Ontario,-26 ölümcül vaka

2.8.2. Hayvanlarda *C. difficile*

C. difficile 'ye bağlı ishal ya da asemptomatik taşıyıcılıkta rolü olan birçok hayvan türü tanımlanmaktadır (sığır, at, köpek, kedi, maymun, tavşan, hamster, domuz, devekuşu ve fil) (Arroyo, 2005; Bojesen, 2006).

Sığır ve buzağılarda yapılan çalışmalarda özellikle ishalleri hayvanlardan etkenin tespit edilmesi ishallerin nedenleri arasında etkenin olabileceğini göstermiştir (Harvey ve ark., 2011b). Etkenin ayrıca genç hayvanlarda yaşlı hayvanlara kıyasla daha çok görüldüğü yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Thitaram ve ark., 2011).

Rodriguez-Placios ve ark. (2006) *C. difficile* 'nin ishalleri ve sağlıklı buzağılarda varlığını belirlemeye yönelik Kanada'da yaptıkları çalışmada ishal vakası bulunan 144 buzağı ve 134 sağlıklı buzağıya ait dışkı örneklerini analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda 11'i ishalleri buzağılara, 20'si sağlıklı buzağılara ait toplam 31 dışkı örneğinde *C. difficile* izole edilirken etkenin prevalansı % 11.2 olarak saptanmıştır. 31 izolat içinde ise 30 izolatin toksin ürettiği belirlenmiştir.

Keel ve ark. (2007) yaptıkları çalışmalarda buzağılardan izole edilen *C. difficile* yönünden pozitif 33 izolatta tespit edilen temel izolatların ribotiplendirilmesi sonucu ribotip 078, ribotip 033 ve ribotip 002 olduğunu bildirmişlerdir.

Pirs ve ark. (2008) Slovenya'da çiftlik hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmada 2 farklı buzağı çiftliğindeki (D, E) 56 buzağıdan alınan dışkı örneklerini *C. difficile* ve toksin varlığı yönünden incelemişlerdir (D:22 örnek, E:34 örnek). Örnekler 21 günlük olan diareli hayvanlardan alınmıştır. Çalışma sonucunda örneklerden % 1.8 oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Buzağılarda tespit edilen bu düşük izolasyon oranına karşılık yapılan toksin testlerinde 25/56 (% 44.6) oranında toksin tespit edilmiştir.

Thitaram ve ark. (2011) sağlıklı süt inekleri ve besi danalarına ait dışkı örneklerinde *C. difficile* varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada süt ineklerinden % 2.7, besi danalarından ise % 6.3 oranında etken izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Rodriguez-Palacios ve LeJeune (2011) yaptıkları bir araştırmada farklı et işleme tesislerinde aldıkları sığır dışkı örneklerinde etken oranını % 6.3 olarak bildirmişlerdir.

Houser ve ark. (2012) çalışmalarında sağlıklı buzağılara ait fekal örneklerden % 28 oranında *C. difficile*' e ait toksin genleri tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, buzağılarda intestinal lezyonların *C. difficile*' ye ait toksin A ve toksin B üretiminden kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir.

Doosti ve Farsani (2014) İran'ın batısında yaşayan buzağuların dışkılarında *C. difficile* toksin genlerini araştırmaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. Buzağılara ait toplam 150 dışkı örneği incelenmiş olup (Etken izolasyonunda kültür yöntemi, toksin genlerinin tespitinde ise PCR metodu) çalışma sonucunda 90/150 (% 60) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Tespit edilen pozitif izolatların toksin karakterizasyonu sonucu 8/60 (% 8.8) oranında *tcdA* geni; 16/60 (% 17.7) oranında *tcdB* geni, 8/60 (% 8.8) oranında ise *cdtA* geni 14/60 (% 15.5) oranında ise *cdtB* geni tespit edilmiştir. Bunlarla beraber sadece 1 (% 1.1) izolatın bu genlerin hepsini içerdiği (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB*), 2 (% 2.2) izolatın ise *tcdA* ve *tcdB* genlerini içermediği bildirilmiştir.

C. difficile neonatal domuzlarda sıklıkla karşılaşılan önemli patojenlerden biri olarak bilinmektedir. Özellikle yenidoğan domuz yavrularında tipik sulu bir diare ve kolonda ödemle karakterizedir (Songer ve ark., 2000). *C. difficile* kaynaklı görülen bu ishaller özellikle domuz sürülerinde kilo kaybı ve ölümlerle sonuçlanan ciddi kayıplara yol açmaktadır (Baker ve ark., 2010). İshal olgularına rastlanan sürülerde mortalitenin % 16-20 arası değerlere ulaşabileceği yapılan çalışmalarla kaydedilmiştir (Songer, 2004; Blasko ve Bilkei, 2005). Ayrıca domuz sürülerinde doğum sonrası görülen MMA sendromunu (Mastitis-Metritis- Agalaksiya) tedavi etmek amacıyla yapılan antibiyotik tedavisinin akabinde dişi domuzlarda *C. difficile*'e bağlı ishal geliştiği ve mortalitenin % 13-16 olduğu kaydedilmiştir (Mauch ve Bilkei, 2003; Silvapru ve Bilkei, 2005).

Paleaz ve ark. (2002) İspanya'da domuzlara ait *C. difficile* izolatlarının karakterizasyonunu belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada 144 domuz izolatı PCR analizi ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda etkenin prevalansının yüksek

olduğu ve % 94.4 oranında ribotip 078 bulunduğu ve % 5.6 oranında ise nontoksijenik izolatların bulunduğu tespit edilmiştir.

Songer ve ark. (2004) yaptıkları bir araştırmada enteritli 600 domuza ait dışkı örneklerini incelemişler ve % 35 oranında toksin A ve B yönünden pozitiflik saptamışlardır. Yine Kuzey Carolina da yaptıkları başka bir çalışmada, 32 domuz sürüsüne ait fekal metaryelleri incelemişler ve sürüde % 48 oranında *C. difficile* toksini yönünden pozitiflik belirlemişlerdir.

Yaeger ve ark. (2007) Amerika'da yaptıkları çalışmada 129 domuz dışkı örneğini *C. difficile* yönünden incelemiş ve örneklerin % 50'sinde *C. difficile* izole ederek bu çalışmayla etkenin prevalansının domuz sürülerinde yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Pirs ve ark. (2008) Slovenya'da çiftlik hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmada, 3 farklı domuz çiftliğindeki (A, B, C) 257 domuzdan alınan rektal svapları *C. difficile* yönünden incelemişlerdir (A:87 örnek, B:95 örnek, C:75 örnek). Alınan örneklerde 1-10 günlük yaştaki bir batımda doğan semptomatik veya asemptomatik diareli hayvanlardan 5'er tane seçilmiştir. Çalışma sonucunda domuzlara ait 133 (% 51.8) örnekte, buzağı örneklerinden ise 1 (% 1.8) örnekte *C. difficile* izole edilmiştir. Buzağılarda tespit edilen bu düşük izolasyon oranına karşılık yapılan toksin testlerinde 25/56 (% 44.6) oranında pozitiflik tespit edilmiştir.

Avbersek ve ark. (2009) *C. difficile* türünün buzağılarda, domuzlarda ve atlarda varlığını belirlemek adına Slovenya'da bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda domuz örneklerinden 247/485 (% 50.9), buzağı örneklerinden 4/42 (% 9.5) ve at örneklerinden 1/20 (% 5) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. İzolatlarının karakterizasyonuna bakıldığında domuz izolatlarının 2 toksinotip (V ve 0) ve 4 ribotip içerdiği (066, 029, SI 011, SI 010), buzağı izolatlarının 2 toksinotip (Xia ve 0) ve ribotip içerdiği (077, 002, 033), at izolatlarının ise sığır izolatlarına benzer olarak 1 toksinotip Xia ve 1 ribotip 033 içerdiği bildirilmiştir.

Schneeberg ve ark. (2013) Almanya'da domuzlarda tespit edilen *C. difficile* izolatlarının genotiplerini belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Nisan-Kasım 2012 tarihleri arasında yapılan çalışmada toplam 15 çiftlikten alınan 201 domuza ait

rektal svap örnekleri incelenmiştir. Alınan svap örneklerinin 151 tanesi diareli hayvanlara ait, 118 tanesi diare tedavisi gören hayvanlara ait örneklerden oluşmuştur. Örneklerden 147/201 (% 73) oranında *C. difficile* izole edilmiş olup, % 78 oranında kültür pozitif izolat tespit edilmiştir. Yaş faktörüne bağlı olarak sıralama yapıldığında izolasyon oranları yeni doğmuş domuzlarda % 68.2, 14 günlük yaştaki domuzlarda % 94, 49 günlük ve üzeri yaştaki domuzlarda ise % 0 olarak belirlenmiştir. İzolatlarla yapılan PCR çalışmasında 14 ribotip belirlenmiştir. Bunlardan ribotip 078, 10 izolatta tespit edilmiştir. Ribotip 126 ise 4 izolatta tespit edilmiştir. Ribotip 078 (% 55) ve ribotip 126 (% 20) yüksek oranda tespit edilen ribotipler olup, bu değerlerin yüksek çıkması belirtilen ribotiplerin Almanya'daki domuzlarda predominant olabileceği ile ilişkili bulunmuştur. Tüm izolatlatlarda *tcdA* ve *tcdB* geni tespit edilirken, 6 izolatta ek olarak binary toksin geni tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada *C. difficile* prevalansının hayvanların yaşı ile bağlantılı olduğu da görülmüştür.

Borriello ve ark. (1983) *C. difficile*'nin evde yaşayan pet hayvanları arasındaki taşıyıcılığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, taşıyıcılığın geçici ve gastrointestinal hastalığa yol açmıyor gibi görünse de, evde yaşayan hayvanlardaki etkilenme seviyesinin % 23 oranında olabileceğini bildirmişlerdir. Taşıyıcılık önceden antibiyotik tedavisi almış hastalarda daha yüksek oranda bildirilmiş olsa da (% 31'e karşılık % 19), bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte olguların çoğunda sitotoksijenik olmayan suşlar tanımlanmıştır. Bununla birlikte hayvanlara ait ortamlardan hem sitotoksijenik hem de sitotoksijenik olmayan suşlar izole edilmiştir.

Madewell ve ark. (1999) Kaliforniya'da Veteriner Fakültesi hastanesinde yaptıkları çalışmada hastanede yatılı olan, sağlıklı ve ayakta tedavi gören 3 farklı gruba ait toplam 245 fekal svap örneğini *C. difficile* yönünden incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 23/245 (% 9.4) oranında pozitiflik tespit edilmiş ve izolatların % 34.8'inin toksijenik olduğunu gözlemlenmiştir.

Erdemoğlu ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada kliniklerine gelen kedi ve köpek dışkılarından alınan numunelerde *C. difficile* ve toksin A varlığını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda enteritli köpeklerin % 41'inde, kedilerin % 35'inde; enterit bulunmayan kedi ve köpeklerin ise % 29'unda (% 29 köpek, % 29 kedi) etken izole edilmiş ve toksinleri saptanmıştır. Toksin A enteritli köpeklerin % 2'sinde enteritli

olmayan köpeklerin ise % 20'sinde saptanmıştır. Kedilerde ise enteritli ve enteritli olmayanların % 29'unda etken izole edilmiştir.

Lefebvre ve ark. (2006) Kanada, Ontario'daki çeşitli yerlerden aldıkları 102 köpeğe ait dışkı örneklerinden oluşan bir grupta zoonotik etkenlerin prevalansını incelemişlerdir. Zoonotik etkenler 102 hayvanın 80'inden izole edilmiştir. Primer patojen olarak *C. difficile* tespit edilmiştir. İncelenen dışkı örneklerinin 58'inden (% 58) *C. difficile* izole edilmiş ve bunların da % 71'inin (41/58) toksijenik olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda atlarda fekal *C. difficile* prevalansının % 2-29 arası olduğu rapor edilmiştir (Flemming ve ark., 2009).

Thean ve ark. (2009) *C. difficile*'nin diareli ve sağlıklı atlarda prevalansını belirlemeye yönelik Avustralya'da yaptıkları çalışmada 174 fekal örneği incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 62 diareli hayvana ait örneklerin 14'ünde (% 23) etken izole edilirken 112 sağlıklı hayvana ait örneklerde etkene rastlanmamıştır. Elde edilen izolatların toksin profillerine bakıldığında 10 izolatın toksin A, toksin B yönünden pozitif, binary toksin yönünden negatif; 1 izolatın toksin A ve B negatif, binary toksin pozitif; 2 izolatın 3 toksin yönünden de pozitif ve 3 izolatında 3 toksin yönünden de negatif olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmanın sonucunda 6 farklı ribotip tespit edilirken, ribotip 012'nin çoğu izolatlarda ortak olduğu rapor edilmiştir.

Simango ve Mwakurudza (2008) yaptıkları çalışmada Zimbabwe'de marketlerde canlı olarak satılan broilerde *C. difficile* prevalansını belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada broilere ait market içerisindeki kafeslerden toplanan dışkı örnekleri ve marketlerin etrafındaki toprak örnekleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda *C. difficile* dışkı örneklerinden % 29 oranında izole edilirken, toprak örneklerinden % 22 oranında izole edilmiştir. Belirlenen izolatların dışkı örneklerine ait % 89.7'sinin ve toprak örneklerine ait % 95.5'inin toksijenik karakterde yapı taşıdığı bildirmişlerdir.

Zidaric ve ark. (2008) Slovenya'da yaptıkları çalışmada tavuk çiftliklerinde % 62 oranında *C. difficile* izole etmişler ve etkenin prevalansının oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada ayrıca 15 günlük yaştaki tavuk örneklerine kıyasla 18 haftalık tavuk örneklerinde etken prevalansının azaldığı (% 40) bildirilmiştir.

İnsan ve Hayvan orjinli *C. difficile* İzolatlarının Genotipik Varyasyon Benzerliği

Hayvan ve insan orjinli izolatlarının genotipik benzerliğini ortaya koymaya yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Arroyo ve ark. (2005) at, köpek ve insan izolatları arasındaki benzerliği belirlemeye yönelik yaptığı bir çalışmada 20 insan izolatının 4'ü ile 92 köpek izolatının 58'i ve 21 at izolatının 5'i arasında benzerlik olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca yapılan bu çalışmada izolatların çoğunluğunun (% 15) insana özgü 5 farklı ribotip içerdiği bildirilmiştir.

Keel ve ark. (2007) Kuzey Amerika'da bulunan sığır, köpek, at ve domuz izolatlarını insan izolatlarıyla karşılaştırmıştır. Çalışmada domuz ve sığır izolatlarından ribotip 078 predominant olarak bulunmuş ve sığır izolatları içinde % 94'lük, domuz izolatları içinde ise % 83'lük bir kısmı oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 6 ribotipin insan ve atlarda ortak, 3 ribotipin ise insan ve domuzlarda ortak olduğu tespit edilmiştir.

Jhung ve ark. (2008) insan ve hayvanlardan izole edilen *C. difficile* izolatlarının genetik benzerliliğini araştırdıkları çalışmalarında, 2001-2006 yılları arasında incelenen 620 insan izolatının 8'inin (% 1.3), 1984-2001 yıllarında analiz edilen 6000 izolatın 7'sinin (% 0.1) *C. difficile* toksinotip V genotipinde olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber yavru domuzlardan ve buzağılardan izole edilen 33 adet *C. difficile* toksinotip V izolatları ile insanlardan elde edilen *C. difficile* toksinotip V izolatlarını genetik benzerlikleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda izolatların hepsinde benzer gen delesyonu olduğunu, bunlarında 6'sının binary toksin geni içerdiklerini, 1984-2001 yılları arasındaki verilerden elde edilen 7 izolatın yine hepsi yine benzer gen delesyonu olduğu ve tamamında binary toksin belirlendiğini bildirmişlerdir. Hayvanlarda tespit edilen 33 adet *C. difficile* toksinotip V izolatlarında da binary toksin pozitif ve aynı gen bölgesinde benzer delesyonun bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Weese ve ark. (2009) ile Songer ve ark. (2009) et örneklerinden izole ettikleri *C. difficile* izolatlarının genotipik yapısının insan izolatlarıyla büyük ölçüde benzerlik taşıdığını bildirmişlerdir.

Koene ve ark. (2012) Hollanda'da yaptıkları çalışmada 7 farklı hayvan türüne ait (köpek, kedi, at, domuz, sığır, koyun, tavuk) 839 fekal örneği *C. difficile* ve toksinleri yönünden incelemişlerdir. Çalışma sonucunda köpeklerde % 25, kedilerde % 15.7, atlarda % 17.8, domuzlarda % 6.6, sığırlarda % 3.4, koyunlarda % 18.2 ve tavuklarda % 5.8 oranında etken tespit etmişlerdir. Tespit edilen 96 adet *C. difficile* izolatından % 53'ünün toksin genleri içerdiği bildirilmiştir. Domuz, sığır ve tavuklardan elde edilen tüm izolatların toksijenik karakterde olduğu ancak pet hayvanlarından elde edilen major izolatların nonsitojenik karakterdeki ribotip 010 ve ribotip 039 olduğu bildirilmiştir. Ribotip 012'in sığırlarda, ribotip 078'in ise domuzlarda yaygın olduğu, bunu yanında at ve tavuk izolatlarında baskın bir ribotipin bulunmadığını tespit edilmiştir. Çalışmada analiz edilen örneklerde ribotip 012, 014 ve 078'in en sık karşılaşılan ribotipler olduğu görülmüştür. Araştırmanın devamında insan orijinli *C. difficile* izolatları ile karşılaştırılmak için 2009 - 2010 yılları arasında Hollanda referans laboratuvarında belirlenen *C. difficile* izolatların ribotip dağılımları incelenmiş olup, bu izolatların ribotip 012, ribotip 014 ve ribotip 078 olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar insan ve hayvanlardan izole edilen *C. difficile* ribotip 078 izolatları arasında genetik benzerlik olduğunu, buna karşın *C. difficile* ribotip 012 ve *C. difficile* ribotip 014 izolatları arasında genetik farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (2014) Belçika'da yaptıkları çalışmada perakende olarak satılan domuz ve sığır etlerinden izole edilen *C. difficile* izolatlarını gen benzerliği yönünden araştırmışlardır. Çalışmada ek olarak hastanedeki hastalardan izole edilen 6 izolat kullanmışlardır. İnsanlara ait izolatlar aynı metodlarla elde edilip, toksin aktiviteleri, toksin üreten genleri, regülatör gen, *tcdA*, *gyrA* mutasyonu ve antibiyotik dirençlilik açısından incelenmiş ve çalışma sonucunda et örneklerine ait izolatlarla benzerlik olduğu bildirilmiştir.

Varshney ve ark. (2014) Pensilvanya'da *C. difficile*'nin insan dışkı örneklerinde ve perakende olarak satışa sunulan etlerde prevalansını ve karakterizasyonunu belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada klinik

laboratuvarlardan toplanan 317 insan dışkı örneği ve Ekim 2011-Eylül 2012 periyodunda 8 farklı perakende marketten toplanan farklı hayvan türlerine ait 303 et örneği (72 sığır eti, 78 domuz eti, 76 hindi eti, 77 tavuk eti) incelenmiştir. Araştırma sonucunda insan dışkı örneklerinden % 16.7, sığır eti örneklerinden % 6.9, domuz eti örneklerinden % 11.5, hindi eti örneklerinden, % 14.5 ve tavuk eti örneklerinden % 7.8 oranında *C. difficile* izole edilmiştir. İnsan ve hayvan türlerine ait tüm izolatlarda 8 farklı toksin geni araştırılmış ve yüksek oranda *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB* toksin genlerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Çalışmada farklı olarak % 75.6 oranında insan izolatlarında *tcdC* gen (139 bp) delesyonu görülmezken, et orjinli izolatlarda % 61.3 oranında 39 bp delesyonu bildirilmiştir. İnsanlara ve hayvan orjinli izolatlardan 25 farklı ribotip tespit edilmiştir. Sonuç olarak insan ve hayvan eti izolatlarında genotipik ve fenotipik farklılıklar olmasına karşın, hayvan etlerinden izole edilen bazı izolatların ribotip türleri (ribotip 078, PA05, PA16 ve PA229), toksin genleri, *tcdC* gen boyutları ve antibiyotik direnç profillerinin insan izolatlarıyla benzer olduğu ortaya konulmuştur.

Noren ve ark. (2014) İsveç'te yaptıkları bir çalışmada *C. difficile*'nin insanlarda ve domuzlarda tespit edilen ribotip 046 izolatının prevalansının belirlenmesi ve dolayısıyla belrtilen ribotipin her iki türde ortak olması nedeniyle zoonotik bir potansiyelin boyutunun incelenmesini hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda 3 farklı domuz yetiştirme çiftliğinden elde ettikleri yavru domuzlara ait örneklerde 45/67 (% 67) oranında ribotip 046 identifiye edilmiştir. Aynı çiftlikteki dişi domuzlara ait örnekler incelendiğinde kolonizasyonun % 50 oranında dışkıda % 30 kolonizasyonun deride olduğu bildirilmiştir. Aynı bölgede yaşayan insanlarda da etkenin tespit edilmesi etkenin zoonotik bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmüştür.

2.8.3. Çevrede *C. difficile*

Saif ve Brazier (1996) *C. difficile*'nin çevrede varlığına yönelik Güney Galler'de Cardiff bölgesinde geniş çaplı bir araştırma yapmışlardır. Araştırmalarında toplam 2580 örnek incelenmiştir. Çalışmada kullanılan su örnekleri Cardiff çevresinde bulunan nehirler, göller, drenaj kanalları ve denizden ve havuzlardan alınmış, çalışma sonunda 40/110 (% 36) oranında pozitiflik tespit edilmiş ve elde edilen izolatların %

90'ının toksin A yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. 100 kedi ve 100 köpeğe ait iki farklı veteriner kliniğinden alınan dışkı örnekleri incelenmiş, köpeklerde 10/100 (% 10) oranında izole edilirken, % 20 oranında toksin A yönünden pozitiflik olduğu tespit edilmiştir. Yedi aylık periyot içerisinde sığır ve koyun satış yerleri ile 45 çiftlikten alınan 104 sığır, 100 at, 100 domuz, 120 kümes hayvanına ait dışkı örnekleri ve balık satış yerlerinden alınan 107 deniz ve tatlı su balıklarına ait svap örnekleri toplanmıştır. Çalışma sonucunda, atlarda 1/100 (% 1), sığırlarda 0/104 (% 0), koyunlarda 1/100 (% 1), domuzlarda 0/100 (% 0), balıklarda 0/107 (% 0), kümes hayvanlarında 2/120 (% 1.6) oranında etken tespit edilmiştir. İzolatlarda toksin A tespiti at, koyun ve kümes hayvanlarında % 100 olarak bildirilmiştir. Halk parkları, bahçeler, oyun parkları ve tarlalardan alınan 104 toprak örneği analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda 22/104 oranında etken izole edilmiş, pozitif izolatlarda ise % 40.9 oranında toksin A saptanmıştır. Hastanelerden, veteriner kliniklerinden, hemşire odalarından, aile evlerinden ve öğrenci yurtlarından yüzey svapları alınmıştır. Çalışma sonucunda tespit edilen etken izolasyon oranı sırasıyla hastanelerde 76/380 (% 20); hemşire odalarında 6/275 (% 2.2); aile evlerinde 8/350 (% 2.3); öğrenci yurtlarında 4/200 (% 2); veteriner kliniklerinde 5/30 (% 16.7) olarak tespit edilmiştir. Çalışmada son olarak Cardiff'te perakende satış yerlerinde satılan 300 çiğ sebze örneği de incelenmiştir. Çalışma sonucunda 7/300 (% 2.3) oranında pozitiflik tespit edilirken % 71.4 oranında toksin A tespit edilmiştir.

Alam ve ark. (2014) yaşanan çevredeki toksijenik *C. difficile* kontaminasyonunun prevalansını belirlemeye yönelik yaptıkları araştırmada Houston, Texas bölgesinde bulunan 30 evden örnekler toplamışlardır. Toplamda 123 adet çevresel svap örneği (63 ayakkabı alt yüzeyi, 15 banyo/tuvalet yüzeyi, 12 ev zemin tozu ve 37 evdeki diğer yüzeyler) incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 41/127 (% 32.3) oranında etken izole edilmiştir. İzolatların gen profillerine bakıldığında toksin A ve toksin B genlerini taşıdığı ancak hiçbir izolatta binary toksin genlerini bulunmadığı görülmüştür. Pozitiflik durumunun grup bazlı dağılımına bakıldığında ayakkabı alt yüzeylerine ait svap örneklerinin pozitif örnekler içinde yüksek bir yüzdelik dilime tekabül ettiği (25/63; % 39.7) bunu tuvalet/banyo yüzeyleri (5/15; % 33.3) ve ev zemin tozu (4/12; % 33.3) örneklerinin takip ettiği ve evdeki diğer yüzeylere ait svaplarda (7/37; % 18.9) oranında etken tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışmada 25 farklı ribotip

tespit edilmiş, ribotip 001'in izolatu en çok bulunan izolat olduğu görülmüştür. Bu veriler etkenin yaygın olarak çevrede bulunduğu göstermiştir.

2.8.4. Hayvansal Kaynaklı Gıdalarda *C. difficile*

C. difficile'nin son zamanlarda yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı gıdalarda, deniz ürünlerinde sıkça tespit edilmesi, etkenin insanlara bulaşmasında hayvansal gıdaların rezervuar olabileceğini düşündürmektedir.

Rodriquez ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada Kanada'da perakende olarak yerel marketlerde satılan sığır eti ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu değerlendirmiş ve örneklerden izole etmiştir. Alınan 60 et örneğinin 12'sinde (% 20) etken saptanmış ve etkene ait 11 toksijenik izolat belirlemişlerdir. Bu toksijenik izolatların 8'inin toksinotip 3 olduğu belirtilmiştir. Kontaminasyonun ise etlerin toplu halde depolama ve paketlenme esnasında oluşabileceğini düşünmüşlerdir. Aynı araştırmacılar 2009 yılında yaptıkları benzer çalışmada 149 sığır parça et ve 65 sığır pirzola etinde sırasıyla % 6.7 (10/145) ve % 4.6 (3/65) oranında saptamışlar ve elde ettikleri 13 örneğin 10'unda toksijenik yapıyı kaydetmişlerdir.

Jöbstl ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada *C. difficile*'nin çiğ hayvansal ürünlerdeki prevalansını incelemişlerdir. Temmuz 2007-Şubat 2008 yılları arasında yaptıkları çalışmada kullanılan et örnekleri Avustralya'nın Graz şehri çevresindeki yerel market ve kasaplardan alınan yaklaşık 200 g ağırlığındaki 30 adet sığır eti, 70 adet sığır - domuz eti karışımından oluşmuştur. Çiğ et örneklerinin 25 tanesi market ve kasaplara anlık ziyaret sırasında hazırlık aşamasındaki etlerden (taze et) diğerleri soğuk dolapta satışa sunulan etlerden (Modifiye Atmosfer Paketli) alınmıştır. Çalışma sonucunda sadece çiğ sığır-domuz eti karışımlarında *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Sığır eti örneklerinin hepsi negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif iki izolattan ribotip AI-57 (Austrian Isolate-Avusturya izolatu) tespit edilmiştir. *tcdA* ve *tcdB* toksin genlerine rastlanılmamıştır. Bu izolatlardan birinin kasaplardan diğerinin ise süpermarketlerden alınan örneklere ait olduğu görülmüştür. Tespit edilen diğer bir pozitif izolattan ise ribotip 053 tespit edilmiştir. Bu izolatta diğer izolatlardan farklı olarak *tcdA* ve *tcdB* gen sekanslarının bulunduğu ve bu izolatu yine farklı olarak MAP

teknolojisiyle paketlenmiş örnekten izole edildiği bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar benzer olarak süt örneklerinde prevalansı belirlemek için Şubat-Haziran 2008 tarihleri arasında Avustralya'daki süt inekleri çiftliklerinden toplamda 50 numune toplayıp incelemişlerdir. Numunelerin 15'i sağmal ineklerden elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda örneklerinin *C. difficile* yönünden negatif olduğu bildirilmiştir. Etkeni izole ettikleri 3 örnek içinde insan suşunu tanımlayan ancak ribotip 028 ve ribotip 027 suşuna rastlamamışlardır.

Weese ve ark. (2009) Kanada'da yaptıkları çalışmada perakende olarak satılan parçalanmış domuz ve sığır etlerinde *C. difficile* kontaminasyonunun seviyesini belirlemeyi hedeflemişlerdir. Ağustos-Kasım 2008 tarihleri arasında perakende marketlerden aldıkları toplam 230 örneği incelemişlerdir (115 sığır eti, 115 domuz eti). Analiz yöntemi olarak zenginleştirme ve direkt plak yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmada; toplam 230 örnekten 28'inde *C. difficile* izole edilmiştir. Bu pozitiflik oranı tür bazında parça sığır etinde 14/115 (% 12), parça domuz etinde 14/115 (% 12) olarak bildirilmiştir. Çalışmada *C. difficile* izole edilen sığır eti örneklerinden 10/14 (% 71)'lük kısım zenginleştirme yöntemiyle belirlenirken 2/14 (% 14)'lük kısım direkt kültür 2/14 (% 14)'lük kısmı ise hem direkt kültür hem de zenginleştirme yöntemiyle izole edilmiştir. Aynı oranlar domuz eti örneklerinde de etken tespit edilmiştir. Etkenin prevalansına genel ve tür bazlı bakıldığında bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Von Abercron ve ark. (2009) İsveç'te perakende olarak satılan sığır kıyma örneklerinde *C. difficile*'nin prevalansını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada Nisan-Eylül 2008 tarihi arasında İsveç'te perakende marketlerden rastgele toplanan 82 örneği incelemişlerdir. Çalışma sonucunda % 2.4 oranında *C. difficile* izole edilmiştir. İncelenen örnekler arasında domuz, koyun, sığır, tavuk et örnekleri bulunmakla beraber tespit edilen 2 pozitif izolata sığır örneklerine ait olduğu bildirilmiştir. Toksin karakterizasyonuna bakıldığında her iki izolatta toksin A ve toksin B genlerini içerdiği görülmüştür.

Songer ve ark. (2009) Arizona'da yaptıkları çalışmada toplam 88 et örneğinin (sığır parça et, koyun parça et ve hindi eti) 37'sinde (% 42) *C. difficile* saptamışlardır. Hayvan türlerinin enfeksiyonun prevalansında belirleyici bir özellik olmadığını

kaydetmişlerdir. 25 izolatta PCR ribotip 078; 4 örnekte PCR ribotip 027 toksinotip 3 tespit edilmiştir.

Weese ve ark. (2010) tarafından Kasım 2008-Haziran 2009 tarihleri arasında Kanada'nın Ontorio şehrindeki perakende satış yerlerinden toplanan 203 kanatlı eti örneği incelenmiştir (111 adet baget, 72 adet kanat ve 20 adet but). Çalışma sonucunda örneklerden 26/203 (% 12.8) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Bunlara ürün bazlı bakıldığında 10/111 (% 9) baget, 13/72 (% 18) kanat ve 3/20 (% 15) but şeklinde sıralanmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmada tüm pozitif örneklerin sadece zenginleştirme yöntemiyle elde edilebildiği bildirilmiştir. PCR analizinin sonucunda tüm izolatların ribotip 078 içerdiği ve toksin A, toksin B ve CDT genlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bouttier ve ark. (2010) Fransa'da satışa sunulan et ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Eylül 2007-Temmuz 2008 tarihleri arasında yapılan çalışmada Paris'in şehir merkezinde ve çevresinde bulunan süpermarketlerden örnekler toplanmıştır. Çalışmada 105 sığır parça et örneği (bir kısmı vakumlu paketlerden oluşan), 59 domuz sosisi, 12 paketli çiğ kedi diet etleri (kedi mamaları) incelenmiştir. Çalışma sonucunda domuz sosislerinde ve çiğ kedi mamalarında etken saptanmazken, 105 sığır parça et örneğinde 2/105 (1.9) oranında *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Sığır parça etlerinde tespit edilen pozitif örneklerin vakumlu paketli örnekler olduğu, bundan yola çıkarak anaerobik ortamın etken üremesini hızlandırabileceğine yönelik görüş belirtmişlerdir. Çalışmada gen ve toksin varlığı da araştırılmıştır. Bu iki izolatın toksinotip 0 ve insanlarda sıklıkla rastlanan bir ribotip olan ribotip 012 içerdiği tespit edilmiştir.

Boer ve ark. (2011) Ekim 2008-Mart 2009 tarihleri arasında Hollanda'da yerel marketlerde satılan farklı hayvan türlerine ait 500 adet parçalanmış et örneklerini incelemişlerdir (sığır eti, sığır eti, kuzu eti, tavuk eti). Çalışma sonucunda; 149 sığır örneği, 63 domuz örneği ve 19 sığır örneğinin hiçbirinde etken tespit edilemezken, kuzu et örneklerinde % 6.3 ve tavuk et örneklerinde % 2.7 oranında izole etmişlerdir. Ortalama olarak 500 örnek içinde 8 adet (% 1.6) pozitif oran tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmada PCR yöntemi kullanılarak et örneklerinde saptanan etkenin identifikasyon ve toksin karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada yapılan benzer çalışmalardan farklı

olarak ribotip 027 tespit edilmemiştir. Sadece 1 tavuk eti örneğinden ribotip 001 tespit edilmiştir.

Harvey ve ark. (2011b) Teksas'ta perakende satılan etlerde ve et işletmelerinde *C. difficile*'nin kontaminasyonunu belirlemeye yönelik araştırma yapmışlar, çalışmanın perakende kısmında 2008-2009 yılları arasında farklı günlerde 5 farklı perakende marketten toplanan 40 adet parça et örnekleri toplanmıştır. Bunlar; domuz parça eti, sığır parça eti, tavuk parça eti, hindi parça eti, domuz sucuğu, domuz-sığır sucuğu ve domuz sosisi çeşitlerinden (pork longaniza, pork chorizo, pork beer bratwurst) oluşmuştur. Çalışma sonucunda örneklerde toplam 23/243 (% 9.5) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Perakende marketlerden toplanan parça et örneklerinde ise 3/40 (% 7.5) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Bu izolatların aynı markette aynı günde alınan parça domuz eti, domuz sosisi (chorizo) ve parça hindi etlerine ait olduğu ve bunlardan domuz sosisi (chorizo) ve parça hindi etinin uluslararası bir markaya, domuz parça etinin ise sadece örneğin alındığı üretimhaneye ait bir ürün olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın et üretimhanesindeki gerçekleştirilen kısmında, 2004-2009 yılları arasında 3 sucuk-sosis üretimhanesinden svap ve et örnekleri toplanmıştır. A üretimhanesinden 149 domuz parça et örneği alınırken, B üretimhanesinden 20 adet domuz parça eti örneği ve 12 adet svap örneği (ekipman, yüzey) C üretimhanesinden ise 12 domuz sosisi örneği ve 10 adet svap örneği (pens, dışkı, canlı hayvan, deri ve karkas) incelenmek üzere alınmıştır. Et üretimhanesinden toplanan örneklerde, A üretimhanesinde 14/149 (% 9.4) oranında *C. difficile* etkeni izole edilmiştir. Pozitif tespit edilen domuz parça etlere ait izolatlardan 13 tanesinde toksin A, toksin B ve binary toksin tespit edilirken, 1 tanesinde toksin A ve toksin B negatif, binary toksin pozitif tespit edilmiştir. B üretimhanesinde domuz parça etlerine ait örneklerden 1/20 (% 5) oranında pozitif izolat tespit edilmiştir. 12 ekipman ve karkas örneklerinde etkene rastlanmamıştır. C üretimhanesinde 2/12 oranında domuz parça etlerinden, 3/10 oranında svaplardan (% 30'u karkas, deri, kulak svapları) pozitiflik tespit edilmiştir. B ve C üretimhanelerine ait toplam 6 izolatın toksin A, toksin B ve binary toksin pozitif olduğu bildirilmiştir.

Harvey ve ark. (2011a) Teksas'ta *C. difficile*'nin tavuklar ve kümes hayvanlarına ait etlerde kontaminasyon düzeyini araştırmaya yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada broiler ve tavuklara ait 300 dışkı örneği incelenmiş ve 7/300

(% 2.3) oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Çalışmada kümes hayvanlarına ait 32 örneğin incelenmesinde 3 farklı kültür tekniği kullanılmış, 1. Teknikte 1/32 (% 3.1); 2. teknikte 2/32 (% 6.2); 3. teknikte 4/32 (% 12.5) oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Tavuklara ve kümes hayvanlarına ait etlerden toksinotip V tespit edilmiş, NAP 7 ve NAP 7 varyanslarını içerdiği bildirilmiştir.

Metcalf ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada Ontario ve Kanada bölgesindeki yerel marketlerden alınan 86 çeşit deniz ürünü ve balık ürünü incelemiştir (taze, dondurulmuş, pişirilmiş karides, taze ve dondurulmuş midye, yengeç, somon suşi, taze levrek, kedi balığı, somon, istridye, midye, ahtapot, alabalık). 33 örnek ise CIPAR (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance) tarafından Ontario, Quebec, Nova Scotia, British Columbia ve Saskatchewan'daki yerel marketlerden alınmıştır. Çalışma sonucunda incelenen 119 örnekten 5'inde (% 4.8) *C. difficile* izole edilmiştir.

Susick ve ark. (2012) *C. difficile*'nin konvansiyonel sistemde ve antibiyotik kullanımının serbest olduğu açık besi (antimicrobial free (ABF) sistemde yetiştirilen domuzlarda prevalansı, antibiyotik duyarlılık profili ve toksinotip profilini belirlemek amaçlı çalışma yapmışlardır. Çalışmada konvansiyonel sistemde yetiştirilen her biri 35 domuz içeren 10 grup, ABF sistemde yine her biri 34 hayvan içeren 8 farklı grup üretimlerinin her aşamalarında (yetiştirmeden kesime kadar) fekal ve çevresel (yem, su, zemin, toprak) örnekler alınarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda konvansiyonel yöntemle yetiştirilen hayvanlarda *C. difficile* prevalansı 120/350 (% 34) oranında tespit edilirken, açık besi yöntemiyle yetiştirilenlerde 56/244 (% 23) oranında tespit edilmiştir. Üretimin daha ileriki aşamalarına gelinip kesimhanelerdeki etken prevalansına bakıldığında prevalansın karkas ve üretim yüzeylerinde yetiştirme yerlerine göre daha düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Toksinotip V her iki sistemde de yetiştirilen hayvanlara ait izolatlarda yüksek oranda tespit edilmiştir (Konvansiyonel sistem % 94, ABF sistem % 82). Diğer pozitif izolatların toksinotip 008 olduğu bildirilmiştir.

Curry ve ark. (2012) Pensilvanya'da *C. difficile*'nin pişmemiş parça et ürünlerindeki prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada Şubat-Nisan 2011 tarihleri arasında Pensilvanya, Pittsburgh'da 3 yerel markette satışa sunulan 102 adet pişmemiş parça et ürünlerini analiz etmişlerdir. Pişmemiş et ürünlerine ait örnekler,

şarküteri et ürünleri, işletmede hazırlanmış taze sosis ve hammaddeleri(ticari amaçlı satılan paketli taze ve donuk sosisler) şeklinde oluşurken örneklerin tür bazlı dağılımı ise 20 adet sığır eti, 2 adet buffalo eti, 22 adet tavuk eti, 2 kuzu eti, 41 domuz eti, 10 hindi eti, 5 sığır eti şeklinde oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda 2/102 oranında *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Pozitif tespit edilen bu 2 örneğin domuz sosislerine ait olduğu bildirilmiştir.

Sepulvida Diaz ve ark. (2013) Minnesota'da 25 farklı perakende marketten ve kasaplardan topladıkları 342 adet çiğ et örneğinde (sığır, domuz, kanatlı) *C. difficile* prevalansını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda % 8.5 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (2013) Belçika'da yaptıkları çalışmada Eylül 2011-Mayıs 2012 arasında lokal bir mezbahadan elde ettikleri toplam 402 sığır eti ve domuz eti örneklerini incelemişlerdir. Sığır örneklerinin çoğunluğu yaşları 15 ve 56 aylık arasında değişen (sadece 2 hayvanın yaşı 12 aydan küçük, 6 hayvanın yaşı 6 yaşın üzerinde) 57 farklı sürüden alınmıştır. Domuz eti örnekleri ise yaşları ortalama 5-6 aylık olan ve ortalama ağırlıkları 96 kg olan 14 farklı sürüden alınmıştır. Sığır eti örneklerinin 101 tanesini hem bağırsak içeriği hemde karkas örneği; domuz eti örneklerinin ise 100 adetini bağırsak içeriği ile 100 adetini karkas örneği oluşturmuştur. Yapılan çalışma sonucunda incelenen toplam 202 sığır örneğinde sığır bağırsak içeriğinde 10/101 (% 9.9) oranında, sığır karkas örneklerinde 8/101 (% 7.9) oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Tespit edilen pozitif örneklerin yaşları 11 ay ile 6 yaş arasında değişen hayvanlara ait olduğunu ve pozitif karkas örneklerinden sadece 2 örneğin aynı sürüden olduğu bildirilmiştir. İncelenen 200 domuz örneğinde ise bağırsak içeriklerinden 1/100 (% 1) oranında, karkas örneklerinden 7/100 samples (% 7) oranında etken izole edilmiştir. Toplamda *C. difficile* yönünden pozitif tespit edilen 26 pozitif örnekten 19 farklı ribotip identifiye edilmiştir. Sığır bağırsak içeriği ve karkaslarından aynı ribotipler tespit edilmiştir (ribotip UCL5a). Ribotip 078 sığır ve domuzlara ait bağırsak içeriklerinden, ribotip 014 ise sığır bağırsak içeriği ve domuz karkas örneklerinden tespit edilmiştir. Yapılan PCR analizlerinde toplamda 50 izolattan 42 izolatin toksijenik özellikte olduğu görülmüştür. Sığır bağırsak içeriklerinde 8 ribotip toksijenik aktivite gösterirken, 3 ribotip nontoksijenik özellikte olduğu, sığır karkas ribotiplerinde ise

tamamında toksijenik aktivite olduğu tespit edilmiştir. Domuz karkaslarında ise sadece 1 ribotipin nontoksijenik özellikte olduğu görülmüştür. Pozitif izolatlarda yapılan PCR çalışmasında 14 ribotip belirlenmiştir. Bunlardan ribotip 078 North Rhine-Westphalia bölgesinde 6 pozitif izolatta tespit edilirken, Lower Saxony bölgesinde 4 pozitif izolatta tespit edilmiştir. Ribotip 126 ise North Rhine-Westphalia bölgesinde tespit edilmezken, Lower Saxony bölgesinde 4 pozitif izolatta tespit edilmiştir. Ribotip 078 (% 55) ve ribotip 126 (% 20) yüksek oranda tespit edilen ribotipler olup, bu değerlerin yüksek çıkması belirtilen ribotiplerin Almanya'daki domuzlarda predominant olabileceği ile ilişkili bulunmuştur. Tüm pozitif izolatlarda *tcdA* ve *tcdB* geni tespit edilirken, 6 izolatta ek olarak binary toksin geni tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada *C. difficile* prevalansının hayvanların yaşı ile bağlantılı olduğu görülürken, diare tedavisinde antibiyotik kullanımıyla bağlantılı olmayabileceği belirtilmiştir.

Esfandiari ve ark. (2014) İran'ın İsfahan bölgesinde bulunan sığır etleri ve koyun etlerinde *C. difficile*'nin prevalansı ve karakterizasyonunu belirlemeye yönelik araştırma yapmışlardır. Çalışmada et paketleme tesislerinden toplanan 81 sığır eti 119 koyun eti olmak üzere toplamda 200 örnek incelemişlerdir. Çalışma sonucunda % 2.8 doğranmış sığır etlerinde; % 2.1 parça sığır etlerinde; % 3.6 doğranmış koyun etlerinde ve % 6.2 oranında parça koyun etlerinde *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Tespit edilen izolatların *tcdB* genini taşımadığı ve pozitif izolatların 8 farklı toksinotip içerdiği bildirilmiştir.

Rodriguez ve ark. (2014) Belçika'da yaptıkları çalışmada perakende olarak satılan etlerde ve *C. difficile* varlığını araştırmışlardır. Ocak-Temmuz 2012 ayları içerisinde yapılan çalışmada 21 farklı perakende marketten alınan 133 sığır eti ve 107 domuz eti örneği incelenmiştir. Örnekler haftalık olarak toplanmıştır. Alınan örnekleri ortalama 200-400 g arası taze sığır kıyma ya da taze domuz kıyma eti oluşturmakla beraber, sığır hamburger köfte ve sığır sosis ile domuz hamburger köfte ve domuz sosis de örneklerle dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam 204 örnek analiz edilmiştir. Sığır eti örneklerinde 3/133 (% 2.3) oranında *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin ayrı zamanlarda ve ayrı işletmelerden alındığı bildirilmiştir. Domuz eti örneklerinde pozitiflik oranı 5/107 (% 4.7) olarak tespit edilmiştir. Yine bu pozitif örneklerinde ayrı zamanlarda ve ayrı işletmelerden alındığı

bildirilmiştir. Yapılan PCR çalışmasıyla *C. difficile* yönünden pozitif olan 8 örnekten 4 farklı ribotip elde edilmiştir. Tespit edilen 8 izolattan 7 tanesinde sitotoksik aktivite görülmemiştir. Sığır etinden izole edilen 3 izolatin tümünde toksijenik aktivite görülürken, domuz etinden izole edilen 5 izolatin 4'ünün toksijenik, 1'inin ise nontoksijenik olduğu görülmüştür. Tüm toksijenik karakterdeki pozitif izolatlarda *tcdA*, *tcdB* genleri tespit edilmiştir. Ribotip 078'in ayrıca *tcdA* ve *tcdB* genlerini kodlayan binary toksin ve regülatör gen olan *tcdC* 'yi de içerdiği tespit edilmiştir.

Kauassi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada pişmiş etlerde *C. difficile* ve *C. perfringens* prevalansını belirlemeyi hedeflemiştir. Çalışmada 395 adet pişmiş böbrek ve parça et örnekleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda *C. difficile* prevalansı böbrek örneklerinde % 11.04, et örneklerinde % 13.45 olmak üzere toplamda % 12.4 oranında *C. difficile* prevalansı olduğu bildirilmiştir.

Rahimi ve ark. (2014) *C. difficile*'nin çiğ et ürünlerindeki (dana, inek, koyun, keçi, deve, buffalo) prevalansının saptanmasına yönelik çalışma yapmışlardır. Nisan-Eylül 2012 tarihleri arasında yapılan çalışmada İran'ın Isfahan ve Khuzestan şehirlerindeki kasaplardan alınan toplam 600 adet çiğ et örneği çalışma metaryelini oluşturmuştur. Bu et örneklerinin tür bazlı dağılım oranı 121 dana eti, 106 inek eti, 150 koyun eti, 92 keçi eti, 124 deve eti ve 67 buffalo eti şeklinde yapılmıştır. Çalışma sonucunda 13/660 et örneğinden *C. difficile* izole edilmiştir. Pozitiflik oranı şehir bazlı kıyasladığında Isfahan (4/135, % 1.3), Khuzestan (4/135, % 2.3) olarak tespit edilerek prevalansta şehirler arası önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Tespit edilen prevalans değerleri tür bazlı yüksekten düşüğe doğru sıralandığında buffalo eti (6/67), keçi eti (3/92), dana eti (2/121) ve kuzu eti (1/150) olarak bildirilmiştir. Deve eti örneklerinde ise etken saptanamamıştır. Yapılan PCR analizlerinde, tespit edilen izolatların 12/13'ünde *tcdA*, *tcdB* ve *cdtB* toksin genleri, 7 /13'ünde *tcdA*, *tcdB* ve *tcdB* toksin genlerini taşıdığı görülmüştür. 4 suş *tcdA*, *tcdB* yönünden, 1 suş ise sadece *tcdB* yönünden pozitif tespit edilmiştir. Diğer izolatlar nontoksijenik olarak belirlenmiştir.

Rahimi ve ark. (2014) İran'da çiğ sütlerde *C. difficile* prevalansını belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Ocak-Ağustos 2013 tarihleri arasında yapılan çalışmada İran'ın Isfahan, Chaharmahal, Bakhtiari ve Khuzestan illerinde bulunan rastgele seçilmiş 111 çiftlikten toplanan ve tür bazlı dağılımı 135 adet sığır sütü, 100 adet koyun

sütü, 80 adet keçi sütü, 49 adet manda sütü ve 66 adet deve sütü olmak üzere toplam 430 adet çiğ süt örneği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, sığır süt örneklerinden 2/135 (% 1.43) oranında *C. difficile* kontaminasyonu tespit edilmiştir. Tespit edilen *C. difficile* suşundan birisinde *tcdA* ve *tcdB* geni tespit edilmiş ve ribotip 078 olarak tanımlanmıştır. Diğer türlere ait çiğ süt örneklerinde etken saptanamamıştır.

Norman ve ark. (2014) perakende satılan deniz ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu araştırmışlardır. Çalışmalarında kabuklu ve yüzgeçli deniz ürünleri incelenmiş, 3/67 (% 4.5) oranında *C. difficile* izole etmişlerdir. Etken pozitif tespit edilen bu 3 örneğin somon, midye ve karides türlerine ait olduğu belirtilmiştir. Midye ve somon izolatlarının karakterizasyonu sonucu toksinotip V ve ribotip NAP7 identifiye edilmiştir. Karides izolatından ise toksinotip XII identifiye edilmiştir.

Varshney ve ark. (2014) Pensilvanya’da perakende olarak satışa sunulan çeşitli et türlerinde *C. difficile* prevalansını belirlemek amacıyla toplam 303 adet et örneğinde (72 sığır eti, 78 domuz eti, 76 hindi eti, 77 tavuk eti) *C. difficile* prevalansını sığır eti örneklerinde % 6.9, domuz eti örneklerinde % 11.5, hindi eti örneklerinden, % 14.5 ve tavuk eti örneklerinden % 7.8 oranında tespit etmişlerdir.

2.8.5. Bitkisel Kaynaklı Gıdalarda *C. difficile*

Bakri ve ark. (2009) İskoçya’nın Glaskow şehrinde yerel marketlerde satışa sunulan hazır salata ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu belirlemek için çalışma yapmışlardır. Mayıs-Haziran 2009 ayları arasında yapılan çalışmada 7 farklı süpermarketten alınan toplam 40 salata örneği analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda 3/40 (% 7.5) oranında *C. difficile*’ye ait pozitiflik belirlenmiştir. PCR incelemelerinde pozitif izolatlardan ıspanaklı salata ve organik karışık salatada toksin A negatif, toksin B pozitif, organik marulda hem toksin A hem de toksin B pozitif bulunmuştur. PCR ribotip 017 izolatı ıspanaklı ve organik karışık salatada ortak olarak saptanırken, organik marulda ribotip 001 izolatı bulunmuştur.

Metcalf ve ark. (2010) *C. difficile*'nin sebzelerdeki kontaminasyonunu araştırmaya yönelik Kanada'da bir araştırma gerçekleştirmiştir. Araştırmada, Mayıs-Ağustos 2009 tarihleri arasında Guelph, Ontario'da manavlarda satılan toplam 111 sebze örneği farklı günlerde toplanmıştır. Çalışmadaki sebze türlerini; havuç, patates, sarımsak, zencefil, pancar, mantar, lahana, yeşil soğan, kırmızı turp, brokoli, kereviz, karaturp, şalgam, kuşkonmaz, eddoes (Asyada yetişen köklü bir sebze) ve arpacık soğanı oluşturmuştur. Çalışma sonucunda 5/111 (% 4.5) oranında *C. difficile* bulunduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen pozitif izolatlardan 3 tanesinin zencefil örneklerine ait olduğu (Kökeni Çin), 1 tanesinin havuç örneğine ait olduğu (USA), 1 tanesinin ise eddoes (kökeni Çin) sebzesine ait olduğu bildirilmiştir. PCR çalışmalarında zencefil örneklerinin 3'ünde toksin A ve toksin B pozitif, 2 örnekte CDT pozitif, 1 örnekte negatif; havuç örneğinde toksin A, toksin B ve CDT pozitif; eddoes bitkisinde ise toksin A, toksin B pozitif, CDT negatif olduğu belirlenmiştir. 2 zencefil örneği ve havuç örneğinde ribotip 078 tespit edilmiştir.

2.9. Antibiyotiklere Direnç

Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterileri değil normal flora bakterilerini de etkiler. Bu bakteriler, endojen mikroflorayı bozarak süperenfeksiyonlara neden olabilirler. Antibiyotik kullanımının bağırsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten sonraki 6. haftaya kadar sürebilmekte, bu süre içinde *C. difficile*'ye bağlı ishaller ortaya çıkabilmektedir (Akan, 1993).

C. difficile'ye bağlı ishale sebep olan antibiyotikler ve antineoplastik ilaçlar yapılan çalışmalarla enfeksiyon oluşturma sıklıklarına göre Tablo 5'de sınıflandırılmıştır.

Tablo 5. *C. difficile*'ye bağlı ishale sebep olan antibiyotikler ve antineoplastik ilaçların enfeksiyon oluşturma sıklıklarına göre sınıflandırılması (Thielman ve ark., 2010)

Sıklıkla	Daha az sıklıkla	Nadir
Klindamisin	Kinolon	Aminoglikozit
Ampisilin	Tetrasiklin	Metronidazol
Amoksisilin	Sülfonamid	Basitrasin
Sefalosporinler (2. ve 3. kuşak)	Makrolid	Vankomisin
	Kloramfenikol	
	Trimetoprim	
	Doksorubisin	
	Siklofosfomit	
	Metotreksat	

Son yıllarda küçük değişiklikler yapılmakla beraber, metronidazol veya vankomisin enfeksiyonların standart tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Her iki antibiyotiğin eşit etkiye sahip olduğu, bununla beraber tedavide metronidazolun kullanılması sırasında klinik yanıtızlıklar söz konusu olduğu bildirilmektedir (Pelaez ve ark., 2002). Antibiyotiklerin minumum inhibitör konsantrasyonları Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör Konsantrasyon Limitleri (MİK) (CLSI, 2012)

Antibiyotik	MİK Limiti
Metranidazol	≤ 8 mg/L
Vankomisin	≤ 2 mg/L
Klindamisin	≤ 2 mg/L
Ampisilin	≤ 0,5 mg/L
Meropenem	≤ 4 mg/L

İsrail'de yapılan bir çalışmada *C. difficile* izolatlarının metronidazole karşı % 2 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Bisharaa ve ark., 2006).

İlk yüksek vankomisin MİK düzeyine sahip suşlar 1996'da tanımlanmıştır (Wong ve ark., 1999). Daha sonra Pelaez ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada % 3.1 oranında azalmış duyarlılık oranı bildirmişlerdir.

İngiltere'de Mutlu ve ark. (2007) MİK değeri 4 mg/L olan *C. difficile* suşlarının 1999-2000 yıllarında oranı % 2.7 iken, 2005 yılında % 21.6'ya yükseldiğini göstermişlerdir. Diğer antibiyotiklere direnç ülkelere göre farklılık göstermekle beraber değişik oranlarda bildirilmiştir.

C. difficile izolatlarında klindamisine direnç, Almanya'da 2003 yılında % 36 iken 2007 yılında % 65, İsveç'te 2006 yılında % 43.7 iken 2009 yılında % 65, Kanada'da 2006 yılında % 14.7 iken 2008 yılında % 90.9 bulunmuştur (Huang ve ark., 2009; Bourgault ve ark., 2006).

Çin'de 2007 yılında yapılmış olan bir yıllık çalışmada ise klindamisine % 71.4 oranında direnç saptanmıştır (Huang ve ark., 2009).

Pelaez ve ark. (2002) İspanya'da yaptıkları çalışmada domuzlara ait *C. difficile* izolatlarının 13 antimikrobiyal ajana karşı MİK değerleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda etkenin çoklu direnç değeri % 49.3 olarak bulunurken, tüm izolatların florokinolon, siprofloksasine karşı dirençli olduğu fakat daptomisin, linezolid, meropenem, rifampisin, teikoplanin, tigesiklin, metronidazol ve vankomisine karşı duyarlı olduğu görülmüştür.

Jöbstl ve ark (2008) yaptıkları çalışmada ribotip 053 tespit edilen bir *C. difficile* suşunda klindamisin ve moxofloksasine karşı direnç saptamışlardır.

Jhung ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada insan ve hayvan izolatlarından tespit ettikleri *C. difficile* toksinotip V'lerin klindamisin, levofloksasin, moksifloksasin ve gatifloksasine karşı duyarlılıklarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda klindamisine karşı insan izolatlarında % 88 oranında, domuz izolatlarında % 100 oranında orta düzey direnç gelişirken buzağı izolatlarında % 88 oranında duyarlılık oluşmuştur. Levofloksasine karşı insan izolatlarında % 57 ve domuz izolatlarında % 75 oranında orta düzey direnç, sığır izolatlarında % 100 oranında direnç geliştiği görülmüştür. *C.*

difficile'nin tüm insan-hayvan izolalarında moksifloksasin ve gatifloksasine karşı % 100 direnç geliştirdiği bildirilmiştir

Bakri ve ark. (2009) İskoçya'nın Glaskow şehrinde yerel marketlerde satışı sunulan hazır salata ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu belirlemek için çalışmada tespit ettikleri pozitif izolatlarda etken antibiyotik duyarlılığı yönünden de incelemiştir. İspanaklı salatadan tespit edilen izolatin metronidazol, eritromisin, vankomisin ve moksifloksasine duyarlı olduğu, klindamisin ve sefotaksime orta düzey direnç gösterdiği; organik karışık salatadan tespit edilen pozitif izolatin metronidazol, eritromisin, vankomisin ve moksifloksasine duyarlı, eritromisine dirençli olduğu ve klindamisine karşı orta düzey direnç gösterdiği, organik maruldan elde edilen pozitif izolatin ise metronidazol ve vankomisine duyarlı, moksifloksasin, klindamisin, eritromisin ve sefotaksime karşı dirençli olduğu bildirilmiştir.

Bouttier ve ark. (2010) çiğ sığır etlerinden tanımlanmış *C. difficile* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada sığır parça etlerinden tespit ettikleri 2 pozitif izolatin moksifloksasin, teikoplanin, vankomisin, metronidazol ve linezolid karşı duyarlı olduğunu, levofloksasin, telitromisin, eritromisin ve linkomisine karşı ise dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Harvey ve ark. (2011b) et ürünlerinden tespit ettikleri pozitif izolatlarda etkenin 11 antimikrobiyal ajana yönelik dirençlilik durumları araştırmışlardır. Çalışmada amoksisilin, klavulanik asit, kloramfenikol, metronidazol, piperacillin-tazobactam ve vankomisine karşı % 100 duyarlılık tespit edilirken, sefoksitin ve kloramfenikol'a karşı % 100 direnç geliştiği, ampisilin'e karşı % 83 oranında orta düzey direnç geliştiği ve klindamisine karşı ise % 56 oranında yine orta düzey direnç geliştiği bildirilmiştir. İmipenem, siprofloksasin ve tetrasikline karşı gelişen duyarlılıkta farklılıklar olduğu görülmüştür.

Ülger ve ark. (2011) Türkiye'de yaptıkları çalışma da tespit ettikleri 50 toksijenik *C. difficile* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını incelemiştir. İzolatların hepsi metronidazol, vankomisin ve meropenem duyarlı bulunmuş ve MİK50/MİK90 değerleri sırasıyla; 0.125-0.125 mg/l, 1-0.5 mg/l ve 1-2 mg/l olarak saptanmıştır. İzolatların % 62'si klindamisine direnç gösterirken MİK50 ve MİK90 değerleri 4 ve 16

mg/l olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde ampisiline de yüksek oranda direnç (% 68) tespit edilmiş ve MİK50 ve MİK90 değerleri aynı (1 mg/l) bulunmuştur.

Zidaric ve ark. (2012) buzağı çiftliklerinde yaptıkları çalışmada antibiyotik duyarlılık testi sonucunda *C. difficile* etkeninin tetrasiklin, doksisisilin ve eritromisine karşı direnç gösterdiği ayrıca amoksisilin ve metronidazole karşı duyarlılık oluştuğunu bildirmişlerdir.

Schneeberg ve ark. (2013) Almanya’da domuzlarda tespit edilen *C. difficile* izolatlarının genotiplerini belirlemeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada 151 diareli hayvanlara ait, 118 tanesi diare tedavisi gören hayvanlara ait örnekler incelenmiş olup, antibiyotik tedavisi ile etken prevalansı arasında bağlantı kurulamamıştır.

Rodriguez ve ark. (2014) Belçika’da yaptıkları çalışma da *C. difficile*’ye ait pozitif izolatların % 50’sinde antibiyotik duyarlılığı tespit edilmiştir. Ribotip 078’e ait sadece 2 izolat tetrasikline karşı direnç göstermiştir. *gyrA* genindeki mutasyonla ile moksifloksasin direncinin bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak bu iki izolattan birinde eritromisine karşı direnç tespit edilmiştir. Domuz etinde tespit edilen ribotip 014’e ait 4 izolattan 1 izolatta ve sığır etine ait 1 izolatta klindamisine karşı orta şiddetli bir direnç tespit edilmiştir. Tüm izolatların metranidazol, vankomisin, kloramfenikol ve rifampine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Kauassi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada pişmiş etlerden tespit edilen *C. difficile* izolatlarının metronidazol ve vankomisine karşı % 100 oranında, klindamisine karşı ise % 12.25 oranında bir dirençlilik durumu saptamışlardır.

Rahimi ve ark. (2014a) et örneklerinden tespit edilen pozitif *C. difficile* izolatları üzerinde yaptıkları antibiyotik duyarlılık testinde; *C. difficile*’nin klindamisin, gentamisin, eritromisin, ampisilin ve tetrasikline karşı direncinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm izolatların metronidazol, vankomisine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençlerinin bu şekilde tespit edilmesi, İrandaki kasaplık hayvanların tedavilerinde belirtilen antibiyotiklerin kullanımına bağlı paralellik gösterdiği yorumlanmıştır.

Rahimi ve ark. (2014b) İran'da çiğ sütlerde *C. difficile* tespit edilen izolatlarda antibiyotik duyarlılığın belirlenmesine yönelik disk difüzyon testi kullanılarak 11 antimikrobal ilaca karşı izolatların hassasiyetlikleri değerlendirmiştir. Pozitif izolatlarda klindamisin, gentamisin ve nalidiksik asite karşı direnç gelişirken; kloramfenikol, metronidazol, tetrasiklin ve vankomisine karşı direnç saptanmamıştır.

Doosti ve Farsani (2014) İran'ın batısında yaşayan buzağuların dışkılarında *C. difficile* izolatların antibiyotik dirençlilik profillerini incelemişler ve klindamisine karşı % 100 direnç, vankomisine karşı % 20 duyarlılık geliştiğini saptamışlardır.

Varshney ve ark. (2014) Pensilvanya'da *C. difficile*'nin insan dışkı örneklerinde ve perakende olarak satışa sunulan etlerde prevalansını ve karakterizasyonunu belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada etkenin antibiyotik dirençlilik durumları baktıklarında et örneklerinden tespit edilen izolatların klindamisin, vankomisin ve metronidazole karşı insan izolatlarında daha duyarlı olduğu görmüşlerdir.

Norman ve ark. (2014) marketlerde perakende olarak satılan deniz ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada ayrıca etkenin 11 antibiyotik ajana karşı duyarlılıkları incelenmiş, çalışma sonucu somon ve midyeye ait izolatların 8 antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu görülürken, klindamisine karşı ara direnç geliştiği bildirilmiştir. Karidese ait izolatların ise klindamisin ve ampisiline dirençli olduğu görülmüştür

2.10. Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP)

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı gıdalar doğal ortamda yaşamsal reaksiyonlarını devam ettirebilirler ancak hasat ve kesim sonrası anabolik reaksiyonlar yerini katabolik reaksiyonlara bırakmakta ortamdaki oksijeninin de negatif etkisiyle bozulmalar meydana gelmektedir. Bu reaksiyonların sonucunda gıdaların yapıtaşları hızla parçalanarak CO₂ ve H₂ gibi gazların oluşmasına neden olmaktadır. Bu bozulma reaksiyonların önüne geçmek ve gıda muhafazasını sağlamak amacıyla dondurma, ışınlama, ısıl işlem uygulama vb. yöntemler geliştirilmektedir. Ancak tüm bu işlemler

gıdanın yapısında birtakım değişiklikler meydana gelmesine ve kimyasal yapısının değişmesine neden olabilmektedir (Brody, 1989).

Günümüzde tüketicilerin tercihi doğrultusunda gıdaların doğal yapısını yapay katkı maddeleri kullanmadan koruma ve raf ömrünü uzatmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu nedenlerden yola çıkarak gıdalarda oluşan bu bozunma reaksiyonları azaltmak amacıyla gıdanın etrafını saran atmosferde bulunan gazların yine atmosferde doğal olarak bulunan gazların belirli değerlerde ayarlı oranlarıyla değiştirilerek elde edilen MAP yöntemi kullanılmaktadır. Özetle MAP paketleme de paketin içerisinde gaz fiziksel olarak hareket ettirilmekte ve ortam yeni bir gaz karışımı ile doldurulmaktadır (Caulon ve Luis, 1989).

Modifiye atmosfer paketlemenin raf ömrü üzerindeki etkisi; ürün tipine, taze materyalin başlangıç kalitesine, gaz karışımına, depolama sıcaklığına, işleme ve paketleme esnasında hijyene, gaz/ürün hacim oranına ve paketleme materyalinin koruma özelliklerine bağlıdır (Sivertsvik ve ark., 2002).

Paketleme de kullanılan gaz karışımlarının doğru seçimi önemli noktayı oluşturmaktadır (Caulon ve Luis, 1989). Modifiye atmosfer paketlemede kullanılan 3 tip gaz; O₂, N₂ ve CO₂'dir. Bu gazların iki veya üç farklı kombinasyonu ürün ihtiyacına göre seçilerek kullanılır. Diğer bazı gazlar karbonmonoksit (kırmızı rengin sağlanmasında), ozon, etilen oksit, nitrous oksit, helyum, neon, argon, propilen oksit, etanol, hidrojen, sülfürdioksit ve klorin çoğu ürünün raf ömrünü artırmak için kullanılmakta buna karşın bu gazların kullanımının ekonomik olmaması yanısıra duyuşsal kalite kayıplarına da neden olması kaynaklı kullanımı yaygın değildir (Sivertsvik ve ark., 2002). Ayrıca etilen oksit, nitrous oksit ve diğer bakterisidal veya bakteriostatik gazların taze balıkların korunmasında toksik özellikleri nedeniyle uygun olmadığı belirtilmiştir (Brody, 1989).

Modifiye Atmosfer Paketleme de Kullanılan Gazların Özellikleri

Azot: İnert özellikte bir gaz olup sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Paketteki reaktif gazlarla yer değiştirerek etkisini gösterir. Oksijen ile reaksiyonu sonucu oksijenle yer değiştir ve oksidatif reaksiyonları dolayısıyla kötü tat-koku oluşumunu

engeller. İnerit özelliğinden dolayı esnek paketlerde vakum oluşumunu engeller (Hotckhiss 1989). Gıda ürünleri içerisinde oksidatif acılaşmayı geciktirmek için O₂ duyarlı ürünlerde O₂ yerine kullanılır ve aerobik mikroorganizmaların gelişimini inhibe eder (Sivertsvik ve ark., 2002).

Karbondioksit: Bakteriyostatik ve fungostatik özelliktedir. Küf ve aerobik bakterilerin gelişmesini yavaşlatır ya da tamamen durdurur. Mayalar üzerinde etkisi yoktur (Caulon ve Luis, 1989). Çözünürlüğün artması sonucu et ürünleri gazı absorbe etmekte ve buna bağlı olarak ürünlerde renk değişimleri meydana gelmektedir (Hotckhiss, 1989; Brody, 1989).

Oksijen: Bozulma nedeni olan aerobik mikroorganizmaların gelişimini arttırması, kalite kaybına ve oksidasyona (kötü renk, koku, tat oluşumu) neden olmasından dolayı MAP teknolojisinde paketteki O₂ oranının % 1'e düşürülmesiyle bu etkiler önemli ölçüde azaltılmaktadır (Hotckhiss 1989). Ancak taze meyve ve sebzelerde düşük düzeyde aerobik solunum için gereklidir (Brody, 1989). Et ve et ürünlerinin modifiye atmosfer paketlenmesinde kullanılan gaz kompozisyonları Tablo 7'de özetlenmiştir.

MAP Uygulamalarında Kullanılan Paketleme Materyalleri ve Özellikleri

Paketlemede kullanılan materyallerin delinmeye karşı dayanıklı, su buharı oluşumunu engelleme, oksijen, karbondioksit ve su geçirgenliği olmayan özellikteki malzemelerden olması gerekir (Bennik ve ark. 1995). Bu özelliklerden yola çıkılarak Modifiye atmosfer paketlemede poliester, polipropilen, polistrin, polivinilklorid (PVC), naylon (poliamid-PA), etilen vinil asetat (EVA), etilen vinil alkol kopolimerleri (EVOH), polietilen (PE), polietilen tereftalat (PET), orient edilmiş poli propilen (OPP), selüloz asetat gibi polimer niteliğinde olan paketleme materyalleri kullanılmaktadır. Kullanılacak olan materyalin gıdalarla etkileşime girmemesi, toksik özellikte olmaması, hijyenik ve ekonomik olması, ilgili kanun, tüzük ve yönetmeliklere uygun olması da oldukça önemlidir (Han 2005; Anon, 2006).

Tablo 7. Et ve Et Ürünlerinin Modifiye Atmosfer Paketlenmesinde Kullanılan Gaz Kombinasyonları (Farber, 1991; Phillips, 1996)

Gıdanın Cinsi	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	N ₂ (%)
Et (kırmızı)	60 - 85	40 - 15	-
Et (Kürlenmiş)	-	20 - 35	65 - 80
Et (Pişmiş)	-	25 - 30	70 - 75
Kanatlı Eti	-	25	75
Domuz eti	60	40	-
Balık	30	40	30
Balık (Yağlı)	40	60	-

Modifiye atmosfer paketlemenin avantajları ve dezavantajları aşağıda belirtilmiştir. (Sivertsvik ve ark., 2002).

Avantajları

- * Ürün raf ömründe % 50-400 oranında yükselme sağlar.
- * Uzun raf ömrü nedeniyle ekonomik kayıpları azaltır.
- * Dağıtım masraflarını azaltır.
- * Yüksek kaliteli ürünler elde edilir.
- * Dilimlenmiş ürünlerin daha kolay ayrımını sağlar.
- * Merkezileştirilmiş paketlenme ve porsiyon kontrolü sağlar.
- * Geliştirilmiş sunum ve ürünün içeriğinin tüketici tarafından net bir şekilde görülmesini sağlar.
- * Kimyasal koruyucu kullanımını azaltır veya kullanılmaz.
- * Paketten su kaybına ve rekontaminasyona karşı koruma sağlar.
- * Kokusuz ve kullanışlı paketlenme yöntemidir.

Dezavantajları

- * Soğuk zincir gerektirir.
- * Maliyetli bir uygulamadır.
- * Her ürün tipi için farklı gaz formülasyonları hazırlanmasını ve özel teçhizat eğitimi gerektirir.
- * Ürün güvenliğinin sağlanabilmesi gereklidir.
- * Paket hacminin artırılması durumunda daha çok gaz kullanımı gerekir ve dolayısıyla taşıma masraflarını artırır.
- * Paketin açılması ve delinmesi gibi dış etkenler sonucu paketin uygunluğu bozulur.
- * Gıdada çözünmüş CO₂ paket bükülmesini sağlamaz ve su kaybını yükseltir.

3. MATERYAL VE METOT

3. 1. Materyal

Beşeri hekimlikte toksijenik *C. difficile* izolatları yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak değerlendirilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda hayvansal orijinli *C. difficile* izolatları ile insan orijinli *C. difficile* izolatları arasında genetik karakterizasyonda benzerlik bulunması nedeniyle bulaşmada kontamine hayvansal gıdaların sorumlu olabileceği tartışılan konular arasına girmektedir. Söz konusu etkenin hayvansal gıdalardan insanlara bulaşma olasılığı nedeniyle bu çalışma düşünülmüştür. Bu amaçla çalışmada Mayıs-Ekim 2013 tarihleri arasında Samsun Merkezi'nde bulunan market ve kasaplardan temin edilen toplam 100 adet MAP sığır et ürünü (50 kıyma, 50 kuşbaşı) materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler her ay 20'şer adet olmak üzere 5 ay boyunca periyodik olarak temin edilmiştir. Numune seçimlerinde örneklerin farklı parti üretimlere ait numunelerden seçilmesine ve örnek paketlerinin en az 500 g olmasına dikkat edilmiştir. Bununla beraber örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek mümkün olan en kısa süre içinde analiz edilmiştir.

3.1.1. *C. difficile*'nin İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar

***Clostridium difficile* Selective Medium (CDB):**

Proteose Peptone (OXOID, LP085)
Disodium Hydrogen Phosphate (SIGMA, S7907)
Potassium Dihydrogen Phosphate (SIGMA, P9791)
Magnesium Sulphate (SIGMA, M7506)
Sodium Chloride (SIGMA, S7653)
Fructose (SIGMA, F0127)
Sodium Taurocholate (SIGMA, S86339)
Laked Horse Blood (OXOID, SR0048C)
C. difficile Selective Supplement (OXOID, SR0173E)

Hazırlanışı (1000 ml): Protease Peptone (40.0 g), Disodium Hydrogen Phosphate (5.0 g), Potassium Dihydrogen Phosphate (1.0 g), Magnesium Sulphate (0.1 g), Sodium Chloride (2.0 g), Fructose (6.0 g) ve Sodium Taurocholate (1.0 g) belirtilen ölçülerde hassas terazide tartılarak erlene alındı. Üzerine 1000 ml distile su ilave edilerek su banyosunda 60 °C'de 1 saat bekletilerek karışım çözündürüldü. Daha sonra otoklavda 121 °C' de 90 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulurak, içerisine Laked Horse Blood (50 ml) ve *C. difficile* Selective Supplement (2 vial) ilave edilerek 4 °C'de muhafazaya kaldırıldı.

***Clostridium difficile* Moxolactam Norfloxacin (CDMN) Agar:**

Proteose Peptone (OXOID, LP 085)
Disodium Hydrogen Phosphate (SIGMA, S7907)
Potassium Dihydrogen Phosphate (SIGMA, P9791)
Magnesium Sulphate (SIGMA, M7506)
Sodium Chloride (SIGMA, S7653)
Fructose (SIGMA, F0127)

Agar Bacteriological (OXOID, LP11)

Laked Horse Blood (OXOID, SR0048C)

C. difficile Selective Supplement (OXOID, SR0173E)

Hazırlanışı (500 ml): Proteose Peptone (40.0 g), Disodium Hydrogen Phosphate (5.0 g), Potassium Dihydrogen Phosphate (1.0 g), Magnesium Sulphate (0.1 g), Sodium Chloride (2.0 g), Fructose (6.0 g) ve Agar Bacteriological (15 g) belirtilen ölçülerde hassas terazide tartılarak erlene alındı. Üzerine 500 ml distile su ilave edilip su banyosunda 95 °C’de bekletilerek çözünmesi sağlandı. Daha sonra 121 °C’ de otoklavda 90 dakika süreyle sterilize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besiyeri 50 °C’ye kadar soğutuldu. Petrilere döküleceği zaman içerisine içerisine Laked Horse Blood (% 7-35 ml) ve *C. difficile* Selective Supplement (1 vial) ilave edilerek petrilere dökümü yapıldı. Besiyeri donduktan sonra 4 °C’de muhafazaya kaldırıldı.

Tryptone Soy - Yeast Extract Agar

Tryptone Soy Agar-TSA (OXOID, CM131)

Yeast Extract Agar-YE (OXOID, LP0021)

Hazırlanışı (500 ml): Tryptone Soy Agar’dan 20 g, Yeast Extract Agar’dan ise 2.5 g (% 0.5) tartıldı ve 500 ml distile suda çözüldürüldü, pH değeri 7.0 ± 0.2 olarak ayarlandı ve su banyosunda 95 °C’de eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi ve besiyeri 50 °C’ye kadar soğutuldu, steril plastik petrilere dökülerek 4 °C’de muhafa edildi.

Test kitleri:

C. difficile Test Kiti (OXOID, DR 1107A)

Test suşları:

C. difficile ATCC 9689, *C. difficile* ATCC 43593

3.1.2. *C. difficile* İzolatlarının PCR ile Doğrulanmasında Kullanılan Kimyasallar

Taq DNA Polymerase Seti (SIGMA, D4545):

Taq DNA Polymerase 500U

10X Reaction Buffer

25 mM MgCl₂

dNTP Mix (SIGMA, D7295):

dNTP Mix 10mM

Gene Ruler Set (BIOLABS, N3231S):

100 bp 500 µg/ml kullanıma hazır.

Primerler:

tpi-F (5-AAA GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA-3)

tpi-R (5 CAT AAT ATT GGG TCT ATT CCT AC-3)

tcdA-F (5-AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT-3)

tcdA-R (5-GTA TCA GGC ATA AAG TAA TAT AC TTT-3)

tcdB-F (5-GGA AAA GAG AAT GGT TTT ATT AA-3)

tcdB-R (5-ATC TTT AGT TAT AAC TTT GAC ATC TTT-3)

Hazırlanışı: Primerler desalted saflıkta ve liyofilize olarak temin edildi. Daha sonra üretici firmanın önerisine göre steril bidistile su ile 20 µmol konsantrasyonunda hazırlandı.

TBE Solüsyonu:

10X TBE (GIBCO, 15581-044, NY-USA)

Hazırlanışı: 10X konantrasyonda olan buffer solüsyonundan 100 ml alınarak 1 litreye tamamlandı ve analizler için 1X konantrasyonda kullanıldı.

Ethidium Bromide:

10 mg/ml, (APPLICHEM, A1152 GmBH)

Hazırlanışı: Kullanıma hazır olarak temin dilen Etidium Bromide solüsyonundan 100 ml agaroz için 6 µl alındı ve agaroz eritildikten sonra içine karıştırıldı.

Agaroz:

Agarose (SIGMA, A9539)

Hazırlanışı: 1.5 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TBE ile sulandırıldı. Daha sonra mikrodalga fırınında eritildi ve 50 °C'ye kadar soğutularak içerisinde 6 µl ethidium bromide eklendi. Son olarak elektroforez tankına dökülerek donması için bekletildi.

3.1.3. *C. difficile* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri

Brucella broth:

Brucella Broth (SIGMA, B3051)

Hazırlanışı: Brucella Broth Base (Sigma, B3051) hazır besiyerinden 31 g tartılarak 1000 ml distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra cam tüplere 9'ar ml olacak şekilde paylaştırıldı. Tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek 4 °C'de muhafaza edildi.

Brucella Medium Base:

Brucella Medium Base (OXOID CM0169)

Hazırlanışı: Besiyerinin hazırlanmasında, besiyerinden 45 g hassas terazide tartılarak erlene alındı. Üzerine 1000 ml distile su ilave edilerek su banyosunda su banyosunda 95 °C’de eritildi ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besiyeri 50 °C’ye kadar soğutuldu. Besiyeri donduktan sonra 4 °C’de muhafazaya kaldırıldı.

Antibiyotik Diskleri:

Metronidazole (5 µg), (OXOID, CT067B)

Vancomycin (30 µg), (OXOID, CT058B)

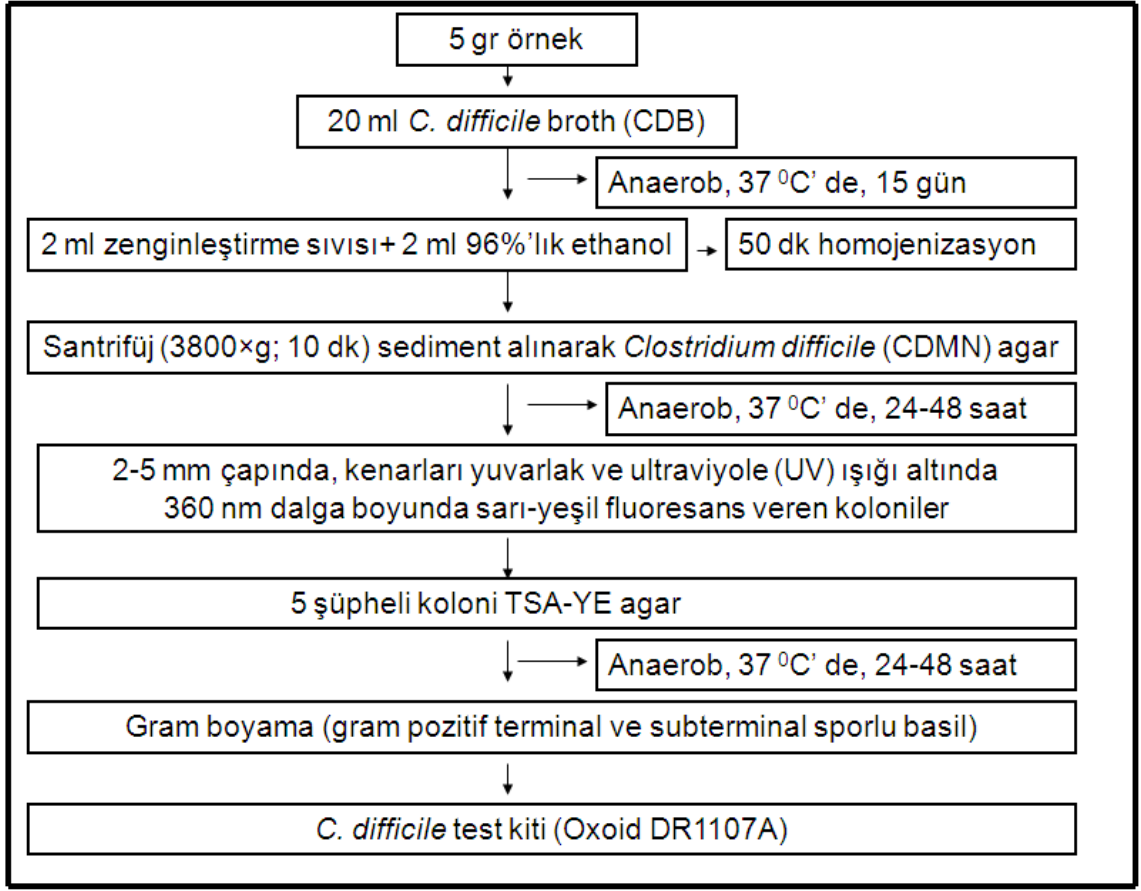
Clindamycin (2 µg), (OXOID, CT064B)

3.2. Metot

Laboratuvara soğuk zincir altında getirilen MAP paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerindeki *C. difficile*’nin izolasyon ve identifikasyonu Boer ve ark. (2011)’nin belirledikleri klasik kültür tekniğine göre yapıldı. Klasik kültür tekniği ile tanımlanan *C. difficile* izolatlarının PCR ile doğrulanmasında ve elde edilen izolatların toksin genlerinin tespiti Lemee ve ark. (2004)’nin belirledikleri yöntemlere göre multipleks PCR metodu ile tamamlandı. İzolatların antibiyotik direnç profilinin belirlenmesinde ise CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standartları esas alınarak çalışmalar gerçekleştirildi.

3.2.1. *C. difficile*’nin İzolasyon ve İdentifikasyonu

C. difficile’nin izolasyon ve identifikasyonu Boer ve ark. (2011)’nin belirledikleri klasik kültür tekniğine göre yapıldı. İzolasyon ve identifikasyon aşamaları Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. *C. difficile*'nin konvansiyonel yöntemle izolasyon ve identifikasyon basamakları

3.2.1.1. Ön Zenginleştirme

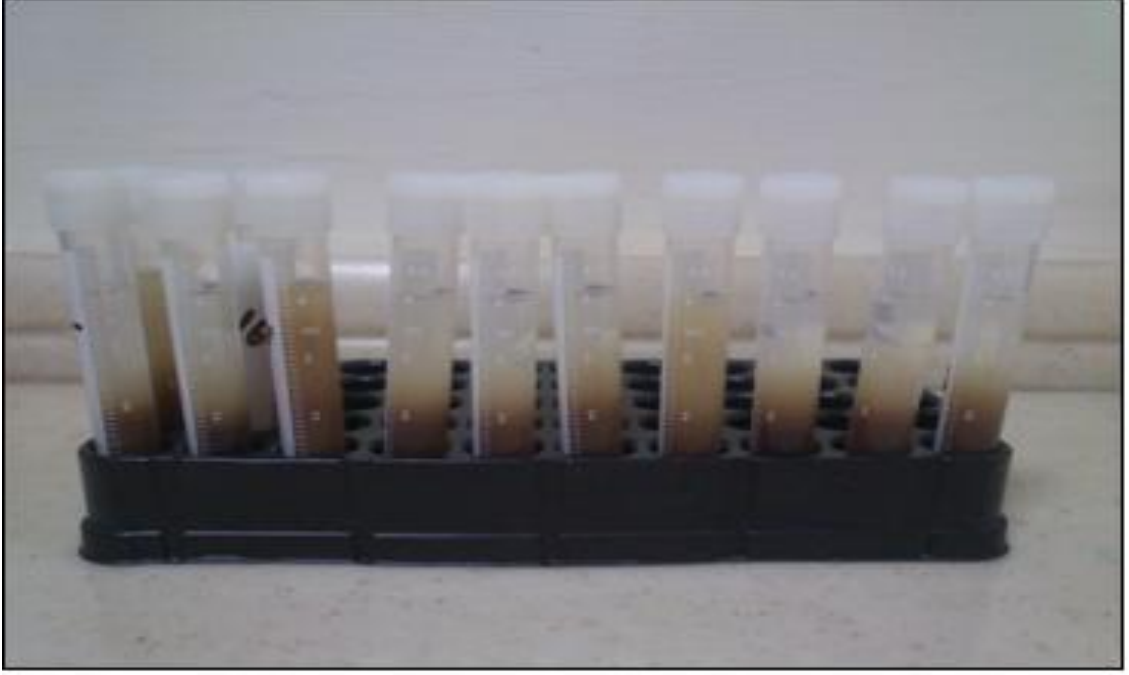
Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen MAP paketli farklı partilerdeki sığır kuşbaşı ve sığır kıyma örneklerinden aseptik koşullarda steril vida kapaklı tüplere (50 ml'lik) her paketten homojen olacak şekilde 5'er gram tartılarak numuneler alındı. Alınan örneklerin üzerine 20 ml CDB broth eklendi ve tüpler vortexlenerek homojenizasyon sağlandı. Anaerob ortamı sağlamak için tüplerin üzeri sıvı parafin ile kapatıldı ve örnekler içerisinde Gas Generating Kit (OXOID, BR38) ilave edilmiş jarlarda 37 °C'de 15 gün süreyle inkübasyona bırakılarak ön zenginleştirme işlemi tamamlandı (Boer ve ark., 2011) (Şekil 4a,4b).



Şekil 4a,4b. Anaerobik şartlarda örneklerin inkübasyonu

3.2.1.2. Sedimentasyon Eldesi

İnkübasyon sonrası hazırlanan zenginleştirme sıvısından 2'şer ml alınıp steril vida kapaklı santrifüj tüplerine (5 ml'lik) konularak üzerine 2 ml % 96'lık ethanol ilave edildi (Şekil 5). Tüplerin kapağı kapatılarak 50 dk süreyle çalkalanmak suretiyle homojenizasyonu sağlandı. Sonrasında örnekler santrifüj cihazına (Hettich Universal R320, Almanya) konularak 3800xg devirde 10 dk santrifüj edilerek sediment eldesi sağlandı.



Şekil 5. Sediment eldesi

3.2.1.3. Katı Besiyerine Ekim

Elde edilen sediment alınarak *Clostridium difficile* moxolactam norfloxacin (CDMN) agar'a çizme plak yöntemiyle geçildi. Plaklar 37 °C'de 24-48 saat süreyle anaerob koşullarda bekletildikten sonra seçilen 5 şüpheli koloni (*C.difficile*'ye özgü 2-5 mm çapında, kenarları yuvarlak ve ultraviyole (UV) ışığı altında 360 nm dalga boyunda sarı-yeşil fluoresans veren koloniler) TSA-YE (OXOID, CM013-LP0021) agarda benzer şekilde 37 °C'de 24-48 saat süreyle anaerob ortamda subkültüre edildi. Kolonilerden gram boyama yapılarak Gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basillerin varlığı kontrol edildi ve konvansiyonel anlamda identifikasyon *C. difficile* test kiti (OXOID, DR1107A) ile tamamlandı (Boer ve ark. 2011). Yapılan tüm analizlerde *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. difficile* ATCC 43593 izolatları pozitif kontrol amaçlı kullanıldı (Şekil 6).



Şekil 6. Anaerobik koşullarda inkübe edilen şüpheli izolatlara ait CDMN agar görüntüsü

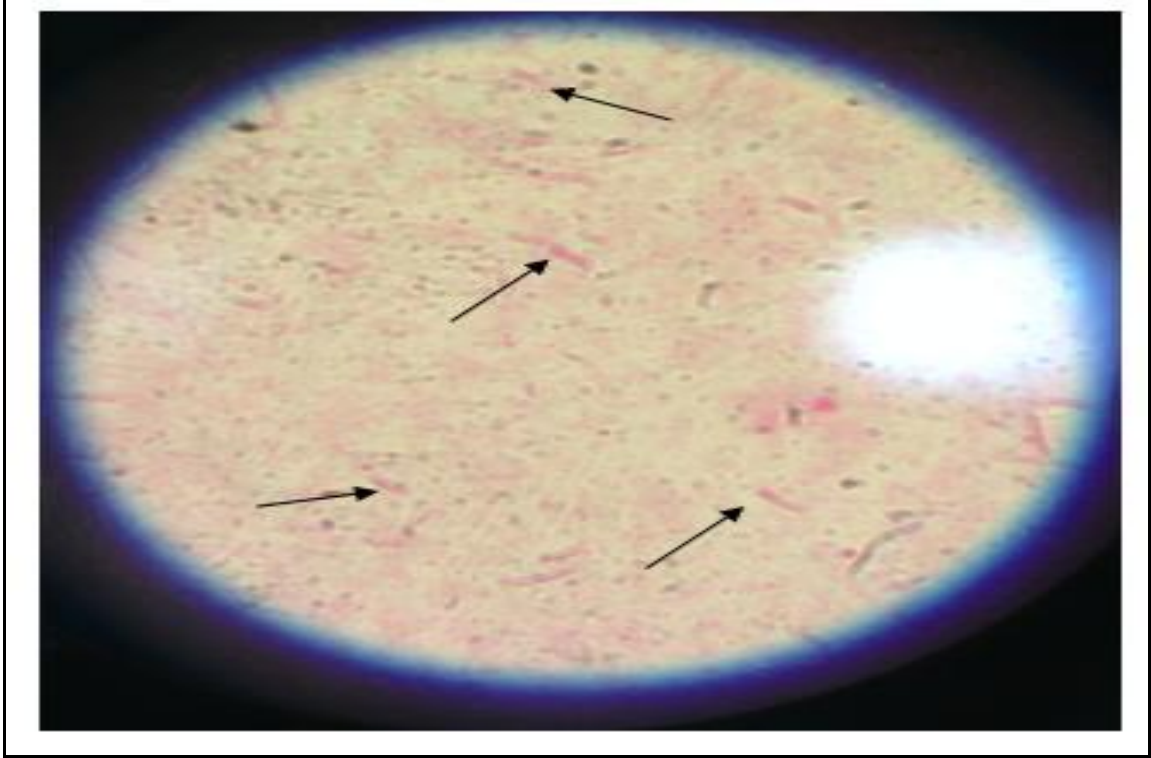
3.2.1.4. *C. difficile* İdentifikasyonu

Her bir petri incelenerek üremeler değerlendirildi. *C. difficile* üremesi tespit edilen (2 mm çapında, kenarları yuvarlak, UV ışığı altında 360 nm dalga boyunda sarı yeşil flouresans veren koloniler) 5 şüpheli koloni TSA-YE (OXOID, CM013-LP0021) agarda çizme plak yöntemiyle geçilerek benzer şekilde 37 °C'de 24-48 saat süreyle anaerob ortamda subkültüre edildi.

3.2.1.4.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Bakı

Şüpheli kolonilerden az miktar alkol ile temizlenmiş bir lam üzerine alındı. Daha sonra steril fizyolojik tuzlu su ile homojen hale getirilerek lam üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra üç defa alevden geçirilerek tespit edildi. Preparatlar 90 sn kristal viyole ile boyandıktan sonra saf su ile yıkandı. 45 sn lugol iyot çözeltisini uygulamasını takiben önce % 96'lık alkol ve sonrasında saf su ile yıkandı. Yıkanan preparatlar sulu karbon fuksin çözeltisi ile 10-20 saniye boyandıktan sonra

tekrar saf su ile yıkanıp kurutuldu. Hazırlanan preparatlar Olympus (CX 21) mikroskop ile 100x büyütmede immersiyon yağı ile incelendi. Mavi-menekşe renk almış gram pozitif terminal ve subterminal sporlu basillerin varlığı *C. difficile* şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 7).

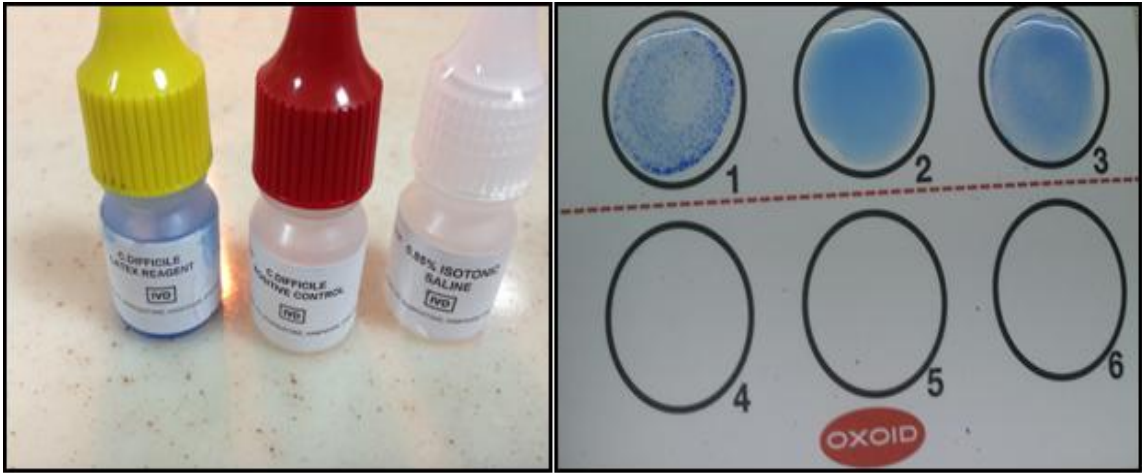


Şekil 7. Şüpheli izolatlara ait Gram boyama görüntüsü

3.2.1.4.2. Test Kiti ile Pozitif Sonucun Doğrulanması

Gram boya ve mikroskopik bakı sonucu şüpheli kabul edilen izolatların doğrulanması amacıyla hızlı ve basit latex aglütinasyon yöntemi olarak bilinen *C. difficile* test kiti (OXOID, DR1107A) kullanıldı. Steril ortamda tek kullanımlık reaksiyon kartlarına negatif kontrolü sağlamak için 1 damla *C. difficile* reaktif ajanı damlatıldı ve solüsyon damlatıldığında herhangi bir pıhtılaşma gözlenmedi. Pozitif kontrolü oluşturmak için ise 1 damla *C. difficile* pozitif kontrol, üzerine 1 damla *C. difficile* reaktif ajan damlatıldı, tek kullanımlık çubuk yardımıyla karıştırıldı, koagülasyon ve iğne şeklinde kümeleşme gözlemlendi ve test kitinin doğru çalışırılığı

test edildi. Daha sonra şüpheli izolatları test etmek için ayrı kartlara 1 damla izotonik tuzlu su damlatıldı, üzerine *C. difficile* şüpheli olarak tespit edilen kolonilerden öze ile alınarak karıştırıldı, son olarak da 1 damla *C. difficile* reaktif ajan eklendi. İki dakika sonrasında *C. difficile* pozitif olanlarda toplu iğne ucuna benzer bir şekilde kümeleşme görülürken, *C. difficile* negatif olanlarda homojen yapı gözlemlendi (Şekil 8a, 8b). Bununla beraber elde edilen izolatlar yapılacak antibiyotik duyarlılık testi ve olası epidemiyolojik çalışmalar için gliserinli cryo tüplerde -20 °C’ de saklandı.



Şekil 8a, 8b. Test kiti solüsyonları ve pozitif ve negatif görüntü

3.2.1.5. *C. difficile* İzolatlarının *tpi* Gen Varlığı Üzerinden PCR ile Konfirmasyonu ve İzolatlarda *tcdA* ve *tcdB* Toksin Gen Varlığının Multipleks PCR ile Belirlenmesi

Klasik kültür tekniği ile tanımlanan *C. difficile* izolatlarının PCR ile konfirmasyonunda Lemee ve ark. (2004)'nin belirledikleri yöntem kullanıldı. Çalışma kapsamında izolatlardan, *C. difficile* suşlarının tamamında yüksek oranda eksprese edilen ve ortak antijen olarak belirlenen Glutamat Dehidrogenaz Enzimini (GDH) kodlayan *tpi* (Triose phosphate isomerase housekeeping gen) geninin tespiti yapıldı. Bununla beraber izolatlardaki olası toksin genlerinin tespiti de benzer olarak Lemee ve ark. (2004)'nin belirledikleri yöntemle göre multipleks PCR metodu ile yapıldı. PCR ile doğrulaması yapılan çalışma izolatlarından toksin A ve toksin B'yi belirleyen *tcdA* ve *tcdB* genlerine bakıldı. Bununla beraber etkenin PCR ile konfirmasyonunda pozitif

kontrol amaçlı *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. difficile* ATCC 43593 referans suşları kullanıldı. Analizlerde kullanılan primer dizilimleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Analizlerde kullanılan primer dizilimleri

Primer	Sequence (5’- 3’)	Bant Boyutu (bp)	Kaynak
tpi-F	AAA GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA	230	Lemee ve
tpi-R	CAT AAT ATT GGG TCT ATT CCT AC		ark.(2004)
tcdA-F	AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT	369	Lemee ve
tcdA-R	GTA TCA GGC ATA AAG TAA TAT ACT TT		ark.(2004)
tcdB-F	GGA AAA GAG AAT GGT TTT ATT AA	160	Lemee ve
tcdB-R	ATC TTT AGT TAT AAC TTT GAC ATC TTT		ark.(2004)

3.2.1.5.1. DNA Ekstaksiyonu

Konvansiyonel metotla identifiye edilen *C. difficile* izolatlarının DNA’larının ekstaksiyon işlemi kaynatma metoduna göre yapıldı. Buna göre TSA-YE (OXOID, CM013-LP0021)’dan 24 saat öncesinden 37 °C’de anaerob inkübasyonun ardından alınan koloniler 500 µl distile su ile süspanse edildikten sonra 95 °C’lik su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilerek, süre sonunda 10.000×g’de 5 dk santrifüj (Hettich Universal 320R, Almanya) edildi ve süpernatant -20 °C’ de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

3.2.1.5.2. PCR İçin Mixer Hazırlanışı

Toplam hacim 25 µl amplifikasyon karışımı için; 1 X PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer set (A ve B), 200 µM dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 0.5 U Taq DNA polymerase ve 2.5 µl DNA örneği oluşturuldu (Lemee ve ark., 2004).

3.2.1.5.3. Amplifikasyon Programı

Thermocyclerda (Bio-Rad MJ mini Gradient CA-USA) aşağıda program 40 siklus (2 ve 4. basamaklar arası) yapıldı.

1. 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyon aşaması
2. 95 °C'de 30 saniye denatürasyon aşaması
3. 60 °C'de 30 saniye bağlanma aşaması (annealing)
4. 72 °C'de 30 saniye primer uzama aşaması (extension)
5. 72 °C'de 10 dakika son uzama (final extension)

3.2.1.5.4. Elektroforez İşlemi ve Agar Hazırlanışı

Ethidium bromide (10 mg/ml) ilave edilmiş, 100 ml 1X TBE'de hazırlanmış % 1.5'lik agar kullanıldı. Elektroforez işlemi Bio-Rad Power Pac Basic Power Supply (CA-USA) güç kaynağı ve Bio-Rad Wide Mini Sub-Cell GT Cell (CA-USA) elektroforez tankında gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa toplam 23 µl (20 µl PCR örneği +3 µl loading dye) konularak, elektroforezde 80 V akımda 1 saat yürütülerek ve bantlar UV transilluminatörde incelendi. *tpi* için 230 bp'de, *tcdA* için 369 bp'de ve *tcd B* için ise 160 bp'de görülen bantlar pozitif kabul edildi.

3.2.1.6. Antibiyotik Dirençlilik Tespiti

Antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standartlarına göre yapıldı. Antibiyotik direnç profilinin belirlenmesinde Brucella broth'a geçilen izolatlar anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat süreyle bekletildi daha sonra örneklerin yoğunluğu McFarland 0.5'e göre ayarlanıp ve % 5 defibrine at kanı ilaveli Brucella Agar'a 0,1 ml düzeyinde geçildi. 5-10 dk plakların kurumasını takiben metronidazol (5 µg), (OXOID, CT067B), vancomycin (30 µg), (OXOID, CT058B), clindamycin (2 µg), (OXOID, CT064B) içeren antibiyotik diskleri plaklara yerleştirilip, anaerob koşullarda 37 °C'de 24 saat süreyle bekletilerek sonrasında zon çapları değerlendirmeye alındı (Şekil 9, Tablo 9, Tablo 10).

Tablo 9. Antibiyotiklerin MİK değerlerine göre zon çaplarının değerlendirilmesi (CLSI, 2012)

	MİK (µg/mL)	Zon Çapı(mm)
Duyarlı	≤ 4	≥ 20
Orta Düzeyde Dirençli	8-16	15-19
Dirençli	≥ 32	≤14

Tablo 10. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve dozları

Antibiyotik Diski	Sembolü	Dozu
Metronidazol	MTZ	5 µg
Clindamycin	DA	2 µg
Vancomycin	VA	30 µg



Şekil 9. % 5 defibrine at kanı ilaveli Brucella Agar'da antibiyotik dirençlilik zon oluşumu

4. BULGULAR

Bu çalışmada Samsun ilinde bulunan yerel market ve kasaplarda satışa sunulan MAP teknolojisi ile paketlenmiş sığır kuşbaşı ve kıyma örneklerinden farklı partilerde olmak koşuluyla toplam 100 adet numune rastgele toplandı. Toplam 100 adet araştırma materyalini, MAP sığır kuşbaşı (50 adet) ve MAP sığır kıyma örnekleri (50 adet) oluşturdu. Toplanan bu numuneler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek 25'şerli gruplar halinde analiz edildi. Çalışmada *C. difficile* varlığı klasik kültür tekniğine göre araştırıldı (Boer ve ark., 2011). Kültürde şüpheli olarak tespit edilen kolonilerin *C. difficile* test kiti (OXOID, DR1107A) ile doğrulaması yapıldı. İzolatların tanımlanması *tpi* gen sekansı esas alınarak yapılırken, *tcdA* ve *tcdB* gen sekansları esas alınarak toksijenik karakteri PCR ile tanımlandı (Lemee ve ark, 2004). Daha sonra 3 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençlilik durumları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) standartlarına göre belirlendi.

4.1. Klasik Kültür Tekniği Sonuçları

Bu aşamada Boer ve ark. (2010)'nın belirledikleri klasik kültür tekniği ile analiz edilen toplam 100 adet numunenin 3 tanesinin (% 3) *C. difficile* yönünden kontamine olduğu belirlendi.

50 adet MAP sığır kıyma örneğinin 2'si *C. difficile* yönünden pozitif olarak tespit edilirken (% 4), 50 adet MAP sığır kuşbaşı örneğinin 1'i *C. difficile* yönünden pozitif tespit edildi (% 2). Araştırmaya ait bulgular Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. *C. difficile*' in numune bazında dağılımı ve izolat sayıları

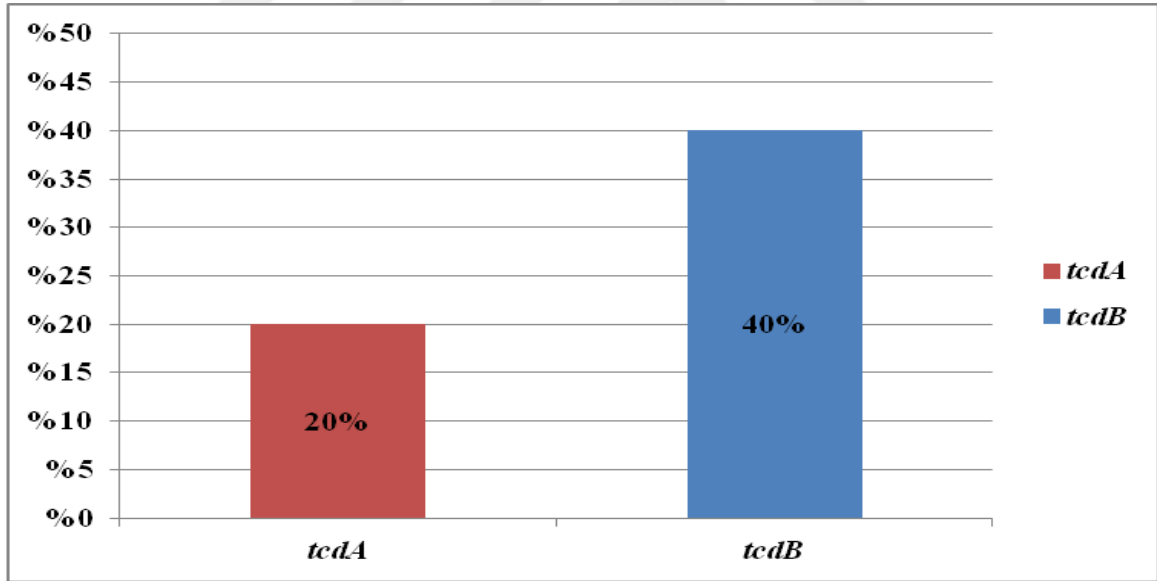
Numune	Örnek Sayısı	<i>C. difficile</i> (+) Numune/Oran	<i>C. difficile</i> (+) İzolat Sayısı
MAP sığır kıyma	50	2 (% 4)	4
MAP sığır kuşbaşı	50	1 (% 2)	1
TOPLAM	100	3 (% 3)	5

4.2. İzolatların PCR ile Doğrulanması ve Toksin Genlerinin Araştırılması

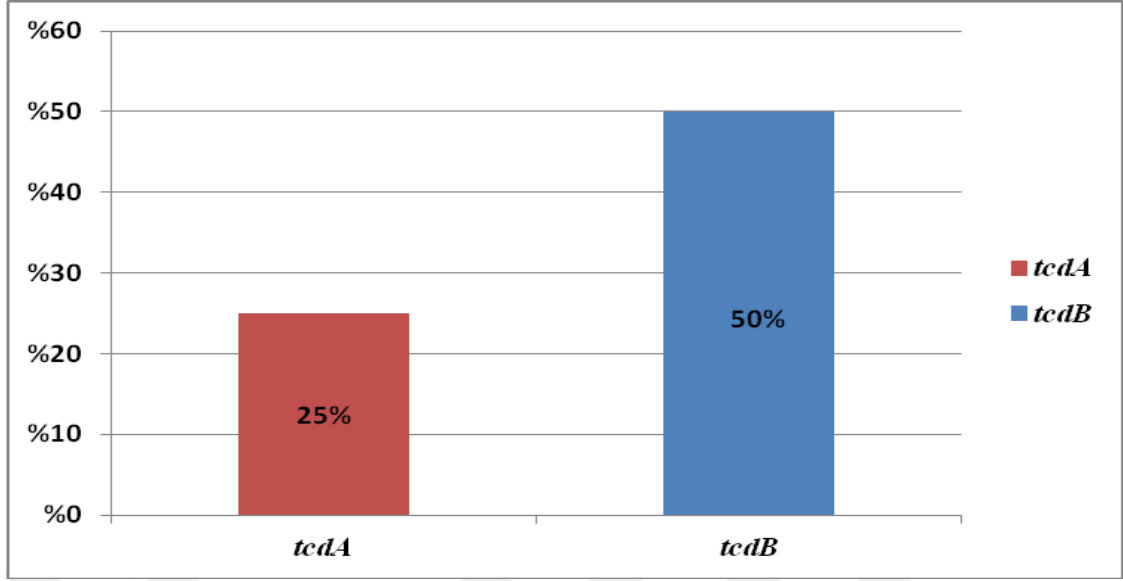
Çalışmamızda klasik kültür tekniği ile *C. difficile* olarak tanımlanan izolatları doğrulamak amacıyla *tpi* geni, izolatlardaki toksijenik karakterizasyonun tespiti için ise *tdA* ve *tdB* genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla yapılan analizler sonucunda MAP sığırcı kıyma ve kuşbaşı örneklerinden tanımlanan PCR ile *tpi* geni yönünden pozitif bulunan toplam 5 adet *C. difficile* izolatının yalnızca 3 tanesinde toksijenik gen karakteri saptanmıştır. Numune dağılımına bakıldığında MAP sığırcı kıyma örneklerine ait 4 adet izolatın 3'ünde toksijenik karakterde gen bölgesi tespit edilirken, MAP sığırcı kuşbaşı örneklerine ait 1 pozitif izolatta ise toksijenik yapı gözlemlenmemiştir. Toksijenik karakterdeki izolatlar incelendiğinde 1 tanesinin *tcdA* gen bölgesini, 2 tanesinin ise *tcdB* gen bölgesi taşıdığı multipleks PCR yöntemiyle belirlenmiştir (Tablo 12, Şekil 10-11). İzolatlara ait multipleks PCR jel görüntüsü şekil 12'de gösterilmiştir. Çalışmamızda PCR analizinin saptama limitinin belirlenmesi için *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. difficile* ATCC 43593 suşlarından ve *tpi* geninden elde edilen ve başlangıç konsantrasyonu sırasıyla *tcdA* için 369, *tcdB* için ise 160 bp ve *tpi* için 230 bp'lik olan genomik DNA örnekleri 1/10 dilüsyonlar halinde sulandırıldıktan sonra *tpi*, *tcdA*, *tcdB* genlerine spesifik primerleri kullanılarak PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Sonuç olarak *tpi* için 230 bp'de, *tcdA* için 369 bp'de ve *tcdB* için ise 160 bp'de görülen bantlar pozitif kabul edilmiştir.

Tablo 12. *C. difficile*' nin numune bazında dağılımı ve toksijenik izolat prevalansı

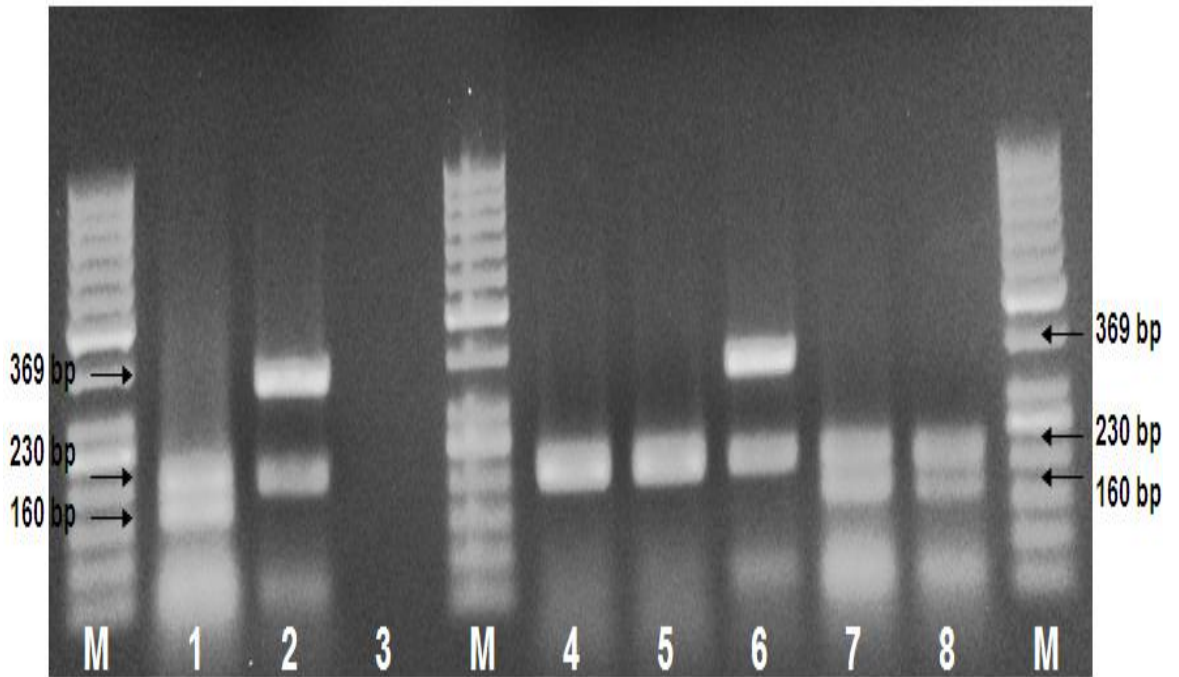
Numune	Klasik Kültür teknîği ile saptanan <i>C. difficile</i> izolat sayısı	PCR tekniği ile saptanan <i>C. difficile</i> izolat sayısı (<i>tpi</i> gen bölgesi üzerinden)	Toksijenik karakterdeki <i>C.difficile</i> izolat sayısı	Toksijenik gen bölgesi	
				<i>tcdA</i>	<i>tcd B</i>
MAP sığır kıyma (n:50)	4	4	3	1	2
MAP sığır kuşbaşı (n:50)	1	1	-	-	-
Toplam (n:100)	5	5	3	1	2



Şekil 10: Pozitif izolatların toksin gen dağılımları



Şekil 11: Kıyma örneklerinden elde edilen pozitif izolatların toksin gen dağılımları



Şekil 12. Multipleks PCR elektroforez görüntüsü [M: 50 bp DNA marker, **1:** *tpi* ve *tcdB* pozitif kontrol (*C. difficile* ATCC 9689), **2:** *tpi* ve *tcdA* pozitif kontrol (*C. difficile* ATCC 43593), **3:** negatif kontrol, **4:** *tpi* pozitif MAP sığır kuşbaşı orijinli izolat, **5:** *tpi* pozitif MAP sığır kıyma orijinli izolat, **6:** *tpi* ve *tcdA* pozitif MAP sığır kıyma orijinli izolat, **7:** *tpi* ve *tcdB* pozitif MAP sığır kıyma orijinli izolat, **8:** *tpi* ve *tcdB* pozitif MAP sığır kıyma orijinli izolat]

4.3. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Testi Sonuçları

Çalışmamızda PCR ile doğrulanan 5 adet *C. difficile* izolatının antibiyotik dirençlilik testleri disk difüzyon metodu ile CLSI'nin (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) tanımladığı kriterlere göre yapıldı.

Klindamisin (2 µg) dirençlilik sonuçlarına bakıldığında kıyma örneklerine ait bir pozitif izolatta antibiyotiğe karşı direnç durumu gelişirken, diğer 4 pozitif izolatta duyarlılık olduğu görüldü.

Vankomisin (30 µg) dirençlilik sonuçlarına bakıldığında tüm pozitif izolatların antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu saptandı.

Metronidazol (5 µg) dirençlilik sonuçlarına bakıldığında tüm pozitif izolatların antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu belirlendi.

Çalışmamızda tespit edilen *C. difficile* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri Tablo 13'de özetlenmiştir.

Tablo 13. *C. difficile* izolatlarının fenotipik antibiyotik dirençlilik profilleri [R: Resistant (Dirençli), I: Intermediate Direnç (Orta düzeyde Direnç), S:Sensible (Duyarlı)]

İzolat Orjini/Kodu	Moleküler			Fenotipik Antibiyotik Dirençlilik Profili								
	Karakterizasyon			Metronidazol (5 µg)			Vankomisin (30 µg)			Klindamisin (2 µg)		
	<i>tpi</i> gen	<i>tcdA</i> gen	<i>tcdB</i> gen	R	I	S	R	I	S	R	I	S
MAP sığır kıyma (33) (İzolat no: Kıyma 33-1)	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
MAP sığır kıyma (33) (İzolat no: Kıyma 33-2)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
MAP sığır kıyma (70) (İzolat no: Kıyma70-1)	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
MAP sığır kıyma (70) (İzolat no: Kıyma 70-2)	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
MAP sığır kuşbaşı (80) (İzolat no: Kuşbaşı 80-1)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

5. TARTIŞMA

Yapılan literatür taramalarında hayvansal orjinli izolatlarla insan izolatları arasında büyük bir benzerlik bulunması nedeniyle bulaşmada kontamine hayvansal gıda aktöründe son yıllarda tartışılan konular arasına girmiştir. Ülkemizde beşeri hekimlikte hastane enfeksiyonları kapsamında *C. difficile* etkeninin varlığı ve toksin tipinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen hayvansal gıdalarda etkenin varlığına yönelik çalışmaya literatür taramalarında rastlenmemiştir. Benzer şekilde *C. difficile*'e bağlı ishal tedavisinde en fazla kullanılan metronidazol, vankomisin ve klindamisine karşı hayvansal gıdalardan izole edilen etkenin antibiyotik direnç profili de araştırılmamıştır. Bu çalışma ülkemizde ve Samsun ilinde yapılan ilk çalışma olup, ülkemizde de modifiye atmosfer paketli sığır kuşbaşı ve kıyma örneklerinde *C. difficile* varlığı ile etkendeki *tcdA* ve *tcdB* genleri ile kodlanan olası toksin oluşturma potansiyeli belirlenmiştir. Bununla beraber identifiye edilen izolatların metronidazol, vankomisin ve klindamisine duyarlılıklarının tespitinde detaylandırılmış ilk çalışma olmuştur.

Çalışmamızda, Samsun ilinde kasap ve marketlerde satışa sunulan MAP yöntemiyle paketlenmiş sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinin % 3'ünde *C. difficile* izole edilmiştir (3/100). Ürün bazlı prevalansa bakıldığında kıyma örneklerinin % 4'ünden (2/50), MAP sığır kuşbaşı örneklerinin ise % 2'sinden (1/50) etken izole edilmiştir.

Yapılan literatür incelemelerinde çalışma verilerimizle benzer sonuçları çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgulara benzer olarak Jöbstl ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Avustralya'nın Graz şehri çevresindeki yerel market ve kasaplardan alınan MAP paketli (n=75), açık olarak satışa sunulan taze (n=25), sığır-domuz eti karışımlarında (n=70) ve sığır etlerinde (n=30) *C. difficile* kontaminasyonunu araştırmışlardır. Çalışma sonucunda sadece sığır eti-domuz eti karışımında *C. difficile* yönünden pozitiflik tespit edilmiş olup (% 2), sığır etleri etken yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu pozitif izolatlardan birinin MAP, diğerinin ise taze et örneğine ait olduğu bildirilmiştir. Çalışmada etkenin Avustralya'da sık görülmesine bağlı olarak gıdalarda bulaşabilen zoonotik bir etken olabileceği bildirilmiş, ayrıca kontaminasyon kaynağının üretim aşamasında personel kaynaklı olabileceği belirtilmiştir. Bunun yanında çalışmamızla benzer sonuç olarak MAP

teknolojisiyle paketlenen örnekteki CO₂ ortamının etken üremesini hızlandıran faktör olduğunu ifade etmişlerdir.

Von Abercron ve ark. (2009) İsveç'te perakende olarak satılan kıyma örneklerinde *C. difficile*'nin prevansını belirlemeye yönelik yaptıkları araştırmada % 2.4 oranında *C. difficile* izole etmişlerdir. Çalışmada incelenen et örnekleri arasında domuz, koyun, sığır, tavuk et örnekleri bulunmakla beraber tespit edilen 2 pozitif izolatin sığır örneklerine ait olduğu bildirilmiştir. Kontaminasyon seviyesini üretim, satış şartları etkileyeceği gibi çalışmamızla benzer olarak metaryelinin kıyma örneği olması da etkenin üremesini tetikleyen nedenler arasında düşünülebilir.

Bouttier ve ark. (2010) Fransa'da süpermarketlerde satışa sunulan vakum paketli ve taze sığır etlerinde *C. difficile* prevalansını % 1.9 (2/105) olarak bildirmişlerdir. Sığır parça etlerinde tespit edilen pozitif örneklerin vakum paketli örnekler olduğu, buradan yola çıkarak anaerobik ortamın etken üremesini hızlandırabileceğine yönelik görüş belirtmişlerdir. Ayrıca Fransa'da satışa sunulan parça etlerde tespit edilen etken prevalansının fekal örneklerle kıyasla düşük olmasının sebebinin gıda ürünlerinin üretiminde HACCP prosedürlerinin uygulanması ve üretim hattı boyunca yapılan mikrobiyolojik analizlerle tehlikelerin kontrol altına alınması ve bu sayede kontaminasyon riskinin minimize edilmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda fekal örnekler incelenemediğinden etkenin gıdalarda ve fekal örneklerde koontaminasyon düzeyine yönelik kıyaslamaya benzer bir yorum yapılamamaktadır. Ancak çalışmamızda vakum pakete benzer MAP'li ürünler kullanılması dolayısıyla anaerobik ortamın etken varlığını indükleyici etkisi ve et üretiminin gerçekleştiği firmaların HACCP standartlarına uyum sağlamış firmalar olması benzer sonucu ortaya koymaktadır.

Esfandiari ve ark. (2014) İran'ın İsfahan bölgesinde et paketlenen tesislerinden toplanan 81 sığır etinde *C. difficile* prevalansını, doğranmış sığır etlerinde % 2.8, parça sığır etlerinde % 2.1 olarak bildirmişlerdir. Buradan hareketle mekanik parçalanmanın arttığı durumlarda etkenin bulunabileceği yüzey alanı arttığından prevalansda artış sözü konusu olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda benzer olarak kıyma örneklerinde kuşbaşı örneklerine kıyasla prosesin daha uzun oluşu ve küçük parçalar elde

edildiğinden yüzey alanının artması prevalansın kuşbaşı örneklerine kıyasla kıyma örneklerinde daha yüksek oluşuyla açıklanabilir.

Rodriguez ve ark. (2014) Belçika’da yaptıkları çalışmada perakende olarak satılan etlerde *C. difficile* varlığını araştırmışlar. Çalışma sonucunda çalışmamızla benzer şekilde % 2.3 (3/133) oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bulaşmanın kaynağının kesinlik göstermediği, etken kontaminasyonunun kesim sırasında fekal kaynaklı olabileceği gibi, marketlerde satış esnasında mevcut işletme ve personel hijyeni kaynaklıda oluşabileceğini belirtmişlerdir. Yine Rahimi ve ark. (2014) İran’da yaptıkları çalışmada *C. difficile*’nin çiğ et ürünlerindeki prevalansını incelemişler çalışmaları sonucunda kasaplardan alınan 121 sığır etinde etken prevalansını % 1.65 (2/121) olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar kontaminasyon kaynağının fekal bulaşma olabileceği gibi, çevrede bulunan etkene ait sporlarında hayvanlarda kontaminasyona sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızdaki örneklerimiz kapalı ürünler olduğundan kontaminasyon kaynağı marketten ziyade üretimhane veya fekal kaynaklı olabileceği düşünülmektedir ancak fekal örnekler incelenemediğinden bulaşma kaynağı hakkında net bir yorum yapılamamaktadır.

Yapılan değerlendirmelerde bazı araştırmacıların verilerinin çalışma bulgularımıza göre yüksek oranda olduğu görülmektedir. Rodriquez ve ark. (2007) Kanada’da yaptıkları çalışmada perakende olarak yerel marketlerde satılan sığır eti ürünlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu % 20 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar kontaminasyonun depolama ve paketleme sırasında gerçekleşebileceğini düşünmüşlerdir. Bunun yanında etlerin satışının açık alanlarda yapılması ve buna bağlı olarak işletme hijyeni vb. ortam şartlarına bağlı kontaminasyon derecesinin artmasına bağlı olarak da değiştiği değerlendirilmektedir. Çalışmamızda kullanılan örneklerin kapalı ambalajlı olması markette satış sırasında oluşacak kontaminasyonu elimine etmektedir. Dolayısıyla açık satışa sunulan ürünlere kıyasla kontaminasyon düzeyi daha düşük olduğu görüşüne varılabilir.

Songer ve ark. (2009) Arizona’da yaptıkları araştırmada toplam 88 et örneğinin (sığır parça et, koyun parça et ve hindi eti) 37’sinde (% 42) *C. difficile* saptamışlardır. Araştırmacılar hayvan türlerinin etken prevalansında belirleyici bir

özelliik olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda sadece sığır eti kullanıldığından hayvan türlerinin prevalanstaki rolüne yönelik yorum yapılamamaktadır.

Weese ve ark. (2009) Kanada’da yaptıkları çalışmada perakende olarak satışı sunulan parçalanmış sığır etlerinde etken prevalansını % 12 (14/115) olarak bildirmişlerdir. Kontaminasyon düzeyinin artışının tesis hijyeni ve muhafaza şartlarıyla ilgili olduğu düşünülebilir.

Rodriguez ve ark. (2013) Belçika’da yaptıkları çalışmada lokal bir mezbahadan elde edilen 101 adet sığır karkas örneği incelenmiş 8/101 (% 7.9) oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Pozitiflik oranının çalışmamızdan farklı olarak yüksek çıkması kesimin yapıldığı işletme hijyeni, personel bilinci ve kesim şartlarından kaynaklanabileceği düşündürmüştür.

Sepulvida Diaz ve ark. (2013) Minnesota’da yaptıkları çalışmada perakende marketten ve kasaplardan topladıkları 342 adet çiğ et örneğinde (Sığır, domuz, kanatlı) *C. difficile* prevalansını % 8.5 olarak saptamışlardır.

Varshney ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Pensilvanya’da perakende olarak satışı sunulan 72 sığır eti örneğinde *C. difficile* prevalansını % 6.9 olarak bildirmişlerdir.

Konuyla ilgili yapılan literatür taramaları sonucu bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda *C. difficile* prevalansının çalışma bulgularımıza göre daha düşük oranda olduğu görülmektedir. Boer ve ark. (2011) da yerel marketlerde satılan parçalanmış sığır eti örneklerini incelemişler ve çalışma sonucunda örneklerin hiçbirinden etken tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Harvey ve ark. (2011b) Teksas’ta perakende satılan etlerde ve et işletmelerinde *C. difficile*’nin kontaminasyonunu belirlemeye yönelik yaptıkları araştırmada sığır etlerinde etken tespit edilememiştir. Mevcut durum bölgesel kaynaklı olabileceği gibi işletme hijyeni kaynaklı da olabileceği ifade etmişlerdir.

Curry ve ark. (2012) Pensilvanya’da *C. difficile*’nin pişmemiş sığır parça et ürünlerindeki prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada sığır parça etlerinde etken tespit edememişlerdir.

Çalışmamızda klasik kültür tekniğiyle *C. difficile* olarak tanımlanan izolatları doğrulamak ve toksijenik gen yapısını ortaya koymak amacıyla *tp1*, *tdA* ve *tdB* genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla yapılan analizler sonucunda MAP sığırcı kıyma ve sığırcı kuşbaşı örneklerinden tespit edilen *C. difficile* ile kontamine 3 örnekten toplamda 5 pozitif izolat tespit edildi. Pozitif izolatlardan ise toplamda 3 tanesinin toksijenik yapıda olduğu görüldü (% 60). MAP sığırcı kıyma örneklerine ait 4 pozitif izolattan 3'ünde (% 75) toksijenik karakterde yapı gösterdiği ve bunlardan da 1 tanesinin (% 25) *tcdA*, 2 tanesinin (% 50) *tcdB* gen bölgesini içerdiği belirlendi. MAP sığırcı kuşbaşı örneklerine ait 1 pozitif izolatta ise toksijenik yapı tespit edilmedi.

Rodriguez-Palacios ve ark. (2007) Kanada'da perakende satılan et ürünlerinden tespit ettikleri 12 pozitif izolattan 11 tanesinin toksijenik karakterde olduğunu bildirmişlerdir (% 91.6). Aynı araştırmacıların 2009 yılındaki çalışmasında ise 10/13 (% 76.9) oranında pozitif izolatlarda toksijenik yapı tespit edilmiştir.

Jöbstl ve ark. (2008) domuz-sığırcı eti karışımından elde ettikleri 2 pozitif izolattan birinde toksijenik yapı tespit etmişler (% 50), bunlarda kasaplardan alınan numuneye ait izolatta *tcdA* ve *tcdB* geninin her ikisinde rastlamazken, süpermarketlerden alınan MAP paketli örneğe ait pozitif izolatta her iki gen sekansında bulunduğunu bildirmişlerdir.

Von Abercron ve ark. (2009) İsveç'te yaptıkları çalışmalarında perakende olarak satılan sığırcı kıyma örneklerinden 2 pozitif izolat tespit etmiş ve bu izolatların toksijenik karakter taşımakla beraber (% 100) *tcdA* ve *tcdB* genlerinin her ikisini de taşıdığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda et örneklerinden tespit edilen *C. difficile* pozitif izolatların antibiyotik dirençlilik durumları disk difüzyon yöntemiyle incelendi. Çalışma sonucunda klindamisine karşı direnç gelişirken (% 20), vankomisin ve metronidazole karşı % 100 oranında duyarlılık tespit edildi.

Metronidazol'e karşı direnç ilki 1994 yılında yapılan iki farklı çalışmada % 6 ile % 9 oranında bildirilirken İsrail'de yapılan bir çalışmada ise % 2 oranında direnç

bildirilmiştir. Ancak çalışmamızda farklı olarak metronidazole karşı direnç saptanmamıştır (Bisharaa ve ark., 2006).

Klindamisine karşı direnç Almanya’da 2003 yılında % 36 iken, 2007 yılında % 65; İsveç’te 2006 yılında % 43.7 iken 2009 yılında % 65, Kanada’da 2006 yılında % 14.7 iken 2008 yılında % 90.9 bulunmuştur (Huang ve ark., 2009; Bourgault ve ark., 2006). Yine 2007 yılında Çin’de yapılan bir çalışmada klindamisin’e karşı % 71.4 oranında direnç saptanmıştır (Huang ve ark., 2009). Belirtilen verilere göre klindamisine karşı gelişen dirençte artış söz konusudur, çalışmamızda benzer olarak klindamisine karşı direnç gelişimi saptanmıştır. 2007 yılında Çin’de yapılan bir çalışmada klindamisin’e karşı % 71.4 oranında direnç saptanmıştır çalışmamızda benzer şekilde klindamisine karşı direnç tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2009).

Çalışmamızla benzer şekilde et örnekleriyle yapılan çalışmalardan Bouttier ve ark. (2010) çiğ sığır etlerinde tespit edilen etkenin vankomisin, metronidazole karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Ancak çalışmamızda ek olarak klindamisine karşı % 20 oranında direnç gelişmiştir.

Harvey ve ark. (2011b) çalışmamıza benzer olarak Teksas’ta yaptıkları çalışmada et ürünlerinden izole edilen pozitif izolatlarda klindamisine karşı direnç tespit ederken, metronidazol ve vankomisine karşı % 100 duyarlılık saptamışlardır.

Rodriguez ve ark. (2014) Belçika’ da yaptıkları çalışmada sığır ve domuz etlerinden tespit edilen pozitif izolatların % 50’sinde antibiyotik duyarlılığı tespit etmişler çalışma sonucunda klindamisine karşı orta şiddetli bir direnç tespit edilirken, tüm izolatların metranidazol ve vankomisine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Rahimi ve ark. (2014) farklı türlere ait et örneklerinden tespit edilen *C. difficile* izolatları üzerinde yaptıkları antibiyotik duyarlılık testinde etkenin klindamisine karşı direncinin yüksek olduğunu ve tüm izolatların, metronidazol, vankomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Kauassi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada pişmiş etlerden tespit edilen pozitif örneklerin bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları incelenmiş çalışma sonucunda

metronidazol ve vankomisine karşı % 100 oranında bir direnç gelişirken, klindamisine karşı % 12.25 oranında bir dirençlilik durumu saptanmıştır.

Varshney ve ark. (2014) Pensilvanya’da *C. difficile*’nin insan dışkı örneklerinde ve perakende olarak satışı sunulan etlerde antibiyotik dirençlilik profilini incelemişler, et örneklerinden tespit edilen izolatların klindamisin, vankomisin ve metronidazole karşı insan izolatlarından daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızla benzer şekilde antibiyotik duyarlılığının incelendiği ancak numunelerin hayvansal kaynaklı fekal örneklerden oluştuğu çalışmalardan Pelaez ve ark. (2002)’nin İspanya’ da yaptıkları bir çalışmada domuzlara ait pozitif izolatların metronidazole ve vankomisine karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir, araştırmacıların verilerine ilaveten bizim çalışmamızda klindamisine karşı direnç tespit edilmiştir (% 20). Yine aynı şekilde Jöbstl ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada klindamisin’e karşı direnç saptamışlardır. Klindamisine karşı gittikçe artan bu dirençlilik düzeyinin doğru ve bilinçli düzeyde antibiyotik kullanılmamasına bağlı gelişmiş olması ana nedenler arasında düşünülebilir.

Jhung ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada insan ve hayvan izolatlarından tespit ettikleri toksinotip V’lerin klindamisine karşı insan izolatlarında % 88 oranında, domuz izolatlarında % 100 oranında orta düzey direnç gelişirken buzağı izolatlarında % 88 oranında duyarlılık bildirmişlerdir.

Thean ve ark. (2011) Avustralya’da yaptıkları çalışmada atlara ait fekal örneklerde tespit ettikleri pozitif tüm izolatlarda yaptıkları antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda etkenin metranidazol ve vankomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Zidaric ve ark. (2012) buzağı çiftiklerinde yaptıkları çalışmada fekal örneklerde belirledikleri pozitif izolatların antibiyotik testleri sonucu etkenin metronidazole duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Doosti ve Farsani (2014) İran’da buzağuların dışkılarından tespit edilen pozitif izolatların klindamisine karşı % 100 direnç, vankomisine karşı % 20 duyarlılık geliştirdiğini saptamışlardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Samsun ilinde bulunan kasap ve marketlerden rastgele toplanan sığır orjinli modifiye atmosfer paketli 50 kuşbaşı ve 50 kıyma örneği analiz edilmiştir. 50 sığır kıyma örneğinin 2'sinde (% 4), 50 sığır kuşbaşı örneğinin 1'inde (% 2), *C. difficile* etkeni saptanmıştır. Multipleks PCR ile yapılan moleküler değerlendirmede ise, konvansiyonel yöntemle belirlenen toplam 5 izolat PCR ile *tpi* geni üzerinden *C. difficile* olarak doğrulanmıştır. *C. difficile* izolatlarının toksijenik özellikleri değerlendirildiğinde 5 izolatın 3 tanesi toksijenik karakterde olup 2'sinde *C. difficile* tip B (*tdcB*), 1'inde ise *C. difficile* tip A (*tdcA*) toksin geni tespit edilmiştir. Fenotipik antibiyotik direnç profilinin analizinde klindamisine karşı yalnızca *C. difficile* tip A (*tdcA*) toksin genini içeren izolat dirençli bulunurken, tüm izolatlar metronidazol ve klindamisine karşı duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda etkenin özellikle kıyma örneklerindeki prevalansının kuşbaşı örneklerine kıyasla iki katı bir oranda daha yüksek bulunuşu, kıymanın mekanik olarak daha küçük parçalara ayrılmasına bağlı etkenin bulanabileceği yüzeyin artması olarak düşünülebilir. Ayrıca ürünlerin yapım aşamasında kuşbaşı etlerinin karkas parçalama işleminden sonra küçük parçalara ayrılarak sadece kesim işlemine tabi tutulması bunun yanında kıyma etlerinin karkas parçalama ve bıçakla belli büyüklükte parçalara kesim işleminden sonra ayrıca kıyma makinesinden geçirerek ekstra bir işleme tabi tutulması dolayısıyla proses uzadığından hijyen kaynaklı bulaşmanın artması söz konusu olabilmektedir. Ayrıca yine kıyma makinesinin detaylı temizliğinin yeterli yapılmaması yada çapraz kontaminasyon riskleri bulaşmayı arttırmada etkili faktörler olabilmektedir. Ürünlerin paketlenmesi sırasında ürünlere kullanılan ambalaj materyellerinin muhafaza şartları (tabakların iç yüzeyleri açıkta olmamalı, kan emici ped kullanılıyorsa kapalı bir kapta muhafaza edilmeli) ve hijyeni de bulaşmada önem taşır. *C. difficile* etkeni CO₂ bulunan ortamda daha fazla üreme gösterdiğinden MAP teknolojisinde paket içerisindeki gaz oranının ayarlanmasının diğer önemli bir nokta olduğu düşünülebilir. Bunu önlemek adına belirli periyotlarda gaz ölçümleri yapılarak makinenin paketlerde doğru gaz karışım oranını ayarlayıp ayarlamadığı kontrol altında tutulabilir. Yine kıyma makinesinde olduğu gibi MAP makinesinde hijyeni bulaşmada etkili faktörler olduğundan belirli periyotlarla temizlik-dezenfeksiyonu yapılmalıdır.

Bunlardan yola çıkılarak üretim hattı boyunca gerekli hijyen ve dezenfeksiyonun sağlanması, çapraz kontaminasyonların önüne geçilmesi, ilgili personellere konu hakkında eğitimler düzenlenerek bilinçlendirilmeli ve böylelikle personel kaynaklı bulaşmaların önüne geçilmelidir.

Bunlara ek olarak çalışmamızda elde ettiğimiz *C. difficile* izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği görülmüştür. Buna bağlı olarak antibiyotik dirençliliklerin önüne geçilmesi adına veteriner hekimlerin antibiyotik kullanımı konusunda bilinçlendirilmesi, halk sağlığının korunması amacıyla gıda üretiminde hayvanlarda profilaktik ve büyütme faktörü olarak antibiyotik kullanımına ilişkin AB direktifleri ile uyumlu mevcut düzenlemelere bağlı kalınması ve resmi otorite tarafından ulusal kalıntı izleme programının etkin olarak yürütülmesi, gıda güvenliğinin sağlanması ve işletmelerde HACCP koşullarının gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada tespit edilen veriler bölgesel veriler içermekle beraber *C. difficile*'nin gıdalarda bulunurluğuna ve gıdalardan elde edilen pozitif izolatlarda antibiyotik dirençliliğin saptanmasına yönelik çalışmaların son yıllarda yeni hız kazanmaya başlaması nedeniyle bir veri niteliği taşımaktadır. Ülkemizde konuyla ilgili çalışma bulunmamasıyla beraber bundan sonraki çalışmalar etkenin diğer hayvansal türlerde prevalansını ve farklı antibiyotiklere karşı da direncini belirlemeye yönelik olacağı gibi gıdalarda *C. difficile* kaynaklarının belirlenmesi için daha hızlı tekniklerin geliştirilmesi ve bu araştırmaların epidemiyolojik açıdan da ele alınması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akan E. *Clostridium difficile*. Tıbbi Mikrobiyoloji. İzmir, Saray Medikal Yayıncılık. 1993; 286-289.
- Alfa MJ, Swan B, Van Deckerhove B, Pang P, Harding GK. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: comparison of Triage *C. difficile* panel, EIA for Tox A/B and cytotoxin assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43: 257-263.
- Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol*. 1996; 45: 133-137.
- Alam MJ, Anu A, Walk ST, Garey KW. Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs. *Clin Mic*. 2014; 27: 31-33.
- Anand A, Glatt AE. *C. difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: A review. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(1): 109-113.
- Anonim 2006. TGK-Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği. Tebliğ no 2006/31. Resmi Gazete 07.07.2006/26221, Tarım ve Köyisleri Bakanlığı, Ankara, 2006.
- Anonim 2014a. USDA-Livestock and Poultry World Markets and Trade Nisan 2014.
- Anonim 2014b. TEPGE- Kırmızı Et Durum ve Tahmin, 2014.
- Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8(1): 17-26.
- Ardıç N. *Clostridium difficile* infeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. *Klimik Dergisi*. 2004; 17(3): 142-145.
- Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J Med Microbiol*. 2005; 54: 163-166.
- Avbersek J, Janezic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, Vengust M, Zemljic M, Pirs T, Ocepek M. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*. 2009; 15(6): 252-255.
- Aygün G, Yılmaz M, Yaşar H, Aslan M, Polat E, Midilli K, Öztürk R, Altaş K. Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? *J Hosp Infect*. 2005; 60(3): 283-285.

- Baker AA, Davis E, Rehberger T, Rosener D. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the midwest. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 2961-2967.
- Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. 2009; 15(5): 817-818.
- Barbut F, Mastrantonio P, Delmee 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): 1048-1057.
- Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clinic Microbiol Infect.* 2001; 7: 405-410.
- Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of *Clostridium* in Hamsters. *J Infect Dis.* 1977; 136 (5): 701-705.
- Bartlett JG. Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrheas. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 8: 1054-1061.
- Barlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Eng J Med.* 2002; 346: 334-339.
- Barlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *CDI.* 2008; 46(1): 12-18.
- Barrasso LA, Wang SZ, Phelps CJ, Jhonson JL, Wilkins TD. Nucleotide sequence of *C. difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. *B Med Microbiol Immunol Berl.* 1990; 179: 271-279.
- Bauer MP, Notermans DW, Van Benthem BH. ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. 2011; 377(9759): 63-73.
- Bennik MHJ, Smid EJ, Rommbouts FM, Gorris LG. Growth of Psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. *Food Microbiology.* 1995; 12: 509- 519.
- Beşirbellioğlu B, Görenek L, Dizer U, Hacıbektaşoğlu A. GATA Eğitim Hastanesi'nde Nozokomiyal *Clostridium difficile* Kolonizasyonu Sıklığı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 1997; 1: 158-162.
- Bilgehan H. Gram pozitif sporlu anaerob basiller. Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 8. Baskı, İzmir, Fakülteler Kitabevi. 2000: 364-399.
- Bilgehan H. Gram Pozitif Sporlu Basiller. Klinik Mikrobiyoloji. 8. baskı, İzmir, Fakülteler Kitabevi. 1994; 282-311.

- Bisharaa J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samrac Z. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54: 141–144.
- Blasko N, Bilkei G. *Clostridium difficile* and post-weaning piglet losses in outdoor production. *The Pig Journal*. 2005; 56: 66-70.
- Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 144: 561–564.
- Bojesen AM, Olsen KEP, Bertelsen MF. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol*. 2006; 116: 329- 335.
- Borriello SP, Honour P, Turner T, Barclay F. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* Infection. *J Clin Pathol*. 1983; 36: 84-87.
- Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J. Antimicrob Chemother*. 1998; 4: 113-119.
- Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, CDAD-CSI Study Group. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 3473–3475.
- Bouttier S, Barc M, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:733.
- Brody AL. Controlled/Modified Atmosphere/Vacuum Packaging of Meat, kontrollered/Modified Atmosphere/Vacuum Packaging of Foods. Trumbull, CT, USA, Food and Nutrition Press. 1989; 17-38.
- Buncic S. Foodborne pathogens on cattle hides and their control in the context of beef safety. An international conference organised by ProSafeBeef, Dublin. *Advancing Beef Safety through Research and Innovation*, 2009; 42-43.
- Burns DA. Analysis of the spore germination mechanisms of *Clostridium difficile*. Thesis submitted to the University of Nottingham for the degree of Doctor of Philosophy. Nottingham. 2010.
- Büyükbaba Ö, Özkan E, Büget E. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishallerli çocukların gaitalarında *C.difficile*'nin araştırılması. *Klimik Derg* 1994; 7(2): 105-7 .
- Caulon M, Louis P. Modified atmosphere packaging of precooked foods 'in controlled/modified atmosphere/ vacuum packaging of foods. USA, Food nutrition press. 1989; 179.

- Cheng VC, Yam WC, Lam OT, Tsang JL, Tse EY, Siu GK, Chan JF, Tse H, To KK, Tai JW, Ho PL, Yuen KY. *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(11): 1371-1381.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Eighth Edition, M11A8E W. Hecht, et al 2012: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Coventry MJ, Hickery MW, Mawson R, Drew P, Wan J, Krause D, Boghossian V. The comparative effects of nitrogen and oxygen on the microflora of beef steaks in carbon dioxide-containing modified atmosphere vacuum skin-packaging (MA-VSP) systems. *Letters in Applied Microbiology*. 1998; 26: 427-431.
- Crobach MJT, 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: 1053–1066.
- Curry SR, Marsh JW, Schlackman JL, Harrison LH. Prevalence of *Clostridium difficile* in Uncooked Ground Meat Products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Applied and environmental microbiology*. 2012; 78(12): 4183.
- Davies AR. Advances in Modified-Atmosphere Packaging. *New Methods of Food Preservation*. Gaithersburg, Aspen Publishers, Inc. 1999; 304-320.
- Deneve C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33: 2.
- Di Persio JR, Varga FS, Conwell DL, Kraft JA, Kozak KJ, Willis DH. Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C.difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(12): 2724-2730.
- Donald EF. *Clostridium difficile* infection. *Emerging Pathogens: Implications for the Future*. 2000.
- Doosti A, Farsani AM. Study of the frequency of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB* genes in feces of Calves in south west of Iran. Doosti and Mokhtari-Farsani *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014; 13: 21.
- Drummond LJ, Smith DGE, Poxton IR. Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. 2003; 52: 1033-1058.
- Erdemoğlu A, Ardiç N, Sareyyüpoğlu B, Özyurt M, Haznedaroğlu T. Carriage of *Clostridium difficile* in dogs and cats. *Indian Vet J*. 2005; 82(9): 929-932.

- Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Med Mal Infect.* 2009; 39(6): 382-387.
- Esfandiari Z, Jalali M, Ezzatpanah H, Weese JS, Chamani M. Prevalence and Characterization of *Clostridium difficile* in Beef and Mutton Meats of Isfahan Region, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2014; 7(8): 16771.
- Farber JM. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: A review. *Journal of Food Protection.* 1991; 54(1): 58–70.
- Fawley WN, Parnell P, Verity P, Freeman J, Wilcox MH. Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom Epidemic Strain (PCR Ribotype 1). *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(6): 2685–96.
- Federko DP, Williams EC. Use of CCFA (cefoxitin-cycloserine fructose agar) and L-Proline-Aminopeptidase (PRO-Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35(5): 1258-1259.
- Fedorko DP, Engler HD, O’Shaughnessy EM, Williams EC, Reichelderfer CJ, Smith WI. Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* Toxin A in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3044-3047.
- Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Am J Gastroenterol.* 1997; 92: 739-750.
- Flemming H, Danish MK. *Clostridium difficile* ‘A Potentially Foodborne Zoonose? Significance In Humans, Animals And Food.’ Statens Serum Institut *Clostridium Difficile*, Olsen, 2009.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver W, Fawley N, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(3): 529-549.
- Fry DE. *Clostridium difficile* infection. *Emerging Pathogens: Implications for the Future.* Montreal, Pharma Libri Publishers. 2000; 51-75.
- Garcia C, Samalvides F, Vidal M, Gotuzzo E, Dupont HL. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a peruvian tertiary care hospital. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(5): 802–805.
- Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J. *C. difficile* associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16(8): 459-477.

- Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kijper EJ. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. CID. 2008; 47.
- Gökalp Y, Yetim H. Et İşletmelerinde temizlik ve dezenfeksiyonun önemi ve ete bağlı gıda zehirlenmeleri. Et ve Balık Endüstrisi Dergisi. 1988; 9(54): 34-44.
- Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, Hutchinson Ji Moore D, Kelly S, Bayd D, Mulvey M and 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): 568-576.
- Gün H, Aksu H, Bostan K. Et ürünlerinin modifiye atmosferde paketlenmesi. Et ve Et Ürünleri Sempozyumu. Bildiri Kitabı, İstanbul. 1996; 185-190.
- Gündem NS. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile*'nin araştırılması. Uzmanlık tezi. Selçuk Üniversitesi. Konya, 2010.
- Gürler N. Anaerob bakteriler. Tıbbi Mikrobiyoloji. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2005; 98-125.
- Gürsoy S, Güven K, Arıkan T, Yurci A, Torun E, Baskol M, Özbakir O, Yücesoy M. *Clostridium difficile* infection frequency in patients with nosocomial infections or using antibiotics. Hepatogastroenterology. 2007; 54(78): 1720-1724.
- Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants. Am J Dis Child. 1935; 49: 390-402.
- Han J. Innovations in Food Packaging. Elsevier, London, Academic Press. 2005.
- Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Hume ME, Scanlan CM, Callaway TR, Anderson RC, Nisbet DJ. *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat. Foodborne Pathog. Dis. 2011a; 8: 1321-1323.
- Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Norby B, Hume ME, Scanlan CM, Hardin MD, Scott HM. *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011b; 23(4): 807-811.
- Hotchkiss JH. Modified atmosphere packaging of poultry and related products. 'in controlled/modified atmosphere/ vacuum packaging of foods. Food nutrition press, USA, 1989; 179.
- Houser BA, Soehnen MK, Wolfgang DR, Lyszczek HR, Burns CM, Jayarao BM. Prevalence of *Clostridium difficile* toxin genes in the feces of veal calves and incidence of ground veal contamination. Foodborne Path. Dis. 2012; 9: 32-36.

- Huanga H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34: 516–522.
- İnal T. Kesim hayvanlarının etlerinin üretilmesi, muhafazası, nakli ve pazarlanmasında hijyenin önemi ve artırılması.. İ.Ü. Vet. Fak. Derg. 1976; 2(1): 121-129.
- Jalali M, Khorvash F, Warriner K, Weese JS. *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. BMC Res Notes. 2012; 21(5): 159.
- Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, Johnson S, Gerding DN, McDonald LC, Limbago BM. Toxinotype V *Clostridium difficile* in Humans and Food Animals. Emerging Infectious Diseases. 2008; 14: 7.
- Johnson S, Clabots CR, Linn FV, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. Lancet. 1990; 336(8707):97-100.
- Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect. 2009; 58(6): 403-410.
- Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int Journal of Food Mic. 2008; 138(1): 172-175.
- Katz DA, Lynch ME, Littenberg B. Clinical prediction rules to optimize cytotoxin testing for *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. Am J Med 1996; 100: 487-495.
- Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B. Detection of *Clostridium difficile* in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. Transplantation Proceedings 2007; 39: 2812–5.
- Kennedy C, Buckley DJ, Kerry JP. Influence of Different Gas Compositions on The Short-term Storage Stability of Mother-Packaged Retail Ready Lamb Packs. Meat Science. 2005; 69(1): 27-33.
- Kouassi KA, Dadie AT, N'Guessan KF, Dje KM, Loukou YG. *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in cooked beef sold in Cote d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility. Anaerobe. 2014; 28: 90-94.
- Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 1963-1964.
- Kıyan M. Anaerop, sporlu, Gram pozitif basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi. 1999; 624-49.

- Kıyan M. *Clostridium* Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2002; 1735-47.
- Kıyan M. Anaerob, sporlu, gram pozitif basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi. 2005.
- 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): 521-527.
- Knoop FC, Owens M, Crocker IC. *C. difficile*: Clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(3): 251-265.
- Koene MGJ, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MPM, Meetsma AM, PutirulanFF, Van Bergen MAP, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 778-784.
- 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): 1-2.
- Kuijper EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. Lancet. 2008; 371(9623): 1486-1488.
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *C. difficile* diarrhoea. Lancet. 2001; 357: 189-193.
- Lale Z, Doğruman Al F, Fidan I, Adıyaman G, Yeşilyurt E, Özkan SS, Çağlar K. İshalli Hastaların Dışkı Örneklerinde *Clostridium Difficile* Toksin A/B Sıklığının Araştırılması. ANKEM Derg. 2013; 27(2): 55-59.
- Larson HE, Price AB. Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. Lancet 1977; 31(1): 2-4.
- Lefebvre S, Waltner-Toews D, Peregrine A. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. J Hosp Infect. 2006; 62: 458-466.
- Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. Anaerobe. 2003; 9: 113-116.
- Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, Pons JL. Multiplex PCR Targeting *tpi* (Triose Phosphate Isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of *Clostridium difficile*. Journal of clin. Mic. 2004; 5710-5714.

- Libby JM, Wilkens TD. Production of antitoxins to two toxins of *Clostridium difficile* and immunological comparison of the toxins by cross-neutralization studies. *Infect Immun*. 1981; 35(1): 374-376.
- Liensenfeld O, Saeger F, Hahn H. Detection of *Clostridium difficile* toxin by enzyme immunoassay, tissue culture test and culture. *Infectio*. 1994; 22: 33-36.
- Lipson SM, Tortora G, Tempone A, Fedorko DP, Spitzer ED. Rapid detection of *Clostridium difficile* in stool using the VIDASR *C.difficile* Toxin A II assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003; 45: 117–21.
- Loo VG, Baurgault AM, Poirier L, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beadoin A, Frost HE, Gilca R, Brassard P, Dendukiri N, Beliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A. Host and pathogen factors for *C difficile* infection and colonization. *N Engl J Med*. 2011; 365: 1693-1703.
- Lyerly DM, Howard CK, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: it's disease and toxins. *Clin Microbiol Rev*. 1988; 1: 1-18.
- Madewell BR, Bea JK, Kraegel SA, Winthrop M, Tang YJ, Jr SJ. *Clostridium difficile*: A survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*. 1999; 11: 50–54.
- Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Barlett JG. *Clostridium difficile* colitis: An efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med*. 1995; 123: 835-840.
- Martirosian G, Popielskac J, Marczynskac M. Occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of HIV-infected children in Poland. *Anaerobe*. 2003; 9: 295–297.
- Mc Collum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012; 10(6): 581-592.
- Mc Donald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S & Gerding DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Eng J Med*. 2005; 353: 2433–2441.
- Mc Farland LV. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320(4): 204-210.
- Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*; 2011; 17: 85-86.
- Mikolajczyk FM, Martirosian G, Tang YJ, Silva J. Genotyping of *Clostridium difficile* isolates from a hospital in Warsaw: A Preliminary Study. *Int J Infect Dis*. 1997; 2: 88-90.

- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 5th ed, Philadelphia, Elsevier. 2005; 57: 889-910.
- Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. J Med Microbiol. 2007; 56: 921–929.
- Nasereddin LM, Bakri FG, Shehabi AA. *Clostridium difficile* infections among Jordanian adult hospitalized patients. Am J Infect Control. 2009; 37(10): 864-866.
- Nonhoff C, Struelens MJ, Serruys E, Evaluation of gas-liquid chromatography (GLC) for rapid detection of *Clostridium difficile* in fecal specimens. Acta Clin. 1995; 50: 76-80.
- Noren T, Johansson K, Unemo M. *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. Clin Mikrobiol infct. 2014; 20: 02-06.
- Norman KN, Harvey RB, Andrews K, Hume ME, Callaway TR, Anderson RC Nisbet DJ. Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. Food Additives & Contaminants: Part A. 2014; 31(6): 1127-1129.
- O'Donoghue C, Kyne L. Update on *Clostridium difficile* infection. Curr Opin Gastroenterol 2011; 27(1): 38-47.
- Ondedonk AB, Allen SD. *Clostridium*. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 6. Ed, DC, Washington. 1995; 574-586.
- Öztürk R. Antibiyotikle ilişkili ishal: Tanı ve Tedavi. Ankem Derg. 2004; 18(2): 82-86.
- Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 1647-1650.
- Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. CMAJ. 2005; 173(9).
- Phillips CA. Review: Modified Atmosphere Packaging and Its Effects on the Microbiological Quality and Safety of Produce. Int J Food Sci Tech. 1996; 31:463-479.
- Pirs T, Ocepek M, Rupnik M. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. Journal of Medical Microbiology. 2008; 57: 790–792.

- Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*. 1988; 56(9): 2299-2306.
- Poxton IR, Brown R, Fraser AG. Enteropathogenic *Clostridia* and *Clostridium botulinum*. *Practical Medical Microbiology*. New York, Churchill-Livingstone. 1996; 5: 537-547.
- Poxton IR, McCoubrey JM, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7: 421-427.
- Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhea. *Gut*. 2004; 53: 58-61.
- Rahimi E, Jalali M, Weese JS. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BioMed Central Public Health*. 2014a; 14:119.
- Rahimi E, Momtaz H, Hemati M. Occurrence of *Clostridium difficile* in Raw Bovine, Ovine, Caprine, Camel and Buffalo Milk in Iran. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*. 2014b; 20(3):371-374.
- Rexach CE, Tang-Feldman YJ, Cantrell MC, Cohen SH. Epidemiologic surveillance of *Clostridium difficile* diarrhea in a freestanding pediatric hospital and a pediatric hospital at a university medical center B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006; 56: 109–14.
- Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, Brazier JS, Weese JS. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(11): 1730-1736.
- Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(3): 485-487.
- Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thompson AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(5): 802-805.
- Rodriguez-Palacios A, LeJeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011; 77: 3085-3091.
- Rodriguez C, Avesani V, Van Broeck J, Taminiaua B, Delmée M, Daube G. Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. *Inter Journal of Food Microbiology* . 2013; 166: 256–262.

- Rodriguez C, Taminau B, Avesani V, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiology*. 2014; 42: 166-171.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol* . 2009; 7: 526-536.
- Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Baier S, Harlizius J, Nienhoff H, Brase K, Zimmermann S, Seyboldt C. *Clostridium difficile* Genotypes in Piglet Populations in Germany. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(11): 3796.
- Sepulveda Diaz RV. Prevalence of *Clostridium difficile* in retail meats from Minnesota and comparison of growth and survival of human and animal isolates. The Faculty of University Minnesota. Minnesota. The master thesis. 201; 33-46.
- Shen A. *Clostridium difficile* toxins: mediators of inflammation. *J Innate Immun*. 2012; 4: 149-158.
- Silvapru BX, Bilkei G. *Clostridium difficile* infections in periparturient sows. *Indian Vet J*. 2005; 82: 243-245.
- Simango C, Mwakurudza S. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. *Int J Food Microbiol*. 2008; 124: 268-270.
- Sivertsvik, M., W.K. Jeksrud, and J.T. Rosnes. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002; 37: 107-127.
- Songer JG, Post KW, Larson DJ, Jost BH, Glock RD. Diagnostic Notes: Infection of neonatal swine with *C. difficile*. *J Swine Health Prod*. 2000; 8: 185-190.
- Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal health res rev*. 2004; 5(2): 321-326
- Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in Retail meat products, USA 2007. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(5): 819-821.
- Strelaw E, Wagner B, Wagner M, Karsch W. Demonstration of Capsules in *Clostridium difficile*. *261 Bakt Hyg*. 1989; A (270): 456-461.
- Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B & Popoff M. Production of an actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000; 186: 307-312.

- Sullivan NM, Pellet S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile*. Infect Immun. 1982; 35 (3): 1032-1040.
- Summanen P, Baron EJ, Citron DM. Laboratory Tests for Diagnosis of *Clostridium difficile* Enteric Disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manuel. 5. Ed, California, Star Publishing Company. 1995; 95-101.
- Susick EK, Putnam M, Bermudez DM, Thakur S. Longitudinal study comparing the dynamics of *Clostridium difficile* in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. Veterinary Microbiology. 2012; 157: 172–178.
- Taşova Y, İnal AS. Psödomembranöz Enterokolit. Önemli ve Sorunlu Anaerob Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2005; 169-97.
- Taylor NS, Thorne GM, Bartlett JG. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. Infect Immun. 1981; 34: 1036-1043.
- Thean S, Elliott B, Riley VR. *Clostridium difficile* in horses in Australia – a preliminary study. Journal of Medical Microbiology. 2011; 60: 1188–1192.
- Thielman NM. Antibiotic associated colitis. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed, Philadelphia, Churchill Livingstone. 2000; 1111-1121.
- Thielman NM, Wilson KH. Antibiotic-associated colitis. In Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed, Newyork, Churchill Livingstone. 2010.
- Thelestam M, Chaves-Olarte E. Cytotoxic effects of the *Clostridium difficile* toxins. Curr Top Microbiol Immunol. 2000; 250: 85–96
- Thitaram S, Frank J, Lyon S, Siragusa G, Bailey J, Lombard J, Haley C, Wagner B, Dargatz D, Fedorka-Cray P. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. J Food Prot. 2011; 74: 130-133.
- Tschudin-Sutter S, Widmer AF, Perl TM. *Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease. Curr Opin Infect Dis. 2012; 25(4): 405-411.
- Tunçcan ÖG, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe Bağlı İshal Gelişen Nötropenik Ve Nötropenik Olmayan Hastalarda *Clostridium difficile* Toksin Sıklığı Ve Risk Faktörlerinin Analizi. Mikrobiyol Bul. 2008; 42: 573-583.
- Ülger NT, İlki A, Akgul O, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde İzole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinin Antibiyotiklere Direnç Durumu. MÜSBED. 2011; 1(3): 162-165.
- Vaishnavi C. Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. Indian J Med Res. 2010; 131: 487-499.

- Varshney JB, Very KJ, Williams JL, Hegarty JP, Stewart DB, Lumadue J, Venkitanarayanan K, Jayarao BM. Characterization of *Clostridium difficile* Isolates from Human Fecal Samples and Retail Meat from Pennsylvania. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2014; 11(10): 822-829.
- Von Abercron SM, Karlsson F, Wigh GT, Wierup M, Krovacek K. Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *Journal of Food Protection*. 2009; 72: 1732-1734.
- Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(2): 247.
- Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. Detection and Enumeration of *Clostridium difficile* Spores in Retail Beef and Pork. *Applied and environmental microbiology*. 2009; 5009-5011.
- Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 2010; 50; 362–365.
- Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 1982; 15: 443-446.
- Wolfhagen MJ, Fluit ACHM, Torensma R. Detection of toxigenic *C. difficile* in fecal samples by magnetic immuno PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1994; 32 (7): 1629-1633.
- Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and E test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34: 1–6.
- Yaeger MJ, Kinyon JM, Songer JG. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Vet Diagn Invest*. 2007; 19: 52–59.
- Yasin SF, Young-Fadok TM, Zein NN, Pardi DS. *Clostridium difficile*-Associated diarrhea and colitis. *Mayo. Clin. Proc*. 2001; 76: 725-730.
- Yetim H. Erzurum piyasasında tüketime sunulan sığır kıymalarının bazı saprofit ve bir kısım patojen bakteriler yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni. Zir. Fak., Erzurum. 1985.
- Yılmaz M, Bilir YA, Aygün G, Erzin Y, Öztürk R, Çelik AF. Prospective observational study on antibiotic-associated bloody diarrhea: report of 21 cases with a long-term follow-up from Turkey. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 24(6): 688-694.

Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, Kocuvan A, Rupnik M. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe*. 2008; 14: 325.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma ATASOY

Doğum Yeri: Edirne

Doğum Tarihi: 04.01.1988

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Bayrampaşa Anadolu Lisesi	2002 - 2006
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Veteriner Fakültesi	2006 - 2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Migros T.A.Ş. - Kalite uzmanı	2011-2011
Yıldız Holding, Şok Marketler T.A.Ş.-Kalite Uzmanı	2011-2013
Real Hipermarketleri A.Ş.-Sorumlu Yönetici-Veteriner Hekim	2013-.....

E-posta: vet_yildiz@hotmail.com