

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAKARYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN ET VE ET
ÜRÜNLERİNDE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*
ARANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma Şeniz ERSÖZ

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR

Haziran 2014

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


SAKARYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN ET VE ET
ÜRÜNLERİNDE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*
ARANMASI


YÜKSEK LİSANS TEZİ


Şeyma Şeniz ERSÖZ

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 26 / 06 /2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Serap COŞANSU
AKDEMİR
Jüri Başkanı


Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR
Üye


Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI
Üye

TEŞEKKÜR

Tez çalışması seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde desteklerini eksik etmeyen ve çok şey öğrendiğim çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013-50-01-027). Bu nedenle maddi desteklerinden dolayı SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emekleri olan kıymetli annem Nurten ERSÖZ ve babam Edip ERSÖZ'e, yanımda olduklarını hissettiren akraba ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.3. Neden Olduğu Hastalıklar	5
2.4. Patojenite Mekanizması	10
2.5. Çiftlik ve Kümes Hayvanlarında Bulunma Sıklığı.....	14
2.6. Gıdalarda <i>C. difficile</i> Varlığı.....	17
2.7. Gıdalardan <i>C. difficile</i> 'in İzolasyonu ve Tanımlanması	25
BÖLÜM 3.	
MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması	27
3.2.2. <i>C. difficile</i> izolasyonu.....	28

3.2.3. Morfolojik, biyokimyasal ve serolojik doğrulama	30
3.2.3.1. Morfolojik doğrulama	30
3.2.3.2. L-prolin aminopeptidaz aktivitesi	31
3.2.3.3. API 20A ile identifikasyon	31
3.2.3.4. Serolojik doğrulama	33
3.2.4. Toksin tipinin belirlenmesi	34
3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi	34
BÖLÜM 4.	
BULGULAR	36
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları	36
4.1.1. Morfolojik doğrulama ve L-proline aminopeptidaz aktivitesi	37
4.1.2. L prolin aminopeptidaz testi	38
4.1.3. İzolatların API-20 A ile identifikasyon sonuçları	43
4.1.4. Serolojik doğrulama	46
4.2. Toksin Belirleme	47
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi	47
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA ve SONUÇ	49
KAYNAKLAR	56
EKLER	67
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

PMC	: Psödomembranöz kolit
µm	: Mikrometre
Mm	: Milimetre
UV	: Ultraviyole
CDMN	: Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CDE	: Clostridium Difficile Enfeksiyonu
CDBH	: Clostridium Difficile' e Bağlı Hastalıklar
TPS	: Tamponlanmış Peptonlu Su
TSB	: Triptik Soy Broth
REA	: Restriction- Endonuclease Analysis
PFGE	: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
E-test	: Epsilon test
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Yıllara göre CDE'ndan hayatını kaybedenlerin sayısı.....	5
Şekil 2.2. Antibiyotik kullanımı ve hastalığın oluşması	7
Şekil 2.3. <i>Clostridium difficile</i> 'in doğal bulaşma döngüsü.....	8
Şekil 2.4. Patojenik Lokus (PaLoc) ve genlerinin toksinliğe etkisi	10
Şekil 2.5. Bağırsaklarda <i>C. difficile</i> toksin aktivitesi	13
Şekil 3.1. <i>C. difficile</i> 'in izolasyon aşamaları.....	28
Şekil 3.2. Anaerobik jar, Anaerocult A ve Anaerotest	29
Şekil 3.3. API 20A identifikasyon testinin görünümü	32
Şekil 3.4. API 20A ile identifikasyonda profil belirleme şablonu.....	32
Şekil 3.5. Lateks aglütinasyon testi analiz akış şeması.....	33
Şekil 3.6. Toksin A/B testinin pozitif ve negatif görüntüsü	34
Şekil 3.7. E-test şeritlerinin petriye yerleştirilme şekilleri.....	35
Şekil 4.1. İzolat dağılım grafiği.....	37
Şekil 4.2. İzolatlardan birine ait mikroskop görüntüsü	37
Şekil 4.3. Kanlı agarda <i>C. difficile</i> gelişmesi	38
Şekil 4.4. L-prolin aminopeptidaz testi pozitif sonuç görüntüsü	38
Şekil 4.5. ED046 örneğine ait izolatın API 20A sonucu	45
Şekil 4.6. Pozitif lateks aglütinasyon testi görüntüsü	47
Şekil 4.7. ED046 örneğine ait E-test görüntüsü.....	48

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Farklı antibiyotiklerin <i>C. difficile</i> riski açısından karşılaştırılması	6
Tablo 2.2. Hayvanlarda yapılan araştırmalara göre <i>C. difficile</i> varlığı	16
Tablo 2.3. <i>C. difficile</i> 'in gıdalardan izolasyon oranı ve toksin tipleri	18
Tablo 3.1. rnek tipleri ve sayısı	27
Tablo 4.1. rnek tipleri ve izolat dağılımı	36
Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları	39
Tablo 4.3. API 20A identifikasyonu sonuçları	44
Tablo 4.4. API 20A ile belirlenen bakteri cinsleri ve yüzdeleri	46
Tablo 4.5. Antibiyotik duyarlılık ve MİK sonuçları	47

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Clostridium difficile*, Et, Kıyma, Köfte, Tavuk Eti

Sakarya ilinde satışa sunulan et ve et ürünlerinde *Clostridium difficile* varlığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada Nisan 2013-Şubat 2014 tarihleri arasında 57 farklı satış yerinden toplam 101 adet et ve et ürünü örneği (31 adet kıyma, 27 adet tavuk, 18 adet köfte, 12 adet et döner, 7 adet tavuk döner, 4 adet salam, 1 adet jambon ve 1 adet sosis) analize alınmıştır. Clostridium Difficile Moxalactam Norflaxin Broth besiyerinde yapılan ön zenginleştirme aşamasından sonra spor seleksiyonu amacıyla alkol şoku uygulanmış ve koloni izolasyonu için Clostridium Difficile Moxalactam Norflaxin Agar besiyerine ekim yapılmıştır. Tipik koloniler izole edilip Gram boyama, L-prolin aminopeptidaz aktivitesi, spor boyama, API 20A identifikasyon kiti ile tanımlanmıştır. *C. difficile* olarak tanımlanan izolatlar lateks aglütinasyon test kiti ile doğrulanmış ve daha sonra bu izolatların toksin tipi ve antibiyotik dirençlilikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Araştırmada 101 adet et ve et ürünü örneğinden toplam 124 izolat elde edilmiştir. Köfte ve pişmiş et döner örneklerinden elde edilen iki izolat *C. difficile* olarak tanımlanmış olup, analize alınan örneklerdeki *C. difficile* bulunma sıklığı %1,98 (2/101) olarak belirlenmiştir. *C. difficile* tanımlanmasında anahtar nitelikli test olarak kullanılan L-prolin aminopeptidaz aktivitesi ile sonuç veren 52 izolattan 45 adedi API 20A identifikasyon kiti ile *Clostridium beijerinckii/ butyricum* (14), *Bifidobacterium* spp. (6), *Actinomyces naeslundii* (6), *Clostridium* spp. (5), *Clostridium botulinum/sporogenes* (2), *Actinomyces israeli* (2), *Lactobacillus acidophilus/jensenii* (2), *Clostridium septicum* (2), *Gemella morbillorum* (1), *Clostridium tertium* (1) ve *Clostridium clostridioforme* (1) olarak tanımlanmıştır. Diğer 7 izolat ise tanımlanamamıştır.

C. difficile olarak tanımlanan her iki izolatın da toksijenik olmadığı saptanmıştır. Köfte örneğinden izole edilen MB025 numaralı izolatın vankomisine dirençli, buna karşın metranidazol, moksalaktam, tetrasiklin ve klindamisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan et döner örneğinden izole edilen ED046 numaralı izolatın metranidazole dirençli iken test edilen diğer dört antibiyotiğe duyarlı olduğu gözlenmiştir.

DETECTION OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN RAW MEAT AND MEAT PRODUCTS SOLD IN SAKARYA

SUMMARY

Key Words: *Clostridium difficile*, Chicken, Ground Meat, Meatballs

In this study that was performed to determine the *Clostridium difficile* incidence in meat and meat products sold in Sakarya province, totally 101 samples (31 ground meats, 27 chicken meats, 18 meat balls, 12 meat döner samples, 7 chicken döner samples, 4 salami samples, 1 bacon and 1 sausage) purchased from 57 different markets, butcher shops and restaurants between April 2013 and February 2014 were analyzed. After enrichment in Clostridium Difficile Moxolactam Noflaxin (CDMN) Broth, cultures were exposed to alcohol shock for spore selection and then spread plated on CDMN Agar. Typical colonies grown on CDMN Agar were picked and identified by Gram staining, L-proline aminopeptidase test, spore staining and API 20A identification test kit. The isolates identified as *C. difficile* were confirmed serologically by latex agglutination test kit. Additionally toxin types and antibiotic resistance of the confirmed isolates were investigated.

Totally 124 isolated were obtained from 101 samples. *C. difficile* incidence was determined as 1.98% (2/101) and the 2 isolates that identified *C. difficile* were belonged to a raw meat ball and cooked meat döner samples. The 45 isolates that gave positive results with L-proline aminopeptidase test, a key biochemical test for *C. difficile* identification, were identified as *Clostridium beijerinckii/butyricum* (14), *Bifidobacterium* spp. (6), *Actinomyces naeslundii* (6), *Clostridium* spp. (5), *Clostridium botulinum/sporogenes* (2), *Actinomyces israeli* (2), *Lactobacillus acidophilus/jensenii* (2), *Clostridium septicum* (2), *Gemella morbillorum* (1), *Clostridium tertium* (1) and *Clostridium clostridioforme* (1). The other 7 isolates could not have been identified.

The two *C. difficile* isolates were not toxigenic. The isolate numbered MB025 isolated from raw meat ball was resistant to vancomycine, while sensitive to metronidazole, moxolactam, tetracycline and clyndamicine. On the other hand the meat döner isolate numbered ED046 was resistant to metronidazole, while sensitive to other four antibiotics.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enerji miktarının fazla olması, vücut için gerekli aminoasitleri bünyesinde bulundurması, mineral madde ve vitaminler (özellikle B grubu vitaminler) açısından zengin olması ve lezzetli olmasından dolayı kırmızı et ve et ürünleri ve tavuk etleri insan beslenmesinde büyük öneme sahiptir. Özellikle son zamanlarda çalışan nüfusun artmasıyla birlikte tüketime hazır etlere eğilim hızlı bir şekilde artmıştır (Baysal, 2002; Kayışoğlu ve ark., 2003).

Beslenmede büyük öneme sahip hayvansal gıdalar ve ürünleri yapıları itibariyle bağırsak mikroflorasında patojen mikroorganizma bulundurmaya müsaittir. Ayrıca kesim esnasında hem bağırsak mikroflorasından hem de çevreden bulaşmaya uygun ortam sağlayarak etin tüketimine kadar risk oluşturmaya devam etmektedir. Taze etlerde yaygın olarak bulunan bakteriler *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Proteus*, *Leuconostoc* ve *Clostridium* türleridir. Tüketime hazır etlerde en fazla *Bacillus* ve *Clostridium* türleri görülmektedir (Aksan, 2010).

Clostridium türleri doğada geniş olarak yayılmışlardır. Özellikle toprakta, su kaynaklarında (deniz, nehir gibi), lağımında, çürümüş bitki örtülerinde, hayvansal ve bitkisel gıdalarda bulunabilirler. *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium difficile* gıdalarda bulunan patojen türleridir. *Clostridium nigrificans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium saccharolyticum* ve *Clostridium laramie* gıdaların bozulmasında rol oynayan *Clostridium* türleridir (Durai, 2007; Akın ve Akın, 2010; Gould ve Limbago, 2010).

C. difficile genellikle antibiyotik tedavisi sonrası görülen ishalden sorumlu bakteridir. Fakat çeşitli risk faktörlerine göre gelişen hastalıklar sonucu ölümler meydana gelebilmektedir. Özellikle hastanede tedavi gören 65 yaş üstü hastalarda ortaya

çıktığı belirtilmektedir (Freeman ve ark., 2010). Antibiyotik tedavisi dışında bakteri kontaminasyon yoluyla da bağırsak sisteminde bulunabilmektedir. Çevrede yaygın bulunan bakterinin olası bulaşma kaynakları toprak, su, hayvanlar ve gıdalardır (Gould ve Limbago, 2010; Hensgens ve ark., 2012).

Hayvanlarda ve gıdalarda *C. difficile* bulunma oranının bir hayli yüksek olması ve suşların toksijenik olduğunun belirlenmesi nedeniyle son yıllarda bu patojenin gıdalardaki varlığını ortaya koymaya yönelik çok sayıda çalışma yapıldığı gözlenmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2012).

Yapılan literatür incelemesi sonucunda Türkiye’de satışa sunulan et ve et ürünlerinde *C. difficile* varlığını belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, Sakarya ilinde satışa sunulan et ve et ürünlerinde *C. difficile* varlığının araştırılarak bu patojen bakterinin insanlara bulaşmasında gıdaların olası rolü konusunda mevcut literatür bilgisine katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Tarihçe

C. difficile ilk kez Hall ve O'Toole tarafından 1935 yılında bebeklerin dışkılarından izole edilmiştir (Kıyan, 1999). Aynı araştırmacılar o yıllarda bu bakterinin toksin ürettiğini ve toksinin de farelerde değerlendirilmesi sonucu letal dozunun yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Barlett, 2008). Araştırmaları yaparken, bakterinin izolasyonundaki ve kültüre alınmasında karşılaştıkları zorlukları belirtmek amacıyla da Latince zor anlamına gelen *Bacillus difficile* adını vermişlerdir (Fernandes, 2009). Daha sonra *Clostridium* türlerine ait olduğu belirlenerek ismi "*Clostridium difficile*" olarak anılmaya başlanmıştır. *C. difficile* üzerine yapılan diğer bir çalışmada toksinlerinin etkisinin yüksek olduğu açıklanmıştır (Smith ve King, 1962).

C. difficile enfeksiyonu (CDE) ve psödomembranöz kolit (PMC) ilişkisi ilk kez 1974 yılında bir hastanede klindamisin cinsi antibiyotik alan hastalarda belirlenmiş ve '*Clostridium difficile* dönemi' başlamıştır (Barlett, 2008; Fraser ve Swiencicki, 2013). İnsanlardaki etkisi açıklanmış olmasının yanında yine aynı yıllarda diğer memelilerdeki etkisi de ortaya çıkmaya başlamıştır (Keel ve Songer, 2006). 1980 yılında hem hayvan (domuz) hem de insan bağırsak hastalıklarında rastlanmış olması bu bakteriyi önemli kılmıştır (George ve ark., 1978).

Hayvanlarda ilk çalışma 1980'li yıllarda domuzlarda yapılmıştır (Borriello ve ark., 1983). Fakat bu çalışmada hayvanlar ile salgın hastalıklar arasında bir bağ kurulamamıştır. Hayvanlar CDE'na neden olduğu düşünülen bir kaynak olmasına rağmen moleküler çalışma eksikliği nedeniyle 2000 yılına kadar bu durum açıklanamamıştır. Yaklaşık 25 yıl sonra moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda hayvan ve insanlarda ortak suşların ortaya çıkması sonucu hayvanların da *C. difficile*

enfeksiyonun bulaşması açısından tehlikeli olabileceği belirtilmiştir (Arroyo ve ark., 2005; Rodriguez-Palacios ve ark., 2013).

2.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

C. difficile Gram pozitif, çubuk şekilli, hareketli, 0,5- 1,9 µm eninde, 3,0- 16,9 µm boyunda, sporları oval şekilde ve subterminal pozisyonundadır (Hatheway, 1990). Gram pozitif özelliği genç kültürlerde görülürken yaşlı kültürlerde bu özellik giderek azalmaktadır. Mikroskop altında uzun çubuk şeklinde görünür (Smith ve King, 1962). Kolonileri yuvarlak, beyazımsı, mat ve buzlu cam görünümündedir (Delmée, 2001). Virülans suşlarında kapsüllü yapı görülebilir (Brazier, 1993).

C. difficile jelatini sıvılaştırabilir, fakat et ve süt proteinlerine etki etmez. Fruktozu, glikozu, mannitolü, mannozu ve çoğunlukla ksilozu fermente eder ve lesitinaz üretmez. Pepton, maya ekstraktı ve glikoz içinde asetik, bütirik, izovalerik, valerik, izokaproik, formik ve laktik asit üretirler (Hatheway, 1990). Maltoz, gliserol, galaktoz, laktoz ve sükroza etki etmezler (Kıyan, 1999).

Örneklere uygulanan alkol şoku, selektif besiyerlerinde *C. difficile*'in gelişmesini yaklaşık %50 oranında arttırmaktadır (Boriello ve Honour, 1981). Ayrıca besiyeri bileşimine lizozim veya taurokolat gibi safra tuzları ilavesi besiyerinde spor oluşumunu kolaylaştırır (Wilcox ve Fawley, 2000).

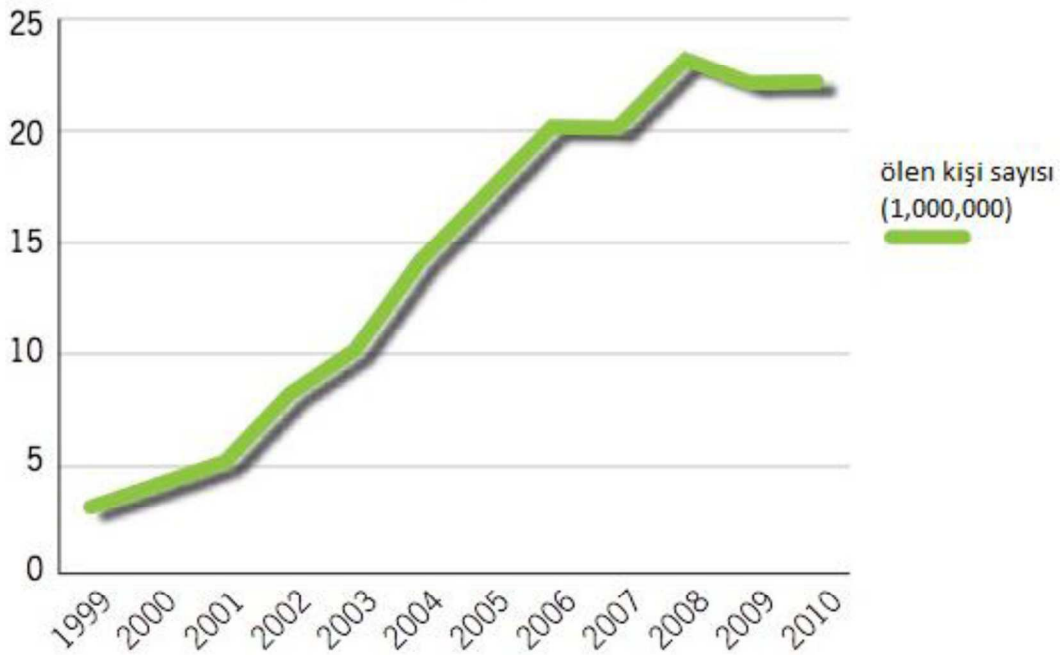
Bakterinin sporları şekilsiz yapıdadır (Kıyan, 1999). Bu yapının oluşmasına etken, sporların hücrelerden daha geniş olması ve bunun sonucu olarak bakteri hücrelerinin mekik, davul tokmağı ve raket şekillerini almasıdır. Sporların gelişmesi amacıyla kanlı agar veya sodyum tauroklat ilave edilmiş selektif besiyerleri kullanılır (Bilgehan, 1995).

C. difficile çevrede her yerde bulunmaktadır (Al Saif ve Brazier, 1996). Dolayısıyla insanlar da önemli bir kaynaktır (Delmée, 2001). *C. difficile*'in başlıca bulaşma kaynakları; su, toprak, yumrulu bitkiler (Al Saif ve Brazier, 1996), hayvanlar

(Songer, 1996) ve etlerdir (Weese, ve ark., 2009). Etlerde ve sebzelerde görülmesi sonucu gıdalar aracılığı ile hastalığa neden olabileceği bildirilmiştir (Rupnik, 2007).

2.3. Neden Olduğu Hastalıklar

C. difficile neredeyse tüm Dünya’da hastalığa yol açan önemli bir problemdir (Şekil 2.1.). Yol açtığı hastalıklar genel itibariyle *C. difficile*’e bağlı hastalıklar (CDBH), *C. difficile*’e bağlı ishal (CDBİ) veya *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) şeklinde isimlendirilmektedir (Oughton ve Miller, 2008). CDBH’lar ilk kez 1980’li yılların başında tanımlanmıştır. Hastane kaynaklı bağırsak hastalıklarının en önde gelen nedenlerinden biri olduğu belirlenmiştir. Zamanla toksik megakolon gibi ağır hastalıklara yol açtığı daha sonralarda anlaşılmıştır (McFarland, 2005).



Şekil 2.1. Yıllara göre CDE’ndan hayatını kaybedenlerin sayısı, CDC National Center for Health Statistics, 2012 (www.cdc.gov, Erişim Tarihi: 02.05.2014)

Amerika Birleşik Devletleri’nde Ulusal Nozokomiyal Hastalıkları Gözetleme Merkezi’nin yapmış olduğu araştırmalara göre 1999 yılında *C. difficile*’e bağlı ölüm oranları milyonda 5,7 iken, 2004 yılında bu oran yaklaşık 4 kat artarak 23,7 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak bu ölümlerin NAP1/027 suşundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Britanya’da yapılan diğer araştırmada 1999 yılından 2004 yılına kadar geçen süreçte ölüm oranlarında 2-3 kat artış olduğu bildirilmiştir (Oughton ve Miller,

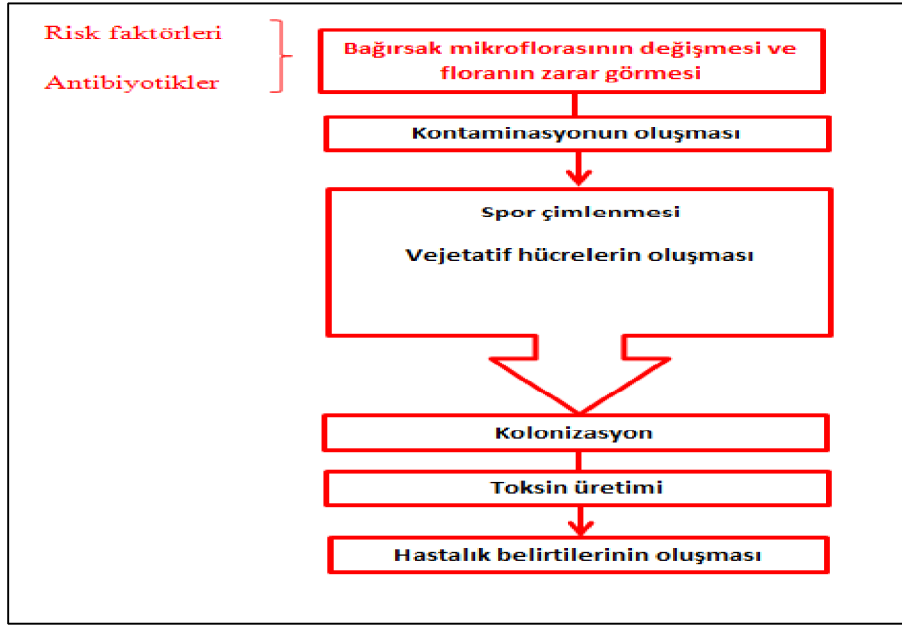
2008). Kanada’da 2002 yılına kadarki dönemde hastalığın şiddeti, tekrarlama ve ölüm oranlarında önemli derecede artışlar meydana gelmiştir (Best ve ark., 2010).

Hastalığa yakalanma oranı uzun süre hastanede kalanlarda ve antibiyotik kullananlarda yüksektir (Siegel ve ark., 1990). Bunun yanısıra diğer risk faktörleri yaş (özellikle 65 yaş ve üstü), hastalığın şiddeti, asit giderici ilaç tedavisi, müşil ilaçları, laksatifler, bağırsak ameliyatı geçirmiş olmak, enteral beslenme şeklinde sıralanmaktadır (Owens ve ark., 2008; Barbut ve ark., 2011; Fraser ve Swiencicki, 2013).

CDE’lerinin %90’dan fazlası antibiyotik tedavisinden sonraki haftalarda veya antibiyotik tedavisi sürecinde görülmektedir (Şekil 2.2.). Antibiyotikler bağırsak florasına zarar verip kolonda *C. difficile*’in gelişip hayatını sürdüreceği ortam oluşturmasına izin verirler. Eğer bağırsaklara giren suş toksijenik nitelikli bir suş ise toksin A ve toksin B salgılar. *C. difficile* toksinleri bağırsaklarda sıvı salgılanmasına yol açar, mukozaya zarar verir ve sonuçta ishal meydana gelir (Barbut ve Petit, 2001). *C. difficile* kolonizasyonu, genellikle hastanın geniş spektrumlu antibiyotik kullanmasından dolayı normal bağırsak mikroflorasının zarar görmesi sonucu oluşmaktadır. Özellikle sefalosporin, klindamisin, ampicilin ve amoksisilin içeren antibiyotikler kolonizasyon oluşumuna izin verirler (Johnson ve ark., 1999). CDBH ile klindamisin içeren antibiyotik kullanımı ile CDBH’ların oluşma mekanizması arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (Mylonakis ve ark., 2001) (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Farklı antibiyotiklerin *C. difficile* riski açısından karşılaştırılması (Monaghan ve ark., 2009).

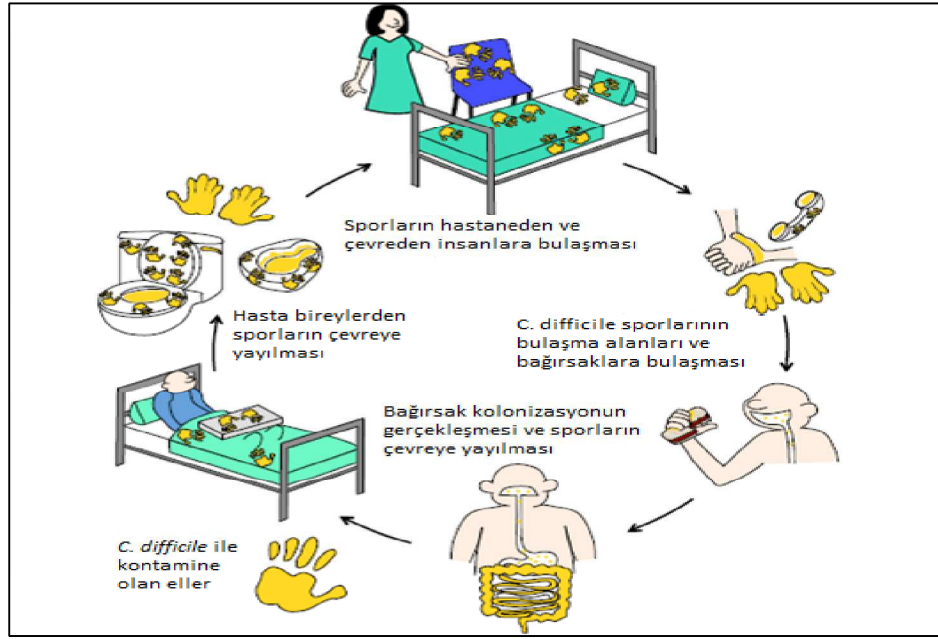
Düşük risk	Orta Risk	Yüksek Risk
Aminoglikozidler	Ko-amoksilav	2. ve 3. Kuşak sefalosporinler
Vankomisin	Makrolidler	Klindamisin
Trimetoprim	Amoksisilin/ampicilin	Fluorokinolonlar
Tetrasiklin		
Piptazobactam		
Benzilpenisilin		



Şekil 2.2. Antibiyotik kullanımı ve hastalığın oluşması (Den`eve ve ark., 2009)

Fluorokinolonların kullanımı bu hastalığın salgına dönüşmesine katkı sağlayan önemli faktörlerden bir diğeridir (Pépin ve ark., 2005). Özellikle hastane enfeksiyonları boyunca antibiyotiklerin kesilmesi CDBH için önemli bir risk olarak belirlenmiştir (Mylonakis ve ark., 2001).

Hastanede yatarak tedavi görenlerde görülme sıklığı yüksektir. Hastanede *C. difficile* sporlarına maruz kalan çalışanlar veya hastalar vasıtasıyla kolaylıkla bulaşabilmektedir. Ayrıca, klindamisin cinsi veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonucu normal bağırsak florası zarar görerek toksijenik *C. difficile* sporlarının üremesine izin verirler (Tsutsumi ve ark., 2014). En önemli kaynağı olan hasta bakım kuruluşları ve hastanelerin ortamlarında *C. difficile* yükünü ölçen bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya göre asemptomik taşıyıcı hastaların odalarında %29 *C. difficile* sporlarına rastlanırken, ishallerli hastaların odalarında yapılan araştırma sonucunda ise %49 *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. Diğer hastane odalarında *C. difficile*'e rastlanma sıklığı %8 olarak belirlenmiştir. Bu da odaların temizlenmesine rağmen *C. difficile* sporlarının dezenfektanlara karşı gösterdiği direnç ile açıklanmaktadır (Barbut ve Petit, 2001) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *Clostridium difficile*'in doğal bulaşma döngüsü (Tsutsumi ve ark., 2014)

C. difficile hastalık mekanizması üç faktörle belirlenir. Antibiyotik kullanımı hem yararlı hem de zararlı bir etki oluşturabilmektedir. Yararlı etkisi hastalığa yol açan patojenlerin etkisini önleyebilmek iken, diğer etkisi ise bağırsak sisteminde bulunan koruyucu mikroflorayı bozabilmesidir. Bu koruyucu floranın önemli bir fonksiyonu da kolonizasyon direncidir. Bu özellik sayesinde bağırsak florasında fırsatçı patojenlerin kolonizasyonu ve enfeksiyon oluşturma mekanizması engellenmiş olur. Eğer bu flora herhangi bir yolla (antibiyotik ve diğer ilaçların kullanımı veya ameliyat gibi farklı yollar) zarar görürse, bireyin bağırsak sisteminde *C. difficile* gibi patojen mikroorganizmaların yaşamasına elverişli ortam sağlanmış olur. İkinci faktör, hastanede *C. difficile*'e maruz kalma şeklinde gerçekleşir. Hastane ortamında asemptomik veya belirtileri taşıyan bireyler aracılığıyla dirençli *C. difficile* sporları yayılmıştır. Bu şekilde hastadan hastaya eller aracılığıyla veya kontamine olmuş aletlerden geçebilmektedir. *C. difficile* sporları aylarca canlılığını sürdürebilir ve böylelikle yeni enfeksiyonlara sebep olabilir. Bir diğer faktör ise bireysel etkenlerdir. En önemli faktör bağışıklık sisteminin kuvvetli olmasıdır. Böylelikle *C. difficile* toksinlerine karşı koruyucu antikor üreten bağışıklık sistemi sayesinde hastalığın şiddeti azalır ve tekrarlanma ihtimalini önlemede önemli bir rol oynar (McFarland, 2005; Fraser ve Swiencicki, 2013).

Kolonizasyon için ilk şart vejetatif hücrenin bağırsak mukus tabakasına nüfuz etmesi ve bağırsak epitel hücrelere bağlanmasıdır. Bakteriyel ekzotoksinler (Toksin A ve Toksin B) semptomik hastalıkların oluşmasında hücreler üzerinde büyük role sahiptir (Twine ve ark., 2009).

Konakçının bağırsağına *C. difficile*' in girmesi sonucu emilimiyle fekal-oral hattında ilerleyerek enfeksiyonun ilk aşaması başlamış olur (Lyerly ve ark., 1988). *C. difficile* bağırsakta uygun şartları bulduğu anda vejetatif formdan daha dayanıklı olduğu spor formuna geçer ve toksin üretimi, virülans faktörleri ve sporlar sayesinde hastalığın tekrar oranı artış gösterir (Poxton ve ark., 2001).

C. difficile bulaşması dirençli sporların vücuda girmesi ile ortaya çıkmaktadır. Devamında dirençli sporlar karın bölgesine geçer ve ince bağırsakta sporlar çimlenerek kolona yerleşir. Kolonda *C. difficile* popülasyonunun artması, fırsatçı patojenlere karşı kolonizasyon direncini sağlayan normal bakteriyel floranın zarar görüp işlevini yitirmesine yol açar (Tsutsumi ve ark., 2014).

Hastalığın klinik tablosu ishal, psödomembransız kolit, psödomembranöz kolit ve fulminant kolit olarak çok değişik şekillerde görülmektedir. Bazı vakalarda toksijenik suşlar hastalık belirtileri göstermeden asemptomik olarak da vücuda yerleşebilir. *C. difficile* ishaliinde nadiren düşük derecede karın krampları da görülebilir. Belirtiler antibiyotik kullanımı süresince veya kısa bir süre görülmeye başlar (Kıyan, 1999).

Asemptomik taşıyıcılık, ishal gibi hiçbir klinik belirti olmaksızın *C. difficile* kolonizasyonunun oluşmasıdır. Sağlıklı yenidoğanların yarısından fazlasında ve erişkinlerin %1'inde *C. difficile* bulunur. Daha çok hastane çevresindeki bireylerde görülür. Asemptomik taşıyıcılık salgınlara yol açabileceği gibi sadece tek bir bireyde de etkili olabilmektedir (Mylonakis ve ark., 2001). Daha çok hastanede tedavi gören kişilerde görülebilir (Kıyan, 1999).

Psödomembransız kolit, genellikle *C. difficile* enfeksiyonlu bireylerde hafif ishalle birlikte karın kramplarıyla ortaya çıkan hastalık tipidir. Antibiyotik tedavisi sırasında

Toksin A, kolonda iltihaplanma, yapısal bozulma ve ishale yol açan bir enterotoksin olarak rol oynar (Poxton ve ark., 2001; Vaishnavi, 2010; Kazanowski ve ark., 2014). Ayrıca bağırsakta bir glikoprotein ve α - galaktoz ile bağırsak epitelyumun üzerinde fırça kenarlı özel bir reseptöre bağlanır (Mylonakis ve ark., 2001; Vaishnavi, 2010). 308 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Trejo ve ark., 2013). Toksin B hücre membranları aracılığıyla sitotoksik etki oluşturur (Songer, 2004; Jöbstl ve ark., 2010). TcdB 260 kDa molekül ağırlığında olup protein yapısındadır (Trejo ve ark., 2013).

Toksinler aminoasit dizilimi bakımından birbirlerine benzerlik gösterirler (Reinert ve ark., 2005). Her iki toksin de aynı enzimatik aktiviteye sahiptir. Ayrıca biyolojik olarak toksin B daha düşük etkiye sahiptir (Carasi ve ark., 2012). Her iki toksin de hücreler arası bağların uzunluğunu etkiler. Bağırsak mukozasında toksin B'nin toksin A'dan yaklaşık 10 kat daha etkili olduğu tahmin edilmektedir (Kazanowski ve ark., 2014). Her iki toksin de sitotoksiktir ve bu da transepitel direncin azalması sonucu aktin hücre iskeleti ve doku birleşme noktalarının bozulmasına, sıvı salınmasına ve bağırsak epitelyumun tahrip olmasına yol açar (Rupnik ve ark., 2009). Ancak toksin B'nin sitotoksik etkisi toksin A'ya göre 1000 kat kadar kuvvetli etkili olduğu için toksin A'nın daha çok enterotoksik etkisinden bahsedilmektedir (Vaishnavi, 2010).

Toksin A ve B üç bölgeyi yapısında bulundurur. Bunlar; glukoziltransferaz N-terminal bölgesi, translokasyon ve sistein proteaz bölgesi ve bir C terminal reseptör bağlama bölgesidir (Pruitt ve ark., 2010). Karboksi ucun dizi analizinde tekrarlayan birçok diziler bulunmaktadır. Bu şekilde toksinlerin tekrarlanıp hücre yüzey karbonhidratlarına bağlanabilir (Ho ve ark., 2005).

Toksin C geninin (tcdC), anti sigma faktör fonksiyonuna sahip olduğuna inanılmaktadır. Toksin A ve B'nin üretimine negatif etki ettiği kabul edilmektedir. tcdC delesyondan sorumlu alellerin bulunduğu polimorfik bir bölge olup mutasyondan etkilenmez. tcdR, sarmal- dönüş-sarmal motifinde DNA motifine sahip diğer patojen *Clostridium* türleriyle benzerlik gösteren bir gen olup RNA polimerazasyonunu ve toksinliği destekleyen bir sigma faktördür (Mani ve Dupuy, 2001). tcdE ise hücrelerden toksinlerin serbest kalmasında etkili rol oynayan bir

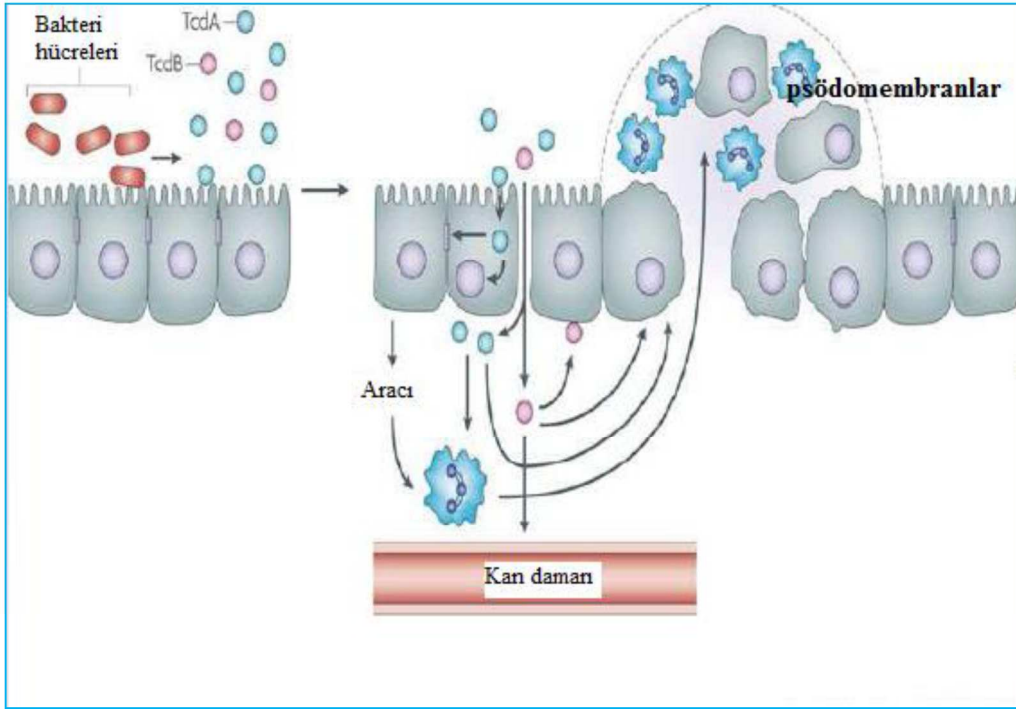
protein şifreleyerek toksijenik genlerin serbest kalmasına yol açar. Holin benzeri protein olarak bilinen tcdE hidrofobiktir (Halsey, 2008; Dupuy ve ark., 2008; Tan ve ark., 2001).

Bazı suşlar üçüncü bir toksin olan ikili toksini de üretebilir (Sebaihia ve ark., 2006, Kelly ve Thomas LaMont, 2008; Doyle, 2013; Trejo ve ark., 2013). İkili toksin *C. difficile* Transferaz (CDT) olarak da bilinir. Bu toksin PaLoc bölgesinin dışında kromozal lokusa (4,3 kb) yerleşmiştir (Perelle ve ark., 1997; Sundriyal ve ark., 2009). İkili toksin oluşmasından sorumlu iki gen bulunmaktadır. Bu genler CdtA ve CdtB'dir. CdtB reseptör bağlayıcı bileşendir ve hücre yüzeyi üzerinde heptamer bir formdadır ve CdtA'nın enzimatik aktivitesine (ADP-ribozil transferaz) izin verir. Binary toksin in vitro çalışmalarda enterotoksik aktiviteye sahiptir, fakat CDE'ndeki mekanizmasındaki rolü hala açıklığa kavuşmamıştır (McFarland ve ark., 2007; Kelly ve Thomas LaMont, 2008; Cartman ve ark., 2010).

C. difficile'in patojenite mekanizması birkaç adımda gerçekleşir. İlk adım bağırsak sisteminde sporların çimlenmesi için gerekli şartların sağlanmasıdır. Sporlar ya bağırsak dışından bir ortamdan bulaşabilir ya da bağırsak içerisinde değişen şartlarla normal bağırsak florasının değişimi gözlemlenebilir. Vejetatif hücreler kolonizasyon boyunca çimlenmeye devam eder. Mukus tabakasının penetrasyonu epitelyum *Clostridium* hücrelerinin bağlanması yüzey katman proteinleri ve flagellalar gibi yüzey faktörlerinin aktivitesi süresince gerçekleşir. Ana virülans faktörleri olan toksin A ve B'nin üretimi bu adımın hemen sonrasında gerçekleşir (Hammond ve Johnson, 1995; Schwan ve ark., 2009).

Reseptörlerin bağlanmasından sonra toksinler endositoz ile hücreye girerler ve etkilerini göstermek için iki etkene ihtiyaç duyarlar. Birincisi sitozol içinde toksinlerin translokasyonudur. Bu olay endositik keseciklerin asidifikasyonunun gelişmesini uyarabilmektedir. Bu bölüme geçilir geçilmez toksinlerin enzimatik aktivitesi *Rho* protein ailesinin glikolizasyonunu uzaklaştırır. *Rho* proteinlerinin aktivitesinin durdurulması sonucu, aktin iskeletinin düzenlenmesi, epitelyum önleme fonksiyonu, hücre ölümleri, yaraların iyileşmesi gibi hayati hücre aktiviteleri düzenlenir veya zarar görür (Barth ve ark., 2001).

Toksin A ve B bağırsak fonksiyonlarının zarar görmesinde etkili olarak bağırsakları zararlılara karşı korunaksız hale getirir ve psödomembranöz kolit gibi hastalıkların gelişmesini teşvik eder (Voth ve Ballard, 2005) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Bağırsaklarda *C. difficile* toksin aktivitesi (Voth ve Ballard, 2005)

C. difficile'in hem toksijenik hem de toksijenik olmayan suşları bulunmaktadır. Bu suşların hastalık mekanizması üzerindeki rolleri oldukça büyüktür. Toksinlerin tiplendirilmesi amacıyla farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin Avrupa'da özellikle PCR Ribotip (PCR-RT) kullanılmaktadır (Killgore ve ark., 2008).

Kuzey Amerika'daki hastanelerde hipervirüent NAP1/027 suşunun sebep olduğu hastalıklarda artış görülmektedir (Sebahia ve ark., 2006). Ribotip 027, Restriksiyon Endonükleaz Analizi [REA] tarafından BI, Pulsed-Field Gel Electrophoresis [PFGE] tip 1 ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu [PCR] ise ribotip 027 olarak adlandırılır (Pépin ve ark., 2005; Maccannell ve ark., 2006). Bu yüzden isimlendirilmede B1/NAP1/027 şeklinde yazılır.

Dünyada yaygın olarak bulunan ribotip 027 suşu CDE'lerinden sık sık izole edilmektedir (Freeman ve ark., 2010; Gerding, 2010). Bu kadar yaygın olmasındaki etkenler, hızla yayılabilmesine ve birçok hastalıkla bağlantılı olma yeteneğine bağlıdır (Burns ve ark., 2010). Kanada'nın farklı bölgelerindeki incelemelerde yaygın olarak görülen ribotip 027 hem nozokomiyal hem de toplum kaynaklı hastalıklarla bağlantılıdır (Maccannell ve ark., 2006). Aynı yıllar içinde Amerika Birleşik Devletleri'nde de aynı türden kaynaklı salgın olduğunu belirtilmiştir (McEllistrem ve ark., 2005). İngiltere'deki Stooke Mandeville Hastanesi'nde 2003-2004 yılları arasında gelişen salgında 027 izole edilmiştir (Anonymous, 2006).

Diğer bir hipervirulent suş 2008 yılında Avrupa'da ortaya çıkan ribotip 078'dir. Ribotip 027 ile virülans özellikleri benzerlik göstermesine rağmen, toksin delesyonundaki farklılıklardan dolayı hücrelerde farklı etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Farklarından en önemlisi ribotip 078'in daha geniş alanlara yayılabilmesiyle daha yaygın rastlanmasıdır (Doyle, 2013).

Toksijenik suşların yanında toksijenik olmayan suşlar da tanımlanmaktadır. Bu suşları toksijenik suşlardan ayıran önemli özellikleri, PaLoc bölgesinin yapısında bulunmaması (bulunsa bile özelliğini yitirmiş olması), toksin A ve toksin B üretmemeleri ve *C. difficile* hastalıklarının belirtilerini taşımamaları olarak sıralanabilir. Nadir olarak bazı nontoksijenik suşlar *tcdA* ve *tcdB* genlerini taşımaktadır. Fakat bu genlerin yapısal bozuklukluğu nedeniyle hastalık oluşturan toksinler yeterli miktarda bulunamazlar ve fenotipik nontoksijenik suş olarak adlandırılırlar. Bu suşlara en iyi örnek M90 suşudur. Suş yapısında PaLoc bölgesi bulundurulur, ancak yetersiz gen transkripsiyonundan dolayı toksin üretimi düşük seviyelerde kalmaktadır (Natarajan ve ark., 2013).

2.5. Çiftlik ve Kümes Hayvanlarında Bulunma Sıklığı

C. difficile domuz, buzağı, at, köpek ve çiftlik hayvanlarını da içine alan geniş bir grupta etkilidir. Hatta enterik hastalıkların ana faktörü olarak görülmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2006; Rodriguez ve ark., 2014).

Evcil hayvanlar ve çiftlik hayvanları hipervirüent hayvan kaynaklı suşların olası kaynağı olarak görülmektedir (Debast ve ark., 2009; Blanco ve ark., 2013). *C. difficile*, domuz, buzağı, at, devekuşu, kedi, köpek ve kümes hayvanlarında bağırsak hastalıklarının önemli bir nedenidir. Tavuk (Weese ve ark., 2010), koyun (Al Saif ve Brazier, 1996), domuz (Songer ve ark., 2000), keçi, sığır, koyun ve buzağı gibi çiftlik ve kümes hayvanları asemptomik olarak bünyelerinde bulundurabilirler (Simango ve Mwakurudza, 2008; Rupnik ve ark., 2009).

C. difficile'in toksijenik suşlarının olası bulaşma kaynaklarının hayvanlar olduğu düşünülmektedir. Hayvanlarda ilk çalışmalar 1980'li yıllara dayanır (Boriello ve ark., 1983). Fakat 2000'li yıllara kadar bu durum doğrulanamamıştır. İnsanlarda bulunan izolatlar ile gıdalardan ve hayvanlardan elde edilen izolatlar genellikle birbirine benzerlik göstermektedir (Metcalf ve ark., 2011; Marsh, 2013). Bundan dolayı insanlarda görülen CDBH ve asemptomik taşıyıcılık durumuna hayvanlarda da rastlanmaktadır (Rupnik, 2007). Hayvanlardan izole edilen genotiplerin heterojenitesi (yaklaşık 30-50 farklı PCR ribotipi) insanlarınkinden (yaklaşık 190 PCR ribotipi) daha düşüktür (Rupnik ve ark., 2009). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda PCR ribotip 078 gibi bazı suşların insan, hayvan (Debast ve ark., 2014) ve et örneklerinde rastlandığı görülmektedir (Weese ve ark., 2009; Curry ve ark., 2012). Suş yaygınlığının farklı olmasında olduğu coğrafyanın farklı oluşu, mevsimler ve yönteminin farklı oluşu büyük rol oynar (Rodriguez-Palacios ve ark., 2013). *C. difficile*'in hayvanlarda görülme sıklığı ülkeden ülkeye, araştırmaya, türlere, araştırma yoğunluğuna ve hatta örnekleme prosedürüne göre farklılık göstermektedir (Tablo 2.2.) (Weese ve ark., 2010).

Tablo 2.2. Hayvanlarda yapılan araştırmalara göre *C. difficile* varlığı (i: ishalleri, s: sağlıklı)

Hayvan Türü	% Pozitif	Suş	Yer	Yıl	Referans
At (s)	1,0 (100)		Kuzey Afrika	-	Al Saif ve Brazier (1996)
At (s)	5,0(20)	033	Slovenya	2008	Avbersek ve ark. (2009)
At (i)	17,8(135)	005, 006, 012, 014, 023, 078, 042, 045, 126, 010, 035, 039, 051	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Buzağı (s)	22,2(18)	078, 015	Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2012)
Buzağı (s)	9,5(42)	002, 033, 077	Slovenya	2008	Avbersek ve ark. (2009)
Buzağı (s)	14,9(134)	078, 017, 027, 077, 014, 033,	Kanada	2004	Rodriguez-Palacios ve ark. (2006)
Buzağı (s)	12,7(47)	003, 033, 066, 070, 137	İsviçre	2012	Romano ve ark. (2012)
Buzağı (i)	7,6(144)		Kanada	2004	Rodriguez-Palacios ve ark. (2006)
Buzağı (s)	1,8(56)	066	Slovenya	-	Pirs ve ark. (2008)
Buzağı (s)	6,0(100)	012, 033	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Buzağı (s)	61,1(200)	078, E, Q, L, F, R, H75, MOH AA, OVC G, OVC AA, OVC J, CM 53	Kanada	2008-2009	Costa ve ark. (2011)
Buzağı (i)	25,3(253)	027, 078 017	ABD	-	Hammit ve ark. (2008)
Buzağı (s)	6,9(202)	002, 014, 081, 087 ve 9 farklı suş daha	Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2012)
Domuz (s)	0(100)	005, 023, 078	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Domuz (s)	0(194)		Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2012)
Domuz (i)	25,0(36)	005, 023, 078	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Domuz yavrusu (s)	51,8(257)	066, 078	Slovenya	-	Pirs ve ark. (2008)
Domuz yavrusu (s)	50,9(485)	010, 066, 011, 029,	Slovenya	2008	Avbersek ve ark. (2009)
Domuz yavrusu (s)	78,3(23)	078, 002 ve 3 bölgesel suş daha	Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2012)
Hindi (s)	4,8(82)		İtalya	-	Saita ve ark. (2009)
İnek (s)	1,0(100)	012	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
İnek (s)	4,5(67)	-	Avusturya	2008	Indra ve ark. (2009)
İnek (s)	1,5(63)	003,033, 066,070,137	İsviçre	2012	Romano ve ark. (2012)
Kaz (s)	50,0(2)		Birleşik Krallık	198-	Boriello ve ark. (1983)
Keçi (s)	7,5(40)	001, 066	İsviçre	2012	Romano ve ark. (2012)
Kedi (s)	30,0(20)		Birleşik Krallık	-	Boriello ve ark. (1983)
Kedi (s)	2,0(100)		Kuzey Afrika	-	Al Saif ve Brazier (1996)

Tablo 2.2. Hayvanlarda yapılan araştırmalara göre *C. difficile* varlığı (devamı)

Hayvan Türü	% Pozitif	Suş	Yer	Yıl	Referans
Kedi (i)	15,7(115)	014, 009, 010, 039	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Koyun (s)	1,0(100)		Kuzey Afrika	-	Al Saif ve Brazier (1996)
Koyun (i)	18,2(11)	015, 097	Hollanda	2009-2010	Koene, ve ark. (2012)
Köpek (s)	21,0(52)		Birleşik Krallık	-	Boriello ve ark. (1983)
Köpek (s)	10,0(100)		Kuzey Afrika	-	Al Saif ve Brazier (1996)
Köpek (i)	25,0(116)	012, 014, 021, 107, 009, 010, 031, 039	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Kümes hayvanı (s)	5,0(100)	003, 014, 056, 010	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Kümes hayvanı (i)	9,5(21)	003, 014, 056, 010	Hollanda	2009-2010	Koene ve ark. (2012)
Kümes hayvanı (s)	1,2(120)		Kuzey Afrika	-	Al Saif ve Brazier (1996)
rdek (s)	50,0(2)		Birleşik Krallık	-	Boriello ve ark. (1983)
Domuz yavrusu (s)	3,3(61)	-	Avusturya	2008	Indra ve ark. (2009)
Tavuk (s)	5,0(59)	-	Avusturya	2008	Indra ve ark. (2009)

2.6. Gıdalarda *C. difficile* Varlığı

İlk kez 1982 yılında, yaşlı bir hastanın konserve somon tükettikten sonra pseudomembranöz kolite yakalanmasından sonra söz konusu gıdanın bulaşma kaynağı olabileceğinden şüphelenilmiş, ancak bu gıdada *C. difficile* varlığı araştırılmamıştır. 1981-1983 yılları arasında yapılan çalışmalarda hastane menüsünde yer alan pişmiş gıdalarda bu bakteriye rastlanmamış olmakla birlikte, çiğ gıdalar veya yetersiz pişmiş gıdaların bulaşma kaynağı olabileceği üzerinde durulmamıştır (Rodriguez-Palacios ve ark., 2013). Ancak, 1988 yılında yapılan bir çalışmada diğer *Clostridium* türleri ile birlikte *C. difficile* sporları da baldan izole edilmiştir (Doyle, 2013). 1982-2002 yılları arasında direkt olarak *C. difficile*'nin gıdalardaki varlığı konusunda yapılmış neredeyse hiç çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu tarihten sonra özellikle de son beş yılda gıdalarda bu patojenin varlığını gösteren çok sayıda bilimsel araştırma makalesine rastlanmaktadır (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. *C. difficile* 'in gıdalarından izolasyon oranı ve toksin tipleri

Örnek	% Pozitif (Toplam Örnek Sayısı)	Ribotip	Ülke	Örnek Zaman Aralığı	Kaynak
Siğir eti	0 (145)	-	Hollanda	2008/2009	de Boer ve ark. (2011)
Siğir eti	12 (115)	027, 078, C	Kanada	2008	Weese ve ark. (2009)
Siğir eti	1,65 (121)	078	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Siğir eti (hamburger ve kıyma)	2,38 (33)	078, 014	Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2014)
Siğir kıyması	20,8 (53)	014, 077, M26, M31	Kanada	2005	Rodriguez-Palacios ve ark. (2007)
Siğir kıyması	6,7	027, 077, 014	Kanada	2006	Rodriguez-Palacios ve ark. (2009)
Siğir kıyması	50 (26)	027, 078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
Siğir kıyması	2 (105)	Toxinotip 0, PCR-ribotip 012	Fransa	2007/2008	Bouttier ve ark. (2010)
Siğir kıyması	8,3 (24)	0348, 0088	Kanada	2007	Visser ve ark. (2012)
Siğir ve/veya domuz kıyması	3 (100)	Ribotip AI-57	Avusturya	2007/2008	Jöbstl ve ark. (2010)
Dana eti	0 (19)	-	Hollanda	2008/2009	de Boer ve ark. (2011)
Dana pizzola	14,3 (7)	014, 077, M26, M31	Kanada	2005	Rodriguez-Palacios ve ark. (2007)
Dana pizzola	4,6 (65)	027	Kanada	2006	Rodriguez-Palacios ve ark. (2009)
Karaciğer sosisi (Braunschweiger)	62,5 (16)	027, 078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
Sosis	14,3 (7)	027	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
İspanyol sucuğu	30 (10)	027, 078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
Bufalo eti	8,96 (67)	078	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Deve eti	0 (124)	-	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Siğir karkası	7,9 (101)	-	Belçika	2011/2012	Rodriguez ve ark. (2013)

Tablo 2.3. *C. difficile*'in gıdalarından izolasyon oranını ve toksin tipleri (devamı)

Örnek	% Pozitif (Toplam Örnek Sayısı)	Ribotip	Ülke	Örnekleme Zaman Aralığı	Kaynak
Domuz karkası	7 (100)		Belçika	2011/2012	Rodriguez ve ark. (2013)
Domuz eti	0 (63)	-	Hollanda	2008/2009	de Boer ve ark. (2011)
Domuz (sosis, kıyma)	4,7 (107)	078, 014, UCL57, UCL378	Belçika	2012	Rodriguez ve ark. (2014)
Domuz kıyması	12 (115)	078, 027, C, E, Y	Kanada	2008	Weese ve ark. (2009)
Domuz kıyması	42,9 (7)	027, 078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
Domuz kıyması	4,2 (24)	0139	Kanada	2007	Visser ve ark. (2012)
Domuz eti	1,8 (393)	027, OVCB, T, Y, V	Kanada	2007/2008	Metcalf ve ark. (2010a)
Domuz sosisi	23,1 (13)	027,078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
Çiğ et ürünü	9,3 (243)	ToksinoipV, Toksinoip IX	ABD, Teksas	2004-2009	Harvey ve ark. (2011)
Farklı tipte et örnekleri (siğir kıyma, hamburger, koyun eti vb.)	2,4 (82)	-	İsviçre	2008	Von Abercron ve ark. (2009)
Hindi kıyma	44,4 (9)	078	ABD, Arizona	2007	Songer ve ark. (2009)
İnek eti	0,94 (106)	-	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Keçi eti	3,26 (92)	078	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Çiğ et ürünü	2,0 (102)	078	ABD, Pittsburgh	2011/2012	Curry ve ark. (2012)
Koyun eti	0,67 (150)	-	İran	2012	Rahimi ve ark. (2014)
Kuzu eti	6,3 (16)	045	Hollanda	2008/2009	de Boer ve ark. (2011)
Salata	7,5 (40)	001,017	İskoçya	2008	Bakri ve ark. (2009)
Tüketime hazır salata ve sebze	2,9 (104)	001, 014/020/077, 015	Fransa	2010/2011	Eckert ve ark. (2013)
Sebze	2,4 (300)	-	Güney Galler	1995	Al Saif ve ark. (1996)
Sebze	4,5 (111)	078, V+	Kanada	2009	Metcalf ve ark. (2010b)
Tavuk	2,7 (257)	001, 003, 087, 071, NT	Hollanda	2008/2009	de Boer ve ark. (2011)
Deniz ürünleri	4,8 (119)	078, OVCO	Kanada	2010	Metcalf ve ark. (2011)
Deniz ürünleri	4,5 (67)	ToksinoipV	ABD, Teksas	2012	Norman ve ark. (2014)

Gıdalar aracılığı ile insanlara bulaştığı henüz doğrulanmamış olmakla birlikte, *C. difficile*'nin gıdalardan izolasyon oranı %0-62,5 aralığında değişmektedir. Çeşitli et ve et ürünleri yanında, *C. difficile*'in izole edildiği gıdalar arasında tüketime hazır salata, sebze ve deniz ürünleri gibi gıdalar da yer almaktadır. Bugüne kadar rastlanan en yüksek izolasyon oranı %62,5 olup, tütülenmiş baharatlı karaciğer sosisi olarak tanımlanabilecek "Braunschweiger" adı verilen tüketime hazır et ürününde analize alınan 16 örneğin 10 adedinden *C. difficile* izole edilmiştir (Songer ve ark., 2009). Ancak bu gibi istisnalar dışında genel olarak hem izolasyon oranının hem de kontaminasyon düzeyinin düşük olduğu görülmektedir. Sonuçlar arasında bu kadar yüksek varyasyon olmasının; örnekleme ve izolasyon yöntemi, gıda çeşidi ve gıdaya uygulanan işlemlerin farklı olması ile laboratuvarlardaki olası çapraz bulaşmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Marsh, 2013).

C. difficile fekal-oral yolla yayıldığından ve çiftlik hayvanları ile kanatlılardan izole edilmiş olduğundan, bu bakterinin gıdalar aracılığı ile insanlara bulaşma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Et kesim sırasında *C. difficile* ile enfekte olmuş hayvanlardan veya kesim hijyenine dikkat etmeyen personel nedeniyle kontamine olabilir (Doyle, 2013). Bazı çalışmalarda *C. difficile* spor sayısı da araştırılmış olup genellikle düşük düzeydedir (Bakri ve ark., 2009; Weese ve ark., 2009; Bouttier ve ark., 2010; Weese ve ark., 2010; Curry ve ark., 2012). Ancak, et veya diğer gıdalarda bu bakterinin sporları varsa pişirme işlemi ile öldürülemeyeceği ve 71°C'de 2 saatlik ısı işlem süresince canlı kaldıkları belirlenmiştir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2010). Diğer yandan gıdalardan izole edilen suşlardan bazılarının toksijenik olduğu ve hastalardan izole edilen suşlara benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Al Saif ve Brazier (1996) tarafından *C. difficile*'in sebzelerde yaygınlığını belirleme amacıyla yapılan çalışmada 300 çiğ sebze örneği incelenmiş ve örnekler %2,4 oranında pozitif bulunmuştur. Fakat o yıllarda tiplendirme çalışmaları olmadığından ribotipler belirlenememiştir (Al Saif ve Brazier, 1996).

Kanada'da yapılan çalışmada 60 kıyma örneği incelenmiş ve bu örneklerden 12 tanesinde (%20) *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. İzolatların biri hariç diğerlerinin

toksijenik olduğu belirlenmiş, hatta yapılan tiplendirme çalışmalarında 8 tanesinin toksinotip III olduğu bulunmuştur (Rodriguez-Palacios, ve ark., 2007).

Oranların yüksek olması üzerine daha geniş kapsamlı araştırma yapan Rodriguez-Palacios ve ark. (2009) üç farklı yöntem kullanarak Kanada'da inceleme yapmışlardır. Bu çalışmada 2006 yılının Ocak-Kasım ayları arasında belirli aralıklarla toplam 214 et örneği (149 sığır eti kıyması, 65 dana pirzola) temin etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre sığır eti kıyması örneklerinin 10'u (%6,7), dana pirzola örneklerinin 3'ü (%4,6) *C. difficile* pozitif olarak belirlenmiştir. Pozitiflik oranlarına bakıldığında *C. difficile*'in genellikle Ocak-Şubat aylarında daha iyi izole edilebildiği görülmüştür. On üç izolatanın 10 tanesi toksijenik olarak belirlenmiştir. Toksijenik izolatların PCR analizinde 4 tanesinin ribotip 027 olması insan sağlığı açısından riskli olduğunu ortaya koymaktadır.

Arizona'da 2007 yılında yapılan üç aylık diğer bir çalışmada çiğ ve tüketime hazır etler *C. difficile* açısından incelenmiş, 88 örneğin 37'sinin (%42) *C. difficile* içerdiği belirlenmiştir. İzolatların önemli bir kısmının (25 tanesi) PCR ribotip 078 ve dört tanesinin ise PCR ribotip 027 olduğu tespit edilmiştir (Songer ve ark., 2009).

Manibota' da 2007 yılında 3 kasap ve 3 mağazalar zincirinden 48 et örneği (24 sığır eti kıyması, 24 domuz eti kıyması) toplanmıştır. Şüpheli koloniler izole edilerek Gram boyama, lateks aglütinasyon testi ve UV ışık altında görünümüne bakılarak doğrulanmıştır. Tanımlama amacıyla trio fosfat izomeraz (tpi) varlığı Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca epsilon test (E- test) ile antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. İki sığır kıymasından olmak üzere 3 örnekte (%6,3) *C. difficile*'e rastlanmış ve tiplendirme çalışmaları sonucunda PFGE-0088, PFGE-0139 ve PFGE-0348 oldukları belirlenmiştir. Bu ribotiplerin insan dışkıında da var olması bu gıdaların tüketen bireyler açısından risk taşıdığını ortaya koymaktadır (Visser ve ark., 2012).

Fransa'da 2007-2008 yılları arasında yapılan çalışmada 105 paketlenmiş et örneği incelenmiş 2 tanesi (%1,9) *C. difficile* pozitif bulunmuştur. Tiplendirme çalışmasında

izolatların PCR ribotip 012 olduğu saptanmış olup, bu ribotipin insanlarda yaygın olduğu belirlenmiştir (Bouttier ve ark., 2010).

Jöbstl ve ark. (2010) tarafından 2007-2008 yılları arasında yapılan çalışmada 100 kıyma eti örneği, 50 çiğ süt örneği incelenmiş, et örneklerinin 3 tanesinden (%3,0) *C. difficile* izole edilmiş, çiğ sütlerde bu patojene rastlanmamıştır. Pozitif çıkan izolatların ikisinin insanlarda hastalığa neden olan patojenik bir tip (PCR ribotip AI-57) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu ribotipin test edilen antibiyotiklerin hepsine duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Avusturya'da yapılan bir çalışmada (Indra ve ark., 2009) 2008 Şubat-Nisan ayları arasında 25 sığır kıyma, 26 sığır eti, 17 domuz kıyma, 10 domuz eti ve 6 tavuk eti 11 farklı kasaptan toplanmıştır. Yapılan analizler sonucunda 87 et örneğinin hiç birinde *C. difficile*'e rastlanmamıştır.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada (de Boer ve ark., 2011) 2008 yılının Kasım ayından itibaren 5 ay boyunca incelenen 500 çiğ et örneğinin 145'i sığır eti, 63'ü domuz eti, 19'u dana eti, 16'sı kuzu eti ve 257'si tavuk örneğidir. Elde edilen izolatlar aglütinasyon testi ve PCR ile tanımlanmıştır. Toplam 8 izolat (%1,6) *C. difficile* olarak tanımlanmış olup 7'si (%2,7) tavuk etinden ve 1'i kuzu etinden izole edilmiştir. Tiplendirme çalışması sonucu kuzu etinden elde edilen suş PCR 045 ve tavuk etinden elde edilenler PCR 001, 003, 087, 071 olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 2 tane de daha önce tanımlanmamış tür bulunmuştur. PCR 001 dışında diğer ribotiplerin daha önce Hollanda'da yapılan çalışmalarda da bulunduğu görülmüştür.

Kanada'da 2008 yılının Ağustos - Kasım ayları arasında gerçekleştirilen çalışmada (Weese ve ark., 2009) 115'i sığır kıyması, 115'i domuz kıyması olmak üzere toplam 230 çiğ et örneği incelenmiştir. Örneklerin 28'inde (%12) *C. difficile* bulunmuştur. Domuz kıymasından izole edilen suşların 10'u 078, diğerleri 027, C, E ve Y ribotipleridir. Sığır kıymasından izole edilen suşların 12 tanesi 078, diğerleri 027 ve C ribotipidir. Aynı zamanda örneklerdeki *C. difficile* spor sayısının 20-240 spor/g aralığında olduğu belirlenmiştir.

İskoçya'da sebze örneklerinde *C. difficile* varlığını belirleme amacıyla 2008 yılının Mayıs – Temmuz aylarında yapılan çalışmada 40 tüketime hazır salata örneği incelenmiş ve 3 tanesinde (%7,5) *C. difficile* varlığına rastlanmıştır. Yapılan tiplendirme çalışmasında iki izolat ribotip 017, bir izolat da ribotip 001 olarak belirlenmiştir. Belirlenen izolatların antibiyotik duyarlılıklarını belirleme amacıyla E-test stripleri kullanılmış ve sonuç olarak vankomisin ve metranidozale hiç birinin dirençli olmadığı görülmüştür. Sebzelerdeki bulaşmanın sebebi tam belirlenemezken bulaşmanın gıda işleyenlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Bakri ve ark., 2009).

Tektaş'ta 2004-2009 yılları arasında analiz edilen salam üretiminde kullanılan 243 çiğ et örneğinin 23 tanesinde (%9,5) *C. difficile* belirlenmiş olup 22 tanesi toksin A, toksin B ve binary toksin açısından pozitifdir. Tiplendirme çalışmasında 22'si de toksinotip V olarak belirlenmiştir (Harvey ve ark., 2011).

Kanada'da 2009 yılının Mayıs ve Ağustos ayları arasında 101 sebze örneğini içeren çalışmada 5 izolat (%4,5) *C. difficile* olarak tanımlanmıştır. Üç izolat ribotip 078, diğer ikisi de insanlarda toksijenik etkili olarak bilinen türlerdir (Metcalf ve ark., 2010b).

Metcalf ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada 2010 yılında Mayıs - Ağustos ayları arasında 8 farklı deniz ürünü satıcısından 119 deniz ürünü örneği toplanmıştır. Örneklerin 5 tanesinde (%4,8) *C. difficile* belirlenmiştir. Elde edilen 4 izolatın toksinojenik ribotip 078/toksिनotip V olduğu belirtilmiştir. Ayrıca izolatlar klindamisin, vankomisin ve metranidazol antibiyotiklerine karşı hassastır.

Eckert ve ark. (2013) tarafından 2010-2011 yılları arasında 104 tüketime hazır salata ve sebze örneklerinde yapılan araştırmada örneklerin %2,9'unun *C. difficile* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. PCR tiplendirme çalışmalarında belirlenen ribotipler 001, 014/020/077 ve 015'tir.

Sülfite indirgeyen *Clostridium*'ların pişmiş etlerdeki etkisini görmek amacıyla Abidjan'da sokakta ve restoranlarda satılan 395 et örneği (178 kebab, 90 biftek ve

127 soslanmış et) toplanmıştır. Kebapların %32,58'inde, bifteklerin %8,88'inde ve soslanmış etlerin %11,81'inde *C. difficile*'e rastlanmıştır. İzolatları doğrulama amacıyla Gram boyama ve biyokimyasal testler yapılmış, ardından pozitif çıkanlar API 20A ile tekrar doğrulanmıştır. Pişmiş etlerde yüksek çıkmasının sebebi ısıya dirençli ve uzun süre canlı kalan sporlar içermesinden kaynaklı olduğu düşünülmüş, ayrıca pişirme sırasında önlemlerin yetersiz ve ambalajlama evresinde dikkat edilmesi gerekliliğinin halk sağlığı açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Kouassi ve ark., 2011).

ABD' nin Pittsburgh eyaletinde 2011 yılında yapılan bir çalışmada 3 farklı kasaptan 102 et örneği (20 sığır eti, 2 bizon eti, 22 tavuk eti, 2 koyun eti, 41 domuz eti, 10 hindi ve 5 dana eti) toplanmıştır. İki örnekten *C. difficile* izole edilmiştir (Curry ve ark., 2012).

Rodriguez ve ark. (2014)'nin 2012 yılının Ocak-Temmuz ayları arasında Belçika'da yaptıkları çalışmada sığır eti ve domuz etinden hazırlanan 240 çiğ kıyma ve hamburger örnekleri incelenmiş ve domuz eti örneklerinin %4,7'si, sığır eti örneklerinin %2,3'ünden *C. difficile* izole edilmiştir. İzolatlar en fazla 078 ve 027 olmak üzere 4 farklı PCR ribotip içermektedirler.

Rahimi ve ark. (2014)'nin 2012 yılının Nisan ve Kasım ayları arasında İran'da yaptıkları bir çalışmada 660 çiğ et örneği (sığır eti, inek eti, koyun eti, keçi eti, bizon eti ve deve eti) 49 farklı kasaptan toplanmıştır. Örneklerin %2'sinde (13) *C. difficile* tespit edilmiştir. Yedi izolat (%53,9) ribotip 078, dört izolat tcdA ve tcdB pozitif, bir izolat ise sadece tcdB pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışma bizon etinde yapılan ilk çalışma olup, *C. difficile*'in farklı et türlerindeki varlığının araştırıldığı geniş kapsamlı bir çalışmadır.

Teksa'sta satışa sunulan deniz ürünlerinde *C. difficile* varlığının araştırıldığı çalışmada 67 örnek analize alınmıştır. Analiz sonucunda *C. difficile* olarak tanımlanan izolatların ikisi toksinotip V, biri de toksinotip XII olarak belirlenmiştir (Norman ve ark., 2014).

C. difficile'in gıdalardan izolasyon aralığının geniş olmasının birçok nedeni bulunmaktadır. Coğrafi dağılımın farklı olmasından dolayı gıdalarda *C. difficile* ribotipleri ve yaygınlığı farklı olmaktadır. Yine farklı örnek toplama yöntemleri ve analiz yöntemlerinin farklı olması da bu duruma etki etmektedir. Tüm çalışmalara bakarak şunları söylemek mümkün olabilir ki; gıdalarda *C. difficile* sporları bulunmaktadır ve yine birçok çalışmada bu sporların etlere uygulanan ısı ile işleme de kaybolmadığı görülmüştür. Ayrıca sporların bulaşma kaynağı tam bilinmezken, kesim sırasında hayvanın dokularından, kesimhanede çalışanların ellerinden kontamine olabilir (Otten ve ark., 2010).

2.7. Gıdalardan *C. difficile*'in İzolasyonu ve Tanımlanması

C. difficile'in gıdalardan izolasyonunda genel olarak izlenen yol; selektif sıvı besiyerinde gerçekleştirilen zenginleştirme aşamasından sonra spor oluşturmeyen bakterileri elimine etmek için alkol şoku uygulanması ve ardından selektif katı besiyerine ekim yapılması şeklindedir. Selektif katı besiyerinde gelişen tipik koloniler izole edilip morfolojik, biyokimyasal ve serolojik testler ile doğrulanmaktadır. Selektif zenginleştirme ortamı olarak %0,1 sodyum taurokolat ilave edilmiş CDMN (Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin) Broth (Weese ve ark., 2009; Jöbstl ve ark., 2010; Metcalf ve ark., 2010a; Metcalf ve ark., 2010b; Weese ve ark., 2010; Metcalf ve ark., 2011), %0,1 sodyum taurokolat ilave edilmiş CCF (Cycloserine Cefoxitin Fructose) Broth (Harvey ve ark., 2011), %0,1 sodyum taurokolat ve %0,5 lizozim ilave edilmiş CCM (Cycloserine Cefoxitin Mannitol) Broth (Curry ve ark., 2012), %0,1 sodyum taurokolat ve at kanı ilave edilmiş Clostridium Difficile Broth (Rodriguez-Palacios ve ark., 2007; de Boer ve ark., 2011) besiyerleri kullanılmaktadır. Bahsedilen besiyerlerine ilave edilen sodyum taurokolat sporların çimlenmesini teşvik ettiği için izolasyonu kolaylaştırmaktadır (Brazier ve Boriello, 2000).

Selektif zenginleştirme besiyeri anaerobik koşullarda 37°C inkübe edilmekte olup, süre 2-10 gün arasında değişmektedir. Selektif sıvı besiyerinde yapılan zenginleştirme aşamasından sonra sporsuz bakterileri elimine etmek amacıyla alkol şoku uygulanmaktadır. Bu amaçla zenginleştirme kültürü 1:1 oranında %96'luk

etanol ile karıştırılıp oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyonun sonunda kültür santrifüjlenir ve elde edilen peletten selektif katı besiyerine sürme yapılır (Weese ve ark., 2009; Weese ve ark., 2010). Bu aşamada en yaygın kullanılan yöntem alkol şoku uygulaması olmakla birlikte, alternatif bir yöntem de ısıl işlemdir. Isı uygulamasında zenginleştirme kültürü 70°C’de 1 saat bekletilir (Jöbstl ve ark., 2010). İzolasyon için selektif katı besiyerleri olarak CDMN (Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin) Agar (Rodriguez-Palacios ve ark., 2007; Weese ve ark., 2009; Weese ve ark., 2010; de Boer ve ark., 2011), Colombia Blood Agar (Metcalf ve ark., 2010a, 2010b; 2011), CCF (Cycloserine Cefoxitin Fructose) Agar (Harvey ve ark., 2011) veya %5 koyun kanı ilave edilmiş Trypticase Soy Agar (Curry ve ark., 2012) besiyerlerinden biri kullanılmaktadır. Selektif katı besiyerine elde edilen peletten ekim yapılır ve 24-48 saat 37°C’de anaerobik inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde gelişen gri renkli, hemolitik olmayan yaygın şekilli şüpheli koloniler izole edilerek morfolojik ve biyokimyasal testler ile doğrulanır. Gram-pozitif, subterminal pozisyonda spor oluşturan, at kanı içeren besiyerinde 365 nm UV ışığı altında sarı-yeşil floresan ışımaya veren, lesitinaz aktivitesi negatif ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi pozitif olan izolatlar *C. difficile* olarak doğrulanır. Ayrıca katı besiyerinde at-fil gübresi kokusu oluşumu bu bakteri için tipik bir özelliktir (Weese ve ark., 2009; Weese ve ark., 2010; Jöbstl ve ark., 2010; de Boer ve ark., 2011).

BÖLÜM 3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada Sakarya’da et ve et ürünleri satışı yapan 57 farklı kasap, market ve restorandan Nisan 2013 – Şubat 2014 tarihleri arasında 101 adet et ve et ürünü örneği toplanmıştır. Örneklerin toplanmasında buz kalıpları kullanılarak soğuk zincirin devamlılığı sağlanmıştır. Örnekler laboratuvara getirilip buzdolabında muhafaza edilmiş ve 24 saat içinde analize alınmıştır. Örnek tipleri ve sayıları Tablo 3.1. de verilmiştir.

Tablo 3.1. Örnek tipleri ve sayısı

Örnek tipi	Adet
Kıyma	31
Tavuk Göğüs Eti	27
Köfte	18
Et Döner (Pişmiş)	12
Tavuk Döner (Pişmiş)	7
Salam	4
Sosis	1
Jambon	1
TOPLAM	101

3.2. Yöntem

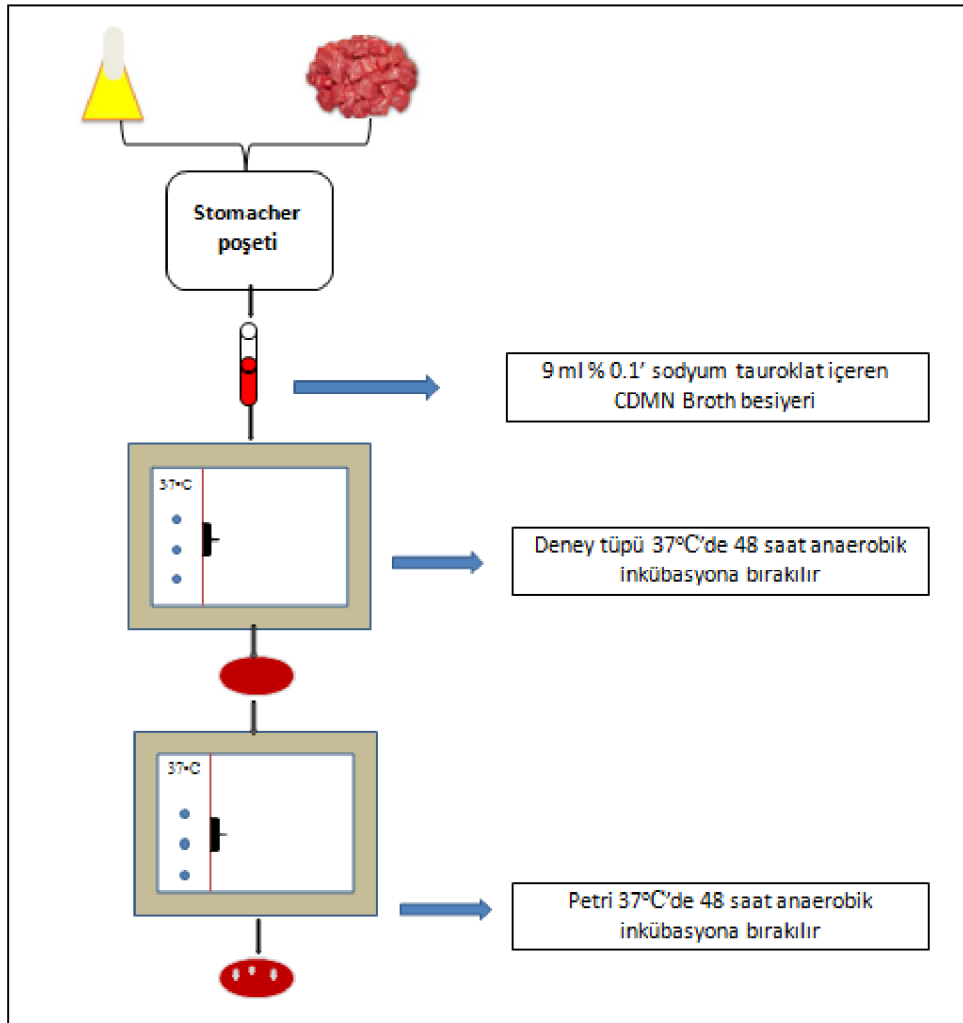
3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

Aseptik koşullarda 25 g örnek tartılarak steril stomacher poşetine konulmuş ve üzerine 25 ml steril tamponlanmış peptonlu su (TPS; Ek 1) ilave edilmiştir. *C. difficile*

anaerob olduğu için beş dakika süreyle elle masaj yapılarak poşet içeriği homojenize edilmiştir.

3.2.2. *C. difficile* izolasyonu

C. difficile izolasyonu Weese ve ark. (2009) tarafından rapor edilen yöntemine göre yapılmış olup işlem aşamaları Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *C. difficile*'in izolasyon aşamaları

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenattan 1 ml alınarak 9 ml %0,1 sodyum tauroklat (Sigma-Aldrich, ABD) katkılı Clostridium Difficile Moksalaktam Norfolaksin (CDMN) Broth (Ek 2) besiyerine ilave edilmiş ve anaerobik koşullar altında 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Anaerobik koşulları sağlamak

amacıyla anaerobik jar (Merck, Darmstad, Almanya) ve Anaerocult A (Merck) kullanılmış olup, anaerotest (Merck) ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.2.). İnkübasyonun ardından spor seleksiyonu için alkol şoku uygulanmıştır. Bu amaçla ön zenginleştirme kültüründen 1 ml alınmış ve üzerine 1 ml susuz etanol ilave edilip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra kültür ve etanol karışımı 4000 devir/dakika hızla 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen peletten steril eküvyon çubuğu yardımıyla *Clostridium Difficile* Moxalactam Norflaxin (CDMN) Agar (Ek 3) besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 48 saat anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişme olan petrilerden alınan koloniler *Clostridium* lar için spesifik olan Tiyoglikolat Broth (Merck, Ek 4) besiyerine aşılanmış ve 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyon bırakılmıştır. Tiyoglikolat Broth besiyerinde aktifleştirilmiş kültürden 850 µl ve steril gliserolden 150 µl alınarak steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Stok kültürler -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Anaerobik jar, Anaerocult A ve Anaerotest

3.2.3. Morfolojik, biyokimyasal ve serolojik doğrulama

3.2.3.1. Morfolojik doğrulama

Örneklerin morfolojik doğrulanması amacıyla ilk olarak Gram boyama işlemi uygulanmıştır. Stok kültür oda sıcaklığına getirilerek çözündürülmesi sağlanmıştır. Stok kültürden 100 µl alınmış ve aktifleştirme amacıyla Tiyoglikolat Broth besiyerine aktarılmıştır. Tüpler anaerobik koşullar sağlanarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bir öze dolusu sıvı besiyeri lam üzerine aktarılmış ve fiksasyon işlemine tabi tutularak lam üzerine sabitlenmiştir. Preparatın yüzeyi kristal viyoletilerle kaplanmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda preparat damıtık suyla yıkanmış ve lugol çözeltisi (Gram iyot çözeltisi) damlatılarak yine 1 dakika boyunca beklenmiş ve damıtık suyla yıkanmıştır. Preparat üzerine %96'lık alkol ilave edilerek 10-15 saniye boyunca bekletilmiş ve damıtık suyla yıkanmıştır. İşlemin ardından preparat karşıt boya olan safranin ile boyanmış ve 30 saniye bekletilerek damıtık suyla yıkanmıştır. Kendiliğinden kurumaya bırakılan preparat immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir. Mavi-mor renkte boyanan bakteriler Gram pozitif, kırmızı renkten boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

Gram boyamanın ardından şüpheli *C. difficile* izolatları Kanlı Agar'da (Ek 5) geliştirilmiştir. Bu amaçla stok kültürden Tiyoglikolat Broth besiyerinde 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyonu yapılmış aktif kültür Kanlı Agar besiyerine 100 µl aktararak, Drigalski spatülüyle yayılmış ve petripler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda at gübresi/ahır kokusu içeren, grimsi beyaz, mat, pürüzlü ve UV ışık (365 nm) altında floresans parlaklık veren koloni oluşturan izolatlar seçilerek diğer tanımlama testleri uygulanmıştır.

Spor boyama için aktifleştirilen kültürlerden Kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 48 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutuları buzdolabında 48-72 saat bekletilerek spor oluşumu teşvik edilmiştir. Kolonilerden öze yardımıyla alınarak lama aktarılmış ve sabitlenmiştir. Bek alevi üzerine kurulan kaynar su banyosu düzeneğine preparat yerleştirilerek %5'lik malaşit yeşili

çözeltiliyle ıslatılmış, üzerine küçük boyutlu kurutma kağıdı yerleştirilip 5 dakika boyunca kurutma kağıdının çözeltiliyle ıslak kalması sağlanmıştır. Süre sonunda preparat yıkanmış ve safranin çözeltiliyle 20-30 saniye bekletirilerek yıkanmıştır. Kurutulan preparat immersiyoñ yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir (Temiz, 1994).

3.2.3.2. L-prolin aminopeptidaz aktivitesi

L- prolin aminopeptidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Pro-Disc (Remel, ABD, R-211357) test kiti kullanılmıştır.

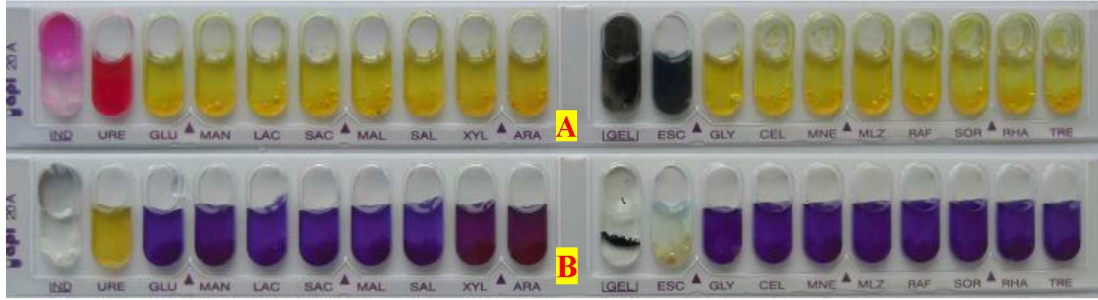
Stok kültür oda sıcaklığına getirilerek çözüldürülmüş ve 100 µl'si Tiyoglikolat Broth besiyerine ilave edilmiştir. Tüpler 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleşen kültürden 100 µl alınmış, Kanlı agar besiyerine aktarılmıştır. Petriler 37°C'de 48 saat anaerobik inkübasyona bırakılarak gelişmesi sağlanmıştır.

Paket içeriğinde yer alan diskler steril bir ortama alınarak aseptik koşullarda steril saf suyla nemlendirilmiştir. Kanlı Agar besiyerinde gelişen koloniler öze yardımıyla alınarak disklere emdirilmiştir. Disklere kolonilerin nüfuz etmesi amacıyla 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Disk yüzeyine Sinamaldehit reaktifi damlatılarak 2 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiş ve pembe-kırmızı renk oluşumu L-prolin aminopeptidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.3. API 20A ile identifikasyon

API 20A (Biomerieux, Fransa) identifikasyon kiti ile izolatların tanımlanması için öncelikle stok kültürden 100 µl alınarak Tiyoglikolat Broth besiyerine aktarılmıştır. 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyonun ardından aktif kültürden 100 µl Kanlı Agar besiyerine aktarılarak Drigalski spatülüyle yayılmış ve 37°C'de 48 saat süreyle anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. Test kabının alt haznesine 5 ml damıtık su ilave edilmiştir. Test şeridi ambalajından aseptik şartlarda çıkarılarak kabına yerleştirilmiştir. Bu sırada API ampülü kırılarak açılmıştır. Kanlı Agarda gelişen kültürler eküvyon çubuğu yardımıyla alınarak McFarland 3 bulanıklığına eşdeğer

bulanıklık derecesine getirilmiştir. Ampül içeriği steril pipet yardımıyla test şeridindeki 21 kuyucuğa hava boşluğu kalmayacak şekilde konulmuştur (Şekil 3.3.). İndol kuyucuğuna mineral yağ ilave edilirken, jelatin kuyucuğu da tamamen doldurularak 37°C’de 48 saat anaerobik inkübasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 3.3. API 20A identifikasyon testinin görünümü (<http://www.tgw1916.net/Tests/api.html>, Erişim Tarihi: 15.05.2014) (A: pozitif görünüm, B: negatif görünüm)

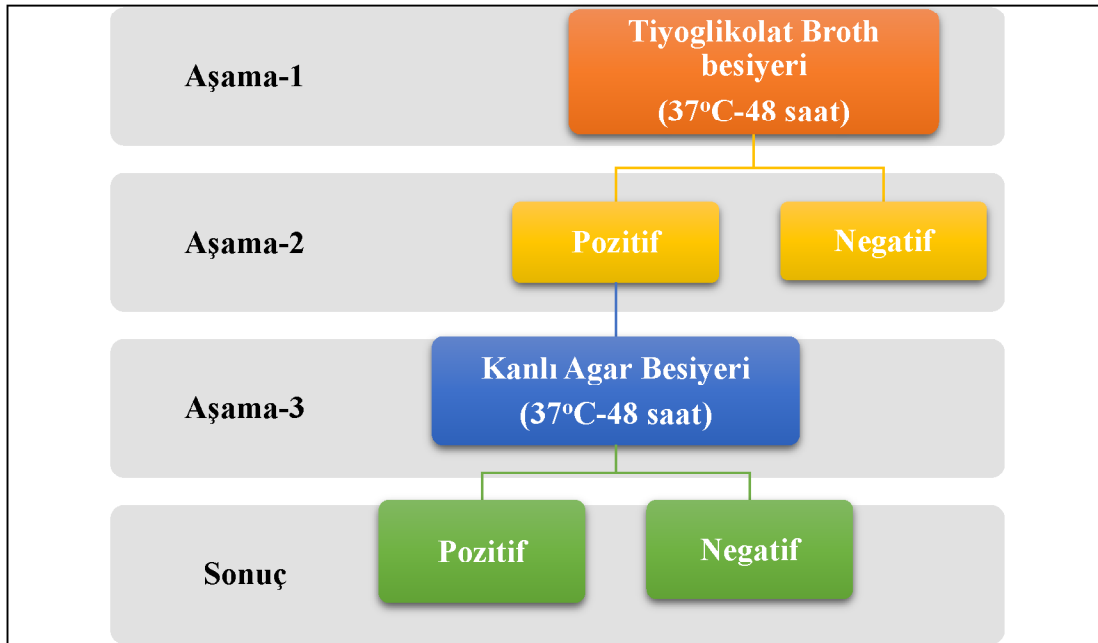
İnkübasyon sonunda üre, jelatin ve eskülin kuyucuklarındaki okumalar hemen yapılmıştır. Karbonhidrat içeren kuyucuklara Bromocresol Purple (BCP) ilave edilerek sarı kuyucuklar pozitif, morumsu kuyucuklar negatif olarak değerlendirilmiştir. İndol kuyucuğuna Xylene (XYL) reaktifi ilave edilerek 2-3 dakika bekletirilmiş ve Ehrlich (EHR) reaktifi ilave edilerek 5 dakika sonra kırmızı-pembe renk oluşumu pozitif, sarımsı renk oluşumu negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca pozitif olarak belirlenen bir kuyucuğa birkaç damla %3'lük H₂O₂ ilave edilerek 30 dakika bekletilmiş ve baloncuk oluşumları pozitif olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda pozitif ve negatif sonuçlara göre API 20A profilleri çıkarılmış ve apiweb (<http://apiweb.biomerieux.com>) çevrimiçi ortamında değerlendirilmiştir (Şekil 3.4.).

Şekil 3.4. API 20A ile identifikasyonda profil belirleme şablonu

3.2.3.4. Serolojik doğrulama

Serolojik doğrulama amacıyla ticari olarak satılan Difficile Test Kiti (Oxoid, UK, DR11907) kullanılmıştır (Şekil 3.5.).

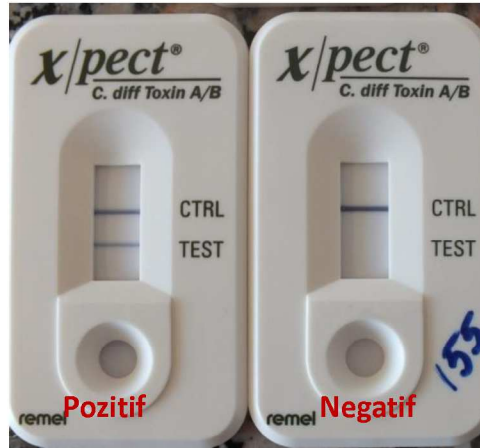
Lateks aglütinasyon testinin yapılması amacıyla stok kültürden 100 µl alınarak Tiyoglikolat Broth besiyerine aktarılmıştır. 37°C’de 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Aseptik koşullarda test kartındaki bölmeye %0,85’lik fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) konsantrasyonundaki tuz çözeltisinden 1 damla damlatılmıştır. Üzerine besiyerinde gelişmesi sağlanan kültürden 1 damla damlatılarak steril bir öze yardımıyla karışması sağlanmıştır. Üzerine 1 damla *C. difficile* reaktif damlatılarak 2 dakika içerisinde aglütine olmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Aglütine olan yani pozitif sonuç veren izolatlardan Kanlı Agar besiyerine ekim yapıp 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve katı besiyerinde gelişimi sağlanmıştır. Yukarıda anlatılan işlem katı besiyerinde gelişen kültür kullanılarak tekrar edilmiş ve böylece pozitif test sonucu doğrulanmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Lateks aglütinasyon testi analiz akış şeması

3.2.4. Toksin tipinin belirlenmesi

Toksisiteyi belirlemek amacıyla *C. difficile* Toksin A/B testi (REF- R24640, Xpect, ABD) kullanılmıştır. Bu doğrultuda stok kültür oda sıcaklığına getirilerek çözüldürülmüş ve 100 µl'si Tiyoglikolat Broth besiyerine ilave edilmiştir. Tüpler 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleştirilen tüplerden 1 ml alınmış ve Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Ek 6) besiyerine aktarılmış ve 37°C'de 72 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda, steril plastik tüplere 200 µl BHI Broth besiyerinde gelişen kültür ilave edilmiş ve üzerine 5 damla Konjüge Reaktif A, 5 damla Konjüge Reaktif B damlatılarak karışması sağlanılmıştır. Karışımdan 200 µl alınarak kitin örnek bölümüne aktarılmıştır. 20 dakika süre sonunda kontrol ve test çizgilerinin oluşup oluşmamasına göre "toksin pozitif/negatif" şeklinde yorum yapılmıştır (Şekil 3.6.).

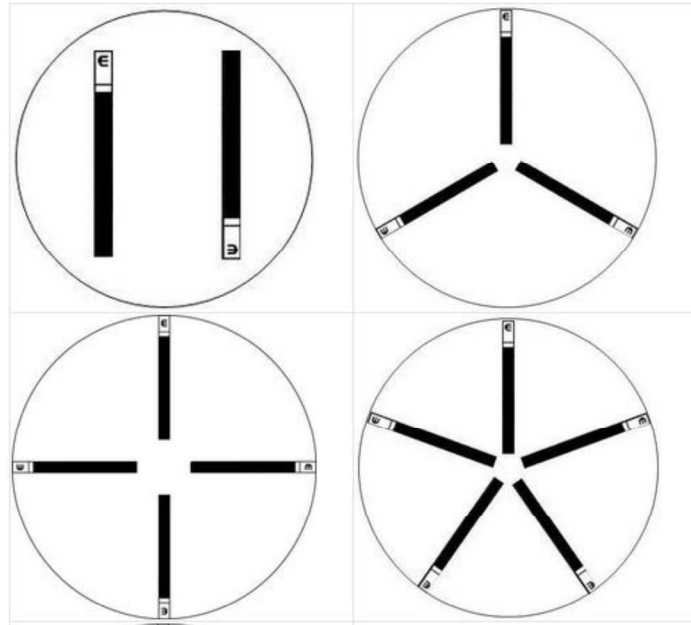


Şekil 3.6. Toksin A/B testinin pozitif ve negatif görüntüsü

3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Epsilon-test (E-test, Biomerieux) kullanılmıştır. Stoğa alınmış *C. difficile* kültürleri Tiyoglikolat Broth besiyerine aşılanmış ve 37°C'de 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Gelişen kültürden 100 µl Kanlı Agar besiyerine aktararak anaerobik koşullar altında 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak gelişmesi sağlanmıştır. Katı besiyerinde gelişme gösteren koloniler eküvyon çubuğu yardımıyla %0,85 NaCl içeren fizyolojik tuzlu su (Ek-7) içerisine aktararak McFarland 1'e eşdeğer bulanıklıkta olması

sağlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan at kanı ilave edilmiş Mueller-Hinton Agar (EK-8) besiyerine sürme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Besiyerinin kültürü emmesinden hemen sonra steril pens yardımıyla klindamisin (CM), metranidazol (MZ), moksifloksasin (MX), vankomisin (VA) ve tetrasiklin (TC) antibiyotik şeritleri üreticinin tavsiye ettiği şekilde petriye yerleştirilmiştir (Şekil 3.7.). Petriler anaerobik ortam sağlanarak 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra E-test şeritlerindeki gelişmesine göre antibiyotik duyarlılıkları ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.7. E-test şeritlerinin petriye yerleştirilme şekilleri

BÖLÜM 4. BULGULAR

Sakarya ilinde 57 farklı market, kasap ve restorandan temin edilen et ve et ürünü örneklerinde *C. difficile* izolasyonu amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1, 4.2 ve 4.3'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

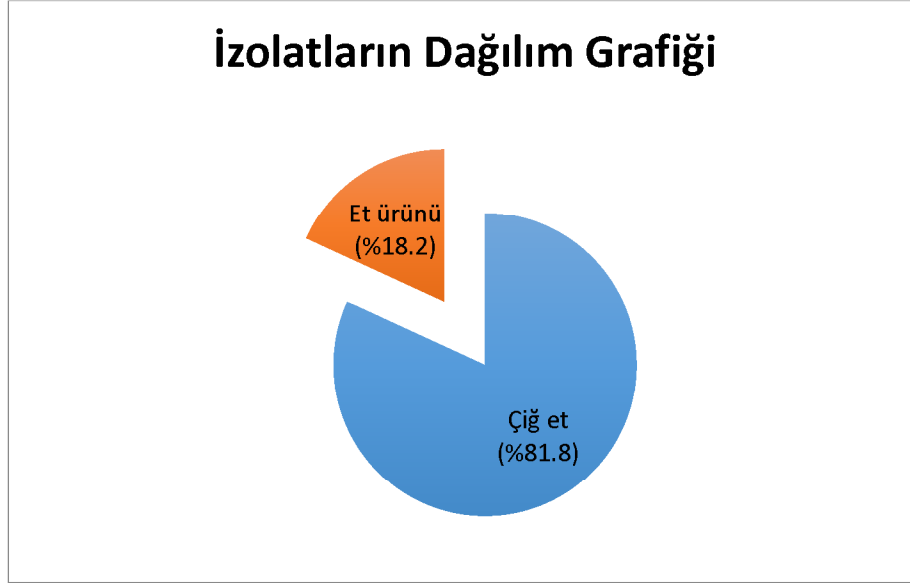
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Analize alınan 101 adet et ve et ürünü örneğinden toplam 124 izolat elde edilmiştir (Tablo 4.1). Bu izolatlar 44 örneğe ait olup, diğer 57 örnekten ön zenginleştirme ve alkol şoku sonrasında CDMN Agar'a yapılan ekim sonucunda koloni gelişimi gözlenememiştir.

Tablo 4.1. Örnek tipleri ve izolat dağılımı

Örnek tipi	Toplam örnek sayısı	Koloni izole edilen örnek sayısı	Koloni gelişimi olmayan örnek sayısı
Kıyma	31	14	17
Tavuk göğüs eti	27	12	15
Köfte	18	10	8
Et Döner (pişmiş)	12	3	9
Tavuk Döner (pişmiş)	7	3	4
Salam	4	2	2
Sosis	1	0	1
Jambon	1	0	1
TOPLAM	101	44	67

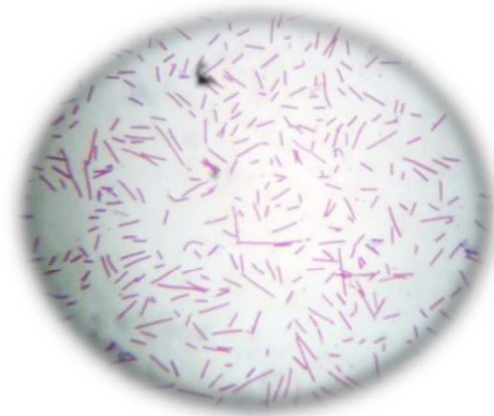
Koloni izole edilen örneklerin %81,8'i çiğ et (kıyma, tavuk göğüs eti, köfte), %18,2'si tüketime hazır ısıtılmış işlem görmüş veya pişmiş et ürünleridir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. İzolat dağılım grafiği

4.1.1. Morfolojik doğrulama ve L-proline aminopeptidaz aktivitesi

İzolatların hepsi Gram boyama işlemiyle doğrulanmıştır. Bu doğrulama aşamasında örneklerden birinin Gram boyama sonucu şekilde görüldüğü gibidir (Şekil 4.2.). Gram boyama sonuçlarını içeren Tablo 4.2.'de görüldüğü üzere izolatların 10 tanesi Gram negatif olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. İzolatlardan birine ait mikroskop görüntüsü

Önceki bölümde belirtildiği şekliyle izolatların Kanlı Agar'da oluşturduğu karakteristik koku ve koloni morfolojisi belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Ayrıca izolatların

Kanlı Agar'da floresan ışına vermesi durumuna göre sonuçlar Tablo 4.2'de belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Kanlı agarda *C. difficile* gelişmesi

4.1.2. L-prolin aminopeptidaz testi

Şüpheli olan izolatlar L-prolin aminopeptidaz testine tabi tutulmuştur. Buna göre pembemsi renk görülen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.). İzolatların 40 tanesi (%32,3) pozitif sonuç vermiştir. Pozitif izolatların 19 tanesi kıyma, 15 tanesi tavuk eti, 2 tanesi et döner, 3 tanesi köfte, 1 tanesi salam örneklerine aittir. Ayrıca 14 izolat da şüpheli (pozitif/negatif) sonuç vermiştir.



Şekil 4.4. L-prolin aminopeptidaz testi pozitif sonuç görüntüsü

İzolatların Gram boyama, Karakteristik görüntüsü, UV ışın altındaki görünüşü ve L-prolin aminopeptidaz sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları (KY: Kıyma Eti, TV: Tavuk Göğüs Eti, MB: Köfte, SA: Salam, TD: Tavuk Döner, ED: Et Döner, +/-: Şüpheliler)

İzolat Numarası	Gram Boyama	Çubuk / Kok	Kanlı Agarda Tipik Koloni Oluşumu	UV (365 nm)	L-prolin Aminopeptidaz Aktivitesi
KY001	+	Çubuk	+	+	+
KY002	+	Çubuk	+	+	+
KY003	+	Kok	+	+	+
KY004	+	Çubuk	+	+	+
KY005	-	Kok	+	+	+
TV006	+	Çubuk	+	+	+
TV007	-	Kok	+	+	+
TV008	+	Çubuk	+	+	+/-
TV009	+	Çubuk	+	+	+/-
KY010	+	Çubuk	+	+	-
KY011	+	Çubuk	+	+	+
KY012	+	Çubuk	+	+	+
KY013	+	Çubuk	+	+	+
KY014	+	Çubuk	+	+	+
TV015	-	Çubuk	+	+	+
KY016	+	Çubuk	+	+	+
TV017	+	Çubuk	+	+	+
TV018	+	Kok	+	+	+
TV019	+	Çubuk	+	+	+
KY020	+	Çubuk	+	+	+
KY021	+	Çubuk	+	+	+
MB022	+	Çubuk	+	+	+
MB023	+	Çubuk	+	+	+

Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları (devamı)

İzolat Numarası	Gram Boyama	Çubuk / Kok	Kanlı Agarda Tipik Koloni Oluşumu	UV (365 nm)	L-prolin Aminopeptidaz Aktivitesi
MB024	+	Çubuk	+	+	-
MB025	+	Çubuk	+	+	+
TV026	-	Kok	+	+	+/-
TV027	+	Çubuk	+	+	+
MB028	+	Çubuk	+	+	-
KY029	+	Çubuk	+	+	-
MB030	+	Çubuk	+	+	-
MB031	+	Çubuk	+	+	-
TD032	+	Çubuk	+	+	-
SA033	+	Çubuk	+	+	-
SA034	+	Çubuk	+	+	+
MB035	+	Çubuk	+	+	-
MB036	+	Çubuk	+	+	-
MB037	+	Çubuk	+	+	-
MB038	+	Çubuk	+	+	-
KY039	-	Çubuk	+	+	+/-
TD040	-	Çubuk	+	+	+/-
TD041	+	Çubuk	+	+	-
TD042	+	Çubuk	+	+	-
TD043	+	Çubuk	+	+	-
TD044	+	Çubuk	+	+	-
ED045	+	Çubuk	+	+	+/-
ED046	+	Çubuk	+	+	+
ED047	+	Çubuk	+	+	+/-
ED048	+	Çubuk	+	+	-
ED049	+	Çubuk	+	+	-
TV050	+	Çubuk	+	+	-
TV051	+	Çubuk	+	+	-

Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları (devamı)

İzolat Numarası	Gram Boyama	Çubuk / Kok	Kanlı Agarda Tipik Koloni Oluşumu	UV (365 nm)	L-prolin Aminopeptidaz Aktivitesi
TV052	+	Kok	+	+	+
TV053	+	Çubuk	+	+	-
TV054	+	Çubuk	+	+	-
KY055	+	Çubuk	+	+	-
KY056	+	Çubuk	+	+	-
KY057	+	Çubuk	+	+	-
KY058	+	Çubuk	+	+	-
KY059	+	Çubuk	+	+	-
KY060	+	Çubuk	+	+	-
TV061	+	Çubuk	+	+	-
TV062	+	Çubuk	+	+	-
TV063	+	Çubuk	+	+	+
KY064	+	Çubuk	+	+	-
KY065	+	Kok	+	+	+
KY066	+	Çubuk	+	+	+/-
KY067	+	Çubuk	+	+	+
KY068	+	Çubuk	+	+	+/-
KY069	-	Çubuk	+	+	+/-
KY070	+	Çubuk	+	+	-
MB071	+	Çubuk	+	+	-
MB072	+	Çubuk	+	+	-
MB073	+	Çubuk	+	+	-
MB074	+	Çubuk	+	+	-
MB075	+	Çubuk	+	+	-
TV076	+	Çubuk	+	+	-
TV077	+	Çubuk	+	+	+
TV078	+	Çubuk	+	+	+/-
TV079	+	Çubuk	+	+	-

Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları (devamı)

İzolat Numarası	Gram Boyama	Çubuk / Kok	Kanlı Agarda Tipik Koloni Oluşumu	UV (365 nm)	L-prolin Aminopeptidaz Aktivitesi
KY080	+	Çubuk	+	+	-
KY081	+	Çubuk	+	+	-
ED082	+	Çubuk	+	+	-
ED083	+	Çubuk	+	+	-
ED084	-	Çubuk	+	+	+/-
ED085	+	Çubuk	+	+	-
ED086	+	Çubuk	+	+	-
ED087	+	Çubuk	+	+	-
TD088	+	Çubuk	+	+	-
TD089	+	Çubuk	+	+	-
TD090	+	Çubuk	+	+	-
TD091	+	Çubuk	+	+	-
TD092	+	Çubuk	+	+	-
KY093	+	Çubuk	+	+	-
KY094	-	Çubuk	+	+	+
KY905	+	Çubuk	+	+	+
KY096	+	Çubuk	+	+	-
KY097	+	Çubuk	+	+	-
KY098	+	Çubuk	+	+	-
KY099	+	Çubuk	+	+	-
KY100	+	Çubuk	+	+	+
KY101	+	Çubuk	+	+	-
TV102	+	Çubuk	+	+	-
TV103	+	Çubuk	+	+	-
TV104	+	Çubuk	+	+	-
TV105	+	Çubuk	+	+	-
TV106	-	Çubuk	+	+	+
TV107	+	Çubuk	+	+	-

Tablo 4.2. Gram boyama, morfolojik inceleme ve L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonuçları (devamı)

İzolat Numarası	Gram Boyama	Çubuk / Kok	Kanlı Agarda Tipik Koloni Oluşumu	UV (365 nm)	L-prolin Aminopeptidaz Aktivitesi
TV108	+	Kok	+	+	+
TV109	+	Çubuk	+	+	-
TV110	+	Çubuk	+	+	+
TV111	+	Çubuk	+	+	-
TV112	+	Çubuk	+	+	+
TV113	+	Çubuk	+	+	-
TV114	+	Çubuk	+	+	+/-
KY115	+	Çubuk	+	+	+
KY116	+	Çubuk	+	+	+
KY117	+	Çubuk	+	+	-
MB118	+	Çubuk	+	+	-
MB119	+	Çubuk	+	+	+/-
MB120	+	Çubuk	+	+	-
KY121	+	Çubuk	+	+	+
MB122	+	Çubuk	+	+	-
MB123	+	Çubuk	+	+	-
MB124	+	Çubuk	+	+	-

4.1.3. İzolatların API-20 A ile identifikasyon sonuçları

L-prolin aminopeptidaz testinde pozitif sonuç veren 40 izolat ile şüpheli sonuç veren 14 izolat API 20A ile tanımlanmıştır. Sonuçlara göre MB025 ve ED046 numaralı, sırasıyla köfte ve pişmiş et dönere ait izolatlar *C. difficile* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.3.; Şekil 4.5.).

Tablo 4.3. API 20A identifikasyonu sonuçları

İzolat Numarası	İzole Edilen Örnek	API 20A İdentifikasyonu
KY001	Kıyma	<i>Gemella morbillorum</i>
KY002	Kıyma	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>
KY003	Kıyma	TANIMLANAMAYAN
KY003	Kıyma	TANIMLANAMAYAN
KY004	Kıyma	<i>Clostridium spp.</i>
KY005	Kıyma	TANIMLANAMAYAN
TV006	Tavuk	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
TV007	Tavuk Eti	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
TV008	Tavuk Eti	<i>Clostridium tertium</i>
TV009	Tavuk Eti	<i>Bifidobacterium spp</i>
KY011	Kıyma	<i>Clostridium clostridioforme</i>
KY012	Kıyma	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
KY013	Kıyma	<i>Clostridium botulinum/sporogenes</i>
KY014	Kıyma	<i>Clostridium spp.</i>
TV015	Tavuk Eti	<i>Clostridium ramosum</i>
KY016	Kıyma	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
TV017	Tavuk Eti	<i>Actinomyces naeslundii</i>
TV018	Tavuk Eti	<i>A. naeslundii</i>
TV019	Tavuk Eti	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
KY020	Kıyma	<i>A.naeslundii</i>
KY021	Kıyma	<i>Clostridium spp.</i>
MB022	Köfte	<i>Actinomyces israelii</i>
MB023	Köfte	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
MB025	Köfte	<i>C. difficile</i>
TV026	Tavuk Eti	TANIMLANAMAYAN
TV027	Tavuk Eti	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
SA034	Salam	<i>Clostridium spp.</i>
KY039	Kıyma	<i>A. naeslundii</i>
TD040	Pişmiş Tavuk Döner	<i>A. naeslundii</i>
ED045	Pişmiş Et Döner	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>

Tablo 4.3. API 20A identifikasyonu sonuçları (devamı)

İzolat Numarası	İzole Edilen Örnek	API 20A İdentifikasyonu
ED046	Pişmiş Et Döner	<i>C. difficile</i>
ED047	Pişmiş Et Döner	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
TV052	Tavuk Eti	<i>Bifidocaterium spp.</i>
TV063	Tavuk Eti	<i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>
KY065	Kıyma	TANIMLANAMAYAN
KY066	Kıyma	<i>A. naeslundii</i>
KY067	Kıyma	<i>Bifidobacterium spp</i>
KY068	Kıyma	<i>L. acidophilus/jensenii</i>
KY069	Kıyma	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
TV077	Tavuk Eti	TANIMLANAMAYAN
TV078	Tavuk Eti	<i>Bifidocaterium spp</i>
ED084	Pişmiş Et Döner	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
KY094	Kıyma	<i>Prevotella melaninogenica</i>
KY095	Kıyma	<i>Clostridium septicum</i>
KY100	Kıyma	<i>C. septicum</i>
TV106	Tavuk Eti	<i>A. israeli</i>
TV108	Tavuk Eti	<i>Bifidobacterium spp.</i>
TV110	Tavuk Eti	<i>Clostridium baratti</i>
TV112	Tavuk Eti	<i>Bifidobacterium spp.</i>
TV114	Tavuk Eti	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
KY115	Kıyma	<i>Clostridium spp.</i>
KY116	Kıyma	TANIMLANAMAYAN
MB119	Köfte	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>
KY121	Kıyma	<i>C. botulinum/sporogenes</i>

VERY GOOD IDENTIFICATION						
Strip	API 20 A V4.0					
Profile	4 1 2 0 4 1 0 3					
Note						
Significant taxa	% ID	T	Tests against			
<i>Clostridium difficile</i>	99.4	0.9	SAL	20%		
Next taxon	% ID	T	Tests against			
<i>Clostridium innocuum</i>	0.5	0.49	CEL	99%	MLZ	4%

Şekil 4.5. ED046 numaralı izolata ait API 20A sonucu

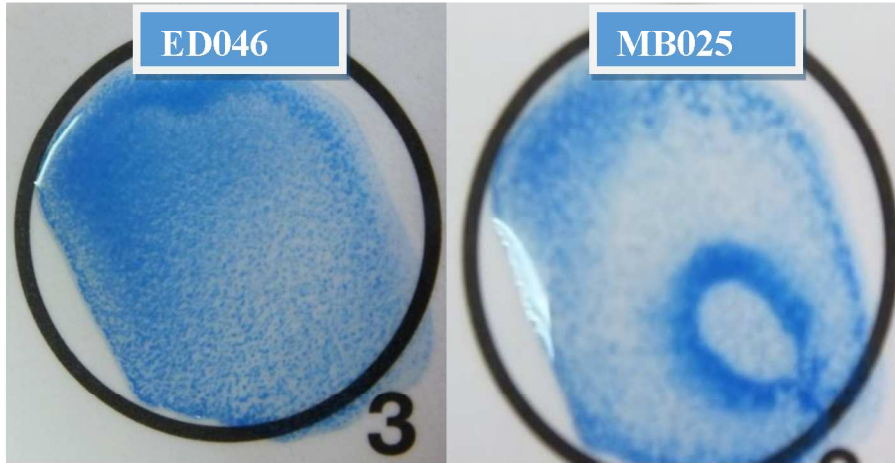
Ayrıca API 20A ile identifikasyon sonucunda belirlenen bakterilerin izolatlar içindeki % dağılımı Tablo 4.4.'te gösterilmiştir. Buna göre L-prolin aminopeptidaz testi ile pozitif sonuç veren izolatların %26'sı *Clostridium beijerinckii/butyricum* olarak tanımlanmıştır. Buna karşın izolatların sadece %3,7'si *C. difficile* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.4. API 20A ile belirlenen bakteri cinsleri ve yüzdeleri

API 20A ile İdentifikasyon Sonucu	İzolot Sayısı	İzolot Yüzdesi (%)
<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	14	26,0
Tanımlanamayan	7	13,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6	11,1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	6	11,1
<i>Clostridium spp.</i>	5	9,3
<i>Clostridium botulinum/sporogenes</i>	2	3,7
<i>Actinomyces israelii</i>	2	3,7
<i>Clostridium difficile</i>	2	3,7
<i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>	2	3,7
<i>Clostridium septicum</i>	2	3,7
<i>Gemella morbillorum</i>	1	1,8
<i>Clostridium tertium</i>	1	1,8
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	1,8
<i>Clostridium ramosum</i>	1	1,8
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	1,8
<i>Clostridium baratti</i>	1	1,8

4.1.4. Serolojik doğrulama

L-prolin aminopeptidaz testi ve API 20A ile identifikasyon sonuçlarına *C. difficile* olarak tanımlanan iki izolata lateks aglütinasyon testi uygulanmış olup, izolatların her ikisi de pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Pozitif lateks aglütinasyon testi görüntüsü

4.2. Toksin Belirleme

API test kitiyle ve lateks aglütinasyonu ile doğrulanan iki *C. difficile* suşunun da toksijenik olmadığı belirlenmiştir.

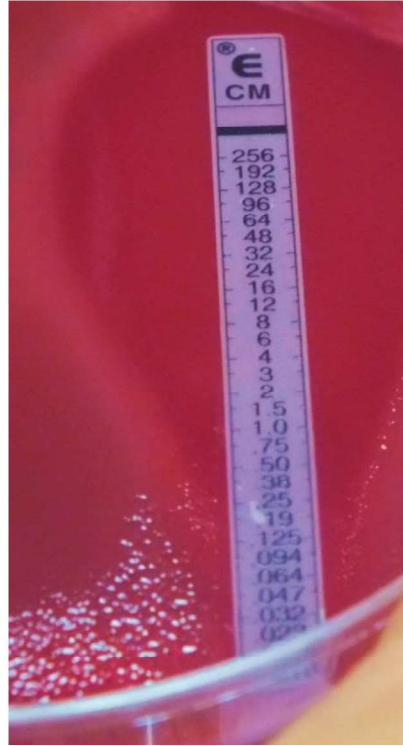
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

C. difficile olarak tanımlanan MB025 numaralı izolatın metranidazol, moksifloksasin, tetrasiklin ve klindamisine duyarlı, buna karşın vankomisine dirençli olduğu saptanmıştır (Tablo 4.5.; Şekil 4.7.).

Diğer yandan et döner örneğinden izole edilen ED046 numaralı izolat metranidazole dirençli iken, diğer 4 antibiyotiğe duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5. Antibiyotik duyarlılık ve MİK ($\mu\text{g/ml}$) sonuçları

Antibiyotik	İzolat No	
	MB025	ED046
Metranidazol	Duyarlı/0,125	Dirençli/-
Vankomisin	Dirençli/-	Duyarlı/ 4
Moksifloksasin	Duyarlı/0,75	Duyarlı/0,38
Tetrasiklin	Duyarlı/48	Duyarlı/0,047
Klindamisin	Duyarlı/0,6	Duyarlı/0,19



Şekil 4.7. ED046 izolatına ait E-test görüntüsü

ED046 izolatına ait MİK değerleri klindamisin 0,19 µg/ml, moksifloksasin 0,38 µg/ml, vankomisin 4 µg/ml ve tetrasiklin 0,047 µg/ml olarak belirlenmiştir. MB025 izolatına ait MİK değerleri ise moksifloksasin 0,75 µg/ml, klindamisin 0,6 µg/ml, metranidazol 0,125 µg/ml, tetrasiklin 48 µg/ml olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

C. difficile patojenik *Clostridium* türlerinden birisidir. Bağırsak sisteminde hastalıklara yol açarak insanlarda salgınlara neden olan önemli patojenlerden biri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bağırsak yapısı insanlara benzerlik gösteren hayvan bağırsaklarında da bulunabilmektedir. Bu bakımdan hayvanlarda görülen bağırsak enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Daha çok çiftlik hayvanları, kümes hayvanları ve evcil hayvanlar hem taşıyıcı olarak hem de olası bulaşma kaynağı olarak görülmektedir. İnsanlarda salgına yol açan ribotip 027 ve ribotip 078'ün gıdalarda da bulunabilmesi gıdaların *C. difficile* açısından potansiyel tehlike olduğunun göstergesi olmuştur. Hem çiğ gıdalarda hem de pişmiş gıdalarda *C. difficile*'e rastlanmaktadır (Gould ve Limbago, 2010; Weese, 2010; Rodriguez-Palacios ve ark., 2013).

Bu amaçla yapılan bu çalışmada Sakarya ilinde faaliyet gösteren 57 farklı market, restoran ve kasaptan tedarik edilen kıyma, tavuk göğüs eti, köfte, pişmiş et döner, pişmiş tavuk döner, salam, sosis ve jambon olmak üzere toplam 101 adet et ve et ürünü analize alınmıştır. Örneklere identifikasyon amacıyla Gram boyama, Kanlı Agar'da karakteristik görünüm ve koku, L-prolin aminopeptidaz aktivitesi testi ve API 20A test kitleri, toksinliğin belirlenmesi amacıyla toksin kiti ve antibiyotik duyarlılığını belirlenmesi amacıyla vankomisin, tetrasiklin, moksiflaksin, metranidazol ve klindamisin E-test antibiyotik şeritleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda *C. difficile* izolatlarını doğrulanmasında anahtar yöntem olan L-prolin aminopeptidaz aktivitesi kullanılmıştır. İzolatların %32,3'ü L-prolin aminopeptidaz aktivitesi sonucu pozitif çıkmıştır. Gıdalarda *C. difficile* belirlenmesi üzerine yapılan birçok çalışmada izolatların L-prolin aminopeptidaz aktivitesini belirlendikten hemen sonra PCR ile tiplendirme çalışması yapılmıştır (Rodriguez-Palacios ve ark., 2007;

Rodriguez-Palacios ve ark., 2009; Songer ve ark., 2009; Weese ve ark., 2009; Metcalf ve ark., 2010a; Rahimi ve ark., 2014). Jöbstl ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmada tanımlama aşamasında L-prolin aminopeptidaz aktivitesi testini takiben biyokimyasal test kiti olan API 32A ile de tanımlanması sağlanmış ve en son PCR ile doğrulanmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlara baktığımızda şüpheli olarak belirlenen 54 izolatin yalnızca 2 tanesi API 20A ile *C. difficile* olarak tanımlanmıştır. Gıdalarda *C. difficile* belirlenmesi amacıyla bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda izolatlar, tanımlama aşamasında ya birden çok test yöntemiyle tanımlanmalıdır veya tiplendirme çalışmalarıyla desteklenmelidir.

API 20A test kitinin kullanımıyla ilgili yapılan bir çalışmada 88 *C. difficile* izolatı incelenmiş ve 84 izolat (%95,5) *C. difficile* olarak belirlenmiş duyarlılığının %95,5 olduğu rapor edilmiştir (Head ve Ratnam, 1988). Kouassi ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada yalnızca API 20A ile tanımlama yapılmış ve ardından herhangi bir tiplendirme çalışması veya genetik test yapılmamıştır. Yine aynı bölgede yapılan çalışmada API 20A ile belirlenmiş ve PCR ile türleri belirlenmiştir (Kouassi ve ark., 2014).

C. difficile olarak tanımlanan her iki suşun da toksijenik olmadığı belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda gıdalardan izole edilen izolatlarda toksijenik suşların oranının yüksek olduğu görülmektedir (Songer ve ark. 2009; Rodriguez ve ark., 2014; Rahimi ve ark., 2014). Test kitinin duyarlılığıyla ilgili yapılan klinik çalışmalara bakıldığında %69-95 olduğu saptanmıştır (Planche ve ark., 2008).

Çalışmaların önemli bir kısmında tiplendirme amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ribotip yöntemi kullanılmıştır. PCR ribotip yönteminin ayırt edebilme yeteneğinin yüksek olması, kullanımının kolay olması ve tekrarlanabilme avantajlarına sahip olması tercih edilmesinin en önemli nedenleri arasındadır. Gıdalarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında klinik *C. difficile* ribotipleri olan Ribotip 027 ve Ribotip 078 gıdalarda bulunma sıklığının yüksek olduğu görülmüştür (de Boer ve ark., 2011). Sonraki yapılacak çalışmalarda tiplendirme analizinin yapılması önerilmektedir.

Yaptığımız çalışmanın analiz sonuçlarına göre 101 et örneğinin 2 tanesinden (%1,98) *C. difficile* izole edilmiştir. *C. difficile* olarak tanımlanan izolatlar köfte ve pişmiş et döner örneklerine aittir.

Gıdalarda *C. difficile*'in bulunma aralığı %0-62,5 arasında değişmektedir (Al Saif ve Brazier, 1996; Visser ve ark., 2007; Indra ve ark., 2009; Songer ve ark., 2009; Weese ve ark., 2009; Koussai ve ark., 2011; Rahimi ve ark., 2014; Rodriguez ve ark., 2014). Avusturya'da 2008 yılında satışa sunulan 84 çiğ et örneğinde yapılan çalışmada *C. difficile*'e rastlanmamıştır (Indra ve ark., 2009).

Von Abercron ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *C. difficile* varlığı açısından incelenen domuz eti, hamburger, koyun eti, tavuk etinden izole edilmediği ancak sığır kıymasından izole edildiği belirtilmiştir. Çalışmada izolasyon oranı %2,4 (2/82) olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki örneğin toksin üretebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir.

de Boer ve ark. (2011)'nin *C. difficile* varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 500 sığır eti, dana eti, kuzu eti ve tavuk eti örneği incelenmiş ve *C. difficile* izolasyon oranı %1,6 (8/500) olarak belirlenmiştir. Çalışmada sığır eti ve dana eti örneklerinde *C. difficile* varlığına rastlanmazken, kuzu eti (%6,3) ve tavuk eti (%2,7) örneklerinde *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir.

Metcalf ve ark. (2010a)'nın 393 domuz etinde yaptıkları çalışmada *C. difficile* izolasyon oranının %1,8 (7/393) olduğu belirtilmiştir. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında düşük olmasının nedenini örnekleme genişliğinin diğerlerine göre daha kapsamlı olmasından kaynaklanabileceğini açıklamışlardır. Ayrıca farklılığın *C. difficile*'in gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu için metot validasyonunun olmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir.

İran'da 660 çiğ et örneğinin *C. difficile* varlığı yönünden incelendiği çalışmada izolasyon oranının %2,0 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada sığır etinde %1,65 (2/121), inek etinde %0,94 (1/106), koyun etinde %0,67 (1/150), keçi etinde %3,26 (3/92), bizon etinde %8,96 (6/67) deve etinde %0 (0/124) *C. difficile*'e rastlanmıştır. Ayrıca

13 izolatın 12'si PCR tiplendirme yöntemiyle toksin A/B pozitif bulunmuştur. Toksin pozitif oranının yüksek oluşu tüketici sağlığı açısından dikkat edilmesi gereken bir nokta olarak görülürken, sonraki çalışmaların gıdaların enfeksiyona yol açıp açmadığı konusunda araştırılması gerektiğini göstermektedir (Rahimi ve ark., 2014).

C. difficile'in farklı ülkelerdeki izolasyon oranlarının yüksek oluşunun kullanılan metotların farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gıdalardan *C. difficile* izolasyonunu içeren diğer çalışmalarda yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir (de Boer ve ark., 2011).

Bouttier ve ark. (2010), 2007-2008 yılları arasında yaptıkları araştırmalarda domuz sosislerinde ve ticari et içerikli kedi mamalarında *C. difficile*'e rastlamamış, sadece sığır kıyması örneklerinde %1,9 oranında rastlanmıştır. Sosis örneklerinde rastlanmaması yönüyle çalışmamıza paralellik göstermektedir. Kıyma örneklerinde *C. difficile* varlığı diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur. Tüketicilerin yine de çiğ etleri tüketirken pişirme sıcaklığına dikkat ederek önlem almaları gerekmektedir.

Weese ve ark. (2010), çalışmamızda baz aldığımız yöntemi kullanılarak 230 çiğ kıyma (115'i sığır kıyması, 115'i domuz kıyması) örneğinin %12'sinden *C. difficile* izole etmişler, toksin üreten izolat oranının ise %9,3 olduğu belirlemişlerdir. Çalışmamıza göre çiğ etlerde (dana kıyma, tavuk göğüs eti ve köfte) %1,3 oranında *C. difficile* bulunması analiz edilen et örneğinin türünün farklı olmasından kaynaklanabilir.

Rodriguez-Palacios ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada 60 çiğ kıyma örneğini incelemiş ve örneklerin %20'sinde *C. difficile* varlığına rastlamışlardır. Önceki çalışmalara göre daha yüksek oranlarda *C. difficile* varlığına rastlanmış olup, bunun sebebinin daha selektif yöntemlerle çalışmalarına bağlamışlardır.

Çalışmamızda çiğ etlerdeki *C. difficile* varlığı %1,2 bulunmuştur. Çiğ etlerde yapılan diğer çalışmalara (Rodriguez-Palacios ve ark., 2007; Weese ve ark., 2009; Jöbstl ve ark., 2010; Metcalf ve ark., 2010a; Weese ve ark., 2010; de Boer ve ark., 2011;

Harvey ve ark., 2011; Houser ve ark., 2012) göre izolasyon oranının daha düşük olduğu görülmektedir.

Songer ve ark. (2009) 240 et ve et ürününde *C. difficile* varlığını araştırmıştır. Bu çalışmada çiğ etlerde *C. difficile*'e rastlanma oranı %42 (sığırcı kıyması %42,4; domuz kıyması %41,3; hindi eti %44,4; çiğ domuz sosisi %23,1 ve çiğ domuz sucuğu %30,0) olarak belirlenmiştir. Tüketime hazır etlerde *C. difficile* %47,8 oranında (yazlık sucuk %14,3; karaciğer sosisi %62,5) bulunmuştur.

Bu çalışmada pişmiş etlerde *C. difficile* bulunma oranı %4,0 olarak belirlenmiştir. Kouassi ve ark. (2011)'nin sülfite indirgeyen *Clostridium*'ların pişmiş kebab, pişmiş biftek ve soslu tavuk örneklerinde varlığını içeren çalışmada *C. difficile* bulunma oranı %20,5 olarak belirlenmiştir. Yine aynı bölgede 395 pişmiş et örneği *C. difficile* varlığı yönünden incelenmiş ve *C. difficile* varlığı %12,4 olarak belirlenmiştir (Kouassi ve ark., 2014). *C. difficile*'in vejetatif hücreleri ve sporları kesim sırasında kesimhane ortamından, iç organların çıkarılması sırasında bağırsak içeriğinden ve çalışanların ellerinden ete bulaşabilir. Gıdanın pişmesi sırasında vejetatif hücreler canlı kalamazlar. Fakat yüksek sıcaklığa dirençli olan sporlar canlılıklarını sürdürebilirler. Sıcaklığın artmasıyla birlikte gıdadaki oksijen miktarı azalarak anaerobik ortam oluşur ve sporların çimlenmesi teşvik edilerek uygun koşullarda vejetatif hücre sayısının artması sonucu pişmiş etlerde *C. difficile* varlığına rastlanabilir (Anonim, 2014; Kouassi ve ark., 2014). Diğer bir değerlendirilmesi gereken ihtimal ise, satışa sunulduğu market ve restoranlarda bulaşabilmesidir (Kouassi ve ark., 2014).

Gıdalarda *C. difficile* bulaşma kaynağı açık değildir. Etlere bulaşmasının hayvan bağırsağında kolonize olmuş *C. difficile*'den kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kesim işlemi boyunca kesimhanede çalışanların ellerinden, kullanılan ekipmanlardan veya kesimhane çevresinden kaynaklanabileceği de olasılık dahilindedir. Diğer bir olası kaynak ise sağlıklı hayvanların dokularında bulunan sporların varlığından olabileceği yönündedir (de Boer ve ark., 2011; Rahimi ve ark., 2014).

Bu zamana kadar ülke, et işletmesi, saklama koşulları veya bunlara bağlı diğer koşullarla *C. difficile*'e rastlanma sıklığı arasında herhangi bir bağ kurulamamıştır. Ancak gıdalardan *C. difficile* izolasyonunun kış aylarında daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Rodriguez ve ark., 2009). Çalışmamızdaki *C. difficile* izole edilen örneklerin Ekim ve Kasım aylarında toplanmış olması mevsimlerin etkisi konusunda daha önce elde edilen bulguları destekler niteliktedir.

Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre köfte örneğine ait izolat vankomisine, pişmiş et döner örneğine ait izolat ise metranidazole dirençlidir. Simango ve Mwakurudza (2008) tarafından içinde metranidazol, vankomisin, tetrasiklin ve klindamisini de bulunduran 14 antibiyotiğe karşı *C. difficile*'in duyarlılığı araştırılmıştır. Çalışmaya göre izolatların hepsi vankomisin, metranidazol, tetrasikline dirençliyken, %70'inden fazlası ampisiline dirençlidir. Bouttier ve ark. (2010) sığır etlerinde antibiyotik duyarlılık testlerinde *C. difficile* izolatlarının metranidazole ve vankomisine dirençli oldukları belirtilmiştir. Buna karşın Rahimi ve ark. (2014) çiğ et örneklerinden izole ettikleri 13 izolatı antibiyotik duyarlılığı açısından değerlendirmişler ve klindamisin direnci %92,31 iken, vankomisin ve metranidazole karşı tüm *C. difficile* izolatları hassas çıkmıştır. Belçika'da sığır etlerinde ve domuz etlerinde disk difüzyon ve E-test yöntemini karşılaştırmak amacıyla yapılan çalışmada izolatların antibiyotik duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle yapılan çalışmada izolatlar moksifloksasine dirençli olarak belirlenirken, E-test yöntemiyle yapılan çalışmada izolatlar tetrasikline dirençli olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon testine ucuz olması bakımından rutin kontrollerde öncelik verilmektedir. Ancak özellikle metranidazol ve vankomisin konusunda küçük hatalar olabileceği çalışmayla ortaya konulmuştur (Rodriguez ve ark., 2014).

Çalışmamızda *C. difficile* izolatlarımızın dirençli olduğu vankomisin ve metranidazol, *C. difficile*'e bağlı ishallerin tedavisinde sık kullanılan antibiyotiklerdendir (Simango ve Mwakurudza, 2008; Yıldız ve Gücükoğlu, 2012).

Ayrıca etlerde *C. difficile* kontaminasyon düzeyini belirleme amacıyla yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Weese ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada çiğ etlerde spor sayısının 60-240 spor/g olduğu belirtilmiştir.

Sonuç olarak, Sakarya ilinde satışa sunulan gerek çiğ gerekse pişmiş et ürünlerinde *C. difficile* varlığı belirlenmiştir. İzolasyon oranı düşük (%1,98) olmakla birlikte, *C. difficile*'in sporlu bir bakteri olduğu ve pişirme sırasında sporlarının canlı kalabileceği göz önüne alındığında gıdalar aracılığı ile insanlara bulaşabileceği ve halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *C. difficile*'in tanımlanmasında kullanılan L-prolin aminopeptidaz testinde et ve et ürünlerinin florasında bulunan *C. difficile* dışındaki bazı bakterilerin de pozitif sonuç vermesi nedeniyle tanımlamada ilave testlere gereksinim olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle gıdalardan *C. difficile* izolasyonu ve tanımlanmasında kullanılacak daha duyarlı, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay, maliyeti düşük yöntemlere ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

AKIN, N. ve AKIN, M., Gıda Mikrobiyolojisine Giriş, Önemli Mikroorganizmalar ve Mikroorganizma Kaynakları, İçinde: ERKMEN O (ed.). Gıda Mikrobiyolojisi. 1.Basım, Ankara: Efil Yayınevi, syf. 3-49, 2010.

AKSAN, E., Gıdaların Mikrobiyal Bozulması, İçinde: ERKMEN O (ed.). Gıda Mikrobiyolojisi. 1.Basım, Ankara: Efil Yayınevi, syf. 82-123, 2010.

AL SAIF, N. ve BRAZIER, J., The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J. Med. Microbiol., 45(2):133-137, 1996.

ANONİM, *Clostridium perfringens*, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF3765F020A27124F8>, Erişim Tarihi: 10.02.2014, 2014.

ANONYMOUS, Investigation into outbreaks of *Clostridium difficile* at Stoke Mandeville hospital, Buckinghamshire Hospitals NHS Trust, s.l.: Healthcare Commission Report, 2006.

ARROYO, L.G., KRUTH, S.A., WILLEY, B.M., STAEMPFLI, H.R., LOW, D.E., WEESE, J.S., PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J. Med. Microbiol., 54(2):163-166, 2005.

AVBERSEK, J., JANEZIC, S., PATE, M., RUPNIK, M., ZIDARIC, V., LOGAR, K., VNGUST, M., ZEMLJIC, M., PIRS, T., OCEPEK, M., Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. Anaerobe, 15(6):252-255, 2009.

BAKRI, M., BROWN, D.J., BUTCHER, J.P., SUTHERLAND, A.D., *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Em. Infect. Dis., 15:817-818, 2009.

BARBUT, F. ve PETIT, J-C., Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin. Microbiol. Infect., 7:405-411, 2001.

BARBUT, F., JONES, G., ECKERT, C., Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. Curr. Opin. Infect. Dis., 24(4):370-376, 2011.

BARLETT, J.G., Historical Perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. Clin. Infect. Dis., 46(1): 4-11, 2008.

BARTH, H., PFEIFER, G., HOFMANN, F., MAIER, E., BENZ, R., AKTORIES, K., Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. J. Biol. Chem., 276(14):10670-10676, 2001.

BAYSAL, A., Beslenme, Hatipoğlu Yayınları, 9. Baskı, Ankara, 250-260, 2002.

BEST, E.L., FAWLEY, W.N., PARNELL, P., WILCOX, M.H., The Potential for Airborne Dispersal of *Clostridium difficile* from Symptomatic Patients. Clin. Infect. Dis., 50(11):1450-1457, 2010.

BİLGEHAN, H., *Clostridium difficile*. İçinde: Klinik Mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi 10. Baskı, 361-363, 1995.

BLANCO, J.L., ALVAREZ-PEREZ, S., GARCIA, M.E., Is the prevalence of *Clostridium difficile* in animals underestimated? Vet. J., 197(3):694-698, 2013.

BORIELLO, S. P. ve HONOUR, P., Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. J. Clin. Pathol., 34(10):1124-1127, 1981.

BORIELLO, S., HONOUR, P., TURNER, T., BARDAY, F., Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. J. Clin. Pathol., 36(1):84-87, 1983.

BOUTTIER, S., FELIX, B., LAMBERT, S., COLLIGNON, A; BARBUT, F., *Clostridium difficile* in ground meat, France. Em. Infect. Dis., 16(4):733-734, 2010.

BRAZIER, J.S., 1993. Role of the Laboratory in Investigations of *Clostridium difficile* Diarrhea. Clin. Infect. Dis., 16(4):228-233, 1993.

BRAZIER, J.S. ve BORIELLO, S.P., Microbiology, epidemiology and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Curr. Top. Microbiol. Immun., 250:1-33, 2000.

BURNS, K., MORRIS-DOWNES, M., FAWLEY, W.N., SMYTH, E., WILCOX, M.H., FITZPATRICK, F., Infection due to *C. difficile* ribotype 078: first report of cases in the Republic of Ireland. J.Hosp. Infect., 75(4):287-291, 2010.

CARASI, P., TREJO, F.M., PÉREZ, P.F., DE ANTONI, G.L., SERRADELL, M.A., Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. Anaerobe, 18(1):135-142, 2012.

CARTMAN, S.T., HEAP, J.T., KUEHNE, S.A., COCKAYNE, A., MINTON, N.P., The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. Int. J. Med. Microbiol., 300(6):387-395, 2010.

COSTA, M.C., STAMPFLI, H.R., AROYO, L.G., PEARL, D.L., WEESE, J.S., Epidemiology of *Clostridium difficile* on aveal farm: Prevalence, molecular characterization and tetracycline resistance. Vet. Microbiol., 152(3-4):379-384, 2011.

CURRY, S., MARSH, J., SCHLACKMAN, J., HARRISON, L., Prevalence of *Clostridium difficile* in Uncooked Ground Meat Products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(12):4183-4186, 2012.

de BOER, D.E., ZWARTKUIS-NAHUIS, A., HEUVELINK, A.E., HARMANUS, C. KUIJPER, E.J., Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.*, 144(3):561-564, 2011.

DEBAST, S.B., van LEENGOED, L.A., GOORHUIS, A., HARMANUS, C., KUIJPER, E.J., BERGWERFF, A.A., *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environ. Microbiol.*, 11(2):505-511, 2009.

DEBAST, S.B., BAUER, M.P., KUIJPER, E.J., European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection, *Clin. Microbiol. Infect.*, 20(2):1-26, 2014.

DELMÉE, M., Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7: 411-416, 2001.

DEN`EVE, C., JANOIR, C., POILANE, I., FANTINATO, C., COLLIGNON, A., New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int. J. Antimi. Agent.*, 33(1):24-28, 2009.

DOYLE, M.E. *Clostridium difficile* as a risk associated with animals sources. Food Research Institute (FRI), http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_Cdifficile_Jan2013.pdf, Erişim Tarihi: 14.02.2014, 2013.

DUPUY, B., GOVIND, R., ANTUNES, A., MATAMOUROS, S., *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J. Med. Microbiol.*, 57(6):685-689, 2008.

DURAI, R., Epidemiology, pathogenesis, and management of *Clostridium difficile* infection. *Dig. Dis. Sci.*, 52:2958-2962, 2007.

ECKERT, C., BURGHOFFER, B., BARBUT, F., Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *J. Med. Microbiol.*, 62(9):817-818, 2013.

FERNANDES, R., Cooked Meats, Poultry and Their Products. In: *Microbiology Handbook- Meat Products I*. Royal Society of Chemistry Publishing, 2009.

FRASER, T.G. ve SWIENCICKI, J.F., *Clostridium difficile*, <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/clostridium-difficile-infection/>, Erişim Tarihi: 16.04.2014, 2013.

FREEMAN, J., BAUER, M.P., BAINES, S.D., CORVER, J., FAWLEY, W.N., GOORHUIS, B., KUIJPER, E.J., WILCOX, M.H., The Epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin. Microbiol. Rev., 23(3):529-549, 2010.

GEORGE, R.H. SYMONDS, J.M. DIMOCK, F., BROWN, J.D., ARABI, Y., SHINAGAWA, N., KEIGHLEY, M.R., ALEXANDER-WILLIAMS, J., BURDON, D.W., Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. Br. Med. J., 1(6114):695, 1978.

GERDING, D.N., Global epidemiology of *Clostridium difficile* infection in 2010. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 31(1):32-34, 2010.

GOULD L. ve LIMBAGO, B., *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen? Clin. Infect. Dis., 51(5):577-582, 2010.

HALSEY, J., Current and Future Treatment Modalities for *Clostridium difficile*-Associated Disease. Am. J. Health. Syst. Pharm., 65(8):705-715, 2008.

HAMMITT, M.C., BUESCHEL, D.M., KEEL, M.K., GLOCK, R.D., CUNCO, P., DEYOUNG, D.W., REGGIARDO, C., TRINH, H.T. SONGER, J.G., A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. Vet. Microbiol., 127(3-4): 343-352, 2008.

HAMMOND, G.A. ve JOHNSON, J.L., The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog., 19(4):203-213, 1995.

HARVEY, R.B., NORMAN, K.N., ANDREWS, K., NORBY, B., HUME, M.E., SCANLAN, C.M., HARDIN, M.D., SCOTT, H.M., *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. J. Vet. Diag. Invest., 23(4): 807-811, 2011.

HATHEWAY, C.L., Toxigenic Clostridia. Clin. Microbiol. Rev., 3(1):66-98, 1990.

HEAD, C.B. ve RAINAM, S., Comparison of API ZYM system with API AN-Ident, API 20A, Minitex Anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., 26(1):144-146, 1988.

HENSGENS, M.; van DORP, S.M., HARMANUS, C., SANDERS, I., CORVER, J., KUIJPER, E.J., NOTERMANS, D.W., BENTHEM, V., ALBLAS, J., COUTINHO, R., Sixth annual report of the National Reference Laboratory for *Clostridium difficile* (May 2011 to May 2012) and results of the sentinel surveillance. <http://www.rivm.nl/Zoeken?query=difficile+report>, Erişim Tarihi: 13.01.2014, 2012.

HO, J.S., GRECO, A., RUPNIK, M., Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102(51):18373-18378, 2005.

HOUSER, B.A., SOEHNLEN, M.K., WOLFGANG, D.R., LYSCZEK, H.R., BURNS, C.M., JAYARAO B., Prevalence of *Clostridium difficile* Toxin Genes in the Feces of Veal Calves and Incidence of Ground Veal Contamination. Foodborne Pathog. Dis., 9(1): 32-36, 2012.

INDRA, A., LASSNIG, H., BALIKO, N., MUCH, P., FIEDLER, A., HUHULESCU, S., ALLERBERGER, F., *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? Wien. Klin. Wochenschr., 121(3-4):91-95, 2009.

JOHNSON, S., SAMORE, M.H., FARROW, K.A., KILLGORE, G.E., TENOVER, F.C., LYRAS, D., ROOD, J.I., DEGIROLAMI, P., BALTCH, A.L., RAFFERTY, M.E., PEAR, S.M. VE GERDING, D.N., Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain. N. Eng. J. Med., 341(22):1645-1651, 1999.

JÖBSTL, M. HEUBERGER, S., INDRA, A., NEPF, R., KÖFER, J., WAGNER, M., *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int. J. Food Microbiol., 138(1-2):172-175, 2010.

KAYIŞOĞLU, S., YILMAZ, İ., DEMİRCİ, M., YETİM, H., Chemical composition and microbiological quality of the doner kebabs sold in Tekirdag market. Food Cont., 14(7):469-474, 2003.

KAZANOWSKI, M., SMOLAREK, S., KINNARNEY, F., GRZEBIENIAK, Z., *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities—a systematic review. Tech. Coloprotocol., 18(3):223-232, 2014.

KEEL, M.K. ve SONGER, J.G., The comparative pathology of *Clostridium difficile*—associated disease. Vet. Pathol., 43(3):225-240, 2006.

KELLY, C.P. ve THOMAS LAMONT, J., *Clostridium difficile*—More Difficult Than Ever. N. Eng. J. Med., 359:1932-1940, 2008.

KILLGORE, G., THOMPSON, A., JOHNSON, S., BRAZIER, J., KUIJPER, E., PEPIN, J., FROST, E.H., SAVELKOUL, P., NICHOLSON, B., BERG, R.J., KATO, H., SAMBOL, S.P., ZUKOWSKI, W., WOODS, C., LIMBAGO, B., GERDING, D.N., MCDONALD, L.C., Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PCR-Ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Surface Layer Protein A Gene Sequence Typing. J. Clin. Microbiol., 46(2):431-437, 2008.

KIYAN M., Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. İçinde: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, syf. 645-649, 1999.

KOENE, M.G., MEVIUS, D., WAGENAAR, J.A., HARMANUS, C., HENSGENS, M.P., MEETSMA, A.M., PUTIRULAN, F.F., van BERGEN, M.A., KUIJPER, E.J., *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. Clin. Microbiol. Infect., 18(8):778-784, 2012.

KOUASSI, K.A., DADIE, A.T., NANGA, Z.Y., DJE, K.M., LOUKOU, Y.G., Prevalence of sulfite reducing *Clostridium* species in barbecued meat in Abidjan, Côte d'Ivoire. J. App. Biosci., 38: 2518–2522, 2011.

KOUASSI, K.A., DADIE, A.T., N'GUESSAN, K.F., DJE, K.M. LOUKOU, Y.G., *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in cooked beef sold in Côte d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility. Anaerobe, 28:90-94, 2014.

LYERLY, D.M., KRIVAN, H.C., WILKINS, T.D., *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev., 1(1):1-18, 1988.

MacCANNELL, D.R., LOUIE, T.J., GREGSON, D.B., LAVERDIERE, M., LABBE, A-C., LAING, F., HENWICK, S., Molecular Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Isolates from Eastern and Western Canada. J. Clin. Microbiol., 44(6):2147-2152, 2006.

MANI, N. ve DUPUY, B., Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. PNAS, 98(10):5844-5849, 2001.

MARSH, J.W., Counterpoint: Is *Clostridium difficile* a food-borne disease? Anaerobe, 21:62-63, 2013.

McELLISTREM, M.C. CARMAN, R.J., GERDING, D.N., GENHEIMER, C.W., ZHENG, L., A Hospital Outbreak of *Clostridium difficile* Disease Associated with Isolates Carrying Binary Toxin Genes. Clin. Infect. Dis., 40(2):265-272, 2005.

McFARLAND, L.V., Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? J. Med. Microbiol., 54:101–111, 2005.

McFARLAND, L.V., BENEDA, H.W., CLARRIDGE, J.E., RAUGI, G.J., Implications of The Changing Face of *Clostridium difficile* Disease for Health Care. Am. J. Infect. Control., 35(4):237-253, 2007.

METCALF, D., REID-SMITH, R.J., AVERY, B.P., WEESE, J.S., Prevalence of *Clostridium difficile* in retail pork. Can. Vet. J., 51(8):873-876, 2010a.

METCALF, D.S., COSTA, M.C., DEW, W.V., WEESE, J.S., *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. Lett Appl Microbiol., 51(5): 600-602, 2010b.

METCALF, D., AVERY, B.P., JANECKO, N., SMITH, R.R., WEESE, J.S., *Clostridium difficile* in seafood and fish. Anaerobe, 17(2):85-86, 2011.

MONAGHAN, T., BOSWELL, T., MAHIDA, Y.R., Recent advances in *Clostridium difficile*- associated disease. Postgraduate Med. J., 85(1001):152-162, 2009.

MYLONAKIS, E., RYAN, E.T., CALDERWOOD, S.B., *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. Arch. Intern. Med., 161(26):529-533, 2001.

- NATARAJAN, M., WALK, S.T., YOUNG, V.B., ARONOFF, D.M., A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 22:1-5, 2013.
- NORMAN, K.N., HARVEY, R.B., ANDREWS, K., HUME, M.E., CALLAWAY, T.R., ANDERSON, R.C., NISBET, D.J., Survey of *Clostridium difficile* in Retail Seafood in College Station, Texas. *Food Addit Contam Part A.*, 31(6):1127-1129, 2014.
- OTTEN, A.M., REID-SMITH, R.J., FAZIL, A., WEESE, J.S., Disease Transmission Model for Community-Associated *Clostridium difficile* infection. *Epidemiol. Infect.*, 138(6):907-914, 2010.
- OUGHTON, M.T. ve MILLER, M.A., Clinical and Epidemiological Aspects of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Newslett.*, 30(12): 87-95, 2008.
- OWENS, R.C., DONSKEY, C.J., GAYNES, R.P., LOO, V.G., MUTO, C.A., Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis.*, 46(1):19-31, 2008.
- PÉPIN, J., SAHEB, N., COULOMBE, M.A., ALARY, M.E., CORRIVEAU, M.P., AUTHIER, S., LEBLANC, M., RIVARD, G., B.M., PRIMEAU, V., NGUYEN, M., JACOB, C.E., LANTHIER, L., Emergence of Fluoroquinolones as the Predominant Risk Factor for *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: A Cohort Study during an Epidemic in Quebec. *Clin. Infect. Dis.*, 41(9):1254-1260, 2005.
- PERELLE, S., GIBERT, M., BOURLIOUX, P., CORTIER, G., POPOFF, M.R., Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect. Immun.*, 65(4):1402-1407, 1997.
- PIRS, T., OCEPEK, M., RUPNIK, M., Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *J. Med. Microbiol.*, 57(6):790-792, 2008.
- PLANCHE, T., AGHAIZU, A., HOLLIMAN, R., RILEY, P., POLONIECKI, J., BREATHNACH, A., KRISHNA, S., Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, 8(12):777-784, 2008.
- POXTON, I., MCCOUBREY, J., BLAIR, G., The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infec.*, 7(8):421-427, 2001.
- PRUITT, R.N., CHAMBERS, M.G., NG, K.K., OHI, M.D., LACY, B., Structural organization of the functional domains of *Clostridium difficile* toxins A and B. *PNAS*, 107(30):13467-13472, 2010.
- RAHIMI, E., JALALI, M., WEESE, J.S., Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health*, 14(119):1-4, 2014.

REINERT, D.J., JANK, T., AKTORIES, K., SCHULZ, G.E., Structural Basis for the Function of *Clostridium difficile* Toxin B. J. Mol. Bio., 351(5): 973-981, 2005.

RODRIGUEZ, C., TAMINIAUA, B., VAN BROECK, J., AVESANI, V., DELMEE, M., DAUBE, G., *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. Anaerobe, 18(6):621-625, 2012.

RODRIGUEZ, C., AVESANI, V., BROECK, J.V., TAMINIAUA, B., DELMEE, M., DAUBE, G., Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. Int. J. Food Microbiol., 166:256-262, 2013.

RODRIGUEZ, C., TAMINIAU, B., AVESANI, V., VAN BROECK, J., DELMEE, M., DAUBE, G., Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. Food Microbiol., 42:166-171, 2014.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., STAMPFLI, H.R., DUFFIELD, T., PEREGRINE, A.S., TROTZ-WILLIAMS, L.A., ARROYO, L.G., BRAZIER, J.S., WEESE, J.S., *Clostridium difficile* PCR Ribotypes in Calves, Canada. Em. Infect. Dis., 12(11):1730-1736, 2006.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., STAMPFLI, H.R., DUFFIELD, T., WEESE, J.S., *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. Em. Infect. Dis., 13(3):485-487, 2007.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., REID-SMITH, R.J., STAMPFLI, H.R., DAIGNAULT, D., JANECKO, N., AVERY, B.P., MARTIN, H., THOMPSON, A.D., McDONALD, L.C., LIMBAGO, B., WEESE, J.C., Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. Em. Infect. Dis., 15(5):802-805, 2009.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., REID-SMITH, R.J., STAEMPFLI, H.R., WEESE, J.S., *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. Anaerobe, 16(5):540-542, 2010.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., LEJEUNE, J., HOOVER, D., *Clostridium difficile*: an emerging food safety risk. http://cfaes.osu.edu/sites/cfaes_main/files/site-library/sitedocuments/News/C_diff_an_Emerging_Food_Safety_Risk.pdf, Erişim Tarihi: 03.03.2014, 2012.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A., BROGMANN, S., KLINE, T., LEJEUNE, J., *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. Anim. Health Rev., 14(1):11-29, 2013.

ROMANO, V., ALBANESE, F., DUMONTET, S., KROVACEK, K., PETRINI, O., PASQUALE, V., Prevalence and Genotypic Characterization of *Clostridium difficile* From Ruminants in Switzerland. Zoonoses Public Health, 59(8):545-548, 2012.

RUPNIK, M., Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? Clin. Microbiol. Infect., 13(5):457-459, 2007.

RUPNIK, M., DUPUY, B., FAIRWEATHER, N.F., GERDING, D.N., JOHNSON, S., JUST I., LYERLY D.M., POPOFF, M.R., ROOD, J.I., SONENSHEIN, A.L., THELESTAM, M., WREN, B.W., WILKINS, T.D., VON EICHEL-STREIBER, C., Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J. Med. Microbiol., 54(2):113-117, 2005.

RUPNIK, M., WILCOX, M., GERDING, D., *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol., 7(7): 526-536, 2009.

SAITA, M., BANO, L., GALLAZZI, D.D., Pathogenicity markers of *Clostridium* spp. in commercial turkeys. IJAS, 8(4):781-784, 2009.

SCHWAN, C., STECHER, B., TZIVELEKIDIS, T., VAN HAM, M., ROHDE, M., HARDT, W.D., WEHLAND, J. AKTORIES, K., *Clostridium difficile* toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. PLOS Pathogens, 5(10):1-14, 2009.

SEBAIHIA, M., WREN, B.W., MULLANY, P., FAIRWEATHER, N.F., MINTON, N., STABLER, R., THOMSON, N.R., ROBERTS, A. P., CERDENO-TARRAGA, A. M., WANG, H., HOLDEN, M. T.G., WRIGHT, A., CHURCHER, C., QUAIL, M.A., BAKER, S., BASON, N., BROOKS, K., CHILLINGWORTH, T., CRONIN, A., DAVIS, P., DOWD, L., FRASER, A., FELTWELL, T., HANCE, Z., HOLROYD, S., JAGELS, K., MOULE, S., MUNGALL, K., PRICE, C., RABBINOWITSCH, E., SHARP, S., SIMMONDS, M., STEVEN, K., UNWIN, L., WHITHEAD, S., DUPUY, B., DOUGAN, G., BARRELL, B., PARKHILL, J., The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat. Genet., 38(7):779-786, 2006.

SIEGEL, D., EDELSTEIN, P., NACHAMKIN, I., Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital. JAMA, 263(7):979-982, 1990.

SIMANGO, C. ve MWAKURUDZA, S., *Clostridium difficile* in broiler Chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int. J. Food Microbiol., 124:268-270, 2008.

SMITH, L.D. ve KING, E.O., Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J. Bacteriol., 84(1):65-67, 1962.

SMITS, W.K., Hype or Hypervirulence A reflection on problematic *C. difficile* strains. Virulence, 4(7):592-596, 2013.

SONGER, J.G., Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev., 9(2):216-234, 1996.

SONGER, J.G., The Emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. An. Health Res. Rev., 5(2):321-326, 2004.

SONGER, J.G., POST, K.W., LARSON, D.J., JOST, H., GLOCK, R.D., Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. Swine Health Prod., 8(4):185-189, 2000.

SONGER, J.G., TRINH, H.T., KILLGORE, G.E., THOMPSON A.D., McDONALD, L.C., LIMBAGO, B.M., *Clostridium difficile* in Retail Meat Products, USA, 2007. Em. Infect. Dis., 15(5):819-821, 2009.

SUNDRIYAL, A., ROBERTS, A.K., SHONE, C.C., ACHARYA, K.R., Structural Basis for Substrate Recognition in the Enzymatic Component of ADP-ribosyltransferase Toxin cdtA from *Clostridium difficile*. J. Biol. Chem., 284(42):28713-28719, 2009.

TAN, K.S., WEE, B.Y., SONG, K.P., Evidence for Holin function of tcdE gene in the Pathogenicity of *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol., 50(7): 613-619, 2001.

TEMİZ, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 1.Baskı, Ankara: Şafak Matbaacılık, syf. 82-106, 1994.

TREJO, F.M., DE ANTONI, G.L., PEREZ, P.F., Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of *Clostridium difficile* associated colitis. J. Dairy Res., 80(3):263-269, 2013.

TSUTSUMI, L.S., OWUSU, Y.B., HURDLE, J.G., SUN, D., Progress in the Discovery of Treatments for *C. difficile* Infection: A Clinical and Medicinal Chemistry Review. Curr. Top. Med. Chem., 14(1):152-175, 2014.

TWINE, S.M., REID, C.W., AUBRY, A., MCMULLIN, D.R., FULTON, K.M., AUSTIN, J., LOGAN, S.M., Motility and Flagellar Glycosylation in *Clostridium difficile*. J. Bacteriol., 191(22):7050-7062, 2009.

VAISHNAVI, C., Clinical spectrum&pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. Indian J. Med. Res., 131: 487-499, 2010.

VISSER, M., SEPEHRIM, S., OLSON, N., DU, T., MULVEY, M.R., ALFA, M.J., Detection of *Clostridium difficile* in retail ground meat products in Manitoba. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol., 23(1):28-30, 2012.

VON ABERCRON, M., MARIE, S., FRIDA, K., GUNILLA W.T., MARTIN W., KAREL K., Low Occurrence of *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat in Sweden. J. Food Protect., 8:1732-1734, 2009.

VOTH, D.E. ve BALLARD, J.D., *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and Role in diseases. Clin. Microbiol. Rev., 18(2):247-263, 2005.

WEESE, J.S., AVERY, B.P., ROUSSEAU, J., REID-SMITH, R.J., Detection and Enumeration of *Clostridium difficile* Spores in Retail Beef and Pork. Appl. Environ. Microbiol., 75(15):5009-5011, 2009.

WEESE, J.S., *Clostridium difficile* in food—innocent bystander or serious threat? Clin. Microbiol. Infect., 16(1):3-10, 2010.

WEESE, J.S., REID-SMITH, R., AVERY, B., ROUSSEA, J., Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. Lett. Appl. Microbiol., 50(4):362-365, 2010.

WILCOX, M.H. ve FAWLEY, W.N., Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. The Lancet, 356(9238):1324, 2000.

YILDIZ, F. ve GÜCÜKOĞLU, A., *Clostridium difficile* ve Gıda Güvenliği Açısından Önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR,10(1):22-29, 2012.

EKLER

EK-1 Tamponlanmış Peptonlu Su

Bileşimi:

Formülü	g/l
Pepton	10,0
Di sodyum hidrojen fosfat dodesitrat	9,0
Tuz	5,0
Di Potasyum hidrojen fosfat	1,5

Hazırlanışı: Bileşimde gösterilen kimyasallar belirtilen oranlarda karıştırılarak 1000 ml destile su içinde çözündürülür. Sonra gereken miktarlarda tüplere veya erlenlere konularak 121°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılır.

EK-2 Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin (CDMN) Broth (OXOID-CM0601)

Bileşimi:

Formülü	gram/litre
Proteaz pepton	40,0
Disodyum hidrojen fosfat	5,0
Potasyum dihidrojen fosfat	1,0
Magnezyum sülfat	0,1
Sodyum klorit	2,0
Fruktoz	6,0

a) Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin (CDMN) Supplement (SR0173; Oxoid)

Vial İçeriği	per vial
Cysteine hydrochloride	250,0 mg
Norfloxacin	6,0 mg
Moxalactam	16,0 mg

b) Defibrine At Kanı (SR0050)

c) Sodyum Tauroklat (%0,1)

Hazırlanışı: Bileşimde bulunan kimyasallar ve %0,1 Sodyum tauroklat tartılarak destile suda çözündürülür ve 121°C’ de 15 dakika sterilize edilir. 50°C’ ye soğutulduktan sonra steril saf suda çözündürülen CDMN Supplement ve %7 defibrine at kanı ilave edilerek karıştırılır ve steril petrilere dağıtılır.

EK-3 Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin (CDMN) Agar

a) Clostridium difficile Agar Base (Oxoid)

Formülü	gram/litre
Proteaz pepton	40,0
Disodyum hidrojen fosfat	5,0
Potasyum dihidrojen fosfat	1,0
Magnezyum sülfat	0,1
Sodyum klorit	2,0
Fruktoz	6,0
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2 @ 25°C	

b) Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin (CDMN) Supplement (SR0173; Oxoid)

Vial İçeriği	per vial
Cysteine hydrochloride	250,0 mg
Norfloxacin	6,0 mg
Moxalactam	16,0 mg

c) Defibrine At Kanı (Oxoid- SR0050)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri 34,5 gr tartılarak 500 ml destile suda çözündürülür ve 121°C' de 15 dakika sterilize edilir. 50°C' ye soğutulduktan sonra steril saf suda çözündürülen 1 vial Clostridium Difficile Moxalactam Norfloxacin (CDMN) Supplement ve %7 defibrine at kanı (35 ml) ilave edilerek karıştırılır ve steril petrilere dağıtılır.

EK-4 Tiyoglikolat Broth (Merck-M108190.0500)**a) Bileşimi;**

Formül	Gram/litre
Pepton from casein	15,0
Yeast extract	5,0
D(+) Glukoz	5,5
L-Cystine	0,5
NaCl	2,5
Sodium thioglycollate	0,5

Hazırlanışı: Dehidre besiyerinden 29 gr tartılarak 1000 ml destile suda çözündürülür ve tüplere 9'ar ml paylaşılırak 121°C' de 15 dakika sterilize edilir.

EK-5 Kanlı Agar

a) Bileşimi (Thermo Scientific-CM0271)

Formül	Gram/litre
Proteose peptone	15.0
Liver digest	2.5
Yeast extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

b) Defibrine At Kanı (Oxoid- SR0050)

Hazırlanışı: Dehidre besiyerinden 20 gram tartılarak 500 ml destile suda çözündürülür ve 121°C’ de 15 dakika sterilize edilir. 50°C’ ye soğutulduktan sonra %7 defibrine at kanı (35 ml) ilave edilerek karıştırılır ve steril petrilere dağıtılır.

EK-6 Brain Heart Infusion Broth (Merck 1.10493)**Bileşimi:**

Formül	Gram/litre
Nutrient Substrate	27,5
D(+) Glukoz	2,0
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄	2,5

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 37,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir.

EK-7 Fizyolojik Tuzlu Su

Hazırlanışı: 1000 ml destile suda 8.5 g NaCl çözümlenir. Tüplere ve erlenlere konularak 121°C' de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutulur.

EK-8 Mueller Hinton Agar

Bileşimi:

Formülü	g/l
Beef, dehydrated infusion from	300,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	17,0
pH 7,3 ± 0,1 @ 25°C	

Hazırlanışı: 21 gram Mueller Hinton Broth (Oxoid-CM0405) ile 17 gram Agar-Agar karıştırılır ve 1000 ml destile suyun içinde çözündürülür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra 50°C’ ye soğutularak %7 (70 ml) oranında at kanı ilave edilerek steril petrilere dökülür.

ÖZGEÇMİŞ

Şeyma Şeniz Ersöz, 02.05.1988'de Yozgat'ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Yozgat'ta tamamladı. 2006 yılında Yozgat Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2007 yılında başladığı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünü 2012 yılında bitirdi. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde Yüksek Lisans'a başladı.