

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENÇ ÇİFTLİK HAYVANLARININ İSHAL VAKALARINDAN,
CLOSTRIDIUM DIFFICILE'İN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Ediz Kağan ÖZGEN

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

2018-Kırıkkale

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENÇ ÇİFTLİK HAYVANLARININ İSHAL VAKALARINDAN,
CLOSTRIDIUM DIFFICILE'İN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Ediz Kağan ÖZGEN

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

Bu doktora tez çalışması Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 11.09.2015 tarih ve 87799839-325.02-30370 sayılı olurları ile yürütülmüştür.

2018-Kırıkkale
Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Doktora Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma
aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/09/2018

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi, Veteriner Faköltesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi, Veteriner Faköltesi
Üye

Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Faköltesi
Üye

imza
Doç. Dr. Nilgün ÜNAL
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Faköltesi
Üye

Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Faköltesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	
İçindekiler.....	I
Önsöz.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar.....	V
Şekiller.....	VII
Çizelgeler.....	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Clostridium</i> Türleri.....	1
1.2. <i>Clostridium difficile</i>	3
1.2.1. Tarihçe.....	3
1.2.2. Etiyoloji.....	4
1.2.3. Toksinler.....	5
1.2.4. Epidemiyoloji.....	8
1.2.5. Risk Faktörleri.....	11
1.2.6. Patogenez.....	11
1.2.7. Semptomlar.....	14
1.2.8. Laboratuvar Teşhisi.....	17
1.2.8.1. Kültür.....	17
1.2.8.2. Seroloji.....	18
1.2.8.3. Hücre Kültürü.....	19
1.2.8.4. Moleküler Teşhis.....	19
1.2.9. Tedavi ve Koruma.....	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Gereç.....	23
2.1.1. Gaita Örneklerinin Toplanması.....	23
2.1.2. Kültür.....	24

2.1.3. PCR ile İdentifikasyon, Toksin Genlerinin Tespiti ve PCR Ribotiplendirme.....	26
2.1.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	28
2.2. Yöntem.....	28
2.2.1. Gaita Örneklerinin Toplanması.....	28
2.2.2. Kültür.....	29
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İdentifikasyon ve Toksin Genlerinin Tespiti.....	29
2.2.4. PCR Ribotiplendirme.....	32
2.2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	34
3. BULGULAR.....	36
3.1. Gaita Örneklerinin Toplanması.....	36
3.2. Kültür Bulguları.....	37
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İdentifikasyon ve Toksin Genlerinin Tespiti.....	39
3.4. PCR Ribotiplendirme.....	40
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	41
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	70

Önsöz

Özellikle bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede en büyük gelişme yirminci yüzyıl başlarında penisilin antibiyotiğinin keşfidir. Takibindeki dönemde yeni antimikrobiyal etkenlerin bulunması sayesinde enfeksiyonların tedavisinde çok büyük güç elde edilmişken doğru kullanılmaması sonucunda mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç kazanmış ve enfeksiyonlarla mücadele daha da zor hale gelmiştir. İnsanlarda gözlenen antibiyotik ilişkili diyare vakaları, antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmalar tarafından meydana gelmektedir. *Clostridium difficile* insanlardaki antibiyotik ilişkili diyare vakalarının % 20'sine neden olmaktadır. Toksin üretebilen *Clostridium difficile* insanlarda neden olduğu diyare vakalarının yanında hayvanlarda özellikle de neonatal dönemdeki hayvanlarda enfeksiyon oluşturarak diyareye neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında neonatal dönemdeki ishalleri buzağı, kuzu ve oğlaklarda ve ahır içerisinde yetiştirilen tavuk gaita örneklerinde toksijenik *Clostridium difficile* varlığı araştırılmıştır.

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesindeki lisans eğitimimden itibaren her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a,

Veteriner Hekimlik vazifeme başladığım Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde her zaman çalışmalarımı destekleyen, Hekimlik duruşuyla örnek olan Enstitü Müdürüm Dr. Biray OKUMUŞ'a,

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesindeki lisans eğitimimden itibaren her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Nilgün ÜNAL ve Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI hocalarıma,

Aynı laboratuvarında çalıştığım ve yardımını hiç esirgemeyen Veteriner Hekim Mustafa ULUCAN'a,

Bu çalışmanın yapılmasına onay veren Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'ne

Hayatım boyunca her zaman destek olan bugünlere gelmemdeki en büyük pay
sahibi olan babam Hamdi ÖZGEN, annem Ayşegül ÖZGEN'e,

Her zaman çalışmalarıma destek olan eşim Hatice ÖZGEN'e ve oğlum Gktğ
Kağan ÖZGEN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erzurum-2018

Ediz Kağan ÖZGEN

Bu doktora tez alışması Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 11.09.2015
tarih ve 87799839-325.02-30370 sayılı olurları ile yürütülmüştür.

Simgeler ve Kısaltmalar

ADP-ribosyltransferase: Adenozin difosfat ribozil transferaz

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

€: Avro

bp: Baz çifti

°C: Santrigrat Derece

CCF: Cycloserine-Cefoxitin Fructose

CDAD: *Clostridium difficile* İlişkili Hastalık

CDT: *Clostridium difficile* transferaz (Binary Toksin)

cdtA: Binary toksinin katalitik komplementin sentezinden görevli gen bölgesi

cdtB: Binary toksinin bağlayıcı komplementin sentezinden görevli gen bölgesi

CDTLoc: *Clostridium difficile* transferaz lokusu

CLSI: Clinical Laboratory Standart Institute

CO₂: Karbon Dioksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

\$: Dolar

dNTP: Deoksinükleotid

EIA: Enzim İmmunoassay

EUCAST: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi

g: Gravite

GAP: GTPaz-Accelerating Protein

GDH: Glutamat Dehidrogenaz

GDP: Guanozin Difosfat

GEF: Guanin Nükleotid Çevirme Faktörü

GTPaz: Guanozin Trifosfataz

kDa: Kilodalton

kb: Kilobaz

LCT: Büyük Klostridial Sitotoksin.

mm: Milimetre

Meso-DAP: Meso-Diaminopimelik Asit
µm: Mikrometre
µg: Mikrogram
ml: Mililitre
mMol: Milimolar
MIK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MgCl₂: Magnezyum Klorür
µM: Mikromolar
µL: Mikrolitre
NAP: North American Pulsotype
PaLoc: Patojenite Lokusu
PBS: Fosfat Buffer Salin
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE: Pulsed-Field Jel Elektroforez
pmol: Pikamol
£: Pound
REA: Restriksiyon Endonükleaz Analizi
RNA: Ribo nükleik asit
rRNA: Ribozomal ribo nükleik asit
SLP: Yüzey Katman Proteini
TAE: Tris, Asetik Asit, EDTA
tcdA: Paloc üzerinde toksin A gen bölgesi
tcdB: Paloc üzerinde toksin B gen bölgesi
tcdC: Paloc üzerinde negatif regülatör gen bölgesi
tcdE: Paloc üzerinde holin-like protein sentezinden görevli gen bölgesi.
tcdR: Paloc üzerinde pozitif regülatör gen bölgesi
tpi: Trioz Fosfat İzomeraz
U: Ünite

Şekiller

Şekil 3.1. Buzağılara ayrılan bölmeler yetişkin hayvanların yanında bariyer ile ayrılmış bölme.

Şekil 3.2. Kış aylarında ahır içerisinde buzağı ve sığırlarla birlikte barındırılan tavuklar.

Şekil 3.3. İzole edilen *Clostridium difficile*'lerin koloni morfolojisi.

Şekil 3.4. *Clostridium difficile* Gram boyama (x100 büyütme).

Şekil 3.5. *Clostridium difficile* toksin karakterizasyonu. A) tpi 230 bp, tcdA 369 bp ve tcdB 160 bp.

Şekil 3.6. Binary toksin teşhisi multiplex PCR jel görüntüleri cdtA 221 bp ve cdtB 262 bp.

Şekil 3.7. Toksikojenik izolatların PCR ribotip profilleri.

Şekil 3.8. Toksikojenik suşların mikrobrot dilüsyon metodu ile incelenmesi. A) İnkübasyon sonrası görünüm, B) Minimal inhibisyon konsantrasyonlarını okuma aşaması.

Çizelgeler

Çizelge 2.1. Alınan gaita örneklerinin illere göre dağılımı.

Çizelge 2.2. *Clostridium difficile* Mannitol Taurocholate Broth İçeriği.

Çizelge 2.3. *Clostridium difficile* Agar İçeriği.

Çizelge 2.4. *Clostridium difficile* Supplement İçeriği.

Çizelge 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu test bileşenleri.

Çizelge 2.6. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Çizelge 2.7. Antimikrobiyal duyarlılık test kiti içeriği

Çizelge 2.8. PCR ile identifikasyon ve toksin genlerinin polimeraz zincir reaksiyon karışımı.

Çizelge 2.9. Binary toksin genleri cdtA, cdtB genlerinin varlığının araştırılması.

Çizelge 2.10. PCR ribotiplendirme reaksiyon karışımı.

Çizelge 2.11. PCR ribotiplendirme reaksiyon döngü ve sıcaklıkları.

Çizelge 3.1. Alınan örneklerdeki *Clostridium difficile* izolasyon oranı.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyal duyarlılık test bulguları.

Genç Çiftlik Hayvanlarının İshal Vakalarından, *Clostridium difficile*'in İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

ÖZET

Clostridium difficile (*Bacillus difficile*) ilk olarak 1935 yılında bebek gaita örneklerinden izole edilmiş ve patojen olduğu düşünülmemiştir. Ancak 1978 yılından itibaren antibiyotik ilişkili diyare ve psödomembranöz kolitise neden olduğu ortaya konularak patojen olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma ile ishalleri buzağı, kuzu, oğlak ve işletme içinde yetiştirilen tavuklarda *C. difficile*'nin tespit edilmesi, bu izolatların toksijenik olarak karakterize edilmesi, toksin üretebilen izolatların PCR ribotiplendirmelerinin yapılması ve mikrobrot dilüsyon metodu ile antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında 2015 yılında neonatal dönemdeki ishalleri 50 adet buzağı, 50 adet kuzu ve 50 adet oğlak gaita örnekleri numunesi ile 50 adet tavuk kloakal swap örneği olmak üzere toplam 200 adet gaita örneği alınarak incelendi. Araştırma boyunca toplanan gaita örneklerinin 58 (% 29.0)'inden *Clostridium difficile* izole edildi. Buzağılardan alınan gaita örneklerinin 35 (% 70.0)'inden, kuzu örneklerinin 15 (% 30.0)'inden, oğlak numunelerinin 7 (% 14.0)'ünden ve tavuk gaita örneklerinin 1 (% 2.0)'inden *Clostridium difficile* tespit edildi. Tür identifikasyonu ve toksin karakterizasyonu ile izolatların 28 (% 48.2)'inin toksijenik karaktere sahip olduğu belirlendi. Toksijenik olan 28 izolatın PCR ribotiplendirmesinde 078, 012 ve 033 ribotipleri tespit edildi.

Toplam 24 adet toksijenik suşun mikrobrot dilüsyon metodu ile antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldı. Toksijenik olan izolatların tamamında, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulanik asit, sefotetan, kloramfenikol, imipenem, meropenem, metronidazol, mezlosilin, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerine duyarlı, ampisilin, sefoksitin, klindamisin, penisilin ve tetrasikline dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yürütülen araştırma ile neonatal buzağı ve kuzu ishal vakalarında toksijenik *C. difficile* varlığı ilk kez ülkemizde tespit edilmiş olup bölgemizdeki ishalleri neonatal buzağı ve kuzularda görülen ishal vakalarında *C. difficile*'nin de dikkate alınması gerektiği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal duyarlılık testi, Buzağı, *Clostridium difficile*, Erzurum, Neonatal.



Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Determination of *Clostridium difficile* from Cases of Diarrhea in Young Farm Animals

SUMMARY

Clostridium difficile (*Bacillus difficile*) was first isolated from baby gaita specimens in 1935 and was not thought to be pathogenic, but since 1978 it has been accepted as pathogen by proving to be caused by antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. In this study, it was aimed to detection *C. difficile* in diarrheal calves, lambs, goats and in chickens grown in the farm and toxigenic characterization of these isolates and investigation of PCR ribotyping and antimicrobial susceptibility by microbroth method on toxin producing isolates.

In the scope of the study, a total of 200 gaita samples including in the neonatal period 50 calves, 50 lambs and 50 goat feces samples and 50 chicken cloacal swab samples in 2015 were examined. *Clostridium difficile* was isolated by 58 (29.0 %) of the gaita samples collected during the study. *Clostridium difficile* was detected as 35 (70.0 %) of the gaita samples taken from the calves, 15 (30.0 %) of the lamb samples, 7 (14.0 %) of the goat specimens and 1 (2.0 %) of the chicken stool specimens. Identification and toxin characterization revealed that 28 (48.2 %) isolates had toxigenic character. The PCR ribotypes of the 28 toxigenic isolates identified PCR ribotypes 078, 012 and 033.

A total of 24 toxigenic strains were tested for antimicrobial susceptibility by microbial dilution method. isolates were found to be resistant to ampicillin, clindamycin, cefoxitin, penicillin and tetracycline, susceptible to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid, cefotetan, cefoxitin, chloramphenicol, imipenem, meropenem, metronidazole, mezlosiline, piperacillin and piperacillin/tazobactam antimicrobial agents.

As a result of this research, toxigenic *C. difficile* presence in neonatal calf and lamb diarrhea cases was detected for the first time in our country and *C. difficile* should be taken into account in case of diarrhea in diarrheal neonatal calves and lambs.

Key Words: Antimicrobial susceptibility test, calf, *Clostridium difficile*, Erzurum, Neonatal.



1- GİRİŞ

1.1. *Clostridium* Türleri

Clostridia sınıfında, *Clostridiales* takımının *Clostridiaceae* ailesinin *Clostridium* cinsi yer almaktadır. *Clostridium* eski yunan diline göre küçük iğ anlamına gelmektedir. İlk olarak A. Prazmowski tarafından 1880 yılında ortaya konulan *Clostridium* genusu içerisinde 168 adet tür vardır. 16S rRNA gen dizilimine göre Collins ve ark. (1994) tarafından gruplandırılmıştır. Bu gruplamaya göre 19 grup oluşmuştur. DNA G+C içeriği (mol %) 22-53 tür (Rainley ve ark 2015).

Gram pozitif, anaerobik, spor oluşturan, çubuk şekilli bir bakteridir. *Clostridium* türleri toprak, taze su ve deniz çökeltileri, çürük sebzelerde, hayvansal materyallerde, kanalizasyonda, omurgasız ve omurgalıların gastrointestinal bölgesinde bulunur (Poxton 2005). Gram pozitifdir ancak bu görünüm özellikle inkübasyonun erken dönemlerinde görülebilmektedir (Timoney ve ark 1988, Quinn ve ark 2004, Rainley ve ark 2015). Genellikle hareketlidir ve peritrik flagellaya sahiptirler (Rainley ve ark 2015). *Clostridium perfringens*, dokularda kapsül oluşturabilen tek türdür ve hareketli değildir. *Clostridium spiroforme* haricindeki bütün patojenik *Clostridium* türleri düz basil şekillidir (Quinn ve ark 2004).

Clostridium türlerinin ayrımında endosporun lokalizasyonu, şekli ve boyutu önemlidir (Quinn ve ark 2002). Genellikle hücre genişliğinden daha büyük oval veya küresel endosporlara sahiptirler (Quinn ve ark 2004, Rainley ve ark 2015). Genellikle kemoorganotroftirler ve karbonhidrat veya peptonlardan organik asitler ve alkoller oluştururlar. Bazı türleri atmosferik nitrojeni tutar (Rainley ve ark 2015). Genellikle katalaz negatiftir (Collins ve ark 2004, Rainley ve ark 2015). Karbonhidratları, alkoller, amino asitleri, purinleri, steroidleri ve diğer organik bileşenleri metabolize edebilirler. Hücre duvarı genel olarak meso-diaminopimelic (meso-DAP) asit içerir. Etken genel olarak zorunlu anaerobiktir ancak oksijen toleransı suşlara göre değişim göstermektedir. Optimal üreme pH ve sıcaklığı pH 6.5-7.0 ve 30-37°C arasındadır. Suşlar fenotipik

karakterlerine göre ayırt edilmiştir. Bu ayırmada, glukozdan asit üretimi, jelatin hidrolizi, et sindirimi, nişasta hidrolizi kullanılmaktadır (Rainley ve ark 2015).

Patojenik *Clostridium* türleri dört grup içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu grupların 3'ü toksin aktivitesi ve etkiledikleri dokulara göre, diğer grup ise daha az önemdeki clostridiumları içermektedir. Bu sınıflandırmaya göre, ilk grupta gözle görünür doku hasarı olmaksızın nöro-musküler etki gösteren nörotoksik clostridiumlar olan *Clostridium tetani* ve *Clostridium botulinum* türleri yer almaktadır. Bir diğer grupta ise nispeten kas ve karaciğer gibi dokularda lokalize lezyonlar oluşturan histotoksik clostridiumlar. Gastrointestinal dokularda inflamasyona ve hasara sebep olan *Clostridium perfringens* tip A ve E enteropatojenik ve enterotoksijenik clostridiumlar içerisinde yer almaktadır. Dördüncü grup Clostridiumlar hayvanlarda sporadik görülen enfeksiyon sebebi olan clostridiumlardır (Quinn ve ark 2002).

Clostridium türleri toprak, su veya deniz tortusunda saprofit olarak bulunmaktadır. Ayrıca normal bağırsak florasında bulunurlar. Bir kısmı endosporlar halinde kas veya karaciğerde bulunabilir. Bu bakterilerin aktivasyonu sonucunda hastalık şekillenebilmektedir (Quinn ve ark 2002).

Zorunlu anaerobik olmaları sebebiyle numune toplama ve uygulamalarında özel işlemler gerekmektedir. Canlı hayvandan veya taze kadavradan numunelerin alınmaması durumunda, bağırsak florasındaki bakteriler dokulara yayılarak doğru laboratuvar analiz ve teşhisini engeller. Laboratuvara nakil için uygun örnekler doku blokları veya sıvılar anaerobik transport mediumu içerisine alınmış örneklerdir. Numuneler alındıktan hemen sonra kültüre edilmelidir. Maya ekstraktı, Vitamin K, ve heminle zenginleştirilmiş kanlı agar izolasyon için uygundur. Besiyerleri taze olmalı ve oksijensiz bir şekilde muhafaza edilmelidir. Uygun atmosfer koşulları anaerobik jar veya kabinler ile sağlanabilmektedir. Bu koşullar % 5 – 10 arasında CO₂ içermelidir. Bazı *Clostridium* türleri vejetatif formları 15 dakikadan fazla süre oksijene maruz kaldığında yaşayamamaktadır (Quinn ve ark. 2002).

Bağırsakların lümen kısmı ile oksijen taşıyan mukozal damarlar arasındaki uzaklık nedeniyle, lümen kısmı anaerobik bakteriler için 1 000 - 10 000 kat daha uygundur. Clostridium, Bacteroides - Prevotella grubu gibi bakteri grupları kolon

anaeroblarının % 99'unu oluşturmaktadır. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* etkenleri de kolon florasının baskın üyeleridir ancak yaş ilerledikçe miktarları azalmaktadır (Mullany ve Roberts 2010).

Dünya üzerinde toprak ve taze su içerisinde yoğun miktarda bulunmaktadır. Kontamine gıdaların oral kolonizasyonu sağlayarak *Clostridium spp.*'nin hayvanların gastrointestinal mikrobiotasının üyeleri olmasının kaynağıdır. *Clostridium* türlerinin spor oluşturmalarının yanında ekzotoksin üretebildikleri de bilinmesi gereken önemli bir konudur. Bilinen 80 *Clostridium* türünün 30'undan fazlası hayvanlarda patojen olarak bilinir ve bunların % 30'u insanlarda da patojendir (Mullany ve Roberts 2010).

1.2. *Clostridium difficile*

1.2.1. Tarihçe

Clostridium difficile (*Bacillus difficile*) ilk olarak Hall ve O'Toole tarafından 1935 yılında bebek gaita örneklerinden izole etmiştir (Mullany ve Roberts 2010). *Clostridium difficile* (*C. difficile*) adı, bakterinin izolasyonunun, identifikasyon ve laboratuvar çalışmalarının zor olması sebebiyle İngilizcede zor anlamına gelen “difficult” kelimesinden türetilmiştir (Rainey ve ark. 2015). Bakterinin ilk teşhisinden 1978 yılına kadar dünya genelinde patojen olmadığı düşünülmekteydi ancak 1978 yılından itibaren şiddetli nekrotize ve genellikle ölümle sonuçlanan kolon enfeksiyonu olan antibiyotik ilişkili diyare ve psödomembranöz kolitise neden olduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda *C. difficile* ilişkili (*Clostridium difficile* Associated Disease, CDAD) insan vakaları dünya genelinde artan bir eğilim göstermektedir (Mullany ve Roberts 2010). Günümüzde *C. difficile*, insanlarda şiddetli ishal, psödomembranöz kolitis ve toksik megakolona sebep olan önemli bir patojen olarak kabul edilmektedir (Angione ve ark. 2014).

1.2.2. Etiyoloji

Clostridium difficile, Gram pozitif, spor oluşturan, basil şekilli, zorunlu anaerobik, sıvı kültürlerde genellikle hareketli, peritirik flagellaya sahip, 0.5-1.9 x 3.0-16.9 µm boyutunda bir bakteridir (Rainey ve ark. 2015, Dawson ve ark. 2009). İncelenen preparatlarda tek tek görülebileceği gibi uç uca ikiden altıya kadar bakterinin birleşmesi ile zincir şeklinde görülebilir. Bakteri sporları oval, subterminal (nadiren terminal) ve hücreden şişkindir. Birçok suş için sporulasyon Brucella Blood Agarda 2 gün inkübasyon sonucu gelişir (Rainey ve ark. 2015). Glisin ve taurokolat sporulasyonu uyaran kimyasal maddelerdir. Deoksikolat da sporulasyonu uyarmaktadır ancak germine olan sporların fazla gelişmesini de inhibe etmektedir (Dawson ve ark. 2009). Katı besiyerlerinde spor oluşumunun gelişmesi için agar içeriğinde % 0.1 oranında sodyum taurocholate olmalıdır (Rainey ve ark. 2015). *C. difficile* sporlarının germinasyonu için gereken ortam koşulları 37°C ve pH 6.5-7.5'dir (Dawson ve ark. 2009).

Bakterinin vejetatif formu zorunlu anaerobik olması nedeniyle oksijene karşı duyarlıyken spor formu kurumaya, ısıya, birçok dezenfektana ve fiziksel ajanlara karşı dayanıklıdır (Wilcox 2003, Dawson ve ark. 2009, Weber ve ark. 2010). Etkenin sporları çevre ve ortam yüzeylerinde uzun süre boyunca canlılığını sürdürebilmektedir (Clements ve ark. 2010, Dawson ve ark. 2009). *C. difficile*, kolonda vejetatif halde, kolon dışarısında ise spor formunda bulunmaktadır. Bakterinin vejetatif formu, oda ısısında kuru yüzeylerde 15 dakika canlı kalırken, nemli yüzeylerde ise 6 saat canlı kalabilir (Weber ve ark. 2010).

Bakteri 25°C ile 45°C arasında üreme gösterirken en uygun üreme sıcaklığı 30-37°C'dir. Kanlı agardaki *C. difficile* kolonileri 2-5 mm çapında, dairesel, kenarları pürüzlü, düz veya hafif konveks, opak, gri-beyazımsı ve mat veya parlak koloniler şeklinde gözlenir. Hemin ve vitamin K1 ilave edilmiş Brucella kanlı agarda 18 saat inkübasyon sonrasında uzun dalgaboylu ultraviolet ışık altında solgun yeşil renkte floresan verir (Rainey ve ark. 2015).

Bakterinin başlıca virülens faktörleri olan üç toksinin (toksin A, toksin B, binary toksin) yanında flagellar protein, yüzey proteinleri, yüzey adezini yer almaktadır ve bu faktörler kolonizasyonu sağlamaktadır (Giannasca ve Warny 2004, Jones ve ark. 2013).

Tüm suşları 8 U/ml penisilin G, 4 µg/ml ampisilin, 4 µg/ml vankomisin, <1 µg/ml rifampin, ve 2 µg/ml metronidazol antimikrobiyal etken maddelerine duyarlıdır. Klindamisin, sefalosporinler, sefamisinler, tetrasiklinler, kloramfenikol ve eritromisine duyarlılığı değişkendir (Rainey ve ark. 2015).

16S rRNA gen dizilimine göre *C. difficile*, *Eubacterium tenue*, *Clostridium irregulare*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium mangenotii*, ve *Clostridium bifermentans* bakterileri ile % 94.7-95.4 benzerlik göstermektedir. DNA G+C içeriği (mol%):28 (Rainey ve ark. 2015).

1.2.3. Toksinler

C. difficile enfeksiyonlarının patogeneğinde rol alan ve büyük clostridial sitotoksinler ailesi (LCT) üyeleri olarak kabul edilen toksin A, toksin B ile clostridial binary toksinler arasında kabul edilen binary toksin (CDT) olmak üzere üç toksin sentezleyebilmektedir (Rainey ve ark. 2015, Mullany ve Roberts 2010, Rupnik ve ark. 2003, Jones ve ark. 2013, Carman ve ark. 2011, Dawson ve ark. 2009, Davies ve ark. 2016). Binary toksin üreten suşların prevalansı insanlara göre hayvanlarda daha yüksek orandadır (Jobstl ve ark. 2010). Toksin üretmeyen suşlar ise hastalık oluşturmamaktadır (Giannasca ve Warny 2004). Toksin A 2710 amino asit içermektedir ve moleküler ağırlığı 308 kDa'dır. Toksin B 269.6 kDa ağırlığında ve 2 366 amino asit içermektedir (Jank ve Aktories 2008).

Toksin A ve toksin B'nin de aralarında yer aldığı büyük clostridial sitotoksinlerin (LCT) yapısal ve fonksiyonel özellikleri; 1) yüksek moleküler ağırlığa sahip olmaları, 2) yapılarında bir amino-terminal (N-terminal) enzimatik bölge, 3) bir

merkezi hidrofobik bölge ve 4) karbonhidrat taşıyan karbosi-terminal (C-terminal) bölgelerin olmasıdır. Multivalan lektin olan C-terminal bölgenin fonksiyonu, konak hücrelerin yüzeyindeki karbonhidrat reseptörlerine uyumlu olması sebebiyle reseptöre toksinin bağlanmasını sağlar. Hedef hücre içerisine toksinin girişi reseptör-aracılı endositozis yoluyla olmaktadır. Merkezi hidrofobik bölge toksinin endositik vezikülden GTPaz substratını etkileyeceği bölgeye doğru yer değiştirmesinde görevli olduğu düşünülmektedir (Giannasca ve Warny 2004).

C. difficile tarafından sentezlenen toksin A ve toksin B hastalığın prevalansı ve patojenitesi için en önemli virülens faktörleridir (Belyi ve Aktories 2010). Toksin A ve toksin B'nin konak hücrelerinde Rho GTPaz'ların glukolizasyonu ile epitel doku kaybına neden olarak diyare ve kolitis meydana getirir (Belyi ve Aktories 2010, Jones ve ark. 2013). Toksinler intestinal epitel hücrelerin aktin hücre iskeleti yapısını bozmaktadır (Dawson ve ark. 2009). Toksin A, temel olarak sıvı kaybına neden olduğu için enterotoksin olarak kabul edilir ancak düşük oranda sitotoksik etki gösterir. Toksin B, enterotoksik aktiviteye sahip değildir ve toksin A ya nazaran daha güçlü sitotoksik etki gösterir (Rainey ve ark. 2015, Giannasca ve Warny 2004). Toksin B'nin bir pikogramdan daha az miktarına maruz kalındığında dahi hücreler yuvarlak şekil alır, destek çatıları bozulur ve hücre ölümü görülür (Rainey ve ark. 2015).

C. difficile genomunda 19.6 kb'lık patojen lokusu (PaLoc) bölgesi içerisinde toksin A ve toksin B sentezinden sorumlu 5 farklı gen bölgesi mevcuttur (Belyi ve Aktories 2010, Carman ve ark. 2011, Dawson ve ark. 2009). PaLoc bölgesindeki değişimler toksin üretiminin temelini oluşturmaktadır (Belyi ve Aktories 2010). *C. difficile* suşlarında PaLoc bölgesi aynı olmayabilir ve bu nedenle toksin A üretemeyen toksin B üretebilen veya toksin A üretebilen toksin B üretemeyen suşlar olabilmektedir (Dawson ve ark. 2009). PaLoc üzerindeki gen bölgeleri; toksin A'nın üretiminden sorumlu gen bölgesi *tcdA*, toksin B kodlayan bölge *tcdB*, her iki toksinin sentezi üzerine negatif regülatör görevi gören bölge *tcdC*, pozitif regülatör bölge *tcdR*, *tcdE* ise holin-like protein sentezinde görevlidir. Hipervirulent suşlarda negatif regülatör olan *tcdC* gen bölgesinde silinmeler olmaktadır (Belyi ve Aktories 2010).

Toksin A ve toksin B arasında % 63 oranında amino asit dizilimi benzerliği bulunurken, her iki toksin arasında antijenik benzerlik çok düşüktür. Bazı çalışmalar

sonucunda, hastalardaki antikor titreleri ile antikorların toksin nötralize edebilme kabiliyeti arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca hastaların yaşı ile birlikte antikor konsantrasyonu artmasına rağmen serum toksin nötralizasyon seviyesi azaldığı tespit edilmiştir (Wilcox ve Minton 2001).

Hastalığın doğal hayvan modeli hamsterlardır. Fare, hamster gibi deney hayvanlarında yapılan araştırmalarda, toksin A ve toksin B'nin saf bir şekilde oral olarak verilmesi sonrasında klinik semptomların tamamı deneysel olarak meydana gelir (Giannasca ve Warny 2004). Sadece toksin A, hamsterlara oral olarak verildiğinde letal etki gösterir ancak toksin B letal etki göstermez (Rainey ve ark. 2015, Giannasca ve Warny 2004). Toksinlerin her ikisi birlikte intraperitoneal uygulandığında letal etki gösterirler (Rainey ve ark. 2015). Her iki toksin birlikte verildiğinde sinerjik etki göstermektedir. İntragastrik yol ile verildiklerinde toksin A ilk olarak epitel bütünlüğü bozarak daha güçlü sitotoksin olan toksin B'nin hücre içerisine girişine kolaylık sağlar. Epitel bariyerin bozulması sonrasında toksin B hücrelerin toksikasyonuna ve ölümüne yol açar. Tek doz klindamisin uygulanması sonrasında toksijenik *C. difficile*'nin intragastrik olarak verilmesinin ardından diyare, letarji belirtileri sonrasındaki 2-3 gün içerisinde ölüm görülür (Giannasca ve Warny 2004).

Bazı *C. difficile* suşları, binary toksin (CDT, cytolethal distending toxin) olarak adlandırılan ve kromozomal genler tarafından kodlanan üçüncü bir toksin daha üretmektedir (Mullany ve Roberts 2010, Swick ve ark. 2016). Binary toksin üretebilen toksin A ve toksin B üretemeyen suşların da enfeksiyon oluşturabileceği belirtilmektedir (Rupnik ve ark. 2003, Eckert ve ark. 2015). Binary toksin *C. difficile* suşlarının % 17 – 23'ü tarafından sentezlenmektedir (Eckert ve ark. 2015). Toksin A ve toksin B üretebilen suşların % 36'sı binary toksin de üretmektedir. Buna ek olarak, toksin A ve B üretemeyen suşların % 2'si binary toksin de üretmektedir ancak bu etkenlerin asemptomatik bireylerden elde edilmiş olması nedeniyle bu toksinin enfeksiyondaki rolünün çok düşük olduğu belirtilmektedir (Mullany ve Roberts 2010). Binary toksin, aktin hücre iskeletinin depolimerizasyonunu, adezyonu ve bakterinin kolonizasyonunu sağlamaktadır (Jones ve ark. 2013, Davies ve ark. 2016). Binary toksinin hedef hücreye lipoliz-uyarımlı bir membran reseptörü aracılığı ile girdiği belirlenmiştir (Jones ve ark. 2013).

C. difficile'nin binary toksini, *Clostridium botulinum* tip C ve tip D'nin C2 toksini, *Clostridium perfringens* tip E'nin iota toksinin, *Clostridium spiroforme*'nin iota-like toksini clostridial binary toksinlerinin üyeleridir. Clostridial binary toksinler aktin değiştiren ADP-ribosyltransferaz'dır (Rupnik ve ark. 2003). Binary toksin polipeptid yapıdaki katalitik komponent CDTa (47.9 kDa) ve bağlayıcı komponent CDTb (98.8 kDa) olmak üzere iki komponentten oluşmaktadır (Rupnik ve ark. 2003, Carman ve ark. 2011, Davies ve ark. 2016).

Binary toksin üretiminden sorumlu gen bölgesi CDT lokus veya CdtLoc olarak tanımlanmaktadır. CdtLoc *cdtA*, *cdtB* ve *cdtR* genlerini içeren 6.2 kb lık gen bölgesidir (Carman ve ark. 2011). Binary toksin üretimi *cdtR* bölgesi tarafından regüle edilirken, *cdtB* gen bölgesi bağlanma komponentini, *cdtA* gen bölgesi enzimatik komponenti kodlamaktadır (Rupnik ve ark. 2005, Dawson ve ark. 2009). *CdtR*, *cdtA* ve *cdtB* genlerini içeren izolatlar binary toksin üretebilmektedir ve CDT⁺ olarak belirtilirler (Carman ve ark. 2011). Binary toksin üretemeyen *C. difficile* izolatlarında CdtLoc gen bölgesi 68 baz çifti uzunluğundadır (Dawson ve ark. 2009). *C. difficile* suşlarının toksin üretimine göre 5 sınıfa ayrılır ve A+B+CDT⁺ (IIIa, IV, V, VI, VII, IX, XIV, XV, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVIII), A+B+CDT⁻ (0, I, II, XII, XIII, XIX, XX, XXI, XXVI, XXIV, XXIX), B+A-CDT⁺ (X, V-like, XVI, XVII, XXX, XXXI), B+A-CDT⁻ (VIII), CDT+A-B- (XIa, XIb) olarak toksin tiplendirmesi tespit edilmiştir (Rupnik ve ark. 2003, Warren ve Guerrant 2011).

1.2.4. Epidemiyoloji

Clostridium difficile enfeksiyonu insanlarda nazokomiyal bir enfeksiyondur ve antibiyotik-ilişkili diyare vakalarının % 20'lik kısmını oluşturmaktadır (Carman ve ark. 2011, Simango ve Mwakurudza 2008). Etken koyun, domuz, tavuk, keçi, sığır gibi birçok hayvandan izole edilmiştir (Simango ve Mwakurudza 2008). Hayvanlardan ve insanlardan izole edilen etkenler benzer suşlardır (Awbersek ve ark. 2009). İnsanlardaki enfeksiyonların önemli kaynağı çiftlik hayvanlardır ve bu hayvanlar hastalık

rezervuarları olarak kabul edilmektedir (Skraban ve ark. 2013, Simango ve Mwakurudza 2008, Awbersek ve ark. 2009).

Son 20 yıl içerisinde birçok ülkede *C. difficile*'nin insidensi artma eğilimi göstermiştir. Hastalığın şiddetinde de artış olduğu 2003 yılında Kanada'da yaşanan salgın raporunda ilk olarak bildirilmiştir. Yapılan araştırma sonucunda hastalık nedeniyle yaklaşık 2 000 kişinin hayatını kaybettiği belirtilmektedir (Clements ve ark. 2010). Ülkelerdeki vakaların incelemelerinde en düşük düzeyde görülen ülkeler her 10 000 hastada pozitif vakası hiç olmayan Türkiye ve Lüksemburg olarak bildirilmektedir (Bauer ve ark. 2011). Hastalığın çocuklardaki vakalarının yetişkin vakalarının yanında artmakta ve 5 günlük bebeklerden 17 yaşlarına kadar değişen yaş aralığı gösterdiği bildirilmektedir (Pituch 2009).

Sağlıklı yetişkinlerin yaklaşık % 1-3'ü asemptomatik *C. difficile* taşıyıcılarıdır (Giannasca ve Warny 2004). Ayakta tedavi edilen yetişkinlerin % 3'ünde tedavi sonrası intestinal sistemlerine *C. difficile* kolonize olmaktadır (Gardiner ve ark. 2009). Sağlıklı bebeklerin % 60'ında klinik semptom olmaksızın etken tespit edilmiştir. Hastalığın gelişmesindeki en önemli risk faktörü antibiyotik tedavisidir. Antibiyotik kullananların yaklaşık % 20'sinde etken kolonize olmaktadır. Hastalık için özellikle 65 yaş üzeri olan insanlar, yatalak hastalar, kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu (AIDS) hastaları veya kemoterapi tedavisi görenler gibi kişiler risk grubunda yer almaktadır (Giannasca ve Warny 2004).

Clostridium difficile, deniz tortuları, toprak, su, kum, hastane ortamı, deve, at, eşek, köpek, kedi ve kanatlı gibi birçok hayvanın intestinal sistemi ve gaitasında bulunabilmektedir. Bunların yanı sıra, insan gaitası, kırmızı ve beyaz et ve et ürünlerinde, sebzelerde, nadiren kan, insan ve hayvanların piyogen enfeksiyon örnekleri gibi farklı ortamlardan da tespit edilmektedir (Rainey ve ark. 2015, Hopman ve ark. 2011, Skraban ve ark. 2013, Metcalf ve ark. 2011). Bakteri sporlarının çevre ortam yüzeylerinde, hastane personel kıyafetleri ve ekipmanlarında bulunması nedeniyle mücadelesi zordur (Giannasca ve Warny 2004). *Clostridium difficile* deniz gıdaları ve balıklardan % 4.8, toprak örneklerinde % 22, kıyma örneklerinde % 3 oranında tespit edilmiştir (Jobstl ve ark. 2010, Metcalf ve ark. 2011).

Clostridium difficile'nin sağlık tesisleri yuzeylerindeki araştırmada temizlik oncesinde enfekte hasta odalarının % 83'ünde, enfekte olmayan hasta odalarının % 33'ünde etken izole edilmiştir. Odalar temizlendikten sonra ise enfekte hastaların odalarının % 67'sinden *C. difficile* tespit edilmiştir (Dubberke ve ark. 2007). *Clostridium difficile* enfekte hastaların tedavi gurdukleri odalarda yapılan incelemelerde ise bakteri sporlarının en yoğun olduğu yuzey % 45 oranıyla taban yuzeyidir, daha sonra sırasıyla % 35 oranında aydınlatma pirizlerinde, % 9 oranında yatakta, % 8 oranında masada, % 3 oranında pencerede tespit edilmiştir (Verity ve ark. 2001).

Genellikle domuz, buzağı ve bu hayvanların yaşam alanlarında tespit edilen *Clostridium difficile* 078 ribotipine bağlı vakaların arttığı belirtilmektedir (Goorhuis ve ark. 2008, Jones ve ark. 2013). Hollanda'da 2005 - 2008 yılları arasında 078 ribotipinin insidensinin % 3'ten % 13'e yukseldiği belirtilmektedir (Goorhuis ve ark. 2008). *C. difficile* 027, 012, 017, 019, 036, 078 ve 153 PCR ribotiplerinin insanlarda, çiftlik hayvanlarında ve pet hayvanlarında ortak olduğu bildirilmektedir (Jones ve ark. 2013).

Ekonomik analizlere gure hastalığın ekonomik kaybı olgu başına Amerika'da 5 042 – 7 179 \$, İrlanda'da 4 577 £, Almanya'da 8 843 £, İngiltere'de 5 000 - 15 000 € olarak hesaplanmıştır (Wiegand ve ark. 2012, Jones ve ark. 2013, Dubberke ve ark. 2008). Amerika'nın hastalığa bağlı 897 milyon ile 1.3 milyar \$, Avrupa Birliği'nin ise yıllık 3 milyar € ekonomik kaybının olduğu bildirilmektedir (Jones ve ark. 2013, Dubberke ve ark. 2008). Enfeksiyonun 2008 yılındaki A.B.D.'deki ekonomik kaybı 4.8 milyar dolar olarak bildirilmektedir (Dubberke ve Olsen 2012). Amerika'da 1997-2007 yılları arasında *Clostridium difficile* nedeniyle hayatını kaybeden insan sayısı 43 513 insandır (Hall ve ark. 2012). İnsanlardaki bu hastalığın raporları gun geçtikçe artmaktadır, 1997 yılındaki raporlar ile 2007 yılındaki raporlar karşılaştırıldığında 20 yıl içerisinde hastalığın insanlardaki mortalitesinde 5 kat artış olduğu belirtilmektedir (Angione ve ark. 2014, Hall ve ark. 2012).

1.2.5. Risk Faktörleri

Hastalığın gelişimi ve sürecini kolaylaştıran bir risk faktörü antibiyotik kullanımıdır ve antibiyotik nedeniyle bağırsak florası zarar görürken toksin üreten *C. difficile* kolonize olur (Wilcox 2003, Clements ve ark. 2010). İnsanlarda enfeksiyon olguları tipik olarak antibiyotik tedavisi başlangıcındaki birkaç gün içerisinde gelişir (Wilcox 2003). Hastalığın gelişiminde yüksek riskli antibiyotikler; sefotaksim, seftazidim, co-amoksiklav, sefalosporinler, klindamisinler, orta riskli antibiyotikler; ampisilin/amoksisilin, ko-trimaksazol, makrolidler, tetrasiklinlerdir, penisilinler, düşük riskli antibiyotikler; aminoglikozidler, metronidazol, florokinolonlar, rifampisin, vankomisinler (Wilcox 2003, Bignardi 1998).

Hastalığın diğer risk faktörleri uzun süre hastane tedavisi, 65 yaş üzeri olmak, neoplastik hastalıklar, gastrointestinal operasyonlar, ülser tedavileri, nazogastrik tüp ile beslenme ve gastrointestinal hastalıklardır (Wilcox 2003, Pituch 2009, Bignardi 1998). Yaşlı insanların bağırsak florası *C. difficile* enfeksiyonunun gelişimine karşı daha düşük inhibitör etkiye sahiptir ve bildirilen enfeksiyon vakalarının % 80'inden fazlası 65 yaş üzerindeki hastanede tedavi edilmiş kişilerden oluşmaktadır (Wilcox 2003).

Çocuklardaki risk faktörleri: bağırsak florasının bozulması, immun yanıt yetersizliği, yetersiz beslenme, uygun olmayan koşullar, enfeksiyonlar ve kanserdir (Pituch 2009). İnsanlarda enfeksiyon riski yüksek yaş olarak belirtilirken hayvanlarda görülen formlar ise genellikle genç yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Zidaric ve ark. 2008).

1.2.6. Patogenez

Mikroorganizma sporları fekal-oral yol ile mide asidi bariyerini aşarak kolona ulaşır (Swick ve ark 2016, Giannasca ve Warny 2004). Herhangi bir enfeksiyon için tercih edilen antimikrobiyal tedavi sonucunda bağırsak florasının kaybı meydana gelirken *C.*

difficile sporları kolonda germine olur (Swick ve ark 2016, Giannasca ve Warny 2004, Genth ve ark. 2008).

Vejetatif forma dönüşen bakterinin epitelyal hücrelere adezyonu ve kolonizasyonunda belirli faktörler mevcuttur (Pechine ve Collignon 2016). Bu faktörlerden ikisi bakteri yüzey katman proteinleri (SLP) olan adezin Cwp66 ile sitein proteaz Cwp84'tür (Genth ve ark. 2008, Pechine ve Collignon 2016). Diğer bir kolonizasyon faktörü fibronektin bağlayan proteindir (Pechine ve Collignon 2016). Bakteri kolon epitel katmanında kolonize olduktan sonra iki büyük ekzotoksin olan toksin A ve toksin B'yi üretir (Giannasca ve Warny 2004).

Kolonizasyon sonrasında primer virülens faktörleri olan toksin A ve toksin B sentezlenir (Swick ve ark 2016, Genth ve ark. 2008). Toksin A ve/veya toksin B'nin sentezlenebilir olması virülens için önemlidir, toksijenik suşlar şiddetli hastalık oluşturabilme yeteneğine sahip iken, toksijenik olmayan suşlar ise hastalığa neden olmaz (Swick ve ark 2016). Her iki toksin de vejetatif *C. difficile* tarafından sentezlenir. Toksin sentezi uygun ortam şartlarında olmaktadır ve ortam sıcaklığı, glukoz, belirli amino asit, bütirik asit veya antibiyotikler gibi çeşitli ortam uyarıcıları tarafından düzenlenir (Genth ve ark. 2008). Bakteri tarafından sentezlenen toksinler enterik sinir sistemini uyarır ve yoğun nötrofil infiltrasyonuna, mast hücreleri ve makrofajlar tarafından çeşitli tümör nekrozis faktör ve proinflamatuvar interlökinlerin salınımını uyarmaktadır (Genth ve ark. 2008, Keessen ve ark. 2011). Etkenin toksin üretebilmesi için PaLoc bölgesi içerisinde yer alan ve negatif regülatör olan *tcdC* gen bölgesindeki silinme olması gerektiği belirtilmektedir (Mullany ve Roberts 2010).

Toksin A ve toksin B konak hücresinin çeşitli membran reseptörlerine bağlanmaktadır. Toksinin konak epitel hücresine bağlanması reseptör-temelli endositoz ile gerçekleşir (Genth ve ark. 2008). Her iki toksin de glukoziltransferaz toksin olarak sınıflandırılır ve yapısında N-ucunda glukoziltransferaz kısmı, küçük hidrofobik bir kısım ile karakterize translokasyon bölümü ve C-ucunda reseptöre bağlanma kısmı yer almaktadır. Toksinin C-terminal bağlanma kısmı, henüz belirlenememiş olan konak hücre reseptörüne bağlanır. Bağlanma sonrasında endositozis gerçekleşir ve toksin endozom ile hücre içerisine girer. Endozom içerisindeki toksin endozomal membrandan sitozole doğru hareket eder ve glukoziltransferaz kısmı endozom dışarısında kalır. Bu

aşama veziküler H^+ ATPaz tarafından endozomların asitliğinin artmasıyla meydana gelir ve membran üzerinde por oluşumunu sağlar (Genth ve ark. 2008, Jank ve Aktories 2008). Bafilomisin, H^+ ATPaz bloke ederek toksinin sitozole girişini ve hücrenin intoksikasyonunu inhibe eder (Jank ve Aktories 2008). Glukoziltransferaz kısım pordan geçerek sitozole ulaşır (Genth ve ark. 2008). Konak hücresi içerisinde bulunan inositol heksakisfosfat (InsP6) sitozole geçmiş glukozilasyon kısmının toksinin diğer kısımlarından ayrılmasını ve sitoplazmada serbest kalmasını sağlar (Jank ve Aktories 2008).

Hücrelerde bulunan Rho proteinleri hücre iskeletinin aktin polimerizasyonunda görev alan proteinler GTPaz'ların küçük moleküler kitleleridir. Clostridial glukozilasyon toksinleri (toksin A ve toksin B) Rho proteinlerinin yapısını değiştirmektedir. Rho GTPaz'lar GDP-bağlı formda inaktif haldedir. Guanin nükleotid çevirme faktörü (GEF), Rho GTPazları aktive eder. GEF aracılığı ile GDP, GTP ye dönüşür. Ayrıca GAP aracılığı ile hidroliz gerçekleştirilir. Toksinin glukozilasyon kısmı Rho GTPazın yapısında değişimine neden olarak aktive olmasını engeller. Rho proteinleri hücre içerisinde epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonlarında, immun hücre göçünde, adezyonda, fagositozda, süperoksit üretiminde, sitokin salınımı ve immun hücre sinyallerinde görev alır. Toksin Rho proteininin treonin 35 veya 37 sıralarında değişime neden olur (Jank ve Aktories 2008). Toksikasyon sonucunda konak hücre proteinlerinin Rho ailesi üyelerinin glikozilasyonu ile konak hücre iskeletinin bozulması sonucu epitel hücrelerinin ölümüne (apoptozis) ve güçlü bir yangı meydana gelir (Swick ve ark. 2016, Jones ve ark. 2013). Bu durumların sonucunda klinik semptomları şekillendiren bağırsak doku hasarlanır ve akut yangı gelişir (Swick ve ark. 2016). Enfeksiyon mukoza bariyer fonksiyonunun kaybı ve kolon yangısı ile karakterizedir (Genth ve ark. 2008).

1.2.7. Semptomlar

C. difficile sporları kolona ulaşması sonrasında ya asemptomatik kolonizasyon gözlenir ya da hastalık gelişerek diyare, kolitis, toksik megakolon, pseudomembranöz kolitis ve ölüm gözlenebilir (Gardiner ve ark. 2009, Wilcox 2003, Clements ve ark. 2010). Etken normal yetişkin insanların bağırsak floralarının mikroorganizmalarının % 2'sini oluştururken bu oran yaş ile birlikte artmaktadır ki yaşlı insanlarda % 10-20 oranında bir kısmı kapsamaktadır. Flora içerisindeki oranın yaşla değişiminin nedenleri ise antibiyotik alımı ve zamanla *C. difficile*'ye maruz kalma oranıdır (Wilcox 2003). İnsanlarda hastalığın gelişiminde üç temel basamak vardır; 1) normal kolon florasının bozulması, 2) toksijenik *C. difficile*'nin kolonda kolonizasyonu ve 3) *C. difficile*'nin kolonda çoğalması ve toksin üretmesidir (Keessen ve ark. 2011). İnsanlarda enfeksiyonun komplikasyonları, hipotansiyon, şok, sepsis, ileus, megakolon, perforasyon ve ölümdür (Usacheva ve ark. 2016). Klinik belirtilerin temel kaynağı toksinler olmasına rağmen gaita içerisindeki toksin miktarı ile hastalığın şiddeti arasında bir bağlantı yoktur (Kuijper ve ark. 2006).

Toksin A ve toksin B üretemeyen *C. difficile* suşları hastalık oluşturmamaktadır. Hastalık toksin A üretemeyen toksin B üreten suşlar tarafından da meydana gelebilmektedir (Planche ve Arnold 2009). İnsanlarda dört farklı klinik form görülür. Asemptomatik form, yetişkinlerin yaklaşık % 3-5'i ve yeni doğanların yaklaşık % 50'si *C. difficile*'nin asemptomatik taşıyıcılarıdır. Orta şiddette enfeksiyon, orta şiddette sulu kansız ishaldir ve abdominal kramp gözlenir. *Clostridium difficile* pseudomembransız kolitis formu, ateş, malazi, yüksek volümlü ve kanlı ishal ve abdominal ağrı mevcuttur. Dördüncü form ise pseudomembranöz kolitis formu, sistemik bir formdur (Mcfee ve Abdelsayed 2009). Hastalarda abdominal ağrı ve hassasiyet, kusma, anoreksiya, letarji, ateş ve kanlı olabilen şiddetli ishal gözlenir (Mcfee ve Abdelsayed 2009, Hammitt ve ark. 2008, Keessen ve ark. 2011).

Enfeksiyonun tekrar etmesi durumu gözlenebilen bir durumdur ve tekrar enfekte olma riski % 45 – 61 arasındadır (Johnson 2009a). İyileştikten sonraki birkaç gün ile birkaç hafta sonra reenfeksiyonlar meydana gelebilmektedir (Johnson 2009b). Bu

durum ya aynı suş ya da farklı bir suş ile enfeksiyon sonucu meydana gelir. Yeni bir suş tarafından enfeksiyon vakaları % 33 – 75 oranlarında görülmektedir. Tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonlarının risk faktörleri, yetersiz antikor yanıtı, kolon florasının bozulmasının kalıcı hale gelmesi, ileri yaş, uzun süreli hastanede kalış ve antasit ilaçların kullanılmasıyla (Johnson 2009a).

Clostridium difficile domuz, buzağı, köpek, at, devekuşu, fil, uçamayan kuşlar, kedi, fare, deney hayvanları gibi birçok hayvan türünde bulunmaktadır (Hammitt ve ark. 2008, Hopman ve ark. 2011, Keessen ve ark. 2011). İnsanlarda olduğu kadar hayvanlardan da izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direnç gelişimi yönünden incelenmesi antibiyotik tedavi protokollerine katkı sağlayacaktır (Thitaram ve ark. 2016).

C. difficile domuzlarda neonatal enteritis ilişkilidir (Hopman ve ark. 2011). Domuzlarda *C. difficile* enfeksiyonu ilk olarak 20 yılı aşkın süre öncesinde gnotobiyotik domuzlara kazara bulaşma vakası ile bildirilmiştir. Yaklaşık 15 yıl sonrasında ise 5 günlük domuz yavrularında *C. difficile* ve toksinlerinin neden olduğu dispne, hafif şişkin abdomen, skrotal ödem, ishal, asites, mezokolonda ödem ve hidrotoraks klinik belirtilerle seyreden bir salgın meydana geldi. Bu vakada mortalite oranı % 16 olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon, 2000 yılından itibaren neonatal domuzlarda en temel enteritis nedeni olarak kabul edilmiştir (Songer ve Anderson 2006).

Hastalıkta, 1-7 günlük domuzlar etkilenir ve ishal gözlenebilir (Hopman ve ark. 2011, Songer 2010, Songer ve Anderson 2006, Keessen ve ark. 2011). Domuzlarda bulunan suşlar genellikle 078 ribotipleri olmaktadır (Hopman ve ark. 2011). Şiddetli mezokolonik ödem, kolonda seröz ödem, nadiren pseudomembran oluşumu ve macun veya sulu kıvamda sarımsı kolon parçaları ile karışık bir ishal tablosu halinde gözlenir (Songer 2010, Songer ve Anderson 2006). Enfeksiyonun domuz yavrularında morbidite oranı % 97-100, mortalite oranı % 16'dır (Keessen ve ark. 2011). Barınakların 2/3'si, domuz yavrularının 1/3'i enfekte olmaktadır ve süten kesim döneminde domuzların normalden % 10 daha az kondisyona sahip olurlar (Songer 2010, Songer ve Anderson 2006, Keessen ve ark. 2011). Mikroskopik bakıda mukozada erozyon, mezokolona nötrofil lökosit infiltrasyonu yaygındır. Nötrofil eksudasyonu ve lümen içerisine fibrinin

meydana getirdiği görüntü “volkan lezyonu” olarak isimlendirilmiştir (Songer ve Anderson 2006).

Domuz yavrularındaki klinik belirtiler vejetatif bakterilerin veya bakteri sporlarının oral yol ile verilmesi sonucunda da deneysel olarak gözlenmiştir. Ayrıca, ishali olmayan domuzlarda da *C. difficile* ve toksinleri tespit edilebilmektedir. Normal dışkılayan veya konstipasyonu olan domuzların % 74’ünde toksin A ve toksin B tespit edilmiştir (Songer ve Anderson 2006).

C. difficile buzağılar için de oldukça önemlidir (Songer 2010). Buzağılarda enfeksiyon ince bağırsaklarda ve kalın bağırsaklarda enterokolitis şeklinde görülür. Deneysel olarak operasyon ile bağırsaklarına *C. difficile* toksinleri inokule edilmiş buzağılarda doku hasarı ve nötrofil infiltrasyonuna neden olduğu ortaya konulmuştur (Keessen ve ark. 2011). Kanada’da buzağılar üzerine yapılan bir vaka-kontrol epidemiyoloji çalışmasında ishali buzağıların gaitalarında sağlıklı buzağıların gaitalarına göre daha fazla toksin varlığı tespit edilmiştir. İnsanlardan izole edilen ribotipler ile buzağılardan izole edilen ribotipler (017, 027 ve 078 ribotipleri) aynıdır ve domuz ve buzağılardan izole edilen suşların % 80’den fazlası insanlarda ölüm ile sonuçlanmış vakaların suşları ile aynı veya benzerdir (Songer 2010).

Atlarda *C. difficile* enfeksiyonunda çeşitli klinik belirtiler ve değişken şiddette seyretmektedir. Genellikle *C. difficile*’nin metronidazol dirençli suşlar atlar için daha virulenttir (Diab ve ark. 2013). Atlar veya taylar *C. difficile* enfeksiyonuna karşı eşit oranda duyarlıdırlar (Diab ve ark. 2013, Uzal ve ark. 2012). Hastalık sporadik olarak da ya da aniden salgın olarak da ortaya çıkabilir (Diab ve ark. 2013). Taylarda genel olarak lezyonlar ince bağırsaklarda görülürken, atlarda lezyonlar sekum ve kolonda gözlenmektedir (Uzal ve ark. 2012). Tay ve atlarda temel klinik belirti ishaldir, bunun yanında muköz membranlarda hiperemi, yüksek ateş, taşıkardi, taşıpne, dehidrasyon, abdominal şişkinlik ve kolik vardır. Taylarda doğumu takiben hastalık gelişebilir ve depresyon, sulu veya kanlı ishal, dehidrasyon ve/veya toksemi takibinde sıklıkla ölüm meydana gelir (Diab ve ark. 2013).

Cooper ve ark. (2013) *C. difficile*'nin tavukların enterik hastalıklarının etiolojisinde yer alan ve nekrotize enteritisle karakterize % 90'ın üzerinde mortalite ile seyreden bir enfeksiyona sebep olduğu bildirilmektedir.

1.2.8. Laboratuvar Teşhisi

Hastalığın laboratuvar teşhisi gaita örneğinden ya toksin üreten *C. difficile*'nin izolasyonu ya da örnekte toksinin teşhisi üzerine temel almaktadır. Teşhis için gönderilen gaitaların taze olması ve inhibitör madde içermemesi gerekmektedir (Rodriguez ve ark. 2016).

1.2.8.1.Kültür

Klinik örneklerden *C. difficile*'in bakteriyolojik kültürde izolasyonu en duyarlı teşhis metotlarından biridir ve hastalığın antibiyotik direnç profillerinin takibi ve epidemiyolojik araştırmaların temelini oluşturur (Rodriguez ve ark. 2016). Bakterinin teşhisinde anaerobik kültürün sensitivitesi yüksek olmasına rağmen tek başına yeterli olmamaktadır (Napolitano ve Edmiston 2017). İnkübasyon süresinin 2 güne kadar uzuyor olması ve izolasyon ile identifikasyon sonrasında toksijenik suş olup olmadığı konusunda test yapma ihtiyacı bu metodun dezavantajı olarak kabul edilmektedir. Bakteri izolasyonunda George ve ark. (1979) tarafından ortaya konulan cycloserine-cefoxitin fuctose agar (CCF) halen günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodriguez ve ark. 2016).

Gelen örneklerden bakteri izolasyonu öncesinde spesifiteyi artırma amacıyla ya 80°C'de tutulması ya da "ethanol şoku" adı verilen ve örnek ile aynı miktarda saf etil

alkol ile karıştırılarak oda sıcaklığında inkübasyon ön işlemlerin uygulanması tavsiye edilmektedir (Rodriguez ve ark. 2016, Martinez-Melendez ve ark. 2017).

Ön işlem sonrasında ayırt edici ve özel besi yeri olan cycloserine-cefoxitin-fructose (CCF) agara ekim yapılır ve anaerobik ortamda inkübe edilir. Besiyeri içerisindeki cycloserine ve cefoxitin *C. difficile*'yi etkilemeksizin diğer Gram pozitif bakterileri ve Gram negatif bakterileri inhibe etmektedir. Etken izolasyonunda ticari kromojenik agarlar da kullanılabilir (Martinez-Melendez ve ark. 2017).

1.2.8.2.Seroloji

Gaita örneklerinde toksin A ve toksin B'nin teşhisinde enzim immunoassay (EIA) kolay kullanımı ve 2-6 saat içerisinde sonuç vermesi sebebiyle yaygın olarak tercih edilmektedir. EIA teşhis kitlerinin sensitivitelerinin % 63 - 99 arasında olduğu bildirilmektedir (Napolitano ve Edmiston 2017). Metot hücre kültürüne göre daha hızlı ancak daha düşük sensitiviteye sahip bir metottur ve uygulanabilmesi için özel bir ekipmana gerek duyulmaz (Rodriguez ve ark. 2016).

Test metodu tedavi indikatörü olarak kullanılmamalıdır çünkü başarılı bir şekilde tedavi edilmiş insanların % 25'inde EIA toksin testleri uzun süre pozitif sonuçlar vermektedir. Başka bir EIA metodunda ise hedef antijen *C. difficile*'ye ait glutamat dehidrogenaz (GDH)'dir (Napolitano ve Edmiston 2017). Bakteri tarafından sentezlenen ve gaita içerisine salınan GDH toksijenik suşlara spesifik bir enzim değildir. Bu nedenle bu enzime yönelik pozitif sonuçlar sonrasında toksin teşhisi yapılmaktadır (Rodriguez ve ark. 2016, Napolitano ve Edmiston 2017).

1.2.8.3.Hücre Kültürü

Toksin teşhisi için kullanılan en iyi ve güvenilir metot hücre kültürüdür. Hücre kültüründe kullanılan hücre hatları; Vero, Hep2, fibroblast, HeLa hücre hatlarıdır. Gaita içerisinde toksin var ise 24 - 48 saat içerisinde hücreler üzerine sitopatik etki gözlenir. Toksin B'nin sitopatik etkisinin toksin A'ya göre daha fazla olması nedeniyle daha çok bu yöntem toksin B'nin varlığını ortaya koyabilmektedir (Rodriguez ve ark. 2016).

1.2.8.4.Moleküler Teşhis

Moleküler temelli metotlardan PCR metotları insanlarda, hayvanlarda ve çevre örneklerinde bakterinin teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodriguez ve ark. 2016, Napolitano ve Edmiston 2017). Bu metotlarla 2 saat içerisinde pozitif veya negatif sonuç verilebilmektedir. Bu metotların sensitiveleri % 84 - 96, spesifiteleri % 94 - 99 arasındadır (Napolitano ve Edmiston 2017). Real time PCR ile de bakterinin ve toksinlerinin teşhisi sağlanabilmektedir (Rodriguez ve ark. 2016). Moleküler teşhis yöntemlerinde canlı hücre olmasına ihtiyaç duyulmaması sebebiyle numune gönderim koşulları zor değildir (Martinez-Melendez ve ark. 2017).

Teşhisi yapılan suşların karşılaştırılabilmesi için geliştirilen farklı moleküler tiplendirme metotları mevcuttur. Pulsed-field gel elektroforez (PFGE) ve restriction endonükleaz analizi (REA) bakterinin genotiplendirilmesinde Amerika ve Kanada'da yaygın olarak kullanılmaktadır. PFGE analizinde genellikle restriksiyon enzimi olarak SmaI ve SacII enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimler ile bakteri genomunda farklı bölgeler kesilerek kendine özgü bir band profili ortaya çıkarır. PFGE analizi ile adlandırılan suşlar NAP (North America Pulsotype) sonrasında numara yazılarak adlandırılmaktadır. REA metodu tam hücre DNA'sında uygulanmaktadır. Analizde restriksiyon enzimi olarak HindIII kullanılır. Sonucu klasik jel elektroforez sonucundaki

band profiline göre değerlendirilir. Avrupa’da bakterinin tiplendirilmesinde yaygın olarak PCR ribotiplendirme uygulanmaktadır. Bu metot 16-23S rDNA integenic spacer bölgelerinin boyut farklılıkları üzerine temel alan bir metottur. Sonuçları klasik jel elektroforezdeki band profiline göre yapılmaktadır band profillerinde bir band farklılığı yeni ribotip olacaktır. Ribotiplendirme sonrası her bir ribotip sırasına göre üç rakamlı olacak şekilde adlandırılır Örneğin, PCR ribotip 001 (Rodriguez ve ark. 2016).

1.2.9. Tedavi ve Koruma

Esasında gastrointestinal sistemde bulunan mikrobiyomun varlığı patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemektedir. Bu nedenle mikrobiyom kolonizasyon direnci olarak kabul edilmektedir. Bunda en önemli mekanizmalardan biri temel besinler için yarışmadır (Usacheva ve ark. 2016).

İnsanlarda *C. difficile*’e bağlı vakaların tedavisinde eğer mümkünse antibiyotik kullanılmamalıdır. Şiddetli vakalarda ise etkene karşı direkt metronidazol veya vankomisin etken maddeleri ile tedavi uygulanmalıdır (Keessen ve ark. 2011, Napolitano ve Edmiston 2017). Hastalığın tedavisinde metronidazol ve vankomisin kullanılmaktadır ancak bakterinin metronidazole karşı duyarlılığın azaldığı rapor edilmektedir (Goorhuis ve ark. 2008, Kelly ve Lamont 2008). Makrolidler içerisinde yer alan yeni fidaksomisin *C. difficile* üzerine vankomisinden 8 kat daha fazla etkili olduğu rapor edilmiştir (Napolitano ve Edmiston 2017). Hayvanların tedavilerinde ilk basamakta metronidazol etken maddesi ile tedavi gerçekleştirilmelidir ancak vankomisin etken maddesi insanlarda son dönemde kullanılması sebebiyle mecbur kalınmadıkça hayvanlarda kullanılmamalıdır. Hayvanların tedavilerinde mutlaka destekleyici sıvı ve elektrolit takviyesi yapılmalıdır (Diab ve ark. 2016).

Koruma stratejisi olarak kompetatif eksklüzyondan faydalanılabileceği bildirilmektedir (Keessen ve ark. 2011). Toksik olmayan *Clostridium difficile* suşlarının toksin üretebilen, hastalığa neden olan suşlar üzerine etkili olduğu ve

koruyucu etki gösterdiği araştırmalarda bildirilmektedir. İnsanlardan izole edilen toksijenik olmayan suşların hamster ve yavru domuzlar üzerine araştırmalarda koruyucu olduğu tespit edilmiştir (Diab ve ark. 2016, Keessen ve ark. 2011). Henüz bir aşısı olmasa da hastalığa karşı immunoproflaksi için aşı çalışmaları yapılmaktadır (Keessen ve ark. 2011, Napolitano ve Edmiston 2017). İntravenöz immunglobulin uygulanmasının da tedaviye katkı sağlayacağı bildirilmektedir (Napolitano ve Edmiston 2017). Hamster ve fare modellerinde yapılan araştırmalarda *C. difficile* toksin A'ya karşı antikorların hastalığın gelişimi ve taşıyıcılık üzerine koruyucu etki göstermiştir (Keessen ve ark. 2011). Toksin A ve toksin B'ye karşı spesifik monoklonal antikorların intravenöz yol ile verildiği insanlar reenfeksiyonlardan korumaktadır (Keessen ve ark. 2011).

Clostridium difficile hastalarının özel odalarda tedavilerinin sağlanması bakterinin çevreye ve diğer insanlara bulaşmasını önleyen önemli konudur (Fletcher ve Cinalli 2007, Khan ve Elzouki 2014, Napolitano ve Edmiston 2017). *C. difficile* gaita ile saçılmakta olup özellikle hastaların elleri ile insanlara bulaşmakta ve evre kontamine olmaktadır (Fletcher ve Cinalli 2007). Bakteri hastalardan veya kontamine olmuş ortamdan direkt veya indirekt yollar ile bulaşmaktadır (Napolitano ve Edmiston 2017). Hastanelerde oda yüzeyleri, tuvaletler, yataklar, tabanlar ve hastane ekipmanları genellikle bakteri sporlarıyla bulaşık halde olmaktadır (Fletcher ve Cinalli 2007). Hastanelerde enfeksiyonun kontrolü için enfekte hastaların izole edilmesi, sınırlı antibiyotik kullanımının sınırlandırılması, evre ve ortam yüzeylerinin dezenfekte edilmesi gerekmektedir (Keessen ve ark. 2011). evre yüzeylere veya bakteri kaynağı olan ekipmanlara eldiven gibi bariyerler kullanılması faydalıdır (Napolitano ve Edmiston 2017). Eldiven kullanımı ve el hijyeni nazokomiyal enfeksiyonların azalmasına etki etmektedir (Fletcher ve Cinalli 2007). El temizliğinde sabun kullanımı sporların uzaklaştırılmasında etkilidir (Fletcher ve Cinalli 2007). Hayvan hastanelerinde de benzer kontrol stratejisi uygulanarak hasta hayvanların karantina altında tutulması, kişisel koruyucu bariyerler (eldiven) aracılığı ile kişisel temizliğin sağlanması, hastane yüzeylerinin % 10'luk çamaşır suyu ile dezenfekte edilmesi ve ayak banyolarının oluşturulmasıdır (Keessen ve ark. 2011). İşletmelerde ise yavrulama bölümlerinin özellikle dezenfekte edilmesi çok önemlidir (Diab ve ark. 2016). Zayıf hijyen uygulamaları etkenin bulaşmasını kolaylaştırmaktadır (Fletcher ve Cinalli 2007).

Dezenfektan olarak uygun dezenfektanın tercih edilmesi gerekmektedir (Diab ve ark. 2016). Dezenfeksiyon için klorin temelli dezenfektanlar sporlar üzerine etkilidir ve yüzeylerin % 10'luk çamaşır suyuyla silinmesi gerekir (Keessen ve ark. 2011, Fletcher ve Cinalli 2007). Klorin-temelli dezenfektanlar dışındaki dezenfektanlar bakterinin sporulasyonunu uyarabilmektedir (Keessen ve ark. 2011).

1978 yılından itibaren insanlar için patojen olarak kabul edilen *C. difficile* domuz ve atlarda da patojen olarak kabul edilmektedir. Buzağı, kuzu, oğlak ve tavuklarda *C. difficile* teşhis edilmekte olup insanlarda meydana gelen vakaların kökenlerinin hayvansal gıdalardan olduğu bildirilmektedir. Ayrıca neonatal dönem çiftlik hayvanlarında bakterinin patojen olabileceği vurgulanmaktadır. Ülkemizde genel olarak insan vakaları ve gıdalardaki mevcudiyeti üzerine araştırmalar yapılmış olup neonatal dönem çiftlik hayvanları üzerine araştırmaya rastlanılamamıştır. Özellikle çiftlik hayvanlarının rezervuar olarak kabul edildiği bu hastalıkta çiftlik hayvanlarında araştırma yapılmasının hayvan ve insan sağlığı yönünden önemli olduğu düşünülerek ishalleri buzağı, kuzu, oğlak ve işletme içinde beslenen tavuklarda *C. difficile*'nin tespit edilmesi, bu izolatların toksijenik olarak karakterize edilmesi, toksijen olarak belirlenen suşların yaygın olarak karakterizasyonda kullanılan yöntem olan PCR ribotiplendirmelerinin yapılması ve broth mikrodilüsyon metodu ile antibiyogram yapılarak tedavide antibiyotik seçimine katkı sağlayabilmek amaçlanmıştır.

2- GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Gaita Örneklerinin Toplanması

Çalışma kapsamında 2015 yılı Mart-Haziran ayları arasında Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü hizmet alanı içerisindeki altı ilden (Ağrı, Artvin, Erzincan, Erzurum, Gümüşhane, Iğdır) yaşları 0-28 gün olan ishalli 50 adet buzağı (22 adet canlı, 28 adet ölü), 50 adet ishalli kuzu ve 50 adet ishalli oğlak gaita örnekleri numunesi ile 50 adet tavuk kloakal svap örneği olmak üzere toplam 200 adet gaita örneği 50 ml hacimli vida kapaklı steril kaplara alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen gaita örneklerinin illere göre dağılımı Çizelge 2.1’de verilmiştir. Örneklerin % 90’ı Erzurum ilindeki işletmelerden alınmıştır. Buzağılardan alınan örneklerin 46 (% 92)’sinin Erzurum, 1 (% 2)’si Ağrı, 1 (% 2)’si Erzincan, 1 (% 2)’si Gümüşhane, 1 (% 2)’si Iğdır illerinden alınmıştır. Kuzu örneklerinin 40 (% 80)’i Erzurum, 2 (% 4)’ü Ağrı, 2 (% 4)’ü Artvin, 5 (% 10)’u Erzincan, 1 (% 2)’si Gümüşhane illerinden alınmıştır. Oğlak örneklerinin 44 (% 88)’i Erzurum, 1 (% 2)’si Artvin, 5 (% 10)’u Erzincan illerinden, tavuk örneklerinin ise 49 (% 98)’u Erzurum, 1 (% 2)’si Erzincan illerinden alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 2.1. Alınan gaita örneklerinin illere göre dağılımı.

İl	Buzağı (n)	Kuzu (n)	Oğlak (n)	Tavuk (n)	Toplam (n)
Ağrı	1	2	-	-	3
Artvin	-	2	1	-	3
Erzincan	1	5	5	1	12
Erzurum	46	40	44	49	179
Gümüşhane	1	1	-	-	2
Iğdır	1	-	-	-	1
Toplam	50	50	50	50	200

2.1.2. Kültür

Gaita örneklerinin ön inkübasyonu için saf etil alkol kullanıldı. Gaita ve swap örneklerinin ön zenginleştirmeleri için *Clostridium difficile* Mannitol Taurocholate Broth kullanıldı. Bu sıvı besiyerinin içeriği Çizelge 2.2.' de verildi. Toz halde olan besiyerinden hassas terazide 55.63 gram tartıldıktan sonra 1 litre hacimli şişe içerisine 1 litre distile su ile karıştırıldı. Karışım manyetik karıştırıcıda kaynayıncaya kadar ısıtıldı. Isıl işlem sonrasında homojenize olan sıvı besiyeri 20 ml hacimli vida kapaklı tüplere 10'ar ml hacimlerle aktarıldı. Tüp sporlarına yerleştirilen tüpler otoklava alınarak 121°C de 15 dakika boyunca sterilize edildi. Sıvı besiyeri sterilizasyon aşamasından sonra kontaminasyon kontrolü için aerobik ortamda 37°C'de bir gün inkübe edildi. Steril sıvı besiyerleri kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Kültür işlemlerinde anaerobik ortamın sağlanması için 2.5 litre hacimli jar ve ticari Anaerocult A (Merck) anaerob ortam kiti kullanıldı.

Çizelge 2.2. *Clostridium difficile* Mannitol Taurocholate Broth İçeriği.

Bileşenler	Gram/Litre
Proteoz pepton	40.00
Disodyum hidrojen fosfat	5.00
Potasyum dihidrojen fosfat	1.00
Sodyum klorid	2.00
Magnezyum sülfat	0.10
Mannitol	6.00
Nötral kırmızı	0.03
Sodyum taurocholate	1.00
Sistein	0.50
pH 7.3±0.2 (25°C de)	

Çalışmada katı besiyeri olarak *Clostridium difficile* Agar kullanıldı (Çizelge 2.3). Dehidre haldeki besiyerinin 34.55 gramı, erlenmayer içerisinde 1 litre distile su ile karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri solüsyonu manyetik karıştırıcı ile ısıtılıp karıştırılarak homojenize edildi. Homojen hale gelen besiyeri otoklavda 121°C de 15 dakika boyunca sterilize edildi. Besiyeri sıcaklığı 45-50°C'ye düştüğünde, içerisine % 7 oranında defibrine koyun kanı ve *Clostridium difficile* Supplement (Çizelge 2.4) 1 şişe (2 ml) ilave edildi ve sonrasında 90 mm ebatlarındaki plastik tek kullanımlık petriler içerisine yaklaşık 18 - 20 ml besiyeri aktarıldı. Petrilere aktarılan besiyerleri bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi gün bir petri sterilite kontrolü için aerobik ortamda 37°C'de bir gün inkübe edildi. Steril katı besiyerleri kullanılıncaya kadar buzdolabında + 4°C'de muhafaza edildi. İzole edilen suşların -20°C'de saklanabilmesi için microbank kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyon analizleri için de fosfat buffer saline (PBS) kullanıldı.

Çizelge 2.3. *Clostridium difficile* Agar İçeriği.

Bileşenler	Gram/Litre
Proteoz pepton	40.00
Disodyum fosfat	5.00
Monopotasyum fosfat	1.00
Sodyum klorid	2.00
Magnezyum sülfat	0.10
Fruktoz	6.00
Agar	15.00
pH 7.4±0.2 (25°C de)	

Çizelge 2.4. *Clostridium difficile* Supplement İçeriği.

Bileşenler	Gram/Litre
D-Sikloserin	250 mg
Sefoksitin	8 mg

2.1.3 PCR ile İdentifikasyon, Toksin Genlerinin Tespiti ve PCR Ribotiplendirme

Ön işlem sonrası izolasyon için katı besiyerine ekimi yapılan numunelerdeki şüpheli kolonilerden *Clostridium difficile* identifikasyonu ve toksin A, toksin B ile binary toksin varlığı için kullanılan primerler Çizelge 2.5. ve bileşenler Çizelge 2.6.'da verildi.

Çizelge 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu test bileşenleri.

Primer Adı	Dizilim 5' – 3'	Ürün
<i>tpi</i> -(F)	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	230
<i>tpi</i> -(R)	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC	
<i>tcdA</i> -(F)	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT	369
<i>tcdA</i> -(R)	GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT	
<i>tcdB</i> -(F)	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA	160
<i>tcdB</i> -(R)	ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT	
<i>cdtA</i> -(FA)	GGGAAGCACTATATTAAAGCAGAAGC	221
<i>cdtA</i> -(FB)	GGGAAACATTATATTAAAGCAGAAGC	
<i>cdtA</i> -(R)	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
<i>cdtB</i> -(F)	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262
<i>cdtB</i> -(R)	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	
16S rDNA	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	
23S rDNA	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	

Çizelge 2.6. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşen	Bileşen Konsantrasyonu	Marka
Taq DNA Polimeraz	5 U/µl	Vivantis
MgCl ₂	25 mM	Thermo
dNTP Miks	10 mM	Vivantis
100 bp DNA Ladder		Thermo
DNA Loading Dye	6X	Thermo
Agaroz	-	Sigma
DNA Boyası	20 000x	RedSafe
TAE Buffer	50X	Merck

2.1.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Toksijenik *C. difficile* etkenlerinin antimikrobiyal duyarlılık testi için Sensititre Anaerob duyarlılık test kiti (Trek Diagnostic Systems, Thermo) kullanıldı. Kit içeriği Çizelge 2.7.'de verildi.

Çizelge 2.7. Antimikrobiyal duyarlılık test kiti içeriği

Cihaz/Program	Marka
Anaerobe MIC Plate	Sensititre/Trek Diagnostic Systems
Supplemental Brucella Broth for Anaerobes	
Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth	

2.2. Yöntem

2.2.1. Gaita Örneklerinin Toplanması

Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen ve ishal nedeni ile öldüğü belirtilen yaşları 0-28 günlük buzağı, kuzu ve oğlaklardan gaita örnekleri, tavuklardan ise kloakal svap örnekleri alındı. Nekropsi ünitesine gelen hayvanların sistemik nekropsisi yapıldı. Gaita örnekleri etkenlerin kolonize olduğu kolon kısmından 3-10 ml kadar steril vida kapaklı tüplere alınarak laboratuvara sevk edildi.

Erzurum ili Aziziye ilçesindeki iki farklı köyden 6 farklı işletmeden toplam 22 adet buzağıdan gaita örnekleri alındı. Gaita örnekleri ishal olmuş 0-28 günlük canlı

buzağılardan rektal tuşe ile steril 50 ml'lik steril vida kapaklı tüpler içerisine alındı. Alınan örnekler soğuk koşullarda en fazla 2 saat içerisinde laboratuvara getirildi.

2.2.2. Kültür

Laboratuvara gelen her bir gaita örneği 1:1 hacim oranında saf ethanol ile steril bir kap içerisinde karıştırıldı ve çalkalanarak homojen hale getirildi. Homojen hale getirilmiş örnekler oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilerek “alkol şoku” sağlandı. Her bir örnekten 1 ml alınarak *Clostridium difficile* Mannitol Taurocholate Broth içerisine inokule edildi. Anaerocult A (Merck) kitinin aktive olması için içerisine 35 ml su eklendi. Ekim yapılmış sıvı besiyerleri ve su ilave edilmiş anaerob ortam kiti jar içerisine alındı. Hazırlanan jarlar etüvde 37°C de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında her bir sıvı besiyerinden alınan 100 µl örnek *Clostridium difficile* Agara seyrelterek ekimi yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri Anaerocult A (Merck) kiti ile birlikte jar içerisine alınarak 37°C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerlerinde tipik koloni morfolojisine sahip ve Gram boyamasında Gram pozitif basil şekilli morfolojiye sahip bakterilere ait koloniler tekrar *Clostridium difficile* Agara pasajlanarak Anaerobik ortamda 37°C’de anaerobik koşullarda inkübe edildi. Pasajlanmış kültürlerin bulunduğu jarlar 48 saat inkübasyon sonrasında açılarak saf koloniler incelendi. Pozitif olduğu düşünülen besiyerlerindeki 2-3 bakteri kolonileri antimikrobiyal duyarlılık testi için Cryobank içerisine, polimeraz zincir reaksiyon testleri için de 2-3 bakteri kolonisi 0.2 ml’lik mikrosantrifüj tüpleri içerisinde yer alan steril PBS ile homojenize edilerek -20°C’de muhafaza edildi.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İdentifikasyon ve Toksin Genlerinin Tespiti

PBS içerisine alınmış *C. difficile* bakteriyolojik kültür pozitif olan bakteri kolonilerinden DNA ekstraksiyonu için kaynatma metodu kullanıldı. Kaynatma işlemi

için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde bulunan PBS-bakteri süspansiyonu thermal cycler cihazında 99.0°C'de 10 dakika boyunca bakterinin parçalanması sağlandı. Daha sonrasında tüpler 10 000 g devirde 10 dakika santrifüj edildi. DNA örneği için süpernatanttan 5 µl kullanıldı.

Clostridium difficile'in tür düzeyinde identifikasyonu için *tpi* (triose phosphate isomerase) gen bölgesine spesifik primerler, toksin A varlığının tespiti için *tcdA* gen bölgesine spesifik primerler, toksin B varlığının tespiti için *tcdB* gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu Lemee ve ark. (2004) metoduna uygun şekilde düzenlendi. Reaksiyon karışımı Çizelge 2.8. verildi.

Çizelge 2.8. PCR ile identifikasyon ve toksin genlerinin polimeraz zincir reaksiyon karışımı.

Bileşen	Stok Solüsyon	Miktar
Taq DNA Polimeraz	5 U/µl	0.5 µl
Taq Buffer	10X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl
dNTP Miks	10 mM	0.5 µl
<i>tpi</i> -(F)	10 µM	1 µl
<i>tpi</i> -(R)	10 µM	1 µl
<i>tcdA</i> -(F)	10 µM	1 µl
<i>tcdA</i> -(R)	10 µM	1 µl
<i>tcdB</i> -(F)	10 µM	1 µl
<i>tcdB</i> -(R)	10 µM	1 µl
Deiyonize Distile Su	-	9 µl
Hedef DNA	-	5 µl
Toplam		25 µl

Hazırlanan PCR reaksiyon tüpleri thermal cycler cihazı ısı bloğuna yerleştirildi. Reaksiyon sıcaklık işlemleri; ilk denaturasyon için 95°C'de 3 dakika, takibinde denaturasyon için 95°C'de 30 saniye, bağlanma derecesi 65°C'den her döngüde 1°C'de azalacak şekilde 30 saniye, uzama için 72°C'de 30 saniye toplamda 11 döngü

oluşturuldu. İlk 11 döngü sonrasında 30 döngü olacak şekilde denaturasyon için 95°C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye, uzama için 72°C’de 30 saniye olarak gerçekleştirildi.

İzole edilen örneklerden *C. difficile* binary toksin varlığının araştırılmasında Person ve ark. (2008)’in metodu kullanılarak binary toksin üretiminden sorumlu *cdtA* ve *cdtB* gen bölgelerinin varlığı araştırıldı. Reaksiyon karışımı Çizelge 2.9.’deki gibi 0.2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerinde hazırlandı.

Çizelge 2.9. Binary toksin genleri *cdtA*, *cdtB* genlerinin varlığının araştırılması.

Bileşen	Stok Solüsyon	Miktar
Taq DNA Polimeraz	5 U/μl	0.5 μl
Taq Buffer	10X	2.5 μl
MgCl ₂	25 mM	1.5 μl
dNTP Miks	10 mM	0.5 μl
<i>cdtA</i> -(FA)	10 μM	1 μl
<i>cdtA</i> -(FB)	10 μM	1 μl
<i>cdtA</i> -(R)	10 μM	1 μl
<i>cdtB</i> -(F)	10 μM	1 μl
<i>cdtB</i> -(R)	10 μM	1 μl
Deiyonize Distile Su	-	10 μl
Hedef DNA	-	5 μl
Toplam		25 μl

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra thermal cycler cihazına reaksiyon tüpleri yerleştirildi. Reaksiyon sıcaklık işlemleri; ilk denaturasyon için 94°C’de 3 dakika, takibinde denaturasyon için 95°C’de 30 saniye, bağlanma derecesi 54°C’de 30 saniye, uzama için 72°C’de 30 saniye toplamda 40 döngü olarak son uzama işlemi için 72°C’de 3 dakika olarak gerçekleştirildi.

Tüm polimeraz zincir reaksiyonlarında elektroforez için % 1.5’lik jel hazırlandı. Hassas terazide tartılan 0.75 gram agaroz 50 ml 1 X’lik TAE buffer ile karıştırıldı. Mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar ısıtıldı. Homojen hale gelen agaroz

50°C'ye kadar soğuduktan sonra içerisine DNA boyası 0.1 µl/ml eklendi ve homojen hale getirildikten sonra jel tankına dökülerek oda sıcaklığında jelin donması bekledi.

Thermal cyclerda reaksiyonlar tamamlandıktan sonra parafilm band üzerinde 10 µl PCR ürünü ile 2 µl 6X loading dye boyası ile karıştırılarak homojenize edildi. Boya ile homojen hale gelen örnekler donmuş olan jel üzerindeki kuyucuklara aktarıldı. Her çalışmada bir kuyucuğa 1 kısım DNA Ladder 1 kısım 6X loading dye ve 4 kısım deiyonize distile su olacak şekilde hazırlanmış solüsyon yüklendi. Elektroforez işleminde artı-eksi kutup arası mesafenin 5 katı büyüklükte voltaj hesaplanarak 45 dakika jelde yürütüldü.

Elektroforez işlemi sonrasında jel transilluminatörde incelendi. *Clostridium difficile* identifikasyonu için kullanılan *tpi* gen bölgesine spesifik 230 bp'de bant gözlenmesi pozitif olarak değerlendirildi. Toksin A üretiminden sorumlu gen bölgesi olan *tcdA* gen bölgesinde silinme olmamış ise 369 bp'de, silinme olmuş ise 110 bp'de bant oluşumu arandı. Toksin B üreten suş olduğu 160 bp'de bant oluşumu ile belirlendi. Binary toksin üretiminden sorumlu gen bölgeleri olan *cdtA* pozitifliği 221 bp'de, *cdtB* pozitifliği için 262 bp'de bant oluşumu arandı.

2.2.4. PCR Ribotiplendirme

Polimeraz zincir reaksiyonu ile *C. difficile* etkenlerinin ribotiplendirme testi Bidet ve ark. (1999) metoduna uygun olarak gerçekleştirildi. Bu test için 16S rDNA ve 23S rDNA genleri üzerinde tekrar eden gen bölgelerinin çoğaltılmasına bağlı ribotiplendirme yapıldı. Toksik Clostridium difficile olarak tespit edilen izolatların saf kolonilerinden 3-5 adet alındı ve içerisinde 0.5 ml PBS bulunan steril 1.5 ml'lik tüplere alındı. DNA izolasyonu için kaynatma metodu kullanıldı. Tüpler içerisine alınmış örnekler ısı bloğunda 95°C'de 10 dakika bekletildikten sonra 10.000 Devirde 10 dakika santrifüj edildi. DNA örneği olarak sıvının üst kısmından 3 veya 5 µl kullanıldı.

Reaksiyonlar 0.2 ml hacimdeki mikrosantrifüj tüplerinde Çizelge 2.10.'daki gibi hazırlandı.

Çizelge 2.10. PCR ribotiplendirme reaksiyon karışımı.

Reaktif	Konsantrasyon	Miktarı
Deiyonize distile su		37.0 µl
Taq buffer (MgCl* içeren)	10X	5.0 µl
dNTP Miks	10 mM	2.0 µl
Taq DNA Polimeraz	5 u/ µl	0.25 µl
16S rDNA Primeri	50 pmol/µl	1.0 µl
23S rDNA Primeri	50 pmol/µl	1.0 µl
Örnek DNA		3-5 µl
Toplam		49.25 – 51.25 µl

*MgCl'nin son hacmi 1.5 mM oranındadır.

Reaksiyon tüpleri termal cyclor cihazına yerleştirildikten sonra Çizelge 2.11.'deki döngü değeri kullanarak reaksiyon yürütüldü.

Çizelge 2.11. PCR ribotiplendirme reaksiyon döngü ve sıcaklıkları.

İşlem	Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü
İlk Denaturasyon	95°C	5	1 döngü
Denaturasyon	95°C	1	
Bağlanma	57°C	1	35 döngü
Uzama	72°C	1	
Son Uzama	72°C	10	1 döngü

Termal cyclor cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra ürünlerin konsantre hale getirmek için cihaz kapağı ve reaksiyon tüplerinin kapakları açılarak 75°C'de 45 dakikaya kadar beklenildi.

Elektroforez işlemi için % 3'lük agaroz hazırlandı. Jel tankına uygun olarak agaroz 100 ml hacimde hazırlandı. Konsantrasyonu 50X olan stok TAE bufferdan 1X'lik çalışma solüsyonu hazırlandı. Yoğunluğu 50X olan TAE bufferdan 10 ml alındı

ve üzerine 490 ml steril distile su eklenerek 1X yoğunluğunda çalışma solüsyonu hazırlandı. Elektroforez için 300 ml hacimli erlen içerisine 1X 'lık TAE bufferdan 100 ml aktarıldı üzerine 3 gram agaroz katıldıktan sonra mikrodalga fırında ısıtım işlemi uygulandı. Homojen hale gelen agaroz oda ısısında soğuyuncaya kadar bekletildi. Yaklaşık 50-60°C derecelere geldiğinde jel içerisine 15 µl nükleik asit boyası katıldı ve homojen hale gelinceye kadar karıştırıldıktan sonra jel tankına döküldü. Jel tankı oda sıcaklığında katılaşuncaya kadar bekletildi.

Hazırlanan agaroz kuyucuklarında her üç örnekte bir olacak şekilde 100 bp'lik DNA ladder ve 6X loading dye ile karıştırılan örneklerden 20 µl jel kuyucuklarına aktarıldı. Elektroforez 2.5 V/cm olacak şekilde 5 saat süre boyunca uygulandı. Uzun süre elektroforez sonucunda TAE bufferın ısınarak ürünlerin bozulmasına neden olması durumuna karşın her 1.5 saatte bir TAE buffer yenilendi. Elektroforez sonrasında jel transilluminatörde incelendi ve diğer araştırmaların band profilleri ile karşılaştırıldı.

2.2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık metodu olarak CLSI'ya göre zorunlu anaerobik bakteriler için uygun olan mikrobrot dilüsyon metodu uygulandı. Toksikjenik suşlar saf olarak kanlı Kolombiya agarı ekim yapılarak jar içerisinde anaerobik ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında jarlar açılarak kültürler incelendi ve kontamine olmamış kültürlerden 3-5 koloni Mueller – Hinton sıvıbesiyeri içerisinde homojen hale getirildi. Mueller- Hinton besiyerinden steril filtreli otomatik pipet ile 100 µl bakteri süspansiyonu supplementli Brucella sıvıbesiyeri içerisine aktarıldı. Hazırlanan son süspansiyonda bakteri miktarı yaklaşık 1×10^6 olmaktadır. Supplementli Brucella sıvı besiyeri 8-10 kez aşağı yukarı yapılarak homojen olması sağlandı. Daha önceden steril edilmiş cam küvet içerisine bakteri süspaniyonu boşaltıldı. Anaerob antibiyogram pleytinin her kuyucuğuna 8 kanallı otomatik mikropipet ile 100 mikrolitre süspansiyon aktarıldı ve pleyt üzeri delikli pleyt bandı ile kaplandı. Bakteri ekimi yapılmış olan

pleytlerden her 3'ü bir jar içerisine anaerobik ortam kiti ile birlikte konuldu ve 37°C'de 46 - 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonrasında jarlar açılarak antibiyogram duyarlılığı tespit edildi. Pleytin tamamında gözlenen kontaminasyonlar değerlendirmeye alınmadı ancak tek kuyucukta gözlenen kontaminasyonlar göz ardı edildi.

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları EUCAST ve CLSI standart MİK değerleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi (EUCAST 2018, Roe-Carpenter 2007)



3- BULGULAR

3.1. Gaita Örneklerinin Toplanması

Çalışmada gaita örneği alınan ahırların modernize bir yapıda olmadığı, buzağı, kuzu ve oğlakların yetişkin hayvanların ahırında tahta bariyer ile çevrili dar alanlarda yetiştirildiği tespit edildi. Tavukların ise özellikle sığır işletmeleri içerisinde yetiştirildiği görüldü. İşletmelere ait genel hijyen ve dezenfeksiyon tedbirlerinin uygulanmadığı görüldü (Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Buzağılara ayrılan bölmeler yetişkin hayvanların yanında bariyer ile ayrılmış bölme.



Şekil 3.2. Kış aylarında ahır içerisinde buzağı ve sığırlarla birlikte barındırılan tavuklar.

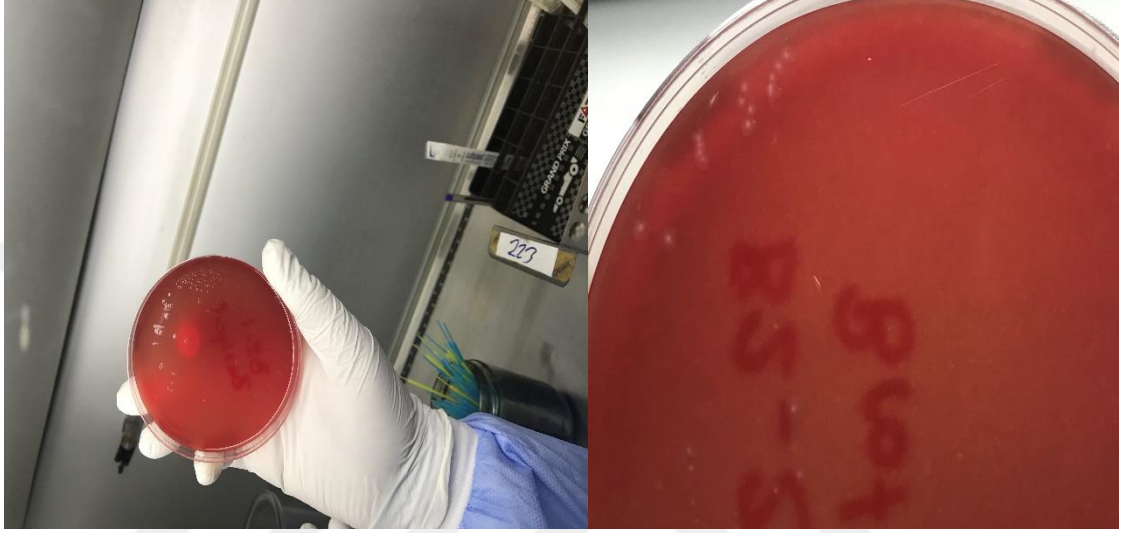
3.2. Kültür Bulguları

Alınan gaita örneklerin laboratuvar analizlerinin ilk basamağı olan bakteriyolojik kültür incelemesinde ön zenginleştirme inkübasyonu ve sonrasında bakteri izolasyonu takip edilerek bakteri morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyon sağlandı. Alınan örneklerdeki izolasyon sayıları Çizelge 3.1.'de görülmektedir.

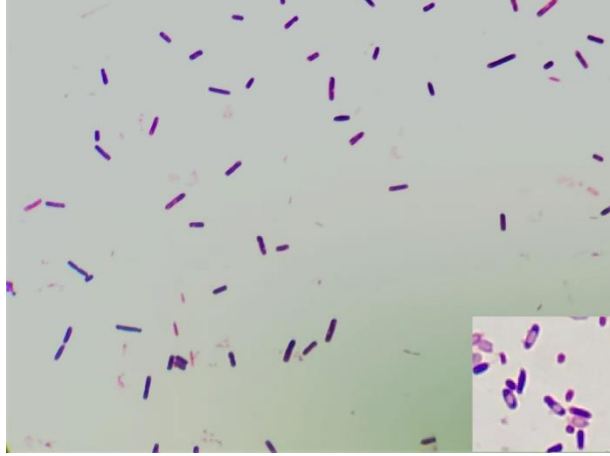
Çizelge 3.1. Alınan örneklerdeki *Clostridium difficile* izolasyon oranı.

	<i>C. difficile</i> izole edilen örnek sayısı (n)	<i>C. difficile</i> izole edilemeyen örnek sayısı (n)	Toplam Örnek Sayısı (n)
Buzağı	35	15	50
Kuzu	15	35	50
Oğlak	7	43	50
Tavuk	1	49	50

Buzağılardan alınan gaita örneklerinin % 70.0 (35)'inden, kuzu örneklerinin % 30.0 (15)'inden, oğlak numunelerinin % 14.0 (7)'ünden ve tavuk gaita örneklerinin % 2.0 (1)'inden *Clostridium difficile* tespit edildi. Araştırma boyunca toplanan gaita örneklerinin % 29.0 (58)'inden *Clostridium difficile* izole edildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3.3. İzole edilen *Clostridium difficile*'lerin koloni morfolojisi.



Şekil 3.4. *Clostridium difficile* Gram boyama (x100 büyütme).

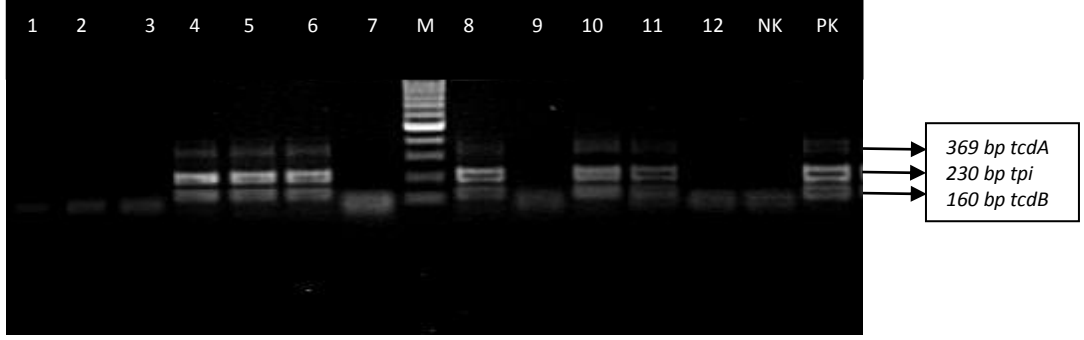
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İdentifikasyon ve Toksin Genlerinin Tespiti

Bakteriyolojik kültür yöntemi ile identifiye edilen suşların moleküler identifikasyonu amacıyla polimeraz zincir reaksiyonundan faydalanıldı. Bakterinin tür düzeyinde identifikasyonu için *tpi* bölgesine spesifik primerler kullanılarak moleküler identifikasyon gerçekleştirildi.

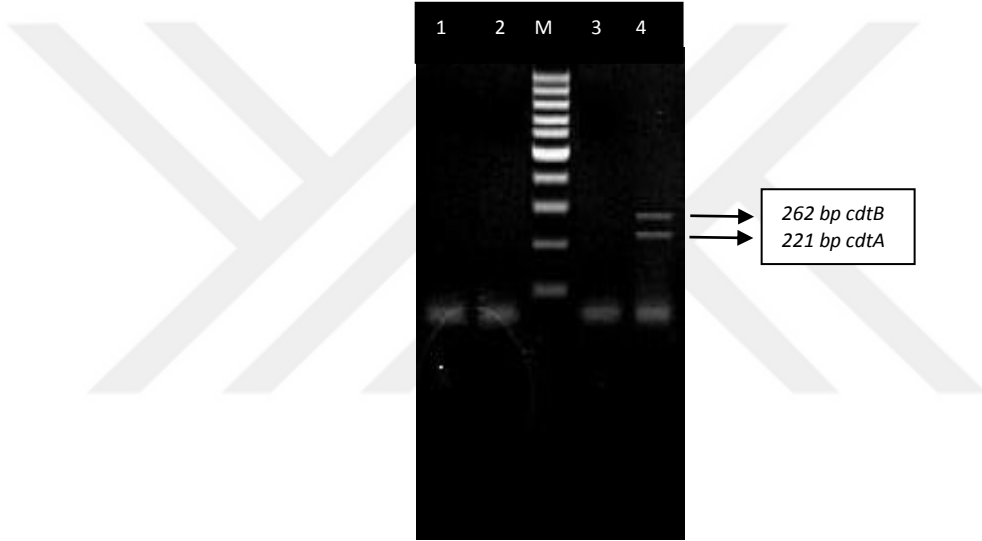
Buzağı, kuzu, oğlak ve tavuklardan alınan örneklerden izole edilen suşlardan *Clostridium difficile* şüpheli toplam 58 adet izolat *tpi* gen bölgesine göre de *C. difficile* olarak identifiye edildi. İdentifiye edilen 58 izolatın toksin tiplendirme analizinde toksin A teşhisi için *tcdA*, toksin B teşhisi için *tcdB* (Şekil 3.5.) ve binary toksin tespiti için *cdtA* ve *cdtB* gen bölgelerine (Şekil 3.6.) spesifik primerler kullanıldı. Tür identifikasyonu ile birlikte izolatların 28 (% 48.2)'inin toksijenik karaktere sahip olduğu belirlendi.

Buzağılardan alınan örneklerden izole ve identifiye edilen 35 suşun toksin tiplendirmesinde 22 suşun toksijenik olduğu tespit edildi. Toksijenik olarak tespit edilen suşların toksin profilleri: izolatların 10'u (% 45.4) A+B+CDT+, 12'si (% 54.5) A-B+CDT- olarak tespit edildi.

Kuzulardan alınan gaita örneklerinden izole edilen 15 izolatın toksijenik değerlendirmesinde izolatların 6'sının toksijenik olduğu tespit edildi. İzolatların toksin üretim karakterleri: 5 (% 83.3) adet izolatın A-B-CDT+, 1 (% 16.6) adet izolatın ise A-B+CDT- olarak belirlendi. Oğlak gaita örneklerinden izole edilen 7 izolatın ve tavuk kloakal svap örneklerinden izole edilen 1 izolatın toksin üretebilen *C. difficile* olmadığı tespit edildi.



Şekil 3.5. Clostridium difficile toksin karakterizasyonu. *tpi* 230 bp, *tcdA* 369 bp ve *tcdB* 160 bp (M: DNA Ladder 100-1000 bp)

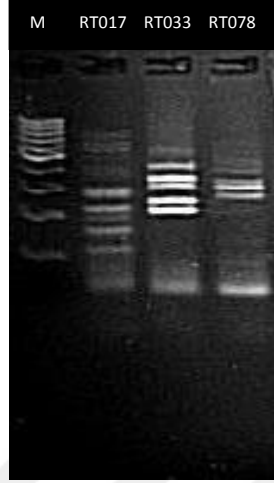


Şekil 3.6. Binary toksin teşhisi multiplex PCR jel görüntüleri *cdtA* 221 bp ve *cdtB* 262 bp (M: DNA Ladder 100-1000 bp).

3.4. PCR Ribotiplendirme

Toksijenik karaktere sahip olan 28 adet izolâtın genotiplendirmesinde Avrupa ülkelerinde yaygın olarak kullanılan PCR ribotiplendirme metodu kullanıldı. Metoda uygun olarak gerçekleştirilen analiz sonucunda toplam 22 adet buzağıdan izole edilen toksijenik suşların 10 tanesinin ribotip 078 ve 12 tanesinin ise ribotip 017 olarak tespit

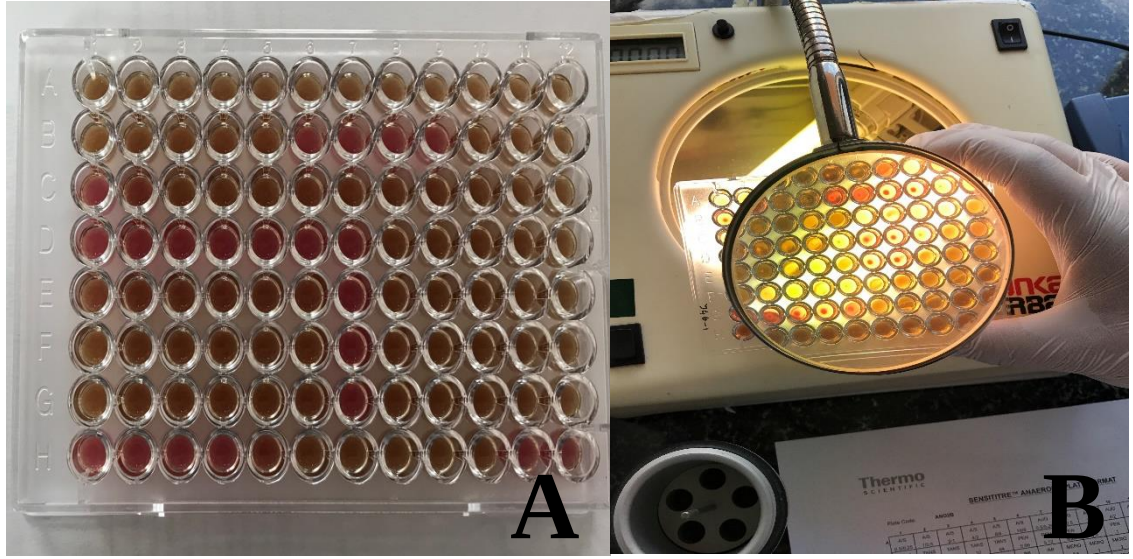
edildi. Kuzu gaita örneklerinden izole edilen toksijenik suşlarından 1 tanesinin 017 ve 5 tanesinin ribotip 033 olarak tespit edildi (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Toksikijenik izolatların PCR ribotip profilleri (M: DNA Ladder 100-1000 bp).

3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Toksijenik karakterdeki 28 adet izolatın antimikrobiyal duyarlılığında mikrobrot dilüsyon metodu uygulandı (Şekil 3.8.). Bakteri üremesinin en son görüldüğü kuyucuktaki belirtilen antibiyotik konsantrasyonu Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edildi. Analizler esnasında 4 suşa ait antibiyogram mikroplatinde kontaminasyon tespit edildi ve değerlendirme dışı bırakıldı. Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmış suşlara ait MİK50 ve MİK90 sonuçları ve duyarlılık-direnç yüzdeleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Toksikjenik suşların mikrobrot dilüsyon metodu ile incelenmesi. A) İnkübasyon sonrası görünüm, B) Minimal inhibisyon konsantrasyonlarını okuma aşaması.

Analiz edilen tüm toksijenik suşların ampisilin/sülbaktam, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, imipenem, metronidazol, mezlosilin, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam etken maddelerine duyarlı olduğu tespit edildi. Suşların % 25'inin ampisilin, % 83.4'ünün sefotetan, % 91.7'sinin kloramfenikol, % 83'ünün meropenem, % 8.3'ünün penisilin ve % 41.6'sının tetrasikline duyarlı olduğu belirlendi. Tüm toksijenik suşların % 91.7'sinde sefoksitin, % 50'sinde ampisilin, % 83.4'ünde klindamisine, % 58.3'ünde penisiline ve % 16.6'sında tetrasiline karşı dirençli olduğu tespit edildi.

Antibiyotik direncinin ribotiplere göre değerlendirilmesinde ribotip 017'nin % 60'ının ampisiline, % 20'sinin klindamisine, % 80'inin penisiline dirençli olduğu, ribotip 033'ün % 50'sinin klindamisine ve tamamının penisilin ve tetrasikline dirençli olduğu, ribotip 078'in % 20'sinin ampisiline % 60'ının klindamisine, % 20'sinin ise penisiline dirençli olduğu belirlendi.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyal duyarlılık test bulguları.

<i>Clostridium difficile</i> (n=24)						
	<i>MİK</i>			% Duyarlı	% Orta	% Dirençli
	<i>MİK50</i>	<i>MİK90</i>	<i>Dağılım</i>			
<i>Ampisilin / Sulbaktam</i>	0.5 / 0.25	1 / 0.5	0.5 / 0.25 - 4/2	100 ($\leq 8/4$)	0 (16/8)	0 ($\geq 32/16$)
<i>Amoksisilin / Klavulanik asit</i>	0.5 / 0.25	4 / 2	0.5 / 0.25 - 4/2	100 ($\leq 4/2$)	0 (8/4)	0 ($\geq 16/8$)
<i>Ampisilin</i>	1	16	0.5 - >16	25 (≤ 0.5)	25 (1)	50 (≥ 2)
<i>Sefotetan</i>	4	32	4 - 32	83.4 (≤ 16)	16.6 (32)	0 (≥ 64)
<i>Sefoksitin</i>	>32	>32	32 - >32	0 (≤ 16)	8.3 (32)	91.7 (≥ 64)
<i>Kloramfenikol</i>	4	8	2 - 16	91.7 (≤ 8)	8.3 (16)	0 (≥ 32)
<i>Klindamisin</i>	4	>8	4 - >8	0 (≤ 2)	16.6 (4)	83.4 (≥ 8)
<i>İmipenem</i>	0.5	2	0.12 - 2	100 (≤ 4)	0 (8)	0 (≥ 16)
<i>Meropenem</i>	2	8	0.5 - 8	83.4 (≤ 4)	16.6 (8)	0 (≥ 16)
<i>Metronidazol</i>	0.5	1	0.5 - 1	100 (≤ 8)	0 (16)	0 (≥ 32)
<i>Mezlosilin</i>	8	8	4 - 16	100 (≤ 32)	0 (64)	0 (≥ 128)
<i>Penisilin</i>	2	4	0.5 - 4	8.3 (≤ 0.5)	33.3 (1)	58.3 (≥ 2)
<i>Piperasilin</i>	8	16	4 - 16	100 (≤ 32)	0 (64)	0 (≥ 128)
<i>Piperasilin/Tazobaktam</i>	8/4	16/4	0.5 / 4 - 16/4	100 ($\leq 32/4$)	0 (64/4)	0 ($\geq 128/4$)
<i>Tetrasiklin</i>	8	>8	0.25 - >8	41.6 (≤ 4)	41.6 (8)	16.6 (≥ 16)

4- TARTIŞMA VE SONUÇ

Clostridium difficile, 1978 yılından itibaren dünya genelindeki birçok ülkede insan sağlığını tehdit eden, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli bir bakteridir. Farklı bir enfeksiyonun antibiyotik tedavisi sonrasında etkenin antibiyotik direnci nedeniyle bağırsaklarda özellikle kolonda enfeksiyon oluşturmaktadır ve antibiyotik kullanımı devam ettikçe de enfeksiyon şiddetlenerek seyrini sürdürmektedir (Mullany ve Roberts 2010, Jones ve ark. 2013, Dubberke ve ark. 2008). *C. difficile*'nin neden olduğu vakaların epidemiyolojik araştırmalarında etkenin rezervuarının çiftlik hayvanları olduğu belirtilmektedir (Skraban ve ark. 2013, Simango ve Mwakurudza 2008, Avbersek ve ark. 2009). Bu tez çalışması ile Ağrı, Artvin, Erzincan, Erzurum, Gümüşhane ve Iğdır illerinden alınan ishalleri buzağı, kuzu ve oğlaklardan gaita örnekleri ile aynı hayvanların barınakları içerisinde beslenen ergin tavuk kloakal svap örneklerinde *C. difficile* izolasyonu, identifikasyonu, toksijenik karakterizasyonu, toksin üretebilen izolatların PCR ribotiplendirme ve antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması amaçlanarak yürütülen çalışma ile genç çiftlik hayvanlarında toksijenik *C. difficile* varlığı ortaya konulmuştur.

Buzağılarda gaita veya rektal svap örneklerinden *Clostridium difficile* izolasyonu ve identifikasyonu üzerine yapılan Amerika Kıtadaki araştırmalarda: Hammitt ve ark. (2008) % 25.3 (64/253), Rodriguez-Palacios ve ark. (2006), 78 gaita örneğinin % 11.2'sinden, Costa ve ark. (2011), 685 adet buzağı gaita örneğinin % 61.0'inden oranında etken tespit etmiştir. Avrupa Kıtasında yürütülen benzer araştırmalarda Magistralli ve ark (2015), toplam 420 buzağıdan alınan örneklerin % 20.2'sinde (85/420), Avbersek ve ark. (2009), 42 adet buzağı rektal svap örneklerinin % 9.5'inden, Pirs ve ark. (2008), 56 adet buzağı rektal svap numunelerinin % 1.7 (1/56)'sinden, Koene ve ark. (2011), 100 adet buzağı gaita örneklerinin % 6.0 (6/100)'sından, Rodriguez ve ark (2012), buzağılardan % 22.2 oranında, Zidaric ve ark. (2012), 50 adet buzağıdan 14 günlük yaş, 18 gün, 32 gün, 46 gün ve 194 günlük yaşlarında örnekler alarak incelemiş ve sırasıyla % 10, % 16, % 12, % 2, % 2, %0

oranlarında, Bandelj ve ark. (2016), yürüttükleri araştırmalarında ergin sığır gaita örneklerinin % 10'unda, buzağı örneklerinin ise % 35.6'sından, Schneeberg ve ark. (2013), 999 adet ishali buzağıdan örneklerin % 17.6'sında *C. difficile* tespit edilmiştir. Asya kıtasında yürütülen araştırma olarak Hussain ve ark. (2016), 12 adet ishali, 142 adet sağlıklı buzağı gaita örneklerini *C. difficile* yönünden incelemişlerdir. İshali buzağların % 16.6, sağlıklı buzağların % 4.9 oranında *C. difficile* izole etmiştir. Knight ve ark. (2013), Avustralya'da 7 günden az olan toplam 360 adet buzağı gaita örneğinin % 56.3'ünden *C. difficile* izole etmiştir.

Buzağılarda yapılan araştırmalar incelendiğinde %1.7- 61.0 arasında *C. difficile* izole edilmiştir (Hammitt ve ark. 2008, Avbersek ve ark. 2009, Koene ve ark. 2011, Rodriguez ve ark. 2012, Rodriguez-Palacios ve ark. 2006, Knight ve ark. 2013, Zidaric ve ark. 2012, Costa ve ark. 2011, Bandelj ve ark. 2016, Pirs ve ark. 2008, Hussain ve ark. 2016, Schneeberg ve ark. 2013, Magistralli ve ark. 2015). Tez çalışmasında % 70.0 oranında *C. difficile* izolasyon oranının Knight ve ark. (2013) ve Costa ve ark. (2011) çalışma sonuçlarıyla uyumlu olduğu ancak diğer araştırmalara nazaran daha yüksek oranda izolasyon oranı olduğu tespit edildi. Buzağı gaita örneklerinden *C. difficile* teşhisi üzerine yapılan araştırmalarda pozitiflik oranlarının farklı olduğu bunun nedenlerinin ise; alınan örneklerin muhafaza koşulları, örnek alınan hayvanların yaşı, önceden antibiyotik kullanımının olup olmadığı, numunelerin alındığı mevsim, izolasyonda kullanılan yöntem gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir (Koene ve ark. 2011, Magistrali ve ark. 2015, Schneeberg ve ark. 2013).

Tez araştırması sonucunda *C. difficile* izolasyon oranının yüksek olma sebeplerinin bakterinin kolon mikroflorasında bulunması, gaita örneği alınan buzağların yaş aralığı (0-28 gün) ve mevsim (Mart-Haziran) koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir. *C. difficile*, insan, sığır, koyun, keçi, tavuk, at gibi birçok canlının normal bağırsak florasında tespit edilebilen bakteridir (Hopman ve ark. 2011, Skraban ve ark. 2013, Metcalf ve ark. 2011). *C. difficile* teşhis oranı ile yaş arasındaki ilişkisi neonatal dönemde intestinal mikrofloranın gelişme sürecinde olması sebebiyle *C. difficile* bağırsaklarda daha kolay kolonize olup, proliferasyon olarak toksin üretebilmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark. 2006). Araştırmacılar *C. difficile* kolonizasyon oranının en yüksek tespit edildiği dönem olarak neonatal dönem olduğunu belirtirken yaş ile birlikte

bakteri saçılımının azalmakta olduğunu bildirmektedirler (Magistrali ve ark. 2015, Rodriguez-Palacios ve ark. 2006, Zidaric ve ark. 2012). Gaita ile bakteri saçılımının en üst seviyeye ulaştığı dönemi 13-28 günlük yaş döneminde olmaktadır (Magistrali ve ark. 2015). Örneklerin alındığı mevsimin *C. difficile*'in teşhis oranı üzerine etkili olan bir faktör olduğu belirlenmiş olup kış aylarında *C. difficile* teşhisinin sıcak aylara nazaran daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark. 2009). Hayvanlarda, antibiyotik tedavisi sonrasında faydalı bağırsak mikroflorasının yıkıma uğraması sonucu buzağılar *C. difficile* enfeksiyonuna duyarlı hale gelmektedir. Sığırlarda antibiyotik kullanımı ile *C. difficile* saçılımı arasında ilişkiye yönelik yürütülen bir araştırmada antibiyotik kullanımı sonrasında bakterinin saçılımı üzerine etkili olduğu tespit edilmiş olup özellikle betalaktam antibiyotik grubu ile polimiksin E uygulamalarının *C. difficile* saçılımı için risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (Magistrali ve ark. 2015). Yürütülen tez çalışmasında gaita örneği alınan buzağuların ishal olduğunda veya öncesinde antibiyotik kullanımı konusunda hayvan sahiplerinin net bir cevap verememesi sebebiyle buna ait yorum yapılamamıştır. *C. difficile* prevalansında risk faktörlerinden birinin de rasyon değişiklikleri olduğu bildirilmektedir. Rasyon değişikliklerinde prevalansta artış olmakta ve bu artış oranı ırklara göre farklılık göstermektedir. Rasyon değişikliği yapılan Simental ve Holstein-Friesian buzağılarda prevalansın değişimi üzerine yapılan bir araştırmada Simental buzağuların Holstein-Friesian buzağılara göre en az beş kat daha fazla *C. difficile* saçılımı olduğu bildirilmiştir (Bandelj ve ark. 2016).

Avrupa'da küçük ruminantlar üzerine yürütülen araştırmalarda Saif ve Brazier (1996), 100 adet koyunun gaita örneğininin % 1'inde, Avbersek ve ark. (2014), 0-4 aylık olan 99 adet oğlak ve 78 adet kuzudan alınan gaita örneklerinde oğlakların % 10.1'inden, kuzuların % 7.7'sinden, Koene ve ark. (2011), 11 adet koyun gaita örneğinin % 18.2'sinden, Romano ve ark (2012) 40 adet ergin keçinin gaita örneklerinin % 7.5 (3/40)'inden, *C. difficile* izole etmişlerdir. Amerikada yürütülen benzer araştırmada, McNamara ve ark. (2011), 57 adet koyun ve 25 adet keçiye ait gaita örneklerinin incelemelerinde *C. difficile* tespit edememişlerdir. Knight ve Riley (2013), Avustralya'da yürütükleri araştırmada toplam 371 adet koyun ve kuzularda yaptıkları araştırmada koyun örneklerinin % 0.6 (1/156)'sında, kuzu örneklerinin % 6.5 (14/215)'inden *C. difficile* izole etmişlerdir. Asya kıtasında yürütülen araştırmada

Hussain ve ark. (2016), insanlarda ve birçok hayvan türünde yaptıkları araştırmalarında toplam 99 adet keçi ve koyun gaita örneklerinin incelemelerinde *C. difficile* izole edememişlerdir.

Kuzu ve oğlakların ishallerinin etiyolojisinde *C. difficile*'nin rolünün araştırıldığı bilimsel bir araştırmaya rastlanamamıştır. Zoonoz olarak kabul edilmesi nedeniyle küçük ruminantlarda yürütülen araştırmaların nitelikleri insan sağlığı yönüyle etken saçılımların tespiti üzerine olmuştur. Araştırmalara göre küçükbaş hayvanlarda *C. difficile* tespit oranları kuzularda % 6.5-7.7 (Avbersek ve ark. 2014, Knight ve Riley 2013), oğlaklarda % 10.1 (Avbersek ve ark. 2014), koyunlarda % 0-18.2 (Koene ve ark. 2011, Hussain ve ark 2016, Knight ve Riley 2013, Saif ve Brazier 1996, McNamara ve ark. 2011) keçilerde % 0- 7.5 (Hussain ve ark 2016, McNamara ve ark. 2011, Romano ve ark. 2012) oranlarında tespit edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında neonatal dönemdeki ishalleri kuzu gaita örneklerinin % 30.0'undan, oğlak gaita örneklerinin ise % 14.0 oranında *C. difficile* izole ve identifiye edildi. *C. difficile*'nin kuzularda en fazla saçılım olduğu dönem ilk 0-16 gün yaş aralığındadır (Avbersek ve ark. 2014). İshalleri kuzu ve oğlaklarda etken teşhis oranının Avbersek ve ark (2014) ve Knight ve Riley (2013) araştırmalarına nazaran yüksek olduğu tespit edilmiş olup izolasyon oranının yüksek olmasının nedeni olarak neonatal dönemdeki hayvanların ergin hayvanlara göre daha fazla bakteri saçılımına sahip oldukları bildirilmektedir. Araştırmalar arasındaki farklı sonuçların ise rasyon değişiklikleri, bakım koşulları, sürü yoğunluğu gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmektedir (Knight ve Riley 2013). Domuz, sığır ve at gibi hayvanlara göre küçükbaş hayvanlarda *C. difficile* saçılımı az oranda olmaktadır (Hussain ve ark. 2016). Bunun nedeni olarak ise büyükbaş hayvan yetiştiriciliğine göre küçükbaş hayvanlarda daha az oranda antibiyotik tedavisi uygulanması sebebiyle küçükbaş hayvanların bağırsak mikrobiyotasında *C. difficile*'in daha az oranda kolonize olduğu düşünülmektedir (Knight ve Riley. 2013). Küçükbaş hayvanların ishal vakalarının patogenezi *C. difficile*'nin rol oynamadığı ancak insanlara bulaşmada rezervuar görevi gördüğü bildirilmektedir (Avbersek ve ark. 2014).

Güran ve İlhak (2015) Ülkemizde yürüttükleri araştırmalarında 310 adet tavuk et örneğinin % 8.6'sında *C. difficile* izole etmişlerdir. Dünyada tavuk gaita örneklerinde *C. difficile* izolasyonu üzerine yürütülen araştırmalarda; Zidaric ve ark. (2008) 61 adet

tavuk gaita örneğinin incelemesinde % 62.2 oranında, Koene ve ark. (2011) 121 adet tavuk gaita örneğinin % 5.7'sinde, Saif ve Brazier (1996) 120 adet tavuk gaita örneğinin % 1.6'sında, Skraban ve ark. (2013) toplam 143 tavuk gaita örneğinin % 60.0 oranında, Indra ve ark (2009) 59 adet broyler tavuk gaita örneğinin % 5'inde *C. difficile* izole etmişlerdir. Hindistan'da yürütülen araştırmada Hussain ve ark. (2016) toplamda 125 adet broyler tavuğun gaita örneklerinin % 13.9'unun *C. difficile* tespit etmişlerdir. Afrikada yürütülen araştırmada Simango ve Mwakurudza (2008) Zimbabwe'de satılan canlı broyler tavuklarında 100 adet tavuk gaita örneğinin % 29.0'unda *C. difficile* izole etmiştir.

Araştırmalara göre tavuk gaita örneklerinde % 1.6 – 62.2 oranlarında *C. difficile* tespit edilmektedir (Indra ve ark. 2009, Skraban ve ark. 2013, Saif ve Brazier 1996, Hussain ve ark. 2016, Zidaric ve ark. 2008, Koene ve ark. 2011). Gerçekleştirilen tez çalışmasında büyükbaş veya küçükbaş işletmeleri içerisinde yetiştirilen ergin köy tavuklarının toplamda 50 adet kloakal svap örneklerinin % 2.0'sinde *C. difficile* tespit edildi. Tavuk izolasyon oranının Koene ve ark. 2011, Saif ve Brazier 1996, Indra ve ark. 2009, Güran ve İlhak 2015 araştırmaları ile yakın değerde ancak Skraban ve ark. 2013, Zidaric ve ark. 2008, Hussain ve ark. 2016 araştırmalarına göre düşük oranda tespit edildiği belirlendi. Araştırmalar arasında izolasyon oranları arasındaki farklılıkların coğrafi farklılıklar, *C. difficile* prevalansındaki zaman farklılıklarının, örnek alınan hayvanların yaşlarının farklılıkları gibi faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir (Koene ve ark. 2011). Hussain ve ark. (2016), yürüttükleri araştırmalarında ticari işletmelerde broyler tavuklarda *C. difficile* tespit etmiştir ancak köy tavuklarında bakteriyi teşhis edememiştir. İnsanlarda *C. difficile* vakaları yaş ile birlikte artış gösterirken hayvanlarda özellikle neonatal dönemde daha fazla tespit edilmektedir (Zidaric ve ark 2012). Zidaric ve ark. (2008) tavuklarda *C. difficile* saçılımına yönelik yaptığı araştırmada tavuklarda da yaş ile birlikte gaitada bakteri varlığının azaldığını ortaya koymuştur. Bu tez araştırmasında da izolasyon oranının diğer araştırmalara göre düşük olmasının bir nedeni olarak da ergin tavuklarda daha az oranda *C. difficile* tespit edilmesi sebebiyle olduğu düşünüldü.

Tez araştırmasında buzağı gaita örneklerinden % 70.0 (35/50)'inde *C. difficile* tespit edilirken % 44.0'ünün, kuzu gaita örneklerinde ise % 12.0'sinin toksijenik suş

olduğu tespit edildi. Benzer araştırma sonuçlarına göre buzağı gaita örneklerinden % 10.2 – 42.7, kuzularda ise % 1.0 - % 18.2 oranında toksin üretebilme kabiliyetine sahip *C. difficile*'nin izole edildiği bildirilmiştir olup diğer araştırmalar ile uyumlu olarak tespit edilmiştir (Hammitt ve ark. 2008, Rodriguez ve ark. 2012, Rodriguez-Palacios ve ark. 2006, Knight ve Riley 2013, Koene ve ark. 2011, Saif ve Brazier 1996). Buzağı gaita örneklerinden izole edilen *C. difficile* toksin analizine ait benzer araştırmalarda; A-B-CDT+, A+B+CDT-, A+B+CDT+, A-B+CDT-, A-B+CDT+, A+B-CDT+ karakterde toksin üretebilen *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir (Avbersek ve ark. 2009, Rodriguez-Palacios ve ark. 2006, Bandelj ve ark. 2016, Pirs ve ark. 2008, Knight ve ark. 2013, Costa ve ark. 2011, Schneeberg ve ark. 2013, Magistralli ve ark. 2015). Koyun ve kuzu gaita örneklerinde tespit edilen toksijenik *C. difficile* suşlarının A+B+CDT-, A-B+CDT+, A-B-CDT+ toksin üretebilme karakterlerinde olduğu bildirilmektedir (Knight ve Riley 2013, Koene ve ark. 2011) Sunulan araştırmada buzağı gaita örneklerinden izole edilen *C. difficile* izolatlarının toksin üretimine ait analizleri sonucunda A+B+CDT+, A-B+CDT-, kuzu gaita örneklerinden tespit edilen *C. difficile* izolatlarının A-B+CDT- ve A-B-CDT+ toksin üretebilen suşlar olduğu belirlendi. Çalışma bulgularının benzer araştırmalar ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Toksin A ve toksin B, *C. difficile*'nin enfeksiyon oluşturmada rol oynayan temel virülens faktörleridir. Her iki toksinin yanında binary toksin adı verilen toksini üretebilen suşlar hipervirulent suşlar olarak adlandırılmaktadır (Aktories ve ark. 2018). İnsanlarda binary toksin pozitif suşların tespitinin az olmasına karşın hayvanlardan izole edilen *C. difficile*'lerin binary toksin pozitif suşlar olduğunu ve bu toksinin *C. difficile* suşlarının hayvanlarda adaptasyonda rol oynayabileceği belirtilmektedir. Buzağılarda, binary toksin negatif olan 077 ribotipi ile deneysel enfeksiyon oluşturma amacıyla yürütülen araştırmanın başarısız olmasının nedeninin buna bağlı olabileceği belirtilmektedir (Schneeberg ve ark. 2013). Tez çalışması sonucunda ishalli buzağı ve kuzulardan izole edilen *C. difficile* izolatlarında temel virülens faktörleri olan toksin A ve toksin B üretebilen suşlar ile hayvanlarda enfeksiyonun gelişiminde rol oynayan binary toksin üretebilen suşlar tespit edilmiştir ve bu bulgular diğer araştırmalar ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Avbersek ve ark. (2009), buzağı örneklerinden izole edilen *C. difficile*'nin izolatlarında 002, 077 ve 033, Koene ve ark. (2011), yürüttükleri benzer araştırmada

012, 033, Rodriguez ve ark (2012), 078 ve 015, Zidaric ve ark. (2012), 078, 126, 045, 033, 012 ve 010, Rodriguez-Palacios ve ark. (2006), 078, 017, 077, 027, 014, 033, Romano ve ark (2012) 033, 066, 070, 003, 001 ve 137 ribotiplerini tespit etmişlerdir. Costa ve ark. (2011), buzağılardan izole edilen suşların % 67.0'nın PCR ribotip 078 olduğunu bildirmektedirler. Bandelj ve ark. (2016), buzağı örneklerinde 19 farklı ribotip tespit ederken, 033 ribotipini baskın ribotip olarak tespit etmiştir. Schneeberg ve ark. (2013), 17 farklı PCR ribotipini buzağı örneklerinde tespit etmiş olup bu ribotipler içerisinde baskın olan ilk iki ribotipin % 56.9 oranında 033 ribotipi ile % 16.6 oranında 078 ribotipi bildirmiştir. Magistralli ve ark (2015) araştırmalarında buzağı örneklerinden tespit edilen 82 izolatın ribotiplendirmesinde 8 farklı ribotip tespit etmiştir. Bu ribotiplerin, % 52.5'inin 078, % 19.5'inin 012, % 15.9'unun 126 ve % 7.3'ünün ise 033 ribotipi olarak rapor etmiştir (Magistralli ve ark 2015). Keel ve ark. (2007) 2 aydan küçük buzağılardan izole edilen 33 adet *C. difficile*'nin % 94.0'ünün 078 ribotipi, % 3.0'ünün 033 ribotipi ve % 3.0'ünün ise 002 ribotipi olduğunu bildirmektedir. Janezic ve ark. (2014), birçok farklı ülkeden farklı türden hayvanlardan izole edilen *C. difficile* izolatlarının PCR ribotip dağılımını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında sığır, at, domuz, tavuk, kedi, köpek, rakun, yabani tavşan, keçi, kaz ve kargalardan izole edilen suşları incelemişlerdir. Sığırlardan izole edilen suşların 078, 014, 002, 010, 033, 126, 045, 005, 013, 103, 288, 081, 015, 027, 029, 050, 342, 365, ve 602 PCR ribotiplerinin olduğunu bildirmiştir (Janezic ve ark. 2014). Avbersek ve ark. (2014), kuzu gaita örneklerinden izole ettikleri *C. difficile*'lerin 056 ve SLO 061 olmak üzere iki farklı ribotip tespit etmişlerdir. Koene ve ark. (2011), koyun gaita örneklerinden tespit ettikleri suşların 015 ve 097 olmak üzere iki farklı ribotip tespit etmiştir.

Yürütülen tez çalışmasında alınan gaita örneklerinden izole edilen toksijenik *C. difficile* izolatlarının PCR ribotiplendirmesi sonucunda buzağılarda 078 ve 017 PCR ribotipleri, kuzularda ise 033 ve 017 PCR ribotipleri tespit edildi. Özellikle 078 ribotipinin çiftlik hayvanlarında yaygın olduğu bildirilmektedir (McNamara ve ark. 2011, Janezic ve ark. 2014, Knight ve ark. 2013). Buzağılar üzerine yapılan bilimsel araştırmalarda yaygın olarak 078 ve 017 ribotipleri izole edilmektedir. *C. difficile* 078 PCR ribotipi toksin A, toksin B ve binary toksin üretebilmesi sebebiyle 027 PCR ribotipi ile birlikte hipervirulent ribotip olarak değerlendirilmektedir (McNamara ve ark.

2011). İnsanlarda hipervirulent 078 PCR ribotipine bağlı vakaların domuz ve buzağılardan köken aldığı bildirilmektedir (Bauer ve Kuijper 2015). Buzağılarda 078 PCR ribotipinin hipervirulent olmasının yanında bir diğer önemli yanı ise uzun süre sindirim sisteminde kolonize olmasıdır. Yürütülen bir araştırmada aynı buzağılardan farklı örnekleme dönemlerinde 078 ve 126 PCR ribotiplerinin tespit edildiği ve her iki ribotipin diğer ribotiplere nazaran daha uzun süre kolonize olduğu ortaya konmuştur (Zidaric ve ark 2012). Toksin A ve B üretemeyen sadece binary toksin üretebilme kabiliyetinde olan 033 ribotipi genel olarak buzağı ve domuz yavrularında tespit edilmektedir ve Veteriner Hekimlikte önemli olduğu bildirilmektedir (Androga ve ark. 2015). PCR ribotip 033 sığır haricindeki diğer hayvanlarda nadiren bulunmaktadır. Binary toksin üretebilen suşlar insanlarda vakaların patogenezisinde daha az oranda rol alırken hayvanlarda daha fazla oranda tespit edilmektedir (Schneeberg ve ark. 2013). *C. difficile* 017 ribotipinin insan ve buzağılardan izole edildiği ve bu ribotipin de zoonoz karakterde olduğu bildirilmektedir (Bauer ve Kuijper 2015). Toksin B üretebilen toksin A ve CDT üretemeyen 017 ribotiplerine bağlı insan vakalarının artmakta olduğu bildirilirken bu ribotipler çiftlik hayvanlarından da izole edilmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark. 2006, Jafari ve ark. 2014). PCR ribotip 017 çeşitli ülkelerde insan vakalarında raporlanmaktadır ve bu durum insan - hayvan bulaşını işaret etmektedir (Rodriguez-Palacios ve ark. 2006). Hayvanlardan *C.difficile*'nin izolasyonu ve tiplendirilmesi hakkında birçok araştırma olmasına rağmen bu araştırmaların genellikle lokal ve PCR ribotiplendirme nomenklatüründeki farklılıklar sebebiyle karşılaştırma yapmak oldukça zordur (Janzic ve ark. 2014). Yürütülen tez çalışmasında tespit edilen PCR ribotiplerinin çiftlik hayvanlarında yürütülen ve bildirilen izolatlar ile uyumlu olduğu ve bu ribotiplerin yaygın olarak çiftlik hayvanlarından tespit edilebildiği belirlendi.

Tez araştırmasında elde edilen toksijenik *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık testleri mikrobrot dilüsyon metoduna göre yapıldı. Çiftlik hayvanlarından izole edilen *C. difficile* izolatları üzerine yürütülen bu araştırmada; İncelenen toplam 24 izolatın % 58.3'ünde penisilin antibiyotiğine karşı direnç olduğu belirlendi. *C. difficile*'nin penisilin direnci üzerine yapılan araştırmalarda direnç oranları penisilin % 38.5 – 40.0 olarak bildirilmektedir (Avbersek ve ark. 2014, Pirs ve ark. 2013). Araştırma sonucunda penisilin grubu antibiyotik etken maddelerinde tespit edilen MİK

90 değeri; penisilin 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Avbersek ve ark. (2014), koyun ve keçilerden izole ettiği *C. difficile* suşlarının MİK 90 penisilin 2 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) insan ve hayvan izolatlarının MİK 90 penisilin 4 µg/ml olarak bildirilmektedir. Penisilin antibiyotiğine karşı direnç oranlarının yakın değerlerde olarak değerlendirilmiş olup MİK 90 değeri Avbersek ve ark. (2014) ve Pirs ve ark. (2013) çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur.

Betalaktam antibiyotikler içinde yeralan ampisilin antibiyotiğine karşı direnç oranı olarak toksijenik *C. difficile* izolatlarının % 50.4'ünde direnç belirlenmesine rağmen ampisilin/sulbaktam etken maddesine karşı direnç tespit edilmedi. Çiftlik hayvanlarından izole edilen *C. difficile* izolatlarının ampisilin direnci benzer araştırmalarda % 6.8 – 20.8 oranında olduğu belirtilmektedir (Avbersek ve ark. 2014, Pirs ve ark. 2013, Thitaram ve ark. 2016, Hampikyan ve ark. 2018). Araştırma sonucunda MİK 90 değeri ampisilin 16 µg/ml, ampisilin/sulbaktam 1 / 0.5 µg/ml olarak belirlendi. Benzer araştırmaların ampisilin MİK 90 değerleri Avbersek ve ark. (2014), ampisilin 1 µg/ml, Kunishima ve ark. (2013) ampisilin 4 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) ampisilin 2 µg/ml, Thitaram ve ark. (2016) ampisilin 3 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Pirs ve ark. (2013) ampisilin/sulbaktam 1/0.5 µg/ml MİK 90 değerini bildirmektedir. Tez araştırması bulgularına göre ampisilin/sulbaktam direnç ve MİK 90 değeri Pirs ve ark. (2013) çalışması ile uyumludur. Ancak ampisilin direnç yüzdeleri ile MİK 90 değeri diğer araştırmalara göre yüksek oranda tespit edildi. Bunun nedeninin betalaktam antibiyotiklere karşı bakteriler tarafından sentezlenen betalaktamazlar, betalaktam antibiyotiklerin etkinliğini azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadır (Calderon ve Sabundayo 2007). Bu nedenle, sulbaktam ile bileşik oluşturan aminopenisilinler ve karboksipenisilinlerin etkinliklerini arttırmaktadır (Kaya 2007, Calderon ve Sabundayo 2007).

Yürütülen tez araştırmasında buzağı ve kuzulardan izole edilen toksin üretebilen *C. difficile* izolatlarının % 83.4'ünde klindamisin etken maddesine karşı direnç olduğu ortaya konulmuş olup eş değer araştırmalarda klindamisin direnç oranları araştırmacılar tarafından % 10.0 – 90.9 oranlarında olduğu bildirilmektedir (Avbersek ve ark. 2014, Pirs ve ark. 2013, Igawa ve ark. 2016, Bandelj ve ark. 2017, Thitaram ve ark. 2016, Hampikyan ve ark. 2018, Alvarez-Perez ve ark. 2017). Klindamisin etken maddesine karşı

duyarlılık testi sonucunda MİK₉₀ > 8 µg/ml oranında tespit edildi. *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları yönünden yürütülen araştırmaların MİK₉₀ değerleri; Avbersek ve ark. (2014) 4 µg/ml, Kunishima ve ark. (2013) > 32 µg/ml, Limbago ve ark. (2009) 256 µg/ml, Hastey ve ark. (2017) 64 µg/ml, Bandelj ve ark. (2017) 32 µg/ml, Alvarez-Perez ve ark. (2017) ≥ 256 µg/ml, Pirs ve ark. (2013), 8 µg/ml, Igawa ve ark. (2016) > 32 µg/ml olarak bildirilmiştir. Benzer araştırmalarda klindamisin etken maddesine karşı direnç yüzdeleri ile MİK₉₀ değerlerinin çalışma direnç oranı ve MİK₉₀ değerlerinin uyumlu olduğu tespit edildi.

Bakteriostatik etki gösteren tetrasiklin antibiyotik etken maddesine karşı araştırma sonucunda elde edilen izolatların %16.6'sının dirençli olduğu ortaya konuldu. Tetrasiklin etken maddelerine karşı bildirilen direnç oranları % 1.9 – 93.0 arasında değerlerdir (Pirs ve ark. 2013, Bandelj ve ark. 2017, Costa ve ark. 2011, Hampikyan ve ark. 2018, Alvarez-Perez ve ark. 2017). Çalışmada izolatların % 90'ını inhibe eden antibiyotik yoğunluğu olarak > 8 µg/ml olarak tespit edildi. Alvarez-Perez ve ark. (2017) 16 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) 8 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Tez çalışması sonucunda direnç oranları diğer çalışmalar ile uyumlu olup MİK₉₀ değeri Alvarez-Perez ve ark. (2017) ve Pirs ve ark. (2013) MİK₉₀ bulguları ile uyumludur. Tetrasiklinlere karşı direnç mekanizması ribozomal koruma yoluyla olmaktadır (Spigaglia 2016). Bu koruma ile ilgili genetik elementler Tn6164, Tn 5397, Tn916-like transpozonlarıdır ve bu transpozonlar *tetM*, *tet44*, *tetW* genlerinin transfer ederek tetrasiklinlere direnç ile ilgili olan *tet* direnç genini ihtiva ettiği bildirilmektedir (Spigaglia 2016, Peng ve ark. 2017). Tn6164 transpozonu *tet44* yapısını meydana getirirken bu yapı genellikle 078 ribotiplerinde görüldüğü ve bunun 078 ribotipinin virülensinde etkili bir faktör olduğu belirtilmektedir (Peng ve ark. 2017).

Sunulan tez araştırmasında elde edilen toksijenik *C. difficile* suşlarının tamamında amoksisilin/klavulanik asit antibiyotik etken maddesine karşı direnç bulunmamış olup eş değer araştırmalarda amoksisilin/klavulanik asit direnç yüzdelerinin % 0 – 1.2 olduğu bildirilmektedir (Pirs ve ark. 2013, Thitaram ve ark. 2016, Hampikyan ve ark. 2018). Yürütülen araştırmada amoksisilin/klavulanik asit etken maddesinin MİK₉₀ değeri olarak 4/2 µg/ml yoğunluğunda inhibisyon olduğu belirlendi. Kunishima ve ark. (2013) 0.5 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) 1/0.5 µg/ml,

Thitaram ve ark. (2016) 0.75 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Tez bulgularına göre direnç oranı ve MİK 90 inhibisyon oranı ile diğer araştırmalar arasında uyum olduğu değerlendirildi.

Sefalosporin grubu antibiyotikler içerisinde yer alan sefotetan etken maddesine karşı izolatların hiçbirinde direnç tespit edilmemiştir ve benzer şekilde Pirs ve ark. (2013) çalışmalarında hayvan izolatlarının sefotetan etken maddesine karşı direncinin olmadığını ortaya koymuştur. Antimikrobiyal duyarlılık analizi sonucunda izolatların MİK 90 değerini 32 µg/ml olarak belirlendi. Pirs ve ark. (2013) *C. difficile* antimikrobiyal duyarlılık analizleri sonucunda sefotetan etken maddesi MİK 90 değerini 16 µg/ml olarak belirlemiştir. Sefotetan MİK 90 değerlerinin Pirs ve ark. (2013) çalışmaları ile uyumludur.

Tez çalışmasında analizi yapılan bir diğer sefalosporin grubu antibiyotik etken maddesi olan sefoksitin yönünden çalışılan izolatlar % 91.7'sinde direnç tespit edildi. Çiftlik hayvanlarından izole edile *C. difficile* suşlarının sefoksitin direnç yüzdelerinin % 97.9 - 100 arasında olduğu bildirilmektedir (Avbersek ve ark. 2014, Pirs ve ark. 2013). Yürütülen çalışmada sefoksitin antibiyotiğine karşı MİK90 değeri olarak >32 µg/ml olarak belirlendi. Avbersek ve ark. (2014) sefoksitin etken maddesi MİK 90 değerini >32 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) *C. difficile* antimikrobiyal duyarlılık analizleri sonucunda sefoksitin >32 olarak belirlemiştir. Sefoksitin direnç yüzde oranı ile MİK 90 değeri diğer araştırmalar ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde direnç tespit edilmeyen bir diğer antimikrobiyal ajan kloramfenikol etken maddesidir. Pirs ve ark. (2013) çiftlik hayvanlarından izole ettikleri *C. difficile* izolatlarını inceledikleri çalışmaları sonucunda direnç olmadığını bildirmektedir. Toksin üretebilen *C. difficile*'lerde MİK90 değeri 8 µg/ml olarak belirlendi. Kunishima ve ark. (2013) klinik vakalardan izole ettikleri *C. difficile*'lerde MİK 90 değeri olarak 32 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) 4 µg/ml oranında tespit etmiştir. Kloramfenikol antibiyotiğine ait direnç yüzdesi ve MİK 90 değerleri araştırmalar ile uyumlu olduğu değerlendirildi.

Yürütülen tez çalışmasında imipenem ve meropenem etken maddelerine karşı analiz edilen suşlarda direnç tespit edilmedi. Pirs ve ark. (2013) imipenem ve

meropenem etken maddelerine karşı direnç yüzdelerini sırasıyla % 28.1, % 1.0 olarak tespit etmiştir. Test edilen izolatların MİK 90 değerleri imipenem 2 µg/ml, meropenem 8 µg/ml oranında tespit edildi. Eş değer araştırmalarda etken maddelerinin MİK 90 değerleri; Pirs ve ark. (2013) imipenem > 8 µg/ml, meropenem 2 µg/ml, Kunishima ve ark. (2013) imipenem >32 µg/ml, Bandelj ve ark. (2017) imipenem ≤ 4 µg/ml olarak tespit etmiştir. Elde edilen bulgular Pirs ve ark. (2013), Kunishima ve ark. (2013) ve Bandelj ve ark. (2017) ile uyumludur.

C. difficile enfeksiyonlarının tedavilerinde vankomisin etken maddesinden önce tedavide kullanılabilir etken olan metronidazol antibiyotiğine karşı genç hayvan izolatlarında direnç tespit edilmemiştir. Metronidazol etken maddesine karşı *C. difficile*'nin direnç oranının artmakta olduğu bildirilmektedir. Benzer araştırmalarda metronidazol etken maddesine karşı direnç yüzdelerinin % 0 – 24.9 arasında olduğu bildirilmektedir (Avbersek ve ark. 2014, Pirs ve ark. 2013, Igawa ve ark. 2016, Hastey ve ark. 2017, Bandelj ve ark. 2017, Thitaram ve ark. 2016, Hampikyan ve ark. 2018, Alvarez-Perez ve ark. 2017). Genç çiftlik hayvanlarında izole edilen *C. difficile*'lerin metronidazol MİK90 değeri 1 µg/ml olarak tespit edildi. Test edilen suşların tamamı metronidazole duyarlı olarak belirlendi. Benzer araştırmalarda belirlenen MİK 90 değerlerine göre, Bandelj ve ark. (2017) ≤ 0.25, Alvarez-Perez ve ark. (2017) 0.5 µg/ml, Thitaram ve ark. (2016) 0.38 µg/ml olarak belirlemiştir. Hastey ve ark. (2017) 920 adet *C. difficile* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri hakkındaki araştırmalarında 1 µg/ml tespit etmişlerdir. Pirs ve ark. (2013) insan ve hayvanlardan izole ettiği *C. difficile* izolatlarının metronidazol MİK90 değerini ≤ 0.5 µg/ml olarak belirlemiştir. Igawa ve ark. (2016) araştırmalarında analiz ettikleri *C. difficile*'lerin metronidazol MİK90 0.5 µg/ml olarak tespit etmiştir. Bandelj ve ark. (2017), Alvarez-Perez ve ark. (2017), Thitaram ve ark. (2016), Hastey ve ark. (2017), Pirs ve ark. (2013) ve Igawa ve ark. (2016) araştırma bulguları ile tez çalışmasının metronidazol antibiyotiğine ait direnç yüzdesi ve MİK 90 değeri uyumlu olduğu belirlendi.

Ureidopenisilin olarak sınıflandırılan mezlosilin ve piperazinler sınıfında yer alan penisilinaz direnci olmayan piperasilin ile penisilinaz direncinin piperasilin/tazobaktam etken maddeler penisilin grubu antimikrobiyal etken maddeler içerisinde Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine etkili geniş spektrumlu

antibiyotiklerdir (Calderon ve Sabundayo 2007). Yürütülen tez çalışmasında ureidopenisilin grubu antibiyotiklerden mezlosisilin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam etken maddelerine karşı direnç tespit edilmemiş olup Pirs ve ark. (2013) araştırmalarında hayvan izolatlarında aynı etken maddelerine karşı direnç tespit etmemiştir. Araştırma sonucunda mezlosisilin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam antibiyotik etken maddelerinde tespit edilen MİK 90 değerleri sırasıyla; 8 µg/ml, 16 µg/ml, 16/4 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Kunishima ve ark. (2013) piperasilin 16 µg/ml, piperasilin/tazobaktam 16 µg/ml, Pirs ve ark. (2013) insan ve hayvan izolatlarının mezlosilin ≤ 4 µg/ml, piperasilin 8 µg/ml, piperasilin/tazobaktam 8/4 µg/ml olarak bildirilmektedir. *C. difficile* izolatlarının mezlosilin, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam etken maddelerine karşı direnç oranları ile MİK 90 değerleri benzer araştırmalar uyumludur.

Sonuç olarak yürütülen tez çalışması ile ülkemizde neonatal dönemde ishali buzağı, kuzu, oğlakların ve aynı ortamda barındırılan tavukların gaita örneklerinde toksin üretebilen *C. difficile* suşları üzerine yapılmış kapsamlı ve ilk olan bu çalışmada buzağı ve kuzuların gaita örneklerinde toksijenik *C. difficile* suşlarının varlığı ortaya konulmuştur. Dünya genelinde insanlarda, domuzlarda ve atlarda patojen olarak kabul edilen *C. difficile* birçok araştırmacı tarafından buzağı ishallerinin etiyolojisinde de rol oynadığı bildirilmektedir. Neonatal dönemdeki ishal vakalarında patojenik suşların tespit edilmesi etkenlerin etiyolojide rol oynadığını destekler niteliktedir. Bu kapsamda yürütülen tez çalışması bulguları doğrultusunda özellikle de antibiyotik tedavilerine cevap alınamayan neonatal dönemdeki hayvanların ishal vakaların mikrobiyolojik analizlerinde *C. difficile* yönünden de analiz edilmesi, izolasyon durumlarında ise toksijenik olup olmadığının tespit edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bakterinin zorunlu anaerobik bakteri olması ve oksijenli ortamda vejetatif formlarının canlılığını yitirmesinden doğacak yanlış negatif sonuçların önüne geçilebilmesi amacıyla kültürde izolasyon ile moleküler teşhis metotların birarada kullanılması, pozitif vakalarda ise moleküler tiplendirme ve antibiyogram gibi analizlerin de yapılabilmesi amacıyla bakterinin izole edilmesi önerilmektedir.

Tez çalışmasında tespit edilen 017, 033 ve 078 PCR ribotiplerinin hem insanlarda hem de hayvanlarda ishal vakalarında tespit ediliyor olması sebebiyle köken

olarak bulaşmalarda çiftlik hayvanlarının rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Bu doğrultuda çiftlik hayvanlarının antibiyotik tedavilerinde dikkatli antibiyotik seçimi ve uygun kullanımının sağlanmasının insan sağlığı yönünden de önemli olduğu düşünülmektedir.

Hastalığın ortaya çıkışında risk faktörlerinin başında antibiyotik kullanımı yer almaktadır. Yürütülen çalışma ile toksijenik *C. difficile* izolatlarının ampisilin, sefoksitin, penisilin, tetrasiklin ve klindamisin antimikrobiyal etken maddelerine karşı direncinin olduğu ortaya konulmuştur. Özellikle neonatal dönemdeki hayvanlarda betalaktam grubu antibiyotiklerin kullanımı durumlarında betalaktamaz ve penisilinaz inhibitörü ihtiva eden antibiyotiklerin tercih edilmesi ile sefoksitin, tetrasiklin ve klindamisin etken maddelerine karşı yüksek direnç nedeniyle bu etken maddeleri içeren tedavi protokollerinden kaçınılması gerekliliği tavsiye edilmektedir.

Hastalığın ortaya çıkmasında esas risk faktörü antibiyotik kullanımı olması nedeniyle insanlarda ve hayvanlarda *C. difficile*'in neden olduğu enfeksiyonların antibiyotik tedavisi sonrasında bir komplikasyon gibi ortaya ishal vakaları ortaya çıkmaktadır. Neonatal dönemdeki hayvanlarda antibiyotik kullanımı ile *C. difficile* saçılımı arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmektedir. Hayvan sağlığını ve halk sağlığını doğrudan ilgilendiren antibiyotik direnci konusunda Veteriner Hekim hizmetlerinde öncelikle aşı, dezenfeksiyon, iyi bakım-besleme gibi koruyucu hekimlik önlemlerinin uygulanması ile antibiyotik kullanımının azaltılmasını sağlayacaktır. Ayrıca *C. difficile*'nin neonatal dönemdeki hayvanların ishal vakalarının etiolojisindeki risk oranını belirlemek amacıyla sağlıklı ve ishalleri buzağılarda vaka-kontrol çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Dünya genelinde gün geçtikçe artan *C. difficile* insan vakalarından tespit edilen ribotiplerin genel olarak çiftlik hayvanlarında tespit edilen ribotipler ile aynı veya benzer oldukları bildirilerek çiftlik hayvanlarından insanlara bulaşmanın olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde insan ve hayvan vakalarının karşılaştırılarak yaygın ribotipler ile ortak ribotipler üzerine epidemiyolojik araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu sayede salgınların ortaya çıkması halinde kökeninin de tespit edilebilmesine katkı sağlayacaktır.

5- KAYNAKLAR

- AKTORIES K, PAPATHEODOROU P, SCHWAN C (2018) Binary *Clostridium difficile* toksin (CDT) – A virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe*, (2018), <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>
- ÁLVAREZ-PÉREZ S, BLANCO JL, HARMANUS C, KUIJPER EJ,B, GARCÍA ME (2017) Subtyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. *Veterinary Microbiology* .199, 15–22.
- ANDROGA GO, MCGOVERN AM, ELLIOTT B, CHANG BJ, PERKINS TT, FOSTER NF, RILEY TV (2015) Evaluation of the Cepheid Xpert *C. difficile*/Epi and Meridian Bioscience illumigene *C. difficile* Assays for Detecting *Clostridium difficile* Ribotype 033 Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 53, No 3, 973-975.
- ANGIONE SL, SARMA AA, NOVIKOV A, SEWARD L, FIEBER JH, MERMEL LA, TRIPATHI A (2014) A Novel Subtyping Assay For Detection of *Clostridium difficile* virulence Genes. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol.16 No.2., 244-252.
- AVBERSEK J, JANEZIK S, PATE M, RUPNIK M, ZIDARIC V, LOGAR K, VENGUST M, ZEMLJIC M, PIRS T, OCEPEK M, (2009) Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 15, 252-255.
- AVBERSEK J, PIRS T, PATE M, RUPNIK M, OCEPEK M, (2014) *Clostridium difficile* in goats and sheep in Slovenia: characterisation of strains and evidence of age-related shedding. *Anaerobe*, 28, 163-167.
- BANDELJ P, GLOB M, OCEPEK M, ZDOVC I, VENGUST M, (2017) Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Clostridium difficile* Isolates from Family Dairy Farms. *Zoonoses and Public Health*, 2017, 64, 213–221
- BANDELJ P, BLAGUS R, BRISKI F, FRLIC O, RATAJ AV, RUPNIK M, OCEPEK M, VENGUST M, (2016) Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms. *Veterinary Research*, 47:41, 1-11.

- BAUER MP, NOTERMANS DW, VAN BENTHEM BH, BRAZIER JS, WILCOX MH, RUPNIK M, MONNET DL, VAN DISSEL JT, KUIJPER EJ (2011) *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*, 2011;377(9759): 63e73.
- BAUER MP, KUIJPER EJ, (2015) Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infect Dis Clin North Am*, 29(1), 29-35.
- BELIYI Y, AKTORIES K (2010) Bacterial toxin and effector glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800 (2010), 134-143.
- BIDET P, BARBUT F, LALANDE V, BURGHOFFER B, PETIT JC, (1999) Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 261-266.
- BIGNARDI GE (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*, 40: 1-15.
- CALDERON CB, SABUNDAYO BP (2007) Antimicrobial classifications: drugs for bugs: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, Ed. R SCHWALBE, L STEELE-MOORE, AC GOODWIN, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 7-52.
- CARMAN RJ, STEVENS AL, LYERLY MW, HILTONSMITH MF, STILES BG, WILKINS TD (2011) *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. *Anaerobe*, 17 (2011) 161-165.
- CLEMENTS ACA, MAGALHÃES RJS, TATEM AJ, PATERSON DL, RILEY TV (2010) *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis*, 2010; 10: 395-04.
- COLLINS CH, LYNE PM, GRANGE JM,, FALKINHAM JO (2004) *Clostridium*, Collins and Lyne's Microbiological Methods. *Eighth Edition*, Arnold, a member of the Hodder Headline Group, Sy. 370-378. London, England.
- COOPER KK, SONGER JG, UZAL FA, (2013) Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(3), 314-327.

- COSTA MC, STAMPFLI HR, ARROYO LG, PEARL DI, WEESE JS, (2011) Epidemiology of *Clostridium difficile* on a veal farm: prevalence, molecular characterization and tetracycline resistance. *Veterinary Microbiology*, 152, 379-384.
- DAVIES AH, MCGLASHANJ, POSNER MG, ROBERTS AK, SHONE CC, ACHARYA KR (2016) Functional significance of active site residues in the enzymatic component of the *Clostridium difficile* binary toxin. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 8, 55-61.
- DAWSON LF, VALIENTE E, WREN BW (2009) *Clostridium difficile*-A continually evolving and problematic pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (2009) 1410-1417.
- DIAB SS, SONGER JG, UZAL FA (2013) *Clostridium difficile* infection in horses: A review. *Veterinary Microbiology*, 167, 42-49.
- DIAB SS, UZAL FA, SONGER JG (2016) Diseases produced by *Clostridium difficile*. In: *Clostridial Diseases of Animals*. Ed. FA UZAL, JG SONGER, PRESCOTT JF, POPOFF MR. First Edition, John Wiley & Sons. Ames, Iowa, USA, 177-195.
- DUBBERKE ER, RESKE KA, NOBLE-WANG J, THOMPSON A, KILLGORE G, MAYFIELD J, CAMINS B, WOELTJE K, MCDONALD JR, MCDONALD LC, FRASER VJ (2007) Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *American Journal of Infection Control*, Vol. 35, Issue 5, 315-318.
- DUBBERKE ER, RESKE KA, OLSEN MA, MCDONALD LC, FRASER VJ (2008) Short- and long-term attributable costs of *Clostridium difficile*-associated disease in nonsurgical inpatients. *Clin Infect Dis*, 2008;46(4):497-504.
- DUBBERKE ER, OLSEN MA (2012) Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clinical Infectious Diseases*, 2012;55(S2), 88-92.
- ECKERT C, EMIRIAN A, LE MONNIER A, CATHALA L, DE MONTCLOS H, GORET J, BERGER P, PETIT A, DE CHEVIGNY A, JEAN-PIERRE H, NEBBAD B, CAMIADE S, MECKENSTOCK R, LALANDE V, MARCHANDIN H, BARBUT F (2015) Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbe and New Infect*, 2015;3, 12-17.

- EUCAST (2018) *Clostridium difficile*: Clinical breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 8.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf , 13.02.2018.
- FLETCHER KR, CINALLI M (2007) Identification, optimal management, and infection control measures for *Clostridium difficile* – associated disease in long term care. *Geriatric Nursing*, Vol 28, No 3, 171-181.
- GARDINER AF, ROSENBER T, ZAHARATOS J, FRANCO D, HO DD (2009) A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine*, 27, 3598-3604.
- GENTH H, DREGER SC, HUELSENBECK J, JUST I (2008) *Clostridium difficile* toxins: More than mere inhibitors of Rho proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40 (2008) 592-597.
- GIANNASCA PJ, WARNY M (2004) Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Vaccine*, Vol 22, Issue 7, 848-856.
- GOORHUIS A, BAKKER D, CORVER J, DEBAST SB, HARMANUS C, NOTERMANS DW, BERGWERFF AA, DEKKER FW, KUIJPER EJ (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*, 47, 1162–1170.
- GÜRAN HS, İLHAK Oİ (2015) *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in Eastern Region of Turkey. *J. Verbr. Lebensm*, 10, 359-364.
- HALL AJ, CURNS AT, MCDONALD LC, PARASHAR UD, LOPMAN BA (2012) The roles of *Clostridium difficile* and Norovirus Among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1997-2007. *Clin Infect Dis*, Jul;55(2):216-23.
- HAMMITT MC, BUESCHEL DM, KEEL MK, GLOCK RD, CUNEO P, DEYOUNG DW, REGGIARDO C, TRINH HT, SONGER JG (2008) A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary Microbiology*, 127, 343-352.

- HAMPIKYAN H, BINGOL EB, MURATOGLU K, AKKAYA E, CETİN O, COLAK H (2018) The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. *Meat Science* 139, 120–124
- HASTEY CJ, DALE SE, NARY J, CITRON D, LAW JH, ROE-CARPENTER DE, CHESNEL L (2017) Comparison of *Clostridium difficile* minimum inhibitory concentrations obtained using agar dilution vs broth microdilution methods. *Anaerobe*, 44, 73-77.
- HOPMAN NEM, KESSEN EC, HARMANUS C, SANDERS IMJG, Van LEENGOED LAMG, KUIJPER EJ, LIPMAN LJA (2011) A acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, 149, 186-192.
- HUSSAIN I, BORAH P, SHARMA RK, RAJKHOWA S, RUPNIK M, SAIKIA DP, HASIN D, HUSSAIN I, DEKA NK, BARKALITA LM, NISHIKAWA Y, RAMAMURTHY T (2016) Molecular characteristics of *Clostridium difficile* isolates from human and animals in the North Eastern region of India. *Molecular and Cellular Probes*, 30, 306-311.
- IGAWA G, CASEY M, SAWABE E, NUKUI Y, OKUGAWA S, MORIYA K, KOIKE R, TOHDA S, SAITO R (2016) Comparison of agar dilution and broth microdilution methods for *Clostridium difficile* antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7, 43-45.
- INDRA A, LASSNIG H, BALIKO N, MUCH P, FLEDLER A, HUHULESCU S, ALLERBERGER F (2009) *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent?. *Wien Klin Wochenschr*, 121, 91-95.
- JAFARI NV, SONGANE M, STABLER RA, ELAWAD M, WREN BW, ALLAN E, BAJAJ-ELLIOTT M (2014) Host immunity to *Clostridium difficile* PCR ribotype 017 strains. *Infection and Immunity*, Vol 82, No 12, 4989-4996.
- JANEZIC S, ZIDARIC V, PARDON B, INDRA A, KOKOTOVIC B, BLANCO JL, SEYBOLDT C, DIAZ CR, POXTON IR, PERRETEEN V, DRIGO I, JIRASKOVA A, OCEPEK M, WEESE JS, SONGER JG, WILCOX MH, RUPNIK M (2014) International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains, *BMC Microbiology*, 14:173, 1-10.
- JANK T, AKTORIES K (2008) Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends in Microbiology*, Vol. 16 No.5, 222-229.

- JOBSTL M, HEUBERGER S, INDRA A, NEPF R, KÖFER J, WAGNER M (2010) *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 172-175.
- JOHNSON S (2009a) Recurrent *Clostridium difficile* infection: A review of risk factors, treatments, and outcomes. *Journal of Infection*, 58, 403-410.
- JOHNSON S (2009b) Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, S1 (2009) S33-S36
- JONES AM, KUIJPER EJ, WILCOX MH (2013) *Clostridium difficile*: A European perspective. *Journal of Infection*, 66, 115-128.
- KAYA S (2007) Antibiyotikler, Veteriner Farmakoloji Ed. S KAYA, cilt 2 baskı 4, Medisan Yayınevi, Ankara, 329-488.
- KEEL K, BRAZIER JS, POST KW, WEESE S, SONGER G (2007) Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2007, 1963-1964.
- KEESSEN EC, GAASTRA W, LIPMAN LJA (2011) *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153, 205-217.
- KELLY CP, LAMONT JT (2008) *Clostridium difficile*-more difficult than ever. *The New England Journal of Medicine*, 359,1932-1940.
- KHAN FY, ELZOUKI AN (2014) *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. *Asian Pac Trop Med*, 7 (Suppl 1), 6-13.
- KNIGHT DR, RILEY TV (2013) Prevalence of Gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in Australian sheep and lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 79, No. 18, 5689-5692.
- KNIGHT DR, THEAN S, PUSATHIT P, FENWICK S, RILEY TV (2013) Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 79, No 8, 2630-2635.

KOENE MGJ, MEVIUS D, WAGENAAR AJ, HARMANUS C, HENSGENS MPM, MEETSMA AM, PUTIRULAN FF, VAN BERGEN MAP, KUIJPER EJ (2011) *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristic similarities with human isolates. *Clinical Microbiology and Infection European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18, 778-784.

KUIJPER EJ, COIGNARD B, TULL P (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 12 (Suppl.6), 2-18.

KUNISHIMA H, CHIBA J, SAITO M, HONDA Y, KATU M (2013) Antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* isolated in Japan. *J.Infect Chemother*, 19:360-362

LEMEE L, DHALLUIN A, TESTELIN S, MATTRAT MA, MAILLARD K, LEMELAND JF, PONS JL (2004) Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (toxin a), and tcdB (toxin b) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol*, 42 (12): 5710-5714.

LIMBAGO BM, LONG CM, THOMPSON AD, KILLGORE GE, HANNET GE, HACILL NL, MICKELSON S, LATHROP S, JONES TF, PARK MM, HARRIMAN KH, GOULD LH, MCDONALD LC, ANGULO FJ (2009) *Clostridium difficile* strains from community-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept 2009, 3004-3007.

MAGISTRALLI CF, MARESCA C, CUCCO L, BANO L, DRIGO I, FLIPPINI G, DETTORI A, BROCCATELLI S, PEZZOTTI G (2015) Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in veal calves in Italy. *Anaerobe*, 33, 42-47.

MARTINEZ-MELENDZ A, CAMACHO-ORTIZ A, MORFIN-OTERO R, MALDONADO-GARZA HJ, VILAREAL-TREVINO L, GARZA-GONZALEZ E (2017) Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *World J Gastroenterol*, March 7, 23(9), 1552-1567.

MCFEE RB, ABDELSAYED GG. (2009) *Clostridium difficile*. *Dis Mon*, 55, 439-470.

MCNAMARA SE, ABDUJAMILOVA N, SOMSEL P, GORDONCILLO MJ, DEDECKER JM, BARTLETT PC (2011) Carriage of *Clostridium difficile* and other enteric pathogens among a 4-H avocational cohort. *Zoonoses and Public Health*, 58, 192-199.

- METCALF D, AVERY BP, JANECKO N, MATIC N, REID-SMITH R, WEESE JS (2011) *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 85-86.
- MULLANY P, ROBERTS AP (2010) *Clostridium difficile* Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 646, Humana Press, New York, USA
- NAPOLITANO LM, EDMISTON CE Jr (2017) *Clostridium difficile* disease: diagnosis, pathogenesis, and treatment update. *Surgery*, 162(2), 325-348.
- PECHINE S, COLLIGNON A (2016) Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 41, 68-78.
- PENG Z, JIN D, KIM HB, STRATTON CW, WU B, TANG YW, SUN X (2017) Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 55, Issue 7, 1998-2008.
- PERSON S, TORPDAHL M, OLSEN KEP (2008) New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin a (tcdA), and toxin b (tcdB), and binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect*, 14 (11), 1057-1064.
- PIRS T, OCEPEK M, RUPNIK M (2008) Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 790-792.
- PIRS T, AVBERSEK J, ZDOVC I, KRT B, ANDLOVIC A, LEJKO-ZUPANC T, RUPNIK M, OCEPEK M (2013) Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1478-1485.
- PITUCH H (2009) *Clostridium difficile* is no longer just a nosocomial infection or an infection of adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, S1 (2009) S42-S45.
- PLANCHE T, ARNOLD A (2009) *Clostridium difficile*, *Medicine Journal*, Vol. 37 Issue 12, 641-643.

- POXTON IR (2005) Other *Clostridium spp.* Editors Stephen H. Gillespie, Peter M. Hawkey
Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.,
Sy. 567-574. Chichester, England.
- QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC (2002)
Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Blackwell Science. Chichester, England.
- QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR, (2004) Clinical Veterinary
Microbiology, Mosby.
- RAINEY FA, HOLLEN BJ, SMALL AM (2015) *Clostridium*, Ed. Whitman WB, Rainey F,
Kampfer P, Trujillo M, Chun J, Devos P, Hedlund B, Dedys S. in Bergey's Manual of
Systematics of Archaea and Bacteria, John Wiley & Sons, Inc., Sy. 1-122.
doi:10.1002/9781118960608.gbm00619.
- RODRIGUEZ-PALACIOS A, STAMPFLI HR, DUFFIELD T, PEREGRINE AS, TROTZ-
WILLIAMS LA, ARROYO LG, BRAZIER JS, WEESE JS. (2006) *Clostridium difficile*
PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 12, No 11, 1730-
1736.
- RODRIGUEZ-PALACIOS A, REID-SMITH RJ, STAEMPFLI HR, DAIGNAULT D,
JANECKO N, AVERY BP, MARTIN H, THOMSPON AD, MCDONALD LC,
LIMBAGO B, WEESE JS. (2009) Possible sseasonality of *Clostridium difficile* in retail
meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 15, No 5, 802-805.
- RODRIGUEZ C, TAMINIAU B, VAN BROECK J, AVESANI V, DELMEE M, DAUBE G
(2012) *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium.
Anaerobe, 18, 621-625.
- RODRIGUEZ C, BROECK JV, TAMINIAU B, DELMEE M, DAUBE G (2016) *Clostridium*
difficile infection: early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial*
Pathogenesis, 97, 59-78.
- ROMANO V, ALBANESE F, DUMONTET S, KROVACEK K, PETRINI O, PASQUALE V
(2012) Prevalence and genotyping characterization of *Clostridium difficile* from
ruminants in Switzerland. *Zoonoses and Public Health*, 59, 545-548.

- RUPNIK M, GRABNAR M, GERIC B (2003) Binary toxin producing *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 9, 289-294.
- RUPNIK M, DUPUY B, FAIRWEATHER NF, GERDING DN, JOHNSON S, JUST I, LYERLY DM, POPOFF MR, ROOD JI, SONENSHEIN AL, THELESTAM M, WREN BW, WILKINS TD, VON EICHEL-STREIBER C (2005) Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 113–117.
- SAIF NA, BRAZIER JS (1996) The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol*, Vol. 45, 133-137.
- SCHNEEBERG A, NEUBAUER H, SCHMOOCK G, GROSSMANN E, SEYBOLDT C (2013) Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1190-1198.
- SIMANGO C, MWAKURUDZA S (2008) *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 268-270.
- SKRABAN J, DZEROSKI S, ZENKO B, TUSAR L, RUPNIK M (2013) Changes of poultry faecal microbiota associated with *Clostridium difficile* colonisation. *Veterinary Microbiology*, 165, 416-424.
- SONGER JG, ANDERSON MA (2006) *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 12, 1-4.
- SONGER JG (2010) *Clostridia* as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140, 399-404.
- SPIGAGLIA P (2016) Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis*. Feb 3 (1), 23-42.
- SWICK MC, KOEHLE TM, DRIKS A (2016) Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. *Microbiol Spectr*, 1-28.

- THITARAM SN, FRABK JF, SIRAGUSA GR, BAILEY JS, DARGATZ DA, LOMBARD JE, HALEY CA, LYON SA, FEDORKA-CRAY PJ (2016) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from food animals on farms. *International Journal of Food Microbiology*, 227, 1-5.
- TIMONEY JF, GILLESPIE JH, SCOTT FW, BARLOUGH JE (1988) The Genus *Clostridium* Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed. Cornell University Press, 1988: 2, Ithaca, USA.
- USACHEVA EA, JIN JP, PETERSON LR (2016) Host response to *Clostridium difficile* infection: diagnostics and detection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7, 93-101.
- UZAL FA, DIAB SS, BLANCHARD P, MOORE J, ANTHENILL L, SHAHRIAR F, GARCIA JP, SONGER JG (2012) *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Veterinary Microbiology*, 156, 395-402.
- VERITY P, WILCOX MH, FAWLEY W, PARNELL P (2001) Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *Journal of Hospital Infection*, 49, 204-209.
- WARREN CA, GUERRANT RL (2011) Pathogenic *C. difficile* is here (and everywhere) to stay. *The Lancet*, Vol 377, 8-9.
- WEBER DJ, RUTALA WA, MILLER MB, HUSLAGE K, SICKBERT-BENNETT E (2010) Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, 38, 25-33.
- WIEGAND PN, NATHWANI D, WILCOX MH, STEPHENS J, SHELBAYA A, HAIDER S (2012) Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcar-facility-acquired infection. *Journal of Hospital Infection*, 81, 1-14.
- WILCOX M, MINTON J (2001) Role of antibody response in outcome of antibiotic associated diarrhoea. *The Lancet*, 357, 158-159.

WILCOX MH (2003) *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 17, No. 3, 475–493.

ZIDARIC V, ZEMLJIC M, JANEZIC S, KOCUVAN A, RUPNIK M (2008) High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe*, 14, 325-327.

ZIDARIC V, PARDON B, VULTOS T, DEPREZ P, BROUWER MSM, ROBERTS AP, HENRIQUES AO, RUPNIK M (2012) Different antibiotic resistance and sporulation properties within multiclonal *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078, 126, and 033 in a single calf farm. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 78, No 24, 8515-8522.



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Ediz Kağan

Soyadı: ÖZGEN

Doğum Yeri ve Tarihi : Erzurum/1987

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Evli

Adres: Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü, Erzurum.

Telefon: 0507 453 30 23

E-posta: ediz_05@hotmail.com

II. Eğitimi

2010-2014: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Yüksek Lisans.

2005-2010: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kırıkkale

2001-2004: Kaya Beyazıtöğlü Lisesi, Ankara

1998-2001: Batıkent Ortaokulu, Ankara.

1993-1998: Sabancı İlköğretim Okulu, Erzurum.

Yabancı Dil: İngilizce

III. Mesleki Deneyimi

2011- : Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü.

IV. Yayınları

Yürüttüğü Projeler

- 1) Ediz Kağan ÖZGEN, Hüseyin ERDEM, Hüseyin Gürkan SARAÇ, Zafer OKUMUŞ, Seyda CENGİZ: Piyetende *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* etkenlerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi, TAGEM Projesi
- 2) Biray OKUMUŞ, Ömer Hamza AKKAYA, Şadiye TOLU ÇERÇİ, Yunus KILIÇOĞLU, Ediz Kağan ÖZGEN, Mustafa ULUCAN, Mehmet MİROĞLU, Gülnur ATALAR: Koyun-Keçi Kan Serumlarında *Coxiella burnetii* Antikorlarının ELISA ile Araştırılması, TAGEM Projesi
- 3) Biray OKUMUŞ, Ediz Kağan ÖZGEN, Ömer Hamza AKKAYA, Mustafa ULUCAN, Koyun ve Keçilerde Yavru Atma (Abort) Kaynağı, Q-Hummasının Önemi, Korunma ve Mücadelesi Yayın Projesi, Eğitim Yayın ve Yayınlar Dairesi Başkanlığı Projesi

Bilimsel Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- 1) Ediz Kağan ÖZGEN, Murat YILDIRIM (2018) Neonatal Dönem Buzağı İshallerinde *Clostridium difficile*. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 7(1), 33-41
- 2) Ediz Kagan Ozgen, Seyda Cengiz, Mustafa Ulucan, Zafer Okumus, Asli Kortel, Hüseyin Erdem, Huseyin Gurkan Sarac (2015) Isolation and identification of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* using the polymerase chain reaction method in sheep with footrot, *Acta Vet Brno*, Vol. 84, Issue 2, pp. 97-104
- 3) Sami GÖKPINAR, Ediz Kağan ÖZGEN, Kader YILDIZ: Ege Denizi'nin Kuzeyinden Yakalanan Bir Sarıgöz Balığında *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826) (Isopoda: Cymothoidae), *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (2): 188 - 190, 2009

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- 1) Ediz Kağan ÖZGEN, Zafer OKUMUŞ, Seyda CENGİZ: Piyeten'de klinik skorlama ile *F. necrophorum* ve *D. nodosus*'un izolasyon oranı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, Poster Sunumu, XIV. ULUSAL VETERİNER CERRAHİ KONGRESİ

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- 1) Ediz Kağan ÖZGEN, , Seyda CENGİZ, Zafer OKUMUŞ, Mustafa ULUCAN, Hüseyin ERDEM, Aslı KORTEK, Hüseyin Gürkan SARAÇ: Piyetende *D. nodosus* ve *F. necrophorum*'un PCR ile Belirlenmesi, Sözlü Sunumu, XI. ULUSLARARASI VETERİNER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ
- 2) Ömer Hamza AKKAYA, Ediz Kağan ÖZGEN, Mustafa ULUCAN, Soner IŞIKPINAR, Biray OKUMUŞ: 2012-2014 Yılları EVKEM Sorumluluk Alanında Brucellosis, Poster Bildirimi, XI. ULUSLARARASI VETERİNER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ
- 3) Ediz Kağan ÖZGEN, Murat YILDIRIM: Evcil Hayvanlarda Zorunlu Anaerobik Bakteri Enfeksiyonları, Poster Bildirimi, XI. ULUSLARARASI VETERİNER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ
- 4) Biray OKUMUŞ, Ömer Hamza AKKAYA, Şadiye TOLU, Yunus KILIÇOĞLU, Ediz Kağan ÖZGEN, Mustafa ULUCAN, Mehmet MİROĞLU, Gülnur ATALAR, Koyun-Keçi Kan Serumlarında *Coxiella burnetii* Antikorlarının ELISA ile Araştırılması, Sözlü Sunum, XI. ULUSLARARASI VETERİNER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ
- 5) Ediz Kağan Özgen Biray Okumuş Ercan Atalay Mustafa Ulucan Ömer Hamza Akkaya Sığır Abort Vakalarının Moleküler Yöntemler ile İncelenmesi, Sözlü Sunum, XII. Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi
- 6) Ediz Kağan Özgen Biray Okumuş Ercan Atalay Mustafa Ulucan Ömer Hamza Akkaya, Abort Vakalarının Değerlendirilmesinde ilk Basamak; Fötusun Yaşı, Poster Sunum, XII. Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi
- 7) Ömer Hamza Akkaya Biray Okumuş Ediz Kağan Özgen Mustafa Ulucan, Antibiyotik Direncin Laboratuvar Teşhislerine Etkisi, Poster Sunum, XII. Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi
- 8) Ediz Kağan Özgen, Ertuğrul ELMA, Erzurum Yöresi Koyunlarında Görülen Ayak Hastalıklarının Prevalansı, Poster Sunum, XV. Ulusal, I. Uluslararası Veteriner Cerrahi Kongresi.