

Ek-2

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI VE İSHALLİ KEDİ VE KÖPEKLERDEN
***CLOSTRIDIODES DIFFICILE* İZOLASYONU, ELDE EDİLEN**
İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIKLARI VE
GENOMİK KARAKTERİZASYONLARI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Doğancan YARIM

Danışman
Prof. Dr. Seçil ABAY

Şubat 2025
Kayseri

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI VE İSHALLİ KEDİ VE KÖPEKLERDEN
***CLOSTRIDIODES DIFFICILE* İZOLASYONU, ELDE EDİLEN**
İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIKLARI VE
GENOMİK KARAKTERİZASYONLARI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Doğancan YARIM

Danışman
Prof. Dr. Seçil ABAY

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2023-12851 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Şubat 2025
Kayseri

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgi ve verilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal, metot ve sonuçları tam olarak yansıttığımı, diğer araştırmacıların makalelerinden alıntı yaptığımda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Doğancan YARIM

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Sağlıklı ve İshalli Kedi ve Köpeklerden *Clostridioides difficile* İzolasyonu, Elde Edilen İzolatların Antibakteriyel Duyarlılıkları ve Genomik Karakterizasyonları” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi ’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Doğancan YARIM

Danışman
Prof. Dr. Seçil ABAY

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Fuat AYDIN

KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Seçil ABAY'ın danışmanlığında **Doğancan YARIM** tarafından hazırlanan “Sağlıklı ve İshalli Kedi ve Köpeklerden *Clostridioides difficile* İzolasyonu, Elde Edilen İzolatların Antibakteriyel Duyarlılıkları ve Genomik Karakterizasyonları” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

27.02.2025

JÜRİ

İmza

Danışman: Prof. Dr. Seçil ABAY
Üye: Prof. Dr. Fuat AYDIN.....
Üye: Doç. Dr. Serhat AL.....
Üye: Doç. Dr. İzzet Burçin SATICIOĞLU.....
Üye: Doç. Dr. Muhammed DUMAN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2025

Prof. Dr. Aydın ALAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Başta bu tez çalışmasında, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yardımlarını ve desteğini, gerek tezimin laboratuvar analizlerinde gerekse yazım aşamasında esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Seçil ABAY ve tezimin biyoinformatik analizleri hususunda bana yol gösteren ve her zaman yanımda olan Doç. Dr. İzzet Burçin SATICIOĞLU'na, beni özverili bir şekilde destekleyen Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Semih GÜMÜŞSOY ve Dr. Öğr. Üyesi Emre KARAKAYA'ya şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam için örnek toplanmasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Veteriner hekim Erdem Can ve Eren Zeki DOĞAN, Veteriner hekim Adnan Onur DOĞAN ve Veteriner hekim Ahmet Sami USLU'ya, manevi desteğini her an hissettiğim Veteriner hekim Akın Özgür CODAR, Araştırma görevlisi Kürşat KÖŞKEROĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Görkem EKEBAŞ'a, tez çalışmamın istatistik analizlerinde yardımcı olan Araştırma Gör. Dr. Güven GÜNGÖR'e, YÖK100/2000 Doktora Projesi bursu ile doktora eğitimim boyunca destekleyen Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı'na ve tez araştırmasını TDK-2023-12851 kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

En çok da hayatım boyunca desteğini ve sevgisini bir an bile üzerimden çekmeyen canım annem Şeyda ŞANAL'a, hem dert ortağım hem ev arkadaşım olan biricik kardeşim Doğukan YARIM'a ve değerli ŞANAL ailesinin bütün fertlerine teşekkürlerimi borç bilirim.

Doğancan YARIM
Kayseri, Şubat 2025

**SAĞLIKLI VE İSHALLİ KEDİ VE KÖPEKLERDEN
CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE İZOLASYONU, ELDE EDİLEN
İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIKLARI VE
GENOMİK KARAKTERİZASYONLARI**

Doğancan YARIM

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Şubat 2025

Danışman: Prof. Dr. Seçil ABAY

ÖZET

Bu çalışmada, sağlıklı ve ishalli kedi ve köpeklerden *Clostridioides difficile* izolasyonu, identifikasyonu, elde edilen izolatların antibakteriyel duyarlılık profillerinin belirlenmesi ve genomik karakterizasyonları amaçlandı. Bu amaçla 100 kedi ve 100 köpektan (50’şer adet sağlıklı, 50’şer adet ishalli) alınan toplam 200 rektal svap örneği materyal olarak kullanıldı. Rektal svap örneklerinden *C. difficile* izolasyonunda kültür yöntemi, elde edilen izolatların identifikasyonunda moleküler yöntem (PCR-Polymerase Chain Reaction) ve antibakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesinde ise gradiyent diffüzyon yöntemi (E-test) kullanıldı. Elde edilen izolatların tüm genom dizi (WGS) analizleri yeni nesil dizileme platformlarından Oxford-Nanopore PromethION sisteminde uzun okumalar şeklinde gerçekleştirildi. Biyoinformatik analizler ile izolatların; genomlarında bulunan antibiyotik direnç genleri, toksin genleri ve diğer antijenik yapılarını kodlayan genler incelendi. Ayrıca izolatların Multi Locus Sequence Typing (MLST) sekans tipleri (ST) belirlendi ve açık veri tabanlarında bulunan farklı coğrafi bölgelerden elde edilen insan ve hayvan orijinli *C. difficile* izolatları ile genetik yakınlıklarının saptanması için filogenetik analizler gerçekleştirildi. İncelenen 200 adet rektal svap örneğinin 12 (%6)’si köpek ve yedisi (%3.5) kedi orijinli olmak üzere 19 (%9.5)’u fenotipik testler ve PCR ile *C. difficile* yönünden pozitif bulundu. WGS analizi sonucunda 19 *C. difficile* izolatının 18’i *C. difficile* olarak doğrulanırken biri *C. innocuum* olarak tanımlandı. Çalışma

kapsamında elde edilen izolatlar sırasıyla ampisilin, klindamisin, meropenem ve metranidazole % 27.7 (5/18), % 33.3 (6/18), % 27.7 (5/18) ve % 11.1 (2/18) oranında dirençli saptanırken, izolatların tamamının (%100) vankomisine duyarlı olduğu tespit edildi. İzolatlarda en sık görülen (15/18, %83.3) direnç geninin metronidazol direnci ile ilişkili *nimB* olduğu ortaya konuldu. Kedi ve köpek izolatlarında *adherans* (*Cwp66* ve *Cwp88*) ve *SlpA* genleri sırasıyla %91.6 (11/12) ve %77.8 (14/18) oranında belirlenirken, izolatların %45'inin toksijenik olduğu tespit edildi. Ayrıca izolatların %22.2 (4/18), %11.1(2/18), %11.1(2/18), %38.8 (7/18), %5.5 (1/18) ve %11.1(2/18) oranında sırası ile ST2, ST3, ST35, ST39, ST55 ve ST185'den oluşan toplam 6 MLST'ne ait olduğu belirlendi.

Çalışmada elde edilen izolatlarda çeşitli toksin, virülens, antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi ve insanlarda daha önce *C. difficile* kaynaklı salgınlarda bildirilen sekans tiplerine benzer genotiplerin elde edilmiş olması, pet hayvanlarının bu bakteri açısından bir rezervuar olabileceğini ve dolayısı ile halk sağlığı için problem arz edebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridioides difficile*; Filogenetik analiz; Kedi; Köpek; Tüm Genom Dizileme

**ISOLATION OF *CLOSTRIDIoidES DIFFICILE* FROM
HEALTHY AND DIARRHEIC CATS AND DOGS,
ANTIBACTERIAL SUSCEPTIBILITIES AND GENOMIC
CHARACTERIZATIONS OF THE ISOLATES OBTAINED**

Doğancan YARIM

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology

Doctoral Thesis, February 2025

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ABAY

ABSTRACT

This study aimed to isolate and identify *Clostridioides difficile* from healthy and diarrheal cats and dogs and determine the antibacterial susceptibility profiles and genomic characterization of the isolates obtained. For this purpose, a total of 200 rectal swab samples taken from 100 cats and 100 dogs (50 healthy, 50 diarrheal) were used as material. The culture method was used in the isolation of *C. difficile* from rectal swap samples, the molecular method (PCR-Polymerase Chain Reaction) was used in the identification of the isolates obtained, and the gradient diffusion method (E-test) was used in the determination of their antibacterial susceptibilities. Whole genome sequence (WGS) analyses of the obtained isolates were performed as long reads on the Oxford-Nanopore PromethION system, one of the next-generation sequencing platforms. Bioinformatic analyses were used to examine antibiotic resistance genes, toxin genes, and genes encoding other antigenic structures in the genomes of the isolates. In addition, Multi Locus Sequence Typing (MLST) sequence types (ST) of the isolates were determined, and phylogenetic analyses were performed to determine their genetic similarities with *C. difficile* isolates of human and animal origin obtained from different geographical regions in open databases. Of the 200 rectal swab samples examined, 19 (9.5%) samples, including 12 (6%) of dogs and 7 (3.5%) of cat origin, were found positive for *C. difficile* by phenotypic tests and PCR. As a result of WGS analysis, 18 of the 19 *C. difficile* isolates were confirmed as *C. difficile*, while one was identified as *C. innocuum*. The isolates obtained within the scope of the study were found to be resistant to ampicillin,

clindamycin, meropenem, and metronidazole at a rate of 27.7% (5/18), 33.3% (6/18), 27.7% (5/18) and 11.1% (2/18), respectively, while all isolates (100%) were found to be susceptible to vancomycin. The most common resistance gene in the isolates was *nimB* (15/18, 83.3%) associated with metronidazole resistance. While adherence (*Cwp66* and *Cwp88*) and *SlpA* genes were determined at a rate of 91.6% (11/12) and 77.8% (14/18), respectively, in cat and dog isolates, 45% of the isolates were found to be toxigenic. In addition, it was determined that 22.2% (4/18), 11.1% (2/18), 11.1% (2/18), 38.8% (7/18), 5.5% (1/18) and 11.1% (2/18) of the isolates belonged to a total of 6 MLSTs consisting of ST2, ST3, ST35, ST39, ST55 and ST185, respectively. The identification of various toxin, virulence, and antibiotic resistance genes in the isolates obtained in the study and the fact that genotypes similar to sequence types reported in previous outbreaks caused by *C. difficile* in humans were obtained suggest that pets may be a reservoir for this bacteria and therefore may pose a problem for public health.

Keywords: *Clostridioides difficile*; Phylogenetic analysis; Cat; Dog; Whole Genome Sequencing

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
TABLolar LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Clostridioides difficile</i> 'nin Tarihçesi	4
2.2. <i>C. difficile</i> 'nin Taksonomisi	6
2.3. <i>C. difficile</i> 'nin Kültür Özellikleri	9
2.4. <i>C. difficile</i> 'nin Biyokimyasal Özellikleri	11
2.5. <i>C. difficile</i> 'nin Genomik Yapısı	11
2.6. <i>C. difficile</i> 'nin Epigenomik Yapısı	12
2.7. <i>C. difficile</i> 'nin Antijenik Özellikleri	13
2.7.1 <i>C. difficile</i> 'nin Toksinleri	13
2.7.2 <i>C. difficile</i> Adhezinleri	16
2.8. İnsan ve Hayvanlarda <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarının Fizyopatolojisi	18
2.9. <i>C. difficile</i> 'nin Sahip Olduğu Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	21
2.10. <i>C. difficile</i> Direnç Durumu	23
2.11. <i>C. difficile</i> 'nin İnsan ve Hayvanlarda Epidemiyolojisi	23
2.12. İnsanlarda <i>C. difficile</i> 'nin Neden Olduğu Hastalıklar	26
2.12.1. <i>C. difficile</i> ile İlişkili Kolit (CDAC)	26
2.12.2. Psödomembranöz Kolit	26
2.12.3. Ülseratif Kolit (FCDC)	26
2.12.4. Toksik Megakolon	27

2.12.5. İshal.....	27
2.12.6. Sepsis	27
2.12.7. Rekürrent Enfeksiyonlar:	27
2.12.8. Aseptomatik Taşıyıcılık.....	28
2.13. <i>C. difficile</i> 'nin Hayvanlarda Neden Olduğu Hastalıklar	28
2.14. Gıdalarda <i>C. difficile</i> Varlığı	29
2.15. <i>C. difficile</i> 'nin teşhisi	30
2.15.1. Bakteriyolojik Teşhis	31
2.15.2. Serolojik Teşhis	32
2.15.3. Moleküler Teşhis	33
2.16. <i>C. difficile</i> Genotiplendirme Metodları	34
2.16.1. Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	34
2.16.2. PCR Ribotipleme	35
2.16.3. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	35
2.16.4. Tüm genom dizi analizi (WGS).....	36
2.16.5. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analizi:	36
2.17. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarında Tedavi.....	36
2.17.1. İnsanlarda <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarında Tedavi	36
2.17.2. Hayvanlarda <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	39
2.18. <i>C. difficile</i> Korunma Yöntemleri	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1 Gereç	41
3.1.1 Örneklerin Toplanması	41
3.1.2. Güç Analizi	41
3.1.3. <i>Clostridioides difficile</i> İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.....	42
3.1.4. Standart Suş	45
3.1.5. <i>Clostridioides difficile</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar	45
3.1.6. Moleküler Analizde Kullanılan Kimyasallar	45
3.2. Yöntem	47
3.2.1. <i>Clostridioides spp.</i> 'nin İzolasyonu	47

3.2.2. Elde Edilen İzolatların <i>Clostridioides</i> spp. Olarak Tanımlanması	49
3.2.2. Serolojik Testler.....	50
3.2.3. İzolatların Antibakteriyel Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	51
3.2.4. Moleküler Analizler	51
3.2.5. Biyoinformatik Analizler.....	53
3.2.6. İstatiksel Analiz	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları	56
4.1.1. Fenotipik İdentifikasyon Sonuçları.....	58
4.1.2. Moleküler İdentifikasyon Sonuçları	58
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	60
4.2.1. <i>C. difficile</i> İzolatlarında Çoklu Antibiyotik Direnci	61
4.3. WGS Analiz Sonuçları	65
4.3.1. Tüm Genom Dizileme (WGS) Kalite Bulguları	65
4.3.2. Genom Anotasyon Sonuçları	65
4.3.3. Fenotipik Direnç ile Antibakteriyel Direnç Gen Varlığının Karşılaştırılması	72
4.4. İzolatların Farklı Metodlarla Genotiplendirilmesi.....	74
4.4.1. ERIC-PCR ile Tiplendirme.....	74
4.4.2. MLST ile tiplendirme	74
4.4.3. İzolatların <i>SlpA</i> Proteinlerinin Tiplendirilmesi	74
4.4.4. Genotiplendirme Metodlarının Karşılaştırılması.....	75
4.5. Filogenetik Analizler	78
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	98
7. KAYNAKLAR	100

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APD	: Otomatik İşleme Alanı
BRA	: Brazier's Anaerobic Agar
<i>C. difficile</i>	: <i>Clostridioides difficile</i>
Caco-2	: Kolon Adenokarsinom Hücre Hattı 2
CCFA	: Sikloserin-Sefoksitin Fructose Agar
CCNA	: Hücre Kültürü Sitotoksisite Nötralizasyon Testi
CDE	: <i>Clostridioides difficile</i> Enfeksiyonu
Cdk	: Siklin Bağımlı kinaz
CDMN	: <i>C. difficile</i> Moksalaktam Norfloksasin
CDT	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin
<i>CdtA</i>	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin A
<i>CdtAB</i>	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin AB
<i>CdtB</i>	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin B
<i>Cdtloc</i>	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin Lokusu
<i>CdtR</i>	: <i>Clostridioides difficile</i> Toksin R
CE	: Kapillar Jel Elektroföresi
CROP	: Kombine Tekrarlayan Oligopeptit
CTA	: Hücre Sitotoksisite Testi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EIA	: Enzim Immunoassay
ELISA	: Enzim-Bağılantılı Immunosorbent Testi
FCDC	: Fulminant <i>C. difficile</i> Koliti
FMT	: Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu
GDH	: Glutamat Dehidrogenaz

GTD	: Glukoziltransferaz Alanı
IL	: Interleukin
LAT	: Lateks Aglütinasyon Testi
Ma	: Adenin Metilasyonu
Mbp	: Mega Baz-çifti
MLSB	: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B
MLST	: Çoklu Lokuslu Dizi Tipleme
Mtase	: Metiltransferaz
PAF	: Platelet-Aktivasyon Faktörü
<i>Paloc</i>	: Patojenite Lokusu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE2	: Prostaglandin
PMK	: Pseudomembranöz Kolit
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
<i>RT</i>	: Ribotip
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizm
<i>TcdA</i>	: Toksin A
<i>TcdB</i>	: Toksin B
TLR4	: Toll-benzeri reseptör 4
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
WGS	: Tüm Genom Dizileme

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>C. difficile</i> 'nin tarihçesi	5
Şekil 2.2. <i>Peptostreptococcaceae</i> familyasına ait üyelerin filogenetik pozisyonlarını gösteren, 16S rRNA gen dizisi verilerine dayalı filogenetik ağaç	8
Şekil 2.3. <i>C. difficile</i> suşlarında <i>PaLoc</i> ve <i>CdtLoc</i> bölgeleri.	16
Şekil 3. 1. <i>C. difficile</i> izolasyonunda kullanılan alkol şok metodu.....	48
Şekil 3. 2. <i>C. difficile</i> izolasyon ve identifikasyon şeması	50
Şekil 3. 3. <i>C. difficile</i> izolatlarına uygulanan WGS işlem şeması	54
Şekil 4. 1. Çalışma kapsamında elde edilen “1cd” kodlu <i>C. difficile</i> izolatının CDMN agardaki saf kültürü.....	57
Şekil 4. 2 Toksik ve non-toksik bazı örneklerin serolojik test sonuçları	59
Şekil 4. 3 Dışkı orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarına ait PCR (<i>tpi</i> geni) ürünlerinin agaroz jel (%1.5) görüntüsü.....	59
Şekil 4. 4. <i>C. difficile</i> izolatlarının antibakteriyel duyarlılık test sonuçları.	62
Şekil 4. 5. <i>C. difficile</i> izolatlarının antibakteriyel duyarlılık test sonuçları.	63
Şekil 4.6. “6cd” kodlu köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatının genom anotasyonundan elde edilen verilerin sirküler organizasyonu.	67
Şekil 4.7. “6cd” kodlu köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatının genom anotasyonu sonucunda elde edilen verilerin dairesel gösterimi.	68
Şekil 4.8. Çalışmada elde edilen <i>C. difficile</i> izolatları ve <i>C. innocuum</i> izolatının orijinlerine göre ERIC-PCR profilleri ve sekans tipleri.....	75
Şekil 4.9. Köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarının MLST sekans tipleri, ERIC PCR profilleri ve <i>SlpA</i> sekans tipleri.	77
Şekil 4.10. Kedi orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarının MLST sekans tipleri, ERIC PCR profilleri ve <i>SlpA</i> sekans tipleri	77
Şekil 4. 11. <i>C. difficile</i> izolatları ile farklı demografik bölgelerden elde edilen hayvan orijinli izolatların ağaçlandırılmaları.....	78
Şekil 4.12. Köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatları ile farklı coğrafi bölgelerden elde edilen insan orijinli izolatların sirküler şekilde ağaçlandırılmaları.	79
Şekil 4. 13. Bazı kedi ve köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatları ile farklı coğrafi bölgelerden ve kaynaklardan elde edilen izolatların ağaçlandırılmaları.	80

Şekil 4. 14. *C. difficile* izolatlarının *SlpA* proteinini kodlayan gen bölgeleri ile farklı coğrafi bölge ve konakçılardan elde edilen *C. difficile* izolatlarının eş lokusları ile ağaçlandırılması 82



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>C. difficile</i> 'nin taksonomisi	7
Tablo 2.2. <i>Clostridioides difficile</i> kültür ve genel özellikleri.....	10
Tablo 2.3. <i>C. difficile</i> 630 tip suşunun genomik özellikleri	12
Tablo 2.4. <i>C. difficile</i> adhezinlerinin fonksiyonları.....	18
Tablo 2.5. <i>C. difficile</i> enfeksiyonunun patogenezi	21
Tablo 2. 6. <i>C. difficile</i> 'nin direnç mekanizması ve regülasyonu.....	22
Tablo 3. 1. Çalışmada <i>C. difficile</i> yönünden incelenen örneklerin sayısı ve işletmelere göre dağılımı.....	42
Tablo 3. 2. Moleküler analizlerde kullanılan primer listesi.....	47
Tablo 4. 1. Çalışmada elde edilen <i>C. difficile</i> izolatlarına verilen kodlar ve izolasyon orijinleri.....	57
Tablo 4. 2. Rektal svap örneklerinin toplandığı kliniklere göre ve <i>C. difficile</i> pozitifliğine göre dağılımı.....	58
Tablo 4. 3. Elde edilen <i>Clostridioides</i> spp. izolatlarının fenotipik ve moleküler test sonuçları	60
Tablo 4. 4. Kedi ve köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarının antibakteriyel duyarlılık sonuçları	61
Tablo 4. 5. <i>C. difficile</i> izolatlarında saptanan çoklu antibiyotik direnci	61
Tablo 4. 6. Kedi ve köpek orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarının E-test sonuçları	64
Tablo 4. 7. Analiz edilen <i>C. difficile</i> genomlarının sıralama ve kalite verileri.	69
Tablo 4. 8. Çalışmada elde edilen izolatların erişim numaraları, en yakın tip suşlar ve genomik yakınlık dereceleri.	70
Tablo 4. 9. Çalışmada elde edilen köpek ve kedi orijinli <i>C. difficile</i> izolatlarının direnç, adherans ve toksin genleri.	71
Tablo 4. 10. Çalışmada elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik duyarlılık profilleri.....	73
Tablo 4. 11. İzolatların sekans tipleri, <i>SlpA</i> ve MLST grupları	76
Tablo 4. 12. SID değeri, Ayarlanmış Rand ve Wallace katsayıları kullanılarak tiplendirme metodlarının karşılaştırılması	76

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Clostridioides difficile (*C. difficile*), hem insan ve hayvanların bağırsak mikrobiyomunda kommensal olarak hem de çevresel etken şeklinde doğada yaygın olarak bulunan anaerobik, Gram pozitif, spor oluşturan, genellikle hareketli, peritrik flagellaya sahip, 0.5-1.9 x 3.0-16.9 µm boyutunda bir basildir (Czepiel ve ark., 2019). Bakterinin vejetatif formu zorunlu anaerobik olması nedeniyle oksijene karşı duyarlıyken spor formu kurumaya, ısıya, birçok dezenfektana ve fiziksel ajanlara karşı oldukça dayanıklıdır (Paredes-Sabja ve ark., 2014) ve kolonda vejetatif halde, kolon dışındaki dokularda ise spor formunda bulunmaktadır (Adams ve ark., 2013). Bakterinin spor formu; hastane ortamı, personel kıyafetleri ve ekipmanlarında (Rose ve ark., 2023), toprak (Lim ve ark., 2020), sel gibi doğal afetler (Lin ve ark., 2015), deniz suları ve deniz tortuları (Perumalsamy ve ark., 2019) ve diğer çevresel ortamlarda (Beinortas ve ark., 2018; Rodriguez ve ark., 2016; Stull ve ark., 2013); tek (Hain-Saunders ve ark., 2023) ve çift tırnaklılar (Bolton ve ark., 2023), köpek, kedi ve kanatlılar gibi birçok hayvanın intestinal sistemi ve gaitasında (Mitchell ve ark., 2022; Rahimi ve ark., 2015; Esfandiari ve ark., 2014); ayrıca hayvansal gıdalarda (Bingöl ve ark., 2020; Atasoy ve Gücükoğlu, 2017; Guran ve İlhak, 2015), insan ile hayvanların piyozjenik enfeksiyonlarında (Mengoli ve ark., 2020) tespit edilmektedir. Bununla birlikte, sporların fiziksel etkenlere (çeşitli dezenfektanlar ve ısı) karşı dayanıklı olması, potejenle mücadeleyi zorlaştırmakta ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Buddle ve ark., 2023; Paredes ve ark., 2014; Sabja ve ark., 2014).

Clostridioides difficile enfeksiyonlarının patogeneğinde, yaygın ve hatalı antibiyotik (Albuquerque ve ark., 2021) ve proton pompası inhibitörlerinin (Inghammar ve ark., 2021) kullanımı temel hazırlayıcı faktörler arasında yer almakta, bağırsak mikrobiyotasını bozarak patojenin aşırı çoğalmasına ve toksin üretimine zemin hazırlamaktadır. Ayrıca, hijyen ve enfeksiyon kontrol önlemlerindeki yetersizlikler, sporların yayılımına katkıda bulunurken, gastrointestinal cerrahi ve invaziv müdahalelerin de hastane kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonlarına yol açtığı bilinmektedir (Rose ve ark., 2023). Etken kedi ve köpeklerde ise pseudomembranöz kolit ve inatçı ishal gibi klinik semptomlarla kendini göstermektedir. İnsanlarda salgınlardan izole edilen sekans tiplerinin kedi ve köpeklerden (Redding ve ark., 2022; Wei ve ark., 2019; Andrés-Lasheras ve ark., 2018; Rabold ve ark., 2018; Alvarez-Perez ve ark., 2017; Orden ve ark., 2017; Loo ve ark., 2016) ve perakende gıda ürünlerinden (Weese ve ark., 2020; Rabold ve ark., 2018; McCollum ve ark., 2012) de izole edilmiş olması ise etkenin zoonotik karakterde olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır. Bu durum hastane kaynaklı olduğu bilinen CDE'nin toplum kaynaklı bir enfeksiyona evrildiğini düşündürmektedir.

Kedi ve köpeklerden izole edilen *C. difficile* suşlarının WGS analizi ile antijenik ve genetik yapılarının kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesi, farklı konak türleri ile coğrafi bölgeler arasındaki antijenik varyasyonlarını ortaya koyarak küresel yayılım dinamiklerinin detaylı izlenmesine olanak tanımaktadır (Wen ve ark., 2022). Bu yaklaşımla elde edilen moleküler veriler, enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesine yönelik bilimsel bir temel oluştururken, patojenin moleküler epidemiyolojisinin daha kapsamlı anlaşılmasını sağlamaktadır (Janezic ve ark., 2019). Mevcut literatür incelendiğinde, Türkiye’de kedi ve köpeklerden izole edilen *C. difficile* suşlarının antijenik ve moleküler karakterizasyonuna yönelik son 25 yıl içerisinde herhangi bir çalışmanın gerçekleştirilmediği görülmekte, insan orijinli izolatlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise patojenin antijenik ve moleküler düzeyde detaylı karakterizasyonu alanındaki eksiklik dikkat çekmektedir. Uluslararası düzeyde ise, ‘‘NCBI GenBank’’ veri tabanında kedi kaynaklı *C. difficile* izolatlarına ait WGS verisinin bulunmadığı görülmekte, bu durum önemli bir bilgi boşluğunu işaret etmektedir. Bu eksiklikler hem insan hem de evcil hayvan kaynaklı *C. difficile* izolatlarının epidemiyolojik ve genetik profilinin aydınlatılması açısından kritik bir

gerekliliği ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, insanlarla aynı yaşam ortamını paylaşan kedi ve köpeklerden elde edilen *C. difficile* izolatlarının; prevalansının araştırılması, antijenik ve moleküler özelliklerinin detaylı bir şekilde karakterize edilmesi ve antimikrobiyal duyarlılık profillerinin belirlenmesinin halk sağlığı açısından kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Tez alışması kapsamında; sağlıklı ve ishalli kedi ile köpeklerden izole edilen *C. difficile* suşlarının WGS analizlerinin gerçekleştirilmesi, patojenin tüm genom düzeyinde moleküler ve antijenik karakterizasyonu ve aynı zamanda fenotipik ve moleküler olarak antibiyotik duyarlılık profillerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.



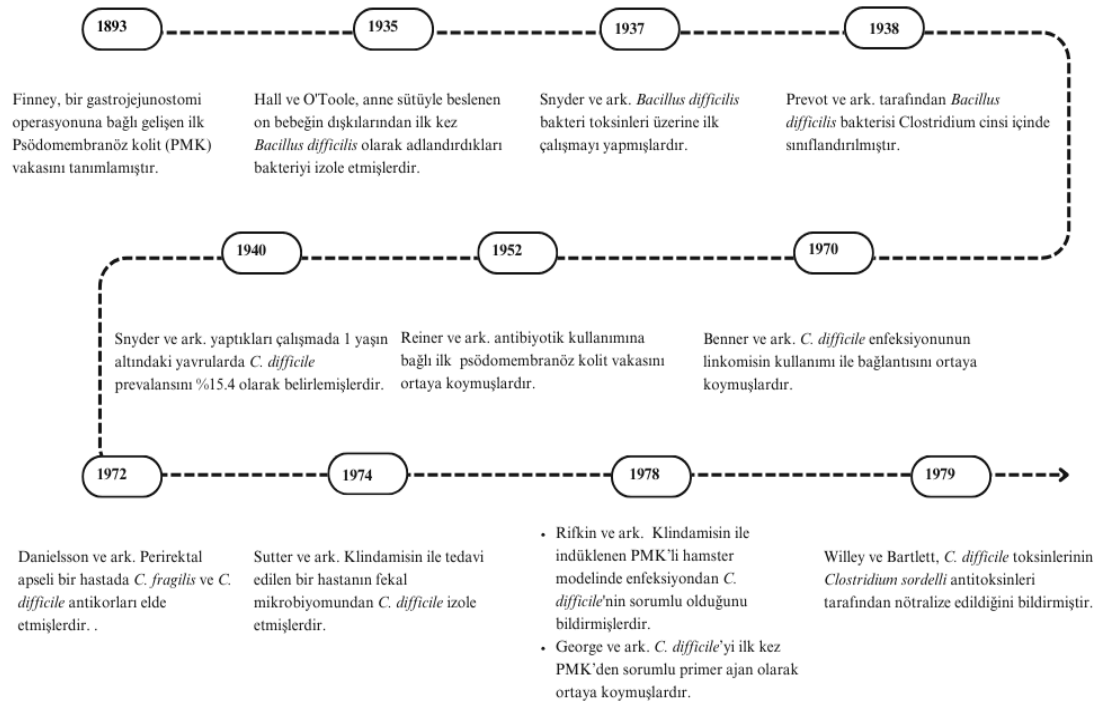
2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridioides difficile*'nin Tarihçesi

Clostridioides difficile enfeksiyonu'nun (CDE) tarihçesi, bakterinin ilk izolasyonundan öncesine dayanmaktadır. 1892 yılında Amerika'da bulunan Johns Hopkins Hastanesi'nde 22 yaşında bir kadın skatrize ülser nedeniyle tümör rezeksiyonu geçirmiş ve ameliyattan 10 gün sonra hafif ishal tablosu gelişmiştir. İshal tablosu gittikçe ilerlemiş ve hasta 5 gün sonra vefat etmiştir. Otopsi kayıtlarında ince bağırsakta "difteritik kolit" görüldüğü belirtilmiştir. Bu olay antibiyotik öncesi dönemde meydana gelmiş olsa da hastaya ameliyattan önce lokal antiseptik olarak borik asit mide irrigasyonu uygulandığı kaydedilmiştir (Finney, 1893). CDE, 1928'de penisilinin keşfiyle (Fleming, 1929) ortaya çıkan “antibiyotik dönemi”nin ilk yan etkilerindendir (Gaynes, 2017). Bu dönem yoğun antibiyotik kullanımına bağlı pseudomembranöz kolit (PMK) vakalarında artış görülmüş, ancak hastalığın etiyojisi ortaya koyulamamıştır (Hamre ve ark., 1943). İlerleyen yıllarda hastalık tablosunun *Staphylococcus aureus* kaynaklı olduğu düşünülse de etkenin etiyojisi hakkında çalışmalar sürmüştür (Antibiotics, 1953; Green ve ark., 1974).

1935 yılında Hall ve O'Toole, sağlıklı yeni doğan bebeklerin bağırsak kanalından izole edilen, zor üreyen, zorunlu anaerobik, Gram-pozitif, spor oluşturan, sitotoksin üreten bir çomak olan *Bacillus difficilis*'i ilk kez tanımlamışlardır (Hall ve O'Toole, 1935). Bunun üzerine uzun yıllar boyunca *C. difficile* PMK ile ilişkilendirilememiş ve bebeklerin bağırsak mikrobiyomunun bir parçası olarak görülmüştür. O yıllarda bebeklerin bağırsak mikrobiyomunun bir parçası olması dışında organizma hakkında çok az şey bilinmekteydi (Snyder ve ark., 1940). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda etken topraktan (Kim ve ark., 1960), kanatlı ve memeli hayvanların bağırsak mikrobiyotasından (McBee ve ark., 1981, Hafız ve ark., 1976) da izole edilmiştir.

Antibiyotik kullanımına bağlı kolit tablosundan sorumlu organizmayı keşfetmeye yönelik araştırmalar 1970'li yıllarda artış göstermiştir. Tedesco ve ark. 1974 yılında geniş spektrumlu antibiyotik kullanımını PMK ile ilişkilendirmişler, ancak etkeni izole edememişlerdir. George ve ark. 1978'de yapmış oldukları çalışmada, *C. difficile*'nin insan ve hayvanlarda PMK'den sorumlu etken olduğunu ortaya koymuşlardır (George ve ark., 1978). Keighley ve ark. 1978'in sonlarında, vankomisin'in toksijenik *C. difficile*'yi kolondan elimine ettiğini ve PMK'lı hastalarda hızlı klinik iyileşme ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Keighley ve ark. 1978). Sonraki yıl yapılan bir çalışmada PMK 'lı hastaların dışkılarında *Clostridium sordellii* toksin antiserumları tarafından nötralize edilebilen bir toksin tespit edilmiş ve etken vankomisine yanıt verdiği için enfeksiyonun bakteriyel olduğu düşünülmüştür (Wiley ve Berlett, 1979). Ancak hastalarda *C. sordelli* izole edilemediğinden, antibiyotikle ilişkili PMK tablosunda primer etkenin *C. difficile* olduğunu, toksin ürettiğini ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini ortaya koymuşlardır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *C. difficile*'nin tarihçesi

Etkenin ismi uzun süre *Clostridium difficile* olarak kaldıktan sonra Yutin ve Galperin, 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada *C. difficile*'nin yeni isminin "*Peptoclostridium difficile*" olarak değiştirilmesini önermişlerdir. Ancak bu durum Lawson ve ark.'nın 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada eleştirilmiştir. Bu eleştirinin sebebi ise bakteri adına literatürde ve halk sağlığı kuruluşlarında çok fazla kısaltma bulunması ve bakterinin cins isminin baş harfinde meydana gelecek değişimin çok fazla karışıklığa neden olacağının düşünülmesidir. Lawson ve ark. (2016) yaptıkları çalışma sonucu "Clostridioides" adını vermiş oldukları yeni bir cins tanımlamış ve *Clostridioides difficile* ile bu bakteriye yakın bir tür olan *Clostridioides mangenotii*'yi bu cinse dahil etmişlerdir. Bu yeni cinsin adının sonuna sadece "-oides" eklemişlerdir. Tür adı ise üreme şartlarından kaynaklı "zor" anlamına gelen "difficile" olarak bırakılmıştır (Lawson ve ark., 2016; Oren ve Rupnik, 2018). Günümüzde *Clostridioides* cinsine bağlı geçerli olarak yayınlanan tek tür "*Clostridioides difficile*"'dir, *Clostridioides perfringens* geçerli olarak kabul edilmemiş, *C. mangenotii* ise "*Metaclostridioides*" isimli yeni bir cins oluşturularak o cinse dâhil edilmiştir (Parte ve ark., 2020; Bello ve ark., 2024).

O zamandan beri, hastanelerde *C. difficile* enfeksiyonunu belgeleyen raporların sayısı artmış ve etken, 90'lı yılların patojeni haline gelmiştir (Riley ve ark. 1998). 2000'li yılların başında, Avrupa ve Kuzey Amerika'da CDE insidansında, şiddetinde ve ölüm oranında, hipervirulent suş olan RT027'nin ortaya çıkmasıyla ilişkili bir artış bildirilmiştir (Kuijper ve ark. 2008). Enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde yaygın ve gereksiz antibiyotik kullanımı ile *C. difficile* enfeksiyonu, dünya çapında hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında endemik hale gelmiştir (Mitchell ve ark., 2022; Rose ve ark., 2022; Lim ve ark., 2020; Curcio ve ark., 2019; Rodriguez ve ark., 2014; Hensgens ve ark., 2012; Barbut ve ark., 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar; Kanada (Xia ve ark., 2019), Asya (Borren ve ark., 2017), Amerika ve Avrupa'da (CDC Reports., 2020) enfeksiyonun prevalansının hızla arttığını ortaya koymaktadır.

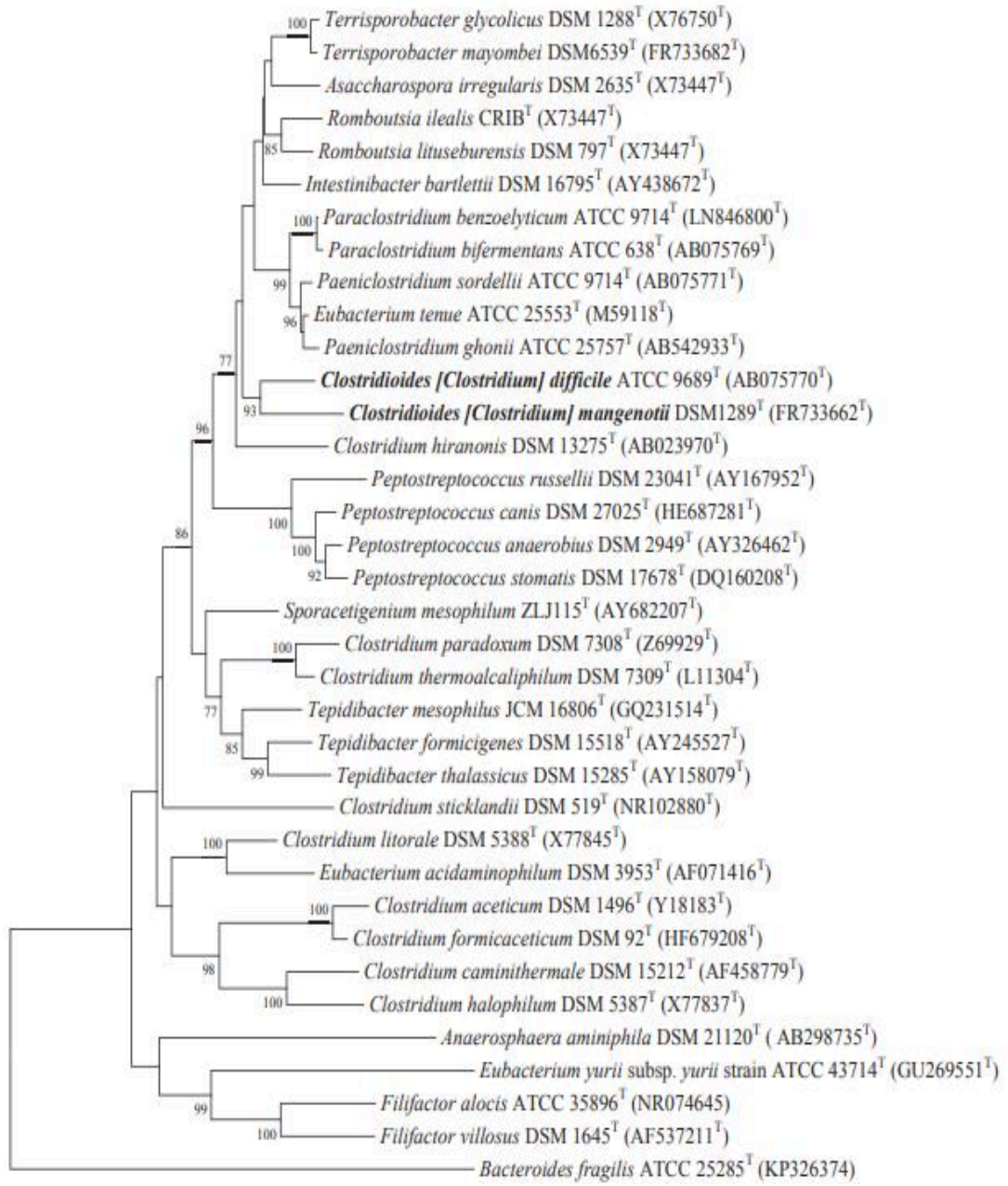
2.2. *C. difficile*'nin Taksonomisi

C. difficile, sporlu, hareketli, peritrik flagelları olan, kapsülsüz, 0.5-1.9 x 3.0-16.9 µm boyutlarında Gram pozitif bir bakteridir (Lawson ve ark., 2016). Bu tür, "*Bacteria*" âleminde yer alır. Türler, *Firmicutes* şubesine, *Clostridia* sınıfına, *Clostridiales*

takımına ve *Peptostreptococcaceae* familyasına dâhil edilirler (Tablo 2.1.). 16S rRNA gen dizilimine göre türler, *Peptostreptococcaceae* ailesinde, *Clostridia*'nın XI numaralı kümesinde yer almaktadır (Lawson ve ark., 2016; Collins ve ark. 1994; Şekil 2.2). *Clostridioides* türleri, karbonhidratları fermentasyon yoluyla metabolize eder. Fermentasyon sonucunda başlıca asetik asit, laktik asit, bütirik asit gibi organik asitler oluşur. Bu türler, proteolitik enzimlere sahiptir ve amino asitlerin de fermentasyonunu gerçekleştirirler. Ayrıca, glukozu fermente ederek gaz (hidrojen ve karbondioksit) üretirler. Guanin+Sitozin (G+C) oranı genellikle %21 ile %30 arasında değişmektedir ve bu oran, *Clostridium* türleriyle uyumludur. Bello ve ark. 2024'te *Peptostreptococcaceae* ailesini ve bu ailenin ana cinslerini, filogenetik analizler ve takson-spesifik moleküler belirteçlere dayanarak yeniden sınıflandırmayı amaçlamadığı çalışmada, *Clostridioides mangelotii*'nin, “*Metaclostridioides*” olarak yeni bir cinse aktarıldığını bildirmişlerdir (Parte ve ark., 2020; Bello ve ark., 2024).

Tablo 2.1. *C. difficile*'nin taksonomisi

Bilimsel sınıflandırma	
Alem	Bacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Clostridia
Takım	Clostridiales
Aile	<i>Peptostreptococcaceae</i>
Cins	<i>Clostridioides</i>
Tür	<i>Clostridioides (C.) difficile</i>



Şekil 2.2. *Peptostreptococcaceae* familyasına ait üyelerin filogenetik pozisyonlarını gösteren, 16S rRNA gen dizisi verilerine dayalı filogenetik ağaç (Lawson ve ark., 2016).

2.3. *C. difficile*'nin Kültür zellikleri

Bakterinin üreyebilmesi için oksijensiz (anaerobik) bir ortam gereklidir ve bakteri, %10 CO₂ (karbondioksit), %10 hidrojen ve %80 nitrojene ihtiyaç duyar. *C. difficile*, 25-45°C arasında da byyebilmesine rağmen, optimal büyümeyi 30-37°C ve 7-7.2 pH aralığında gösterir (Mitchell ve ark., 2022). Etkenin izolasyonu için kan, yumurta sarısı, serum, K1 vitamini ve hemin ile zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılır. %0.2'lik Kreozol, lizozim veya sodyum taurokolat üremesi istenmeyen Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin gelişimini engelleyerek *C. difficile*'nin seçici izolasyonuna olanak tanır. Sikloserin, norfloksasin sefoksitin, moksalaktam *C. difficile*'nin besiyerinde baskın hale gelmesini sağlayan antimikrobiyal ajanlardır (Shivaperumal ve ark., 2022). Fruktoz, *C. difficile* tarafından fermente edilebilen bir karbon kaynağı olarak besiyerine eklenir (Wren, 2010). Bu fermentasyon süreci, asit üretimi ile sonuçlanır ve besiyerinde pH değişikliklerine neden olur. Fruktoz, özellikle fenol kırmızısı gibi bir pH indikatörü ile birlikte kullanıldığında fruktozun fermentasyonu sonucu oluşan asit, fenol kırmızısının rengini sarıya çevirerek *C. difficile* kolonilerinin sarı renkte görünmesini sağlar (Wren, 2010).

C. difficile'nin izolasyonu ve identifikasyonu için en yaygın kullanılan besiyerleri; Cycloserine-Cefoksitin Fructose Agar (CCFA), Brazier's Anaerobic Agar (BRA), *Clostridioides difficile* Moksalactam Norfloksacin Agar (CDMN) 'dır (Alataş ve ark., 2018). BRA'da bulunan sikloserin, sefoksitin ve amfoterisin B besiyerine selektivite kazandıran antimikrobiyal ve antifungal ajanlardır. Bu besiyerinde, *C. difficile* kolonileri genellikle gri-beyaz renkte olup, düzensiz kenarlara sahiptir ve karakteristik bir koku yayarlar. *C. difficile*, p-hidroksifenilasetik asiti (trirozini), p-kresole fermente edebildiğinden dolayı sıklıkla "at ve fil gbresesi" veya "ahır kokusunu andıran kendine has bir kokuya sahiptir (Curry, 2017, Hafız ve Oakley, 1976). CDMN ise, *C. difficile*'nin izolasyonunda en sık kullanılan besiyerlerinden biridir. Moksalaktam ve norfloksasin gibi antibiyotikler içeren bu besiyerinde *C. difficile* kolonileri sarı renkte-gri renkte ve şekilsiz kenarlara sahip düzensiz koloniler oluşturur (Lister ve ark., 2014). CCFA, içerdiği sikloserin ve sefoksitin aynı şekilde selektif olup *C. difficile* kolonileri bu besiyerinde gri koloniler oluşturur. At kanlı CDMN broth ve Thioglycollate Broth ise *C. difficile* n izolasyonu ve zenginleştirilmesi için kullanımı uygun sıvı besiyerleridir. *C. difficile*, obligat

anaerob bir bakteri olduğu için genellikle sıvı besiyerlerinin dibinde tortu oluşturarak ürer (Imwattana ve ark., 2023). *C. difficile*, katı besiyerlerinde ise 37°C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübe edildiğinde, hafif kabarık, kenarları düzensiz ve 1-3 mm çapında koloniler oluşturur. Etken, genel amaçlı besiyerlerinde spor oluşturabilir; ancak besiyerine %0.2 oranında sodyum taurokolat eklenmesi spor oluşumunu hızlandırır (Lister ve ark., 2014). *C. difficile*'nin izolasyonunda besiyerlerine alkol ve ısı şoku uygulanması, izolasyon oranını artırır. Bu teknik, diğer mikroorganizmaların büyümesini inhibe ederken, *C. difficile*'nin daha iyi gelişmesini sağlar. Hemin ve vitamin K1 eklenen Brucella kanlı agarda üreme gösteren kolonilerin 18 saat süren inkübasyonu sonucunda ultraviyole (UV) ışık altında donuk yeşil floresans renk verdiği görülür (Govani ve ark., 2015). *C. difficile*'nin kesin teşhisi için günümüzde toksin varlığını inceleyen testlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Krůtová ve ark., 2015; Carroll ve ark., 2020; Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. *Clostridioides difficile* kültür ve genel özellikleri

Özellik		Veri
Genel Özellikler	Gram boyama	Gram pozitif
	Hareket	Hareketli
	Flagella tipi	Peritrik
	Boyut	0.5-1.9 µm genişlik 3.0-1.9 µm uzunluk
Spor özellikleri	Şekil ve konum	Oval, subterminal (nadiren terminal) ve hücreyi şişiren tarzda
	Spor üretimini destekleyen kimyasallar	Safra tuzları (kolat, taurokolat) Glisin, histidin
Koloni özellikleri	Morfoloji	Dairesel, pütürlü kenarlı, rizoid koloni
	Boyut	2-5 mm
	Renk	Opak, grimsi, beyazımsı, mat-parlak yüzeyli, Sarı floresan.
	Hemoliz	Non-hemolitik,
	Spesifik koku	At ahır benzeri karakteristik koku
Büyüme Derecesi	Optimum	30-37 °C
	Büyüme aralığı	25-45 °C
PH	Minimum: 5 Optimal: 7-7.2	
Su aktivitesi	0.969 (minimum)	
Atmosfer ihtiyacı	%10 karbondioksit, %10 hidrojen ve %80 nitrojen bulunan anaerobik ortam	

2.4. *C. difficile*'nin Biyokimyasal Özellikleri

Clostridioides difficile'nin izolasyonunda biyokimyasal aktivitesi önem arz etmektedir. Etken Glikoz, mannoz, fruktoz, mannitol ve genellikle ksilozu fermente edebilir; (Alataş ve ark., 2018) indol, nitrat, oksidaz, katalaz, oksijenaz ve üreaz, lesitinaz ve lipaz aktiviteleri göstermez (Rineh ve ark., 2014). *C. difficile*, laktoz ve nişastayı hidrolize edemez, ancak jelatin ve eskülin'i hidrolize edebilir (Shivaperumal ve ark., 2022; Nitzan ve ark., 2013). Triptofan'dan indol üretmez ve hidrojen sülfür (H_2S) oluşturmaz (Vedantam ve ark., 2012). *C. difficile*'nin metabolik ürünleri; valerik asit, formik asit, izobütirik asit, izovalerik asit, izokaproik asit, propiyonik asit, asetik asit, bütirik asit ve laktik asitdir (Imwattana ve ark., 2023). Sellebiyoz, salisin, ksiloz, sorbitol ve trehaloz gibi substratlara karşı etkileri ise farklılık göstermektedir (Alataş ve ark., 2018). *C. difficile*, amigdalin, arabinoz, galaktoz, glikojen, inositol, inülin, maltoz, melibiyoz, rafinoz, ramnoz, riboz, laktoz ve sükroz gibi karbonhidratlar üzerinde etkili değildir. Bununla birlikte, mellibiyoz ve melesitozu asidik ürünler oluşturarak fermente edebilme yeteneğine sahiptir (Alataş ve ark., 2018).

2.5. *C. difficile*'nin Genomik Yapısı

C. difficile; sahip olduğu genom büyüklüğü (4.1- 4.5 Mbp), az sayıda korunaklı bölge ve transpozon, bakteriyofajlar gibi yüksek düzeyde esneklik içeren genetik elementlerinden dolayı varyasyonlara oldukça açık bir bakteridir (Redding ve ark., 2022). *C. difficile*'de genlerin yalnızca %16-32'sinin korunduğu ortaya koyulmuştur. (Janvilisri ve ark., 2009; Stabler ve ark., 2006). Bu durum, etkenin adaptasyonunu ve antimikrobiyallere direnç potansiyelini güçlendirmektedir. *C. difficile*, sirküler yapıda bir kromozoma sahiptir ve bazı suşlarında sirküler bir de plazmid bulunur (Sebahia ve ark. 2006). Genom boyutlarındaki farklılıklar *C. difficile*'nin toplam genomunun %11'ini oluşturan konjugatif transpozonlar ve bakteriyofajlar ile ilişkilendirilmiştir. (Brouwer ve ark., 2013; Dingle ve ark., 2011). Bu unsurların çoğu antibiyotik direnç genleri ve diğer virülansla ilişkili genler taşır ve bu da *C. difficile*'nin virülans faktörlerindeki varyasyonlara ve salgına sebep olan sekans tiplerinin ortaya çıkmasına katkıda bulunur (He ve ark., 2020; Sebahia ve ark., 2006). Plazmidleri ise yaklaşık olarak 7800 bp'dan oluşur. *C. difficile*'nin

genomunda %29.06, plazmidinde ise %27.9 G+C içeriği bulunur (Sebahia ve ark., 2006; Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. *C. difficile* 630 tip suşunun genomik özellikleri (Sebahia ve ark., 2006)

Özellik	Kromozom	Plazmid
Genom boyutu (bp)	4,290,252	7,881
Gen kodlayan bölgeler (CDS)	3,776	11
G+C oranı (%)	29.06	27.9
Ortalama gen boyutu (bp)	943	563
Kodlama boyutu	0.87	1.39
Pseudogenler	32	0
rRNA operonları	11	0
tRNA sayısı	87	0
Sabit RNA sayısı	54	0

2.6. *C. difficile*'nin Epigenomik Yapısı

Epigenom, bir organizmanın genomundaki DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesini düzenleyen tüm kimyasal değişiklikleri ifade eder. Epigenetik düzenlemeler, hücrelerin genetik bilgiyi nasıl kullandığını belirler ve gen ifadesinde kalıcı veya geçici değişiklikler yaratabilir. Epigenom; adaptasyon, hücre farklılaşması, antijenik elementlerin ortaya çıkışı ve çevresel faktörlere yanıt gibi süreçlerde kritik bir rol oynar. *C. difficile*, çoğunluğu 6 mA tipine ait olmak üzere şimdiye kadar bildirilen 17 yüksek kaliteli metilasyon motifi ile oldukça çeşitli bir epigenoma sahiptir. Bu motiflerden biri olan CAAAA'daki metilasyonun, *C. difficile* enfeksiyonunun bulaşmasında önemli bir adım olan sporulasyonun yanı sıra hücre uzunluğu, biyofilm oluşumu ve konak kolonizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Redding ve ark., 2022). 300 izolat üzerinde *C. difficile*'nin epigenomu hakkında yapılan kapsamlı bir çalışmada; *CamA* adlı 6mA metiltransferazın (*MTase*) tüm izolatların genomunda korunduğunu ve bu genin inaktivasyonunun sporulasyon defektine yol açarak hayatta kalma yeteneğini etkilediğini göstermiştir. (Oliveira ve ark., 2020)

2.7. *C. difficile*'nin Antijenik Özellikleri

2.7.1 *C. difficile*'nin Toksinleri

Tcd Toksin Ailesi

C. difficile'nin toksinleri ve bu toksinlerin konağın bağırsak epiteli üzerindeki etkileri hastalığı önemli bir halk sağlığı patojeni yapan yegâne faktörüdür (Voth ve ark., 2005). *C. difficile*'nin suşlarının %75'i toksijenik etkilidir (Kılıç, 2013). *C. difficile* enfeksiyonlarında enfeksiyonun patogenezi etkileyen en önemli iki toksin enterotoksin niteliğindeki *TcdA* (Toksin A) ve sitotoksin niteliğindeki *TcdB* (Toksin B)' dir (Sailhamer ve ark., 2019). Bu toksinler, oluşturdukları hastalık tablosuna ek olarak, *C. difficile* enfeksiyonlarının tanısı için birincil belirteçlerdir ve hastaların dışkılarında antikör bazlı ve sitotoksisite analizleri ile tespit edilirler. Etkenin, ilk kez izole edildiği dönemlerde bile toksin ürettiği bilinmekteydi. O dönem yapılan bir çalışma organizmanın kültüründen elde edilen filtratların tavşanlardaki lethal etkilerini ortaya koymuştur (Green ve ark., 1974). CDE ilk ortaya konulduğunda, *TcdA* ve *TcdB* toksinlerinin etki mekanizmaları birbirinden bağımsız olarak tanımlanmış ve genetik yakınlıklarından dolayı karıştırılmıştır (Tan ve ark., 2001). Daha sonra *TcdA*'nın başlıca virülans faktörü olduğu ve *TcdB*'nin hücre kültüründe yapılan çalışmalarda güçlü bir sitotoksin olmasına rağmen, kolon mukozasında hastalık tablosu oluşturmak için *TcdA* 'ya ihtiyaç duyduğu düşünülmüştür (Danielsson ve ark., 1972; Govind ve ark., 2006). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, *TcdA* uygulamasının, sıvı birikimi, inflamasyon ve hücre hasarı gibi psödomembranöz kolit tablosunda ortaya çıkan nekropsi bulgularını ortaya koymuşlardır (Czepiel ve ark., 2019; Sebahia ve ark. 2006). Bununla birlikte, *TcdB* içermeyen suş ile enfekte olan hamsterler, *TcdA* içermeyen suşlar ile enfekte olanlara göre birkaç gün daha uzun süre hayatta kalmıştır (Tenover ve ark., 2011). Bu durum da *TcdA*'nın daha letal olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak öte yandan yapılan analizlerde, *C. difficile*'nin *TcdA*- *TcdB*+ suşlarının da zaman zaman klinik izolatlardan tanımlanmakta ve bazı durumlarda yaygın psödomembranöz kolite neden olduğu ortaya koyulmuştur (Dupuy, 2023).

Toksijenik *C. difficile* suşları, beş gen içeren 19,6 kb'lık bir patojenite lokusu (PaLoc) taşır: *TcdR*, *TcdE*, *TcdA*, *TcdB* ve *TcdC*. *TcdA* ve *TcdB*. Bu lokusun genleri

A ve B toksinlerinin kodlanmasından sorumludurlar. *TcdR* geni, *TcdA* ve *TcdB*'nin transkripsiyonunu yönlendiren alternatif bir sigma faktörü kodlar, *TcdC* ise *TcdR*'ye antagonist çalışır (Goudarzi, 2014). *TcdD* geni, *TcdB*'nin kodlanmasında rol alır ve her iki toksin geniyle koordineli olarak eksprese edilir. Yapılan bir çalışma *TcdD*'nin, *TcdA* ve *TcdB*'nin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (Wang ve ark., 2021). *TcdD* ekspresyonu durağan fazda önemli ölçüde artar ve çevresel koşullara duyarlıdır. (Govind ve ark., 2006). Bu nedenle, *TcdD*, *TcdA* ve *TcdB* ekspresyonunun önemli bir pozitif düzenleyicisidir. *TcdE*'yi kodlayan gen, *TcdB* ve *TcdA* arasında yer alır ve por proteinleriyle homoloji gösterir, bu nedenle *C. difficile* hücre duvarının geçirgenliğinin artırılması yoluyla *TcdA* ve *TcdB*'nin salınımını kolaylaştırdığı ortaya koyulmuştur (Govind ve ark., 2006). *TcdE* geni, A ve B toksinlerinin bakteri hücresinden salınmasını kolaylaştırdığı öne sürülen holin benzeri bir proteini kodlar, çünkü bu toksinler sinyal peptidlerine sahip değildir (Wang ve ark., 2021).

TcdA yaklaşık 8133 bp'den oluşurken *TcdB* ise yaklaşık 7098 bp uzunluğundadır. Hem *TcdA* hem de *TcdB* düşük G + C (<%28) içeriğine sahiptirler, bu *C. difficile* genomunun G + C içeriğine (~%29) benzerdir ve toksinler yüksek derecede genetik yakınlık gösterir (%66). İki toksin geni, bu lokus üzerinde yaklaşık 1350 nükleotidlik bir ara dizi ile yakın bir şekilde yerleşmiştir ve aynı yönde transkripsiyona uğrarlar (Dupuy, 2023; Sebaihia ve ark 2006). *TcdA* ve *TcdB*'nin proksimal konumu ve iki protein arasındaki yüksek dizi ve işlevsel homolojileri göz önüne alındığında, iki genin aynı genetik kökenden (duplikasyon ile) ortaya çıkmış olabileceği öne sürülmüştür (Sebaihia ve ark 2006). Ayrıca, her iki toksinin de özdeş substratları modifiye etmek için oldukça korunmuş bir N-terminal alanı kullanması, *TcdA* ve *TcdB*'nin biyokimyasal aktivitesindeki benzerlik, gen duplikasyonu kavramını destekler. *TcdA* ve *TcdB* arasındaki ana homoloji bölgeleri, iki toksinin enzimatik ve reseptör bağlayıcı alanlarına denk gelmektedir (Brouwer ve ark., 2013). *TcdA* ve *TcdB*'nin N-terminal alanları %74 homoloji gösterir ve bu homoloji, bu iki toksinin benzer substrat özgüllüğü için bir temel sağlar. *TcdA* ve *TcdB*'nin C-terminalleri, birleşik tekrarlayan oligopeptitler (CROP'lar) olarak adlandırılan bir dizi kısa, homolog bölgeden oluşur (Stabler ve ark., 2006).

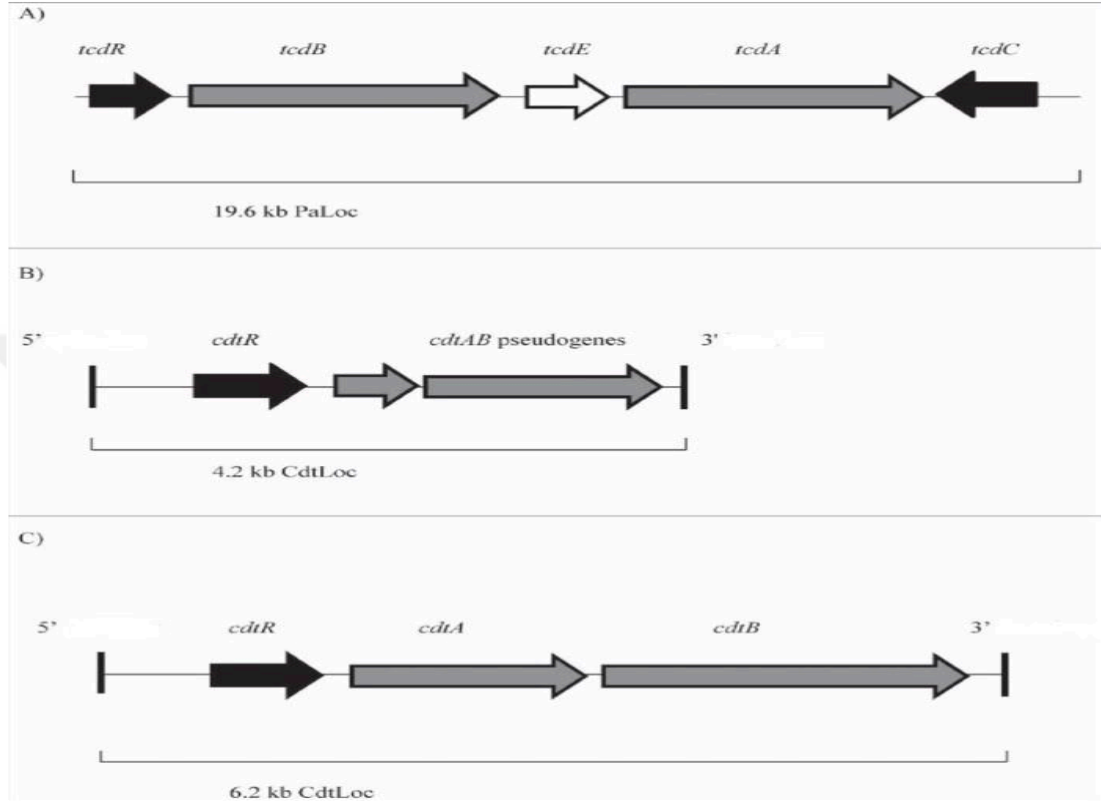
Toksin seviyeleri ile psödomembranöz kolit gelişimi ve ishalin süresi arasında doğrudan bir ilişki vardır (Kılıç, 2013; Yang ve ark.,2015). Hastalığa karşı

korunmada *TcdA*'ya karşı geliştirilen immunglobulin G'nin önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiş, bu toksine karşı oluşan antikor tepkisinin hastalığa karşı yeterli koruma sağladığı tespit edilmiştir. Hem *TcdA* hem de *TcdB*, *Rho* (*RhoA*, *B*, *C*), *Rac* ve *Cdc42* izoformlarını hedef alarak aktin yoğunlaşmasına, hücrelerin yuvarlanmasına, zar çıkıntılarının oluşmasına ve nihayetinde apoptoz ile hücre ölümüne yol açar. *TcdA* ve *TcdB*'nin hastalık sürecindeki rolü, *Rho*'nun odak yapışma bölgelerinde stres liflerinin yerleşimini düzenlemesiyle ilişkilidir (Voth ve Ballard, 2005). Her iki toksinin etki mekanizması, Rho proteinlerinin glikolizasyon tarafından inaktive edilmesi sonucu aktin filamentlerinin depolimerizasyonuna, hücre iskeletinde bozulmaya, hücre yuvarlaklaşmasına ve hücre ölümüne neden olur. *TcdB* ile tedavi edilen bağırsak boğumlarında doku hasarı veya sıvı salgılanması görülmez ancak *in vitro* hücre dizileri için sitotoksiktir (Farooq ve ark., 2015).

CDT (Binary) toksini

C. difficile suşlarının %17 ila %23'ü, Clostridial toksinler ailesine ait ek bir toksin olan *CDT* üretir (Dupuy, 2023; Gerding ve ark., 2014; Sebaihia ve ark 2006). *CDT*, *C. perfringens*'in iota toksinine benzerlik gösteren aktin spesifik bir ADPribosiltransferazdır (Pruitt ve Lacy, 2012). Bu toksinler Clostridial glukolize edici toksinler olarak adlandırılan (LCGT) ailesinin bir parçasıdır (Bella ve ark., 2016). Binary toksin suşlarının hayvanlarda prevalansının daha fazla olduğu bildirilmektedir (Sebaihia ve ark 2006). *CDT*'yi kodlayan *CDTloc*, *CDTa* ve *CDTb* ve düzenleyici bir protein olan *CdtR*'den oluşan 6,2 kb'lik bir bölgeden oluşmaktadır (Martínez-Meléndez ve ark., 2022; Şekil 2.3). Binary toksinin polipeptid yapıdaki *CDTa* (47.9 kDa) ve *CDTb* (98.8 kDa) şeklinde iki komponentten oluştuğu bilinmektedir (Pruitt ve Lacy, 2012). Bu toksin aktin hücre iskeletinin depolimerizasyonu, bakteri adezyonu ve kolonizasyonu aşamasında görevlidir ve hedef hücreye lipolizi uyaran bir membran reseptörü ile girebildiği gözlenmiştir ve ST1 ve ST11 gibi salgın dizi tiplerindeki yaygınlığı, şiddetli CDE'yi teşvik edebileceğini düşündürmektedir (Cowardin ve ark., 2018). RT 027 ve RT 078 gibi hipervirülen *C. difficile* ribotiplerinde de, *CDT* varlığı ortaya koyulmuştur (Pruitt ve Lacy, 2012). Yapılan bir çalışmada pürifiye edilmiş *CDT*'nin kolon epitel hücre hatlarına uygulanması, mikrotübül oluşumunu arttırmış ve bu mikrotübüllerin *C. difficile*'nin kolonizasyonunu artırdığı ortaya koyulmuştur (Cowardin ve ark., 2016).

Bununla birlikte, ikili toksinin hastalık patogenezinine yönelik önemi belirsizliğini korumaktadır. Bir diğer çalışma ise toksijenik olmayan (*TcdA*-, *TcdB*-), ancak *CDT* eksprese eden *C. difficile* izolatlarından elde edilen süpernatantların tavşan deney hayvanı modelinde PMK'ye neden olduğunu ortaya koymuştur (Bella ve ark., 2016).



Şekil 2.3. *C. difficile* suşlarında PaLoc ve CdtLoc bölgelerinin şematik organizasyonu (Mathur ve ark., 2015).

A: 19,6 kb uzunluğundaki *C. difficile* PaLoc'unun şematik organizasyonu. B: *C. difficile*'nin pseudogen içeren 4,2 kb uzunluğundaki binary toksin lokusu (CdtLoc). C: *C. difficile*'nin pseudogen içermeyen, eksprese edilmiş ikili toksin lokusu.

2.7.2 *C. difficile* Adhezinleri

C. difficile'nin adezyonunda etkili *Cwp* (Cell Wall Protein) protein ailesi, *SlpA* (S-Layer Protein A) ve flagella gibi yüzey yapıları, bakterinin konak dokularına tutunmasında, enfeksiyonun başlatmasında ve immün sistemden kaçmasında kritik rol oynar. Bu yapılar, bakterinin virülansını ve kolonizasyon yeteneğini artırırken, bağışıklık sistemi ile etkileşimde bulunarak hastalığın patogenezinin şekillendirir. Özellikle flagella, hareketlilik sağlamanın ötesinde, mukozaya yapışmada ve kolonizasyonun başlangıcında önemli görevler üstlenir. *C. difficile* adhezinlerinin farklı hücre hatlarında (Vero, Hela, Hep-2, Caco-2, HT-29) bakterinin enfeksiyon

sürecinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Bununla beraber adhezinler, bakterinin çevresindeki konak dokularla etkileşim kurarak kolonizasyonun başlangıcını da sağlar. *C. difficile*'nin adhezinleri aracılığı ile bağlandığı başlıca konak proteinleri arasında ekstraselüler matriks (ECM) proteinleri olan fibronektin, vitronektin, kollajenler ve fibrinojen bulunur. ECM proteinlerine bağlanma, bakterinin bağışıklık sisteminden kaçmasına ve dokulara derinlemesine tutunmasına yardımcı olur (Janoir, 2016).

Cwp Ailesi

Cwp proteinleri glikoprotein yapısında olup, hücre duvarının dış kısmında bulunarak etkinliklerini gösterirler. Ayrıca, bu proteinler bakterinin çevresel stres koşullarına karşı direncini artırmakta ve konağa yapışmasını sağlamaktadır. Cwp proteinlerinin bakterideki regülasyonu *Cwp* ve *SlpA* gen aileleri tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar, genellikle glikozilasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğrayarak fonksiyonlarını kazanır. Moleküler olarak, tekrarlayan amino asit motifleri içerirler ve bakterinin hücre yüzeyine yerleşirler. Özellikle Cwp84 ve Cwp66, proteolitik aktiviteye sahip olup, bakterinin dış yüzeyinde bulunan diğer proteinleri işlemek ve aktif hale getirmek, bakterinin konağa yapışmasını ve bu süreçte hücre duvarını yeniden şekillendirmesini sağlamak gibi işlevlere sahiptirler. *C. difficile*'nin antibiyotik direnci kazanması ve immun yanıt oluşturabilmesinin nedenlerinden biri bu proteinler olarak bilinmektedir (Kirk ve ark., 2017).

SlpA

SlpA, bakterinin yüzeyinin büyük bir kısmını oluşturarak hücreye mekanik ve kimyasal koruma sağlayan S-layer kompleksinin en önemli komponentidir ve *C. difficile*'nin yüzeyinde bulunan parakristalin yapıyı oluşturan önemli bir proteindir. *SlpA*, yapısal kararlılığını sağlamak için *Cwp84* proteazı tarafından kesilerek düşük moleküler ağırlıklı *Slp-LMW* ve yüksek moleküler ağırlıklı *Slp-HMW* olmak üzere iki alt birime ayrılır ve sonrasında kovalent olmayan bir şekilde yeniden bir araya gelir. *Slp-HMW* bölgesi, diğer yüzey proteinlerine bağlanma ve hücre duvarı ile etkileşim kurma özelliklerine sahipken LMW alt birimi, yüzey tabakasının yapısal bütünlüğünü korur ve düzenleyici işlevler üstlenir. Ayrıca, *SlpA*'nın konak bağışıklık

sistemi tarafından Toll-like receptor 4 (TLR4) aracılığıyla tanındığı ve bu sayede immün yanıtın aktive edildiği gösterilmiştir (Bradshaw ve ark., 2020).

Flagella

Flagella, *C. difficile*'nin motilitesinde ve konak mukozasına yapışmasında görev alır. Özellikle fare modellerinde yapılan çalışmalarda, flagella içermeyen suşların, flagella taşıyan suşlara göre mukozaya daha az yapıştığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bakterinin mukus tabakasından geçerek derin dokulara ulaşmasına olanak tanır. Flagella üretimi, F3, F2 ve F1 operonlarında organize edilmiş genler tarafından kontrol edilir. *FliA* sigma faktörü, flagellanın temel proteinlerinden biri olan *FliC* ve *FliD* gibi genlerin ekspresyonlarını düzenler. *FliP* geni, flagellanın temel yapıtaşı olan flagellin proteinini kodlar ve flagellanın hareket kapasitesini sağlar. *FliD* ise flagellanın uç kısmında bulunan bir kapak proteini olarak görev yapar. Flagellanın *C. difficile* virulansı için kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir ancak RT 078 gibi bazı salgın suşlarının flagella genlerine sahip olmadan da enfeksiyon oluşturduğu bildirilmektedir (Janoir, 2016). Tablo 2.4.'de *C. difficile*'ye ait adhezinlerin fonksiyonları özetlenmiştir.

Tablo 2.4. *C. difficile* adhezinlerinin fonksiyonları (Janoir, 2016).

Adhezin	Fonksiyon
<i>SlpA</i>	Bağırsak mukozasına, Caco-2 hücrelerine ve ECM proteinlerine bağlanma; TLR4 ile etkileşim
<i>Cwp84</i>	<i>SlpA</i> 'nın olgunlaşması; ECM proteinlerinin parçalanması
<i>Cwp66</i>	Konakçı mukoza hücrelerine bağlanma
<i>CwpV</i>	Faj direnci
<i>Fbp68</i>	Fibronektin adhezyonu
<i>CbpA</i>	Kollajene bağlanma

2.8. İnsan ve Hayvanlarda *C. difficile* Enfeksiyonlarının Fizyopatolojisi

C. difficile'ye bağlı enfeksiyon tablosunun belirtileri, antibiyotik tedavisi gören hastalarda hafif ishalden ülseratif kolite kadar değişir. Hastalık yalnızca kalın bağırsakta görülür ve ayırt edici mikroskobik ve makroskobik lezyonlar gösterir.

TcdA ve *TcdB* epitel sıkı bağlantılarını bozar ve epitel hücre ölümünü başlatır, böylece kolon epiteline doğrudan zarar verir. Bunun yanında, toksinler kolon epitel hücrelerini proinflatuar sitokinler ve nötrofil kemotaktik maddeleri salgılamaya teşvik eder, bu da nötrofillerin submukozaya infiltrasyonu, dolayısı ile akut inflammatuar yanıtı yol açar (Kelly ve Kyne, 2011; Voth ve Ballard, 2005). Bozulmuş bağırsak bariyer bütünlüğü, damar geçirgenliğinin artmasına neden olur ve filtrat salgılanmasını teşvik eder. Koruyucu bir bariyerin kaybı ayrıca toksinlerin ve/veya bakterilerin lamina propriaya girmesine izin verir ve bu da enterit tablosunda artışa sebebiyet verir. Mukozal bağışıklık sisteminin proinflatuar mediatörlere uzun süre maruz kalması doku hasarını artırır ve prognozu ciddileştirir (Yu ve ark., 2017). Epitel bariyerinin bozulması, lümene nötrofil infiltrasyonu ile yoğun bir inflammatuar yanıt ve ilişkili doku hasarının, ciddi CDE vakalarında gözlenen psödomembran oluşumuna katkıda bulunduğu da düşünülmektedir (Sun ve Hirota 2015; Voth ve Ballard 2005).

TcdA ve *TcdB*, konak hücrelerini sırası ile reseptör bağlanması ve endositoz, gözenek oluşumu ve *GTD* (*N-terminal glukoziltransferaz alanı*) ve *APD*'nin (*otoproses alanı*) endosomal membran boyunca taşınması, *GTD*'nin sitozole otomatik işlenmesi ve salınması ve konak *GTPaz*larının (*Guanozin trifosfat*) (*RhoA*, *Rac1* ve *Cdc42*) glukozilasyonu ile enfekte eder. Psödomembranöz kolit sırasında *TcdA* ve *TcdB* toksinleri epitel bariyerlerinin sıkı bağlantılarını bozar. *TcdA* ve *TcdB*'nin hastalığındaki rolü, *Rho*'nun fokal adezyon bölgelerinde *Rho* proteinlerini etkisizleştirerek stres liflerinin lokalizasyonunu bozması ile başlar. Bu da *GTPaz*ların sıkı bağlantılarının korunmasında önemlidir. *RhoA*, odaksal yapışmaların ve aktin stres liflerinin birleşmesini sağlarken, *Rac1* ve *Cdc42* sırasıyla aktin açısından zengin yüzey çıkıntıları olan lamellipodia ve filopodia oluşumunu sağlar (Etienne-Mesmin ve ark., 2018; Nobes ve Hall 1995). Ek olarak, *Rho* ve *GTPaz*lar epitel hücre morfolojisi ve polaritesinin kurulması için önemlidir. Sonuç olarak, *GTPaz*'ın *TcdA* ve *TcdB* tarafından inaktivasyonu hücrede iskelet yapının kaybına, odaksal yapışmaların parçalanmasına ve sıkı bağlantıların bozulmasına neden olur (Etienne-Mesmin ve ark., 2018).

Glikozilasyona bağlı sitopatik etkinin hastalık tablosunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Toksin kaynaklı sıkı bağlantıların bozulması bariyer

fonksiyonunun bozulmasına, bağırsak geçirgenliğinin artmasına ve inflamasyona neden olur. *TcdA* ve *TcdB* tarafından *GTPaz* inaktivasyonu hücrenin metabolik aktivitelerini de etkiler. *TcdA* ve *TcdB* tarafından invazyona uğrama, hücre döngüsünün G1 fazı boyunca ilerleme için gerekli olan siklin D1'in ekspresyonunda azalma ile ilişkilendirilmiştir ve bu durum G1-S yetmezliğine neden olur. Bu duruma ek olarak, *Rac1*'in mitotik kinaz Aurora A ve siklin B/siklin bağımlı kinaz (*Cdk*) I kompleksinin aktivasyonunu, efektör proteini *PAK* (*p21 aktiveli kinaz*) aracılığıyla teşvik ettiği gösterilmiştir (Mattana ve ark. 2022). Sonuç olarak, *C. difficile* toksinleri tarafından *Rac1*'in inaktivasyonu, G2 fazında Aurora A ve *CyclinB/Cdk1* kompleksinin aktivasyonunu geciktirir ve gecikmiş G2-M geçişine neden olur. Son olarak, bu toksinler tarafından *RhoA* inaktivasyonu, kasılma halkası oluşumunu ve ardından sitokinezi inhibe ederek binükleer hücrelerin oluşumuna neden olur. Bu nedenle, toksinler hücre döngüsünün çeşitli aşamalarını düzenleyen *GTPaz*ları inaktive ederek konak hücre çoğalmasına müdahale edebilir (Pruss ve ark., 2021).

TcdA ve *TcdB* enterotoksik ve sitotoksik nitelikte oldukları için memeli bağırsak hücre iskeletinde meydana getirdiği değişiklikler dışında, immün sistem aktivasyonuna sebep olarak da hastalık tablosu oluştururlar. *TcdA* yalnızca enterositleri etkilemekle kalmaz, aynı zamanda makrofaj ve mast hücrelerini aktive ederek nötrofillerin harekete geçmesine sebep olur. Bu süreç, mukoza hasarı, fokal mikro apseler ve psödomembran oluşumuna neden olur. Bu sırada PGE2, lökotrien B4, lökotrien C4, PAF, IL-1, IL-8, tümör nekroz faktörü (TNF) ve histamin gibi maddeler salgınır. Bu nedenlerle *TcdA*, protein açısından zengin bir dışkılamaya yol açar (Farooq ve ark., 2015). Buna ek olarak; Aktin hücre iskeletinin bozulması ve bağırsak epitelinde bulunan tight junction gibi bağlantıların bozulmasına ve sonucunda sıvı birikmesiyle birlikte kalın bağırsakta yoğun harabiyet ve iltihaplanmaya neden olduğu ortaya koyulmuştur (Etienne-Mesmin ve ark., 2018). *TcdA* ve *TcdB*'nin bağlanmış olduğu reseptörler bazolateral yüzeyde bulunduğu enterositlerin apikal yüzeyine bağlandığı bilinmektedir. Tablo 2.5.'de *C. difficile* patogenezi hakkında bilgi verilmiştir.

Tablo 2.5. *C. difficile* enfeksiyonunun patogenezi

Aşama	Açıklama
Kolonizasyon	<i>C. difficile</i> , antibiyotik kullanımı veya diğer faktörlerle bozulmuş bağırsak mikrobiyotasına yerleşir ve replike olur. Spor formunda dirençli olduğu için mide asidini geçer ve kalın bağırsakta vejetatif formuna dönüşür.
Toksin Salınımı	Toksin A (<i>TcdA</i>) ve Toksin B (<i>TcdB</i>) salınır.
Toksin A (<i>TcdA</i>)	Enterositlere bağlanarak hücrelere girer, Bağırsak epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları bozarak geçirgenliği artırır, aktin filamentlerini değiştirir, hücre ölümüne yol açarak mukoza hasarı ve inflamasyonu tetikler, proteinden zengin eksudatın bağırsak lümenine sızmasına yol açar.
Toksin B (<i>TcdB</i>)	<i>TcdA</i> 'nın yol açtığı hasarı artırarak Hücre iskeleti düzenini bozar, <i>Rho GTPaz</i> 'ları inaktive ederek aktin filamentlerini parçalayıp hücre ölümüne yol açar.
Enflamatuvar Yanıt	Makrofaj ve mast hücrelerinin aktivasyonu, nötrofil mobilizasyonu ve sitokin salınımı (IL-1, IL-8, TNF vb.) ile inflamasyon artar. Mukozada hasar, fokal mikro apseler ve psödomembran oluşumu gerçekleşir.
Hücre Hasarı ve Apoptoz	<i>Rho</i> proteinlerinin inaktivasyonu ile aktin iskeleti bozulur, hücre yuvarlanması ve apoptoz meydana gelir.
Mukoza Bariyeri Bozulması	Mukoza hasarı ve psödomembran oluşumu, bağırsak lümenine protein açısından zengin eksudatın sızmasına neden olur.
İshal Tablosu	Hafif ishalden, psödomembranöz kolit, toksik megakolon, sepsis ve ölüm gibi ciddi CDE komplikasyonları meydana gelir.

2.9. *C. difficile*'nin Sahip Olduğu Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

C. difficile, çok çeşitli mekanizmalarla antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Bunun yanında, biyofilm ve spor formasyonları gibi doğal direnç mekanizmaları, etkenin antibiyotik kullanımında hayatta kalmasına ve enfeksiyon oluşturabilmesine yol açar. Çok sayıda gen ve bu genlerin mutasyonları, bu direnç mekanizmalarının araçlarını kodlar. *C. difficile*, genomunda barındırdığı transpozon, profaj, plazmid gibi mobil elementler sayesinde, antibiyotik direnç genlerini aktarabilir. Ayrıca, yatay gen transferinin yanı sıra, *C. difficile* suşlarının sahip oldukları epigenomik esneklik, suşların antibiyotiklere karşı daha hızlı direnç oluşturabilmesini sağlamaktadır (Sebahia ve ark. 2006). *C. difficile*'deki MLSB (makrolid-linkozamid-streptogramin B) direnç geni ailesinin *Tn5398*, *Tn5398*, *Tn6194* ve *Tn6215* gibi transpozonlar aracılığı ile aktarılması, etkenin en sık kullanılan antibiyotik gruplarına karşı direnç mekanizması oluşturmasını sağlamaktadır. Transpozonlar ayrıca 23S rRNA

metilazını kodlayan ve klindamisin ve eritromisin dahil olmak üzere MLSB antibiyotik ailesine karşı direnci indükleyen *ermB* geninin transferini de sağlayabilir. Konjugasyon yoluyla gen transferi de *C. difficile* resistomuna büyük katkılarda bulunmaktadır. *Tn5398* ve *Tn6215* transpozonları, konjugasyon yoluyla *C. difficile* genomuna entegre olmaktadır. Bu elementlerin aynı ortamda bulunan *C. difficile*'den *S. aureus*'a ve *B. subtilis*'e transfer edilebildiği ortaya koyulmuştur (Wasels ve ark., 2014). Profajlar da *C. difficile* resistomunun oldukça önemli bir bölümünü oluşturur. Örneğin *phiC2* profajının metronidazol direnci ile ilgili genleri aktardığı bilinmektedir. Metronidazole karşı *C. difficile*'nin geliştirdiği diğer direnç mekanizmaları ise nitroredüktaz aktivitesi ve DNA onarımıdır (Wickramage ve ark., 2021). *C. difficile*'nin direnç mekanizması ve direnç mekanizmasının regülasyonu Tablo 2.6'da verilmiştir (Tablo 2.6.).

Tablo 2. 6. *C. difficile*'nin direnç mekanizması ve direnç mekanizmasının regülasyonu

Antibiyotik	Direnç Mekanizması	Direnç Mekanizmasının Regülasyonu
Vankomisin	Peptidoglikan prekürsörlerinde vankomisin bağlanma bölgesinin değişimi.	<i>VanG</i> -CD operon enzimlerindeki mutasyonlar.
Metronidazol	Efflux pompası ile bakterinin dışarı çıkarılması ve demir aktivitesinin düşürülmesi.	Stres koşulları altında <i>glyC</i> geninin ekspresyonunda meydana gelen değişimler.
Fidaksomisin	RNA polimeraz alt biriminde meydana gelen mutasyonlar	<i>RpoB</i> bölgesinde meydana gelen genetik değişim mekanizml.
Rifamisin	Mutasyonlar sayesinde antibiyotiğin bağlandığı reseptörün ortadan kaldırılması.	<i>RpoB</i> 'nin RRDR'sindeki meydana gelen mutasyonlar.
Klindamisin	23S rRNA'nın antibiyotiğin bağlandığı bölgesinin metilasyon ile değiştirilmesi	<i>Erm(B)</i> geninin transpozon aracılığı ile taşınması
Sefalosporinler	B-laktamaz enzimleri ile ilaç inaktivasyonu ve efflux pompası	<i>CDD1-CDD2</i> gibi SNP'ler ve profajlar aracılığı ile taşınan CD2068 geni
Florokinolonlar	İlaç hedef bölgesinin değiştirilmesi ve efflux pompası	<i>gyrA</i> ve/veya <i>gyrB</i> SNP tipleri tarafından kontrol edilir
Tetrasiklinler	İlacın ribozoma bağlanmasının ribozomal koruyucu proteinler üretimiyle önlenmesi	<i>Tet(M)</i> , <i>Tet(W)</i> ve <i>Tet(44)</i> konjugatif genleri.

2.10. *C. difficile* Direnç Durumu

Günümüzde CDE tedavisinde kullanılan en etkili ajanların vankomisin ve fidaksomisin olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda bu antibiyotiklere de direnç geliştiren suşların ortaya koyulması, CDE tedavisinde seçeneklerin azalmasına sebep olmaktadır. Kuzey Amerika'da CDE tedavisinde rutin olarak florokinolonların kullanılması, florokinolona dirençli RT027 suşlarının ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Tenover ve ark., 2012). Doğu Avrupa'da, moksifloksasin, metronidazol, eritromisin, klindamisin, imipenem ve rifampisin gibi birçok antibiyotiğe dirençli RT 027 RT 001, RT 017, RT 018 ve RT 078 kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (Peng ve ark., 2018). Son 15 yılda Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'dan elde edilen *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal direnci üzerine yapılan çalışmalar, izolatların moksifloksasin direnç oranlarının %2 ile %87 arasında, klindamisin direnç oranlarının %15 ile %97 arasında değiştiğini göstermiştir (Sholeh ve ark., 2020). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan retrospektif bir çalışmada, ribotip 027 suşlarının yaklaşık %98'i moksifloksasine dirençli bulunmuştur (Wieczorkiewicz ve ark., 2015). Hollanda'da izole edilen ribotip 078 suşlarının siprofloksasin, eritromisin, imipenem ve moksifloksasine direnç gösterdiği ortaya koyulmuştur (Keessen ve ark., 2014; Spigaglia ve ark., 2016). Çin'de ise insanlardan izole edilen *C. difficile* izolatlarının %15.6'sının metronidazole dirençli olduğu ortaya koyulmuştur. (Jin ve ark., 2017) İsrail'de *C. difficile*'nin moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılan ulusal bir araştırmada, test edilen suşların yaklaşık %18.3'ünün metronidazole dirençli olduğu belirtilmiştir (Adler ve ark., 2015).

2.11. *C. difficile*'nin İnsan ve Hayvanlarda Epidemiyolojisi

Son yıllarda CDE, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, çoğu Avrupa ülkesi ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Curcio ve ark., 2019). Bakteri kolonda, sağlıklı yetişkinlerde %2-3, yenidoğanlarda ise %40-60 oranında metabolik inaktif spor formunda bulunabilmektedir. İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik taşıyıcılardan veya sporların doğada yayılımı sonucu çevreden almak sureti ile enfekte olabilirler (Michael ve ark., 2016). Yeni doğanlarda etkenin yüksek taşıyıcılık oranları (%15-75) bildirilmektedir (Drall ve ark., 2019). Neonatal dönemde kolonizasyon görülmesine ve bakterinin toksin üretmesine rağmen, genellikle bu durum asemptomatik olarak seyreder. Yenidoğanlar ve

bebeklerde bu direncin tam nedeni bilinmemekle birlikte, bunun sebebinin bebeklerin eritrosit membranındaki toksin reseptörlerinin henüz tam gelişmemiş olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Lees ve ark., 2016). Reseptörler yaşla birlikte gelişir ve bu nedenle üç yaşından itibaren çocuklarda duyarlılığın arttığı gözlemlenir. Anne sütünün bu süreçteki etkisi tam olarak anlaşılmamış olsa da mama ile beslenen bebeklerde süt ile beslenenlere kıyasla belirgin bir enfeksiyon artışı saptanmamıştır (Drall ve ark., 2019). *C. difficile* ile düzenli olarak temas eden kişiler (hemşireler, bakıcılar, tarım işçileri ve veteriner hekimler) bu bakteriyi sporlar aracılığıyla spor salonlarına, iş yerlerine ve evlerine taşıyabilir. Etkenin daha sık görüldüğü hayvan grupları arasında ise veteriner kliniklerindeki hospitalizasyon ünitelerinde tedavi gören köpekler (%19-22) (Clooten ve ark., 2008), veteriner kliniklerinde günlük tedaviye gelip giden köpekler (%14-33) (Hussain ve ark., 2015; Usui ve ark., 2016) ve kızak köpekleri (%58) (McKenzie ve ark., 2010) yer almaktadır. *C. difficile* bulaşması açısından bildirilen risk faktörleri arasında insan sağlık tesisleriyle iç dış olma, çocuk grupları ile birlikte yaşama (Lefebvre ve ark., 2009), immünosupresif veya antimikrobiyal ajanlarla uzun süreli tedaviye maruz kalma (Hussain ve ark., 2015; Clooten ve ark., 2008) gösterilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar CDE epidemiyolojisinin dramatik olarak değiştiğini, hastalığın insidansı ile birlikte şiddetinin de arttığını göstermektedir (CDC Reports., 2020). Kanada’da 4 yılda CDE insidansının her 100.000 kişide 35.6’dan 156.3’e çıktığı bildirilmiştir (Xia ve ark., 2019). *C. difficile*, aynı şekilde Asya’da da günde 10.000 hastada, %8.9 mortalite oranı ile ön plana çıkmaktadır (Borren ve ark., 2017). Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-30’undan sorumlu tutulan *C. difficile*, 1980’den sonra, ABD’de en önemli hastane kaynaklı (nosokomiyal) ishal etkeni olarak açıklanmış, 2000’lerden sonra ise tedaviye dirençli ve tekrarlama oranı yüksek *C. difficile* ribotiplerindeki artış ortaya koyulmuştur (Borren ve ark., 2017). Günümüzde etken AB’de yılda 120.000’den fazla enfeksiyondan sorumludur ve hastane kaynaklı ishalin önde gelen nedenidir (Gerding ve ark., 2018). Önemli bir nozokomiyal patojen olmasının yanı sıra, son zamanlardaki toplum kaynaklı CDE’nin travmatik şekilde arttığını ortaya koymuştur. Genellikle daha az şiddetli olmakla birlikte, toplum kökenli CDE tüm vakaların tahminen %20-27’sinden sorumludur (Buddle ve ark., 2023). Ülkemizde de

insanlarda *C. difficile* enfeksiyonları ile ilgili son yıllarda çeşitli çalışmalar yapılmış, ishal olgularından *C. difficile* izole edilmiştir (Sayın ve ark., 2020; Ülger ve ark., 2014; Ayarç ve ark., 2011).

Etken, spor formundayken mide asidi de dahil olmak üzere kimyasal ve fiziksel dezenfektanlara dirençli iken, vejetatif formda ısı, alkol, eter, gastrik asit, antibiyotikler, antibakteriyel sabun, alkol bazlı el dezenfektanı gibi maddelere karşı oldukça hassastır (Dilnessa ve ark., 2022). Öte yandan, bakterinin spor formuna karşı etkili dezenfektanlar da ortaya koyulmuştur. Alkalen gluteraldehit, sodyum hipoklorit ve iyot bileşikler sporların inaktivasyonuna sebep olabilmektedir (Maestri ve ark., 2022). Etanol ve oksijenle temas eden vejetatif formların öldüğü gözlemlenmiştir. Antibiyotikler, *C. difficile*'nin vejetatif formlarını öldürür ama spor formları antibiyotiklere dirençlidir (Stein, 2012). *C. difficile* sporları normal mide koşullarında hayatta kalabilir ancak vejetatif hücreler asit nedeniyle hayatta kalamaz. Vejetatif hücreler, pH> 5 olan tüm ortamları tolere edebilir (Martinez ve ark., 2022).

Clostridioides difficile epidemiyolojisi, özellikle insanlar ve hayvanlar arasında giderek daha fazla önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Hayvanlar, özellikle evcil kediler ve köpekler, *C. difficile* için potansiyel rezervuarlar olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda olduğu gibi, hayvanlarda da *C. difficile* enfeksiyonları, antibiyotik kullanımı, bağışıklık sistemi bozuklukları ve gastrointestinal rahatsızlıklarla ilişkilidir (Maestri ve ark., 2022). *C. difficile*, sağlıklı hayvanlarda da taşıyıcı olarak bulunabilir, bu da bakteri ile temas halindeki insanlar için enfeksiyon riski oluşturabilir. Hayvanlarda genellikle *C. difficile*'in asimptomatik taşıyıcıları daha yaygınken, ishal gibi klinik semptomlar da görülebilir (Wesse 2020). Hayvanlardan insanlara bulaş, özellikle evcil hayvanlarla yakın temasta bulunan bireyler için mümkündür, bu nedenle zoonotik bir patojen olarak *C. difficile*'in halk sağlığı üzerindeki etkisi önemlidir. Yapılan araştırmalar, hayvanlardan elde edilen *C. difficile* izolatlarının, insanlardaki klinik suşlarla genetik olarak benzerlik gösterdiğini ve antibiyotik direnç genlerinin taşınabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, hayvanların *C. difficile* enfeksiyonlarının yayılmasındaki rolünü ve potansiyel zoonotik riski vurgulamaktadır (Hain-Saunders ve ark., 2022).

2.12. İnsanlarda *C. difficile*'nin Neden Olduğu Hastalıklar

İnsanlarda *C. difficile* enfeksiyonları, çok çeşitli belirtilerle kendini gösterebilir. Bu belirtiler, asemptomatik taşıyıcılıktan, yaşamı tehdit edebilen toksik megakolona kadar geniş bir klinik spektrumda yer alır. Hafif ishal vakalarından, şiddetli pseudomembranöz kolit ve çoklu organ yetmezliği gibi ciddi komplikasyonlara kadar uzanan bu tablo, özellikle yaşlılar, bağışıklık sistemi zayıf bireyler ve antibiyotik kullanımı sonrası bağırsak mikrobiyotası bozulmuş hastalarda daha sık görülmektedir. (Sinnathamby ve ark., 2023).

2.12.1. *C. difficile* ile İlişkili Kolit (CDAC)

CDAC, genellikle *C. difficile*'ye bağlı ishalde görülen semptomlara benzer belirtilerle ortaya çıkar. Ancak bu durum, ek olarak ateş ve beyaz kan hücrelerinde belirgin bir artış (lökositoz, $15 \times 10^9/L$) ile karakterizedir. Fiziksel muayenede en sık karşılaşılan bulgu, karın bölgesinde hassasiyetin artmasıdır. Hastalarda ciddi derecede sıvı kaybı (dehidrasyon) yaşanır ve dışkıda gizli kan testi pozitifdir. Kolonoskopik inceleme sırasında, bağırsak mukozasında kızarıklık (eritematöz mukoza), dokuların kırılganlığı ve temasla kolayca kanama gibi karakteristik değişiklikler göze çarpar (Baker ve ark., 2020).

2.12.2. Psödomembranöz Kolit

C. difficile enfeksiyonunun ilerlemiş bir formu olan psödomembranöz kolit, bağırsak duvarında psödomembran adı verilen kalın, seröz plakların oluşmasıyla karakterizedir ve ishal semptomunun görülmesinin ardından 4 ila 10 gün arasında görülmeye başlar. Bu durum, bağırsak mukozasının ciddi hasar görmesine neden olur ve inflamasyonla birlikte şiddetli karın ağrısı, kanlı ishal ve ateş gibi belirtilerle kendini gösterir. *TcdA* ve *TcdB* toksinleri, bağırsak hücrelerine doğrudan zarar vererek hastalığın oluşmasına yol açar. Psödomembranöz kolit, agresif olarak ortadan kaldırılmadığı sürece hipoalbuminemi, gizli kolonik kanama ve bağırsak membran geçirgenliğinin artması ile oluşan ishal sonucu sıvı ve elektrolit kaybına bağlı ölüm tablosu görülebilir. (Clifford ve ark., 2017).

2.12.3. Ülseratif Kolit (FCDC)

Ülseratif *C. difficile* koliti (FCDC), nadir rastlanan bir kolit çeşidi olup hastaların %3-8'inde ortaya çıkar (Adams ve Mercer, 2007; Weese., 2020.). Bu durum özellikle

yaşlılarda, kemoterapi nedeniyle bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde, konjestif kalp yetmezliği olanlarda, böbrek yetmezliği bulunanlarda, transplantasyon veya cerrahi operasyon geçirmiş kişilerde ve yüksek antibiyotik direnci olan hastalarda daha yaygın olarak gözlemlenir (Girotra ve ark., 2012).

2.12.4. Toksik Megakolon

C. difficile enfeksiyonunun en ciddi komplikasyonlarından biri toksik megakolondur. Toksik megakolon, kolonun genişlemesi ve bağırsak peristaltik hareketinin durmasıyla sonuçlanır. Bu durumda, bağırsak içeriği boşaltılamaz ve bu da bağırsak duvarının delinmesine (perforasyon) ve ciddi enfeksiyon tablosu ve sepsise yol açabilir. Toksik megakolon, karın bölgesinde aşırı şişkinlik, şiddetli karın ağrısı, ateş ve ciddi dehidrasyon gibi belirtilerle kendini gösterir. Bu durum, cerrahi müdahale gerektirir ve acil bir tıbbi durum olarak değerlendirilmelidir (Khanna ve ark.,2012).

2.12.5. İshal

C. difficile, antibiyotikle ilişkili ishalin en yaygın nedenidir. Antibiyotiklerin kullanımı, bağırsaktaki doğal mikrobiyal dengeyi bozarak *C. difficile*'nin kontrolsüz replikasyonuna ve toksin üretmesine yol açar. Bu toksinler, bağırsak mukozasına zarar vererek sıvı salgısını artırır ve ishalin gelişmesine neden olur. *C. difficile* enfeksiyonuna bağlı ishal hafiften şiddetliye kadar değişebilir. Hafif vakalar genellikle kendiliğinden düzelirken, şiddetli vakalar tedavi gerektirebilir (Bagdasarian ve ark.,2015).

2.12.6. Sepsis

C. difficile enfeksiyonu ilerlediğinde ve tedavi edilmediğinde, *TcdA* ve *TcdB* toksinlerinin kana karışması sonucu sepsis gelişir. Sepsis, vücudun enfeksiyona karşı aşırı tepkisi sonucu organ yetmezliği ve düşük tansiyon gibi hayati tehlike arz eden komplikasyonlarla kendini gösterir. *C. difficile*'ye bağlı sepsis, bağırsak duvarının perforasyonu ve buna bağlı bakterinin kan dolaşımına geçmesi sonucu oluşur (Nelson ve ark., 2017).

2.12.7. Rekürrent Enfeksiyonlar:

C. difficile enfeksiyonları, tedavi sonrasında tekrarlama eğilimindedir. İlk enfeksiyon tedavi edildikten sonra bile bağırsakta kalan sporlar nedeniyle enfeksiyon tekrar edebilir. Tekrarlayan enfeksiyonlar genellikle daha şiddetli olabilir ve tedavisi daha

zordur. Tekrarlayan CDE, tedavisinde günümüzde fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Furuya-Kanamori ve ark., 2015; Sinnathamby ve ark., 2023).

2.12.8. Aseptomatik Taşıyıcılık

Etkenin yenidoğan mikrobiyomunun bir parçası olduğu bilinmektedir (Hall ve O'Toole, 1935; Snyder ve ark., 1937). Yenidoğanların yaklaşık %40'ında veya daha fazlasında ve yetişkinlerin %2-3'ünde *C. difficile* taşıyıcılığı mevcuttur ve antibiyotik tedavisi görmüş yetişkinlerde bu oran %25'e kadar yükselebilmektedir. Aseptomatik taşıyıcılar, enfeksiyona neden olan patojeni barındıran ancak hastalık belirtileri sergilemeyen kişilerdir (Terveer ve ark., 2017). Bu tür taşıyıcılık, bireyin bağışıklık durumu, patojenin özellikleri ve çevresel faktörler gibi unsurlara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. *C. difficile* taşıyan aseptomatik bireyler, bu bakterinin yayılmasında potansiyel bir kaynak olarak kabul edilmektedir ve bu bireylerden elde edilen suşların genellikle toksijenik olduğu belirlenmiştir (Furuya-Kanamori ve ark., 2015). Aseptomatik taşıyıcılara, antimikrobiyal tedavi yöntemleri bakteri sporlarını yok edemediğinden ve bu durumun bireyleri *C. difficile* enfeksiyonuna daha duyarlı hale getirebileceği düşünüldüğünden tedavi önerilmemektedir (Silva ve ark., 2017).

2.13. *C. difficile*'nin Hayvanlarda Neden Olduğu Hastalıklar

C. difficile, genellikle genç hayvanlarda duodenumda ve jejunumun proksimalinde görülen pseudomembranöz kolit tablosuyla karakterize aseptomatik kolonizasyondan inatçı ishal tablosuna kadar değişebilen klinik semptomla seyretmektedir (Weese., 2020).

Atlarda etken perakut hemorajik enterokolit, toksemi, ishal ve kolik şeklinde kendini gösterir (Weese., 2020). *C. difficile* atlarda patojenik olarak belirtilmiş olsa da, bağırsak mikrobiyomunda enfeksiyon oluşturmada kommensal olarak da görüldüğü bildirilmiştir (Hain-Saunders ve ark., 2022). Etken sağlıklı taylarda %0-29, antibiyotikle tedavi edilen taylarda %44, sağlıklı atlarda %0-7.6 (Weese ve ark., 2010; Medina-Torres ve ark., 2011) ve tedavi gören atlarda %4.9-8.4 (Keceroğlu ve ark., 2019) oranlarında görülmektedir. 001, 012, 014, 017 ve 027 gibi insanlarda enfeksiyon oluşturduğu bildirilen ribogruplara atlarda da rastlandığı bildirilmiştir (Weese., 2020).

Domuzlarda ise etken daha çok yeni doğanlarda tiflokolit ve mezokolonik ödem şeklinde kendini gösterirken antibiyotik kullanımına bağlı olmadan da hastalık oluşturabilir. Bununla beraber insanlarda hastalık oluşturduğu bilinen sekans tiplerinin domuzlardan da izole edildiği bildirilmiştir (Arruda ve ark., 2013).

Hastalık buzağılarda diyare ile seyrederken, inekler ve düvelerin hastalıktan daha az etkilendikleri bildirilmiştir. Diyet değişikliği, mastitis, buzağı sayısı ve antimikrobiyal maruziyet gibi çiftlik yönetimi ve sağlık durumu faktörleri, *C. difficile* bulaşması riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Magistrali ve ark., 2015). Yine aynı şekilde 033, 001, 014/020 ve 027 gibi özellikle insanlardan izole edilen ribogruplar ineklerde de bildirilmiştir (Knight ve ark., 2016).

Köpeklerde etken genellikle akut hemorajik ishalden sorumlu olup uzun süreli antibiyotik tedavisinin bir yan etkisi olarak ortaya çıkabilmektedir (Weese., 2020). Köpeklerde, *C. difficile*'ye bağlı görülen ishal tablosunda etkenin primer mi yoksa sekonder ajan mı olduğu yönündeki araştırmalar sürmektedir (Alvarez-Perez ve ark., 2017).

Kedilerde de köpeklere benzer bir tablo söz konusudur. Kedilerde *C. difficile* ile ishal arasında bir ilişki olduğuna dair çalışma oldukça azdır. Bilinen klinik semptomlar köpeklerde olduğu gibi kedilerde de hemorajik ishal ile sınırlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalar kedi ve köpeklerde hem sağlıklı hem hasta hayvanların dışkısında etkenin varlığını ortaya koymuştur (Álvarez-Pérez ve ark., 2017; Thanissery ve ark., 2020; Silva ve ark., 2020). İshalli ve sağlıklı kedilerden elde edilen *C. difficile* suşlarının ribogruplandırılması ile ilgili verileri sınırlıdır, ancak yapılan çalışmalar köpeklerde ve kedilerde benzer şekilde 010, 106 ve 014/020 gibi yaygın insan ribotiplerinin sıklıkla bulunduğunu ortaya koymuştur (McKenzie ve ark., 2010; Hussain ve ark., 2015).

2.14. Gıdalarda *C. difficile* Varlığı

Toplum kaynaklı *C. difficile* vakalarındaki artış ve perakende gıdalarda *C. difficile* varlığını gösteren çalışmalar (Marsh, 2013), *C. difficile*'nin gıda kaynaklı olduğu düşüncesini desteklemektedir. *C. difficile*'nin doğrudan gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğunu bildiren bir çalışma ortaya konulmamasına rağmen çiftlik hayvanları ve gıdalarda görülmesi, sporlarla kontamine olmuş gıdaların *C. difficile*

enfeksiyonlarının yayılmasında bir araç olabileceği düşüncesini desteklemektedir (Candel-Pérez ve ark., 2019; Bauer ve Kuijper, 2015). Clostridial kökenli bazı etkenlerin (*C. perfringens* ve *C. botulinum*) fekal-oral yolla bulaşması ve ciddi gıda enfeksiyonlarına sebebiyet vermesi, *C. difficile*'nin de gıda aracılığıyla bulaşabileceği teorisini güçlendirmektedir (Warriner ve ark., 2017). *C. difficile* ile ilgili bir rapor, bu organizmanın tatlı su, deniz suyu, atık su gibi çeşitli su kaynakları, toprak ve doğal çevrede yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir (Candel-Pérez ve ark., 2019). Deniz ürünlerinde, özellikle midyelerde, filtrasyon yoluyla beslenme ve patojenleri yoğunlaştırma süreçleri nedeniyle *C. difficile* sporları ile kontamine oldukları tespit edilmiştir (Candel-Pérez ve ark., 2019; Eckert ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada etken, su ürünleri, deniz canlıları ve balıklardan % 4.8 oranında (Esfandiari ve ark., 2014) izole edilirken, bir diğer çalışmada da köftelik kıyma ve toprak örneklerinde sırasıyla % 3 ve % 22 oranlarında (Rahimi ve ark., 2015) tespit edilmiştir. Atık suların tarımsal sulamada kullanılması, ruminant dışkılarının gübre olarak kullanımı ve kontamine suların gıdaların yıkanmasında kullanılması, özellikle sebze ve meyveler için bir kontaminasyon kaynağı olmaktadır (Candel-Pérez ve ark., 2019). Kontamine dışkılarda bu bakterinin çeşitli koşullarda hayatta kaldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Dharmasena ve ark., 2018; Usui ve ark., 2017; Weese ve ark., 2000). Kontaminasyon açısından oldukça müsait olan mezbahalarda tüketime açık etlerin kesim ve iç organların çıkarılması aşamasında bağırsak içeriğinin dökülmesi mezbaha ortamında spor birikimine ve karkasların kontaminasyonuna neden olabilir. Mezbahanelerde yapılan çalışmalar, bu bilgiyi destekler niteliktedir (Abay ve ark., 2022; Candel-Pérez ve ark., 2019; Hampikyan ve ark., 2018; Rodriguez ve ark., 2013; Keessen ve ark., 2011; Weese ve ark., 2011).

2.15. *C. difficile*'nin teşhisi

C. difficile teşhisi, doğru tedavi ve enfeksiyon kontrolü için hayati öneme sahiptir. Farklı teşhis yöntemlerinin kullanımı, enfeksiyonun tanımlanmasında ve yönetiminde büyük bir rol oynar. Bu yöntemlerin her biri, klinik pratikte farklı avantajlar sunar ve uygun test seçimi, hastanın durumu, laboratuvar olanakları ve testlerin performans özelliklerine bağlı olarak yapılmalıdır (Housman ve ark., 2016). 24 saat içinde başlamış olan şekilsiz dışkısı olan bireyler, *C. difficile* testi için tercih edilen hedef grubudur. Bebeklerde toksijenik *C. difficile*'nin yüksek oranda

asemptomatik taşıyıcılığı nedeniyle, yenidoğanlar veya ≤ 12 aylık diyareli bebeklerde bu testin rutin olarak uygulanması önerilmemektedir. Ayrıca, *C. difficile* toksin kiti, diğer enfeksiyöz ya da non- enfeksiyöz nedenler ele alınmadan 1-2 yaşındaki ishallerde çocuklarda rutin olarak yapılmamalıdır. 2 yaş ve üzerindeki çocuklarda ise, uzun süreli veya kötüleşen ishal ile birlikte risk faktörleri veya ilgili maruziyetleri bulunan hastalar için *C. difficile* testi önerilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar dışında, aynı ishal epizodunda tekrar test (7 gün içinde) ve asemptomatik bireylerde dışkı testi yapılmamalıdır (Perry ve ark; 2017).

C. difficile enfeksiyonunun laboratuvar tanısında çeşitli yaklaşımlar kullanılabilir; ancak en uygun standart laboratuvar testi henüz belirlenmemiştir. *C. difficile*'nin laboratuvar tanısı, mikroorganizmanın kendisini hedefleyen kültür ve glutamat dehidrogenaz (GDH) antijen testi, dışkıda *C. difficile* toksinlerinin varlığını tespit eden sitotoksikite nötralizasyon testi (CCNA), enzim immünoanalizleri (EIA'lar) ve toksin genlerini hedefleyen moleküler yöntemler gibi birçok teşhis yöntemi ile yapılmaktadır. *C. difficile*'yi teşhis etmek için hastanelerde genellikle iki veya üç aşamalı bir algoritma kullanılır; pozitif bir ilk test, bir veya iki doğrulama testi veya referans yöntemle doğrulanır. *TcdB* sitotoksin tespiti, standart tanı yöntemi olarak savunulmaktadır. Ancak, optimal sonuçlar için hem kültür hem de toksin tespiti yapılması gerekmektedir. (Carroll ve ark., 2020). Ancak bu testler, laboratuvar testlerine ek olarak kullanılmadıkça yeterli duyarlılık ve özgüllük sağlamamaktadır. En uygun bakteriyolojik tanı için, sıvı dışkı materyali marazi madde olarak kullanılmalıdır. Sitotoksin aktivitesinin hızla kaybolması nedeniyle, testler hızlı bir şekilde yapılmalı, yalnızca taze örnekler işlenmeli ve bunlar 4°C veya altında saklanmalıdır (Stamper ve ark., 2009). Hızlı *C. difficile* tanısının yapılması, hastalığın ilerlemesini engellemek ve nozokomiyal vakaların sıklığını azaltmak için zamanında ve etkili enfeksiyon kontrol önlemleri açısından büyük önem taşır.

2.15.1. Bakteriyolojik Teşhis

Kültür, dışkının anaerobik ortama inokülasyonunu ve inkübasyondan sonra şüpheli kolonilerin belirlenmesini ve ardından *C. difficile* tipik koloni özelliği gösteren kolonilere toksin testi yapılmasını gerektirir. Tüm süreç 7 güne kadar sürebilir ve bu nedenle bu yöntem klinik bir laboratuvarda birincil tanı yaklaşımı olarak kullanılmak için zor ve yavaştır. Ancak, *C. difficile*'nin tespiti için çok hassas bir yöntemdir. Öte

yandan salgın araştırmaları için izolatların izole edilmesi, antibiyotik direncinin araştırılması ve diğerk testlerin değerkendirilmesi için referans yöntem olarak kullanılmaktadır (Swindells ve ark., 2010). Kùltùr metodu için bilim dùnyasında farklı dùřùnceler vardır. CCFA, yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir ve üreyen koloniler, ultraviyole ışık altında incelendiğinde grimsi veya sarı yeşil görünùr ve karakteristik at harası, gübre kokusu yaymaktadır. ChromID *C. difficile* agar, 48 saat inkùbe edilirse %100'e kadar duyarlılıkla siyah koloniler oluşturur. Bir çalışmada, ChromID *C. difficile* agar ve CCFA sodyum taurokolat, yumurta sarısı veya koyun kanı, tripton soya agar ile zenginleştirildiğinde daha fazla sensitivite sağlamıştır (Edwards ve ark., 2013). Geleneksel yöntemler, řùpheli dışkı materyalinde bulunan ve elimine edilmek istenen organizmaları en aza indirmek için "ısı şoku" veya "alkol şoku" metotları uygular ve ardından seğıci sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar veya bu maddeleri ihtiva eden bir besiyerine inokùlasyon yapar. Daha yakın tarihli çalışmalar, taurokolat, antibiyotikler, karbonhidratlar ve lizozim içeren bir zenginleştirme besiyerinin (örneğın, taurokolat ve lizozim içeren sikloserin mannitol besiyeri (CCMB-TAL) inokùlasyonunun, ısı veya alkol ön işleme gerek kalmadan *C. difficile*'nin üremesini artırdığını göstermiştir (Carroll ve ark., 2020). Ayrıca, zenginleştirme teknikleriyle veya bunlar olmadan kromojenik agar besiyerinin kullanılmasının da hızlı ve hassas sonuçlar ürettiğı gösterilmiştir (Housman ve arek., 2016; Perry ve ark., 2017. Ekim; genellikle 37°C'de, anaerobik koşullarda 48-72 saat boyunca gerçekleştirilmektedir (Alataş ve Güner, 2018).

2.15.2. Serolojik Teşhis

Hùcre Kùltùrù Sitotoksisite Nùtralizasyon Testleri (CCCNA)

Hùcre kùltùrù sitotoksisite nùtralizasyon testleri, *C. difficile*'nin pseudomembranöz koliti tetikleyen toksinlerini tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu test, dışkı örneklerinin bir hùcre kùltùrù monolayer'ine inokùlasyonunu ve sitopatogenik etkilerin gözlemlenmesini içerir. Hùcrelerin yuvarlanması ve çıkıntılarla karakterize edilen sitopatogenik etki, toksinlerin varlığını doğrulamak için nùtralize edilmelidir. CCCNA, toksin B'nin tespiti için hassas bir yöntem olmasına rağmen, klinik hassasiyeti %90'ın altındadır ve laboratuvar desteğı gerektirdiğı için popùlaritesi azalmıştır (Carroll ve ark., 2020).

Toksin Enzim İmmùnoanalizleri (EIAs)

C. difficile'nin toksin A ve B'yi tespit eden hızlı testlerdir. Çeşitli formatlarda mevcut olan bu testler, genellikle toksinlerin varlığını hızlıca belirlemek için kullanılır, ancak sensitivite ve değişkenlik sorunları yaşayabilir. Daha yeni dijital ELISA testleri, toksinlerin daha hassas ve doğru tespitini sağlayarak, bu yöntemlerin sınırlamalarını aşmaktadır. Dijital ELISA, femtolitre boyutunda kuyucuklarda tek molekül algılaması yaparak yüksek sensitivite sunar (Banz ve ark., 2018).

Glutamat Dehidrojenaz (GDH) Testleri

GDH ise *C. difficile*'nin tüm suşlarında bulunan bir metabolik enzimi hedefler ve genellikle birincil tarama adımı olarak kullanılır. GDH testleri düşük maliyetli ve yüksek negatif prediktif değere sahiptir, ancak bazı çalışmalar, sensitivitenin ribotipe bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. GDH testleri genellikle toksin EIAs veya nükleik asit testleri ile kombine edilerek çok aşamalı algoritmalarda kullanılır. Bu yöntemler, *C. difficile*'nin doğru ve etkili şekilde teşhis edilmesini sağlar, ancak testlerin dikkatli seçilmesi ve uygulanması, doğru sonuçların elde edilmesi için kritik öneme sahiptir (Hart ve ark., 2014).

2.15.3. Moleküler Teşhis

MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

MALDI-TOF; biyomoleküller, polimerler ve bakteriler gibi moleküllerin iyonlaşma zamanlarını inceleyerek bakterilerin identifikasyonunda da kullanılabilen bir kütle spektrometresi tekniğidir. MALDI-TOF MS, örneklerin iyonlaştırılması ve iyonların kütle/yük oranına göre ayrılarak analiz edilmesi prensibine dayanan ileri bir kütle spektrometri yöntemidir. MALDI aşamasında, lazer yardımıyla matris aracılığıyla iyonlaşma gerçekleştirilirken, TOF aşamasında iyonlar hızlandırılarak kütlelerine bağlı dedektöre ulaşma süreleri ölçülerek kütle spektrumu oluşturulur. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını ve yapılarını belirlemek için Proteomiks çalışmalarında, bakteri, mantar, virüs gibi mikroorganizmaların protein parmak izleri analiz edilerek mikrobiyal identifikasyonda, polimerlerin moleküler kütle dağılımlarını ve yapılarını analiz ederek polimer kimyası alanında, ilaç moleküllerinin yapılarının belirleyerek, farmasötik ve biyoteknoloji alanlarında kullanılır. Bu yöntem diğer identifikasyon yöntemlerine göre hızlı bir sonuç verse de diğer moleküler yöntemlere (PCR-WGS) destekleyici olarak kullanılması tavsiye edilmektedir (Ashfaq ve ark., 2022).

Nükleik Asit Tabanlı (NAT) Metodlar

Nükleik asit tespit yöntemleri, *C. difficile* enfeksiyonunun tanısında önemli bir rol oynamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler testler, 1990'larda geliştirilmiş olsa da dışkı örneklerinde *C. difficile* tespiti için gerçek zamanlı PCR yöntemi 2008 yılında FDA onayı almıştır. ABD'de şu anda toksin A veya toksin B'yi tespit eden 15 FDA onaylı moleküler platform mevcuttur. NAT'ların analitik hassasiyeti, sitotoksin testlerinden 10 ila 100 kat daha yüksek olmasına rağmen, maliyetleri genellikle daha yüksektir. Bazı laboratuvarlar, NAT'ları üç aşamalı algoritmalara dahil ederek maliyetleri azaltmayı başarmıştır. Bu algoritmalarda, dışkı önce GDH ve toksinleri tespit eden bir kombinasyon testi ile değerlendirilir. GDH ve toksin testleri uyumlu ise sonuçlar raporlanır. GDH pozitif ve toksin negatifse, numuneler NAT testine yönlendirilir (Prosty ve ark., 2024).

Bartsch ve ark.'ın yaptığı ekonomik ve sağlık yararlarını karşılaştıran çalışmada, GDH/toksin testi ve NAT kombinasyonun, en hızlı tedavi ve en düşük maliyetli seçenek olarak raporlanmıştır (Bartsch ve ark., 2015). Daha yakın tarihlerde yapılan bir çalışma, laboratuvarların EIA'dan PCR testine geçişinin, negatif sonuçlar için tedavi süresini azaltarak maliyetleri dengelediğini göstermiştir. NAT pozitif, toksin negatif hastalar arasında hastalık şiddeti veya mortalite açısından fark gözlemlenmemiştir (Carroll ve ark., 2017).

2.16. *C. difficile* Genotiplendirme Metodları

Clostridioides difficile, nosokomiyal enfeksiyonların arasında en yüksek prevalansa sahip olan etkenlerden biridir. *C. difficile*'nin genotiplendirilmesi, bakterinin genetik profilini belirleyerek enfeksiyonların izlenmesini ve kontrolünü sağlamak için kullanılan çeşitli yöntemleri içerir. Bu metotlar genetik varyasyonları tespit etmede, epidemiyolojik araştırmalarda ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir (Mendo-Lopez ve ark., 2024).

2.16.1. Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), bakterinin DNA'sının belirli genetik bölgelerini amplifiye ederek genotiplendirmeyi hedefler. Toksin genleri (A ve B toksin genleri) veya ribotip belirleme için kullanılan spesifik gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilir. Bu yöntemin avantajı yüksek hassasiyeti ve spesifikliğidir. Klasik

PCR'ye ek olarak, Real-Time PCR (qPCR) gibi gelişmiş PCR yöntemleri de *C. difficile* genotiplendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. qPCR, amplifikasyon süreci sırasında DNA'nın miktarını ölçerek, enfeksiyonun derecesi hakkında bilgi sağlayabilir. Bu teknik, *C. difficile* suşlarının daha hızlı ve hassas bir şekilde tanımlanmasına olanak tanır (Prosty ve ark., 2024).

2.16.2. PCR Ribotipleme

PCR ribotipleme, *C. difficile*'in genetik çeşitliliğini ve dizilimlerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, bakterinin rRNA bölgelerini hedef alır ve bu gen bölgelerinin kısıtlı değişkenliği sayesinde farklı suşları ayırt edebilir. PCR ribotipleme, PCR ve jel elektroforez kombinasyonu ile gerçekleştirilir ve bakteriyel suşların epidemiyolojik izlenmesinde kullanılır. Kapiller jel elektroforezi (CE), geleneksel slab jel elektroforezinin gelişmiş bir formudur. Bu teknik, DNA fragmanlarının bir elektrik alanı altında bir kapiller tüp içerisindeki polimer jel matriksi boyunca hareket ettirilmesi esasına dayanır. DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası, pozitif yüklü bir anoda doğru çekilir. DNA parçaları, boyutlarına göre farklı hızlarda hareket eder; küçük fragmanlar jelde daha hızlı ilerlerken, büyük fragmanlar daha yavaş ilerler. Bu ayrışma süreci, DNA fragmanlarının boyutlarına dayalı olarak ayırt edilmesini sağlar (Bogiel ve ark., 2024). *C. difficile* suşlarının izlenmesi ve epidemiyolojik araştırmalarında CE, farklı suşların hızlı ve hassas bir şekilde ayrıştırılmasını sağlar. Özellikle salgın durumlarında, hastane veya sağlık kurumlarında farklı suşların kaynağının izlenmesi için önemli bir araçtır. CE, salgınları izlemek, yeni suşları tanımlamak ve hastalığın yayılmasını kontrol altına almak için değerli veriler sunar. Bununla birlikte CE'nin bazı sınırlamaları da vardır. Örneğin, kapiller tüp içerisindeki polimer matriksinin kalitesi, analiz sonuçlarını etkileyebilir. Ayrıca, bu teknoloji diğer genotiplendirme yöntemlerine kıyasla daha pahalıdır ve özel ekipmanların bakımı, deneyimli personel gerektirir (Bogiel ve ark., 2024).

2.16.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST, *C. difficile*'nin farklı genetik profillerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, bakterinin çeşitli korunan gen bölgelerinin (housekeeping genler) dizilimlerini analiz eder. Her bir genin belirli bir dizilim kombinasyonu, bakteriyi belirli bir genotipe atar. MLST, yüksek derecede ayrıntılı genetik bilgi

sağlayarak, epidemiyolojik araştırmalar ve enfeksiyon kaynağının tespitinde kullanılır (Dingle ve ark., 2018).

2.16.4. Tüm genom dizi analizi (WGS)

Tüm genom dizi analizi, *C. difficile* genomunu yüksek çözünürlükle inceleyerek, mikroorganizmanın genetik yapısını, virölans faktörlerini, antibiyotik direnç genlerini ve çeşitli moleküler belirteçleri detaylı bir şekilde ortaya koymaktadır (Wen ve ark., 2022). Geleneksel yöntemler, sınırlı sayıda genetik bölgeyi analiz ederek sonuç verirken, WGS tüm genomu tarayarak daha kapsamlı ve kesin sonuçlar sunar. *C. difficile* tespitinde WGS'nin kullanımı, sadece klinik mikrobiyoloji anlamında değil, aynı zamanda halk sağlığı açısından da büyük önem arz etmektedir. (Mellmann ve ark., 2017). Bu yöntem, özellikle *C. difficile*'nin genetik çeşitliliğini, klonal yayılımını ve genetik varyasyonlarını anlamada büyük bir avantaj sağlar (Eyre ve ark., 2013).

Enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesi için bu yöntemlerin kombinasyonu genellikle tercih edilir, çünkü her biri farklı özellikler ve avantajlar sunar. Bu tür genetik analizler, *C. difficile*'nin izlenmesinde ve kontrolünde kritik bir rol oynar.

2.16.5. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analizi:

SNP analizi, *C. difficile*'nin genetik varyasyonlarını incelemek için kullanılan bir başka yöntemdir. Bu teknik, WGS'yi müteakiben, gen dizilimi içindeki tek bir nükleotid değişimini (SNP) tespit eder ve bu değişimlerin bakterinin genetik profilindeki rolünü değerlendirir. SNP analizi, özellikle genetik çeşitliliği ve direnç genlerini araştırmada etkili bir yöntemdir (Hulme ve ark., 2024).

2.17. *C. difficile* Enfeksiyonlarında Tedavi

2.17.1. İnsanlarda *C. difficile* Enfeksiyonlarında Tedavi

CDE geçiren hastaların çoğunda, genellikle daha önce antibiyotik kullanımı kaydedilmiştir. Tedavi planlanırken, eğer hastada ciddi bir sistemik rahatsızlık bulunmuyorsa, antibiyotik tedavisine son verilmesi önerilir. Toksik megakolon riskine neden olabileceği için antitilitite ilaçlar kullanılmamalıdır. Bu riski azaltmak amacıyla, antiperistaltik etkisi olan opioidler'den kaçınılmalıdır. Tedavi sürecinde ağız yoluyla sıvı verilerek hastanın yeterli düzeyde rehidrate edilmesi

büyük önem taşır (McDonald ve ark., 2018). Tedavide sıklıkla tercih edilen antibiyotikler metronidazol, vankomisin ve fidaksomisin olup, tekrarlayan CDE vakalarında ise fekal transplantasyon daha uygun bulunmaktadır. Eğer kolon perforasyonu, sistemik inflamasyon ya da antibiyotik tedavisine rağmen klinik durumda kötüleşme söz konusuysa, kolon lavajı ile birlikte total abdominal kolektomi veya diverting loop ileostomi gibi cerrahi yaklaşımlar önerilmektedir. CDE, hem yatarak hem de ayakta tedavi gören hastalarda yaygın bir ishal nedenidir. Son yıllarda, CDE tedavi yöntemlerinde önemli değişiklikler olmuştur. En dikkat çekici olanlar, CDE'nin ilk epizodunda metronidazol yerine fidaksomisin ve bezlotoksomab eklenmesi ile mikrobiyal replasman tedavileridir (Normington ve ark., 2024).

Metronidazol güncel tedavi protokollerine göre birinci basamak tedavi olarak önerilmemektedir. Oral vankomisin ve fidaksomisin artık hem şiddetli hem de şiddetli olmayan ilk CDE atakları için birinci basamak seçenekler olarak desteklenmektedir. Bu değişiklik, her iki seçeneğin de semptomların çözülmesini ve tedaviden bir ay sonra kalıcı çözümü garantilediğine dair kanıtlardan kaynaklanmaktadır. Metronidazol yalnızca hastaların oral vankomisin veya fidaksomisin kullanamadığı veya tedavi edilemediği şiddetli olmayan ilk ataklar için önerilmektedir. Nörotoksisite riski nedeniyle tekrarlanan veya uzun süreli tedavi kürlerinden kaçınılmalıdır. Ülseratif CDE'li hastalara, intravenöz (IV) metronidazol ile birlikte günde 4 kez 500 mg vankomisin verilmelidir. Tekrarlayan CDE için metronidazol kullanılmamalıdır. Metronidazol ilk tedavi için kullanıldıysa, hastalara oral vankomisin verilmelidir. Vankomisin ilk tedavi olarak kullanıldıysa, fidaksomisin kullanılabilir. İkinci veya sonraki tekrarlarda hastalar oral vankomisin, fidaksomisin veya fekal transplantasyon ile tedavi edilebilir. CDE tedavisinin önerilen tedavi süresinin ötesine uzatılması veya sürekli antibiyotik tedavisi gerektiren bir hasta için ampirik olarak antibiyotik kullanılması hastalığın nüks ihtimalini arttırmaktadır (McDonald ve ark., 2017; Normington ve ark., 2024).

2.17.1. Vankomisin

Vankomisin, bakteri hücre duvarının d-alanil-d-alanin kısmına bağlanarak glikopeptid polimerizasyonunu bloke ederek bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe

eden bir glikopeptiddir. Vankomisin, CDE tedavisi için oral yoldan uygulanır ve kolonda daha yüksek konsantrasyonlara ulaşmak için minimal düzeyde sistemik olarak emilir. Oral vankomisinin yan etkileri arasında karın ağrısı, disgeuzi, mide bulantısı, baş ağrısı, şişkinlik ve periferik ödem bulunur (Jarrad ve ark., 2015).

2.17.1. Fidaksomisin

Fidaksomisin (Difcid), *in vitro* *C. difficile*'ye karşı bakterisidal olan ve RNA polimerazları tarafından RNA sentezini inhibe eden bir makrolid antibakteriyel ilaçtır; Mayıs 2011'de onaylanmıştır. On sekiz yaş ve üzeri yetişkinlerde *C difficile* ile ilişkili ishalin tedavisi için endikedir. Antimikrobiyal direnci kontrol altında tutmak ve fidaksomisin etkinliğini korumak için fidaksomisin yalnızca *C. difficile*'den kaynaklandığı kanıtlanmış veya şiddetle şüphelenilen enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmalıdır. Önerilen doz, 10 gün boyunca günde iki kez oral yoldan 200 mg'dır ve aç veya tok karına alınmalıdır (McDonald ve ark., 2018).

2.17.1. Rifaksimin

Rifaksimin, bakteriyel DNA'ya bağlı RNA polimeraza bağlanarak bakteriyel RNA sentezini inhibe eder. Rifaksimin, kılavuzlarda tekrarlayan CDE'li hastalar için vankomisin sonrası ek bir tedavi rejimi olarak önerilmektedir. Bildirilen yaygın yan etkiler arasında baş dönmesi, yorgunluk ve mide bulantısı bulunur (Kitchin ve ark., 2020)

2.17.1. Metronidazol

Metronidazol, DNA ile etkileşime girerek helezon DNA yapısının kaybına ve tel kırılmasına neden olan bir nitroimidazoldür ve bu da duyarlı organizmalarda protein sentezinin inhibisyonuna ve bakteri ölümüne yol açar. Oral metronidazol %100 biyoyararlanımlıdır. Ancak, sistemik emilim nedeniyle enfeksiyon bölgesinde düşük konsantrasyonda ilaç bulunur ve bunun orta ve şiddetli CDE vakalarında etkinliğin azalmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bildirilen yan etkiler arasında baş ağrısı, mide bulantısı, metalik tat, baş dönmesi ve karın ağrısı bulunur (McDonald ve ark., 2018).

2.17.2. Hayvanlarda *C. difficile* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Hayvanlarda *Clostridioides difficile* enfeksiyonlarının tedavi yöntemleri, hastalığın şiddetine, hayvanın türüne ve genel sağlık durumuna göre farklılık gösterir. Öncelikle, *C. difficile* enfeksiyonları genellikle antibiyotik kullanımına bağlı olarak geliştiği için, enfeksiyonun tedavisinde antibiyotik seçimi dikkatle yapılmalıdır. Metronidazol ve vankomisin, insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da en yaygın kullanılan antibiyotikler arasında yer alır. Bu antibiyotikler, *C. difficile*'nin neden olduğu bağırsak enfeksiyonlarını tedavi etmek için etkilidir, ancak özellikle metronidazol uzun süreli kullanımda bağırsak mikrobiyotasını daha fazla bozabileceği için dikkatli kullanılmalıdır. Vankomisin ise genellikle oral yolla verilir ve bağırsaklarda yerel olarak etki gösterir (Weese, 2020).

Antibiyotik tedavisine ek olarak, probiyotikler de hayvanlarda *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını dengelemeye yardımcı olur ve faydalı bakterilerin büyümesini teşvik eder, bu da patojen bakterilerin yerleşmesini zorlaştırır. Özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotik suşların kullanımı, enfeksiyonun şiddetini azaltır ve bağırsak mikrobiyotasının normale dönmesine katkıda bulunabilir. Bu probiyotikler, genellikle besin takviyesi olarak veya doğrudan bağırsak mikrobiyotasını destekleyen ürünler şeklinde verilir. Yapılan çalışmalar, domuzlardan izole edilen *C. difficile* suslarından korunmada hayvan yemine dahil olan tiamulin, virginiamisin ve tilosinin profilaktik veya terapide faydalı olabileceğini vurgulamaktadır (Songer ve Anderson, 2006). Destekleyici tedaviler de hayvanlarda *C. difficile* enfeksiyonlarının yönetiminde önemli yer tutar. İshal nedeniyle sıvı kaybı yaşayan hayvanlarda sıvı terapisi hayati önem taşır. Ayrıca, diyetin sindirimi kolay ve besin açısından zengin olması, iyileşme sürecini hızlandırabilir (Silva ve ark., 2013).

2.18. *C. difficile* Korunma Yöntemleri

Hatalı antibiyotik kullanımı, bağırsak mikrobiyotasının dengesini bozarak *C. difficile*'in hızla üremesine zemin hazırlar. Bu da antibiyotik kullanımını *C. difficile* enfeksiyonlarının en önemli risk faktörlerinden biri yapar. Bu nedenle, antibiyotik kullanımının sınırlanması ve sadece gerektiğinde, uygun doz ve sürede verilmesi enfeksiyon riskini azaltmada kritik rol oynar. Sağlık çalışanlarının bu konuda

bilinçlendirilmesi ve dikkatli antibiyotik yönetimi, *C. difficile* enfeksiyonlarının önlenmesine katkı sağlar (McDonald ve ark., 2018). Bakterinin vejetatif formu zorunlu anaerobik olması nedeniyle oksijene karşı duyarlıyken spor formu kurumaya, ısıya, birçok dezenfektana ve fiziksel ajanlara karşı oldukça dayanıklıdır (Sabja ve ark., 2014). *C. difficile*, kolonda vejetatif halde, kolon dışarısındaki dokularda ise spor formunda bulunmaktadır (Adams ve ark., 2013). Etkenin sporları çevre ve ortam yüzeylerine oldukça dayanıklı olup, bu ortamlarda canlılıklarını uzun süre sürdürebilmektedir (Buddle ve ark., 2023). Bakterinin vejetatif formu, oda ısısında kuru yüzeylerde 15 dakika canlı kalırken, nemli yüzeylerde ise 6 saat canlı kalabilir (Adams ve ark., 2013). Bakterinin spor formu; hastane ortamı, (Rose ve ark., 2022) toprak, (Lim ve ark., 2020) doğal su kaynakları, (Lin ve ark., 2015) kum ve deniz tortuları, (Perumalsamy ve ark., 2019) tek ve çift tırnaklılar, köpek, kedi ve kanatlı gibi birçok hayvanın intestinal sistemi ve gaitasında bulunabilmektedir (Mitchell ve ark., 2022). Bunların yanı sıra etken, et ürünlerinde, sebzelerde, insan ve hayvanların piyojenik enfeksiyonlarında da tespit edilmektedir (Mengoli ve ark., 2022). Bakteri sporlarının çevre ortam yüzeylerinde, hastane personel kıyafetleri ve ekipmanlarında bulunması ve dezenfektanlara, ısı gibi fiziksel ajanlara karşı dayanıklı olması nedeniyle mücadelesi zordur (Paredes-Sabja ve ark., 2014).

Bakterinin sporları, özellikle hasta bakımı sırasında yüzeylere bulaşabilir ve diğer hastalara veya sağlık çalışanlarına yayılabilir. Bu nedenle, el hijyeni uygulamaları, *C. difficile*'den korunmada en temel önlemlerden biridir. Alkol bazlı el dezenfektanları *C. difficile* sporlarına karşı etkili olmadığından, sabun ve su ile ellerin yıkanması önerilir. Ayrıca, hasta odalarının ve çevresel yüzeylerin uygun dezenfektanlarla (örneğin, sodyum hipoklorit) düzenli olarak temizlenmesi gerekmektedir (Guh ve Kutty, 2018). *C. difficile* enfeksiyonu olan hastaların izole edilmesi, enfeksiyonun yayılmasını önlemek için önemlidir. Bu hastalar, mümkünse tek kişilik odalarda tutulmalı ve bu odalara giren herkesin koruyucu giysi, eldiven ve maske gibi bariyer önlemleri alması sağlanmalıdır. İzolasyon önlemleri, hastanın tedavisi boyunca ve semptomların sona ermesinden en az 48 saat sonrasına kadar devam ettirilmelidir (Debast ve ark., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamında Mart-Temmuz 2023 tarihleri arasında Kayseri ili şehir merkezinde faaliyet gösteren 5 özel veteriner kliniği her hafta ziyaret edilerek hotel veya hospitalizasyon hizmeti alan 50'şer adet sağlıklı kedi ve köpek, 50'şer adet ishalleri kedi ve köpek olmak üzere toplam 200 hayvana ait rektal svap örneği toplandı ve *C. difficile* izolasyonu amacıyla materyal olarak kullanıldı.

Kedi ve köpeklerden toplanan rektal svap örnekleri, Stuart besiyerine konularak soğuk zincir altında en kısa süre içerisinde mikrobiyoloji laboratuvarına getirildi. Getirildikten hemen sonra örnekler, bekletilmeden analizlere başlandı. Çalışmada *C. difficile* yönünden incelenen örnekler ve işletmelere göre dağılımı Tablo 3.1.'de verilmiştir.

3.1.2. Güç Analizi

Çalışmada etki büyüklüğü $d = 0.3$ (Cohen kriterlerine göre medium), $\alpha = 0.05$ ve testin gücü 0.80 alınarak gerekli olan minimum örnek sayısı 133 olarak belirlendi (Faul ve ark., 2007).

Tablo 3.1. Çalışmada *C. difficile* yönünden incelenen örneklerin sayısı ve işletmelere göre dağılımı

İşletme	Hayvan Türü	Toplanan svap sayısı
Klinik A	Kedi	20
	Köpek	20
Klinik B	Kedi	20
	Köpek	20
Klinik C	Kedi	20
	Köpek	20
Klinik D	Kedi	20
	Köpek	20
Klinik E	Kedi	20
	Köpek	20

3.1.3. *Clostridioides difficile* İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

C. difficile'nin izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan besiyerleri aşağıda verilmiştir:

Ön zenginleştirme Besiyeri (*Clostridioides difficile* Moxolactam-Norfloxacin ilaveli Brain Heart Infusion Broth, CDMN Broth)

Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM1135, Birleşik Krallık)

İçindekiler	Miktar g/L
Brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Proteose peptone	10.0
Glucose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5
pH 7.4 ± 0.2	

Sodium Taurocholate Hydrate 96% (Alfa aesar A18346, ABD)

Formülasyonu: C₂₆H₄₄NNaO₇S•xH₂O

Formül Ağırlığı: 537.73(anhy)

Optikal Rotasyonu: +23.0° (su içerisinde c=3)

Defibrine at kanı

Bu amaçla manuel hazırlanan cam boncuklu steril bir kan alma seti kullanıldı. Bu set ile sağlıklı atların vena jugularis'inden alınan kan hafifçe çalkalanarak cam boncuklar yardımıyla defibrine edildi. Kısa sürede laboratuvara ulaştırılan defibrine at kanı, steril koşullarda steril falkon tüplere aktarılıp kullanılana kadar 4°C'de saklandı.

Clostridium difficile Moxalactam-Norfloxacin (CDMN) Selective Supplement (Oxoid SR0173, Birleşik Krallık)

İçindekiler	Miktar mg/vial
Cysteine hydrochloride	250.0 mg
Norfloxacin	6.0 mg
Moxalactam	16.0 mg

Her bir vial 500 ml besiyeri için kullanılır.

Hazırlanışı: 18.5 g Brain heart infusion broth tartılarak 465 ml distile su içinde çözüldü. Besiyerinde son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde 0.5 g sodyum taurocholate hydrate eklenerek homojenize edildi. Hazırlanan broth, 121°C'de otoklavda 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında, su banyosunda 55°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra, 2 ml distile su ile homojenize edilen 1 vial CDMN selective supplement ve 35 ml (%7) defibrine at kanı ilave edilip homojenize edildi. Kullanılincaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Blood Agar Base No.2 (LiofilChem 610188, İtalya)

İçindekiler	Miktar g/L
Tryptose	15.0
Soy Peptone	2.5
Yeast Extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0
pH: 7.4 ± 0.2	

Hazırlanışı: 19.75 g besiyeri tartılarak, 465 ml distile suda çözüldürüldü ve otoklavda 121 °C'de, 15 dk sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında, besiyeri ısısının düşürülmesi amacıyla, ısısı 50 °C'ye ayarlanmış olan su banyosuna alındı ve burada

1-2 saat kadar bekletildi. Daha sonra, besiyerine 35 ml defibrine at kanı ilave edilerek homojenize edildi ve hacmi 20 ml olacak şekilde, steril plastik petrilere döküldü ve donması beklendi. Besiyerleri katı hale geldikten sonra, petrilere ters çevrildi ve oda ısısında, UV ışığı altında 12-15 saat bekletildi. Hazırlanan %7'lik at kanlı agarlar, kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Brucella Broth (Liofilchem 64026, İtalya)

İçindekiler	Miktar g/L
Meat Peptone	10.0
Tryptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Yeast Extract	2.0
Dextrose	1.0
Sodium Bisulfite	0.1
pH: 7.0 ± 0.2	

%15'lik Gliserinli Brucella Broth Hazırlanışı: 2.8 g besiyeri tartılarak, 85 ml distile suda çözündürüldü ve üzerine 15 ml gliserin (Merck 1.04093, Almanya) ilave edildikten sonra homojenize edildi ve 2 ml'lik cryo tüplere (Tarsons T523021, Hindistan), 500'er µl taksim edildi. %15'lik Brucella Broth içeren Cryo tüpleri, otoklavda 121 °C'de, 15 dk sterilize edildi. Hazırlanan %15 gliserinli Brucella Broth'lar, kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

***C. difficile* Toxin A Test (Thermo fisher-TD0970, ABD)**

C. difficile izolatlarının Toxin A varlığının serolojik yöntemle belirlenmesi için ticari bir test kiti (Thermo fisher-TD0970, ABD)'nden yararlanıldı.

Gram Boyama Seti

Ticari Gram Boyama Seti (GBL, 5026, Türkiye) kullanıldı.

Oksidaz Testi

Ticari Bactident Oxidase (Merck, 113300, Almanya) test kiti kullanıldı.

Katalaz Testi

Hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merck, 117209, Almanya) test kiti kullanıldı.

Hazırlanışı: Ticari %30' luk hidrojen peroksitten 3 ml alınarak 27 ml distile su ile karıştırıldı ve %3'lük H₂O₂ solüsyonu hazırlandı.

Anaerobik Ortam Kitleri

Clostridioides difficile'nin üretilmesinde anaerob ortamı sağlamak için, anaerobik jarlar (Merck, 116387, Almanya) ve anaerobik ortam kitleri (Mitsubishi Gas Chemicals, GA500ZE, ABD) kullanıldı.

3.1.4. Standart Suş

Clostridioides difficile'nin izolasyonu, elde edilen izolatların fenotipik testler ve moleküler yöntemle identifikasyonu aşamalarında, ATCC 43593, ATCC 9689 ve NCTC 11223 *Clostridioides difficile* standart suşları kullanıldı.

3.1.5. *Clostridioides difficile* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Brucella Agar (Merck 18795, Almanya)

İçindekiler	Miktar g/L
Meat Peptone	10.0
Casein Peptone	10.0
Yeast Extract	2.0
D (+)-Glucose	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar	13.0
pH: 7.0 ± 0.2	

Gradyent diffüzyon (E-test) stripleri

C.difficile izolatlarının MIC değerlerini belirlemek için; Ampisilin (Liofilchem 92003, İtalya), Vankomisin (Liofilchem, 92057, İtalya), Klindamisin (Liofilchem, 92072, İtalya), Meropenem (Liofilchem, 92084, İtalya) ve Metronidazol (Liofilchem, 92087, İtalya), antibiyotiklerini içeren E-test striplerinden yararlanıldı.

3.1.6. Moleküler Analizde Kullanılan Kimyasallar

10X PCR Buffer

MgCl₂ içermeyen, 10X ViBuffer A (Vivantis, RB0201, Malezya) kullanıldı.

Deoxynucleotide Trifosfat (dNTP)

10 mM dNTP Mix (Vivantis, NP2410, Malezya) kullanıldı.

Magnezyum klorür (MgCl₂)

25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, R0971, ABD) kullanıldı.

Taq DNA Polymerase

5 U/μl Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EP0402, ABD) kullanıldı.

10X Tris-borate-EDTA (TBE) Electrophoresis Buffer (Thermo Scientific, B52)

Hazırlanışı: 50 ml 10XTBE Buffer ve 950 ml distile su karıştırılarak, 0.5xTBE solüsyonu hazırlandı.

Agaroz Jel (Fisher Scientific Agarose, BP1356-100, ABD)

Hazırlanışı: %1.5'lik agaroz jel hazırlamak amacıyla, 0.75 g agaroz tartıldı ve 50 ml 0.5XTBE eklendikten sonra, mikrodalga fırında eritildi. Eritilen jel, ısı 50°C'ye ayarlanmış olan su banyosuna alındı ve ısı düştükten sonra içerisine 3 μl ethidium bromide eklendi ve homojenize edildi. Elektroforez tankına taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel tanka döküldü.

Ethidium Bromide

Ticari %1'lik ethidium bromide boyası (Gerbü, 1341, Almanya) kullanıldı.

6X Loading Dye

Ticari 1 ml'lik 6XLoading Dye (Vivantis, NM0410, Malezya) kullanıldı

DNA ekstraksiyon kiti

Elde edilen *C. difficile* izolatlarından DNA ekstraksiyonu için DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen 12224-50, ABD) kullanıldı.

Elde edilen izolatların moleküler analizlerinde kullanılan primerler

Elde edilen izolatların *C. difficile* olarak moleküler identifikasyonu, toksin genlerinin varlığının belirlenmesi ve izolatların ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi amacıyla kullanılan primerler Tablo 3.2.'de detaylı olarak verilmiştir.

DNA Ladder

Ticari GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific SM0321) kullanıldı.

Tablo 3.2. Moleküler analizlerde kullanılan primer listesi

Hedef Gen	Primer	Sekans (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
<i>tpi</i>	<i>tpi F</i>	AAAAGAGCTACTAAGGGTACAACA	230	Lemee ve ark., 2004
	<i>tpi R</i>	CATAATATTGGCTTACTTCTTAC		
<i>ERIC PCR</i>	<i>1R</i>	ATGTAAGCTCCTGGGGTTGATCAC	-	Houf ve ark., 2002
	<i>2</i>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

3.2. Yöntem

3.2.1. *Clostridioides* spp.'nin İzolasyonu

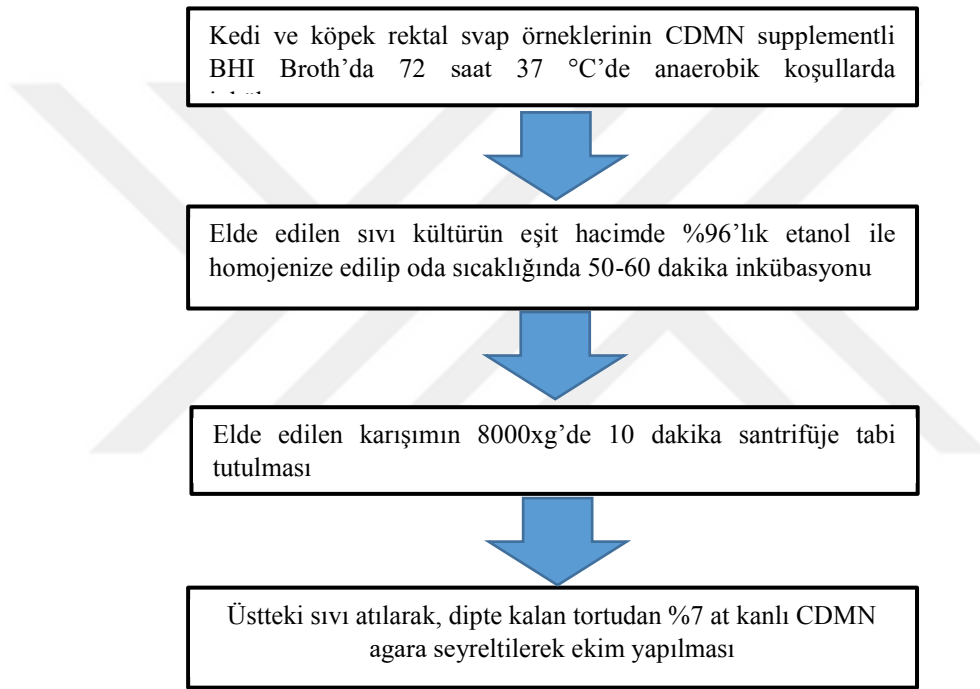
Çalışmada, kedi ve köpek rektal svap örneklerinden *C. difficile* izolasyonu amacıyla (Abay ve ark., 2022) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Örneklerin, *C. difficile* moxalactam-norfloxacin (CDMN) broth içerisinde 37°C'de, 72 saat, anaerobik koşullarda ön zenginleştirme işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası, elde edilen zenginleştirme kültürüne alkol şok metodu (Şekil 3.1) uygulanarak işlem sonrasında CDMN agara direkt ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler 37°C'de 72 saat anaerobik koşullarda inkübasyona tabi tutuldu (Rodriguez- Palacios ve ark., 2007).

Alkol Şok Yöntemi

Çalışma kapsamında ön zenginleştirmeye tabi tutulan tüm örneklerden sporların seçimi için alkol şok yöntemi uygulandı. Bu işlem için, 2 mL buyyon kültürü ve 2 mL %96 etil alkol karıştırıldı ve homojenize edildi. Hazırlanan karışım, oda sıcaklığında 50-60 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından karışım, 8000xg'de 10 dakika santrifüje alındı. Santrifüj işlemi sonrası üstteki sıvı atılarak, dipte kalan tortudan %7 at kanlı CDMN agara seyreltilmiş şekilde ekim yapıldı. Ekim yapılan tüm petriler, 37 °C'de 72 saat süreyle anaerobik ortamda inkübasyona alındı. CDMN agarda üreyen koloniler, *Clostridioides* spp. açısından değerlendirildi. Özellikle *C. difficile*'ye özgü tipik at harası kokusunu taşıyan ve beyaz buzlu cam görünümünde

düzensiz koloni morfolojisine sahip bakteriler tespit edildi. *Clostridioides* spp. şüpheli kolonilerin saf kültürünü elde etmek amacıyla, at kanlı agara pasajlar yapıldı ve petriler 37 °C’de 72 saat anaerobik ortamda inkübe edildi (Şekil 3.1).

Saf kültürü elde edilen şüpheli izolatlar öncelikle fenotipik (Gram boyama, oksidaz, katalaz ve hareket testi) testlere tabi tutuldu. Fenotipik testler sonucunda; Gram pozitif basil, hareketli, oksidaz ve katalaz testleri negatif olan ve tipik at harası kokusu veren koloniler *Clostridioides* spp. yönünden pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. *C. difficile* izolasyonunda kullanılan alkol şok metodu (Rodriguez- Palacios ve ark., 2007).

Fenotipik testler ile *C. difficile* şüpheli olarak belirlenen izolatların doğrulanması amacıyla *C. difficile* için spesifik ‘*tpi*’ genine ait primerler (Tablo 3.2.) kullanılarak gerçekleştirilen PCR yönteminden yararlanıldı (Lemee ve ark., 2004). Kedi ve köpek rektal svap örneklerinden gerçekleştirilen *C. difficile* izolasyonu ve identifikasyonuna ilişkin basamaklar Şekil 3.2’de şematize edilmiştir.

3.2.2. Elde Edilen İzolatların *Clostridioides* spp. Olarak Tanımlanması

Şüpheli izolatların *Clostridioides* spp. olarak tanımlanması amacıyla çeşitli fenotipik (Gram boyama, katalaz, oksidaz ve hareket testleri) ve moleküler (PCR) analizler uygulandı (Şekil 3.2.).

Fenotipik Testler

Gram Boyama

Saf kültürlerden bir öze alınarak, lam üzerinde bir damla serum fizyolojik (tuzlu su) ile homojenize edildi ve lam üzerine yayıldı. Hazırlanan preparat havada kurutuldu ve ardından üç kez bek alevinden geçirildi. İlk olarak kristal viyole çözeltisi (GBL 5026/01) eklenerek 2-3 dakika bekletildi. Boya döküldü ve preparat bol distile su ile yıkandı. Sonrasında lugol çözeltisi (GBL 5026/02) eklendi ve 1-2 dakika bekletildi. Boya döküldükten sonra preparat tekrar distile su ile yıkandı. Daha sonra, preparat üzerine %96'lık alkol çözeltisi (GBL 5026/03) eklendi ve 30 saniye bekletildi. Son olarak, preparat sulu fuksin (GBL 5026/04) ile 30 saniye boyandı ve tekrar distile su ile yıkandı. Kurutma kâğıdı kullanılarak kurutulan preparat, immersiyon objektifinde incelendi. Gram pozitif ve spor oluşturan veya oluşturmeyan basiller değerlendirildi (Pommerville, 2007).

Katalaz Testi

Saf kültürden bir öze dolusu koloni alınıp, lam üzerinde önceden damlatılmış 100 µl %3 H₂O₂ ile karıştırıldı. Kısa sürede preparat üzerinde hava kabarcıklarının gözlenmemesi durumunda, katalaz testinin sonucu negatif olarak değerlendirildi (Pommerville, 2007).

Oksidaz Testi

Bu testte Ticari Bactident Oxidase (Merck, 113300, Almanya) kiti kullanıldı. Kâğıt oksidaz test şeridi üzerine, saf kültürden alınan öze ile sürüldü ve 1-2 dakika bekletildi. Şerit üzerinde herhangi bir renk değişimi gözlenmemesi halinde, test negatif olarak değerlendirildi (Pommerville, 2007).

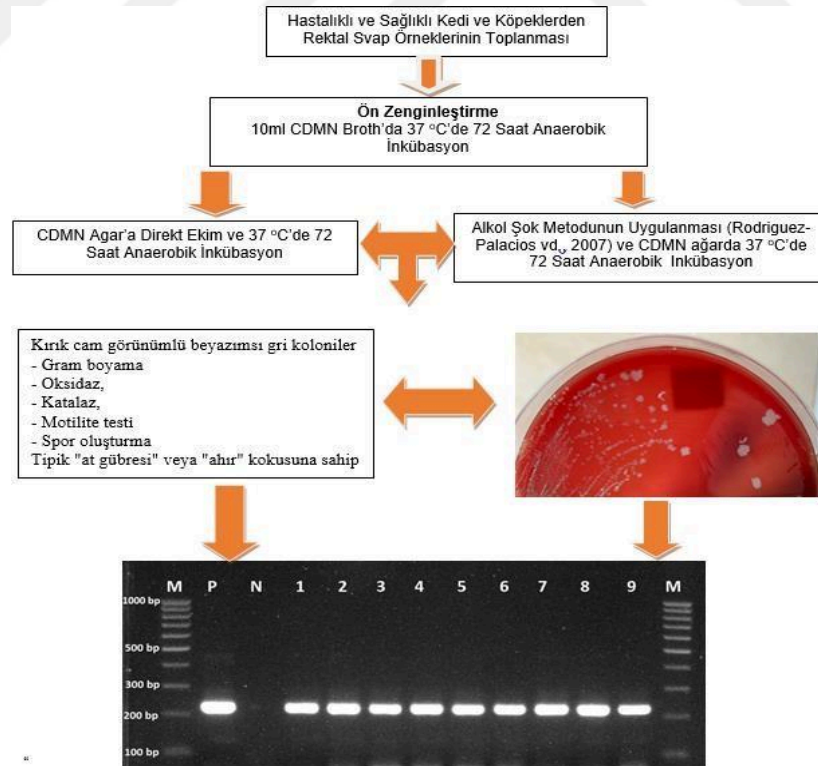
Hareket Muayenesi

Steril bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatıldı. 72 saatlik katı kültürden alınan bir koloni, serum fizyolojik ile homojenize edildi ve lamel kapatılarak hazırlanan preparat üzerine immersiye yağı damlatıldı. Mikroskop altında hareketli basiller değerlendirildi.

3.2.2. Serolojik Testler

C. difficile Toxin A Testi (Thermo fisher-TD0970, ABD)

Kit üreticisinin talimatlarında bildirilen yöntemde materyal olarak dışkı örnekleri kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmada Toksin A tespiti için dışkı örnekleri yerine *C. difficile* izolatlarının BHI broth kültürleri kullanıldı. Test prosedürü kit içeriğinde belirtilen basamaklara göre gerçekleştirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde test şeridindeki immobilize antikora bağlanarak mavi çift çizgi oluşturan izolatlar pozitif olarak, yalnızca kontrol çizgisi oluşturan izolatlar ise negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.2. *C. difficile* izolasyon ve identifikasyon şeması

3.2.3. İzolatların Antibakteriyel Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların ampisilin, klindamisin, meropenem, metronidazol ve vankomisin gibi antibakteriyel ajanlara duyarlılıklarının belirlenmesi için gerçekleştirilen gradiyent diffüzyon (E-test) testi Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2025) tarafından bildirilen yönteme göre gerçekleştirildi. Kısaca, *C. difficile* izolatlarının ve *Clostridium innocuum* izolatının 24 saatlik taze kültüründen %0.85'lik NaCl çözeltisi içerisinde inokulumlar hazırlandı. İnokulumların bulanıklığı McFarland 1 olacak şekilde ayarlandı. Her bir izolat için hazırlanan inokulumlardan 0.1 ml alınarak 5 µg/L hemin, 1 µg/L K1 vitamini ve %5 defibrinlenmiş at kanı ilave edilene Brucella agara (Merck, 18795 Almanya) inoküle edildi ve cam drigalski çubuğu ile agarın yüzeyine yayıldı. Agarların yüzeyleri kurumaya bırakılarak her bir agara bir antibiyotiğe ait E-test stripi olmak üzere agar yüzeyine yerleştirildi. Petriler 37°C'de 72 saat anaerobik atmosferde inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonucunda izolatların antibakteriyel duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesinde ampisilin, klindamisin, meropenem ve metronidazol için CLSI (CLSI, 2025) ve vankomisin için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2025) tarafından yayınlanan eşik değerler kullanılmıştır. *C. difficile* ATCC 43593 ve *S. aureus* ATCC 25923 standart suşları kalite kontrol organizmaları olarak kullanılmıştır.

3.2.4. Moleküler Analizler

Fenotipik testler sonucunda, Gram pozitif basil, hareketli, oksidaz ve katalaz testleri negatif olarak değerlendirilen izolatlar *Clostridioides* spp. şüpheli olarak kabul edildi. Bu izolatların *C. difficile* olarak tanımlanması amacıyla triose phosphate isomerase (*tpi*) gen varlığını esas alan PCR yönteminden yararlanıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Clostridioides spp. şüpheli izolatlardan DNA ekstraksiyonu, üretici firmanın (DNeasy UltraClean Microbial Kit, Qiagen 12224-50, ABD) talimatlarına göre gerçekleştirildi.

C. difficile'nin Moleküler Yöntem ile İdentifikasyonu

C. difficile'nin identifikasyonu için Lemee ve ark. (2004) tarafından önerilen *tpi* genine özgü primerler kullanılarak PCR işlemi yapıldı. PCR karışımı, 25 µl

hacminde; 2.5 µl 10×PCR buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl), 0.5 µl 10 mM dNTP, 3 µl MgCl₂, 0.4 µl FastStart Taq polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ve *tpiF* ve *tpiR* primerlerini içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları, 94°C’de 10 dakika başlangıç denaturasyonu, ardından 94°C’de 50 saniye denaturasyon, 54°C’de 40 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 50 saniye primer uzamasından oluşan 35 siklus ve 72°C’de 3 dakika final uzaması olacak şekilde gerçekleştirildi.

***C. difficile* İzolatlarının Genotiplendirilmesi (ERIC-PCR)**

Genotiplendirme amacıyla Houf ve ark. (2002) tarafından önerilen ERIC-PCR analizi kullanıldı. Kullanılan primerler Tablo 3.2.’de belirtilmiştir. PCR karışımı, 50 µl hacminde, 5 µl 10×PCR buffer, 8 mM dNTP, 4 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol ve 1 µl hedef DNA’yı içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları, 94°C’de 5 dakika ilk denaturasyon, ardından 94°C’de 1 dakika denaturasyon, 25°C’de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C’de 2 dakika primer uzaması şeklinde 40 siklus olarak gerçekleştirildi.

Agaroz Jel Elektroforezis

Moleküler identifikasyon ve toksin genlerinin analizinde uygulanan PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1.5 agaroz jelde, ERIC-PCR ürünleri ise %2 agaroz jelde 100V, 500 mA’de 35 dakika koşturulduktan sonra jel görüntüleme sistemi (Syngene G-F3) ile değerlendirildi.

Tüm Genom Sekans Analizi

C. difficile izolatlarından ticari kit yardımı ile çıkarılan DNA’ların konsantrasyon ve saflıkları sırası ile Qubit Fluorometer dsDNA Quantification Assay Kit (Invitrogen Q32851, İngiltere) ve NanoDrop™ 2000 spektrofotometresi (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Konsantrasyon ve saflık değerleri WGS analizi için uygun olarak belirlenen DNA örnekleri kütüphane hazırlığı aşamasına alındı.

Kütüphane Hazırlama

Genomik kütüphaneler Oxford-Nanopore PromethION Ligation Sequencing Kit (Nanopore-Native Barcoding Kit 24 V14-SQK-NBD114.24, İngiltere) kullanılarak

üreticinin bildirdiği direktifler doğrultusunda hazırlandı. Kütüphane hazırlığı sırasında, DNA'nın adaptörlerle bağlanması, temizlenmesi ve boyut seçimi yapıldı.

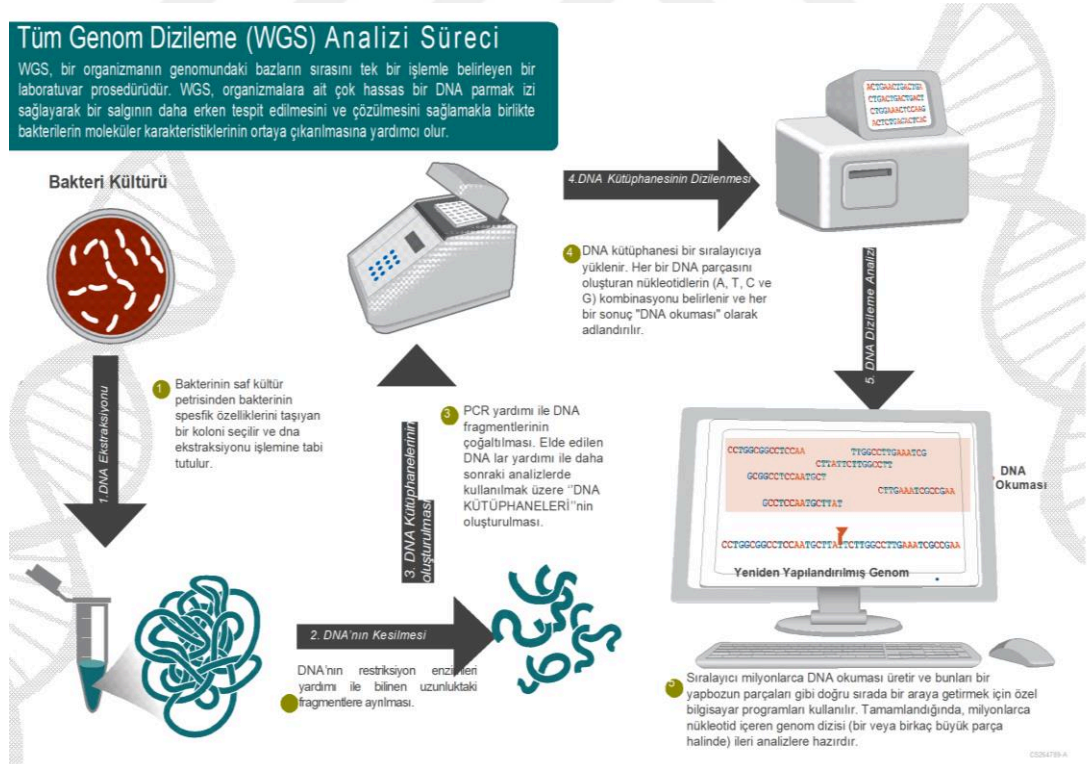
Genomik Dizileme

Genomik dizileme işlemi, yeni nesil dizileme platformları içerisinde yer alan Oxford Nanopore (Oxford-Nanopore PromethION İngiltere) sisteminde gerçekleştirildi ve uzun okumalar R9.4.1 ve R10.4 kimyası kullanılarak elde edildi (Şekil 3.3.). Biyoinformatik işlem ve analizlerde referans suş olarak, *C. difficile* 630 (GCA_000932055) kullanıldı. Bu tez kapsamında elde edilen *C. difficile* izolatlarının küresel suşlarla akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi için National Center for Biotechnology Information (NCBI) Dizi Okuma Arşivi'nden alınan *C. difficile* suşlarına ait genomik veriler kullanıldı.

3.2.5. Biyoinformatik Analizler

Elde edilen *C. difficile* izolatlarının tüm genom dizi analizlerine ait ham verilerin kalite kontrolü, kırılması hizalanması ve sirküler genom modeli oluşturulması işlemleri BV-BRC ve Proksee arayüzü kullanılarak gerçekleştirildi (Olson ve ark., 2023; Grant ve ark., 2023). Bu arayüze göre bakteriyel genom montajı gerçekleştirilmiş ve montaj sonrası hata düzeltme işlemleri uygulanmıştır. De novo montaj, elde edilen N50, L50, N90, G+C oranı Genom kapsamı (coverage), Tutarlılık ve Kontaminasyon kalite metrikleri göz önüne alınarak Flye V1.17 veya Unicycler v0.4.8 yazılımları kullanılarak yürütülmüş, ardından minimum kontig uzunluğu 1000 bp ve minimum kapsama derinliği 5.0 olarak belirlenerek filtreleme yapılmıştır. Ortalama uzun okuma kapsama derinliği Minimapp2 v2.24 ile hesaplanmış ve hata düzeltme işlemi Racon v1.5.0 kullanılarak iki iterasyon halinde gerçekleştirilmiştir. İlk iterasyonda montaj dosyaları ham okumalarla hizalanmış ve Racon ile düzeltilmiş, ardından aynı süreç ikinci kez uygulanarak nihai olarak düzeltilmiş montaj dizisi elde edilmiştir. Montajın değerlendirilmesi için Prokka ve QUAST v5.2.0 yazılımları kullanılarak genom bütünlüğü ve kalite metrikleri analiz edilmiştir. Birleştirmelere dayanarak izolatların *SlpA* tiplendirilmesi, sekans tipleri ve içerisinde yer aldıkları MLST grupları, PubMLST veritabanı kullanılarak saptandı (Jolley ve ark., 2018). Çekirdek genom SNP araması, referans olarak *C. difficile* 630 kullanılmak sureti ile FreeBayes arayüzünde gerçekleştirildi (Marth ve ark.,1999).

Çekirdek genom SNP hizalamaları, RAXML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (v 8.2.12) tarafından gerçekleştirilen maksimum olabilirlik analizi için temel oluşturdu. ERIC PCR sonuçlarının dendrogram analizinde GelJ programı (Heras ve ark., 2015) kullanılarak Dice katsayısına dayalı bir benzerlik matrisi hesaplandı ve örnekler %4'lik bir tolerans pozisyon değeri ve kullanılarak UPGMA algoritmasına göre kümelendi. WGS tabanlı Filogenetik ağaçlar ise FigTree v1.4.3 (Rambaut ve ark., 2007) ve MEGA v.11.0.13 (Tamura ve ark., 2021) araçları ile gerçekleştirildi. İzolatların kendi aralarında ve referans tip suşlar ile genetik yakınlıklarını analiz etmek için TYGS (Kolthoff ve ark., 2022) ve NCBI arşivlerinde bulunan *C. difficile* suşlarına ait genomik veriler kullanıldı. Antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) kullanılarak varsayılan ayarlar kullanılarak gerçekleştirildi (Alcock ve ark., 2023). Tez çalışmasına dahil edilen *C. difficile* izolatlarının virülens gen varlığı, elde edilen birleştirilmiş genomun Virulens Factor Database (VFDB) veri tabanına yüklenmesi ile analiz edildi (Liu ve ark., 2022).



Şekil 3.3. *C. difficile* izolatlarına uygulanan WGS işlem şeması

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Kediler ve köpekler arasında *C. difficile* pozitifliği açısından istatistiksel farkın ve kedi ve köpek rektal swap orijinli *C. difficile* izolatlarının yer aldıkları MLST sekans grupları ve bu izolatlarda saptanan virülens ve antibiyotik direnç genlerinin bulunma oranları arasındaki farkın değerlendirilmesi için Pearson Ki-kare test ve Fisher'in Kesin testi kullanıldı. Belirtilen istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için Jamovi programı (1.6.13 sürümü)'ndan yararlanıldı.

Çalışmada *C. difficile* izolatlarının genotiplendirilmesi için kullanılan MLST, ERIC PCR ve *SlpA* ST yöntemlerinin ayırım gücü Simpson'ın çeşitlilik indeksi (SID) hesaplanarak belirlendi. Bu tiplendirme yöntemleri arasındaki uyum ise ayarlanmış Rand ve Wallace katsayılarının hesaplanmasıyla saptandı. SID, ayarlanmış Rand ve Aralığı (GA) kullanılarak hesaplandı. Simpson'ın çeşitlilik indeksi (SID), genotiplendirme yöntemlerinin izolatlar arasındaki ayırım gücünü göstermektedir. Bu indeks aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır:

$$SID = \sum ni(ni - 1) / N(N - 1)$$

i: Genotip çeşidi, ni: i genotipinde yer alan izolat sayısı, N: Tiplendirmede kullanılan toplam izolat sayısı.

Ayarlanmış Rand indeksi, iki genotiplendirme yöntemi arasındaki uyumun genel bir ölçüsünü sağlarken, Wallace katsayısı daha bilgilendiricidir ve bir yöntemle aynı genotipte saptanan suşun diğer yöntemle de aynı tipte sınıflandırılma olasılığını temsil ettiği için net bir yorumlama sağlamaktadır. Bu indeks, online olarak Carriço ve ark. (2006) ve Pinto ve ark. (2008) tarafından tarif edildiği şekilde hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Çalışmada incelenen 200 adet (50'şer adet sağlıklı kedi ve köpek, 50'şer adet ishalli kedi ve köpek) rektal svab örneğinden 12 (%12)'si köpek ve 7 (%7)'si kedi orijinli olmak üzere elde edilen toplam 19 (% 9.5) örnek *Clostridioides* spp. yönünden pozitif olarak belirlendi (Şekil 4.1). Bu pozitif örneklerden elde edilen 19 izolat fenotipik testler ve *tpi* PCR ile *C. difficile* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen 19 *C. difficile* izolatına 1cd'den -17cd'ye kadar aralıksız ve 19cd ve 20cd olmak üzere kod verildi (Tablo 4.1). Fenotipik testler ve PCR ile tanımlanmış 19 *C. difficile* izolatının tüm genom dizi analizi sonucunda 18'i *C. difficile* olarak doğrulanırken 1 adet kedi orijinli izolat *Clostridium innocuum* (*C. innocuum*) olarak doğrulandı. Tüm genom dizi analizi sonucunda kedi ve köpek svap örneklerinde toplam *C. difficile* prevalansı %9 (18/200) olarak saptandı. Kedi ve köpek rektal svap örneklerinde *C. difficile* prevalansı sırasıyla %6 (6/100) ve %12 (12/100) olarak belirlendi. Kedi ve köpek rektal svap örneklerinde *C. difficile* varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($\chi^2 = 2.20$ sd=1, p= 0.138) bulunamadı (Tablo 4.2). Bununla birlikte analiz edilen örneklerin sağlıklı veya ishalli hayvanlardan alınma durumunun *C. difficile*'nin izolasyonu açısından istatistiksel bir fark oluşturmadığı saptandı ($\chi^2 = 0.24$ sd=1, p=0.621), (Tablo 4.2). Ayrıca, svap örneklerinin alındığı hayvanlarda örnek alımı öncesi antibiyotik kullanımının *C. difficile* izolasyonu açısından istatistiksel bir fark oluşturmadığı da belirlendi ($\chi^2 = 0.98$ sd=1 p=0.323), (Tablo 4.2).



Şekil 4. 1. Çalışma kapsamında elde edilen “1cd” kodlu *C. difficile* izolatının CDMN agardaki saf kültürü

Tablo 4. 1. Çalışmada elde edilen *C. difficile* izolatlarına verilen kodlar ve izolasyon orijinleri

İzolat No	Orijin	İzolat No	Orijin				
1cd ^a	Sağlıklı köpek	11cd	İshalli kedi				
2cd ^a	Sağlıklı köpek	12cd	İshalli kedi				
3cd ^a	Sağlıklı kedi	13cd ^a	Sağlıklı kedi				
4cd ^a	Sağlıklı kedi	14cd ^a	Sağlıklı kedi				
5cd	Sağlıklı köpek	15cd	İshalli köpek				
6cd ^a	İshalli köpek	16cd	İshalli köpek				
7cd ^a	İshalli köpek	17cd ^a	Sağlıklı köpek				
8cd	İshalli köpek	19cd ^a	Sağlıklı köpek				
9cd	İshalli köpek	20cd ^a	Sağlıklı köpek				
10cd*	Sağlıklı kedi						
*: Clostridium innocuum izolatı, -: negatif, +: pozitif							
^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar							
	Sağlıklı köpek		İshalli köpek		Sağlıklı kedi		İshalli kedi

Tablo 4. 2. Rektal svap örneklerinin toplandığı kliniklere göre ve *C. difficile* pozitifliğine göre dağılımı

İşletme	Toplanan Örnek Sayısı				Pozitif Örnek Sayısı			
	Kedi		Köpek		Kedi		Köpek	
	H	D	H	D	H	D	H	D
Klinik A	6+3 ^a	11 ^a	14	6 ^a	1	2 ^a	2	2 ^a
Klinik B	6	14 ^a	8+2 ^a	10 ^a		1 ^a		1
Klinik C	10+2 ^a	8	7+2 ^a	11 ^a	-		2 ^a +2	
Klinik D	11	9 ^a	6+2 ^a	12 ^a	-		2 ^a	
Klinik E	14	6 ^a	9	10 ^a +1	1	1 ^a		1 ^a
$\chi^2_{\text{ishal durumu}} = 0.24 \text{ sd}=1, p=0.621$ $\chi^2_{\text{antibiyotik kullanımı}} = 0.98 \text{ sd}=1 p=0.323$								
H: Sağlıklı, D: İshalli, ^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar								

4.1.1. Fenotipik İdentifikasyon Sonuçları

Çalışmada incelenen 200 adet kedi ve köpek rektal svap örneğinden elde edilen toplam 19 *Clostridioides* spp. şüpheli izolatın tamamının Gram pozitif, hareketli, oksidaz ve katalaz negatif olduğu saptandı (Tablo 4.3).

Serolojik İdentifikasyon Sonuçları

İzolatlar uygulanan Toksin (A) antijeninin saptanmasına yönelik serolojik test sonucunda; iki kedi orijinli izolatın (2/6, %33.3) ve yedi köpek orijinli izolatın (7/12, %58.3) Toksin (A) yönünden pozitif olduğu belirlendi (Tablo 4.3), (Şekil 4.2).

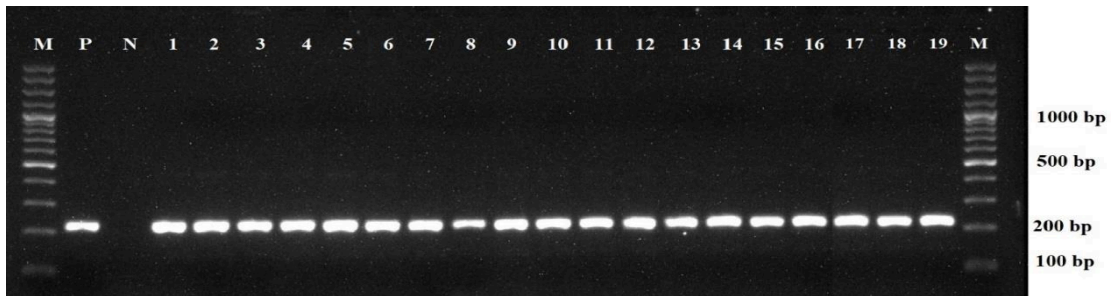
4.1.2. Moleküler İdentifikasyon Sonuçları

tpi Gen Varlığının Araştırılması

Fenotipik testler ile *Clostridioides* spp. olarak tanımlanan 19 izolatın tamamı *C. difficile* için spesifik “*tpi*” geninin amplifiye edildiği tür spesifik PCR yöntemi sonucunda 230 bp büyüklüğünde bant verdi ve izolatların tamamı *C. difficile* olarak tanımlandı (Şekil 4.3), (Tablo 4.3).



Şekil 4. 2 Toksik ve non-toksik bazı örneklerin serolojik test sonuçları. K: Kontrol: Bu bölgede oluşan tek çizgi testin çalıştığını göstermektedir.; S: Örneğin damlatıldığı bölge; P: Bu bölümde oluşan mavi çizgi pozitif test sonucunu gösterir.; PK: Pozitif kontrol; 8cd, 9cd, 16cd, 17cd, 19cd ve 20cd: pozitif örnekler; 13cd, 15cd ve 1cd: negatif örnekler



Şekil 4. 3 Dışkı orijinli *C. difficile* izolatlarına ait PCR (*tpi* geni) ürünlerinin agaroz jel (%1.5) görüntüsü. M: Marker, P: Pozitif Kontrol ATCC 43593 *C. difficile* standart susu (230 bp) N: Negatif Kontrol, steril distile su, 1-20: *C. difficile* pozitif izolatlar (230 bp).

Tablo 4. 3. Elde edilen *Clostridioides* spp. izolatlarının fenotipik ve moleküler test sonuçları

İzolat No	Fenotipik testler					PCR (<i>tpi</i> geni)
	Gram Boyama	Oksidaz	Katalaz	Hareket	Toksin (A) Test kiti	
1cd ^a	+	-	-	+	-	+
2cd ^a	+	-	-	+	-	+
3cd ^a	+	-	-	+	+	+
4cd ^a	+	-	-	+	+	+
5cd	+	-	-	+	+	+
6cd ^a	+	-	-	+	-	+
7cd ^a	+	-	-	+	-	+
8cd	+	-	-	+	+	+
9cd	+	-	-	+	+	+
10cd*	+	-	-	+	-	+
11cd	+	-	-	+	-	+
12cd	+	-	-	+	-	+
13cd ^a	+	-	-	+	-	+
14cd ^a	+	-	-	+	-	+
15cd	+	-	-	+	-	+
16cd	+	-	-	+	+	+
17cd ^a	+	-	-	+	+	+
19cd ^a	+	-	-	+	+	+
20cd ^a	+	-	-	+	+	+
*: <i>Clostridium innocuum</i> izolatı, -: negatif, +: pozitif ^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar						
	Sağlıklı köpek		İshalli köpek		Sağlıklı kedi	İshalli kedi

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Kedi orijinli *C. difficile* izolatlarının ampisilin ve klindamisine sırası ile %33.3 (2/6) ve %50 (3/6) oranında duyarlı olduğu saptanırken her iki antibiyotiğe %50 (3/6) oranında dirençli oldukları belirlendi. Bununla birlikte kedi izolatlarının tamamının vankomisin, meropenem ve metronidazole duyarlı olduğu belirlenirken, bir kedi izolatının (1/6, %16.6) ampisiline orta derece duyarlı olduğu saptandı. Köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının tamamının vankomisine karşı duyarlı olduğu belirlendi. İzolatların; ampisilin, klindamisin, meropenem ve metranidazole sırasıyla %50(6/12), %75(9/12), %58.3 (7/12) ve %83.3 (10/12) oranında duyarlı olduğu saptanırken yine sırasıyla %16.6 (2/12), %25 (3/12), %41.6 (5/12) ve %16.6 (2/12) oranında da dirençli olduğu belirlendi. Ayrıca izolatlarda ampisiline karşı %33.3 (4/12) oranında orta derecede duyarlılık saptandı (Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6), (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

4.2.1. *C. difficile* İzolatlarında Çoklu Antibiyotik Direnci

Çalışmada elde edilen toplam 18 *C. difficile* izolatının dört (4/6, %66.6) 'ü kedi ve sekiz (8/12, %66.6)'i köpek orijinli olmak üzere 12 tanesi test edilen antibiyotikler içerisinde en az birine dirençli bulundu. İki (2/6, %33.3) kedi orijinli izolat iki farklı antibiyotiğe (AMP, CD) karşı dirençli saptanırken, iki (2/12, %16.6) köpek orijinli izolat üç farklı antibiyotiğe (MRP, CD, AMP) karşı dirençli saptandı (Tablo 4.5), Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Tablo 4. 4. Kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel duyarlılık sonuçları

Antibiyotik Grubu	ANT	Kedi (N=6)			Köpek (N=12)			Toplam (N=18)		
		S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penisilin	AMP	2 (33.3)	1 (16.6)	3 (50)	6 (50)	4 (33.3)	2 (16.6)	8 (44.4)	5 (27.7)	5 (27.7)
Linkozamid	CD	3 (50)	-	3 (50)	9 (75)	-	3 (25)	12 (66.6)	-	6 (33.3)
Glikopeptid	VAN	6 (100)	-	-	12 (100)	-	-	18 (100)	-	-
Karbapenem	MRP	6 (100)	-	-	7 (58.3)	-	5 (41.6)	13 (72.2)	-	5 (27.7)
Nitroimidazol	MTZ	6 (100)	-	-	10 (83.3)	-	2 (16.6)	16 (88.8)	-	2 (11.1)

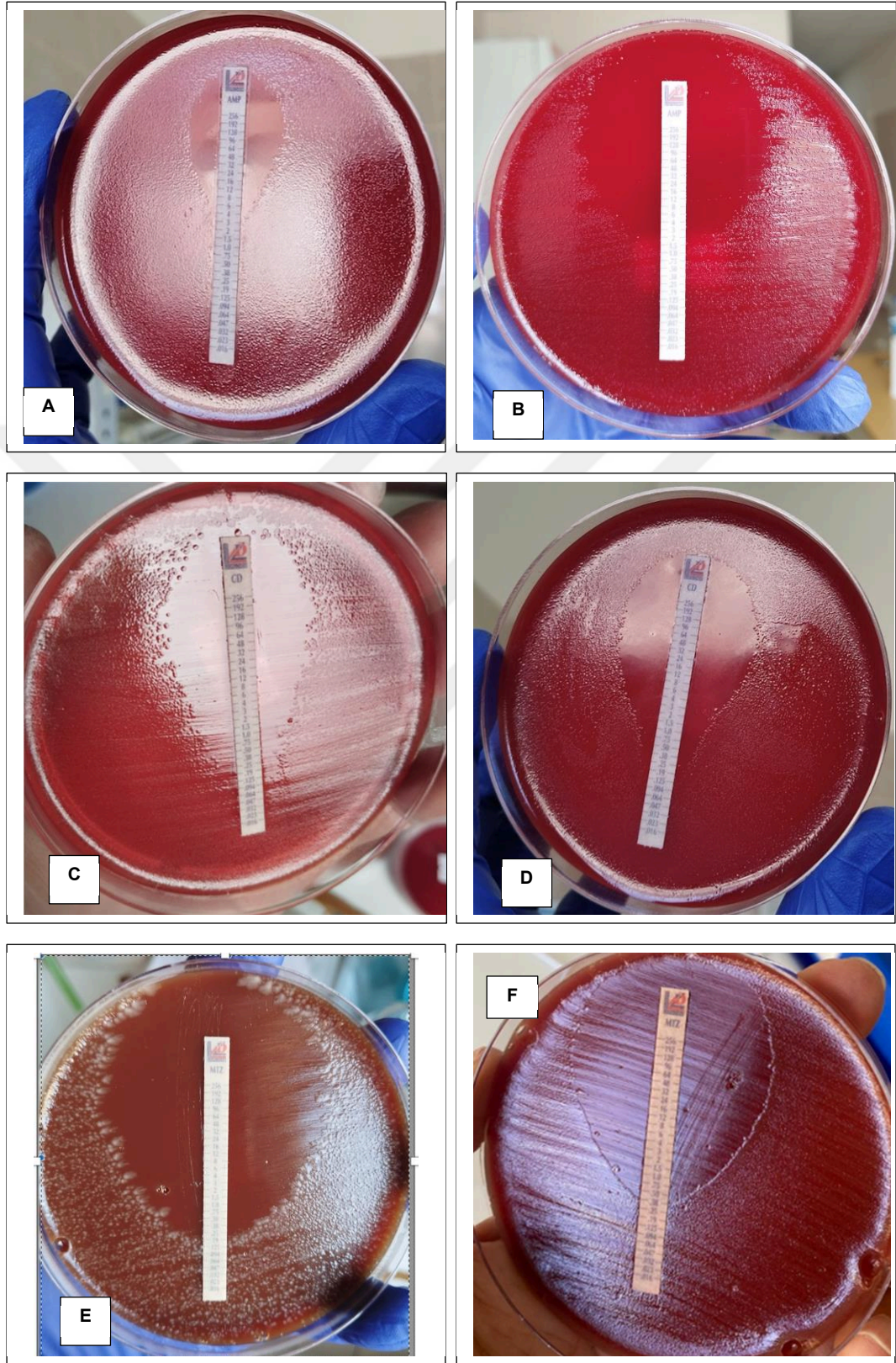
N: *C. difficile* izolat sayısı, S: Duyarlı, I: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli
ANT: Antibiyotikler, AMP: Ampisilin, CD: Klindamisin, VAN: Vankomisin, MRP: Meropenem, MTZ: Metronidazol

Tablo 4. 5. *C. difficile* izolatlarında saptanan çoklu antibiyotik direnci

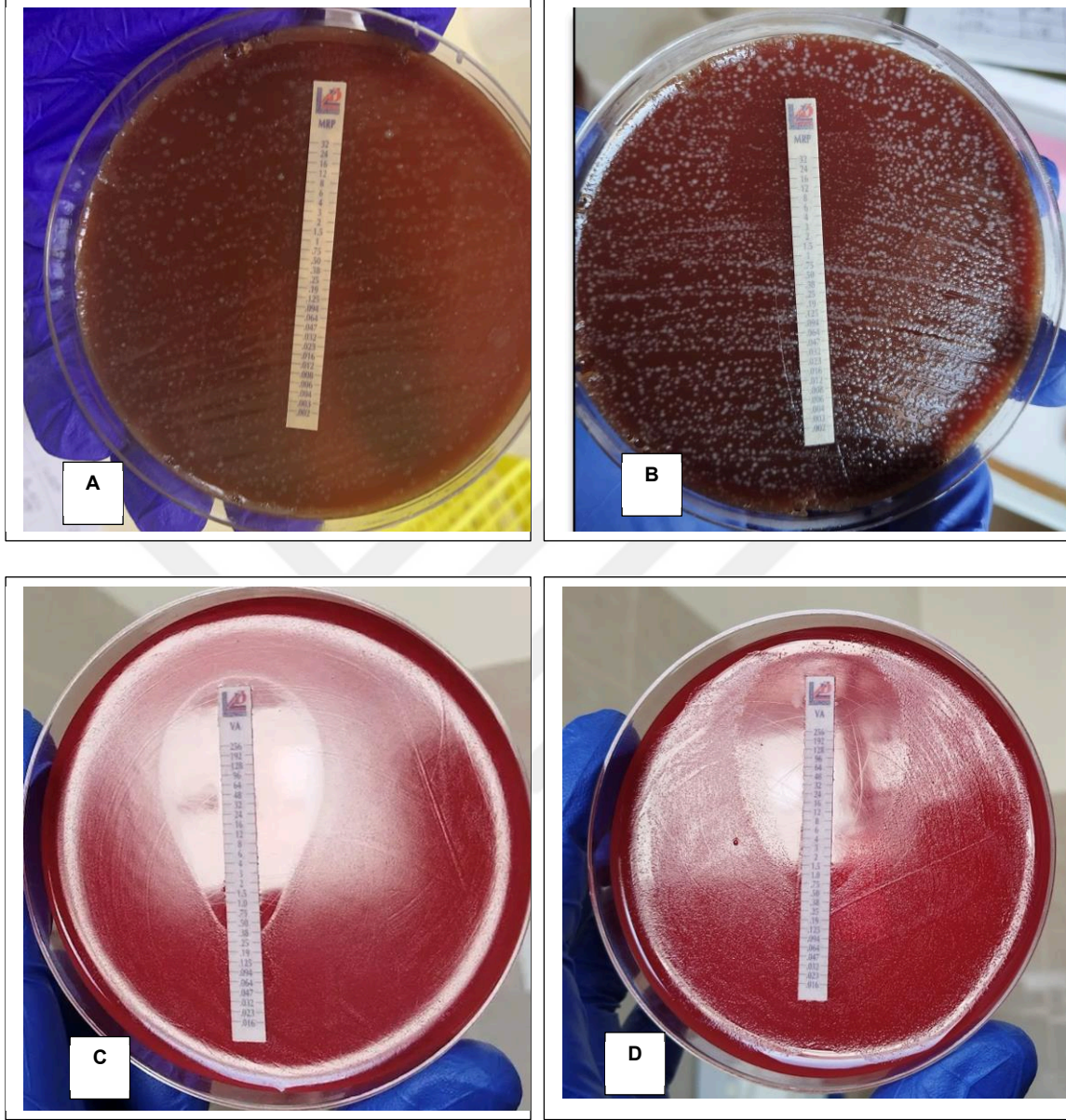
İzolat adı	Direnç saptanan antibiyotik sayısı	Antibiyotikler
14cd ^a	2	CD, AMP
4cd ^a	2	CD, AMP
2cd ^a	3	CD, AMP, MRP
8cd	3	CD, AMP, MRP

Sağlıklı köpek izolatları	Sağlıklı kedi izolatları	İshalli köpek izolatları
---------------------------	--------------------------	--------------------------

AMP: Ampisilin, CD: Klindamisin, VAN: Vankomisin, MRP: Meropenem, MTZ: Metronidazol. ^a: Antibiyotik uygulanan hayvanlar



Şekil 4. 4. *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel duyarlılık test sonuçları.
A: 2cd, B: 1cd; C: 17cd, D: 16cd; E: 12cd, F: 6cd kodlu izolatların sırasıyla ampisilin, klindamisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı duyarlılık zonları.



Şekil 4. 5. *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel duyarlılık test sonuçları.

A: 18cd, B: 8cd; C: 14cd, D: 5cd kodlu izolatların sırasıyla meropenem ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılık zonları.

Tablo 4. 6. Kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının E-test sonuçları

Anti-biyotik	MIC Değeri (mg/L)			MIC değerlerine göre <i>C. difficile</i> izolat sayıları																					
	S	I	R	Orijin	0.032	0.125	0.16	0.19	0.256	0.38	0.47	0.5	0.64	0.75	0.94	1	1.5	2	3	4	8	12	16	≥32	
AMP ^C	≤0.5	1	≥2	Kedi	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	-	-	
				Köpek	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	4	-	-	-	2	-	-	-	-	
CD ^C	2	4	≥8	Kedi	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	3	-	-	-	
				Köpek	-	1	1	1	2	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-		
VAN ^E	≤2	-	≥2	Kedi	-	-	1	-	1	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-		
				Köpek	-	4	-	-	-	3	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MRP ^C	≤4	8	≥16	Kedi	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	2	-	1	-	-	-	-		
				Köpek	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	2	-	2	-	-	-	5	
MTZ ^C	≤8	16	≥32	Kedi	-	-	-	2	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-		
				Köpek	2	2	-	-	1	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	
AMP: Ampisilin, CD: Klindamisin, VAN: Vankomisin, MRP: Meropenem, MTZ: Metronidazol, ^E : Değerlendirilmesinde EUCAST 2025'te bildirilen eşik değerler kullanılmıştır. ^C : CLSI 2025'te bildirilen eşik değerler kullanılmıştır. MIC: Minimum inhibitör konsantrasyon, S: Duyarlı, I: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli																									
	Duyarlı izolatlar				Orta derece duyarlı izolatlar						Dirençli izolatlar														

4.3. WGS Analiz Sonuçları

4.3.1. Tüm Genom Dizileme (WGS) Kalite Bulguları

Çalışmada PCR ile *C. difficile* olarak tanımlanan 19 adet izolat, FastQC analizine tabi tutuldu ve sekans kaliteleri ile ilgili herhangi bir sorun tespit edilmedi. Elde edilen *C. difficile* genomları referans genom *C. difficile* 630 ile karşılaştırıldığında izolatların 18'i *C. difficile* olarak belirlenirken 1'i *C. innocuum* olarak identifiye edildi. Kontiglerin N50 değerleri minimum 256,093, maksimum ise 4.223,882 olarak hesaplandı. L50 değerleri ise en düşük 1, en yüksek ise 7 olarak belirlendi. Genom uzunluğu ortalama 4.272,472 bp olarak belirlenen izolatların elde edilen N50, L50, N90, G+C oranı Genom kapsamı (coverage), Tutarlılık ve Kontaminasyon kalite metrikleri göz önüne alınarak 2 tanesi Flye V1.17 ile birleştirilirken 16 tanesi Unicycler v0.4.8 ile birleştirildi (Tablo 4.7). 10cd izolatına (*C. innocuum*) ait genom ise Unicycler v0.4.8 ile birleştirildi. Çalışmada WGS analizine tabi tutulan 18 *C. difficile* izolatının tüm genom dizilerinin TYGS veritabanında eşleştiği türlere ilişkin veriler (Tablo 4.8)'da sunulmuş olup ilk eşleşmelerin farklı *C. difficile* tip suşları ile olduğu belirlendi. Bununla beraber çalışmada izole edilen ve WGS analizine tabi tutulan 18 *C. difficile* izolatı ile 1 *C. innocuum* izolatı NCBI Genbank veri tabanına kaydedildi ve izolatlara ait BioProject, BioSample ve erişim numaraları alındı (Tablo 4.8).

4.3.2. Genom Anotasyon Sonuçları

İzolatların Toksin Genlerinin Belirlenmesi

İzolatların genomları üzerinde sahip oldukları toksin genleri tespit edildi. Sekiz izolatın (%44.4) *TcdB* ve *TcdA* genlerini birlikte taşıdığı, bir izolatın ise sadece *TcdA* genini taşıdığı belirlendi. Öte yandan izolatların hiçbirinde *Cdt* gen ailesine ait herhangi bir gene rastlanmadı. Dokuz (%50) izolatın ise non-toksijenik olduğu belirlendi. Dokuz toksijenik izolatdan iki (%22.2) tanesinin kedi, yedi (%77.7) tanesinin köpek orijinli olduğu görüldü (Tablo 4.9).

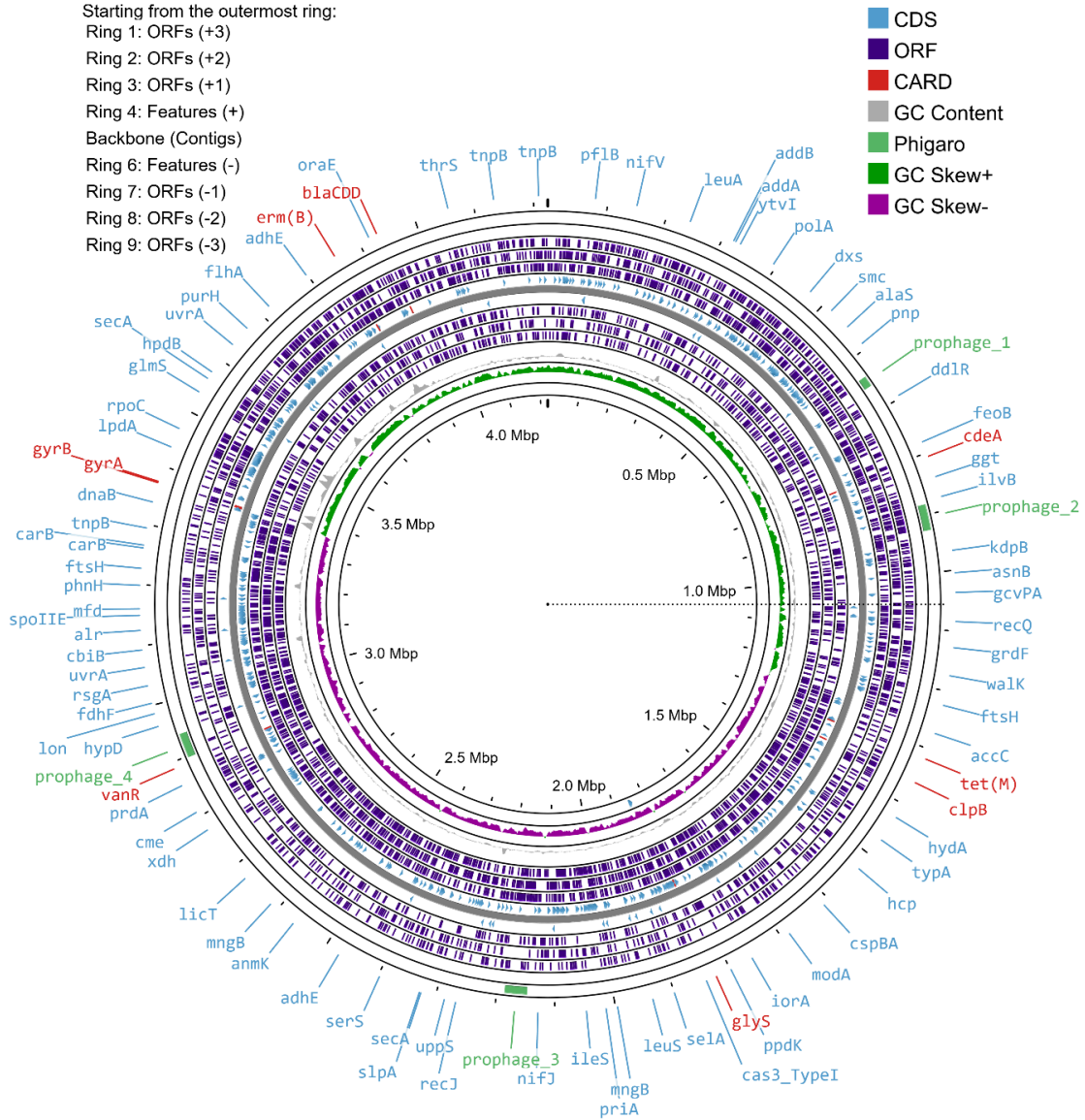
İzolatların Adherans Genlerinin Belirlenmesi

İzolatların, adherans'da etkili hücre duvarı proteinleri (*Cwp 88*, *Cwp 66*), yüzey tabakası proteini (*SlpA*) ve Flagella (*fliP*)'larını kodlayan genlerin varlığı saptandı. Analizler sonucu; dört (%66.6) kedi ve 11 (91.6) köpek orijinli olmak üzere 15 (%83.3) izolatın *Cwp 66* ve *Cwp 88*, 10 (83.3) köpek ve dört kedi (%66.6) orijinli olmak üzere 14 (%77.7) izolatın ise *SlpA* gen varlıklarının pozitif olduğu ve bütün izolatların (%100)

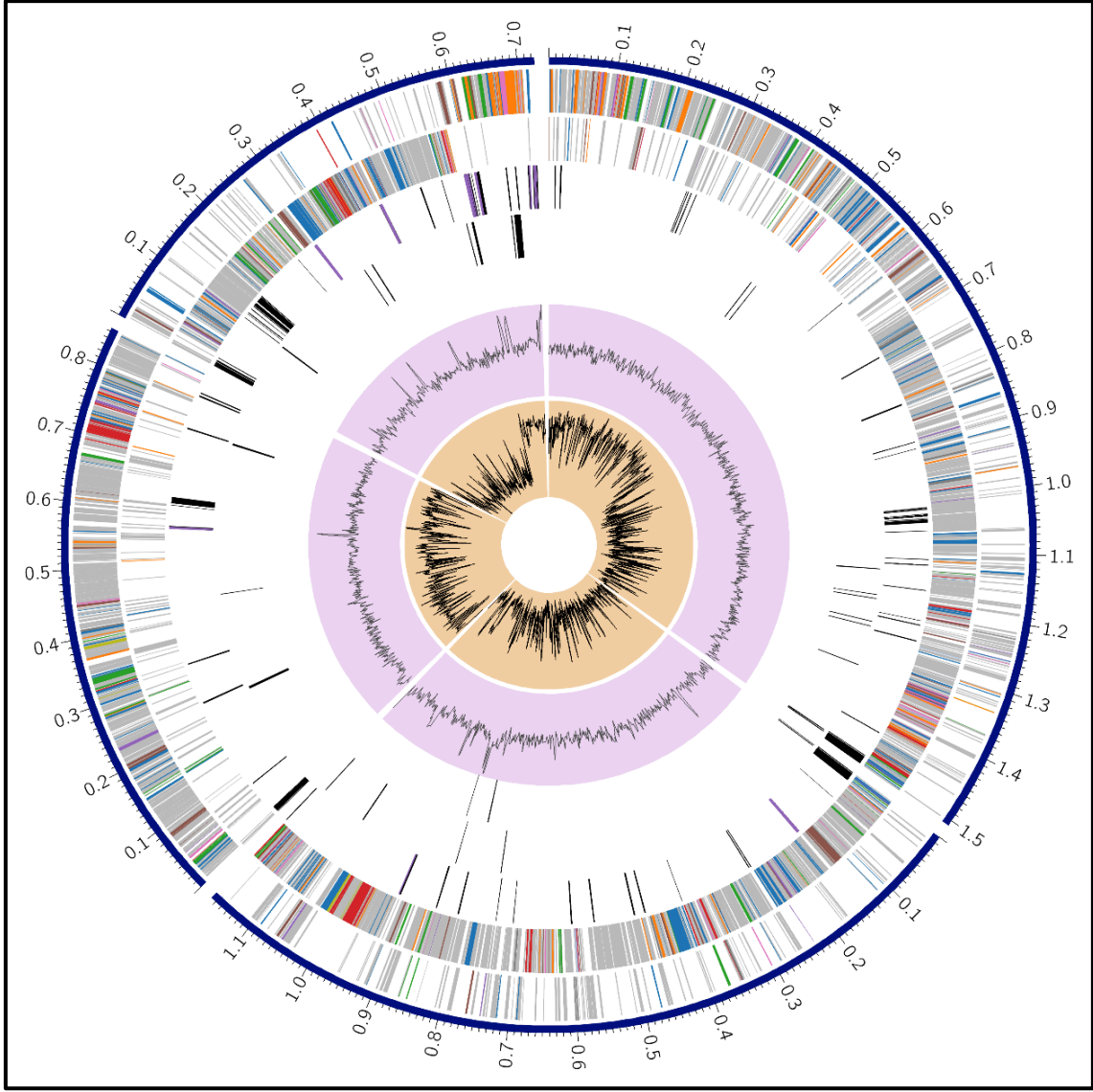
fliP geni yönünden pozitif olduğu tespit edildi (Tablo 4.9). Elde edilen izolatlardan temsili olarak seçilen “6cd” izolatının sirküler genom demonstrasyonu Şekil 4.6’da verilmiştir.

İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

C. difficile izolatlarının bazı önemli direnç genleri (*nimB*, *tet(M)*, *ermB*, *CDD-1*, *CDD-2*, *vanG*, *vanR*, *mefH*, *vanS*, *vanA*, *vanT*, *vanZ-1*) ve dirençle ilişkili olduğu bilinen SNP tipleri (*C656T*, *cpIR*), incelendi. Kedilerde; iki (%33.3) izolatta *gyrA* SNP’si, altı (%100) izolatta *nimB* geni, iki (%33.3) izolatta *tet(M)* geni, üç (%50) izolatta *CDD-1* geni, iki (%33.3) izolatta *CDD-2* geni, dört (%66.7) izolatta *vanR* geni, iki (%33,3) izolatta *mefH* geni, iki (%33,3) izolatta *vanZ-1*, dört (%66.7) izolatta *vanT*, dört (%66.7) izolatta *vanS* tespit edildi, öte yandan *ermB*, *vanA* ve *vanG* genlerine rastlanmadı. Köpeklerde ise; üç (%25) izolatta *gyrA* SNP’si, dokuz (%75) izolatta *nimB* geni, dört (%33.3) izolatta *tet(M)* geni, beş (%41.6) izolatta *ermB* geni, beş (%41,6) izolatta *CDD-1* geni, altı (%50) izolatta *CDD-2* geni, bir (%8.3) izolatta *vanG* geni, altı (%50) izolatta *vanR* geni, yedi (%58.3) izolatta *vanZ-1* geni, beş (%58.3) izolatta (%41.6) *vanT* geni bulunurken köpek orijinli izolatlarda *mefH* geni tespit edilmedi. Öte yandan tüm izolatlarda (%100) *C656T* ve *cpIR* SNP tipleri gözlemlendi (Tablo 4.9, Tablo 4.10), (Şekil 4.4).



Şekil 4.6. “6cd” kodlu köpek orijinli *C. difficile* izolatının genom anotasyonundan elde edilen verilerin sirküler organizasyonu. En dış halkadan içe doğru sırasıyla; (+3) çerçeve okuma bölgeleri (ORF'ler), (+2) çerçeve ORF'ler, (+1) çerçeve ORF'ler, forward yönde gen özellikleri, omurga (kontigler), negatif yönde gen özellikleri, (-1) çerçeve ORF'ler, (-2) çerçeve ORF'ler ve (-3) çerçeve ORF'ler gösterilmiştir. Renk kodları: Mavi, gen kodlayıcı diziler (CDS); Mor, GC eğimi (+ve-); Yeşil, pozitif GC eğimi; Kırmızı, antibiyotik direnç genleri (CARD); Gri, GC içeriği; Siyah, Phigaro yazılımı ile tanımlanmış olan faj bölgeleri.



Şekil 4.7. “6cd” kodlu köpek orijinli *C. difficile* izolatının genom anotasyonu sonucunda elde edilen verilerin dairesel gösterimi. Grafik dışdan içe doğru; elde edilen kontigleri, forward iplikteki CDS'leri, reverse iplikteki CDS'leri, RNA genlerini, bilinen antimikrobiyal direnç genlerini, bilinen virülans faktörlerini, GC içeriğini ve değişimlerini göstermektedir.

Tablo 4. 7. Analiz edilen *C. difficile* genomlarının sıralama ve kalite verileri. Kontig: DNA dizisinin bir konsensüs bölgesini temsil eden üst üste binen okumalar kümesini ifade eder. N50: Genom montaj kalitesini değerlendirmek için kullanılan bir istatistiktir L50: N50 değerini veren kontig sırasını ifade eder.

İzolat adı	Birleştirme Metotu/Versiyon Numarası	Kontig Sayısı	En uzun Kontig Uzunluğu	Genom Uzunluğu (bp)	N50 Değeri	L50 Değeri	Genom kapsamı	Tutarlılık (%)	Kontaminasyon (%)
1cd ^a	Flye V1.17	44	465.708	4.353,375	256.093	7	32.201	99.9	4.60
2cd ^a	Flye V1.17	33	754.565	4.263,056	449.627	4	27.548	99.9	4.20
3cd ^a	Unicycler v0.4.8	5	1.862,139	4.260,319	1.407,069	2	146.460	99.9	1.0
4cd ^a	Unicycler v0.4.8	8	1.843,982	4.278,067	1.281,723	2	145.195	98.7	4.50
5cd	Unicycler v0.4.8	6	2.338,613	4.162,933	2.338,613	1	144.58	99.9	4.00
6cd ^a	Unicycler v0.4.8	4	1.507,595	4.255,016	1.168,397	2	140.84	99.9	4.00
7cd ^a	Unicycler v0.4.8	1	4.223,882	4.223,882	4.223,882	1	143.90	99.8	1.80
8cd	Unicycler v0.4.8	4	2.147,160	4.199,551	2.147,160	1	141.23	99.9	1.60
9cd	Unicycler v0.4.8	4	2.172,201	4.129,768	2.172,201	1	77.48	99.8	1.60
10cd*	Unicycler v0.4.8	1	4.593,329	4.593,329	4.593,329	1	106.322	97.4	0.7
11cd	Unicycler v0.4.8	6	1.704,751	4.310,047	1.341,628	2	83.81	99.8	1.80
12cd	Unicycler v0.4.8	4	2.070,423	4.360,088	902.593	2	142.16	100.0	2.20
13cd ^a	Unicycler v0.4.8	4	1.739,521	4.249,635	1.193,116	2	141.85	99.9	2.20
14cd ^a	Unicycler v0.4.8	6	1.225,356	4.266,842	1.131,952	2	143.447	99.9	2.50
15cd	Unicycler v0.4.8	2	4.035,163	4.154,450	4.035,163	1	145.02	100.0	2.20
16cd	Unicycler v0.4.8	23	1.582,966	4.851,448	456.851	3	140.70	99.6	4.00
17cd ^a	Unicycler v0.4.8	5	1.686,828	4.172,076	1.035,982	2	142.57	100	2.60
19cd ^a	Unicycler v0.4.8	9	1.108,297	4.141,476	578.417	3	143.73	99.7	3.90
20cd	Unicycler v0.4.8	3	2.314,774	4.213,622	2.314,774	1	142.56	100	2.90
*: PCR ile <i>C. difficile</i> olarak tanımlanan ancak WGS analizinde <i>Clostridium innocuum</i> olarak tanımlanan izolat									
	Sağlıklı köpek izolatları	Sağlıklı kedi izolatları	İshalli köpek izolatları	İshalli kedi izolatları	^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar				

Tablo 4. 8. Çalışmada elde edilen izolatların erişim numaraları, en yakın tip suşlar ve genomik yakınlık dereceleri.

*: Digital DNA-DNA Hybridization. **: PCR ile *C. difficile* olarak tanımlanan ancak WGS analizinde *Clostridium innocuum* olarak tanımlanan izolat

İzolat adı	BioProject Numarası	BioSample Numarası	Erişim Numarası	En yakın tip suş	dDDH* Benzerlik Yüzdesi	G+C içeriği farklılık yüzdesi
1cd ^a	PRJNA1150517	SAMN43287658	JBGOF000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	93.0	0.9
2cd ^a	PRJNA1150532	SAMN43288435	JBGOF000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	87.9	0.2
3cd ^a	PRJNA1142345	SAMN42934612	JBFYDK000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	87.8	0.26
4cd ^a	PRJNA1142419	SAMN42940519	JBFYDL000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	87.7	0.26
5cd	PRJNA1150549	SAMN43288705	JBGOFU000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	98.6	0.02
6cd ^a	PRJNA1150771	SAMN43296498	JBGOPC000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	87.4	0.32
7cd ^a	PRJNA1173519	SAMN44307050	CP172239	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	85.1	0.32
8cd	PRJNA1150809	SAMN43297081	JBG00Z000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	87.8	0.21
9cd	PRJNA1150812	SAMN43297090	JBGOPA000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	87.2	0.25
10cd**	PRJNA1174072	SAMN44327364	CP172347	<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	78.8	0.5
11cd	PRJNA1150888	SAMN43297198	JBGOPB000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	93.8	0.47
12cd	PRJNA1150896	SAMN43297301	JBGOPD000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	94.4	0.37
13cd ^a	PRJNA1150905	SAMN43297525	JBGOPE000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	93.4	0.2
14cd ^a	PRJNA1150909	SAMN43297545	JBGOPF000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	93.2	0.23
15cd	PRJNA1150917	SAMN43297667	JBGOPG000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	93.5	0.21
16cd	PRJNA1150920	SAMN43297692	JBGOPH000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	94.3	0.66
17cd ^a	PRJNA1150923	SAMN43297758	JBGOPJ000000000	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689	93.3	0.42
19cd ^a	PRJNA1150932	SAMN43297817	JBGOPJ000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	93.6	0.42
20cd	PRJNA1150937	SAMN43297822	JBGOPK000000000	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296	91.5	0.9
Sağlıklı köpek izolatları		Sağlıklı kedi izolatları		İshalli köpek izolatları	İshalli kedi izolatları	^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar

Tablo 4. 9. Çalışmada elde edilen köpek ve kedi orijinli *C. difficile* izolatlarının direnç, adherans ve toksin genleri.

İzolat adı	Direnç geni**				Dirençle ilgili SNP			Adherens geni				Toksın geni		
	<i>nimB</i>	<i>tet(M)</i>	<i>ErmB</i>	<i>mefH</i>	<i>gyrA</i>	<i>C656T</i>	<i>cpIR</i>	<i>CWP66</i>	<i>CWP88</i>	<i>SlpA</i>	<i>fliP</i>	<i>TcdA</i>	<i>TcdB</i>	<i>Cdt</i>
1cd ^a	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2cd ^a	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
3cd ^a	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4cd ^a	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5cd	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6cd ^a	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7cd ^a	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8cd	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9cd	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11cd	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12cd	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13cd ^a	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14cd ^a	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
15cd	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
16cd	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
17cd ^a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
19cd ^a	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
20cd	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

***C. difficile* izolatlarında WGS analizi ile saptanan ve fenotipik duyarlılık testleri yapılmayan antibiyotiklere ait direnç genleri

Sağlıklı köpek izolatları	Sağlıklı kedi izolatları	İshalli köpek izolatları	İshalli kedi izolatları	^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar
---------------------------	--------------------------	--------------------------	-------------------------	--

4.3.3. Fenotipik Direnç ile Antibakteriyel Direnç Gen Varlığının Karşılaştırılması

Çalışmada elde edilen izolatların tamamının E-test ile vankomisine duyarlı olduğu ve *vanG*, *vanA* gen varlığı yönünden de negatif olduğu belirlendi. Bununla birlikte kedi orijinli duyarlı izolatların dördünde (%66.7) *vanR*, ikisinde (%33,3) *vanZ-1*, dördünde (%66.7) *vanT* ve dördünde (%66.7) ise *vanS* genlerinin varlığı belirlendi. Yine köpek orijinli duyarlı izolatların birinde (%8.3) *vanG*, altısında (%50) *vanR*, yedisinde (%58.3) *vanZ-1* ve beşinde (%41.6) *vanT* genlerinin varlığı saptandı. Kedi orijinli izolatların tamamının fenotipik olarak meropeneme duyarlı olduğu belirlenirken köpek orijinli izolatlarda %41.6 oranında direnç saptandı. Ancak izolatların tamamında meropenem ile ilişkili gen varlığı saptanamadı. E-test ile kedi ve köpek orijinli izolatların sırası ile %50 ve %25'inin klindamisine dirençli olduğu saptandı. Bu dirençli izolatların biri (1/3, %33.3) köpek orijinli olup *erm(B)* gen varlığı yönünden pozitif bulunurken, iki (2/3, %66.6) kedi ve bir (1/3, %33.3) köpek orijinli dirençli izolatta ise bu gene rastlanmadı. Ayrıca, fenotipik olarak klindamisine duyarlı olduğu belirlenen dört (4/8, %50) köpek orijinli izolatın *erm(B)* gen varlığı yönünden pozitif olduğu belirlendi.

Fenotipik test ile sadece iki (%16.6) köpek orijinli izolatın metronidazole dirençli olduğu belirlenirken bu izolatların biri (1/2, %50) *nim(B)* geni varlığı yönünden pozitif bulunurken diğer dirençli izolatın bu genin varlığı yönünden negatif olduğu saptandı. Bununla birlikte fenotipik test ile duyarlı olduğu belirlenen izolatların yedisi (7/10, %70) köpek ve altısı (6/6, %100) kedi orijinli olmak üzere toplam 13 izolat *nim(B)* geni varlığı yönünden pozitif bulundu. İzolatların ampisiline direnci fenotipik test ile kedilerde %50 (3/6) köpeklerde %16.6 (2/12) oranında saptandı. Dirençli iki köpek izolatının birinde (%50) ve dirençli üç kedi izolatının birinde (%33.3) *CDD-1* geni negatif ancak *CDD-2* geni pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca dirençli iki kedi (%66.6) ve bir (%50) köpek orijinli izolat *CDD-1* geni yönünden pozitif ancak *CDD-2* geni yönünden negatif olarak belirlendi. Ayrıca, duyarlı olduğu belirlenen köpek orijinli izolatlardan biri (%10) sadece *CDD-1* geni yönünden, biri (%10) de sadece *CDD-2* geni yönünden pozitif bulundu. Duyarlı olduğu belirlenen bir köpek orijinli izolatın iki (%100) geni de içerdiği ve duyarlı bir kedi (%33) orijinli izolatın ise sadece *CDD-2* geni taşıdığı tespit edildi. Yapılan istatistik analizleri sonucu izolatların fenotipik ve genotipik direnç profilleri arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı (Tablo 4.10; $p>0.05$).

Tablo 4. 10. Çalışmada elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik duyarlılık profilleri

İzolat	VAN							CD		MTZ		AMP			MRP	
	F	Gen						F	Gen	F	Gen	F	Gen			F
		<i>vanG</i>	<i>vanZ-1</i>	<i>vanT</i>	<i>vanR</i>	<i>vanS</i>	<i>vanA</i>		<i>erm(B)</i>		<i>C656T</i>		<i>nim(B)</i>	<i>CDD-1</i>		
1cd ^a	S	-	-	-	-	-	-	S	+	+	S	+	I	-	+	S
2cd ^a	S	-	+	-	-	-	-	R	+	+	S	+	R	-	+	R
3cd ^a	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	S	+	S	-	-	S
4cd ^a	S	-	-	+	+	+	-	R	-	+	S	+	R	+	-	S
5cd	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	R	-	S	+	-	S
6cd ^a	S	-	+	-	+	-	-	R	+	+	S	+	S	-	-	S
7cd ^a	S	-	+	-	+	-	-	S	+	+	S	+	S	-	-	S
8cd	S	-	+	+	-	+	-	R	-	+	S	+	R	+	-	R
9cd	S	-	+	+	+	+	-	S	-	+	S	-	I	+	-	R
10cd*	S	-	-	-	+	-	-	S	-	+	S	-	S	+	+	S
11cd	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	S	+	I	+	-	S
12cd	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	S	+	R	+	-	S
13cd ^a	S	-	+	-	-	-	-	R	-	+	S	+	S	-	+	S
14cd ^a	S	-	+	-	-	-	-	R	-	+	S	+	R	-	+	S
15cd	S	-	-	+	-	+	-	S	+	-	S	-	I	-	+	S
16cd	S	-	+	-	-	-	-	S	+	+	S	+	S	+	+	R
17cd ^a	S	-	+	+	+	+	-	S	-	+	S	-	S	-	+	S
19cd ^a	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	S	+	I	-	-	R
20cd	S	-	-	+	+	+	-	S	-	+	R	+	S	-	-	S
	Sağlıklı köpek izolatları			Sağlıklı kedi izolatları				İshalli köpek izolatları				İshalli kedi izolatları			^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar	
*: PCR ile <i>C. difficile</i> olarak tanımlanan ancak WGS analizinde <i>Clostridium innocuum</i> olarak tanımlanan izolat, F: Fenotipik direnç sonucu. S: Duyarlı, I: orta derecede duyarlı, R: Dirençli izolat, Çalışmada Meropenem direnci ile ilgili bir gene rastlanmamıştır. AMP: Ampisilin, CD: Klindamisin, VAN: Vankomisin, MRP: Meropenem, MTZ: Metronidazol																

4.4. İzolatların Farklı Metodlarla Genotiplendirilmesi

4.4.1. ERIC-PCR ile Tiplendirme

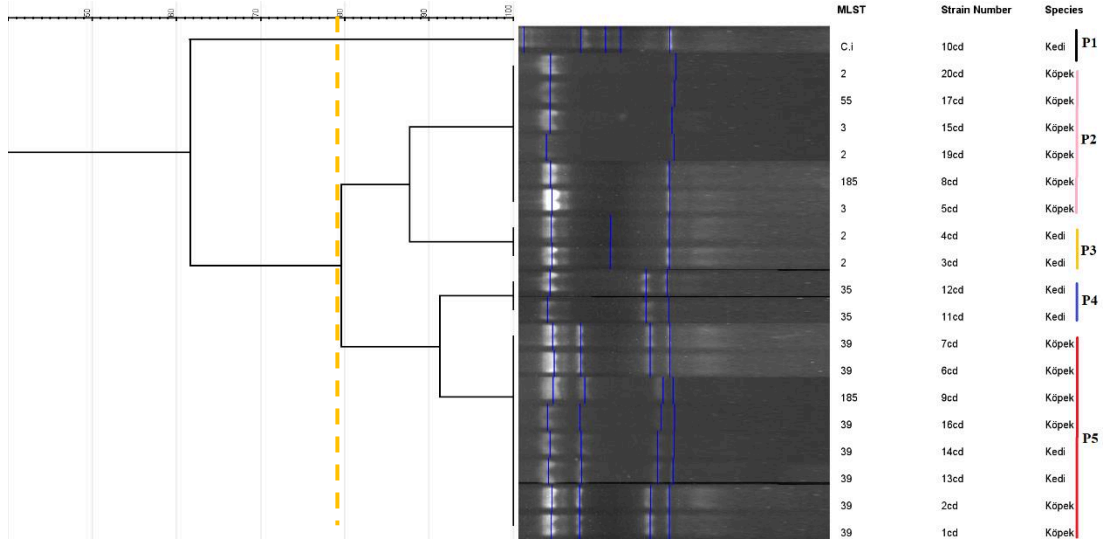
Çalışmada elde edilen 18 *C. difficile* izolatu ve 1 adet *C. innocuum* izolatının, ERIC-PCR ile genotiplendirilmesi sonucunda elde edilen PCR profilleri UPMGA temelli dendrogram ile ağaçlandırıldı. Dendrogram analizi sonucunda elde edilen ERIC profilleri “P” şeklinde adlandırıldı (Şekil 4.3). *C. difficile* izolatlarında 4 farklı ERIC-PCR profili (P2, P3, P4, P5) elde edilirken, kedi orijinli *C. innocuum* izolatının *C. difficile* izolatlarından farklı bir ERIC-PCR profilinde (P1) olduğu saptandı. Köpek izolatlarının %50(6/12)’sinin P2, %50(6/12)’sinin P5 profilinde yer aldığı belirlenirken kedi izolatlarının %33(2/6)’ünün P3, %33(2/6)’ünün P4, %33(2/6)’ünün ise P5 profilinde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.11, Şekil 4.8).

4.4.2. MLST ile tiplendirme

İzolatların temizlenen ve birleştirilen WGS verilerinin, sekans tipleri (ST) ve MLST gruplarının araştırılması amacıyla PubMLST veritabanından yararlanılmıştır. Bu süreçte, MLST gen lokuslarında bulunan 7 genin (*adh*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* ve *tpi*) allelleri, uzunlukları ile başlangıç ve bitiş pozisyonları ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu kapsamlı analiz, izolatların MLST profillerine ilişkin detaylı bilgiler sağlamıştır. Kedilerden izole edilen altı suşun ikisi (%33.3) ST2, ikisi (%33.3) ST35 ve ikisi (%33.3) ST39 olarak tiplendirilmiş olup, bu izolatların dördü (%66.6) Clade 1 ve ikisi (%33.3) Clade 4 içinde yer almıştır. Köpeklerden izole edilen 12 izolatın beşi (%41.6) ST39, ikisi (%25) ST2, ikisi (%16.6) ST185, ikisi (%8.3) ST3 ve biri (%8.3) ST55 olarak sınıflandırılmış olup, bu izolatların 5’i (%41.6) Clade 4 ve 7’si (%58.3) Clade 1’de yer almıştır (Tablo 4.11).

4.4.3. İzolatların *SlpA* Proteinlerinin Tiplendirilmesi

İzolatların *SlpA* proteinlerinin tiplendirilmesi ile kedi orijinli *C. difficile* izolatlarında *SlpA* ST 9 (%33, 2/6), *SlpA* ST 186 (%33, 2/6) ve *SlpA* ST 4 (%33, 2/6) olmak üzere 3 farklı sekans tipi belirlendi. Köpek orijinli *C. difficile* izolatlarında ise *SlpA* ST 186 (%41.6, 5/12), *SlpA* ST 34 (%8.3, 1/12), *SlpA* ST 162 (%16.6, 2/12), *SlpA* ST 14 (%8.3, 1/12), *SlpA* ST 9 (%8.3, 1/12) ve *SlpA* ST 28 (%8.3, 1/12) olmak üzere 6 farklı *SlpA* sekans tipi saptandı (Tablo 4.11, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.8. Çalışmada elde edilen *C. difficile* izolatları ve *C. innocuum* izolatının orijinlerine göre ERIC-PCR profilleri ve sekans tipleri

4.4.4. Genotiplendirme Metodlarının Karşılaştırılması

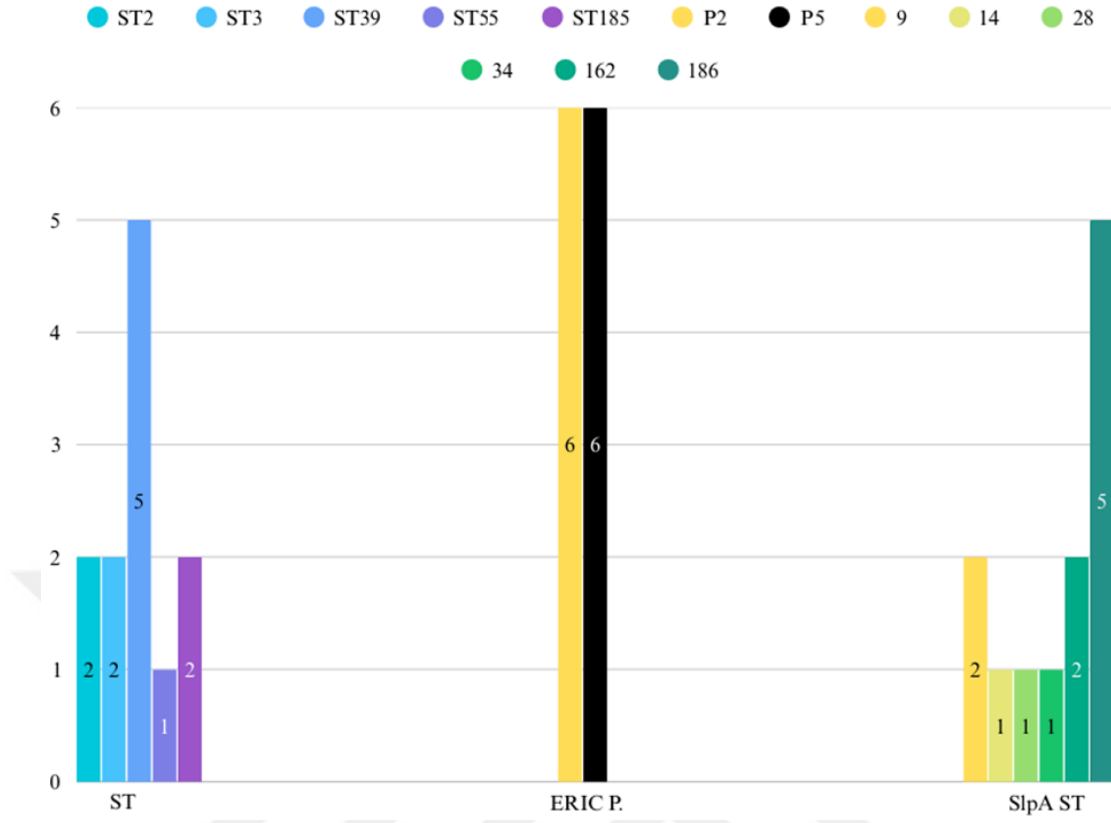
Çalışmada elde edilen *C. difficile* izolatlarının çeşitli yöntemlerle belirlenen genotiplerine ilişkin bilgiler Tablo 4.11’de sunulmuştur. Bu tablodaki verilere göre gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda; *SlpA* ST, MLST ST ve ERIC-PCR’nin Simpson’ın çeşitlilik indeksine göre ayırım gücü sırasıyla 0.810, 0.804 ve 0.706 olarak belirlendi. Ayrıca *SlpA* ST ve MLST ST; ERIC-PCR ve *SlpA* ST ve ERIC-PCR ve MLST ST SID’leri arasındaki P değerlerinin üçü de “P > 0.05” olarak belirlendi ve istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak ERIC-PCR’nin SID değeri diğer genotiplendirme yöntemlerine göre düşük değerde saptanmış olup (0’a yaklaştıkça ayırım gücü azalmaktadır.) bu durum yöntemin ayırım gücünün de diğer metodlara göre düşük olduğunu göstermektedir. *SlpA* ST’nin MLST ST sonuçlarına göre hesaplanan ayarlanmış Rand katsayısı ile saptanan uyumu 0.979 olarak belirlenmiş olup bu sonuç, yöntemlerin arasındaki yüksek uyumu gösterdi. *SlpA* ST sonuçları MLST’ye göre karşılaştırıldığında ise Wallace katsayısı 1.000 olarak saptanmış olup izolatların aynı *SlpA* tipi olarak karakterize edilmesi durumunda, bu izolatların aynı MLST sekans tipi olarak tanımlanma şansının %100 olduğunu göstermektedir. Yine, MLST ST sonuçları *SlpA* ST’ye göre karşılaştırıldığında ise Wallace katsayısı 0.959 olarak belirlendi (bu değer izolatların aynı MLST tipi olarak karakterize edilmesi durumunda, bu izolatların aynı *SlpA* tipi olarak tanımlanma şansının %95.9 olduğunu göstermektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4. 11. İzolatların sekans tipleri, *SlpA* ve MLST grupları

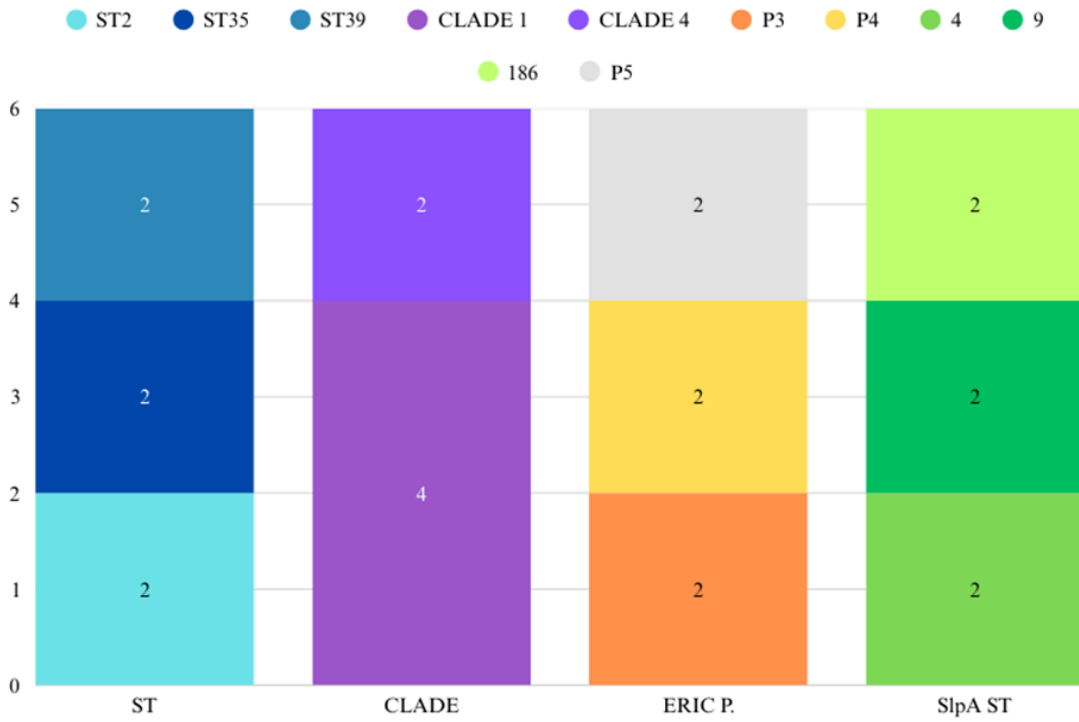
İzolat adı	ST	MLST Clade	ERIC-PCR Profili	<i>SlpA</i> ST
1cd ^a	ST39	4	P5	186
2cd ^a	ST39	4	P5	186
3cd ^a	ST2	1	P3	9
4cd ^a	ST2	1	P3	9
5cd	ST3	1	P2	34
6cd ^a	ST39	4	P5	186
7cd ^a	ST39	4	P5	186
8cd	ST185	1	P2	162
9cd	ST185	1	P5	162
11cd	ST35	1	P4	4
12cd	ST35	1	P4	4
13cd ^a	ST39	4	P5	186
14cd ^a	ST39	4	P5	186
15cd	ST3	1	P2	14
16cd	ST39	4	P5	186
17cd ^a	ST55	1	P2	28
19cd ^a	ST2	1	P2	9
20cd	ST2	1	P2	9
Sağlıklı köpek izolatları	Sağlıklı kedi izolatları	İshalli köpek izolatları	İshalli kedi izolatları	^a : Antibiyotik uygulanan hayvanlar

Tablo 4. 12. SID değeri, Ayarlanmış Rand ve Wallace katsayıları kullanılarak tiplendirme metodlarının karşılaştırılması

Tiplendirme metodu	İzolat sayısı	SID (%95 CI)	Ayarlanmış Rand katsayısı (%95 CI)			Wallace katsayısı (%95 CI)		
			ERIC-PCR	MLST ST	<i>SlpA</i> ST	ERIC-PCR	MLST ST	<i>SlpA</i> ST
ERIC-PCR	18*	0.706 (0.585-0.827)		0.564 (0.142-1.000)			0.447 (0.148-0.746)	0.424 (0.130-0.718)
MLST ST	18	0.804 (0.684-0.924)				0.764 (0.639-0.889)		0.959 (0.918-1.000)
<i>SlpA</i> ST	18	0.810 (0.684-0.937)	0.543 (0.099-1.000)	0.979 (0.921-1.000)		0.756 (0.627-0.885)	1.000 (1.000-1.000)	
SID: Simpson çeşitlilik indeksi, *: 12 köpek orijinli ve 6 kedi orijinli								



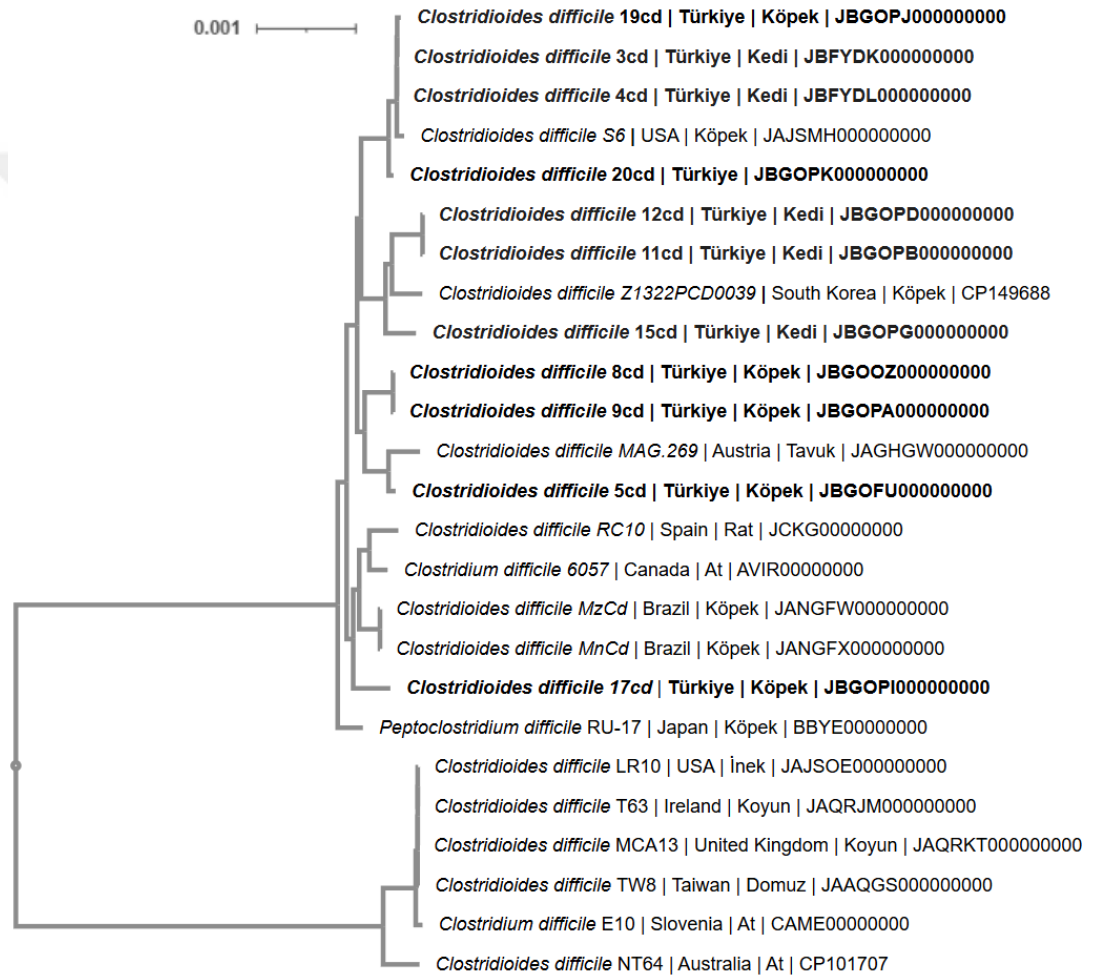
Şekil 4.9. Köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının MLST sekans tipleri, ERIC PCR profilleri ve *SlpA* sekans tipleri.



Şekil 4.10. Kedi orijinli *C. difficile* izolatlarının MLST sekans tipleri, ERIC PCR profilleri ve *SlpA* sekans tipleri

4.5. Filogenetik Analizler

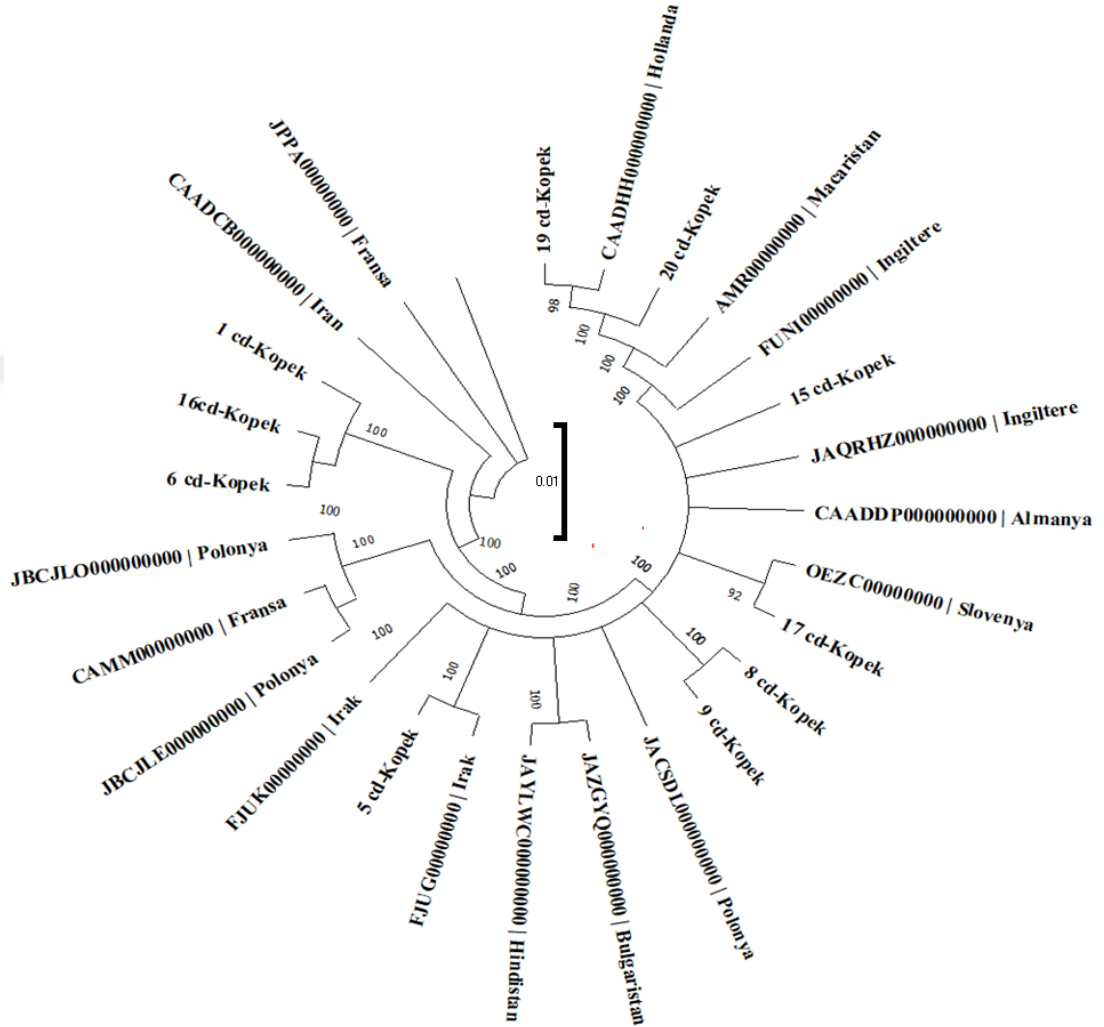
Çalışmadan elde edilen tüm genom verileri ile topluma açık veri tabanlarında bulunan Çekirdek genom SNP hizalamaları, RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood, V. 8.2.12) arayüzü tarafından gerçekleştirilen maksimum olabilirlik analizi için temel oluşturdu, genetik yakınlıklar içeren gruplar MEGA (V.11.0.13) programında şematize edilerek ağaçlandırıldı (Şekil 4.11, Şekil 4.12; Şekil 4.13).



Şekil 4. 11. *C. difficile* izolatları ile farklı demografik bölgelerden elde edilen hayvan orijinli izolatların ağaçlandırılmaları. GenBank veri tabanına daha önce kayıtları yapılan izolatların accession numaraları, izole edildiği ülkeler ve orijinleri şekilde sunulmuştur. Bu çalışmada elde edilen izolatlar koyu renkle ifade edilmiştir.

WGS tabanlı filogenetik analizler, kedi kaynaklı “3cd”, “4cd”, “19cd” ve “20cd” kodlu *C. difficile* izolatlarımızın, ABD kökenli köpek izolatı “S6” ile dikkate değer bir filogenetik yakınlık sergilediğini, bunun yanı sıra “11cd” ve “12 cd” kodlu

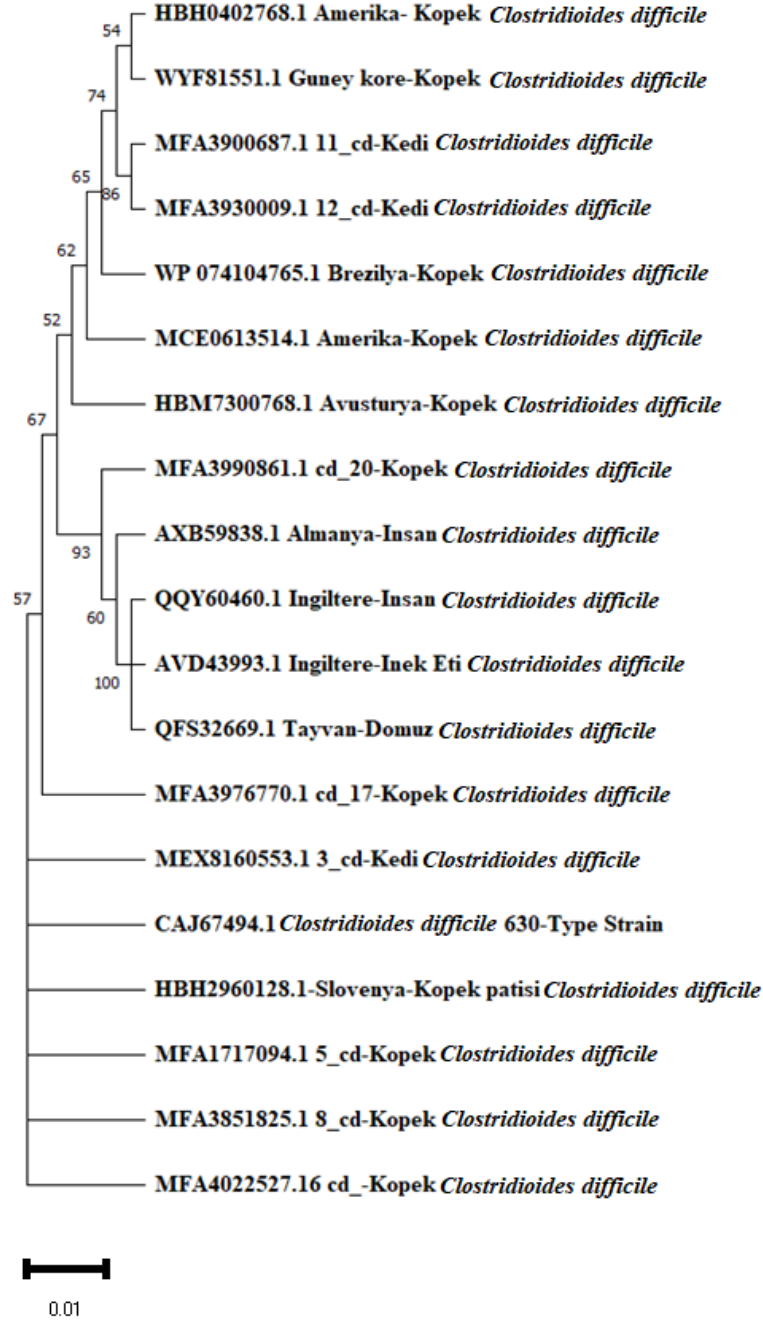
izolatımızın Güney Kore’den izole edilen “Z1322PCD0039” accession numaralı köpek kaynaklı *C. difficile* izolatıyla, ‘5cd” kodlu izolatımızın da Avusturya’da bir tavuktan elde edilen ‘MAG269” kodlu *C. difficile* suşu ile yakınlığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. Köpek orijinli *C. difficile* izolatları ile farklı coğrafi bölgelerden elde edilen insan orijinli izolatların sirküler şekilde ağaçlandırılmaları. GenBank veri tabanına daha önce kayıtları yapılan izolatların accession numaraları, izole edildiği ülkeler ve orijinleri grafikte sunulmuştur.

Köpek orijinli izolatlarımız ile dünyanın diğer bölgelerinden kaydedilmiş insan orijinli *C. difficile* izolatları arasında yapılan analizler ise; 5cd izolatımızın İran’dan elde edilen ‘FJUG000000000’ kodlu izolat ile, 17cd kodlu izolatımızın Slovenya’dan elde edilen ‘OEZC00000000’ kodlu izolat ile, 15cd kodlu izolatımızın İngiltere’den FUN100000000 kodlu izolat ile, 19cd kodlu izolatımızın

ise CAADHH00000000 kodlu Hollanda orijinli izolat ile yakınlık gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 13. Bazı kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatları ile farklı coğrafi bölgelerden ve kaynaklardan elde edilen *C. difficile* izolatlarının ağaçlandırılmaları. GenBank veri tabanına daha önce kayıtları yapılan izolatların accession numaraları, izole edildiği ülkeler ve orijinleri şekilde sunulmuştur.

Öte yandan çalışma kapsamında elde edilen *C. difficile* suşlarına ait majör antijenik yapı olarak bilinen *SlpA* proteinlerinin gen dizilimleri elde edildi, diğer coğrafi bölgeler ve konakçılardan elde edilen *C. difficile* izolatlarının *SlpA* gen dizileri ile filogenetik analize tabi tutularak karşılaştırması yapıldı. Kedilerden izole edilen “3cd”, “4cd” ve köpeklerden izole edilen “19” ve “20cd” suşlarının *SlpA* proteinleri, ABD'deki insan kaynaklı QWR62406 izolatı ile Slovenya'da bir köpeğin patisinden elde edilen HBH2943129 izolatına genetik olarak oldukça yakındır. Benzer şekilde, köpeklerden elde edilen “5cd” suşu, Almanya'da insan kaynaklı “AVB42170” izolatının *SlpA* proteini ile benzerlik gösterirken, “17cd” kodlu izolatın ise Hindistan'da köpek dışkı svap örneğinden elde edilen “HEB4999574” suşlarının *SlpA* proteinleri ile klonal bir ilişki içindedir. “5cd” kodlu izolatımız, Almanya'da bir insandan elde edilen “AVB42170” numaralı izolat ile, “cd1”, “cd2”, “cd13”, “cd14”, “cd6”, “cd7” izolatlarımız aynı kümelenmenin içinde ve “WP_021402687 kodlu, Güney Kore'de insandan elde edilen izolata genetik yakınlık göstermektedir. Öte yandan “25_HFG9196321_1” ve “26_HFG9230863_1” kodlu Fransa'dan elde edilen izolatlar ise diğerlerinden farklı dallarda konumlanmışlardır (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14. *C. difficile* izolatlarının *SlpA* proteinini kodlayan gen bölgeleri ile farklı coğrafi bölge ve konakçılardan elde edilen *C. difficile* izolatlarının eş lokusları ile ağaçlandırılması. Bu çalışma kapsamında elde edilen izolatlar koyu renkte gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Clostridioides difficile (*C. difficile*), hem insan ve hayvanların bağırsak mikrobiyomunda kommensal olarak hem de çevresel etken şeklinde doğada yaygın olarak bulunan bir basildir. Etken kedi ve köpeklerde pseudomembranöz kolit ve inatçı ishal gibi klinik semptomlarla kendini gösterir ve uzun süreli antibiyotik tedavisinin bir yan etkisi olarak ortaya çıkar (Buddle ve ark., 2023). Bakteri sporlarının farklı ortam yüzeylerinde, hastane personel kıyafetleri ve ekipmanlarında bulunması ve dezenfektanlara, ısı gibi fiziksel ajanlara karşı dayanıklı olması nedeniyle mücadelesi zordur (Paredes ve ark., 2014). İnsanlarda enfektif sekans tiplerinin kedi ve köpeklerden, gıdalardan, tropikal ve besin hayvanlarından da izole edilmiş olması etkenin zoonotik karakterde olduğu düşüncesini desteklemektedir. (Mitchell ve ark., 2022; Mengoli ve ark., 2020; Beinortas ve ark., 2018; Rodriguez ve ark., 2016; Stull ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, Kayseri’de faaliyet gösteren farklı veteriner kliniklerine getirilen sağlıklı/ishalli kedi ve köpeklerden toplanan rektal svap örneklerinde *C. difficile* prevalansı sırası ile %6 ve %12 oranında saptanmış olup, toplam 18 *C. difficile* izolatu elde edilmiştir. Dünyada son yıllara ait sağlıklı ve ishalli kedi ve köpek dışkılarından *C. difficile* izolasyonuna yönelik pek çok çalışma bulunmakla beraber ülkemizde bu etkenin kedi ve köpeklerde prevalansının saptanmasına dair son 25 yılda yürütülen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Sadece 1999 yılında konu ile ilgili yürütülen bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Erganiş ve Hadimli (1999) etkenin prevalansını köpeklerde %21.67 (39/180), kedilerde ise %25 (4/16) olarak raporlamışlardır. *C. difficile*’nin güncel zoonotik öneminden dolayı kedi ve köpeklerde bu etkenin varlığının araştırılmasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalar önem arz etmektedir.

Son 35 yıl içerisinde dünyada pek çok ülkede *C. difficile*'nin hem sağlıklı hem de ishalleri kedi ve köpek dışkılarından izolasyonuna yönelik çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Aşağıda detayları verilen bu çalışmalarda etkenin kedi köpeklerdeki prevalansının %0-%90' arasında değişiklik gösterdiği rapor edilmektedir. Kedi ve köpek dışkı örneklerinde en yüksek *C. difficile* pozitifliği Samir ve ark. (2021) tarafından %90 (90/100) olarak rapor edilmiştir. Ancak Samir ve ark (2021)'nin analiz ettikleri ishalleri hayvanlara ait dışkı örneklerinde etkenin varlığını dışkıdan direkt PCR ile belirledikleri ve etkenin kültürünün yapılmadığı gözlenmektedir. Bu nedenle anılan çalışmada elde edilen yüksek *C. difficile* pozitifliğini çalışmamızda elde edilen *C. difficile* prevalansı ile karşılaştırılmasının anlamlı olmadığı düşünülmektedir.

Konu ile ilgili farklı kültür yöntemleri ile *C. difficile*'nin izolasyonu üzerine yapılan çalışmaların bazılarında kedi ve köpek dışkılarında bildirilen *C. difficile* prevalansının çalışmamızda belirlenen prevalans oranlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır. Nitekim, köpek dışkı örneklerinde *C. difficile* izolasyonuna ilişkin çalışmalar detaylı incelendiğinde, Meireles ve ark. (2023) %15.5 (14/90), Redding ve ark. (2023) %13.8 (10/72), Thanissery ve ark. (2020) %30 (33/107), Usui ve ark. (2016) %30 (62/204), Stone ve ark. (2016) % 17.1 (37/216), Hussain ve ark. (2015) 13.67% (16/117), Koene ve ark. (2012), %25.0 (29/116) McKenzie ve ark. (2010) %58.2 (32 /55), Clooten ve ark. (2008) %19 (70/360), Weese ve ark. (2003) %52 (48/93), Cave ve ark. (2002) %18 (47/260-ishalleri)/ % 55 (41/74-sağlıklı) ve Marks ve ark. (2002) %14,3 (6/42- sağlıklı) / %16,1 (5/31-ishalleri) oranında farklı prevalans değerleri bildirmişlerdir. Bununla birlikte kedi dışkı örneklerinde ise Diniz ve ark., (2022) %8.3 (2/24), Wen ve ark. (2022) %8.1 (5/62), Thanissery ve ark. (2020) %11.7 (2/17), Koene ve ark. (2012) %15.7 (18/115) ve Clooten ve ark. (2008) %7.1 (3/42) *C. difficile* izolasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

Bazı çalışmalarda kedi ve köpek dışkılarında çalışma bulgularımızdan daha düşük *C. difficile* izolasyon oranları bildirilmiştir. Kedi ve köpeklerde bildirilen bu düşük prevalans oranlarını sırası ile Rabold ve ark. (2018) %2,4 (10/403), %3,4 (15/437), Alvarez-Perez ve ark. (2017) %0 (0/35), %4.8 (5/105) ve Schneeberg ve ark. (2012) %3.7 (5/135), 5.5% (9/165) olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca yürütülen bazı çalışmalarda da köpeklerde *C. difficile* izolasyonu için Diniz ve ark., (2022) %6.6

(12/181), Wen ve ark. (2022) %10.3 (19/185), Wei ve ark. (2019) %0.68 (1/146), Rainha ve ark. (2019) %10 (5/10), Bjöersdorff ve ark. (2021) % 6.7 (6/90), Andres-Lasheras ve ark. (2018) 7.9% (12/151), Ghavidel ve ark. (2016) %10 (14/139) Weese ve ark. (2010) %10,5 (6/57-antibiyotik uygulanan) gibi düşük prevalans oranları rapor edilirken kedi dışkılarında ise Redding ve ark. (2023) %0 (0/9) ve Silva ve ark. (2020) %5.2 (16/304) gibi düşük prevalans oranları bildirmişlerdir.

Yukarıda *C. difficile* prevalans oranlarındaki farklı sonuçlar elde edilmesi; araştırmanın yapıldığı bölge, örnek sayısı, örneklerin alındığı mevsim, örneklerin toplandığı hayvanların antibiyotik kullanma durumu, hayvanların sağlıklı veya ishallerli olması ve etkenin izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerdeki farklılıklara bağlanabilir.

Bununla birlikte *C. difficile* izolasyon oranını kedi dışkı örneklerinde Wei ve ark. (2019) %6.8 (2/29), köpek dışkı örneklerinde ise Silva ve ark. (2017) %12.1 (10/82) ve Orden ve ark. (2017) %12.1 (13/107) olarak saptadıklarını bildirmiş olup çalışmamızda kedi ve köpek dışkı örneklerinde belirlenen *C. difficile* prevalans oranları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmalar incelendiğinde *C. difficile* prevalansının kültür yöntemi ile belirlenmesi ve etkenin identifikasyonunda *tpi* PCR kullanılması ile de çalışmamızın materyal metodu ile benzerlik gösterdiği dikkat çekmektedir. Ayrıca Marks ve ark. (2002) antibiyotik tedavisi gören köpek dışkılarında %10.5, sağlıklı köpek dışkılarında %14.3 ve ishallerli köpek dışkılarında %16.1 oranında *C. difficile* izolasyonu yapmışlardır. Araştırmacılar, *C. difficile* izolasyonu açısından örnek alınan hayvanların sağlıklı, ishallerli ve antibiyotik tedavisi görmelerinin *C. difficile* izolasyon oranları açısından istatistik bir fark oluşturmadığını belirlemişlerdir. Yine sağlıklı ve antibiyotik tedavisi gören hayvan grupları birleştirildiğinde elde edilen *C. difficile* izolasyon sonuçları ile ishallerli hayvanlarda izolasyon sonuçları karşılaştırıldığında da istatistiksel bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Bu bulgu bizim sonuçlarımız ile paralellik göstermekte olup bizim çalışmamızda da köpeklerin sağlıklı/ishallerli olma durumunun *C. difficile* izolasyonu üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen 19 izolatın biri (%5.2) fenotipik testler ve *tpi* PCR ile *C. difficile* olarak tanımlanmasına rağmen, WGS analizi sonucunda *C. innocuum*

olarak identifiye edildi. Literatürde bildirildiği şekilde (Skinner ve ark., 2022; Cherny ve ark., 2021) bu bakterinin *C. difficile*ye benzeyen fenotipik özellikleri nedeniyle *C. difficile* olarak hatalı identifikasyonu ile karşılaşmaktadır. Çalışmamızda özellikle *C. innocuum*'un *tpi* PCR ile pozitif sonuç vermesi, *C. difficile*'nin identifikasyonunda sadece *tpi* geninin araştırılmasının yeterli olmadığını ve bu genin yanı sıra başka bir spesifik gen varlığının da araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ya da *C. difficile*'nin identifikasyonunda WGS analizinin yapılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca yurdumuzda insanlarda, çiftlik hayvanlarında ve gıdalarda *C. difficile*'nin varlığını ortaya koyan araştırmalar mevcuttur. Hayvansal kaynaklı örneklerde (dışkı ve gıda) yürütülen çalışmalarda *C. difficile* prevalansının %2'den %70'e kadar farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Özgen ve Yıldırım, 2021; Bingol ve ark., 2020; Muratoğlu ve ark., 2020; Ersöz ve Coşansu, 2018; Hampikyan ve ark., 2018; Atasoy ve Gücükoğlu, 2017; Güran ve İlhak, 2015).

Yine yurdumuzda insanlarda gözlenen hastane kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonlarının prevalansı üzerine yapılan çalışmalar etkenin sıklığını serolojik (Karaaslan ve ark., 2016; Yoldaş ve ark., 2016; Öksüz ve ark., 2015; Lale ve ark., 2010) olarak %0.8-%29.4, kültür tabanlı metodlarla ise (Trak ve ark., 2024; Sayın ve ark., 2020; Kafa ve ark., 2020; Akgül ve ark., 2019; Deniz ve ark., 2010) %7.9-%25 arasında bildirmektedir

Gereksiz ve yaygın antibiyotik kullanımı, bağırsak mikrobiyotasının dengesinin bozularak gastrointestinal sistemin *C. difficile* tarafından kolonize edilmesine ve böylece CDE gelişimine zemin hazırlamaktadır. Günümüzde CDE tedavisinde kullanılan en etkili ajanların metronidazol, vankomisin ve fidaksomisin olduğu kabul edilse de bu antibiyotiklere direnç geliştiren suşların ortaya çıkması, tedavi seçeneklerinin azalmasına yol açmaktadır (Wickramage ve ark., 2021; Peng ve ark., 2018). Amerika (Wieczorkiewicz ve ark., 2015; Tenover ve ark., 2012), Avrupa (Lanzoni-Mangutchi ve ark., 2022; Peng ve ark., 2018; Spigaglia ve ark., 2016; Keessen ve ark., 2013;) ve Asya (Wang ve ark., 2024; Wen ve ark., 2022; Jin ve ark., 2017; Adler ve ark., 2015) kıtalarında insan örneklerinde yürütülen çeşitli çalışmalarda çoklu dirence sahip ve salgınlara neden olan sekans tipleri bildirilmiştir.

Kedi-köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesi üzerine yürütülen çok sayıda çalışmada izolatların vankomisine %100 duyarlı olduğu bildirilmiştir (Wen ve ark., 2022; Bjöersdorff ve ark., 2021; Thanissery ve ark., 2020; Silveira ve ark., 2020; Barbanti ve ark., 2020; Rainha ve ark., 2019; Andres-Lasheras ve ark., 2018; Alvarez-Pérez ve ark., 2017; Orden ve ark., 2017; Usui ve ark., 2016; Spigaglia ve ark., 2015; Silva ve ark., 2014; Wetterwik ve ark., 2013; Piris ve ark., 2013; Janezic, 2012; Marks 2003). Çalışmamızda elde edilen kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının tamamı yukarda belirtilen çalışmalar ile uyumlu olarak vankomisine duyarlı olduğu belirlendi. Genellikle insanlarda CDE tedavisinin ilk aşamasında vankomisin tercih edilmektedir. (CDC, 2024). Veteriner sahada kedi ve köpeklerde CDE'nin saptanması ve tedavisine yönelik standart bir uygulama bulunmadığı ve vankomisinin bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmediği bilinmektedir (Wesse., 2020). Bu durumun kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının vankomisine karşı duyarlı olmasını sağlayan en önemli nedenler arasında yer aldığı değerlendirilmiştir. Kedi-köpeklerden elde edilen *C. difficile* izolatlarının vankomisine dirençli olduğunu bildiren tek bir çalışma bulunmakta (Wei ve ark., 2019) olup bu çalışmada test edilen izolat sayısının üç adet olması ve sadece bir sağlıklı kedi orijinli izolatın (%33.3) dirençli saptanması nedeni ile bu bulgular ile etkenin vankomisine direnç geliştirdiğine yönelik yorum yapılması mümkün görünmemektedir. Bununla birlikte insan orijinli *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel duyarlılığının meta-analizi ile değerlendirildiği bir çalışmada oldukça düşük oranlarda vankomisin direnci tespit edildiği %0.4 (10/2296) rapor edilmiştir (Sholeh ve ark., 2020).

CDE ve diğer gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen antibiyotiklerden biri de metronidazoldür. Yürütülen çok sayıda çalışmada kedi-köpek orijinli *C. difficile*'nin metronidazole karşı %100 duyarlı olduğu (Wen ve ark., 2022; Bjöersdorff ve ark., 2021; Silveira ve ark., 2020; Wei ve ark., 2019; Rainha ve ark., 2019; Alvarez-Pérez ve ark., 2017; Usui ve ark., 2016; Silva ve ark., 2014) bildirilmektedir. Bunun yanı sıra; metronidazolün köpek orijinli izolatlara karşı MIC değerlerini belirleyen çalışmalarda %2.5 ila %50 arasında direnç oranı bildirilmektedir. Nitekim metronidazole karşı; Barbanti ve ark. (2020) %10 (12/125), Thanissery ve ark. (2020) %2.5 (1/39), Andres-Lasheras ve ark. (2018) %50 (3/6),

Orden ve ark. (2017) %6.5 (7/107), Spigaglia ve ark. (2015) %21 (21/101) ve Wetterwik ve ark. (2013) %25 (1/4) oranında direnç saptadıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ise kedi orijinli izolatların tamamının metronidazole duyarlı olduğu bulunurken, köpek izolatlarının ikisinin (%16.6) dirençli olduğu belirlenmiştir. Direnç oranlarındaki bu farklılıkların; çalışmalarda analiz edilen izolat sayısı, antibiyotik kullanımı, kullanılan duyarlılık testi ve çalışmanın yapıldığı coğrafya gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim çalışmamızda, kedi orijinli az sayıda (6) *C. difficile* izolatının analiz edilmesi nedeni ile metronidazole %100 duyarlılık bildiren diğer çalışmalardan daha yüksek oranda direnç (%16.6) saptanmıştır. Yurdumuzda son 25 yıl içerisinde ise kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolasyonuna ilişkin çalışma bulunmadığı için etkenin antibakteriyel direncine ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, yürütülen bazı çalışmalarda tavuk karkas, sığır dışkı ve kesimhane atık suyu gibi örneklerden elde edilen *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel direnç profilleri araştırılmıştır (Abay ve ark 2022; Bingol ve ark., 2020; Hampikyan ve ark., 2018). Bu çalışmalarda metronidazole sırasıyla %0 (0/23), %11.6 (8/69) ve %30 (25/83) oranında direnç olduğu bildirilmiştir. Yürütülen bir meta-analiz çalışmasında insan orijinli *C. difficile* izolatlarının metronidazol direncinin ortalama %1.0 (129/13,207) oranında tespit edildiğini bildirmişlerdir (Sholeh ve ark., 2020).

Çeşitli çalışmalarda kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının farklı oranlarda (%0-%88.2) klindamisine dirençli olduğu rapor edilmektedir. Bu çalışmalarda etkene karşı klindamisin MIC değerleri belirlenmiş ve direnç oranlarını; Wen ve ark., 2022 (%62.5) Bjöersdorff ve ark., (2021) %27.2 (3/11), Thanissery ve ark. (2020) %23.0 (9/39), Barbanti ve ark. (2020) %35 (44/125), Silveira ve ark. (2020) %18.75 (3/16), Rainha ve ark. (2019) %40 (2/5), Wei ve ark. (2019) %0 (0/3), Andres-Lasheras ve ark. (2018) %50 (3/6), Alvarez-Pérez ve ark. (2017) % 11.1 (2/18), Orden ve ark. (2017) %6.5 7/107, Usui ve ark. (2016) %88.2 (60/68) ve Spigaglia ve ark. (2015) %51 (51/101) olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda da yukarıda belirtilen son yıllarda gerçekleştirilen bazı çalışmalar (Bjöersdorff ve ark., 2021; Thanissery ve ark., 2020; Andres-Lasheras ve ark., 2018; Spigaglia ve ark., 2015) ile benzer şekilde kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarında klindamisine sırası ile %50 (3/6) ve %25 (3/12) oranında direnç saptanmıştır. Bununla birlikte insan orijinli *C. difficile*

izolatlarının klindamisin direncinin araştırıldığı bir meta-analizinde, bu antibiyotiğe karşı ortalama %34.0 (6685/19,645) oranında direnç olduğu rapor edilmektedir (Sholeh ve ark., 2020).

Kedi-köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının ampisilin ve meropenem duyarlılıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Andino-Molina ve ark., 2024). Nitekim Wei ve ark. (2019) hem meropenem hem de ampisilin direnç oranını %0 (0/3) olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde kedi izolatlarının tamamı meropeneme duyarlı bulundu. Çok sayıda insan izolatının antimikrobiyal direnç profilini değerlendiren çalışmaları içeren bir meta-analizinde de izolatların meropenem ve ampisilin direnci çok düşük oranlarda belirlenmiş olup, sırası ile %0.7 (20/2756) ve %0.1 (4/2803) olarak rapor edilmiştir (Sholeh ve ark., 2020). Ancak, çalışmamızda *C. difficile* izolatlarının %50 (9/18) oranında ampisilin'e dirençli olduğu belirlendi. Yürütülen iki çalışmada ise ampisilin direnç oranı %20 (1/5) Piris ve ark., 2013) ve %8.3 (2/24) (Wen ve ark., 2022) olarak belirlendiği görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen toplam 18 *C. difficile* izolatının 4 (4/6, %66.6.)'ü kedi ve 8 (8/12, %66.6)'i köpek orijinli olmak üzere 12 izolat test edilen antibiyotikler içerisinde en az birine dirençli bulundu. İki (2/6, %33.3) kedi orijinli izolat iki farklı antibiyotiğe (AMP, CD) karşı dirençli saptanırken, iki (2/12, %16.6) köpek orijinli izolat üç farklı antibiyotiğe (MRP, CD, AMP) karşı dirençli saptandı. Çeşitli çalışmalarda (Finsterwalder ve ark., 2022; Barbanti ve ark., 2020; Orden ve ark. 2017; Spigaglia ve ark., 2015) kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının farklı oranlarda (%2.5-%57.1) çoklu direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Finsterwalder ve ark. (2022), köpeklerden izole edilen *C. difficile* suşlarının %26.3'ünde iki (CD ve TET veya CD ve ERY) ya da üç (CLI, ERY ve TET) antibiyotiğe direnç tespit etmiştir. Barbanti ve ark. (2018), bu oranı %18 olarak bildirmiş ve bu izolatların %4,8'inin dört (ERY, CD, MXF, RIF), %28,6'sının üç (ERY, CD, MXF), %9,5'inin üç (ERY, CD, RIF) ve %57,1'inin üç (ERY, CD, MTZ) antibiyotiğe dirençli olduğunu saptamıştır. Orden ve ark. (2017), köpeklerin %7,7'sinde dört (CLI, ERY, MOX, MTZ), %38,5'inde üç (CLI, ERY, MTZ), %7,7'sinde iki (MOX, MTZ) ve %7,7'sinde iki (CLI, ERY) antibiyotiğe direnç tespit ederken; Spigaglia ve ark. (2015) ise köpeklerin %23'ünde iki (ERY, CLI), %17,9'unda üç (ERY, CLI, MTZ),

%2.5'inde dört (MXF, ERY, CLI, MTZ) ve %2.5'inde üç (MXF, ERY, CD) antibiyotiğe dirençli suşlar bulunmuştur.

C. difficile'nin sahip olduğu genom büyüklüğü, G+C içeriği, az sayıda korunaklı bölge ve transpozon, bakteriyofajlar gibi yüksek düzeyde esneklik içeren genetik elementlerinden dolayı varyasyonlara oldukça açık bir bakteri olduğu bilinmektedir (Redding ve ark., 2022; Sebaihia ve ark., 2006). WGS analizleri ile kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının antibiyotik direnç profillerini belirleyen çalışmalar bulunmaktadır. (Finsterwalder ve ark., 2022; Wen ve ark., 2022; Bjöersdorff ve ark., 2021; Barbanti ve ark., 2020;). İzolatlarda WGS ile belirlenen antibiyotik direnç profilinin fenotipik direnç profili ile karşılaştırıldığı çalışmalar sınırlıdır (Finsterwalder ve ark., 2022). Çalışmamızda elde edilen izolatların %27.8'inde (5/18) *gyrA* SNP'si, %77.8'inde (14/18) *nimB* geni, %38.9'unda (7/18) *tet(M)* geni, %27.8'inde (5/18) *ermB* geni, %33.3'ünde (6/18) *CDD-1* geni, %55.6'sında (10/18) *CDD-2* geni, %5.6'sında (1/18) *vanG* geni, %44.4'ünde, (8/18) *vanR* geni, %16.7'sinde (3/18) *mefH* geni bulunurken, korunan ve yaygın SNP'ler olan *C656T* ve *cpIR* SNP'leri, izolatların tamamında (18/18) bulunmuştur.

Bilgilerimize göre yurdumuzda *C. difficile* izolatlarının WGS analizine ilişkin gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Finsterwalder ve ark. (2022) kedi ve köpeklerden elde ettikleri 38 *C. difficile* izolatında eritromisin, klindamisin, tetrasiklin ve metronidazole direnç durumunu fenotipik ve moleküler yöntem (WGS) ile araştırmışlardır. Araştırmacılar, fenotipik olarak eritromisine dirençli saptadıkları yedi izolatın dördünde *erm(B)* geninin varlığı, bir izolatta ise 23S rDNA mutasyonu (*C656T*)'nu, klindamisine karşı dirençli 11 izolatın, altısında *erm(B)*, ve tetrasikline karşı dirençli altı izolatın üçünde *tet(M)* genini tespit etmişlerdir. Finsterwalder ve ark. (2022), fenotipik direnç sonuçlarının genetik direnç analizi ile büyük ölçüde desteklendiğini, özellikle eritromisin, klindamisin ve tetrasiklin dirençlerinin belirli genetik mekanizmalarla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda yukarıda detayları verildiği üzere fenotipik olarak çeşitli antibiyotiklere dirençli olarak saptanan izolatlarda direnç gen varlığı farklılık gösterdi. Kedilerde ve köpeklerde tüm izolatlar vankomisine duyarlı bulunurken, köpeklerde düşük oranda *vanG* ve her iki grupta da *vanR* geninin saptanması bu genlerin fenotipik direnci belirlemede her zaman etkili olmadığını düşündürmektedir.

Benzer şekilde, *nimB* geninin tüm kedilerde bulunmasına rağmen karbapenem ve metronidazol direnç profilleri arasında farklılık gözlenmiştir ve bazı duyarlı izolatlarda da direnç genlerinin varlığı saptanmıştır. İstatistik analizde ise, antibakteriyel direncin fenotipik sonucu ile direnç geni varlığı arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı bulundu. Bununla birlikte, WGS ile antibiyotik direnç genlerinin tespit edilmesinin, her zaman fenotipik olarak ifade edilen antibakteriyel bir direnç oluşturmayacağı bildirilmekte ve bu durum, direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri, çevresel faktörler veya ek direnç mekanizmalarının varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Buddle ve Fagan, 2023).

Toksinlerin *C. difficile* patogenezinin en önemli kısmını oluşturduğu bilinmektedir (Kordus ve ark., 2022). İshalli kedi ve köpeklerden izole edilen *C. difficile* suşları, farklı toksin profilleri kombinasyonlarını içermektedir (Maja ve ark., 2024). Dolayısı ile *PaLoc* ve *CdtLoc* toksinotiplerinin ve genetik varyasyonlarının incelenmesi, hastalığın patogenezinin öngörülmesi ve ideal tedavi protokollerinin belirlenmesi adına kritik bir adımdır. Yurdumuzda son yıllarda kedi ve köpeklerden elde edilen *C. difficile* izolatlarında toksin genlerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, insan ve hayvansal gıdaların materyal olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Özgen ve Yıldırım (2021), *TcdA* ve *TcdB* gen varlığını buzağı dışkılarından elde ettikleri *C. difficile* izolatlarında %44, kuzularda %12 ve oğlak ile tavuk dışkı örneklerinde %0 olarak saptarken, Hampikyan ve ark. (2018) sığır karkaslarından elde ettikleri *C. difficile* izolatlarında %48.2 *TcdA*, %63.9 *TcdB* ve %84.3 *CdtA/B*, koyun karkas izolatlarında ise %46.2 *TcdA*, %20.5 *TcdB* ve %78.2 *CdtA/B* pozitifliği bildirmişlerdir. Gıdalarda yapılan çalışmalarda ise; Ersöz ve Coşansu (2018) %0 pozitiflik bildirirken, Atasoy ve Gücükoğlu (2017) %20 (1/5) *TcdA* ve %40 (2/5) *TcdB* pozitifliği tespit etmişlerdir. Öte yandan insan orijinli *C. difficile* izolatlarında yapılan çalışmalarda ise Yoldaş ve ark. (2016) %32.1 (9/28) *TcdA* ve *TcdB*, Öksüz ve ark. (2015) %2.8 (3/104) *TcdA* ve *TcdB* ve Lale ve ark. (2010) %24 (135/592) *TcdA* ve *TcdB* pozitifliği rapor etmişlerdir.

Yurtdışında farklı coğrafyalarda yapılan çalışmalar ise kedi ve köpeklerde toksijenik *C. difficile* suşlarının sıklığını ortaya koymaktadır. Redding ve ark. (2023) Amerika'da köpeklerde *TcdA* ve *TcdB* pozitif *C. difficile* prevalansını PCR ile %10 (1/10), Leite ve ark. (2023) Brezilya'da PCR ile %80 (8/10), Thanissery ve ark.

(2020) Amerika’da PCR yöntemi ile 69% (23/42), Wen ve ark. (2022) Çin’de WGS analizi ile %66.6 (16/24). Bjöersdorff ve ark. (2021) Danimarka’da WGS analizi ile %63.6 (7/11) olarak raporlamışlardır. Samir ve ark. (2021) Mısır’da *TcdA+TcdB-*, *TcdA-TcdB+* ve *TcdA+TcdB+* *C. difficile* izolatlarını sırası ile %8.8 (8/90), %3.3 (3/90) ve %2.2 (2/90) oranlarında PCR yöntemi ile ortaya koymuşlardır Rainha ve ark. (2019), Brezilya’da %60 (3/5) toksijenik *C. difficile* EIA yöntemi ile ortaya koymuşlardır. Wei ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada ELISA yöntemi ile (%33) *TcdA+TcdB+* bulurken kedi izolatlarının non-toksijenik olduğunu, hiçbir izolatta *CdtA* ve *CdtB* toksinlerine rastlanmadığını ortaya koymuşlardır. Rabold ve ark. (2018), Almanya’da 437 köpek ve 403 kediden topladıkları dışkıları *C. difficile* toksinleri yönünden PCR yöntemi ile incelemişler ve elde ettikleri kedi ve köpek orijinli 25 (%2.9) *C. difficile* pozitif izolatın 16’ sını (%61.5) *TcdA* ve *TcdB*, ikisini (%12.5) ise *CdtA* ve *CdtB* genleri yönünden pozitif bulmuşlardır.

Gerek ülkemizdeki hayvansal kaynaklardan gerekse yurt dışındaki kedi ve köpeklerden elde edilen *C. difficile* izolatlarının yüksek oranda (%2.9-%48) toksijenik özellik göstermesi çalışmamız kapsamında yapılan analizler ile uyumludur. Keza çalışmamızda da hem genomik (WGS) hem de serolojik (Toksine-A test) olarak, kedi ve köpeklerden izole edilen *C. difficile* izolatlarının %45’inin toksijenik olduğu tespit edilmiştir. İnsanlardan elde edilen izolatlarda *Binary* toksine rastlanmamışken, hayvan kaynaklı izolatlarda bu toksinin sınırlı oranda (%12.5) gözlemlenmesi, *Binary* toksinin hayvan izolatlarındaki prevalansının daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Nitekim araştırmalar, hayvanlarda görülen CDE patogenezinde *cdtA* ve *cdtB* toksinlerinin önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (Weese, 2020). Ancak tez çalışmamız kapsamında elde edilen izolatların hiçbirinde *Binary* toksin genine rastlanmamış olması, bu toksinin yalnızca elde edildiği memeli türüne bağlı olmayıp başka faktörlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Başta *SlpA* ve *Cwp* olmak üzere yüzey tabakası proteinleri, sadece kolonizasyon sürecinde değil, aynı zamanda bağışıklık yanıtında da önemli rol oynadığı, bu proteinlerin yüksek düzeyde inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklediği ve enfeksiyon bölgesine makrofajların infiltrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Mitchell ve ark., 2022; Bianco ve ark., 2011). Dünya’nın çeşitli bölgelerinde çeşitli

kaynaklardan (insan, kedi, köpek) elde edilen *C. difficile* izolatları üzerinde *SlpA* ve diğer yüzey proteinleriyle ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, bu çalışmalar, bu proteinlerin hayvan izolatlarında görülme sıklığından ziyade, moleküler yapıları ve hastalık üzerindeki etkilerini ele almaktadır (Hunault ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024; Mizrahi ve ark., 2024; Chamgordani ve ark., 2024; Lanzoni-Mangutchi ve ark., 2022 Amirkamali ve ark., 2022; Shirvan ve ark., 2016; Merrighan ve ark., 2013). Keza, yurdumuzda da bu alanda bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda da *SlpA* gen varlığı ve filogenetik analizi gerçekleştirilmiş olması ile yukarıdaki moleküler yöntemleri kullanan çalışmalar ile paralellik göstermedir. Ayrıca, *SlpA* ve *Cwp* protein komplekslerine sahip birçok salgın suşunun varlığı da dikkat çekicidir (Brown ve ark., 2018; Stabler ve ark., 2012). Bu çalışmalar, yüzey proteinlerinin enfeksiyonun patogenezinde toksinler kadar etkili olduğunu ve bu alanda yapılacak araştırmaların enfeksiyon önleme stratejilerine katkı sağlayabileceğini vurgulamaktadır (Hunault ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024; Mizrahi ve ark., 2024; Chamgordani ve ark., 2024; Lanzoni-Mangutchi ve ark., 2022 Amirkamali ve ark., 2022; Shirvan ve ark., 2016; Merrighan ve ark., 2013).

WGS analizleri, *C. difficile*'nin tüm virülans faktörlerini aynı anda analiz etme imkânı sunarak etkenin bütün antijenik yapısının incelenmesine olanak tanımaktadır. Çalışmamızda, kedi ve köpeklerden elde edilen *C. difficile* suşlarına yönelik WGS analizleri gerçekleştirilmiş; 15 (%83.3) izolatın *Cwp66* ve *Cwp 88* genleri açısından, 15 (%83.3) izolatın ise *SlpA* genleri açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan tez kapsamında yapılan filogenetik analizler, elde edilen suşlar ile farklı coğrafi bölgelerden ve konak türlerinden izole edilen *C. difficile* suşlarının majör antijenik bölgesi olan *SlpA* proteinleri arasındaki genetik yakınlığı ortaya koymaktadır. Kedilerden izole edilen “3cd”, “4cd” ve köpeklerden izole edilen “19” ve “20cd” izolatlarının *SlpA* proteinleri, ABD'deki insan kaynaklı QWR62406 izolatı ile Slovenya'da bir köpeğin patisinden elde edilen HBH2943129 izolatına genetik olarak oldukça yakındır. Benzer şekilde, köpeklerden elde edilen “5cd” suşu, Almanya'da insan kaynaklı “AVB42170” izolatının *SlpA* proteini ile benzerlik gösterirken, “17cd” kodlu izolatın ise Hindistan'da köpek dışkı swap örneğinden elde edilen “HEB4999574” suşlarının *SlpA* proteinleri ile klonal bir ilişki içindedir. “5cd” kodlu izolatımız, Almanya'da bir insandan elde edilen “AVB42170” numaralı

izolat ile, “cd1”, “cd2”, “cd13”, “cd14”, “cd6”, “cd7” izolatlarımız aynı kümelenmenin içinde ve “WP_021402687 kodlu, Güney Kore’de insandan elde edilen izolata genetik yakınlık göstermektedir. Bu durum, *C. difficile* suşlarında *SlpA* gen bölgesinin farklı kıtalardaki izolatlar arasında yüksek düzeyde genetik benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu genetik benzerlik, suşların ülkeler arasında uluslararası seyahatler, gıda ve hayvan ticareti gibi insan faaliyetleri ile geniş coğrafyaya yayılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

C. difficile’nin zoonotik karakterini ve toplum kaynaklı CDE’nin çıkış noktalarını ortaya koymak, farklı izolatların orijinlerini ve genetik çeşitliliğini anlamak ve salgınları izlemek amacıyla ribotipleme ve genom temelli tiplendirme yöntemlerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır (CDC., 2024). Geleneksel CE-PCR ribotipleme yöntemi, düşük ayırım gücü nedeniyle sınırlı kalırken, çekirdek genom çok lokuslu dizi tipleme (MLST) gibi modern genomik yaklaşımların daha yüksek hassasiyet ve standartlaştırılabilirlik sunduğu düşünülmektedir. Bu yöntemler, farklı sekans tipleri (ST) ile ribotipler arasındaki genetik yakınlıkların anlamlandırılmasında daha etkin çözümler ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda Baktash ve ark. (2022), *C. difficile* ribotiplerinin hangi MLST sekans tipine yakınlık gösterdiğini ve bu sekans tiplerinden kaynaklanan salgınların genetik temellerini belirlemek amacıyla geniş çaplı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada, farklı orijinlerden toplanmış 100 farklı ribotipe ait 630 adet *C. difficile* izolatu, tüm genom dizileme (WGS) analizine tabi tutulmuştur. Araştırmacılar, elde edilen bulgular ışığında sekans tipleri ile ribotipler arasındaki genetik bağlantıların MLST analizleri ile etkin bir şekilde belirlenebileceğini göstermişlerdir. Baktash ve ark. (2022)’nin bildirdiği Ripotip-ST ilişkisine dayalı olarak çalışmamızda elde edilen sekans tipleri ribotip olarak değerlendirildiğinde ST2’nin RT014, ST3’ün RT023, ST35’in RT001, ST39’un salgınlarla ilişkili RT027, ST55’in RT020 ve ST185’in RT181 ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre, sekans tiplerinin eşleştiği ribotipler, dünyada çeşitli salgınlardan elde edilen ribotipler ile benzerlik göstermektedir. Yapılan bir meta-analiz; Asya ve Avrupa’da buzağılarda salgın ribotiplerinden RT027’ nin değişken oranlarda (%20-%70) saptandığını raporlamıştır (Wesse, 2020). Bununla birlikte, Hawken ve ark. (2013) RT027’nin Amerika’da büyükbaş ve kümes hayvanlarında yaygınlığının sırası ile %75 ve %90 arasında ve Kanada’da büyükbaş

orijinli ve İngiltere’de insan orijinli izolatlarla da aynı tipte olduğu vurgulamışlardır (Albuquerque ve ark., 2021). Bununla beraber yapılan çeşitli çalışmalarda; köpek ve kedilerde toksijenik *C. difficile* ribogruplarının prevalansının %50’ye kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (Weese ve ark., 2020; Stone ve ark., 2019; Stone ve ark., 2016). Konu ile ilişkili Loo ve ark. (2016), enfekte bireylerin evlerinde yaşayan köpek ve kedilerden alınan *C. difficile* izolatlarının, sahiplerinden alınan izolatlarla aynı ribotipte olduğunu ve bu taşıyıcılığın genellikle asemptomatik seyrettiğini rapor etmişlerdir. Analizlerimiz sonucunda kedi ve köpek orijinli *C. difficile* suşlarından elde edilen sekans tipleri, insanlarda yaygın olarak bulunan RT014, RT001, RT020, RT181, RT023 ve RT027 gibi ribotiplerle örtüşmüş olup bu durum, etkenin evcil hayvanlardan insanlara potansiyel geçişinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu sonuçların insan ve hayvanlar arasında doğrudan bir geçişten mi yoksa ortak çevresel kaynaklar aracılığıyla yayılımdan mı kaynaklandığının daha fazla NGS tabanlı araştırmalar ile aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir.

Hayvan orijinli *C. difficile* izolatlarının MLST sekans tiplerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda, köpeklerde ST2 sekans tipinin sıklığını Wen ve ark. (2022) %12 (3/24), Finsterwalder ve ark. (2022) %36.8 (14/38) ve Stone ve ark. (2019) %16.6 (7/42) oranında, ST3 sekans tipinin ise aynı araştırmacılar tarafından sırasıyla %4.1 (1/24), %10.5 (4/38) ve %19 (8/42) oranlarında raporlandığı görülmektedir. Ayrıca, Wen ve ark. (2022), köpek orijinli *C. difficile* izolatlarında ST39 sekans tipinin sıklığını %16,7 (4/24) oranında saptarken, araştırmacılar, domuzlarda ST35’in %7.4 (13/176) oranında gözlendiğini bildirmişlerdir. Ancak kedi ve köpeklerde bu sekans tipini gösteren bir çalışmaya rastlanmadığı göze çarpmaktadır. Öte yandan, literatür taramalarımız sonucu çalışmamızdan elde edilen diğer sekans tiplerine (ST55, S155) ait izolatların sadece insanlardan elde edildiği, bu sekans tipine ait ilk kedi-köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının çalışmamız kapsamında elde edildiği saptanmıştır. Tez çalışmamızda kedilerden elde ettiğimiz iki adet ST2 ve bir adet ST55 *C. difficile* suşunun, Yeni Zelanda ve Japonya gibi okyanus ötesi ülkelerde nosokomiyal salgınlara sebebiyet vermiş olması, *C. difficile*’nin bazı sekans tiplerinin farklı coğrafik bölgelerde yayılım gösterdiğini düşündürmektedir. Bu doğrultuda; Bloomfield ve ark. (2024), Yeni Zelanda’da bir insan hastanesi’nde

yaşanan bir CDE salgınında ortaya çıkan *C. difficile* izolatlarının %18.4 (14/76)'ünü ST2, %7.9 (6/76)'unun ST55 sekans tiplerine ait olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde'da Kuwata ve ark. (2014) araştırmamızda tanımlanan tüm sekans tiplerini bir insan hastanesinden elde edilen *C. difficile* izolatlarında belirlemişlerdir. Ayrıca, toksin tiplerini, direnç genlerini ve dirençle ilişkili SNP'leri çalışmamızla uyumlu olarak raporlamışlardır. Yaptıkları çalışmada izole ettikleri 130 *C. difficile* izolatının 13'ünün ST2, (%10) üçünün (%2.3) ST3, üçünün (%2.3) ST35, birinin (%0.7) ST39, birinin (%0.7) ST55 ve birinin (%0.7) ST185 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri ST2, ST3, ST35, ST39, ST55 ve ST185 izolatlarının tamamının klindamisin ve florokuinolonlara dirençli olduğunu, ancak metronidazol, vankomisin ve meropenem gibi antibiyotiklere duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. ST2, ST3, ST35, ST39, ST55 ve ST185 izolatlarının tamamında klindamisin direnci ile alakalı olduğu bilinen *ermB* geni tespit edilirken, floroquinolon direnci gösteren izolatlarda, *gyrA* SNP'sine rastladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da aynı şekilde *gyrA* SNP'si ve *ermB* genine klindamisine dirençli izolatlarda rastlanmıştır.

MLST sonucu izolatların ST'leri ve MLST Clade'lerinin belirlenmesinin yanı sıra, çalışmamız kapsamında elde edilen izolatların WGS verileri ile, dünyanın farklı coğrafi bölgelerden ve konak türlerinden izole edilen ve "NCBI Genbank" veritabanında bulunan *C. difficile* suşlarının WGS verileri arasındaki genetik yakınlık, yapılan filogenetik analizler ile incelendi. Çalışmamızda, kedilerden izole edilen 3cd ve köpeklerden izole edilen 20cd suşlarının, ABD'de kökeni köpek olan bir *C. difficile* izolatı ile genetik yakınlık gösterdiği, benzer şekilde kedilerden izole edilen 11cd ve 12cd izolatlarının ise Kuzey Kore'den bir köpek izolatı ile genetik benzerlik taşıdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte 5cd kodlu köpek izolatımızın da Avusturya'dan elde edilmiş tavuk orijinli *C. difficile* izolatıyla gösterdiği yakınlık, *C. difficile* izolatlarının sadece kıtalararası olarak yayılımını değil, türler arasındaki transferine de dikkat çekmektedir. Filogenetik analizler sonucu elde edilen veriler farklı orijinlerden elde edilen *C. difficile* suşlarının yayılım mekanizmalarının ve kontrol stratejilerinin daha geniş çaplı ve kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, Kayseri'deki veteriner kliniklerinden alınan sağlıklı ve ishalleri kedi ve köpek rektal svap örneklerinden elde edilen 18 *C. difficile* izolatının WGS-SNP ve

MLST analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpek ve kedilerin hem sağlıklı hem de ishalli hayvanlardan oluşması, bu hayvanların asemptomatik taşıyıcılık oranları ve elde edilen izolatların genetik yapıları hakkında geniş bir perspektif sunmuştur. Bu alışma, Türkiye’deki evcil hayvan popülasyonunda *C. difficile* izolatlarının genetik yapısını detaylı bir şekilde analiz ederek, zoonotik bulaşma yollarının daha iyi anlaşılmasına yönelik önemli veriler sunmaktadır. Elde edilen bulgular, WGS tabanlı analizlerin *C. difficile* epidemiyolojisi ve zoonotik geçiş mekanizmalarının aydınlatılmasında kritik bir araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. *C. difficile*’nin sadece kedi ve köpeklerde değil, bütün olası bulaş yollarında izolasyonu, elde edilen izolatların antibakteriyel direnç durumunun belirlenmesi ve WGS analizi çalışmaları hem CD enfeksiyonunun kontrol ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine hem de patojenin yayılımının sınırlandırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, Türkiye’de sağlıklı ve ishaller kedi ve köpeklerden *C. difficile* izolasyonu, elde edilen 18 *C. difficile* suşunun, tüm genom dizileme (WGS) analizi ile moleküler ve antijenik karakterizasyonunu ve antibakteriyel duyarlılık profillerini belirleyen ilk kapsamlı araştırmadır. Çalışmada, özellikle etkenin ST39, ST2 ve ST55 gibi toksijenik niteliği ile bilinen sekans tiplerinin sağlıklı kedi ve köpeklerden izole edilmiş olması, etkenin kedi ve köpeklerin asemptomatik taşıyıcılığını, dolayısı ile potansiyel bir rezervuar olarak rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışma sonucunda, yerel izolatların genetik profilleri ortaya konulmuş ve uluslararası suşlarla olan filogenetik ilişkileri analizi sonucunda Türkiye’deki *C. difficile* suşlarının, uluslararası düzeyde farklı kaynaklardan (insani kedi, köpek, inek, rat, tavuk) elde edilen izolatlarla genetik benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Yine izolatlarda tespit edilen antibiyotik direnç genleri ve sekans tipleri ile benzer genotiplerin küresel dağılımını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, yurdumuzda *C. difficile*’nin moleküler epidemiyolojisi ile ilgili genomik verilerdeki ciddi bilgi boşluğu için önemli bir veri sağlamıştır. Ayrıca, Türkiye’de kedi ve köpek kaynaklı oluşabilecek *C. difficile* enfeksiyonlarında etkenin moleküler özelliklerinin değerlendirilmesi açısından bir alt yapı oluşturarak patojenin yerel düzeyde izlenebilirliğine katkı sağladığı düşünülmektedir. Elde edilen ‘NCBI GenBank’ veri tabanına kaydı yapılan *C. difficile* WGS verilerinin, hayvanlardan insanlara olası bulaş yollarının belirlenmesi açısından hem yerel hem de uluslararası düzeyde gelecekte yürütülecek karşılaştırmalı epidemiyolojik araştırmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmada yurdumuzda kedi ve köpek orijinli *C. difficile* izolatlarının antibakteriyel direncine ilişkin ilk veriler elde edilmiş olup CD enfeksiyonunun tedavisi ve etkenin yayılımının kontrol altına alınması için halihazırda kullanılan vankomisin ve metranidazol gibi antibiyotiklere yüksek oranda duyarlılık belirlenmiştir. *C. difficile*’nin zoonotik potansiyelinin tam olarak ortaya konulabilmesi için evcil hayvan sahipleri, veteriner hekimler ve halk sağlığı

uzmanlarının iş birliği içinde çalışarak ortak izleme sistemlerinin oluşturulması gerekmektedir. Bu kapsamda özellikle hayvan ve insan orijinli *C. difficile* izolatlarının genetik yapılarının tek sağlık konsepti kapsamında incelenmesinin, etkenin türler arası yayılımına ilişkin önemli ipuçları sağlayacağı düşünölmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Abay S, Ahmed EF., Aydin F, Karakaya E, Müştak HK. Presence of *Clostridioides difficile* in cattle feces, carcasses, and slaughterhouses: Molecular characterization and antibacterial susceptibility of the recovered isolates. *Anaerobe*, 2022; 75, 102575.
- Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*, 2016; 14(10): 609-620.
- Adams CM, Eckenroth BE, Putnam EE, Double S, Shen A. Structural and functional analysis of the CspB protease required for *Clostridium* spore germination. *PLoS Pathog*, 2013; 9(2): e1003165.
- Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015; 83(1): 21-24.
- Akgül Ö. Is the incidence of *clostridium difficile* in nosocomial diarrhoea underestimated ?. *J. Exp. Clin. Med.* 2018;34(3):181-183.
- Alataş Z, Güner A. *Clostridium difficile*: Yeni Bir Gıda Patojeni mi? *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 2018; 13(3): 389-396.
- Albuquerque C, Pagnossin D, Landsgaard K, Simpson J, Brown D, Irvine J, Candlish D, Ridyard AE, Douce G, Millins C. The duration of antibiotic treatment is associated with carriage of toxigenic and non-toxigenic strains of *Clostridioides difficile* in dogs. *PLoS One*, 2021; 16(5): e0245949.
- Alshannaq AF, Kates AE, Keating JA, Mckinley LL, Dixon JW, Safdar N. Diverse Sources and Latent Reservoirs of Community-Associated *Clostridioides difficile* Infection. *Clin Infect Dis*, 2024; ciae429. Advance online publication.
- Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Harmanus C, Kuijper EJ, García ME. Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region. *Anaerobe*, 2017; 48: 47-55.
- Andino-Molina M, Dost I, Abdel-Glil M, Pletz MW, Neubauer H, Seyboldt C. Antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in veterinary medicine around the world: A scoping review of minimum inhibitory concentrations. *One Health*. 2024; 19:100860.

- Andrés-Lasheras S, Martín-Burriel I, Mainar-Jaime RC, Morales M, Kuijper E, Blanco JL, Chirino-Trejo M, Bolea R. Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. *BMC Vet Res*, 2018; 14(1): 77.
- Antibiotics, Staphylococcal enteritis and pseudomembranous enterocolitis. *N Engl J Med*, 1953; 249(1): 37-40.
- Arruda PH, Madson DM, Ramirez A, Rowe E, Lizer JT, Songer JG. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe*, 2013; 22: 104-110.
- Ashfaq MY, Da'na DA, Al-Ghouti MA. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *J Environ Manage*, 2022; 305: 114359.
- Atasoy F, Gücükoğlu A. Detection of *Clostridium difficile* and toxin genes in samples of modified atmosphere packaged (MAP) minced and cubed beef meat. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 2017; 64(3): 165-170.
- Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA*, 2015; 313(4): 398-408.
- Baker SJ, Chu DI. Physical, Laboratory, Radiographic, and Endoscopic Workup for *Clostridium difficile* Colitis. *Clin Colon Rectal Surg*, 2020; 33(2): 82-86.
- Banz A, Lantz A, Riou B, et al. Sensitivity of single-molecule array assays for detection of *Clostridium difficile* toxins in comparison to conventional laboratory testing algorithms. *J Clin Microbiol*, 2018; 56(8).
- Barbut F, Braun M, Burghoffer B, Lalande V, Eckert C. Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2009; 47(4): 1276-1277.
- Bartlett JG, Willey SH, Chang TW, Lowe B. Cephalosporin-associated pseudomembranous colitis due to *Clostridium difficile*. *JAMA*, 1979; 242(24): 2683-2685.
- Bartsch SM, Umscheid CA, Nachamkin I, Hamilton K, Lee BY. Comparing the economic and health benefits of different approaches to diagnosing *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*, 2015; 21(1): 77.e1-77.e779.
- Bauer, M. P., & Kuijper, E. J. (2015). Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infectious disease clinics of North America*, 29(1), 29–35.
- Beinortas T, Burr NE, Wilcox MH, Subramanian V. Comparative efficacy of treatments for *Clostridium difficile* infection: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2018; 18(9): 1035-1044.
- Bella S, Ascenzi P, Siarakas S, Petrosillo N, di Masi A. *Clostridium difficile* toxins A and B: insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins*, 2016; 8(5): 134.

- Bello S, McQuay S, Rudra B, Gupta RS. Robust demarcation of the family Peptostreptococcaceae and its main genera based on phylogenomic studies and taxon-specific molecular markers. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2024; 74(2).
- Bianco M, Fedele G, Quattrini A, Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, Ausiello CM. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*, 2011; 60(Pt 8): 1162-1167.
- Bingol EB, Hampikyan H, Muratoglu K, Akkaya E, Cetin O, Colak H. Characterisation and antibiotic susceptibility profile of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* isolated from chicken carcasses. *J Vet Res*, 2020; 64(3): 407-412.
- Bjöersdorff OG, Lindberg S, Kiil K, Persson S, Guardabassi L, Damborg P. Dogs are carriers of *Clostridioides difficile* lineages associated with human community-acquired infections. *Anaerobe*, 2021; 67: 102317.
- Bletz S, Janezic S, Harmsen D, Rupnik M, Mellmann A. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for genome-wide typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 2018; 56(6): e01987-17.
- Bloomfield M, Hutton S, Burton M, Tarring C, Velasco C, Clissold C, Balm M, Kelly M, Macartney-Coxson D, White R. Early identification of a ward-based outbreak of *Clostridioides difficile* using prospective multilocus sequence type-based Oxford Nanopore genomic surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2024; 45(9): 1-7.
- Bogiel T, Dura A, Woźniak M, Mikucka A, Kanarek P. Usefulness of capillary gel electrophoresis-based PCR for detection of *Clostridioides difficile* strains with hypervirulent ribotypes. *Gels*, 2024; 10: 343.
- Bolton D, Marcos P. The environment, farm animals and foods as sources of *Clostridioides difficile* infection in humans. *Foods*, 2023; 12(5): 1094.
- Borren NZ, Ghadermarzi S, Hutfless S, Ananthakrishnan AN. The emergence of *Clostridium difficile* infection in Asia: a systematic review and meta-analysis of incidence and impact. *PLoS One*, 2017; 12(5): e0176797.
- Bradshaw WJ, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. *J Cell Commun Signal*, 2018; 12(1): 319-331.
- Brouwer MS, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun*, 2013; 4: 2601.
- Brown AWW, Wilson RB. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterol Rep*, 2018; 6(3): 157-166.
- Buddle JE, Fagan RP. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, 2023; 14(1): 2150452.
- Bush SJ, Foster D, Eyre DW, Clark EL, De Maio N, Shaw LP, Stoesser N, Peto TEA, Crook DW, Walker AS. Genomic diversity affects the accuracy of bacterial single-nucleotide polymorphism-calling pipelines. *GigaScience*, 2020; 9(2): giaa007.

- Carroll KC, Mizusawa M. Laboratory tests for the diagnosis of *Clostridium difficile*. Clin Colon Rectal Surg, 2020; 33(2): 73-81.
- Carter GP, Lyras D, Allen DL, et al. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. J Bacteriol, 2007; 189(20): 7290-7301.
- Carriço, J. A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F. R. Pinto, H. de Lencastre, J. S. Almeida, and M. Ramirez. 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by Application to Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol, 44(7). 2524-32.
- Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. J Am Vet Med Assoc, 2002; 221(1): 52-59.
- Centers for Disease Control and Prevention. Emerging infections program, healthcare-associated infections—community interface surveillance report, *Clostridioides difficile* infection (CDI), 2017. CDC, 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention. Emerging infections program, healthcare-associated infections—community interface surveillance report, *Clostridioides difficile* infection (CDI), 2024. CDC, 2024.
- Chamgordani SZ, Yadegar A, Azimirad M, Ghourchian H. An ultrasensitive genosensor for detection of toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* based on a conserved sequence in surface layer protein coding gene. Talanta, 2024; 275: 126014.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025.
- Clooten J, Kruth S, Arroyo L, Weese JS. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. Vet Microbiol, 2008; 129(1-2): 209-214.
- Cowardin CA, Buonomo EL, Saleh MM, et al. The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. Nat Microbiol, 2016; 1(8).
- Curcio D, Cané A, Fernández FA, Correa J. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in developing countries: a systematic review and meta-analysis. Infect Dis Ther, 2019; 8(1): 87-103.
- Curry S. *Clostridium difficile*. Clinics in Laboratory Medicine, 2010; 30(1): 329-342.
- Czepiel J, Drózd M, Pituch H, et al. *Clostridium difficile* infection: review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019; 38(7): 1211-1221.
- Çakır M, Özsan M. *Clostridium difficile*'ye bağlı kolit. Güncel Gastroenteroloji Dergisi, 1997; 439-451.
- Danielsson D, Lambe D, Persson S. The immune response in patients to an infection with *Bacteroides fragilis* spp. *fragilis* and *Clostridium difficile*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1972; 80: 709-712.

- De Jong E, de Jong AS, Bartels CJM, van der Rijt-van den Biggelaar C, Melchers WJ, Sturm PD. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012; 31(9): 2219-2225.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20(2): 1-26.
- Dharmasena M, Jiang X. Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from animal manure and composts being used as biological soil amendments. *Appl Environ Microbiol*, 2018; 84(16): e00738-18.
- Dilnessa T, Getaneh A, Hailu W, Moges F, Gelaw B. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2022; 17(1): e0262597.
- Dingle KE, Didelot X, Quan TP, et al. Role of clinical and environmental contamination in the transmission of *Clostridium difficile* in hospitals: a combined genetic and epidemiological analysis. *Lancet Infect Dis*, 2018; 18(1): 68-75.
- Dingle KE, Griffiths D, Didelot X, et al. Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity. *PLoS One*, 2011; 6(5).
- Diniz AN, Moura LNF, Cruz DS, et al. Characterization of the virulence of three novel clade 2 *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains and a two-year screening in animals and humans in Brazil. *PLoS One*, 2022; 17(8): e0273013.
- Doyle EM. *Clostridium difficile* as a risk associated with animal sources. *Food Res Inst Proje Raporu*, Wisconsin; erişim tarihi: 25.06.2019.
- Drall KM, Tun HM, Morales-Lizcano NP, et al. *Clostridioides difficile* colonization is differentially associated with gut microbiome profiles by infant feeding modality at 3-4 months of age. *Front Immunol*, 2019; 10: 2866.
- Dupuy B. Regulation of clostridial toxin gene expression: a pasteurian tradition. *Toxins*, 2023; 15(7): 413.
- Eckert C, Holscher E, Petit A, Lalande V, Barbut F. Molecular test based on isothermal helicase-dependent amplification for detection of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *J Clin Microbiol*, 2014; 52(7): 2386-2389.
- Edwards AN, Suárez JM, McBride SM. Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *J Vis Exp*. 2013;(79): e50787.
- El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, Gonzalez C, Tarr PI, Haslam DB. Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2013;56(12):1713-1721.
- Erganiş O, Hadimli HH. Investigation on carriage of *Clostridium difficile* in dogs and cats. *Eurasian J Vet Sci*. 1999;15(2):97-103.

- Ersöz ŞŞ, Coşansu S. Prevalence of *Clostridium difficile* isolated from beef and chicken meat products in Turkey. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2018;38(4):759-767.
- Esfandiari Z, Weese S, Ezzatpanah H, Jalali M, Chamani M. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiol.* 2014; 14:283.
- Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Adekunle O, Mattei LM, Bushman FD, Gewirtz AT. Toxin-positive *Clostridium difficile* latently infect mouse colonies and protect against highly pathogenic *C. difficile*. *Gut.* 2018;67(5):860-871.
- Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip CLC, Golubchik T, Batty EM, Finney JM, Wyllie DH, Didelot X, Piazza P, Bowden R, Dingle KE, Harding RM, Crook DW, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1195-1205.
- Farooq PD, Urrunaga NH, Tang DM, von Rosenvinge EC. Pseudomembranous colitis. *Dis Mon.* 2015;61(5):181-206.
- Feltis BA, Wiesner SM, Kim AS, Erlandsen SL, Holterman MJ, Wells CL. *Clostridium difficile* toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes. *Shock.* 2000;14(6):629-634.
- Finney, J.M. (1893). Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus.
- Finsterwalder SK, Loncaric I, Cabal A, Szostak MP, Barf LM, Marz M, Allerberger F, Burgener IA, Tichy A, Feßler AT, Schwarz S, Monecke S, Ehricht R, Ruppitsch W, Spergser J, Künzel F. Dogs as carriers of virulent and resistant genotypes of *Clostridioides difficile*. *Zoonoses Public Health.* 2022;69(6):673-681.
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *Br J Exp Pathol.* 1929; 10:226-236.
- Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Hinds S, Parry S, Paterson DL, Riley TV. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:516. Published 2015 Nov 14.
- Gaynes R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):849-853.
- George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, Keighley MR, Alexander-Williams J, Burdon DW. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J.* 1978; 1:695.
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes.* 2014;5(1):15-27.
- Gerhard R, Nottrott S, Schoentaube J, Tatge H, Olling A, Just I. Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 6):765-770.

- Ghavidel M, Salari Sedigh H, Razmyar J. Isolation of *Clostridium difficile* and molecular detection of binary and A/B toxins in faeces of dogs. *Iran J Vet Res.* 2016;17(4):273-276.
- Gilbreath JJ, Verma P, Abbott AN, Butler-Wu SM. Comparison of the Verigene *Clostridium difficile*, Simplexa *C. difficile* Universal Direct, BD MAX Cdiff, and Xpert *C. difficile* assays for the detection of toxigenic *C. difficile*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80(1):13-18.
- Girotra M, Kumar V, Khan JM, Damisse P, Abraham RR, Aggarwal V, Dutta SK. Clinical predictors of fulminant colitis in patients with *Clostridium difficile* infection. *Saudi J Gastroenterol.* 2012;18(2):133-139.
- Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E, Nazeri S. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:916826.
- Govani SM, Waljee AK, Stidham RW, Higgins PD. Increasing ultraviolet light exposure is associated with reduced mortality from *Clostridium difficile* infection. *United Eur Gastroenterol J.* 2015;3(2):208-214.
- Govind R, VEDIYAPPAN G, Rolfe RD, Fralick JA. Evidence that *Clostridium difficile* TcdC is a membrane-associated protein. *J Bacteriol.* 2006;188(10):3716-3720.
- Green RH. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. *Yale J Biol Med.* 1974;47(3):166-181.
- Guh AY, Kutty PK. *Clostridioides difficile* infection. *Ann Intern Med.* 2018;169(7):ITC49-ITC64.
- Guran S, Ilhak O. *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. *J Verbrauch Lebensm.* 2015;10:289-294.
- Hafiz S, Oakley CL. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *J Med Microbiol.* 1976;9:129-136.
- Hain-Saunders NMR, Knight DR, Bruce M, Byrne D, Riley TV. Genomic analysis of *Clostridioides difficile* recovered from horses in Western Australia. *Microorganisms.* 2023;11(7):1743.
- Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child.* 1935;49:390-402.
- Hampikyan H, Bingol EB, Muratoglu K, Akkaya E, Cetin O, Colak H. The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. *Meat Sci.* 2018;139:120-124.
- Hamre DM, Rake GW, McKee CM, Macphillamy HB. The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *Am J Med Sci.* 1943;206:642-652.
- Hart J, Putsathit P, Knight DR, Sammels L, Riley TV, Keil A. *Clostridium difficile* infection diagnosis in a paediatric population: comparison of methodologies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(9):1555-1564.
- Hawken P, Weese JS, Friendship R, Warriner K. Longitudinal study of *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pigs

- from weaning through to the end of processing. *J Food Prot.* 2013;76(4):624-630.
- Hazarika R, Sarmah H, Doley MK, Saikia DP, Hazarika G, Barkalita LM, Deka P, Manoharan S, Sharma RK. *Clostridioides difficile* in food and food products of animal origin in Assam, India. *Anaerobe.* 2023;81:102723.
- He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Dingle KE. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet.* 2020;45(1):109-113.
- Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest.* 1988;82(5):1516-1524.
- Hensgens MP, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MG, de Boer E, Lipman LJ, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection in the community, a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:635-645.
- Hernandez BG, Vinithakumari AA, Sponseller B, Tangudu C, Mooyottu S. Prevalence, colonization, epidemiology, and public health significance of *Clostridioides difficile* in companion animals. *Front Vet Sci.* 2020;7:512551.
- Houf K De, Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Assessment of the Genetic Diversity among *Arcobacters* Isolated from Poultry Products by Using Two PCR-Based Typing Methods. *Appl Environ Microbiol* 68: 2002.
- Housman ST, Banevicius MA, Lamb LM, Nicolau DP. Isolation and quantitation of *Clostridium difficile* in aqueous and fecal matter using two types of selective media. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(3):445-447.
- Huelsenbeck SC, May M, Schmidt G, Genth H. Inhibition of cytokinesis by *Clostridium difficile* toxin B and cytotoxic necrotizing factors—reinforcing the critical role of RhoA in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009;66(11):967-975.
- Hulme JP. Emerging diagnostics in *Clostridioides difficile* infection. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8672.
- Hunault L, England P, Barbut F, Iannascoli B, Godon O, Déjardin F, Thomas C, Dupuy B, Guo C, Macdonald L, Gorochoy G, Sterlin D, Bruhns P. A monoclonal antibody collection for *C. difficile* typing?. *Gut Pathog.* 2024;16(1):4.
- Hussain I, Sharma RK, Borah P, Rajkhowa S, Barkalita LM, Hasin D, Choudhury M, Rupnik M, Deka NK, Saikia GK. Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from pet dogs in Assam, India. *Anaerobe.* 2015;36:9-13.
- Imwattana K, Shivaperumal N, Leepattarakit T, Kiratisin P, Knight DR, Riley TV. The brief case: a white-colony-producing *Clostridioides difficile* ribotype 020 strain. *J Clin Microbiol.* 2023;61(6):e00593-23.
- Inghammar M, Svanström H, Voldstedlund M, Melbye M, Hviid A, Mølbak K, Pasternak B. Proton-pump inhibitor use and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2021;72(12):e1084-e1089.

- Janezic S, Rupnik M. Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Res Microbiol*. 2015;166(4):353-360.
- Janezic S, Rupnik M. Development and implementation of whole genome sequencing-based typing schemes for *Clostridioides difficile*. *Front Public Health*. 2019;7:309.
- Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*. 2016;37:13-24.
- Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD, Nicholson A, Limbago BM, Arroyo LG, et al. Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin. *J Bacteriol*. 2009;191:3881-3891.
- Jarrad AM, Karoli T, Blaskovich MA, et al. *Clostridium difficile* drug pipeline: challenges in discovery and development of new agents. *J Med Chem*. 2015;58(13):5164-5185.
- Jin D, Luo Y, Huang C, Cai J, Ye J, Zheng Y, Wang L, Zhao P, Liu A, Fang W, Wang X, Xia S, Jiang J, Tang YW. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients in eastern China. *J Clin Microbiol*. 2017;55(3):801-810.
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124.
- Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 1995;375(6531):500-503.
- Karaaslan A, Soysal A, Yakut N, Akkoç G, Demir SO, Atıcı S, Toprak NU, Söyletir G, Bakır M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection in pediatric wards: a retrospective case-control study. *SpringerPlus*. 2016;5(1):1329.
- Keessen EC, Hensgens MP, Spigaglia P, et al. Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet *Clostridium difficile* PCR-ribotype 078. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013;2:14.
- Keighley MR, Burdon DW, Arabi Y, Williams JA, Thompson H, Youngs D, et al. Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhoea. *Br Med J*. 1978;16:1667-1669.
- Kelly CP, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 8):1070-1079.
- Khanna S, Pardi DS. *Clostridium difficile* infection: new insights into management. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(11):1106-1117.
- Kılıç A. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenezi, klinik özellikler, tanı ve tedavi. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(3):556-566.
- Kim J, Darley D, Selmer T, Buckel W. Characterization of (R)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase and a family III coenzyme A transferase involved in reduction of L-leucine to isocaproate by *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(9):6062-6069.

- Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J Jr, Waters D. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis.* 1981;143(1):42-50.
- Kirk JA, Banerji O, Fagan RP. Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its importance in therapeutics. *Microb Biotechnol.* 2017;10(1):76-90.
- Kitchin N, Remich SA, Peterson J, et al. A Phase 2 study evaluating the safety, tolerability, and immunogenicity of two 3-dose regimens of a *Clostridium difficile* vaccine in healthy US adults aged 65 to 85 years. *Clin Infect Dis.* 2020; 70:1-10.
- Knight DR, Riley TV. Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*. *Front Public Health.* 2019; 7:164.
- Knight DR, Putsathit P, Elliott B, Riley TV. Contamination of Australian newborn calf carcasses at slaughter with *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(3): 259.e1-259.e4.
- Koene MG, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MP, Meetsma AM, Putirulan FF, van Bergen MA, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(8):778-784.
- Jan P Meier-Kolthoff, Joaquim Sardà Carbasse, Rosa L Peinado-Olarte, Markus Göker, TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes, *Nuc Acid Res*, 2022; 7, 50.
- Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):285-298.
- Krůtová M, Nyč O. Diagnosis of infections caused by *Clostridium difficile* in the Czech Republic: availability, possibilities, and interpretation of laboratory results. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(2):92-97.
- Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR-ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13:31.
- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W22-W28.
- Kuwata Y, Tanimoto S, Sawabe E, Shima M, Takahashi Y, Ushizawa H, Fujie T, Koike R, Tojo N, Kubota T, Saito R. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(4):763-772.
- Lale Z, Dogruman Al F, Fidan I, Adiyaman G, Yesilyurt E, Ozkan S, Caglar K. The investigation of frequency of *Clostridium difficile* toxin A/B in stool samples of patients with diarrhea. *Ankem Derg.* 2013;27:55-59.

- Lanzoni-Mangutchi P, Banerji O, Wilson J, Barwinska-Sendra A, Kirk JA, Vaz F, O'Beirne S, Baslé A, El Omari K, Wagner A, Fairweather NF, Douce GR, Bullough PA, Fagan RP, Salgado PS. Structure and assembly of the S-layer in *C. difficile*. *Nat Commun*. 2022;13(1):970.
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. 2016;40:95-99.
- Lee C, Lee J, Chiu C, Tsai P, Ko W, Hung Y. Clinical significance of toxigenic *Clostridioides difficile* growth in stool cultures during the era of nonculture methods for the diagnosis of *C. difficile* infection. *Microbiol Spectr*. 2021;9:e00799-21.
- Lees EA, Miyajima F, Pirmohamed M, Carrol ED. The role of *Clostridium difficile* in the paediatric and neonatal gut - a narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(7):1047-1057.
- Lefebvre SL, Reid-Smith RJ, Waltner-Toews D, Weese JS. Incidence of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, and other healthcare-associated pathogens by dogs that participate in animal-assisted interventions. *J Am Vet Med Assoc*. 2009;234(11):1404-1417.
- Lefebvre SL, Reid-Smith R, Boerlin P, Weese JS. Evaluation of the risks of shedding *Salmonellae* and other potential pathogens by therapy dogs fed raw diets in Ontario and Alberta. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(8-10):470-480.
- Leite S, Cotias C, Rainha KC, Santos MG, Penna B, Moraes RF, Harmanus C, Smits WK, Ferreira EO. Prevalence of *Clostridioides difficile* in dogs (*Canis familiaris*) with gastrointestinal disorders in Rio de Janeiro. *Anaerobe*. 2023;83:102765.
- Lim SC, Knight DR, Moon P, Foster NF, Riley TV. *Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches, and garden mixes with evidence of a clonal relationship with historical food and clinical isolates. *Environ Microbiol Rep*. 2020;12(6):672-680.
- Lin CJ, Wade TJ, Hilborn ED. Flooding and *Clostridium difficile* infection: a case-crossover analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(6):6948-6964.
- Lister M, Stevenson E, Heeg D, Minton NP, Kuehne SA. Comparison of culture-based methods for the isolation of *Clostridium difficile* from stool samples in a research setting. *Anaerobe*. 2014;28:226-229.
- Loo VG, Brassard P, Miller MA. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(11):1342-1348.
- Madewell BR, Bea JK, Kraegel SA, Winthrop M, Tang YJ, Silva J Jr. *Clostridium difficile*: a survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11(1):50-4.
- Maestri AC, Ando PK, Sarot G, de Castilho F, Raboni SM, Nogueira KS. Prevalence and seasonality of *Clostridioides difficile* over 12 years at a tertiary hospital in Brazil. *Curr Microbiol*. 2022;79(12):354.

- Magistrali CF, Maresca C, Cucco L, Bano L, Drigo I, Filippini G, Dettori A, Broccatelli S, Pezzotti G. Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in veal calves in Italy. *Anaerobe*. 2015;33:42-47.
- Maja R, Virginie V, Sandra J, Valerija T, Georgina D, Béatrice S, Nathalie D, Bruno HM, Emmanuelle SA, Philippe C, Mark W, Kerrie D; COMBACTE-CDI consortium. Distribution of *Clostridioides difficile* ribotypes and sequence types across humans, animals, and food in thirteen European countries. *Emerg Microbes Infect*. 2024;13:2427804.
- Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2002;16(5):533-540.
- Martinez E, Taminiau B, Rodriguez C, Daube G. Gut microbiota composition associated with *Clostridioides difficile* colonization and infection. *Pathogens*. 2022;11(7):781.
- Martínez-Meléndez A, Cruz-López F, Morfin-Otero R, Maldonado-Garza HJ, Garza-González E. An update on *Clostridioides difficile* binary toxin. *Toxins (Basel)*. 2022;14(5):305.
- Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Ross RP, Hill C. The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*. 2015;5(10):1-12.
- Mattana M, Tomasello R, Cammarata C, Di Carlo P, Fasciana T, Giordano G, Lucchesi A, Siragusa S, Napolitano M. *Clostridium difficile*-induced inflammasome activation and coagulation derangements. *Microorganisms*. 2022;10(8):1624.
- McBee RH. Intestinal flora of some Antarctic birds and mammals. *J Bacteriol*. 1960;79:311-312.
- McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):581-592.
- McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis*. 2018;66(7):987-994.
- McKenzie E, Riehl J, Banse H, Kass PH, Nelson S Jr, Marks SL. Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. *J Vet Intern Med*. 2010;24(1):97-103.
- Medina-Torres, C. E., Weese, J. S., & Staempfli, H. R. (2011). Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Veterinary microbiology*, 152(1-2), 212–215
- Meireles, J., Moraes, R. F. F., Lins, D., Oliveira, T. D. S., de Carvalho, E. B., Rainha, K., & Ferreira, E. O. (2024). Dogs in Rio de Janeiro as reservoirs of *Clostridioides difficile* ribotypes causing CDI in humans. *Anaerobe*, 90, 102917.
- Mellmann A, Andersen PS, Bletz S, Friedrich AW, Kohl TA, Lilje B, Niemann S, Prior K, Rossen JW, Harmsen D. High interlaboratory reproducibility and

- accuracy of next-generation-sequencing-based bacterial genotyping in a ring trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017; 55(3): 908-913.
- Mendo-Lopez R, Alonso CD, Villafuerte-Gálvez JA. Best practices in the management of *Clostridioides difficile* infection in developing nations. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2024; 9(8): 185.
- Mengoli M, Barone M, Fabbrini M, D'Amico F, Brigidi P, Turrone S. Make it less difficile: understanding genetic evolution and global spread of *Clostridioides difficile*. *Genes*, 2022; 13(12): 2200.
- Mitchell M, Nguyen SV, Macori G, Bolton D, McMullan G, Drudy D, Fanning S. *Clostridioides difficile* as a potential pathogen of importance to One Health: a review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2022; 19(12): 806-816.
- Mizrahi A, Péan de Ponfilly G, Sapa D, Suau A, Mangin I, Baliarda A, Hoys S, Pilmis B, Lambert S, Brosse A, Le Monnier A. A mouse model of mild *Clostridioides difficile* infection for the characterization of natural immune responses. *Microorganisms*, 2024; 12(10): 1933.
- Moore R, Pothoulakis C, LaMont JT, Carlson S, Madara JL. *C. difficile* toxin A increases intestinal permeability and induces Cl⁻ secretion. *American Journal of Physiology*, 1990; 259(2 Pt 1): G165-G172.
- Muratoglu K, Akkaya E, Hampikyan H, Bingol EB, Cetin O, Colak H. Detection, characterization and antibiotic susceptibility of *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* in meat products. *Food Science of Animal Resources*, 2020; 40(4): 578-587.
- Nelson RL, Suda KJ, Evans CT. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017; 3(3): CD004610.
- Nitzan O, Elias M, Chazan B, Raz R, Saliba W. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and implications in treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 2013; 19(43): 7577-7585.
- Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 1995; 81(1): 53-62.
- Normington C, Chilton CH, Buckley AM. *Clostridioides difficile* infections; new treatments and future perspectives. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2024; 40(1): 7-13.
- Nottrott S, Schoentaube J, Genth H, Just I, Gerhard R. *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. *Apoptosis*, 2007; 12(8): 1443-1453.
- Oliveira PH, Ribis JW, Garrett EM, Trzilova D, Kim A, Sekulovic O, Mead EA, Pak T, Zhu S, Deikus G, Touchon M, Lewis-Sandari M, Beckford C, Zeitouni NE, Altman DR, Webster E, Oussenko I, Bunyavanich S, Aggarwal AK, Bashir A, Patel G, Wallach F, Hamula C, Huprikar S, Schadt EE, Sebra R, van Bakel H, Kasarskis A, Tamayo R, Shen A, Fang G. Epigenomic characterization of

- Clostridioides difficile* finds a conserved DNA methyltransferase that mediates sporulation and pathogenesis. *Nature Microbiology*, 2020; 5(1): 166-180.
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., ... & Stevens, R. L. (2023). Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic acids research*, 51(D1), D678-D689.
- Orden C, Blanco JL, Álvarez-Pérez S, Garcia-Sancho M, Rodriguez-Franco F, Sainz A, Villaescusa A, Harmanus C, Kuijper E, Garcia ME. Isolation of *Clostridium difficile* from dogs with digestive disorders, including stable metronidazole-resistant strains. *Anaerobe*, 2017; 43: 78-81.
- Oren A, Rupnik M. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: two validly published and correct names. *Anaerobe*, 2018; 52: 125-126.
- Öksüz Ş, Danış A, Öztürk E, Çalışkan E, Kılıç Akar N, Sungur MA. The investigation of *Clostridium difficile* colonization in long-term hospitalized patients. *Anadolu Klinikleri*, 2017; 22(3): 177-182.
- Özgen E, Yıldırım M. Isolation and identification of *Clostridium difficile* from cases of diarrhea in young farm animals, and the determination of antimicrobial susceptibility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2021; 45(2): 266-271.
- Özgen EK, Yıldırım M. Neonatal dönem buzağı ishallerinde *Clostridium difficile*. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 2018; 7(1): 33-41.
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(7): 406-415.
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020; 70: 5607-5612.
- Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerging Microbes & Infections*, 2018; 7(1): 15.
- Perry JD. A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017; 30(2): 449-479.
- Pommerville JC. *Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology*. 8th ed. Jones and Bartlett Publishers, 2007; pp. 49-52.
- Perumalsamy S, Putsathit P, Riley TV. High prevalence of *Clostridium difficile* in soil, mulch and lawn samples from the grounds of Western Australian hospitals. *Anaerobe*, 2019; 60: 102065.
- Pothoulakis C, Lamont JT. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001; 280(2): G178-G183.

- Prosty C, Hanula R, Katergi K, Longtin Y, McDonald EG, Lee TC. Clinical outcomes and management of NAAT-positive/toxin-negative *Clostridioides difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 2024; 78(2): 430-438.
- Pruitt RN, Lacy DB. Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012; 2: 28. Published 2012 Mar 16.
- Pruss KM, Sonnenburg JL. *C. difficile* exploits a host metabolite produced during toxin-mediated disease. *Nature*, 2021; 593(7858): 261-265.
- Rabold D, Espelage W, Abu Sin M, Eckmanns T, Schneeberg A, Neubauer H, Möbius N, Hille K, Wieler LH, Seyboldt C, Lübke-Becker A. The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. *PLoS One*, 2018; 13(2): e0193411.
- Rainha K, Fernandes Ferreira R, Trindade CNR, Carneiro LG, Penna B, Endres BT, Begum K, Alam MJ, Garey KW, Domingues Regina Maria CP, Ferreira EO. Characterization of *Clostridioides difficile* ribotypes in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe*, 2019; 58: 102065.
- Redding LE, Habing GG, Tu V, Bittinger KL, O'Day J, Pancholi P, Wang SH, Alexander A, Kelly BJ, Weese JS, Stull JW. Infrequent intrahousehold transmission of *Clostridioides difficile* between pet owners and their pets. *Zoonoses and Public Health*, 2023; 70(4): 341-351.
- Redding LE, Tu V, Abbas A, Alvarez M, Zackular JP, Gu C, Bushman FD, Kelly DJ, Barnhart D, Lee JJ, Bittinger KL. Genetic and phenotypic characteristics of *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* from canine, bovine, and pediatric populations. *Anaerobe*, 2022; 74: 102539.
- Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1995; 95(5): 2004-2011.
- Riley TV. *Clostridium difficile*: a pathogen of the nineties. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1998; 17(3): 137-141.
- Riley TV, Adams JE, O'Neill GL, Bowman RA. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology and Infection*, 1991; 107(3): 659-665.
- Rineh A, Kelso MJ, Vatansever F, Tegos GP, Hamblin MR. *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2014; 12(1): 131-150.
- Pinto F.R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2008. A Confidence Interval for the Wallace Coefficient of Concordance and Its Application to Microbial Typing Methods. *PLoS ONE* 3(11):e3696.
- Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016; 932: 65-92.

- Rodriguez-Palacios A, Lejeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011; 77(9): 3085-3091.
- Rose AN, Baggs J, Kazakova SV, Guh AY, Yi SH, McCarthy NL, Jernigan JA, Reddy SC. Trends in facility-level rates of *Clostridioides difficile* infections in US hospitals, 2019-2020. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2023; 44(2): 238-245.
- Sailhamer EA, Carson K, Chang Y, Zacharias N, Spaniolas K, Tabbara M, Alam HB, Demoya MA, Velmahos GC. Fulminant *Clostridium difficile* colitis patterns of care and predictors of mortality. *Archives of Surgery*, 2009; 144(5): 433-439.
- Samir A, Abdel-Moein KA, Zaher HM. Molecular detection of toxigenic *Clostridioides difficile* among diarrheic dogs and cats: a mounting public health concern. *Veterinary Sciences*, 2021; 8(6): 88.
- Sayın E, Bilgin H, Söyletir G, Ülger Toprak N. Türkiye’deki bir üniversite eğitim ve araştırma hastanesinde elde edilen toksijenik *Clostridioides difficile* izolatlarına antimikrobiyallerin in vitro etkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2020; 54(3): 368-377.
- Schneeberg A, Rupnik M, Neubauer H, Seyboldt C. Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, 2012; 18(5): 484-488.
- Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeño-Tárraga AM, Wang H, Holden MTG, Wright A, Churcher C, Quail MA, Baker S, Nathalie B, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, Dowd L, Fraser A, Feltwell T, Hance Z, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Price C, Rabbino-witsch E, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Unwin L, Whithead S, Dupuy B, Dougan G, Barrell B, Parkhill J. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, 2006; 38: 779-786.
- Shivaperumal N, Knight DR, Imwattana K, Androga GO, Chang BJ, Riley TV. Esculin hydrolysis negative and TcdA-only producing strains of *Clostridium (Clostridioides) difficile* from the environment in Western Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 2022; 133(3): 1183-1196.
- Sholeh M, Krutova M, Forouzesh M, et al. Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2020; 9(1): 158.
- Silva ALO, Marra AR, Martino MDV, Mafra ACCN, Edmond MB, Dos Santos OFP. Identification of *Clostridium difficile* asymptomatic carriers in a tertiary care hospital. *Biomedical Research International*, 2017; 2017: 5450829.
- Silva ROS, Ribeiro MG, de Paula CL, Pires IH, Oliveira Junior CA, Diniz AN, de Araújo Nunes TA, Lobato FCF. Isolation of *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* in diarrheic and nondiarrheic cats. *Anaerobe*, 2020; 62: 102164.

- Sinnathamby ES, Mason JW, Flanagan CJ, et al. Clostridioides difficile infection: a clinical review of pathogenesis, clinical considerations, and treatment strategies. *Cureus*, 2023; 15(12).
- Skinner AM, Petrella L, Spandoni S, Serna-Perez F, Johnson S. Can Clostridium innocuum Masquerade as Clostridioides difficile? *Clin Infect Dis*. 2022;75(7):1268-1269.
- Smith Ld, King E. 1962. Clostridium Innocuum, Sp. N., A Spore-Forming Anaerobe Isolated From Human Infections. *J Bacteriol* 83.
- Snyder ML. The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age. *Journal of Infectious Diseases*, 1940; 66(1): 1-16.
- Songer JG, Anderson MA. Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 2006; 12(1): 1-4.
- Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 2016; 3: 23-42.
- Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, et al. Comparative phylogenomics of Clostridium difficile reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *Journal of Bacteriology*, 2006; 188: 7297-7305.
- Stabler RA, Dawson LF, Valiente E, Cairns MD, Martin MJ, Donahue EH, Riley TV, Songer JG, Kuijper EJ, Dingle KE, Wren BW. Macro and micro diversity of Clostridium difficile isolates from diverse sources and geographical locations. *PLoS One*, 2012; 7(3): e31559.
- Starikova EV, Tikhonova PO, Prianichnikov NA, Rands CM, Zdobnov EM, et al.. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation. *Bioinformatics*. 2020;36(12):3882-3884.
- Stein BE, Greenough WB, Mears SC. Management and prevention of recurrent Clostridium difficile infection in patients after total joint arthroplasty. *Geriatric Orthopaedic Surgery & Rehabilitation*, 2012; 3(4): 157-163.
- Steiner TS, Flores CA, Pizarro TT, Guerrant RL. Fecal lactoferrin, interleukin-1beta, and interleukin-8 are elevated in patients with severe Clostridium difficile colitis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 1997; 4(6): 719-722.
- Stone NE, Nunnally AE, Jimenez V Jr, Cope EK, Sahl JW, Sheridan K, Hornstra HM, Vinocur J, Settles EW, Headley KC, Williamson CHD, Rideout JR, Bolyen E, Caporaso JG, Terriqez J, Monroy FP, Busch JD, Keim P, Wagner DM. Domestic canines do not display evidence of gut microbial dysbiosis in the presence of Clostridioides (Clostridium) difficile, despite cellular susceptibility to its toxins. *Anaerobe*, 2019; 58: 53-72.
- Stone NE, Sidak-Loftis LC, Sahl JW, Vazquez AJ, Wiggins KB, Gillece JD, Hicks ND, Schupp JM, Busch JD, Keim P, Wagner DM. More than 50% of Clostridium difficile isolates from pet dogs in Flagstaff, USA, carry toxigenic genotypes. *PLoS One*, 2016; 11(10): e0164504.

- Struble AL, Tang YJ, Kass PH, Gumerlock PH, Madewell BR, Silva J Jr. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994; 6(3): 342-347.
- Stull JW, Peregrine AS, Sargeant JM, Weese JS. Pet husbandry and infection control practices related to zoonotic disease risks in Ontario, Canada. *BMC Public Health*, 2013; 13: 520.
- Sun X, Hirota SA. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Molecular Immunology*, 2015; 63(2): 193-202.
- Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 48(2): 606-608.
- Taha AE. Raw animal meats as potential sources of *Clostridium difficile* in Al-Jouf, Saudi Arabia. *Food Science of Animal Resources*, 2021; 41(5): 883-893.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021; 38(11): 3022-3027.
- Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 2001; 50(7): 613-619.
- Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. *Annals of Internal Medicine*, 1974; 81(4): 429-433.
- Tenover FC, Tickler IA, Persing DH. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012; 56(6): 2929-2932.
- Thanissery R, McLaren MR, Rivera A, Reed AD, Betrapally NS, Burdette T, Winston JA, Jacob M, Callahan BJ, Theriot CM. *Clostridioides difficile* carriage in animals and the associated changes in the host fecal microbiota. *Anaerobe*, 2020; 66: 102240.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. <https://www.eucast.org>
- Usui M, Suzuki K, Oka K, Miyamoto K, Takahashi M, Inamatsu T, Kamiya S, Tamura Y. Distribution and characterization of *Clostridium difficile* isolated from dogs in Japan. *Anaerobe*, 2016; 37: 58-61.
- Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Tamura, Y. Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, 2017; 43:15-20.
- Uzal FA, Navarro MA, Asin J, Boix O, Ballarà-Rodríguez I, Gibert X. Clostridial diarrheas in piglets: a review. *Veterinary Microbiology*, 2023; 280: 109691.

- Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clinical Microbiology and Infection*, 2001; 7(2): 55-64.
- Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes*, 2012; 3(2): 121-134.
- Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18(2): 247-263.
- Wang J, Yang C, Zhang C, Mao X, Lizhe A. Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* LCL126. *Bioengineered*, 2021; 12(1): 745-754.
- Wang S, Courreges MC, Xu L, Gurung B, Berryman M, Gu T. Revealing roles of S-layer protein (SlpA) in *Clostridioides difficile* pathogenicity by generating the first slpA gene deletion mutant. *Microbiology Spectrum*, 2024; 12(6): e0323323.
- Wasels F, Monot M, Spigaglia P, et al. Inter- and intraspecies transfer of a *Clostridium difficile* conjugative transposon conferring resistance to MLSB. *Microbial Drug Resistance*, 2014; 20(6): 555-560.
- Weese JS. *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020; 32(2): 213-221.
- Weese JS. *Clostridium difficile* in food—innocent bystander or serious threat? *Clinical Microbiology and Infection*, 2010; 16(1): 3-10.
- Weese JS, Armstrong J. Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2003; 17(6): 813-816.
- Wei Y, Sun M, Zhang Y, Gao J, Kong F, Liu D, Yu H, Du J, Tang R. Prevalence, genotype and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates from healthy pets in Eastern China. *BMC Infectious Diseases*, 2019; 19(1): 46.
- Wen X, Shen C, Xia J, et al. Whole-genome sequencing reveals the high nosocomial transmission and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in a single center in China, a four-year retrospective study. *Microbiology Spectrum*, 2022; 10(1): e0132221.
- Wen GL, Li SH, Qin Z, Yang YJ, Bai LX, Ge WB, Liu XW, Li JY. Isolation, molecular typing and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in dogs and cats in Lanzhou City of Northwest China. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022; 9: 1032945.
- Wickramage I, Spigaglia P, Sun X. Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021; 76(12): 3077-3090.
- Wieczorkiewicz JT, Lopansri BK, Cheknis A, et al. Fluoroquinolone and macrolide exposure predict *Clostridium difficile* infection with the highly

- fluoroquinolone- and macrolide-resistant epidemic *C. difficile* strain BI/NAP1/027. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015; 60(1): 418-423.
- Wren M. *Clostridium difficile* isolation and culture techniques. *Methods in Molecular Biology*, 2010; 646: 39-52.
- Xia Y, Tunis MC, Frenette C, Katz K, Amaratunga K, Rose SR, House A, Quach C. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Canada: a six-year review to support vaccine decision-making. *Canada Communicable Disease Report*, 2019; 45(7-8): 191-211.
- Yang Z, Zhang Y, Huang T, Feng H. Glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B is essential for disease pathogenesis. *Gut Microbes*, 2015; 6(3): 221-224.
- Yoldaş Ö, Altındış M, Cufalı D, Aşık G. A diagnostic algorithm for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Balkan Medical Journal*, 2016; 33(1): 80-86.
- Yu H, Chen K, Sun Y, et al. Cytokines are markers of the *Clostridium difficile*-induced inflammatory response and predict disease severity. *Clinical Vaccine Immunology*, 2017; 24(8): e00037-17.
- Yun Luo, Yu Chen, Shan Lin, Hui Hu, Xiaojun Song, Qiao Bian, Weijia Fang, Huoyang Lv, Qin Wang, Jianmin Jiang, Yi-Wei Tang & Dazhi Jin (2024) Genomic epidemiology of *Clostridioides difficile* sequence type 35 reveals intraspecies and interspecies clonal transmission, *Emerging Microbes & Infections*, 13:1, 2408322, DOI: 10.1080/22221751.2024.2408322
- Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 2013; 15(10): 2631-2641.

Doğancan Yarim Tez.docx

ORJİNALLIK RAPORU

% 6	% 6	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	tr.yesevikongresi.org İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.liofilchem.net İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.db-thueringen.de İnternet Kaynağı	<% 1
5	Seçil Abay, Emral Fevzi Ahmed, Fuat Aydın, Emre Karakaya, Hamit Kaan Müştak. "Presence of Clostridioides difficile in cattle feces, carcasses, and slaughterhouses: Molecular characterization and antibacterial susceptibility of the recovered isolates", Anaerobe, 2022 Yayın	<% 1
6	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Doğancañ YARIM

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi	2020
Doktora	ERÜ Sağlık Bil. Ens. Veteriner Mikrobiyoloji ABD.	2025

AKADEMİK DENEYİMLERİ

Deneyim	Kurum	Tarih
YÖK100/2000 Doktora Bursiyeri	ERÜ Sağlık Bil. Ens. Veteriner Mikrobiyoloji ABD. Enfeksiyon Hastalıklarının İmmunolojisi	2020-2024
TÜBİTAK 1001 Doktora Bursiyeri	TÜBİTAK 1001 121O619 Kodlu proje	2021-2022

YABANCI DİL

İngilizce: 83.75 (Yökdil, 2025/1)