

CLOSTRIDIUM DIFFICILE'NİN GIDALARDA BULUNUŞU VE HALK SAĞLIĞI AÇISINDAN ÖNEMİ

Çiğdem Öner¹, Haydar Özdemir^{2*}

ÖZET

Antibiyotiklerin keşfi ile infeksiyon hastalıklara bağlı ölüm olaylarında önemli düzeyde azalma olmasına karşın, zaman içerisinde gerek medikal tıpta gerekse veteriner hekimlikte tedavi amacıyla kullanılan değişik antibiyotiklere karşı mikrobiyal dirençlilik oluşmuştur. Mikroorganizmalarda oluşan değişik antibiyotik dirençliliğine bağlı olarak, bugün hastane kaynaklı infeksiyonlar olarak adlandırılan yeni sağlık problemleri ortaya çıkmıştır. *Clostridium difficile*'de günümüzde hastane kaynaklı infeksiyonların oluşumunda önemli rol oynamakta olup, insan ve hayvanlarda görülen infeksiyöz karakterdeki diarelerin en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Bu makale, son yıllarda adından sıkça bahsedilen *C. difficile*'nin tarihçesi, epidemiyolojisi, patojenitesi ve değişik gıdalarda bulunuşu ile halk sağlığı açısından önemini vurgulamak amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Clostridium difficile*, Gıda, Halk Sağlığı.

GİRİŞ

Clostridium difficile infeksiyonları (CDİ) sıklıkla antibiyotik kullanan ve hospitalize edilmiş insanlarda görülmektedir. Ancak günümüzde Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere, Kanada ve Avrupa Ülkelerinden hospitalize olmamış, antibiyotik tedavisi almamış ve yaşlı olmayan insanlara ait toplumsal kaynaklı *C. difficile* infeksiyonları olarak adlandırılan vakalar bildirilmektedir.

Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalarda (1, 2, 3, 4) etkenin hayvanlarda, hayvansal ürünlerde, sebzelerde ve çevrede (sulara, toprakta) tespit edilmesi, insanlarda infeksiyonun oluşmasında değişik kontaminasyon kaynaklarının olabileceğini akla getirmiştir. Aynı şekilde yapılan bu çalışmalarda etkenin farklı suşları tespit edilmiş olup, insan ve hayvansal orijinli suşlar arasında belirlenen yakın akraba benzerlikleri *C. difficile*'nin gıda kaynaklı bir zoonoz olabileceğini gündeme getirmiştir. Günümüzde araştırmacılar *C. difficile*'nin gıda patojeni olarak değerlendirilebilmesi için, konu üzerindeki çalışmaların henüz yetersiz olduğunu bildirmektedirler.

¹ Gıda Mühendisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi, ² Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. *Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: hozdemir@veterinary.ankara.edu.tr

***Clostridium difficile*'nin GENEL ÖZELLİKLERİ**

C. difficile günümüzde insan ve hayvanlarda görülen infeksiyöz karakterdeki enteritlerin en önemli etkenlerindedir. Etken Gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerob, peritrik flagellaları ile hareketli, kapsülsüz, 0.5-2 µm eninde, 3-17 µm boyunda, ince, uzun, basil formundadır (5). Etkenin spor formu ısıya, kurutmaya ve kimyasallara karşı dirençlidir. Etken toprakta, suda, insan ve bağırsak içeriğinde bulunmaktadır. *C. difficile* infeksiyonlarına bağlı enteritis vakalarında ölüm olayları % 3-6 düzeyindedir. *C. difficile*'nin iki önemli toksini olup, bunlar toksin A ve Toksin B olarak adlandırılır. Her iki toksinde sitotoksik etkiye sahip olup, etkenin bazı suşları sadece toksin B üretmektedir. Bununla birlikte *C. difficile*'nin az sayıdaki bazı suşları ise binary toksin olarak adlandırılan toksin tipini de üretebilmektedir (6). *C. difficile* ilk kez 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından sağlıklı yeni doğan bebeklerin bağırsak florasında saptanmış ve kültüre edilmesi oldukça zor olduğundan güç (difficult) anlamında "*Clostridium difficile*"adı verilmiştir (7). Etkenin 1960 ve 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarda ekzotoksinleri belirlenip, pseudomembranöz enterekolit ile ilişkisi saptanmıştır. Bu yıllarda etkenin bilinen bu özellikleri nedeniyle, antibiyotik kullanımına bağlı diareye yol açan en önemli ajan olarak tanımlanmıştır (8).

C. difficile uygun besiyerlerinde (Sikloserin Sefoksitin Fruktoz Agar v.b) 48 saat inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında, sarı-beyazımsı renkte, buzlu cam görünümünde koloniler oluşturur ve kültür at gübresi gibi kokar. Koloniler, 360 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışığı altında yeşil floresan verirler (5). Etken aynı şekilde pepton, maya ekstraktı ve glikoz içeren besiyerinde asetik, izobutirik, butirik, valerik, izovalerik, izokaproik, formik ve laktik asit üretir, ayrıca trozini para-kresole çevirirler. Bunun sonucu besiyerinde spesifik kresol kokusu (at veya fil gübresine benzer) oluşmakta olup, bu ayırt edici bir özellik olarak kabul edilir (9, 10). Çevresel ve klinik örneklerde bakterinin izolasyonunda değişik yöntemler geliştirilmiş olup, bunların temelini etkenin spor formunun vejetatif forma dönüştürülmesi işlemleri oluşturmaktadır (5, 11, 12).



Şekil 1: *C. difficile*'nin koloni morfolojisi (

C. difficile antibiyotik ile ilişkili diare ve kolitlerin en önemli nedenidir. *C. difficile* infeksiyonlarında klinik bulgular, hafif diareden toksik megakolon, bağırsak tıkanıklığı, bağırsak perforasyonu ve pseudomembranöz koliti içeren şiddetli intestinal hastalık tablosuna kadar oldukça değişken semptomlar gösterir (13).

***Clostridium difficile*'nin TARİHÇESİ**

C. difficile 1935 yılında ilk kez Hall ve O'Toole tarafından sağlıklı yeni doğan bebeklerin bağırsak florasında saptanmış ve *Bacillus difficilis* olarak adlandırılmıştır. Etken saptandığı bu yıllarda, bağırsak florasının normal bakterileri olarak kabul edilmiştir (6, 7).

1950-1970 yılları arasında antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak, diare/kolit vakalarında artışlar başlamış ve 1978'de ilk olarak pseudomembranöz kolit (PMK) ve antibiyotikle ilişkili diare deyimi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, bu tip vakaların çoğunda etken olarak *C. difficile* saptanmış ve klinik çalışmalarda klindamisin kullanımı ile bu semptomların daha erken ortaya çıktığı tespit edilmiştir (14, 15).

C. difficile'ye bağlı ortaya çıkan PMK hastalarında, 1979 yılından itibaren ilk basamak tedavisinde vankomisin kullanılmaya başlanmıştır. Bu yıllarda İngiltere Sağlık Bakanlığı, PMK'in en sık nedeni olarak belirlenen klindamisin ve linkomisin hastalarda kullanımını kısıtlamıştır. ABD'nde ise 1980'li yıllarda *C. difficile* en önemli hastane kaynaklı diare etkeni olarak tanımlanmıştır. Aynı şekilde 1989-1992 yıllarında klindamisin yoğun kullanımına bağlı olarak, klindamisin dirençli *C. difficile* (J suşu) suşları ABD hastanelerinde salgınlara neden olmuştur. Benzer şekilde, Kanada'nın Qubeck şehrinde 1991 yılı verilerine göre, antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan 100.000 vakanın % 35'inde etkenin *C. difficile* olduğu bildirilmiştir (14, 15).

İngiltere'de 2005- 2006 yılları arasındaki verilere göre *C. difficile*'den kaynaklanan vakaların sayısal olarak % 72 düzeyinde artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu yönden bakıldığında infeksiyonların artış nedenleri arasında, bölgesel ve insanlardan kaynaklanan faktörlerin rol oynayabileceği belirtilmiştir. Bunu takiben, 2003-2006 yıllarında klinik olarak daha şiddetli seyreden ve bilinen standart tedaviye yanıt alınamayan, antibiyotik dirençli *C. difficile* infeksiyonları tanımlanmıştır. Nitekim 2003-2004 yıllarında sadece Kanada'nın Qubeck şehrinde 2.000'den fazla insanın, *C. difficile* infeksiyonlarından dolayı öldüğü bildirilmiştir. Son yıllarda başta Avrupa Ülkeleri olmak üzere, Kuzey Amerika'dan ciddi *C. difficile* kaynaklı infeksiyon vakaları bildirilmiştir (14, 16).

***Clostridium difficile*'nin EPİDEMİYOLOJİSİ**

ABD'nde Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) tarafından bildirilen *C. difficile*'den kaynaklanan diare vakalarının yıllık sayısı 250.000'den fazladır. ABD ve Kanada'dan hastalıkla ilgili bildirimlerde, hastane kaynaklı infeksiyonlar içerisinde *C. difficile*'nin ilk sıralarda yer aldığı bildirilmiştir. *C. difficile* ile ilişkili hastalıklar genellikle toplumsal kökenli (CDAD) hastalıklar olarak adlandırılır (17).

C. difficile infeksiyonları, ağız yoluyla vücuda alınan etkenlerin (vejetatif ve spor formları) duyarlı konakçılarda, *C. difficile* sporlarının kalın bağırsakta kolonize olması ve toksinlerin salınması ile kolitis ve diareye neden olarak ortaya çıkar. Sağlıklı yetişkinler bağırsakta bulunan normal bakteri florası ve toksin A antikorları tarafından hastalıktan korunurlar (18). Ancak antibiyotik tedavisi, bağırsak cerrahisi ve nadiren de olsa kemoterapik ilaç kullanımı bazı hastalarda bağırsak mikroflorasını olumsuz yönde etkileyerek, *C. difficile*'nin kolonize olmasına neden olabilir (14). *C. difficile* infeksiyonu hastanede antibiyotik tedavisi veya kemoterapi gören yaşlı hastalarda yaygın olarak görülmektedir. *C. difficile* ayrıca sağlıklı yeni doğan bebekler ile 12-18 aylık bebeklerin % 60-70'inde kolonize olabilmektedir. Ancak bebeklerde nadiren kolitis görülür. Yeni doğan bebeklerin etkeni taşıyıcı özellikleri 18-24 aydan itibaren kaybolarak, normal yetişkin florası oluşur. Hastanede yatan hastalarda, klinik *C. difficile* infeksiyonunun oranı zamanla yaygın olarak değişir (17, 19).

C. difficile'nin vejetatif formları da bazı durumlarda, spor formları gibi dış ortamlarda canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Ağız yoluyla vücuda alınan *C. difficile* etkenleri, kalın bağırsakta kolonize olduktan sonra spor formları vejetatif formlara dönüşerek çoğalmaya başlar. Genellikle hastanelerde yataklar, hastane mobilyaları, hasta ve hasta yakınlarının ciltlerinde, tırnaklarında bulunabilen sporlar hastane ortamında aylarca canlı kalabilir (18, 19).

Son yıllarda *C. difficile* infeksiyonları ABD, Kanada ve çoğu Avrupa Ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. *C. difficile*'den kaynaklanan salgınlar hızla yayılım eğilimi göstererek tüm ülkeleri tehdit edebilir. İnfeksiyonlar hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında oldukça yaygın olarak görülmektedir. Etken sağlıklı kişilerin % 2-3'ünde, hastanede yeni doğan bebeklerin ise % 40-60'nın bağırsak florasında, inaktif spor formunda bulunmaktadır. İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak infekte olmaktadır (15, 17).

Özellikle 2000'li yıllardan itibaren CDI'nın epidemiyolojisi değişiklik göstererek hem insidensde büyük bir artış gözlenmiş hem de hastalığın seyri daha ağırlaşmıştır. Nitekim bu kapsamda, Kanada'da 1991-2003 yılları arasında CDI'nın insidensi her 100.000 kişide 35.6 olgu iken bu sayı 156.3'e ulaşmıştır. ABD'de de benzer bir artış gözlenmiştir (20, 21). ABD ve Kanada'da yapılan çalışmalarda hastalarda etkenin en fazla 027 ribotipi saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda Hastane kaynaklı infeksiyonların yanında, toplumsal kaynaklı *C. difficile* infeksiyonları da tüm dünyada görülmeye başlamıştır (22). Kanada'da 2003 yılında Montreal, Quebec Calgary ve Alberta şehirlerini kapsayan 2 salgın olayı gözlenmiştir (23). Benzer şekilde 2005 yılında da Toronto ve Ontario şehri hastanelerinde salgınlar ortaya çıkmıştır. Aynı yıllar içerisinde CDI'nın Avrupa Ülkelerinde görülme sıklığında artışlar görülmesi üzerine, 2005 yılında 14 ülke ve 38 hastanede yapılan çalışmalarda insidensin 14 ülkede 10.000 hastada 2.45 olgu olduğu saptanmıştır (22). Bu salgınlara örnek olarak, İngiltere'de 2003-2005 yıllarında *C. difficile*'nin NAP1/027 suşunun neden olduğu salgınlar verilebilir. Aynı şekilde görülen bu salgın olaylarını 2007 yılında İrlanda ve Finlandiya'daki salgınlar izlemiştir. Benzer şekilde 2010 yılında Danimarka ve Avustralya'da saptanan salgınları, 2012 yılında Yeni Zelanda'da gözlenen salgınlar takip etmiştir. Avrupa Ülkelerinde yapılan çalışmalarda, saptanan ribotiplerin ülkeler arasında farklılıklar gösterdiği belirtilmiş olup, Fransa'da 014, Almanya'da 168 ve 001, İngiltere'de 077, İrlanda'da 017 ve 156, İtalya'da 020, Hollanda'da 027 ve Polonya'da ise 017 ribotiplerinin daha yaygın olduğu bildirilmiştir (24).

C. difficile'nin üremesi her yaştaki hastalarda mümkün olabilmektedir. Bu durum klinik hastalıklarla ilişkili olabilir ya da olmayabilir. Bakteri sağlıklı yetişkinlerin % 3-5'nin, hastanede tedavi gören hastaların ise % 10-30'unun dışkıında bulunmaktadır. Bu oranların çocuklarda daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Yeni doğanlarda toksijenik *C. difficile*'nin bağırsakta kolonize olma olasılığı % 50 veya daha yüksek olabilir. *C. difficile*'nin insana geçişi genelde hastane kökenlidir. Enterotoksijenik *C. difficile*'nin hastalık tablosunu oluşturması, kolonize olan bakterinin sayısı ile ilişkilidir. Bu nedenle *C. difficile* çoğu hastada diareye neden olmayabilir. Ayrıca *C. difficile* bulunan hastalarda mutlaka diare olacak diye bir şey yoktur. Aynı şekilde, *C. difficile*'den kaynaklanan kolitis tüm yaş gruplarında görülmekle birlikte, çoğunlukla yaşlı ve hastanede yatan hastalarda görülür (21).

Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da 2003 yılından beri *C. difficile* infeksiyonuna bağlı diare salgınları ile mortalitenin artmasına bağlı olarak yapılan çalışmalar sonucunda, etkenin 027 (CD027) olarak adlandırılan daha patojen serotipi tespit edilmiştir (22). *C. difficile*'nin 027 ribotipinin dünyada hızla yayıldığı, ancak niçin bu ribotipin diğer tiplere oranla daha fazla yaygın olduğuna ilişkin açıklayıcı bilgiler mevcut değildir. Nitekim yine 2008 yılında 16 Avrupa ülkesinde yapılan başka bir çalışmada, *C. difficile* infeksiyonlarında 027 serotip kaynaklı vakalar bildirilmiştir. Bunların içinde 9 ülkede (İngiltere, Hollanda, Belçika, Fransa, İrlanda, Lüksemburg, İsviçre, Almanya ve Finlandiya) infeksiyon salgınları şeklinde seyrederken, 7 ülkede ise (Avusturya, Norveç, Danimarka, İsveç, Polonya, İspanya, Macaristan) sporadik şekilde seyretmiştir. Bu çalışmada en sık rastlanan ribotiplerin 014/020 (% 16), 001 (% 9), 078 (% 8) ve 027 (% 5) olduğu bildirilmiştir. *C. difficile*'nin 027 ribotipinin neden olduğu infeksiyonlar son zamanlarda Japonya, Kore, Hong Kong ve Avustralya'dan da bildirilmiştir (22, 25). Özellikle Kore'de infeksiyonların en fazla 018 ribotipinden, İran'da ise 078 ribotipinden kaynaklandığı, Türkiye'de ise sekiz izolat 001 ribotip olarak tespit edilmiştir (22, 26, 27).

İnsan ve hayvan orijinli *C. difficile* izolatlarının genotipik akrabalığını saptamaya ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda Songer ve ark (3) ile Weese ve ark. (28) tarafından yapılan çalışmalarda, et örneklerinden izole edilen *C. difficile* izolatlarının genotipik yapısının insan izolatlarıyla büyük ölçüde benzerlik taşıdığı belirtilmiştir. Aynı şekilde Arroya ve ark. da (29) at, köpek ve insan orijinli izolatlardan 20 insan izolatının 4'ü ile 92 köpek izolatının 58'i ve 21 at izolatından 5'inin arasında benzerlik olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmada, insan orijinli izolatlardan çoğunun (% 15) sadece insana özgü olan 5 farklı ribotip içerdiği belirlenmiştir. Yine Keel ve ark. (30) tarafından Kuzey Amerika'da yapılan çalışmada sığır, köpek, at, domuz ve insan izolatları içerisinde, domuz ve insan orijinli ribotip 078 izolatı predominant olarak tespit edilmiştir.

RİSK FAKTÖRLERİ

C. difficile infeksiyonlarında (CDİ) en önemli risk faktörleri yaşlılık, hastanede yatış süresi ve uzun süre antibiyotik kullanmaktır. Özellikle klindamisin, geniş spektrumlu sefalosporin veya florokinolon grubu antibiyotiklerin kullanılması bunlar içinde en önemli risk faktörü olarak bilinmektedir.

Bu 3 risk faktörü dışında, bağışıklık sisteminin baskılandığı koşullar ile kronik karaciğer ve böbrek yetmezliğinin de CDİ gelişimi için önemli risk faktörleri olduğu belirtilmiştir (21, 31).

Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak, mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon mikroflorasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmakta ve baskın hale geçen *C. difficile* sporları, vejetatif forma geçerek toksin salgılamaktadır. Aynı şekilde, bazı hastanelerde hastane orijinli infeksiyonların oluşma riskine karşı yapılan girişimler de, infeksiyon riskini arttırmaktadır. İnsanlarda ileri yaşlarda (≥ 65) oluşan riskin, yaşlılıkla birlikte toksinlere karşı oluşan immün sistemin zayıflamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (13, 32).

***Clostridium difficile*'nin PATOJENİTESİ**

C. difficile infeksiyonlarının ortaya çıkışında yaşlılık, hastanede yatış ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Antibiyotik tedavisinde özellikle klindamisin, geniş spektrumlu sefalosporin veya florokinolonların kullanılması en önemli risk faktörü olarak bilinmektedir. Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdaki uzaklaştırılırken, kolonda baskın hale geçen *C. difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksinlerini salgılamaktadır (17, 33).

C. difficile infeksiyonlarında temel virulans faktörleri, geniş clostridial sitotoksin ailesinin iki üyesi olan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)'dir. *C. difficile* ince bağırsaklarda bulunan enterocyt hücrelerine yerleşerek toksinlerini üretir. Toksin A bağırsak yangısı ve diareye neden olan enterotoksin olarak rol oynar. Toksin B ise hücre membranı vasıtasıyla sitotoksik etki oluşturur. Bununla birlikte her iki toksinin de potansiyel olarak sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, toksin B'nin sitotoksik etkisinin daha yüksek olup, bağırsakta hasarlara neden olur.

Önceki çalışmalarda toksin A'nın CDİ'nin oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmekteyken, deneysel hayvan çalışmalarında toksin A negatif ve toksin B pozitif *C. difficile* izolatlarının da ciddi bir hastalık tablosu oluşturdukları görülmüştür. Bu çalışmalar toksin B'nin de toksin A gibi, enterotoksin etkisi gösterdiğini ve hastalık oluşumunda esas faktör olduğunu düşündürmüştür. Etkenin toksin üretimi ve bunların genetik düzenlenmesinden, toksin A için "TcdA", toksin B için "TcdB" ve her iki toksinin düzenlenmesinden ise "TcdR" yi kodlayan genleri tanımlanmıştır (13, 34).

Toksin A ve toksin B'nin ikisi de büyük moleküler ağırlıkta (toksin A 308 kDA, toksin B 270 kDA) ve protein yapısındadırlar. Yapılan doku kültürü çalışmalarında toksin B'nin toksin A'ya oranla 1000 kat daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Toksin A intestinal sıvı sekresyonlarını indükleyen, mukus permeabilitesinde artışa ve bağırsak mukozasında yangıya neden olan bir enterotoksindir. Ayrıca epitel hücrelerinin sıkı bağlantılarını çözerek, toksin B'nin girmesine yardımcı olur. Benzer şekilde çalışmalar toksijenik *C. difficile* suşlarının daha ciddi salgınlara neden olduklarını göstermiştir. Ayrıca her iki toksin varlığında, hastalarda şiddetli kolitis tablosu oluşmaktadır (13, 35).

Son zamanlarda *C. difficile*'nin binary toksin olarak adlandırılan üçüncü bir toksini daha tanımlanmış olup, bunun patojenitede yüksek etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. *C. difficile*'nin binary toksin oluşturmasından "tCdtLoc" genomik bölgesi sorumludur. *C. difficile*'nin binary toksin oluşturan suşlarına, hastane orijinli izolatların % 6-12'sinde rastlanılmaktadır. Benzer şekilde binary toksin oluşturan izolatların çiftlik hayvanlarından ziyade, insan orijinli olduğu belirtilmiştir. Ancak binary toksinin *C. difficile* infeksiyonlarındaki rolü henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, doku kültürü çalışmalarında sitotoksik etkisi saptanmıştır. Aynı şekilde tavşanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, etkenin bağırsaklarda oluşturduğu lezyonlar doğrulanmıştır. Ancak hamsterlar üzerinde yapılan çalışmalarda, gerek *C. difficile*'nin gerekse toksinlerinin (toksin A, toksin B) etki göstermediği bildirilmiştir (14, 17, 36).

HASTALIĞIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

C. difficile infeksiyonlarında erken teşhis tedavinin başarılı olmasında en önemli faktördür. Ancak teşhiste zaman zaman güçlüklerle karşılaşmaktadır. Çünkü CDİ'nde klinik bulgular diğer enteritis vakaları ile benzerlik göstermektedir. Ancak klinik bulgular ortalama antibiyotik kullanımından 9 gün, hospitalizasyonu takiben ise 13. günde ortaya çıkmaktadır. Klinik bulgular aşağıda belirtildiği üzere değişkenlik gösterir (15, 37, 38).

Asemptomatik Kolonizasyon

Asemptomatik kolonizasyonda etkenler bağırsağın kolon bölümünde kolonize olurlar ki, bu durumda diare tablosu gözlenmez. Dışkı kültüründe hem etkenler izole edilebilir hem de toksin pozitifdir. Asemptomatik kolonizasyona özellikle hastanelerin yüksek riskli bölümlerinde yatan ve antibiyotik kullanan hastaların % 10-16'sında rastlanılmaktadır.

***Clostridium difficile* Diarezi**

Sıklıkla karın ağrısı ile birlikte hafif veya orta şiddette diare ile kendini göstermektedir. Halsizlik ve ateş nadir de olsa görülebilmektedir. Diare antibiyotik tedavisi esnasında veya kısa bir süre sonra veya birkaç hafta sonra ortaya çıkmaktadır.

Pseudomembranöz Kolitisi

C. difficile kolitisinin klasik tipi olarak bilinmekte olup, ona göre daha ağır seyreder. Hastalarda şiddetli diare ile birlikte sağ veya sol alt karın bölgesinde şiddetli ağrı mevcuttur. Hastaların endoskopik muayenelerinde genellikle kalın bağırsak proksimalinde 2-10 mm çapında, sarı renkli plak artışı şeklinde ve kolorektal mukoza boyunca pseudomembran oluşumları görülebilmektedir.

Rekürrent CDİ

Vankomisin veya metronidazol ile tedavi edilen hastalarda birkaç hafta içinde tekrar diare ve diğer semptomların ortaya çıkması rekürrent CDİ olarak adlandırılır. CDİ bulunan hastaların % 20'sinde hastalık bulguları tekrar ortaya çıkmaktadır. Birinci rekürrentten sonra olguların % 40'ında ikinci rekürrent, ikinci rekürrent oluşan hastaların % 60'ında ise üçüncü rekürrent görülmektedir.

HASTALIĞIN TEŞHİSİ

Doğru, güvenilir ve hızlı teşhis özellikle hastane kaynaklı CDİ'nin kontrol altına alınması ve hasta takibi açısından önemlidir. CDİ'nin tanısı klinik bulgular ve laboratuvar testleri ile yapılmaktadır. Sadece toksin A ve/veya toksin B üreten izolatların hastalık yapma yeteneğinin olmasından dolayı, hastalığın tanısı dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A ve toksin B'nin tespit edilmesine dayanır. Hastanede antibiyotik ile ilişkili diare gelişen hastaların yaklaşık % 30'unda, neden CDİ olduğu için eğer uygun tanı testleri varsa, tanı testi yapmadan tedavi uygulanması uygun değildir. Hastaların 36 saat içerisinde en az 6 kez sulu diare ile 48 saat içinde 8'in üzerinde şekilsiz diare veya 2 gün içinde günde 3 kez şekilsiz diare vakası, CDİ'ni akla getirir (14, 37).

Hücre kültürü sitotoksisite yöntemi ve toksijenik kültür CDİ'nin tanısında referans yöntemler olarak bilinmektedir. Ancak her iki yöntem de, uzun zaman almakta ve uzman teknik personel ile özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Bu yüzden de çoğu laboratuvar, duyarlılığı düşük olmasına rağmen bunların yerine glutamat dehidrojenaz (GDH) ve toksinleri tespit eden enzim temelli immunolojik yöntemleri tercih etmektedir. Son dönemlerde ise daha güvenli olan moleküler yöntemler (RT-PCR, PCR) kullanılmaktadır (18).

***C. difficile*'nin GIDALARDA BULUNUŞU**

C. difficile toprakta, suda, insan ve hayvan dışkıyla değişik gıdalarda olmak üzere pek çok alanda bulunmaktadır. Mikroorganizmanın insana geçişi oral-fekal yol ile olur. *C. difficile* sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan, doğada yaygın olarak bulunur ve infeksiyon için sürekli rezerv oluşturur. Yapılan çalışmalarda *C. difficile* hayvansal orijinli (et ve süt ürünleri) gıdaların yanı sıra deniz ürünleri, değişik salata çeşitleri ile sebzelerde de yüksek oranda izole edilmiştir (1). *C. difficile*'ye bağlı diare olaylarında artış yaşanması, araştırmacıları bu etkenin gıda kaynaklı bir zoonoz etken olacağına dair çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Günümüzde bu konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yer almakla beraber, hayvan ve hayvansal orijinli gıdaların bu bakterinin rezervuarı olabileceğini düşündürmektedir (4, 32).

C. difficile'nin perakende olarak satılan hayvansal gıdalardan tanıya edilmesi, CDİ'nde gıdaların potansiyel olarak rol oynadığını gösterir niteliktedir. Kontaminasyonda canlı hayvan rezervuarlarının yanı sıra çevre ve hayvansal gıdalarında kaynak oluşturabileceğine yönelik çalışmalar yapılmıştır (4, 9).

C. difficile'nin genç ruminantlarda yayılmasının yanı sıra, yetişkin ruminantlarda da yaygınlık gösterdiği bu nedenle güvenli süt üretimi için potansiyel risk oluşturabileceği bildirilmektedir. Ancak bugüne kadar çiğ süttten kaynaklanan bir kontaminasyon bildirilmemiştir. Bu nedenle, infeksiyon kaynağı olarak çiğ sütün rolü belirsizliğini sürdürmektedir. Ancak süt üretim zincirinde çiftlik sütlerinde diğer *Clostridium* türlerinin tespit edilmiş olması, sütlerin *C. difficile* ile kontamine olabileceklerini mümkün kılmaktadır (39).

Weese ve ark. (28) Kanada'da yaptıkları çalışmada, marketlerden temin edilen 230 adet sığır (115 adet) ve domuz eti (115 adet) örneklerinde *C. difficile*'nin hem sığır hem de domuz eti örneklerinde % 12 düzeyinde bulunduğunu saptamışlardır. Kanada'da yapılan başka bir çalışmada (40) ise marketlerden temin edilen 60 adet et örneğinden 12'sinin (% 20) *C. difficile* yönünden pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar çalışmada izole edilen etkene ait 11 adet toksijenik izolattan 8'inin toxinotype 3 olduğunu tespit etmişler ve etlerde kontaminasyonun toplu halde depolama veya paketlenme sırasında oluşabileceğini ifade etmişlerdir.

Aynı araştırmacıların 2009 yılında yaptıkları benzer başka bir çalışmada ise (41) 145 parça et ile 65 dana pirzola etinde *C. difficile* sırasıyla % 6,7 ve 4.6 düzeyinde bulunmuştur. Kanada'da yapılan diğer bir çalışmada ise (42) yerel marketlerden alınan toplam 119 deniz ürünü örneğinin (taze, dondurulmuş, pişirilmiş karides, taze ve dondurulmuş midye, yengeç, somon suşi, taze levrek, kedi balığı, somon, istridye, midye, ahtapot, alabalık) 5'inde *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir,

Songer (43) yaptığı bir çalışmada diareli 600 domuz dışkısına ait örneklerin % 35'inde toksin A ve B yönünden pozitiflik saptadığını belirtmiştir. Araştırmacı ABD'nin Kuzey Karolina bölgesinde yaptığı başka bir çalışmasında ise 32 domuzla ait fekal materyalin % 48'inde *C. difficile* toksin A ve B yönünden pozitiflik belirlemiştir (44). Songer ve ark. (3) tarafından ABD'nin Arizona eyaletinde yapılan diğer bir çalışmada da, incelenen toplam 88 et örneğinin (sığır parça et, koyun parça et ve hindi eti) 37'sinde (% 42) *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca infeksiyonun prevalansında hayvan türlerinin belirleyici bir özelliği olmadığını kaydetmişlerdir. Ayrıca çalışmada izole edilen 25 izolatin ribotip 078, 4'ünün ise ribotip 027 toksintip 3 olduğu tespit edilmiştir. ABD'nin Pensilvanya eyaletinin Pittsburg kentinde yapılan başka bir çalışmada ise 3 kasaptan alınan 102 adet kıyma ve sosis numunelerinde % 2 düzeyinde *C. difficile* izole edildiği belirtilmiş olup, kontaminasyonun etin işlenmesi sırasında olabileceği belirtilmiştir (45).

Boer ve ark. (11) Hollanda'da yaptıkları çalışmada, marketlerde satılan farklı hayvan türlerine ait parçalanmış 500 adet et örneğini *C. difficile* kontaminasyonu yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda 168 adet sığır ve 63 adet domuz eti örneklerinin hiçbirinde etkeni tespit edemediklerini ancak, kuzu eti örneklerinde % 6.3, kanatlı eti örneklerinde ise % 2.7 oranında etkeni izole ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar kontaminasyonun ya çevresel faktörlerden ya da çalışanların ellerinden olabileceğini belirtmişler ve *C. difficile*'nin sporlarının üremesi için hayvanların ve gıdaların en uygun ortamı oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Benzer şekilde Hopman ve ark. (46) tarafından Hollanda'da yapılan başka bir çalışmada, farklı domuz kesimhanelerinde domuzlardan alınan 50 adet rektal fekal örneklerden 14'ünün (% 28) pozitif bulunduğu ve izolatların yoğunlukla 015 PCR ribotip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca tüm izolatların toksin A ve toksin B yönünden pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Keessen ve ark. (47) tarafından Hollanda'da yapılan diğer çalışmada da, domuz kesimhanelerinde domuzlardan alınan 677 dışkı örneklerinden % 8.6'sının *C. difficile* yönünden pozitif olduğu ve izolatlardan % 31'nin ise 078 ribotip olduğu belirtilmiştir.

İsveç'te yapılan çalışmada (48) ise 82 et örneğinin 2'sinde (% 2.4) *C. difficile* izole edildiği ve her 2 izolatta hem toksin A hem de toksin B ürettiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar pozitif örneklerin sığır kıyma numunelerine ait olup, domuz eti, hamburger, koyun ve kanatlı eti örneklerinde ise etkeni izole edemediklerini belirtmişlerdir. İskoçya'da yapılan çalışmada (1) ise *C. difficile* yönünden incelenen 40 salata örneğinden 3'ünün (% 7.5) pozitif bulunduğu belirtilmiştir.

Pasquale ve ark. (49) tarafından İtalya'da yapılan çalışmada, yenilebilir yumuşakça örnekleri *C. difficile* yönünden incelenmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında inceledikleri 53 örneğin % 49'unun pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolatlardan 16'sının bilinen (001, 002, 003, 010, 012, 014/020, 018, 045, 070, 078, 106 ve 126) ribotipler olduğunu, 10 izolatin ise yeni tanımlanan izolatlardan olduğunu belirtmişlerdir.

Jöbstl ve ark. (2) tarafından Avusturya'da yapılan çalışmada, marketlerden alınan 100 adet parça et ile 50 adet çiğ süt örneği *C. difficile* varlığı yönünden incelemiş olup, sadece 3 et örneği pozitif bulunurken, çiğ süt örneklerinde etken izole edilememiştir. Araştırmacılar pozitif bulunan 3 örneğe ait izolatların ise insan orijinli olduğunu belirtmişlerdir. Yine Knight ve Riley (50) tarafından Avustralya'daki koyun ve kuzulardan alınan 371 adet rektal fekal örneklerden, ortalama % 4'ünün *C. difficile* yönünden pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar ayrıca izolatların bilinen 056, 101 ve 137 ribotipler olduğunu tespit etmişlerdir.

Esfandiari ve ark. (51) tarafından İran'da bir Hamburger işletmesinden alınan (katkı maddeleri, alet ve ekipman, son ürün) toplam 211 örneğin 9'unun *C. difficile* yönünden pozitif bulunduğu ve izolatların tümü toksin B yönünden pozitif bulunurken, 7'sinin ise toksin A yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Yine Simango ve Mwakurudza (52) tarafından Zimbabve'de yapılan bir çalışmada, 100 adet broyler piliçlerden alınan 100 adet dışkı örneğinden 29'unun *C. difficile* yönünden pozitif bulunduğu ve izolatlardan % 89.7'sinin toksijenik özellikte olduğu rapor edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

C. difficile'ye bağlı diare olguları günümüzde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın ortaya çıkışında bir çok risk faktörü (yaşlılık, antibiyotik kullanımı, hastanede yatış v.b) ile birlikte hijyen uygulamalarının eksikliği etkili faktörler arasında gösterilmektedir. Etkenin vejetatif formları dezenfektanlara duyarlı olmasına karşın, spor formları dirençli olup çevrede uzun süre canlılığını muhafaza edebilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çiftlik ve pet hayvanlarının bağırsak florasında etkeninin sıklıkla tespit edilmesi, insanlarda görülen *C. difficile*'ye bağlı infeksiyonların oluşumunda bu canlıların rezervuar olabileceği görüşünü ortaya koymuştur. *C. difficile*'nin gıdalarda bulunuşu üzerine yapılan çalışmalarda etkenler kasaplık hayvan etlerinde, salatalarda, deniz ürünlerinde ve sularda tespit edilmiş ve bunların infeksiyonun yayılmasında kaynak oluşturabileceği bildirilmiştir.

İnsanlarda görülen *C. difficile* infeksiyonlarının oluşumunda, gıdaların rolü henüz epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konulmamıştır. Ancak *C. difficile*'nin spor formlarının üremesi için en uygun ortamın hayvanlar ile gıdaların olduğu belirtilmiş olup, aynı zamanda gıda temininin kontaminasyonlarda rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Bu nedenle *C. difficile* infeksiyonlarının oluşumunda gıdaların rolünün ortaya konulması açısından, epidemiyolojik çalışmaların yapılması halk sağlığı ve gıda güvenliği yönünden önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- 1-Bakri, M.M., Brown, D.J., Butcher, J.P., Sutherland, A. D. 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emer. Infect. Dis. 15, 817-819.
- 2-Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Köfer J., Wagner, M. 2010. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 138, 172-175.
- 3-Songer, J.G., Trinh, H.T., Killgore, G.E., Thompson, A.D., McDonald, L.C., Limbago, B.M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, Emerg. Infect. Dis.15, 819-821.
- 4-Weese, J.S. 2010. *Clostridium difficile* in food—innocent bystander or serious threat? Clin. Microbiol. Infect. 16, 3-10.
- 5-Depestel, D.D., Aronoff, D.M. 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. J. Pharm. Pract. 26, 464-475.
- 6- Heinlen, L., Ballard, J.D. 2010. *Clostridium difficile* infection. Am J Med Sci. 340, 247-252.
- 7- Hall. I., O'Toole E.1935. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am. J. Dis. Child. 49, 390-402.
- 8- Lung, E. 2003. Acute diarrheal diseases, In: Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. 131-150.
- 9- Gould L.H., Limbago, B. 2010. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A New Foodborne Pathogen? Centers for Disease Control and Prevention. 51, 583–584.
- 10- Delmée, M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin. Microbiol. Infect. 7, 411-416.
- 11- Boer, E.De., Zwartkruis-Nahuis, A., Heuvelink, A.E., Harmanus, C., Kuijper, E.J. 2011. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. Int. J. Food Microbiol. 144, 561-564.
- 12- Summanen, P., Baron, E.J., Citron, D.M. 1995. Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology. 5, 95-101.
- 13- Deneve C., Janoir C., Poilane I., Fantinato C., Collignon A. 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. Int. J. Antimicrobial Agents. 33, 24-28.
- 14-McFee, R.B., Abdelsayed, G.G. 2009. *Clostridium difficile*. Disease-a-Month. 55, 439-70.
- 15-Stanley, J.D., Bartlett, J.G., Dart, B.W., Ashcraft, J.H. 2013. *Clostridium difficile* infection. Current Problems in Surgery. 50, 302-337
- 16-O'Connor, J.R, Johnson S, Gerding D.N. 2009. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic B1/NAP1/027 strain. Gastroenterology. 136, 1913-24.

- 17-Kuijpers, E.J, Surawicz C.M. 2008. *Clostridium difficile* infection. Lancet. 371, 1486-1488.
- 18-Schroeder M.S. 2005. *Clostridium difficile*–associated diarrhea kaiser permanente, fontana, California. Am. Fam. Physician. 71, 921-928.
- 19- Leffler, D.A., J. Lamont, T. 2009. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. Gastroenterology. 136, 1899–1912.
- 20- Gravel, D., Miller, M., Simor, A., Taylor, G., Gardam, M., McGeer, A., Hutchinson, J., Moore, D., Kelly, S., Boyd, D., Mulvey, M. 2009. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: A Canadian nosocomial infection surveillance program study. Clin. Infect. Diseases, 48, 568-576.
- 21- Ananthakrishnan, A. N. 2011. *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, risk factors and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 8, 17-26.
- 22- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmee, M., Brazier, J., Kuijper, E., Poxton, I. European Study Group On *Clostridium difficile* (ESGCD). 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin. Microbiol. Infect. 13, 1048-1057.
- 23- Freeman, J., Bauer, M.P., Baines, SD. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin. Microbiol. Rev. 23, 529-549.
- 24-Cohen, SH., Gerding, DN., Johnson, S. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 31, 431-455.
- 25-Kuijper, E.J., Coignard, B., Brazier, J.S., Suetens, C., Drudy, D., Wiuff, C., Pituch, H., Reichert, P., Schneider, F., Widmer, A.F., Olsen, K.E., Allerberger, F., Notermans, D.W., Barbut, F., Delmée, M., Wilcox, M., Pearson, A., Patel, B.C., Brown, D.J., Frei, R., Akerlund, T., Poxton, I.R., Tüll, P. 2007. Update of *Clostridium difficile* associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro Surveill. 12, E1-2.
- 26- Jalali, M., Khorvash, F., Warriner, K., Weese, J.S. 2012. *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. BMC Res Notes. 21, 159.
- 27-Kim, J., Kang, J.O., Kim, H. 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in a tertiary-care hospital in Korea. Clin. Microbiol. Infect. 19, 521-527.
- 28-Weese, J.S., Avery, B.P., Rousseau, J., Reid-Smith, R.J. 2009. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5009-5011.
- 29-Arroyo, L.G., Kruth, S.A., Willey, B.M., Staempfli, H.R., Low, D.E., Weese, J.S. 2005. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J. Med. Microbiol. 54, 163–166.
- 30-Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, J.S., Songer, J.G.. 2007. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. J. Clin. Microbiol. 45, 1963-1964.
- 31- Bignardi, G. E. 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J. Hospital Infect. 40, 1 -15.

- 32-Rupnik, M. 2007. Is *Clostridium difficile* associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? Clin. Microbiol. Infec. 13, 457-459
- 33-Borriello, SP. 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrobiol. Chemother. 41, 21-27.
- 34- Fekety, R.M.D. 1997. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Am. Coll. Gastroenterology. 92, 9205-9207.
- 35- Poutanen, S.M., Simor, A.E. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Can Med. Assoc. J. 171, 51-58.
- 36-Kılıç, A. 2013. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, Risk Faktörleri, Patogenez, Klinik Özellikler, Tanı ve Tedavi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- 37- Sunenshine, R.H., Mcdonald, M.D. 2006. *Clostridium difficile*-associated disease: New challenges from an established pathogen. Cleveland Clin. J. Med. 73, 186-197.
- 38- Kazanowski, M., Smorlarek, S., Kinnarney, F., Grzebienak, Z. 2014. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities- A systematic review. Tech. Coloproctol. 18, 223-232.
- 39- Julien, M.C., Dion, P., Lafrenière, C., Antoun, H., Drouin, P. 2008. Sources of *Clostridia* in raw milk on farms. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6348–6357.
- 40- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H.R., Duffield, T., Weese, J.S. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerg. Infect. Dis. 13, 485-487.
- 41- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R.J., Staempfli, H.R. 2009. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. Emerg. Infect. Dis. 15, 802-805.
- 42- Metcalf, D., Avery, B.P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., Weese, J.S. 2011. *Clostridium difficile* in seafood and fish. Anaerob. 17, 85-86.
- 43-Songer, J.G. 2004. The Emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. Anim. Health. Res. Rev. 5, 321-326.
- 44- Songer J.G, Anderson M.A. 2006. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. Anaerobe. 12, 1–4.
- 45-Scott, R., Marsh, W.J., Schlackman, L.J., Harrison, L.H. 2012. Prevalence of *Clostridium difficile* in uncooked ground meat products from Pittsburg, Pennsylvania. Appl. Environ. Microbiol. 78, 4183-4186.
- 46-Hopman, N. E., Oorburg, D., Sanders, I., Kuijper, E. J., Lipman, L. J. 2011. High occurrence of various *Clostridium difficile* PCR ribotypes in pigs arriving at the slaughterhouse. Vet. Q. 31, 179-181.
- 47-Keessen, E.C., Van Den Berkt, A. J., Haasjes, N.H., Hermanus, C., Kuijper, E.J., Lipman, L.J. 2011. The relation between farm specific factors and prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs. Vet. Microbiol. 154, 130-134.
- 48-Abercron, S.M., Karlsson, F., Wigh, G.T, Wierup, M., Krovacek, K. 2009. Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. J. Food. Prot. 72,1732-1734.

49-Pasquale, V., Romano, V., Rupnik, M., Capuano, F., Bove, D., Aliberti, F., Krovacek, K., Dumonted, S. 2012. Occurance of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscus. Food Microbiol. 31, 309-312.

50-Knight, D.R., Riley, T.V. 2013. Prevalence of gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in Australian sheep and lambs. Appl. Environ. Microbiol. 79, 5689-5692.

51-Esfandiari, Z., Weese, S., Ezzatpanah, H., Jalali, M., Chamani, M. 2014. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. BMC Microbiol. 14, 283.

52-Simango, C., Mwakurudza, S. 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int. J. Food Microbiol. 124, 268-270.