



İstanbul'da Satışa Sunulan Tavuk Dönerlerinde *Clostridioides difficile* Varlığının ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Aslıhan BİLGİN^{1,a}, Esra AKKAYA^{2,b,✉}, Enver Barış BİNGÖL^{2,c}

¹T.C. Beyoğlu Belediye Başkanlığı, Veteriner İşleri Müdürlüğü, Sütlüce, Beyoğlu, İstanbul, TÜRKİYE

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-4110-6261; ^bORCID: 0000-0002-2665-4788; ^cORCID: 0000-0002-6452-4706

Geliş Tarihi/Received
31.05.2024

Kabul Tarihi/Accepted
27.09.2024

Yayın Tarihi/Published
17.12.2024

Öz

Clostridioides difficile, gram (+), anaerob, sporlu, çomak şeklinde bakteri olup özellikle uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucunda psödomembranoz kolit, toksik megakolon, intestinal perforasyon ve diareye sebep olmaktadır. Hastane kaynaklı olan etken toprakta, suda, su ürünlerinde, kasaplık hayvanlarda ve kanatlılarda tespit edilmiş olup, bu durum gıdaların *C. difficile* için potansiyel yeni rezervuarlar olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle son yıllarda insanlardan izole edilen *C. difficile* suşlarının kasaplık ve kanatlı hayvanlarda da saptanması bu etkenin halk sağlığı yönünden ciddi bir risk oluşturabileceği kaygısını doğurmuştur. Bu doğrultuda, İstanbul'da satışa sunulan 128 tavuk döner örneği *C. difficile* varlığı yönünden analiz edilmiş ve bunlardan 12'si *C. difficile* şüpheli olarak tespit edilmiştir. Şüpheli 12 örnekten sadece 2'si (%1.56) *C. difficile* olarak doğrulanırken, her iki izolatin da vankomisin ve sefotaksime dirençli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, tavuk döner örneklerinden izole edilen *C. difficile* suşları, etkenin kanatlı hayvan karkaslarının yanı sıra bunlardan elde edilen hayvansal kökenli gıdalarda da bulunabildiğini ve pişirme sıcaklıklarına da dirençli olabildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal duyarlılık, *Clostridioides difficile*, halk sağlığı, kanatlı eti, tavuk döner

Determination of the Presence of *Clostridioides difficile* and Antimicrobial Susceptibility Profiles of the isolates in Chicken Doner Kebabs Sold in Istanbul

Abstract

Clostridioides difficile is a gram (+), anaerobic, spore-forming, rod-shaped bacterium that causes pseudomembranous colitis, toxic megacolon, intestinal perforation and diarrhea, especially due to long-term usage of antibiotics. The hospital-acquired agent has been detected in soil, water, seafood, slaughtered animals and poultry, and these foods are thought to be potential new reservoirs for *C. difficile*. Especially in recent years, the detection of *C. difficile* strains isolated from humans in butchery and poultry animals has raised concerns that this agent may pose a serious risk to public health. Accordingly, 128 chicken doner kebab samples offered for sale in Istanbul were analyzed for the presence of *C. difficile* and 12 of them were identified as *C. difficile* suspects. Only 2 (1.56%) out of the 12 suspected colonies were confirmed as *C. difficile*, and both isolates were resistant to vancomycin and cefotaxime. In conclusion, *C. difficile* strains isolated from chicken doner samples showed that the agent can be found in poultry carcasses as well as in animal-originated foods obtained from these carcasses and can also be resistant to cooking temperatures.

Key Words: Antimicrobial susceptibility, chicken doner kebab, *Clostridioides difficile*, poultry, public health

GİRİŞ

Clostridioides (Clostridium) difficile, Gram (+), zorunlu anaerob özellikte, sporlu bir basil olup, insanların ve çeşitli hayvan türlerinin bağırsak kanalında kolonize olabilmektedir (1,2). Etkenin halk sağlığı açısından en önemli özellikleri çevresel faktörlere karşı dayanıklılık gösteren spor formlarının bulunması ve belli şartlar (yaşlılık, hastanede uzun süre antibiyotik kullanımı, mide asitliğini düşüren ilaçlar, kemoterapik ajanlar, sigara kullanımı) altında hastalık tablosunun şekillenmesine yol açan toksin üretimidir. Etkenin neden olduğu *Clostridioides difficile* enfeksiyonu (CDI), uzun süreli antibiyotik kullanımına bağlı olarak bağırsak mikrobiyotası tahrip olmuş

ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde şekillenmektedir. Bakteri kolonize olduğu bağırsaklarda çoğalarak, hafif ishal olgularından ciddi bağırsak enfeksiyonlarına kadar ilerleyebilen tablolara yol açmaktadır. Kritik durumlarda ölüm vakaları bile görülebilmektedir (3-5).

C. difficile enfeksiyonunun şiddeti, suşların virülansı ve antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Bakterinin virülansı sahip olduğu A (enterotoksin) ve B (sitotoksin) toksinlerinin varlığı ile ilgili olup, bu toksinler, patojenik lokusun genomik bölgesindeki *tcdA* ve *tcdB* genleri tarafından sentezlenmektedir. Bu toksinlere ek olarak, bazı suşlar patojenik lokusun dışında *cdtA* ve *cdtB* genleri

tarafından kodlanan ikili toksine sahiptir. Bazı *C. difficile* ribotipleri, onları hipervirüent yapan artmış toksin üretimi ve etkin sporülasyon özelliklerine sahiptir. Bu bağlamda, RT027 ve RT078 insanlarda patojen özellik gösteren hipervirüent ribotipler olarak nitelendirilmekte ve *C. difficile* enfeksiyonunun nedeni olarak bilinmektedir (6-10).

C. difficile hastane kaynaklı bir bakteri olmakla birlikte, toprak ve su gibi çevresel kaynaklarda, kasaplık hayvanlarda, kümes hayvanlarında, su ürünlerinde, hayvansal kökenli gıdalar başta olmak üzere sebze gibi birçok gıda matrisinde bulunabilmektedir (2,3,9,11-13).

Son yıllarda, kümes hayvanlarında *C. difficile*'nin tespit edilmesi ve tavuk karkaslarından izole edilen *C. difficile* ribotipleri ile insanlardaki hipervirüent ribotiplerin benzerliği, kanatlıların *C. difficile*'nin insanlara bulaşmasında potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olabileceğine dikkat çekmektedir (6,7,14-18).

Bu çalışmada, İstanbul'da satışa sunulan tavuk dönerlerinde *C. difficile* varlığının tespit edilmesi ve izolatların antimikrobiyal duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Tavuk Döner Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada 128 tavuk döner örneği İstanbul'da farklı semtlerde bulunan çeşitli büfe ve restoranlardan temin edilmiştir. Tüm örnekler ısı kaynaklarından yaklaşık 12±2 cm uzakta ve 3-5 dakika süreyle iyi pişirilmiş (yanmamış/aşırı ızgara edilmemiş) dönerlerden seçilmiştir. Toplanan döner örnekleri (yaklaşık 250 g) steril numune torbalarına yerleştirilerek soğuk zincir altında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarlarına ulaştırılmış ve 24 saat içerisinde analize alınmıştır.

C. difficile İzolasyonu

Her bir tavuk döner örneğinden 25 g alınarak, 225 ml *C. difficile* zenginleştirme broth'u (Cycloserine Cefoxitin Fructose Taurocholate Broth) ile karıştırılmış ve anaeroben kit (AN0025A, Oxoid) ile anaerobik indikatör (BR 0055B, Oxoid) içeren anaerobik jar (HP0011A, Oxoid) içerisinde 10 gün süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Alkol şoklama aşamasının ardından, sediment *C. difficile* Selektif Agar (CM0601+CDMN supplement SR 0173+%5 defibrine at kanı, Oxoid)'a yayılmış ve anaerobik koşullar altında 37°C'de 48-72 saat inkübasyona tabi tutulmuştur (19). Grimsi buzlu cam görünümüne ve at gübresi kokusuna sahip koloniler şüpheli koloni olarak değerlendirilmiş ve Gram boyama ile lateks aglütinasyon testleri yapılmıştır (DR1107A *C. difficile* test kiti, Oxoid). Moleküler doğrulama aşamasının öncesinde kolonilerin saflaştırılması amacıyla, %5 defibrine at kanı içeren Tryptic Soy Agara (CM0131, Oxoid) geçiş yapılarak, suşlar 37°C'de 48-72 saat süreyle anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

İzolatların Moleküler Doğrulaması ve Toksin Üreten Genlerin Tespiti

DNA ekstraksiyonu için, kanlı agarda saflaştırılan kolonilerden 1 öze dolusu örnek alınarak 1 ml steril tuz çözeltisi

(%0.85) içinde seyreltilmiş ve 10 dakika kaynatılmıştır. Ardından, ekstrakte edilen DNA doğrulama aşamasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

Şüpheli izolatların moleküler doğrulaması için *C. difficile*'ye özgü trioz fosfat izomeraz (*tpi*) geni araştırılmıştır. Bu amaçla, Lemee ve ark. (20) tarafından önerilen primer ve protokoller kullanılarak simplex PCR CG Palm-Cycler (CG 1-96 Genetix Biotech, Avustralya & Asya) ile analizler gerçekleştirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Kullanılan primer dizisi listesi

Gen	Primer	Amplikon büyüklüğü	Kaynak
<i>tpi</i>	F: 5'-AAAGAAGCTACTAAGGG-TACAAA-3' R: 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3'	230 bp	Lemee ve ark. (20)
<i>tcdA</i>	F: 5'-AGATTCCTATATTTACATGCAATAT-3' R: 5'-GTATCAGGCATAAAGTAA-TATACTTT-3'	369 bp	Lemee ve ark. (20)
<i>tcdB</i>	F: 5'-GGAAAAGA-GAATGGTTTTATTAA-3' R: 5'-ATCTTTAGTTATAACTTT-GACATCTTT-3'	160 bp	Lemee ve ark. (20)
<i>cdtA</i>	F: 5'-TGAACCTGGAAAAGGTGATG-3' R: 5'-AGGATTATTACTGGAC-CATTTG-3'	353 bp	Stubbs ve ark. (21)
<i>cdtB</i>	F: 5'-CTTATTGCAAGTAAACTGA-GAGTACTATATC-3' R: 5'-ACCGGATCTCTTGCTCAGTC-3'	490 bp	Stubbs ve ark. (21)

Doğrulamanın akabinde, *tpi* geni pozitif belirlenen örnekler toksin üreten *tcdA* ve *tcdB* genlerinin varlığı yönünden değerlendirilmiş ve ikili toksin genleri (*cdtA* ve *cdtB*) Stubbs ve ark. (21) tarafından açıklanan protokolle multipleks PCR kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforez işlemi için %1.5 agaroz jel kullanılmış ve jel incelemesi için Dolphin-Doc analiz sistemi (Wealtec, Sparks, NV, ABD) ile görüntüleme sağlayan bir UV transillüminatör kullanılmıştır.

ATCC 9689 ve BAA 1870 suşları sırasıyla *tpi*, *tcdA*, *tcdB* ve *tpi*, *cdtA*, *cdtB* genleri için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Merck, Darmstadt, Almanya).

Antibiyotik Duyarlılık Testi

C. difficile izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri, Minimum İnhibitor Konsantrasyon (MIC) testi ile belirlenmiş olup, bu kapsamda Ampisilin (AMP), Amoksisilin-klavulanik asit (AMC), Klindamisin (DA), İmipenem (IMP), Metronidazol (MTZ), Tetrasiklin (TE), Vankomisin (VA) ve Sefotaksim (CTX) antibiyotikleri değerlendirilmiştir.

Bu amaçla, koloniler %5 defibrine at kanı içeren triptik soya agara (CM0131, Oxoid) pasajlanmış ve anaerobik koşullar altında 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. PCR ile doğrulanan koloniler 5 µg/ml Hemin, 1 µg/ml vitamin K1 ve koyun kanı (%5) içeren Brucella agara (CM0169, Oxoid) yayılmış ve agar üzerine iki adet minimum inhibitör konsantrasyon değerlendirme şeriti yerleştirilerek, anaerobik koşullar altında 37°C'de 48-72 saat süre ile inkübasyonun ardından değerlendirilmiştir. Test edilen antibiyotiklerin kırılma noktaları değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) (22) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesinden (EUCAST) (23) referans alınmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Antibiyotik duyarlılık testi

Antibiyotik	MIC (µg/mL)			Referans Standart
	S	I	R	
Ampisilin (AMP)	≤ 0.5	1	≥ 2	*CLSI (22)
Amoksisilin-klavulanik asit (AMC)	≤ 4/2	8/4	≥ 16/8	*CLSI (22)
Sefotaksim (CTX)	≤ 16	32	≥ 64	*CLSI (22)
İmipenem (IPM)	≤ 4	8	≥ 16	*CLSI (22)
Tetrasiklin (TE)	≤ 4	8	≥ 16	*CLSI (22)
Klindamisin (DA)	≤ 2	4	≥ 8	*CLSI (22)
Metronidazol (MTZ)	≤ 8	16	≥ 32	*CLSI (22)
Vankomisin (VA)	≤ 2	-	> 2	**EUCAST (23)

S: duyarlı; I: orta duyarlı; R: dirençli

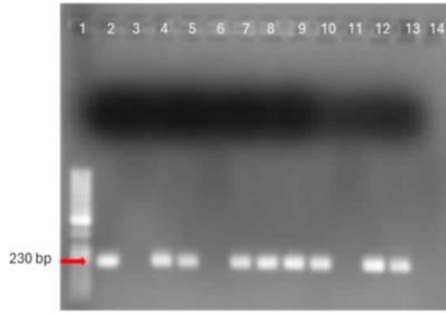
BULGULAR

İstanbul'da satışa sunulan tavuk dönerlerinde *C. difficile* varlığının araştırıldığı bu çalışmada, 128 tavuk döner örneği kültürel ekim yöntemleriyle analiz edilmiş ve bunlardan 12'si *C.*

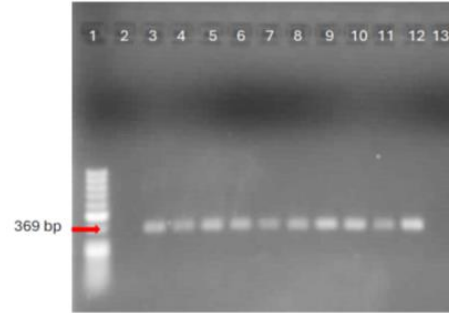
difficile şüpheli olarak tespit edilmiştir. Şüpheli 12 örneğin 2 (%1.56)'si etken yönünden pozitif bulunurken, her bir örneğe ait 1 izolat olmak üzere 2 izolat *C. difficile* olarak doğrulanmıştır. Ayrıca, bu iki izolat *tcdA* ve *tcdB* pozitif olarak belirlenirken, *cdtA* ve *cdtB* genleri negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 3; Şekil 1). İzolatlar antibiyotik duyarlılık profilleri bakımından değerlendirildiğinde, her iki izolatın da vankomisin ve sefotaksime dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 3. İzole edilen toksin genleri

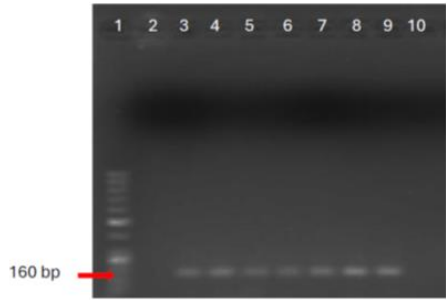
Örnek	Toksın genleri				Pozitif izolat sayısı (%)
	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	
Örnek no.1	+	+	-	-	2/128 (%1.56)
Örnek no.2	+	+	-	-	

***tpi* 230 bp PCR jel görüntüsü**

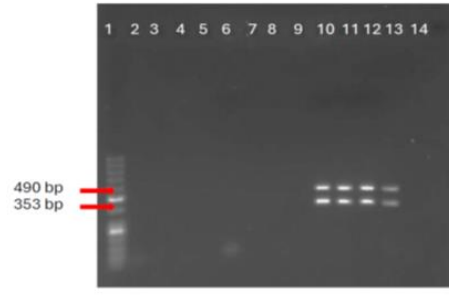
1. 50 bp DNA ladder; 2,4,5,7,8,9,10: pozitif örnekler; 3,6,11: negatif örnekler; 12: pozitif kontrol (ATCC 9689); 13: pozitif kontrol (BAA1870); 14: negatif kontrol

***tcdA* 369 bp PCR jel görüntüsü**

1. 50 bp DNA ladder; 3-11: pozitif örnekler; 2: negatif örnek; 12: pozitif kontrol (ATCC 9689); 13: negatif kontrol

***tcdB* 160 bp PCR jel görüntüsü**

1. 50 bp DNA ladder; 2: negatif örnek; 3-8: pozitif örnekler; 9: pozitif kontrol (ATCC 9689); 10: negatif kontrol

***cdtA* 353 bp *cdtB* 490 bp multiplex PCR jel görüntüsü**

1. 50 bp DNA ladder; 2-9: negatif örnekler; 10-13: pozitif kontrol (BAA1870); 14: negatif kontrol

Şekil 1. *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* ve *cdtB* genlerine ait agar jel elektroforez görüntüleri**Tablo 4.** İzolatların duyarlılık profili

Örnek	Duyarlılık profili (µg/mL)							
	AMP	AMC	DA	IMP	MTZ	TE	VA	CTX
	≤ 0.5	≤ 4/2	≤ 2	≤ 4	≤ 8	≤ 4	≤ 2	≤ 14
	1	8/4	4	8	16	8	≤ 2	32
	≥ 2	≥ 16/8	≥ 8	≥ 16	≥ 32	≥ 16	> 2	≥ 64
Örnek no.1	0.5	0.5	0.25	0.03	0.03	0.015	2	256
Örnek no.2	0.12	0.12	0.12	0.06	0.06	0.015	2	256
S/R	S	S	S	S	S	S	R	R

S: duyarlı; I: orta duyarlı; R: dirençli; AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-clavulanic acid; DA: Clindamycin; IMP: imipenem; MTZ: Metronidazole; TE: Tetracycline; VA: Vancomycin; CTX: Cefotaxime

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmanın sonuçları, kanatlı hayvan karkaslarından izole edilen *C. difficile* suşlarının, bunlardan elde edilen hayvansal kökenli gıdalarda da primer ya da sekonder kontaminasyona bağlı olarak bulunabildiği ve etkenin pişirme sıcaklıklarına da dirençli olabildiğini göstermektedir.

Etkenin kanatlı hayvanlardan ve ürünlerinden tespit edildiğini doğrulayan farklı ülkelerde son on beş yıl içinde gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmaktadır. De Boer ve ark. (3) tarafından yapılan bir çalışmada, 257 tavuk karkas örneğinin 7'sinde (%2.7) *C. difficile* izole edilmiştir. Kanada'da yapılan bir başka çalışmada, Weese ve ark. (7) tavuk karkaslarının (but, kanat ve bacak) %12.8'inde (26/203) etkeni tespit etmişlerdir. Guran ve İlhak (15), Türkiye'nin doğu bölgelerinden topladıkları 310 tavuk örneğinin 25'inde (%8.1) bakteriyi saptamışlardır. Indra ve ark. (24) Avusturya'da yaptıkları çalışmada 59 broyler tavuk örneğinden 3'ünde (%5.1) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Bingol ve ark. (18), Marmara Bölgesindeki 9 farklı şehirde hizmet veren farklı satış noktalarından temin ettikleri 185 tavuk karkas örneğinin 69'undan (%37.3) etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Avrupa'da yapılan araştırmalar, tavuk etinde *C. difficile* varlığının %2.7 ile %37.3 arasında değişen oranlarda görüldüğünü ortaya koymaktadır. Almanya (25), Hollanda (3), Slovenya (26) ve Türkiye'de (18) yapılan araştırmalarda tespit edilen RT 001, 014, 027 ve 078 ribotipleri, insanlarda *C. difficile* enfeksiyonu ile ilişkilendirilen ribotiplerdir.

C. difficile, Amerika ve Kanada'da ısı işlemi görmemiş hindi kıyması ile tavuk but, kanat ve bacak dahil olmak üzere çeşitli kanatlı eti ve ürünlerinden izole edilmiştir. Bu ürünlerdeki *C. difficile* prevalansı %7.3 ile %44.4 arasında değişmektedir. Aynı zamanda, kanatlı etleri ve ürünlerinden izole edilen bazı *C. difficile* suşlarının toksijenik olduğu ve bu suşların *C. difficile* enfeksiyonuna neden olan toksinlerin üretiminden sorumlu genleri taşıdığı bildirilmiştir (7,27,28).

Asya kıtasında yürütülen çalışmalarda ise kanatlı etindeki *C. difficile* prevalansı %1 ile %24.4 arasında saptanmıştır. Özellikle İran'da yapılan çalışmalarda tavuk, hindi, bıldırcın, ördek ve keklik gibi kanatlı etlerinde %1 ile %15.8 arasında değişen oranlarda *C. difficile* varlığı ortaya konmuştur (29).

Bu çalışmaların aksine, Amerika Birleşik Devletleri (30, 31) ve bazı Avrupa ülkelerinde yürütülen araştırmalarda (17,24,32) *C. difficile*'nin kanatlı etlerinde tespit edilemediği rapor edilmiştir. Limbago ve ark. (33), 614 adet hindi kıyma ve 259 tavuk göğüs örneğinde bakteriyi izole etmezken, benzer şekilde Mooyottu ve ark. (31) 100 tavuk kanadı örneğinde herhangi bir *C. difficile* suşu tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Ersöz ve Coşansu (17) tarafından Türkiye'de gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, 27 tavuk göğüs örneğinde etken saptanmamıştır. Benzer olarak, Rahimi ve Khaksar (34) tarafından Asya kıtasında gerçekleştirilen bir çalışmada ısı işlemi görmüş tavuk nuggetlarında da bakteri izole edilememiştir. Bunlara ek olarak, Abdel-Gil ve ark. (16) Mısır'da topladıkları 150 kanatlı eti örneğinde etkeni tespit etmediklerini bildirmişlerdir.

Bakterinin tavuk karkaslarının yanı sıra tavuk dışkılarındaki varlığı da bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (6,14,35). *C. difficile* ve sporlarının toprak ve su gibi çevresel

kaynaklardaki kalıcılığı, yetiştirme alanlarında etkin bir hijyen uygulamasının olmaması, hijyenik olmayan kesimhane koşulları (yetersiz temizlik, alt yapısal eksiklikler vb.), tüy yolma, iç organ çıkarma gibi kritik aşamalarda karkasın kontaminasyonu, uygun olmayan soğutma işlemleri ve depolama koşulları, personel ve ekipman hijyeninde yetersizlik, hayvan kalıntılarının ve yabancı maddelerin dikkatsizce ve uygunsuz bir şekilde bertaraf edilmesi gibi yanlış üretim uygulamaları kanatlı karkaslarında *C. difficile* varlığını belirleyen önemli faktörlerdir (4,10,18,28).

Bazı çalışmalarda, kanatlı karkaslarından izole edilen *C. difficile* suşları farklı prevalanslarla rapor edilmiştir. Etkenin prevalansı, mevsimler ve coğrafi konum gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Guran ve İlhak (15) ile Rodriguez-Palacios ve ark. (11), *C. difficile* prevalansının genellikle kış aylarında diğer mevsimlere göre daha yüksek olduğunu bildirirken; Lund ve Peck (36) *C. difficile* izolasyon oranlarının Avrupa'da nispeten düşük (%4.3), Kuzey Amerika'da ise çok daha yüksek (%44) olduğunu vurgulamıştır. Bu farklılığın nedenleri olarak öne sürülen görüş, araştırmacıların yararlandığı zenginleştirme, izolasyon ve tanımlama yöntemlerinin birbirlerinden farklılık göstermesidir. Bu durumu destekler nitelikte Blanco ve ark. (37) *C. difficile*'yi izole etmek için kullanılan prosedürün bu organizmanın prevalans verileri üzerinde önemli bir etkisi olabileceğini belirtmiştir. Bunların yanı sıra, hayvanların yaşı, ırkı gibi özelliklerinin de etkenin bulunma oranı üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur (10,17,28). Knight ve ark. (38), *C. difficile* prevalansının tüketim amacıyla yetiştirilen hayvanların yaşının artmasıyla birlikte azaldığını, dolayısıyla yaşlı hayvanlardan elde edilen etlerin çok daha az risk oluşturduğunu ifade etmiştir. Zidaric ve ark. (14) tavuklarda *C. difficile* kolonizasyonunun ağırlıklı olarak yumurtadan çıktıktan sonraki ilk iki hafta içinde oluştuğunu ve daha sonra yaşla birlikte azaldığını vurgulamıştır.

C. difficile'nin gıdalardaki varlığının insanlarda CDI'na neden olduğuna dair veri yetersizliği, etkenin gıda kaynaklı bir patojen olarak kabul edilememesine neden olmaktadır. Etkenin en belirgin özelliği, ısı ve kimyasallar da dahil olmak üzere birçok fiziksel koşula karşı direnç göstermesini sağlayan spor formudur. Sporların midenin asidik ortamına ve pişirme işlemleri sırasında karşılaşılan yüksek sıcaklıklara dayanma kapasitesi göz önüne alındığında, bu bakterinin pişirildikten sonra bile gıdalarda kalabileceği düşüncesi oluşmaktadır (13,39). Ayrıca, bu dayanıklı spor formu gıdaların hazırlık aşamasında kullanılan alet-ekipman ve yüzeylerin dezenfeksiyonunda da engel teşkil etmektedir (40).

Rodriguez-Palacios ve ark. (39), *C. difficile*'nin vejetatif formlarının Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından sığır etleri için önerilen pişirme sıcaklığı olan 71°C'ye 2 saat boyunca dayanabildiği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, gıdanın 85°C'de yeniden ısıtılmasının, 10 dakikalık bir süre içinde *C. difficile* sporlarının %90'ının yıkımına yol açtığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, *C. difficile* sporlarının 60°C ile 75°C arasında sıcaklıklara uzun süre dayanabildiği ve spor sayısında önemli azalmanın yalnızca 85°C'yi aşan sıcaklıklarda meydana geldiği gözlemlenmiştir (41). Etkenin 30 saniye süreyle 100°C'de ısıtma işlemine tabi tutulması, *C. difficile* sayısında 3.75 log düzeyinde azalma

meydana getirirken, aynı sürede uygulanan 105°C'lik bir sıcaklık ise 4.29 log düzeyinde azalma sağlamıştır (42). Bunların yanı sıra, bazı *C. difficile* sporlarının yüksek sıcaklıklara maruz kaldıktan sonra bile rejenerasyon yeteneği gösterebildiği ifade edilmiştir (43). Sporların genellikle pişirme için önerilen sıcaklıklarda hayatta kalması, hastalığın bulaşmasında gıdaların potansiyel rolüne işaret etmektedir (43,44).

Vankomisin, amoksisilin-klavulanikasit, metronidazol gibi bazı antibiyotiklerin tüketim amacıyla yetiştirilen hayvanların çeşitli enfeksiyonlarında ve insanlarda CDI'nin tedavisinde kullanılması, *C. difficile*'de antibiyotik direncinin gelişmesine ilişkin endişeleri destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra, konak duyarlılığı, antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı, kasaplık ve kanatlı hayvanlarda koruyucu ve üretici olarak çeşitli antibiyotiklerin sık kullanımı, tüm dünyada antibiyotik ilişkili ishal ve psödo-membranöz kolit vakalarının %15-30'undan sorumlu olan *C. difficile*'nin önemini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, çeşitli gıdalardan izole edilen *C. difficile* suşlarının çoğunun imipenem ve sefotaksime dirençli olduğu ancak amoksisilin, ampicilin, tetrasiklin, metronidazol ve vankomisine duyarlı olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (2,5,9,45,46).

Bu çalışmada, tavuk döner örneklerinden izole edilen *C. difficile* suşları vankomisin ve sefotaksime dirençli bulunurken, ampicilin, amoksisilin-klavulanik asit, klindamisin, imipenem, metronidazol ve tetrasikline karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Simango ve Mwakurudza (6) tavuk örneklerinden izole edilen tüm *C. difficile* suşlarının sefotaksime dirençli olduğunu bildirmesine rağmen vankomisin, metronidazol ve tetrasikline duyarlı olduğunu ifade etmiştir. Bingol ve ark. (18), kanatlı karkaslarından izole edilen suşların amoksisilin, tetrasiklin, vankomisin ve metronidazole sırasıyla %100, %95.7, %97.1 ve %88.4 oranlarında duyarlı olduğunu; sefotaksim ve imipeneme ise sırasıyla %97.1 ve %89.9 oranlarında dirençlilik gösterdiğini vurgulamışlardır.

Sonuç olarak, kanatlı hayvan karkaslarından izole edilen *C. difficile* suşlarının, bunlardan elde edilen hayvansal kökenli gıdalarda da bulunabildiği ve etkenin pişirme sıcaklıklarına da dirençli olabildiği görülmektedir. Sporların genellikle pişirme için önerilen sıcaklıklarda hayatta kalması, hastalığın bulaşmasında gıdaların potansiyel rolüne işaret etmektedir. Kanatlı eti ve ürünlerinin *C. difficile* için potansiyel bir rezervuar olabileceği ve halk sağlığı yönünden risk oluşturabileceği hususu dikkate alınmalı ve kanatlı etlerine bağlı *C. difficile* vakalarının önlenmesi için etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanması sağlanmalıdır. Bu bağlamda, mevcut pişirme önerileri *C. difficile*'yi de kapsayacak şekilde gözden geçirilmeli ve gıda ürünlerindeki spor kontaminasyonunu azaltmayı amaçlayan daha etkili müdahale önlemleri benimsenmelidir. Bununla birlikte, etkenin kanatlı ürünleri dahil tüm gıda matrislerindeki olası varlığı rutin tetkiklerle denetlenmeli ve çevresel bulaşmanın önüne geçilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Pelaez T, Alcalá L, Blanco JL. et al. (2013). Characterization of Swine Isolates of *Clostridium difficile* in Spain: A Potential Source of Epidemic Multidrug Resistant Strains? *Anaerobe*. 22: 45-49.

2. Troiano T, Harmanus C, Sanders IMJG. et al. (2015). Toxigenic *Clostridium difficile* PCR Ribotypes in Edible Marine Bivalve Molluscs in Italy. *Int J Food Microbiol*. 208: 30-34.
3. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Hurmanus C, Kuisjper EJ. (2011). Prevalence of *Clostridium difficile* in Retail Meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*. 144: 561-564.
4. Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Avesani V, Delmée M, Daube G. (2012). *Clostridium difficile* in Young Farm Animals and Slaughter Animals in Belgium. *Anaerobe*. 18: 621-625.
5. Thitaram SN, Frank JF, Siragusa GR. et al. (2016). Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium difficile* Isolated from Food Animals on Farms. *Int J Food Microbiol*. 227: 1-5.
6. 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.
7. 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.
8. Romano V, Albanese F, Dumontet S, Krovacek K, Petrini O, Pasquale V. (2012). Prevalence and Genotypic Characterization of *Clostridium difficile* from Ruminants in Switzerland. *Zoonoses Public Health*. 59: 545-548.
9. 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.
10. Hampikyan H, Bingol EB, Muratoglu K., Akkaya E, Cetin O, Colak H. (2018). The Prevalence of *Clostridium difficile* in Cattle and Sheep Carcasses and the Antibiotic Susceptibility of Isolates. *Meat Sci*. 139: 120-124.
11. Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR. et al. (2009). Possible Seasonality of *Clostridium difficile* in Retail Meat, Canada. *Emerg Infect Dis*. 15: 802-805.
12. Metcalf DS, Costa MC, Dew WMV, Weese J.S. (2010). *Clostridium difficile* in Vegetables. *Canada Lett Appl Microbiol*. 51: 600-602.
13. Rodriguez C, Avesani V, Van Broeck J, Taminiau B, Delmée M, Daube G. (2013). Presence of *Clostridium difficile* in Pigs and Cattle Intestinal Contents and Carcass Contamination at the Slaughterhouse in Belgium. *Int J Food Microbiol*. 166: 256-262.
14. 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.
15. Guran HS, Ilhak OI. (2015). *Clostridium difficile* in Retail Chicken Meat Parts and Liver in the Eastern Region of Turkey. *J Verbr Lebensm*. 10: 359-364.
16. Abdel-Gliil MY, Thomas P, Schmoock G. et al. (2018). Presence of *Clostridium difficile* in Poultry and Poultry meat in Egypt. *Anaerobe*. 51: 21-25.
17. Ersöz ŞŞ, Coşansu S. (2018). Prevalence of *Clostridium difficile* Isolated from Beef and Chicken meat products in Turkey. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 38: 759-767.
18. Bingol EB, Hampikyan H, Muratoglu K, Akkaya E, Cetin O, Colak H. (2020). Characterisation and Antibiotic Susceptibility Profile of *Clostridioides (Clostridium) difficile* Isolated from Chicken Carcasses. *J Vet Res*. 64: 407-412.
19. Muratoglu K, Akkaya E, Hampikyan H, Bingol EB, Cetin O, Colak H. (2020). Detection, Characterization and Antibiotic Susceptibility of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Meat Products. *Food Sci Anim Resour*. 40(4): 578-587.
20. Lemee L, Dhaliun A, Testelin S. et al. (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.
21. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M. (2000). Production of Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase (Binary Toxin) by Strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett. 186: 307-312.
 22. CLSI. (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
 23. EUCAST. (2023). European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoint table v. 2.0. 62.
 24. Indra A, Lassnig H, Baliko N. et al. (2009). *C. difficile*: A New Zoonotic Agent? Wien Klin Wochenschr. 121: 91-95.
 25. Heise J, Witt P, Maneck C, Wichmann-Schauer H, Maurischat S. (2021). Prevalence and Phylogenetic Relationship of *Clostridioides difficile* Strains in Fresh Poultry Meat Samples Processed in Different Cutting Plants. Int J Food Microbiol. 339.
 26. Tkalec V, Jamnikar-Ciglenecki U, Rupnik M, Vadnjal S, Zelenik K, Biasizzo M. (2020). *Clostridioides difficile* in National Food Surveillance, Slovenia, 2015 to 2017. Eurosurveill. 25.
 27. 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.
 28. Varshney JB, Very KJ, Williams JL. et al. (2014). Characterization of *Clostridium difficile* Isolates from Human Fecal Samples and Retail Meat from Pennsylvania. Foodborne Pathog Dis. 11: 822-829.
 29. Barezi AA, Shakerian A, Rahimi E, Esfandiari Z. (2023). Examining the Extent of Contamination, Antibiotic Resistance, and Genetic Diversity of *Clostridioides (Clostridium) difficile* Strains in Meat and Feces of Some Native Birds of Iran. Biomed Res Int. 3524091.
 30. Limbago B, Thompson AD, Greene SA. et al. (2012). Development of a Consensus Method for Culture of *Clostridium difficile* from Meat and its Use in a Survey of U.S. Retail Meats. Food Microbiol. 32: 448-451.
 31. Mooyottu S, Flock G, Kollanoor-Johny A, Upadhyaya I, Jayarao B, Venkitanarayanan K. (2015). Characterization of a Multidrug Resistant *C. difficile* Meat Isolate. Int J Food Microbiol. 192: 111-116.
 32. Von Abercron SMM, Karlsson F, Wigh GT, Wierup M, Krovacek K. (2009). Low Occurrence of *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat in Sweden. J Food Prot. 72: 1732-1734.
 33. Limbago B, Thompson AD, Greene SA. et al. (2012). Development of a Consensus Method for Culture of *Clostridium difficile* from Meat and its Use in a Survey of U.S. Retail Meats. Food Microbiol. 32: 448-451.
 34. Rahimi E, Khaksar F. (2015). Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains Isolated from Meat and Meat Products in Iran. Bulg J Vet Med. 18: 277-281.
 35. Simango C. (2006). Prevalence of *Clostridium difficile* in the Environment in a Rural Community in Zimbabwe. Trans R Soc Trop Med Hyg. 100: 1146-1150.
 36. Lund BM, Peck MW. (2015). A Possible Route for Foodborne Transmission of *Clostridium difficile*? Foodborne Pathog Dis. 12: 177-182.
 37. Blanco JL, Álvarez-Pérez S, García ME. (2013). Is the Prevalence of *Clostridium difficile* in Animals Underestimated? Vet J. 197: 694-698.
 38. Knight DR, Thean S, Putsathit 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. Appl Environ Microbiol. 79, 2630-2635.
 39. Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Weese JS. (2010). *Clostridium difficile* Survives Minimal Temperature Recommended for Cooking Ground Meats. Anaerobe. 16: 540-542.
 40. Kouassi KA, Dadie AT, N'Guessan KF, Dje KM, Loukou YG. (2014). *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in Cooked Beef Sold in Côte d'Ivoire and Their Antimicrobial Susceptibility. Anaerobe. 28: 90-94.
 41. Lawley TD, Croucher NJ, Yu L. et al. (2009). Proteomic and Genomic Characterization of Highly Infectious *Clostridium difficile* Spores. J Bacteriol. 191: 5377-5386.
 42. Saad J, Lendormi T, Le Marechal C, Pourcher A-M, Druilhe C, Lanoiselle J-L. (2023). Kinetic Study of Thermal Inactivation of Enterococci and Clostridial Spores. MATEC Web of Conferences. 379: 05004.
 43. Rodriguez-Palacios A, LeJeune JT. (2011). Moist-heat Resistance, Spore Aging, and Superdormancy in *Clostridium difficile*. Appl Environ Microbiol. 77: 3085-3091.
 44. Deng K, Plaza-Garrido A, Torres JA, Paredes-Sabja D. (2015). Survival of *Clostridium difficile* Spores at Low Temperatures. Food Microbiol. 46: 218-221.
 45. Bakri M. (2018). Prevalence of *Clostridium difficile* in Raw Cow, Sheep, and Goat Meat in Jazan, Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci. 25: 783-785.
 46. Harvey RB, Norman KN, Andrews K. et al. (2011). *Clostridium difficile* in Retail Meat and Processing Plants in Texas. J Vet Diagn Invest. 23: 807-811.

✉ Sorumlu Yazar:

Esra AKKAYA

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

E-posta: esra.akkaya@iuc.edu.tr