



## *Clostridium difficile*: Yeni Bir Gıda Patojeni mi?

Zeynep ALATAŞ<sup>1</sup>, Ahmet GÜNER<sup>2</sup>✉

1. Tarım ve Orman Bakanlığı, Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Birimi, Konya, TÜRKİYE.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.12.2017	30.03.2018	25.12.2018

**Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:**

**Alataş Z, Güner A:** *Clostridium difficile*: Yeni Bir Gıda Patojeni mi?. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 389-396, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.364311

**Öz:** Doğada yaygın olarak bulunan *Clostridium difficile*, antibiyotik ilişkili ishal, pseudomembranöz kolit ve fulminant kolit olmak üzere çeşitli klinik tabloların şekillenmesine sebep olabilen nozokomiyal fırsatçı bir patojendir. Antibiyotiğe bağlı ishallerin %15-25'inden, psödomembranöz kolitlerin hemen hemen hepsinden sorumlu olduğu düşünülen *C. difficile*'in hipervirülan suşlarının ise genellikle nüks oranı yüksek ve şiddetli enfeksiyonlara hatta ölüme yol açtıkları bilinmektedir. *C. difficile*'in gıdalardan insanlara bulaşarak enfeksiyon yaptığına dair henüz yeterli veri bulunmamakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. difficile* enfeksiyonlarında çarpıcı bir artış olduğunun belirtilmesi, etkenin aynı zamanda hayvansal gıdalardan, çiğ veya tüketime hazır gıdalardan, sebzelerden, salatalardan, deniz, göl ve nehir sularından, su ürünlerinden, topraktan ve çeşitli çevresel numunelerden izole edilmiş olması, *C. difficile*'in gıda kaynaklı bir patojen olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. *C. difficile*'in gıdalarda tespit edilen bazı suşlarının toksijenik özellik taşımaları, antibiyotiklere karşı değişen oranlarda dirençli olmaları ve zor şartlara dayanıklı endosporları sayesinde kolayca yayılabilme özellikleri ise bu bakterinin önemini giderek arttırmaktadır. Bu derlemede *C. difficile*'in genel özellikleri, patojenitesi, enfeksiyon kaynakları, risk faktörleri, gıdalarda varlığı, gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu hakkında bilgilere yer verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Clostridium difficile*, Gıda kaynaklı hastalıklar, Gıda mikrobiyolojisi.

## *Clostridium difficile*: Is it a New Food-Borne Pathogen?

**Abstract:** *Clostridium difficile*, commonly found in nature, is a nosocomial opportunistic pathogen which causes formation of various clinical disorders including antibiotic associated diarrhea, fulminant colitis and pseudomembranous colitis. *C. difficile* is thought to be responsible for almost all of the pseudomembranous colitis and 15-25% of the antibiotics related diarrhea. Also it is known that hypervirulent strains generally have high recurrence rate and cause severe infections or even death. Although there is not enough data that *C. difficile* infects people by transmission via food, there is a significant increase in infections caused by *C. difficile* in recent studies. In addition to this knowledge bacteria have been isolated from various samples which animal foods, raw or ready to eat foods, vegetables, salads, the waters of sea, lake and river, seafood, soil and environmental samples. All of these bring to mind a question that *C. difficile* is whether or not a food-borne pathogen. Toxigenic characteristics of some strains of *C. difficile* detected in foods, resistance to antibiotics in various ratios and their spreading easily properties due to endospores resistant to difficult conditions have further increased the importance of this bacterium. In this review, the information about general characteristics, pathogenesis, infection sources, risk factors, presence in food, isolation from food and identification of *C. difficile* have been given.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, Food-borne diseases, Food microbiology.

## GİRİŞ

**C**lostridium cinsinin büyük çoğunluğu biyoyakıt üretimi de dahil olmak üzere, yararlı biyotransformasyonları gerçekleştirilebilir kabiliyetine sahiptir. Bazı türlere (örn.; *Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi*) ait spor formlarının kanser tedavisinde önemli bir rol oynadıkları da iddia edilmektedir. Bilinen bu özelliklerine rağmen *Clostridium* türleri sebep oldukları hastalıklardan dolayı insanlar için genellikle tehlikeli olarak düşünülmektedir (1).

*Clostridium difficile*, antibiyotiğe bağlı ishallerin %15-25'inden, psödomembranöz kolitlerin ise hemen hemen hepsinden sorumlu olduğu düşünülen ve doğada yaygın olarak bulunan, nozokomiyal fırsatçı bir patojendir (2).

Son on yılda ciddi bir artışın olduğu *C. difficile* enfeksiyonları (CDE) için risk faktörü olarak bazı gıdalar şüpheli görülmektedir. Bu konuda kesin bir kanıt bulunmamakla birlikte gıdaların gerçekten enfeksiyon kaynağı olup olmadığını belirlemek de oldukça zordur (3).

### 1. Tarihçe ve Taksonomi

İlk olarak 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından sağlıklı yenidoğanlar ile bir yaşına kadar olan bebeklerin dışkılarından Gram pozitif, anaerobik ve sitotoksin üretebilen bir bakteri izole edilmiş, bu bakterinin küçük yaşlarda barsak florasının normal bir üyesi olduğu bildirilmiştir (4). Hall ve O'Toole, izolasyon ve kültürünü yaparken karşılaştıkları zorlukları yansıtmak için bakteriyeye *Bacillus difficilis* adını vermişlerdir (5). İlk kez 1978 yılında klindamisine ilişkili kolite sebep olduğunun anlaşılmasının ardından 1989-2002 yıllarında Amerika Birleşik Devleti'nde klindamisine dirençli *C. difficile*'ye bağlı salgınlar bildirilmiş, 2003-2006 yıllarında ise Kuzey Amerika ve Avrupa'da klinik şiddeti ve mortalite oranı yüksek, fazla miktarda

toksin üreten ve florokinolonlara dirençli *C. difficile* suşu (BI/NAP1/027) tespit edilmiştir (6). *C. difficile*'in sınıflandırılması ise Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de şu şekilde yapılmıştır (7).

Şube:	Firmicutes
Sınıf:	Clostridia
Takım:	Clostridiales
Familiya:	Clostridiaceae
Cins:	Clostridium
Tür:	<i>C. difficile</i>

### 2. C. difficile ve Gelişme Özellikleri

*C. difficile*, 0.5-1.9 µm eninde, 3.0-16.9 µm boyunda, Gram pozitif bir basildir. Bazı suşlar 2-6 hücreden oluşan zincirler oluşturabilmektedirler (7). Bakteri, hücrelerinden daha geniş ve bazen terminal, çoğunlukla subterminal yerleşimli spora sahiptir (4,7). *C. difficile*, optimum üreme sıcaklığı 30-37°C olan, zorunlu anaerobik bir bakteridir. İnkübasyon için %10 CO<sub>2</sub>, %10 H<sub>2</sub> ve %80 N<sub>2</sub>'ye ihtiyaç duymakta ve ilk izolasyonda içerisinde kan, serum, yumurta sarısı, fruktoz bulunan besiyerleri kullanılmaktadır. Sikloserin sefoksitin fruktoz agar (CCFA) *C. difficile* izolasyonunda çok tercih edilen bir besiyeridir (4).

### 3. Virülens Faktörleri

*C. difficile*'in temel virülens faktörleri olarak, bir enterotoksin olan toksin A ve bir sitotoksin olan toksin B bildirilmektedir. Bazı suşları (örn.; *C. difficile* ribotip 027, ribotip 078) tarafından ADP-ribosyltransferase aktivitesine sahip bir toksin olan *C. difficile* transferase (CDT) üretilmektedir. Ancak CDT'nin virülense sağladığı katkı tam olarak bilinmemektedir (8). İzole edilen *C. difficile* suşlarının %75'inin toksijenik olduğu bildirilmektedir (4). Toksijenik *C. difficile* suşları, bilinen toksinlerden en az birini üretmektedirler. Ürettikleri toksin çeşidine bağlı olarak farklı toksinotipler mevcuttur (Tablo 1).

**Tablo 1.** *C. difficile*'in Toksinotipleri (9).**Table 1.** Toxinotypes of *C. difficile* (9).

Toksinotip	Toksin A	Toksin B	CDT
0, I, II, XII, XIII, XVIII– XXII	+	+	-
III–VII, IX, XIV, XV, XXIII, XXIV	+	+	+
VIII	-	+	-
X, XVI, XVII	-	+	+
XI ve bazı PaLoc* negatif suşlar	-	-	+
Nontoksijenik suşlar	-	-	-

\*PaLoc: Patojenite lokusu veya adası olarak bilinen, toksin A ve toksin B'yi kodlayan genom bölgesi.

Toksin A 308 kDa, toksin B ise 270 kDa molekül ağırlığındadır. Her iki toksin de protein yapısında olmakla birlikte asitlere, proteolitik enzimlere ve ısıya karşı duyarlıdır (4). Toksin A, kolon mukozasındaki reseptörlere tutunmayı sağlayarak, mukoza hasarı ve inflamasyona sebep olan mediyatörlerin salınımını uyarmaktadır. Toksin B ise direkt olarak kolon mukozasında hasara yol açmaktadır (6).

*C. difficile*, olumsuz çevre koşullarında dirençli endosporlar oluşturmaktadır. Sporların bakterinin hastane ortamında yayılmasında önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (10). Antibiyotik direnci kazandıran, toksin üretimini arttıran, sporulasyonu kolaylaştıran çeşitli mutasyonlar da, *C. difficile*'in görülme sıklığını ve virülensini önemli ölçüde arttırmaktadır (5).

### 3.1. *C. difficile*'in Hipervirülen Suşları

Toksin üretme kapasitesi yüksek olan suşlar “hipervirülen suşlar” olarak bilinmektedir. Bu suşlar genellikle nüks oranı yüksek olan şiddetli enfeksiyonlara ve ölüme sebep olabilmektedirler (11). *C. difficile*'in BI/NAP1/027 olarak adlandırılan hipervirülen suşunun dünyada son yıllarda artan CDE salgınları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu suşlar, florokinolonlara dirençli olup diğer suşlara (örn.; toksinotip 0 ) göre 16-23 kat daha fazla toksin üretme kapasitesine sahiptirler (12).

### 3.2. *C. difficile*'in Antibiyotik Direnci

CDE'nin tedavisinde genellikle metronidazol veya vankomisin kullanılmaktadır (13). Ancak yapılan bazı çalışmalarda tedavide kullanılan bu antibiyotiklere karşı dirençli suşların varlığı bildirilmiştir (14,15). Palaez ve ark. (14), 1999-2000

yılları arasında topladıkları 415 *C. difficile* suşunun 26'sında (%6.3) metronidazole karşı direnç saptamışlardır. Dworzynski ve ark (15) ise Polonya'da disk diffüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada vankomisine dirençli suşlar tespit etmişlerdir. Kıyma örneklerinde klindamisin ve moksifloksasine (16), bazı sebzelede klindamisin (17), salatalarda klindamisin, moksifloksasin, eritromisin ve sefotaksime (18), tavuklarda sefotaksim, gentamisin, siprofloksasin, norfloksasin ve nalidiksik asite (19) dirençli suşlar izole edilmiştir.

## 4. Enfeksiyon Tablosu ve Patojenitesi

CDE, asemptomatik olabildiği gibi pseudomembransız kolit, psödomembranöz kolit ve fulminant kolit olmak üzere çeşitli klinik tablolarla da karşımıza çıkabilmektedir (4,6). Bir kişide CDE meydana gelebilmesi için üç ana faktör mevcut olmalıdır. İlk olarak hasta, mikroorganizma veya onun sporlarına maruz kalmış olmalı, hastanın barsak florası antibiyotik kullanmak suretiyle tahrip edilmiş olmalı ve mikroorganizma barsakta belli bir sayıya ulaşarak toksin üretmelidir (20).

Psödomembranöz kolit olgularında dışkılama sayısında artışla birlikte yüksek ateş, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma gözlenmekte dışkıda ise bol lökosit ve eritrosit bulunmaktadır (6). Psödomembranöz kolitli hastaların barsaklarında da 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar gözlenmektedir (4). Hastalığın başında dağınık ve küçük olan bu plaklar zamanla birleşerek tabaka şeklinde geniş bir alanı kaplamaktadır. Bu tabaka, psödomembranöz koliti diğer barsak iltihabı çeşitlerinden ayıran ve hastalığa adını veren bir yapıdır. Tedavi edilmeyen psödomembranöz kolit ölümcül olabilmektedir (21).

## 5. Enfeksiyon Kaynakları

*C. difficile* için deniz sedimenti, toprak, kum, hastane ortamı, insan, deve, at, eşek, kedi, evcil kuş ve köpeklerin dışkıları ile nadiren insan ve hayvan kanları kaynak olarak gösterilmektedir (7). *C. difficile* sağlık çalışanlarının elleri, tuvalet ve lavobolar, hastanede kullanılan araç-gereçler, endoskopi ekipmanları gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. Kişiden kişiye bulaşma genellikle fekal-oral yolla olmaktadır (22). Çevresel faktörler içinde ellerin *C. difficile* sporları ile kontaminasyonu, en önemli bulaşma yolu olmakla birlikte henüz tespit edilememiş kaynaklar olması da muhtemel görülmektedir (23). Bakterinin spor formu ısıya dayanıklıdır ve insan midesi gibi asidik ortamlarda canlı kalmayı başarabilmektedir. *C. difficile* sporlarının, çeşitli dezenfektanlara maruz kaldıktan sonra bile hastane yüzeylerinden izole edilebildikleri bildirilmiştir (22).

## 6. Risk Faktörleri

CDE için en önemli risk faktörü yoğun antibiyotik kullanımınıdır. Ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin ve fluorokinolonlar antibiyotikle ilişkili CDE şekillenmesinde yüksek risk taşımaktadır (24). Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmakta ve baskın hale gelen *C. difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksin üretmektedir (25).

İleri yaş ( $\geq 65$ ) grubundaki kişilerde, hastanede yatmanın ve ağır hastalıklara maruz kalmanın CDE riskini arttırdığı iddia edilmektedir (13). *C. difficile*'ye bağlı ishale, barsakların ameliyat öncesi mekanik temizliği, radyasyon, yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre hastanede yatma gibi etkenlerin de sebep olabileceği düşünülmektedir (4). Kesin bir kanıt bulunmamasıyla birlikte CDE için diğer bir risk faktörü ise proton pompa inhibitörlerinin kullanımınıdır (20). Özellikle yüksek riskli antibiyotik alan hastalarda, proton pompa inhibitörlerinin daha dikkatli kullanılmasının CDE önleme stratejisi açısından önem arz edeceği belirtilmektedir (26).

## 7. Gıdalarda Varlığı

Her geçen gün dünyanın çeşitli ülkelerinden virülensi yüksek ve antibiyotiklere dirençli *C. difficile* suşlarına bağlı yeni hastane salgınları ve yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (5). Son yıllarda toplum ile ilişkili CDE'nin artması, gıdalarda ve kasaplık etlerde etkenin tespit edilmesi, hayvanlardan ve insanlardan izole edilen suşların benzerliği *C. difficile*'in gıda kaynaklı hastalığa sebep olabileceğini düşündürülen temel faktörlerdir (3).

Tüketime hazır gıdalarda *C. difficile*, ilk olarak bombaj yapmış vakum paketli pişmiş etlerden tesadüfen izole edilmiştir (27). Bakri ve ark. (18), İskoçya'da tüketime hazır salata numunelerinde %7.5 (3/40), Metcalf ve ark. (17), Kanada'da marketlerde satışı sunulan çeşitli sebze ve meyvelerde (örn.; havuç, patates, sarımsak, zencefil, pancar, mantar, marul, yeşil soğan, turp, brokoli, kereviz kökleri, şalgam, pancar, kuşkonmaz) %4.5 (5/111), Eckert ve ark. (28) ise Fransa'da tüketime hazır salata ve sebze numunelerinde %2.9 (3/104) oranında toksijenik *C. difficile* suşları tespit etmişlerdir. Sebze ve meyvelerin kontamine olmasında toprak, gübre, su, işleme ortamları ve insan elleri gibi çeşitli muhtemel kaynakların rolleri olabileceği düşünülmektedir (3,18). Rodriguez ve ark. (29), Belçika'da bir huzur evinde domuz sosisi, hardal sosu ve havuç salatasından oluşan tek öğün yemeğinde ripotip 078 *C. difficile* suşu izole etmişlerdir. Rahimi ve ark. (30), İran'da çeşitli market ve restoranlarda tüketime sunulan paketlenmemiş yemeye hazır gıda örneklerinin %1.36'sında (5/368) *C. difficile* sporları tespit etmişlerdir. Esfandiari ve ark. (31), İran'da işlem görmüş hamburgerler ve hamburger üretim tesislerinden topladıkları numunelerin %4.2'sinde (9/211) *C. difficile*'ye rastlamışlar ve suşlardan %28.5'inin toksijenik olduğunu tespit etmişlerdir. Metcalf ve ark. (32), Kanada'da marketlerde satılan deniz ürünleri ve balıklarda %4.8 oranında (5/119) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Montazeri ve ark. (33) ise ıstiridye ve ıstiridyelerin yetiştirildiği ortamlardaki atık sularında toksijenik *C. difficile* tespit etmişlerdir.

Çiftlik hayvanlarında ve bunlara ait et örneklerinde de *C. difficile* varlığını belirlemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Rodriguez-Palacios ve ark. (34), Kanada'da perakende olarak

satılan toplam 60 kıyma örneğinin 11'i toksijenik olmak üzere 12'sinde (%20) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Simango ve Mwakurudza (19), Zimbabwe'de pazarlarda satılan tavukların dışkılarının %29'unda ve pazar yeri toprak örneklerinin ise %22'sinde *C. difficile* tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma verileri ışığında, şehir pazarlarında satılan tavukların *C. difficile*'in insanlara bulaşmasında önemli bir kaynak olabileceği ihtimalini vurgulamışlardır. Weese ve ark. (35), Kanada'da tüketime sunulan tavuk numunelerinin %12.8'inde toksijenik *C. difficile* suşu tespit ederken, Drigo ve ark. (36), et üretimi için yetiştirilen tavşanlarda bu oranı %66'sı (25/38) toksijenik olmak üzere %3 olarak (38/1279) bulmuşlardır. Jöbstl ve ark. (16), Avusturya'da 100 kıyma ve 50 çiğ süt numunesiyle yaptıkları bir çalışmada yalnızca kıyma örneklerinin 3'ünde (%3) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Boer ve ark. (37), Hollanda'da marketlerde tüketime sunulan kuzu et örneklerinde %6.3, kanatlı et örneklerinde ise %2.7 oranında etken izole etmişler ve toplamdaki örneklerin %1.6'sını *C. difficile* yönünden pozitif bulmuşlardır. Güran ve İlhak (38), Türkiye'de iki ilde süpermarket ve kasaplarda tüketime sunulan parçalanmış tavuk örneklerinde 5'i toksijenik olmak üzere %8.06 oranında (25/310) *C. difficile* tespit etmişler ve sonuçların *C. difficile*'in gıda kaynaklı bir patojen olduğunu kanıtlayacak kadar kuvvetli bir kanıt teşkil etmediğini fakat tavuk etinde toksijenik *C. difficile*'in varlığının insanlar için bir risk anlamı taşıdığına gözardı edilmemesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Rahimi ve ark. (39), İran'da sığır, inek, koyun, keçi, deve ve mandaya ait çiğ et örneklerinin %2'sinde (13/660) *C. difficile* varlığını tespit etmişlerdir. Songer ve ark. (40) ise Arizona'da pişmiş ve pişmemiş et ürünlerinde %42 oranında toksijenik *C. difficile* suşları tespit etmişlerdir.

## 8. Gıdalardan İzolasyonu ve İdentifikasyonu

*C. difficile*'yi gıdalardan izole ederken genellikle selektif bir zenginleştirme ortamı kullanılmakta sonrasında ise seçici besiyerinde üreyen kolonilerle identifikasyon ve doğrulama yapılmaktadır.

### 8.1. Zenginleştirme Ortamları ve Prosedürü

Gıda örneklerinden *C. difficile* izolasyonunda en uygun zenginleştirme ortamının hangisi olduğunu

belirlemek amacıyla araştırmacılar besiyerleri arasında karşılaştırma yapmışlardır. Jöbstl ve ark. (16), kıyma ve süt örneklerinden *C. difficile*'yi izole edebilmek amacıyla kullandıkları dört farklı zenginleştirme besiyeri (differential reinforced clostridial medium (DRCM), tryptone soy broth (TSB), thioglycolate broth (TG) ve *C. difficile* moxalactam norfloxacin (CDMN) broth) içerisinde en iyi sonucu %0.1 sodyum taurokolat ve TWEEN 80 ilave edilerek hazırlanmış CDMN brohtan aldıklarını ifade etmişlerdir. Songer ve ark. (40), zenginleştirme besiyeri olarak %0.5 maya ekstraktı, %0.05 DL-sistein ve %0.1 taurokolat içeren brain heart infusion (BHI) broth kullanmışlardır. Weese ve ark. (35), %0.1 sodyum taurokolat içeren CDMN broth kullanmışlar ve bu zenginleştirme metodunun düşük kontaminasyon oranına sahip numunelerde izolasyon şansını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Boer ve ark. (37), proteoz pepton, disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum klorür, fruktoz, sodyum taurokolat, at kanı ve *C. difficile* selektif supplement içeren bir broth kullanmışlardır. Selektif zenginleştirme besiyeri anaerobik koşullarda ve 37°C'de inkübe edilmektedir. Selektif sıvı besiyerinde yapılan zenginleştirme aşamasından sonra sporsuz bakterileri elimine etmek amacıyla alkol şoku uygulanmaktadır. Bu amaçla zenginleştirme kültürü 1:1 oranında %96'lık etanol ile karıştırılıp oda sıcaklığında bir saat inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek elde edilen peletten selektif katı besiyerine ekim yapılmaktadır (35).

### 8.2. Katı Besiyerleri

*C. difficile*'in gıdalardan izolasyonu amacıyla çoğunlukla CDMN selective supplement ve %6 at kanı ilave edilerek hazırlanmış olan Fastidious anaerobe agar (19), Taurocholate cycloserine cefoxitin fructose agar (TCCFA) (40), Colombia kanlı agar (32) ve CDMN agar (16,34,35,37) kullanılmaktadır. Ekim yapılan besiyerlerinin inkübasyonu anaerobik şartlarda ve genellikle 37°C'de 48-72 saat süreyle yapılmaktadır (35).

### 8.3. İdentifikasyon ve Doğrulama

*C. difficile*, ilk olarak koloni morfolojisi, karakteristik kokusu ve pozitif L-prolin

aminopeptidaz aktivitesi ile tanımlanmaktadır (17). Koloni morfolojisi, deneyimsiz kişiler için, yeterince ayırt edici olmamakla birlikte kolonilerin kokusu fil ya da at gübresine benzetilmektedir (41). Selektif besiyerlerinde *C. difficile*'in tirozin metabolizması sonucu *p*-cresol üretmesi ile oluşan bu tipik koku identifikasyon açısından önemlidir (42,43). L-prolin-aminopeptidaz aktivite testi de *C. difficile*

tanımlanması için kullanılan az sayıdaki biyokimyasal testten biridir. *C. difficile*'den başka bu enzimi üreten diğer *Clostridium* türlerinin bir kısmı CCFA'da gelişmemekte, bir kısmı ise koloni morfolojisi yönünden farklılık göstermektedir (44). *C. difficile*'in identifikasyonunda biyokimyasal özellikler de oldukça önemlidir (Tablo 2).

**Tablo 2.** *C. difficile*'in Bazı Önemli Biyokimyasal Reaksiyonları (7).

**Table 2.** Some Important Biochemical Reactions of *C. difficile* (7).

Özellikler					Sonuç
İndol üretimi					-
Lesitinaz üretimi					-
Lipaz üretimi					-
Eskülin hidrolizi					+
Niştasta hidrolizi					-
Nitrat redüksiyonu					-
Kullandığı ve/veya kullanarak asit oluşturduğu substratlar					
Amigdalin	-	Laktoz	-	Riboz	-
Arabinoz	-	Maltoz	-	Salisin	w
Sellobiyoz	w	Mannitol	+/-	Sorbitol	w
Fruktoz	+	Mannoz	+/-	Niştasta	-
Galaktoz	-	Melezitoz	d	Sükroz	-
Glikojen	-	Melibiyoz	-	Trehaloz	w
İnositol	-	Rafinoz	-	Ksiloz	w
İnülin	-	Ramnoz	-	Süt reaksiyonu	-
Amigdalin	-	Laktoz	-	Riboz	-

+: *C. difficile* suşlarının % 90-100'ü pozitif reaksiyon, -: suşların % 90-100'ü negatif, +/-: suşların % 61-89'u pozitif reaksiyon, d: suşların % 40-60'ı pozitif reaksiyon, w: zayıf.

Selektif besiyerlerine egg-yolk ilavesi lesitinaz aktivitesine sahip olmayan *C. difficile*'yi lesitinaz pozitif *Clostridium* türlerinden (örn.; *C. perfringens*, *C. bifermantans*) ayırmak için kullanılmakta olan önemli bir ayrıntıdır (41). Uygun besiyerinde gelişen *C. difficile* kolonileri 365 nm dalga boyunda UV-ışığında yeşilimsi sarı floresan özellik göstermektedirler (16,19).

## SONUÇ

*C. difficile*'ye bağlı ishal vakalarının, oldukça fazla sayıda karşımıza çıktığı günümüzde, *C. difficile*'in çiftlik hayvanlarının gastrointestinal sisteminden başka çeşitli kaynaklardan (örn.; toprak, sular ve çeşitli gıdalar) da tespit edildiği bilinmektedir.

*C. difficile*'in gıdalardan insanlara bulaşması ile ilgili kesin bir bilgi olmamakla birlikte *C. difficile* sporlarının hayvanın kas ve diğer dokularına kesim sonrasında fekal ve çevresel kontaminasyon sonucu

bulaşması, gıda üretim süreci boyunca da canlılığını koruması hayvansal gıdaların enfeksiyon kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. *C. difficile*'in çiğ sebze ve salatalardan, topraktan ve çevresel numunelerden de izole edilmesi, çevrede yaygın olarak bulunduğunu göstermekte ve enfeksiyonun yayılmasında gıdaların kaynak oluşturabileceği ihtimalini arttırmaktadır.

Sonuç olarak, *C. difficile*'in gıdalar vasıtasıyla bulaşma ihtimali etken ve toksinlerinin gıda ortamlarında varlıklarının belirlenmesi, gıdalardan izole edilen suşlarla, klinik suşların benzerliklerinin ortaya konulması ve bu konuda alınması gereken tedbirlerin araştırılmasına yönelik yapılacak bilimsel çalışmalar sonucunda daha iyi anlaşılacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Cartman ST., Heap JT., Kuehne SA., Cockayne A., Minton NP., 2010. The emergence of

- 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol, 300, 387-395.
2. Barbut F., Petit JC., 2001. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect, 7, 405-410.
  3. Weese JS., 2010. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? Clin Microbiol Infect, 16, 3-10.
  4. Kıyan M., 1999. Anaerop, sporlu, gram pozitif basiller. In "Temel ve Klinik Mikrobiyoloji", Ed., Ustaçelebi Ş., 1st ed., 645-649, Güneş Kitabevi, Ankara.
  5. Kelly CP., LaMont JT., 2008. *Clostridium difficile* - More difficult than ever. N Engl J Med, 359, 1932-1940.
  6. Karadağ FY., 2013. *Clostridium difficile*. Ekmud Bilimsel Platformu. 20-24 Mart 2013, Antalya, 32-33.
  7. Rainey FA., Hollen BJ., Small A., 2015. Clostridium, In "Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria", 1-43, Online, John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust.
  8. Vedantam G., Clark A., Chu M., McQuade R., Mallozzi M., Viswanathan VK., 2012. *Clostridium difficile* infection: Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes, 3, 121-134.
  9. Rupnik M., Dupuy B., Fairweather NF., Gerding DN., Johnson S., Just I., Lyerly DM., Popoff MR., Rood JL., Sonenshein AL., Thelestam M., Wren BW., Wilkins TD., Eichel-Streiber C., 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol, 54, 113-117.
  10. Lawley TD., Croucher NJ., Yu L., Clare S., Sebahia M., Goulding D., Pickard DJ., Parkhill J., Choudhary J., Dougan G., 2009. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. J Bacteriol, 191, 5377-5386.
  11. Cookson B., 2007. Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*. Postgrad Med J, 83, 291-295.
  12. Sinh P., Barrett TA., Yun L., 2011. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: a review. Gastroenterol Res Pract, 11.
  13. Kılıç A., 2013. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenezi, klinik özellikler, tanı ve tedavi. Mikrobiyol Bul, 47, 556-566.
  14. Pelaez T., Alcalá L., Alonso R., Rodríguez-Creixems M., García-Lechuz JM., Bouza E., 2002. Susceptibility to metronidazole and reassessment of *Clostridium difficile* vancomycin. Antimicrob Agents Ch, 46, 1647-1650.
  15. Dworzynski A., Sokol B., Meisel-Mikolajczyk F., 1991. Antibiotic resistance of *Clostridium difficile* isolates. Cytobios, 65, 149-153.
  16. Jöbstl M., Heuberger S., Indra A., Nepf R., Köfer J., Wagner M., 2010. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int J Food Microbiol, 138, 172-175.
  17. Metcalf DS., Costa MC., Dew WMV., Weese JS., 2010. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. Lett Appl Microbiol, 51, 600-602.
  18. Bakri MM., Brown DJ., Butcher JP., Sutherland AD., 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emerg Infect Dis, 15, 817-818.
  19. Simango C., Mwakurudza S., 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int J Food Microbiol, 124, 268-270.
  20. Planche T., Arnold A., 2009. *Clostridium difficile*. Medicine, 37, 641-643.
  21. Wilson BA., Salyers AA., Whitt DD., Winkler ME., 2011. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 3rd ed., 423-431, ASM Press, Washington.
  22. McFee RB., Abdelsayed GG., 2009. *Clostridium difficile*. Dis Mon, 55, 439-470.
  23. Rupnik M., 2010. *Clostridium difficile*: (Re)emergence of zoonotic potential. Clin Infect Dis, 51, 583-584.
  24. Leffler DA., Lamont JT., 2015. *Clostridium difficile* Infection. N Engl J Med, 372, 1539-1548.
  25. Leclair MA., Allard C., Lesur O., Pepin J., 2010. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. J Intensive Care Med, 25, 23-30.
  26. Gordon D., Young LR., Reddy S., Bergman C., Young JD., 2016. Incidence of *Clostridium difficile* infection in patients receiving high-risk antibiotics with or without a proton pump inhibitor. J Hosp Infect, 92, 173-177.
  27. Broda DM., DeLacy KM., Bell RG., Braggins TJ., Cook RL., 1996. Psychrotrophic *Clostridium spp.*

- associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int J of Food Microbiol*, 29, 335-352.
28. Eckert C., Burghoffer B., Barbut F., 2013. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *J Med Microbiol*, 62, 1435-1438.
  29. Rodriguez C., Korsak N., Taminiau B., Avesani V., Van Broeck J., Brach P., Delmee M., Daube G., 2015. *Clostridium difficile* from food and surface samples in a Belgian nursing home: An unlikely source of contamination. *Anaerobe*, 32, 87-89.
  30. Rahimi E., Afzali ZS., Baghbadorani ZT., 2015. *Clostridium difficile* in ready-to-eat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5, 128-131.
  31. Esfandiari Z., Weese S., Ezzatpanah H., Jalali M., Chamani M., 2014. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiology*, 14, 283.
  32. Metcalf D., Avery BP., Janecko N., Matic N., Reid-Smith R., Weese JS., 2011. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 85-86.
  33. Montazeri N., Liu D., Janes ME., 2015. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in Louisiana Oysters (*Crassostrea virginica*) and environmental waters. *Food Nutr Sci*, 6, 1065-1070.
  34. Rodriguez-Palacios A., Staempfli HR., Duffield T., Weese JS., 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis*, 13, 485-487.
  35. Weese JS., Reid-Smith RJ., Avery BP., Rousseau J., 2010. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken Lett. *Appl Microbiol*, 50, 362-365.
  36. Drigo I., Mazzolini E., Bacchin C., Tonon E., Puiatti C., Bano L., Spigaglia P., Barbanti F., Agnoletti F., 2015. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Vet Microbiol*, 181, 303-307.
  37. Boer E., Zwartkruis-Nahuis A., Heuvelink AE., Harmanus C., Kuijper EJ., 2011. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*, 144, 561-564.
  38. Güran HS., İlhak Ol., 2015. *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. *J Verbr Lebensm*, 10, 359-364.
  39. Rahimi E., Jalali M., Weese JS., 2014. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health*, 14, 119.
  40. Songer JG., Trinh HT., Killgore GE., Thompson AD., McDonald LC., Limbago BM., 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, 15, 819-821.
  41. Brazier JS., 1998. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother*, 41, 29-40.
  42. Selmer T., Andrei PI., 2001. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycy radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur J Biochem*, 268, 1363-1372.
  43. Yıldız F., Gücükoğlu A., 2012. *Clostridium difficile* ve gıda güvenliği açısından önemi. *Elektronik Mikrobiyoloji Derg*, 10, 22-29.
  44. Fedorko DP., Williams EC., 1997. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 35, 1258-1259.