

Neonatal Dönem Buzağı İshallerinde *Clostridium difficile*

Ediz Kağan ÖZGEN¹

Murat YILDIRIM²

¹ Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü, Erzurum

² Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale
edizkagan.ozgen@tarim.gov.tr

Öz

Clostridium difficile, insanlarda antibiyotik ilişkili diyare vakalarının etiyolojik ajanı olmasının yanında çiftlik hayvanlarında özellikle neonatal dönemde ishallere sebep olmaktadır. Bakterinin birçok antimikrobiyal etken maddesine dirençli olması sebebiyle hastalık vakalarının tedavisi sınırlı kalabilmektedir. Etken toksin A, toksin B ve binary toksin olmak üzere üç toksin üretebilmekte ve klinik semptomlar bu toksinlerin bağırsaklarda meydana getirdiği hasar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu derleme ile *C. difficile*'nin epidemiyolojisi, patogenezi, teşhisi, tedavisi ve buzağı ishallerinde rolü hakkında bilgi verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, neonatal buzağı, ishal.

Clostridium difficile in Neonatal Calf Diarrhea

Abstract

Clostridium difficile is an etiological agent of antibiotic-associated diarrhea in humans, as well as diarrhea in farm animals, especially in the neonatal period. Because bacteria is resistant to many antimicrobial agents, the treatment of disease cases can be limited. The active toxin can produce three toxins, toxin A, toxin B and binary toxin, and clinical symptoms arise as a result of damage caused by these toxins in the intestines. This review provides information on the role of *C. difficile* in epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and calf diarrhea.

Keywords: *Clostridium difficile*, neonatal calf, diarrhea.

1. Giriş

Clostridium difficile (*Bacillus difficile*) ilk olarak Hall ve O'Toole tarafından 1935 yılında bebek gaita örneklerinden izole edilmiştir (Mullany ve Roberts, 2010). Hayvanlarda ise ilk olarak McBee tarafından 1960 yılında Weddell fokunun bağırsak florasında tespit edilmiştir (McBee, 1960). *Clostridium difficile* (*C. difficile*) adı, bakterinin izolasyonunun, identifikasyon ve laboratuvar çalışmalarının zor olması sebebiyle İngilizce'de 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 insanlarda şiddetli nekrotize ve genellikle ölümle sonuçlanan kolon enfeksiyonu olan antibiyotik ilişkili diyare ve psödomembranöz kolitise neden olduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda *C. difficile* ilişkili hastalık (*Clostridium difficile* Associated Disease, CDAD) insan vakaları dünya genelinde artan bir eğilim gösterdiği birçok ülkede tarafından rapor edilmektedir (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).

2. Etiyoloji, Virülens Faktörleri ve Patogenez

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). Bakteri sporları oval, subterminal (nadiren terminal) ve hücreden şişkindir. Glisin ve taurokolat bakterinin sporulasyonunu uyaran kimyasal maddelerdir (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 duyarlıdır ve oda ısısında kuru yüzeylerde 15 dakika, nemli yüzeylerde ise 6 saat canlı kalabilir, spor formu ise kurumaya, ısıya, birçok dezenfektana ve fiziksel etkilere karşı dayanıklıdır (Wilcox, 2003; Dawson ve ark., 2009; Weber ve ark., 2010).

C. difficile, enfeksiyonlarının patogenezinde rol alan ve büyük clostridial sitotoksin 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).

Bakterinin temel virülans faktörleri olan üç toksinin (toksin A, toksin B, binary toksin) yanında flagellar protein, yüzey proteinleri, yüzey adezini yer almaktadır ve bu faktörler bakterinin kolonizasyonunu sağlamaktadır (Giannasca ve Warny, 2004; Jones ve ark., 2013).

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 genetik 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 *tcdA* gen bölgesi, toksin B kodlayan bölge *tcdB*, her iki toksinin sentezi üzerine negatif regülatör görevi gören bölge *tcdC*, pozitif regülatör bölge *tcdR*, holin-like protein sentezinde görevli *tcdE* bölgesidir. Hipervirüent suşlarda negatif regülatör olan *tcdC* gen bölgesinde silinmeler olmaktadır (Belyi ve Aktories, 2010).

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).

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 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, aktin hücre iskeletinin depolimerizasyonunu, bakterinin adezyonu ve kolonizasyonunda rol oynamaktadır (Jones ve ark., 2013; Davies ve ark., 2016). Binary toksin hedef hücreye lipoliz-uyarımlı bir membran reseptörü aracılığı ile girdiği belirlenmiştir (Jones ve ark., 2013).

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).

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).

Kolonizasyon sonrasında primer virülans faktörleri olan toksin A ve toksin B sentezlenir (Swick ve ark., 2016; Genth ve ark., 2008). Toksin A ve toksin B konak epitel hücrelerine bağlanması reseptör-temelli endositoz ile gerçekleşir (Genth ve ark., 2008). Her iki toksin de glukoziltransferaz toksin olarak sınıflandırılır ve toksinin 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, konak reseptörüne bağlanması 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 endozom içerisindeki asitliğin arttırılmasıyla meydana gelir ve membran üzerinde por oluşumunu sağlar (Genth ve ark., 2008; 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 stoplazmada serbest kalmasını sağlar (Jank ve Aktories, 2008).

Clostridial glukozilasyon toksinleri Rho proteinlerinin yapısını değiştirmektedir. Bu proteinler guanin trifosfaz (GTPaz)'ların küçük moleküler kitleleridir. Rho GTPaz guanin difosfat (GDP)-bağlı formda inaktif haldedir. Guanin nükleotid dönüştürme faktörü (GEF), Rho GTPaz'ları aktive eder. GEF aracılığı ile Rho GDP, Rho guanin trifosfat (GTP)'a dönüştürülür. Rho GTP proteinleri hücre içerisinde hücre iskelet fonksiyonlarında, immun hücre sinyallerinde, adezyonda, fagositozda, süperoksit üretiminde, sitokin salınımı ve görev alır. Toksinin glukozilasyon kısmı Rho GTPaz'ın aktive olmasını engeller ve bu proteinlerin yapısında değişmeye neden olur (Jank ve Aktories, 2008).

Toksikasyon sonucunda konak hücre Rho proteinlerinin glikozilasyonu ile konak hücre iskeletinin bozulması sonucu epitel hücrelerinin ölür ve güçlü bir yangı meydana gelir (Swick ve ark., 2016; Jones ve ark., 2013). Bu durumların sonucunda klinik semptomları şekillendiren bağırsak doku hasarı ve akut yangı gelişir (Swick ve ark., 2016). Enfeksiyon mukoza bariyer fonksiyonunun kaybı ve kolon yangısı ile karakterizedir (Genth ve ark., 2008).

3. Epidemiyoloji

C. difficile, deniz çökeltileri, toprak, su, insan ve hayvanların intestinal sistemi ve gaitaları, kırmızı ve beyaz etlerde, sebzelerde, insan ve hayvanların piyojen enfeksiyon örnekleri, hastane yüzeyleri gibi farklı ortamlarda tespit edilmektedir (Rainey ve ark., 2015; Hopman ve ark., 2011; Skraban ve ark., 2013; Metcalf ve ark., 2011). *C. difficile* deniz gıdaları ve balıklardan %4.8, toprak örneklerinde %22, kıyma örneklerinde %3 oranında tespit edilmiştir (Jobstl ve ark., 2010; Metcalf ve ark., 2011).

Hastalığın gelişimi ve sürecini kolaylaştıran risk faktörü antibiyotik kullanımıdır ve antibiyotik nedeniyle bağırsak florasındaki faydalı mikroorganizmalar zarar görürken toksin üreten *C. difficile* bağırsaklarda kolonize olur (Wilcox, 2003; Clements ve ark., 2010). Hastalığın gelişiminde yüksek riskli antibiyotikler; sefoaksim, seftazidim, co-amoksiklav, sefalosporinler, klindamisindir, orta riskli antibiyotikler; ampicilin/amoksisilin, co-trimoxazole, makrolidler, tetrasiklinlerdir, penisilinler, düşük riskli antibiyotikler; aminoglikozidler, metronidazol, florokinolonlar, rifampisin, vankomisindir (Wilcox, 2003; Bignardi, 1998).

C. difficile'nin buzağı ishallerinin etiolojisinde rolünün belirlenebilmesi amacıyla yapılan birçok araştırma mevcuttur. Hammitt ve ark. (2008), 253 adet ishalleri buzağıdan alınan rektal svap örneklerinin %25.3 (64/253)'ünden *C. difficile* tespit etmiş olup bu izolatların %10.2 (26/253)'ünün toksijenik karakterde olduğunu tespit etmişlerdir. Rodriguez-Palacios ve ark. (2006), *C. difficile*'nin neonatal buzağı ishallerindeki rolünü yapmak amacıyla Kanada'da 144'ü ishali olan, 134'ü ise sağlıklı olmak üzere toplam 278 buzağıdan aldıkları gaita örneklerini incelemişlerdir. Çalışmada toplam 278 gaita örneğinin %11.2'sinden etken izole edilirken, sağlıklı buzağılardaki izolasyon oranının (%14.9), ishallerdeki izolasyon oranına (%7.6) göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Toksin A ve toksin B'nin gaita örneklerindeki varlığının ELISA ile analizinde ise ishallerdeki buzağıların %39.6'sının gaitalarında toksin tespit edilirken, sağlıklı buzağıların %20.9'undan toksin tespit edilmiştir. Hindistan'da 5-30 günlük 12 adet ishalleri buzağı gaita örneklerinin %16.6'sında *C. difficile* tespit etmişlerdir (Hussain ve ark., 2016).

İtalya'da *C. difficile* ribotiplerinin prevalansını ve risk faktörlerini belirlemek amacıyla sığır işletmeleri ve kesimhanelerde 0-16 gün, 90-120 gün ve 150 günden büyük olmak üzere üç yaş grubundan alınan gaita örnekleri alınarak incelenmiştir. Çalışmada 0-16 günlük yaş grubundaki toplam 420 hayvanın %20.2'sinde (85/420) etken izolasyonu yapılmıştır. Bu gruptaki etken izolasyonu yapılan 85 adet buzağının %51.8'inin sağlıklı, %48.2'sinin ise ishalleri olduğunu bildirmektedir (Magistralli ve ark., 2015).

Almanya'da 603 adet sığır işletmesindeki 999 adet ishalleri buzağıdan alınan 509 adet gaita ve 490 adet rektal svap örneğini *C. difficile* yönünden incelemişlerdir. Çalışmada alınan örneklerin %17.6'sında etken tespit edilmiştir. Araştırmada yaş dağılımına göre izolasyon karşılaştırıldığında 1 haftalık yaştaki buzağılarda %19.9, 2 haftalık yaştaki buzağılarda %18.4, 3 haftalık buzağılarda %15.2, 4 haftalık buzağılarda %4.5 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Schneeberg ve ark., 2013).

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 insidansının %3'ten %13'e yükseldiği 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). Costa ve ark. (2011), buzağılardan izole edilen suşların %67.0'ının PCR ribotip 078 olduğunu bildirmektedirler. Bandelj ve ark. (2016), buzağı örneklerinde 19 farklı ribotip tespit ederken, 033 ribotipinin baskın ribotip olarak tespit etmiştir. Schneeberg ve ark. (2013), 17 farklı PCR ribotipin

buzağı örneklerinde tespit etmiş olup bu ribotipler içerisinde baskın olan ilk iki ribotipin %56.9 oranında 033 ribotipi ile %16.6 oranında 078 ribotipi olarak bildirmiştir (Schneeberg ve ark. 2013).

4. Buzağılarda Semptomlar

C. 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).

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 epidemiyolojik çalışmasında ishalleri buzağuların gaitalarında sağlıklı buzağuların 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).

5. 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).

5.1. 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 1979 yılında geliştirilen selektif besiyeri cycloserine-cefoxitin fuctose agar (CCF) halen günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (George ve ark., 1979).

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).

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 koveks, opak, gri-beyazımsı ve mat veya parlak koloniler gözlenir. Hemin ve vitamin K1 ilave edilmiş Brucella kanlı agarda üreyen koloniler 18 saat inkübasyon sonrasında uzun dalga boylu ultraviolet ışık altında solgun yeşil renkte parlaklık gösterir (Rainey ve ark., 2015).

5.2. 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 sensitivitealarının %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) dır (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).

5.3. 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).

5.4. Moleküler metotlar

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 sensitiviteaları %84-96, spesifiteaları %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).

6. 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 temel besinler için yarışmadır (Usacheva ve ark., 2016).

C. difficile enfeksiyonlarında temel tedavi metodu antibiyotik kullanımıdır. Bakterinin antimikrobiyal maddelere karşı direnci nedeniyle tedavide kullanılabilir etken madde olarak vankomisin önerilmektedir. Vankomisinin yanında metronidazol etken maddesi de önerilmektedir, ancak bakterinin metronidazole karşı duyarlılığın azaldığı rapor edilmektedir (Napolitano ve Edmiston, 2017; Goorhuis ve ark., 2008; Kelly ve Lamont, 2008). Makrolidler içerisinde yer alan yeni fidaxomisin *C. difficile* üzerine vankomisinden 8 kat daha fazla etkili olduğu rapor edilmiştir. İntravenöz immunglobulin uygulanmasının da tedaviye katkı sağlayacağı bildirilmektedir. Hastalığa yönelik aşı çalışmaları devam etmektedir (Napolitano ve Edmiston, 2017).

7. Sonuç

Büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde kayıpların en önemli nedenlerinden biri olan neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde birçok faktör ve mikroorganizma rol oynamaktadır. İnsanlardaki antibiyotik ilişkili diyare vakalarının %20'sine neden olan *C. difficile*'nin neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde rol aldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Bakterinin çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip olması sebebiyle neden olduğu diyare vakalarının tedavileri için antibiyotik seçeneği sınırlı veya başarısız kalabilmektedir. Ülkemizde *C. difficile*'nin buzağı ishallerinde varlığına yönelik bilimsel araştırmalara rastlanılmaması sebebiyle *C. difficile*'nin neonatal buzağı ishallerine neden olup olmadığı, bulaş yolları ve tedavi protokollerine yönelik epidemiyolojik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynakça

- Angione, S. L., Sarma, A. A., Novikov, A., Seward, L., Fieber, J. H., Mermel, L. A., 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.
- Bandelj, P., Blagus, R., Briski, F., Frlic, O., Rataj, A. V., 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.
- Belyi, Y., Aktories, K. (2010). Bacterial toxin and effector glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800 (2010), 134-143.
- Bignardi, G. E. (1998). Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*, 40: 1-15.
- Carman, R. J., Stevens, A. L., Lyster, M. W., Hiltonsmith, M. F., Stiles, B. G., Wilkins, T. D. (2011). *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. *Anaerobe*, 17 (2011) 161-165.
- Clements, A. C. A., Magalhaes, R. J. S., Tatem, A. J., Paterson, D. L., Riley, T. V. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis*, 2010; 10: 395-04.
- Costa, M. C., Stampfli, H. R., Arroyo, L. G., Pearl, D. I., Weese, J. S. (2011). Epidemiology of *Clostridium difficile* on a veal farm: prevalence, molecular characterization and tetracycline resistance. *Veterinary Microbiology*, 152, 379-384.
- Davies, A. H., Mcglashan, J., Posner, M. G., Roberts, A. K., Shone, C. C., Acharya, K. R. (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, L. F., Valiente, E., Wren, B. W. (2009). *Clostridium difficile*-A continually evolving and problematic pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (2009) 1410-1417.
- Genth, H., Dreger, S. C., 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.
- George, W. L., Sutter, V. L., Citron, D., Finegold, S.M. (1979). Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 9(2), 214-219.
- Giannasca, P. J., Warny, M. (2004). Active and passive immunization against *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Vaccine*, 22(7), 848-856.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A., Dekker, F. W., Kuijper, E. J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*, 47, 1162–1170.
- Hammitt, M. C., Bueschel, D. M., Keel, M. K., Glock, R. D., Cuneo, P., Deyoung, D. W., Reggiardo, C., Trinh, H. T., Songer, J. G. (2008). A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary Microbiology*, 127, 343-352.
- Hopman, N. E. M., Keessen, E. C., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., Van Leengoed, L. A. M. G., Kuijper, E. J., Lipman, L. J. A. (2011). A acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, 149, 186-192.
- Hussain, I., Borah, P., Sharma, R. K., Rajkhowa, S., Rupnik, M., Saikia, D. P., Hasin, D., Hussain, I., Deka, N. K., Barkalita, L. M., 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.
- 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., Kofer, J., Wagner, M. (2010). *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 172-175.
- Jones, A. M., Kuijper, E. J., Wilcox, M. H. (2013). *Clostridium difficile*: A European perspective. *Journal of Infection*, 66, 115-128.
- Keessen, E. C., Gaastra, W., Lipman, L. J. A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153, 205-217.
- Kelly, C. P., Lamont, J. T. (2008). *Clostridium difficile*-more difficult than ever. *The New England Journal of Medicine*, 359,1932-1940.
- Magistralli, C.F., 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-Melendez, A., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., 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.
- Mcbee, R. H. (1960). Intestinal flora of some antarctic birds and mammals. *J Bacteriol*, 79, 311-312.
- Metcalf, D., Avery, B. P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., Weese, J. S. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 85-86.
- Mullany, P., Roberts, A. P. (2010). *Clostridium difficile* Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 646, Humana Press
- Napolitano, L. M., Edmiston, C. E. (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.
- Rainey, F. A., Hollen, B. J., Small, A. M. (2015). *Clostridium*, Ed. William B. Whitman in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons, Inc., Sy. 1-122.
- Rodriguez, C., Broeck, J. V., Taminau, B., Delmee, M., Daube G. (2016). *Clostridium difficile* infection: early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*, 97, 59-78.
- Rodriguez-Palacios, A., Stampfli, H. R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-Williams, L. A., Arroyo, L. G., Brazier, J. S., Weese, J. S. (2006). *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 12, No 11, 1730-1736.

- Rupnik, M., Dupuy, B., Fairweather, N. F., Gerding, D. N., Johnson, S., Just, I., Lysterly, D. M., Popoff, M. R., Rood, J. I., Sonenshein, A. L., Thelestam, M., Wren, B. W., Wilkins, T. D., Von Eichel-Streiber, C. (2005). Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 113–117.
- Rupnik, M., Grabnar, M., Geric, B. (2003). Binary toxin producing *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 9, 289-294.
- 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.
- 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, J. G. (2010). *Clostridia* as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140, 399-404.
- Swick, M. C., Koehle, T. M., Driks, A. (2016). Surviving between hosts: sporulation and transmission. *Microbiol Spectr*, 1-28.
- Usacheva, E. A., Jin, J. P., Peterson, L. R. (2016). Host response to *Clostridium difficile* infection: diagnostics and detection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7, 93-101.
- Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., 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.
- Wilcox, M. H. (2003). *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 17, No. 3, 475–493.