

***Clostridium difficile* ve Gıda Güvenliği Açısından Önemi**

Fatma Yıldız¹ , Ali Gücükoğlu¹

Özet

Clostridium difficile, insanlar için patojen olan, ekzotoksin üreten gram pozitif, sporlu, zorunlu anaerob basildir. *C. difficile*, ilk kez yenidoğanların bağırsak florasından tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. difficile*'nin hayvanlarda, hayvansal ürünlerde, sebzelerde ve çevrede (sularda, toprakta) tespit edilmesi, insanlarda enfeksiyonun oluşmasında değişik kontaminasyon kaynaklarının olabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda etkenin farklı suşları tespit edilmiş ve özellikle hayvanlarda bulunan izolatların insan izolatlarıyla benzerliği konusuna değinilmiştir. Etkenin hayvanlarda ve hayvansal kaynaklı ürünlerde bulunurluğu *C. difficile*'nin gıda kaynaklı bir zoonoz olabileceğini gündeme getirmiştir.

GİRİŞ

1935 yılında ilk kez Hall ve O'Toole tarafından sağlıklı yenidoğanların bağırsak florasında saptanmış ve normal bağırsak florasının etkeni olarak kabul edilmiştir. Kültüre edilmesi oldukça zor olduğundan bu bakteriye güç (difficult) anlamında "*Clostridium difficile*" adı verilmiştir. 1960 ve 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarda güçlü ekzotoksinleri belirlenip, psödomembranöz enterekolit ile ilişkisi saptanmış, sonrasında antibiyotiğe bağlı ishale yol açan en önemli etken olarak tanımlanmıştır (1, 2). *C. difficile*, anaerob, oval subterminal sporlu, peritrik flagellelari ile hareketli, kapsülsüz, 0.5-2 µm eninde, 3-17 µm boyunda, ince, uzun, düz gram pozitif bir basildir (3).

Uygun besiyerlerinde 48 saat inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında S tipi koloniler oluşturmaktadır. Oluşan bu koloniler, 360 nm'lik ultraviyole (UV) ışığı altında incelendiğinde açık görünümünde oldukları tespit edilmiştir (3, 4). Pepton-maya özütü-glikoz içeren besiyerinde asetik, izobutirik, butirik, valerik, izovalerik, izokaproik, formik, laktik asitler üretir ve trozini para-kresole çevirebilir. Bunun sonucu olarak besiyerinde spesifik cresol kokusu (at veya fil gübresine benzer) oluşur ve bu ayırt edici bir özellik kabul edilir (3, 5, 6). Çevresel ve klinik örneklerdeki bakterinin izolasyonunda değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunların temelini etkenin sporlu formunun vejetatif formuna dönüştürülmesi oluşturmaktadır (4, 7, 8).

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AbD
Kurupelit-Samsun. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: aligucuk77@hotmail.com

VİRÜLENS FAKTÖRLERİ ve TOKSİN ÖZELLİKLERİ

Virülens faktörlerinin başında enterotoksik etkili toksin A ve sitotoksik etkili toksin B gelmektedir. Etkenin nonpatojenik suşlarında bulunmaktadır. İnsan bağırsak hücrelerine bağlanmasını kolaylaştıran adezin faktör, hiyalüronidaz ve spor oluşturmaları da virulensde rolü olan diğer faktörler arasında gösterilmektedir.

Toksinler özellikle logaritmik fazın sonu ile durgunluk fazın başında oluşmakla beraber sporülasyon sırasında toksin üretimi gerçekleşmez. Bununla beraber toksin oluşumu üzerine ısı, glikoz, aminoasit konsantrasyonu ve biyotin varlığının etkili olduğu bildirilmektedir (10, 11). Her iki toksin benzer etkilere sahip olmakla beraber yapısal olarak homoloji gösterirler. Bununla beraber patolojik olarak toksin B, toksin A'ya kıyasla 1000 kez daha güçlü bulunmuştur ve 100 kat daha aktif bir enzimatik aktiviteye sahiptir. Toksin A'nın toksin B'den önemli bir farkı bağırsakta sıvı salınımını arttırabilmesidir (12). Toksin A'nın molekül ağırlığını 308 kDa, toksin B'ninkini ise 270 kDa olarak belirlenmiştir (13).

Toksinler karboksil ucunda devamlı tekrar eden üniteler içerir. Toksin A ve toksin B'nin karboksi terminal bölgeleri benzer glikoziltransferaz aktivitesine sahiptir. Toksin A, hücrenin karbonhidrat reseptörlerine bağlanarak etki ederken, toksin B'nin reseptörleri henüz belirlenememiştir. Ayrıca, toksin A'nın nonspesifik monoklonal antikorlara da FAB (Fragment antigen binding-Antijen bağlayan kısım) kısımlarından bağlanabildiği gösterilmiştir (11). Yenidoğanlarda bakteri ve toksin varlığı yüksek oranlarda saptanırken, hastalık bulgularının olmayışı reseptörlerin yeterince gelişmemesi, kolostrumun olası koruyucu etkisi ya da reseptörleri örten ince bir tabaka varlığı ile açıklanmaktadır (14). Bu toksinlerin sitotoksik aktiviteleri ve buna karşı gelişen inflamatuvar yanıt, *C.difficile* ile ilişkili ishalin histopatolojisini oluşturmaktadır. Toksinlerin hücre membranındaki reseptörlere bağlanması toksik etkiyi oluşturur. *C.difficile* kökenlerinin yaklaşık % 25'i toksin üretmemektedir ve dolayısıyla bu özellikteki etkenin ishal ve kolite neden olmadığı ifade edilmektedir (15, 16).

Toksin A ve toksin B sırasıyla *tcdA* ve *tcdB* tarafından kodlanır. Bazı *C.difficile* suşları, ek olarak *cdtA* (enzimatik komponent) ve *cdtB* (binding komponent) kompleksinden eksprese edilen "*Clostridium difficile* binary toksini" (CDT) de içermektedir. Binary toksin (ADP-riboziltransferaz, CDT) *cdtA* ve *cdtB* genleriyle kodlanan, çok az üretilen, aktive olmak için tripsine ihtiyaç duyan ve toksin B gibi hücrelerde ölüme neden olan farklı bir suştur (17, 18). Toksin üretiminden sorumlu genler uzun bir genetik dizi üzerinde sıralanmıştır. Bu dizide ayrıca toksinlerin fonksiyonlarını düzenleyen 3 farklı bölge daha tanımlanmıştır: txeR(I), txe2, txe3. TxeR ve txe2 pozitif regülasyon oluşturup toksin yapımını arttırırken, txe3 toksin genlerinin negatif regülasyonundan sorumlu tutulmaktadır (12). Bu genler ve fonksiyonel bölgeler birlikte (*tcdC*, *tcdD*, *tcdE*) patojen suşlarda bulunan ve kısa bir kromozal segment olan PaLoc (pathogenicity locus) kompleksinin bir parçasını oluşturmaktadır (19). Bu bölgedeki farklı mutasyonlarla varyant suşları saptamak ve en az 20 farklı toksinotip (I-XX) tanımlamak olasıdır (20).

ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ

Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler sadece patojen bakterileri değil normal flora bakterilerini de etkiler, endojen mikroflorayı bozarak süperenfeksiyonlara neden olabilirler. Antibiyotik kullanımının bağırsak florasına yaptığı etki, ilaç kesildikten sonraki 6. haftaya kadar sürebilmekte, bu süre içinde *C.difficile*'ye bağlı ishaller ortaya çıkabilmektedir (6). Yapılan çalışmalarda *C.difficile*'ye bağlı ishale sebep olan antibiyotikler enfeksiyon oluşturma sıklıklarına göre sınıflandırılmışlardır.

Sınıflandırmaya göre; sıklıkla enfeksiyona sebep olanlar; ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin, linkomisin, metronidazol, seyrek olarak enfeksiyon oluşturanlar; kloramfenikol, eritromisin, imipenem, aminopenisilinler dışındaki penisilinler, çok seyrek enfeksiyon oluşturanlar ise; antimikrobiyaller (basitrasin, aminoglikozitler, kinolonlar, rifampisin, trimetoprim sulfametoksazol, tetrasiklin, vankomisin, amfoterisin B, aztreonam, asiklovir) ve antineoplastikler (sisplatin, siklofosfatamid, metotreksat, doksorubisin) olarak belirlenmiştir (21).

Son yıllarda küçük değişiklikler yapılmakla beraber, metronidazol veya vankomisin *C.difficile* enfeksiyonlarının standart tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Her iki antibiyotiğin eşit etkiye sahip olduğu, bununla beraber tedavide metronidazolun kullanılması sırasında klinik yanıtızlıklar söz konusu olduğu bildirilmektedir. Palaez ve ark., ilki 1994 yılında yapılan iki farklı çalışmada %6 ile %9 oranında metronidazole dirençli bakteri saptamışlardır. (22) İsrail'de yapılan bir çalışmada ise %2 oranında direnç bildirilmiştir (23). İlk yüksek vankomisin MIK düzeyine sahip *C.difficile* ise 1996'da tanımlanmıştır (24). Pelaez ve ark. tarafından 2002'de yapılan çalışma da ise %3.1 oranında azalmış duyarlılık oranı bildirilmiştir (22). O zamandan günümüze azalmış duyarlılığa sahip izolat sayısında yavaş ama gittikçe yükselen bir artış söz konusudur. İngiltere'de Mutlu ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada, MIK değeri 4mg/L olan suşların 1999-2000 yıllarında %2,7 iken, 2005 yılında %21,6'ya yükseldiğini göstermişlerdir (25).

Diğer antibiyotiklere direnç ülkelere göre farklılık göstermekle beraber değişik oranlarda bildirilmiştir. En fazla direnç klindamisin-eritromisin grubunda görülmekte ve yıllar içinde giderek artmaktadır. Klindamisine direnç, Almanya'da 2003 yılında %36 iken 2007 yılında %65, İsveç'te 2006 yılında %43,7 iken 2009 yılında %65, Kanada'da 2006 yılında %14,7 iken 2008 yılında %90,9 bulunmuştur (21, 26). Çin'de 2007 yılında yapılmış olan bir yıllık çalışmada ise klindamisine %71,4 oranında direnç saptanmıştır (21).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE ENFEKSİYONLARI

C.difficile enfeksiyonları, öncelikle hafif ishal ve karın ağrısıyla başlayıp toksik megakolona kadar giden gastrointestinal enfeksiyonları başta olmak üzere diğer sistemleri de etkileyerek bakteremi-sepsis sendromu, karaciğer, dalak ve pankreas apseleri, peritonit ve kemik-eklem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlarında oluşmasında rol oynamaktadır. Hastalık insanlarda klinik olarak 1- Asemptomatik taşıyıcılık, 2- Psödomembransız kolit, 3- Psödomembranlı kolit (PMK) ve 4- Fulminant kolik/toksik megakolon formlarından biri ile seyrettiği bildirilmektedir (27).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE ve GIDA GÜVENLİĞİ AÇISINDAN ÖNEMİ

C. difficile; toprakta, gaita da gıdalarda ve deniz ürünleri olmak üzere pek çok alanda bulunmaktadır. Mikroorganizmanın insana geçişi oral-fekal yol ile olur. *C.difficile* sporları olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olduğundan çevrede yaygın olarak bulunur ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturur. Yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı (et ve süt ürünleri) gıdalara ek olarak salata ve sebzelerde de yüksek oranda izole edilmiştir. Deniz ürünleri ve balıklarda da tespiti söz konusudur (28).

C.difficile'ye bağlı ishal olaylarında artış yaşanması, araştırmacıları bu etkenin gıda kaynaklı zoonoz olacağına dair çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Günümüzde bu konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yer almakla beraber hayvanların ve hayvansal kaynaklı gıdaların bu bakterinin rezervuarı olabileceği düşünülmektedir. Son yapılan çalışmalarda *C.difficile*'nin hayvansal gıdalarda ve perakende olarak satılan etlerde identifiye edilmesi, *C.difficile* kaynaklı bakteri enfeksiyonlarında gıdaların potansiyel olarak rol oynadığını gösterir niteliktedir. Kontaminasyonda canlı hayvan rezervuarlarının yanı sıra çevre ve hayvansal gıdalarında kaynak oluşturabileceğine yönelik çalışmalar yapılmıştır. 2003 yılından bu yana Kuzey Amerika ve Avrupa da *C.difficile* etkenine bağlı ishal salgınlarının hızla ortaya çıkışı ve mortalitenin artışı sonucu etkeni izole etmek için çeşitli metodlar kullanılmış ve bunların neticesinde *C.difficile* PCR Ribotip 027 (CD027) suşu ortaya çıkmıştır (29).

2008 yılında 16 Avrupa ülkesinde *C.difficile* PCR Ribotip 027 kaynaklı vakalar ortaya çıktığı kaydedilmiştir. Bunların içinde 9 ülkede (İngiltere, Hollanda, Belçika, Fransa, İrlanda, Lüksemburg, İsviçre, Almanya ve Finlandiya) enfeksiyon salgınları şeklinde seyrederken 7 ülkede ise (Avustralya, Norveç, Danimarka, İsveç, Norveç, Hindistan, Polonya, İspanya) sporadik şekilde seyrettiği tespit edilmiştir (30).

Hayvan ve insan orijinli *C.difficile* izolatlarının genotipik varyasyon benzerliğini ortaya koymaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Weese ve ark. ile Songer ve arkadaşları 2009'da yaptıkları çalışmalar da, et örneklerinden izole ettikleri *C. difficile* izolatlarının genotipik yapısının insan izolatlarıyla büyük ölçüde benzerlik taşıdığını ifade etmişlerdir (31, 32). Arroya ve ark. (2005), at, köpek ve insan izolatları arasındaki benzerliği belirlemeye yönelik yaptığı çalışmalarında 20 insan izolatının 4'ü ile 92 köpek izolatının 58'i ve 21 at izolatının 5'inin arasında benzerlik olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmada insana ait izolatlarını çoğunluğunun (%15) sadece insana özgü olan 5 farklı PCR ribotip içerdiğini belirlemişlerdir (33).

Keel ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada, Kuzey Amerika da bulunan sığır, köpek, at ve domuz izolatlarını insan izolatlarıyla karşılaştırmıştır. Çalışmada domuz ve sığır izolatlarından PCR ribotip (078) predominant olarak bulunmuş ve sığır izolatları içinde %94'lük, domuz izolatları içinde ise , %83'lük bir kısmı oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 6 PCR ribotipinin insan ve atlarda ortak, 3 PCR ribotipinin ise insan ve domuzlarda ortak olarak tespit edilmiştir (34). 2004 yılında Songer yaptığı çalışmada enteritli 600 domuz dışkısında %35 oranında toksin A ve B yönünden pozitiflik saptamıştır. Araştırmacının Kuzey Carolina da yaptığı başka bir çalışmada, 32 domuzun fekal metaryelleri incelemiş ve %48 oranında *C. difficile* toksin A ve B yönünden pozitiflik belirlemiştir (31).

C. difficile' ye bağılı ishal olgularının görüldüğü domuz sürülerindeki mortalitenin %16 ile %20 arasında olduğı yapılan çalışmalarla kaydedilmiştir (31, 35). Ayrıca domuz sürülerinde doğum sonrası görülen MMA sendromunu (Mastitis-Metritis-Agalaksiya) tedavi etmek amacıyla yapılan antibiyotik tedavisinin devamında diğı domuzlarda *C.difficile*'ye bağılı ishal geliştiğı ve mortalitenin %13-16 olduğı kaydedilmiştir (36, 37).

Weese ve ark. (2009) Kanada'da perakende olarak satılan parçalanmış domuz ve sığır etlerinde *C.difficile* kontaminasyonunu belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada; toplam 230 örnekten 28 inde *C. difficile* izole etmişlerdir. Bu örneklerin içinde 14/115 (%12)' lik kısmını parça sığır eti, 14/115 (%12)' lik kısmını da parça domuz eti oluşturmaktadır. *C.difficile* izole edilen domuz eti örneklerinden 10/14 (%71)'lik kısım zenginleştirilmiş kültürle tespit edilirken 4/ 14 (%28)' lük kısım direkt kültür yapılarak izole edilmiştir. Sığır etlerinde ise 14/15 (93)' lük kısmı sadece zenginleştirme yöntemiyle elde edilirken 4/ 14 (%28)' lük kısım direkt kültür yapılarak izole edilmiştir. Zenginleştirme yöntemiyle pozitif olarak saptanan örneklerde etkenin spor formlarının sayısı oldukça düşükken, direkt plak yöntemiyle pozitiflik saptanan örneklerde 20-240 spor/g arası spor formuna rastlanmıştır (32).

Jöbstl ve ark. (2010), Avustralya'da yaptıkları çalışmada yerel marketlerden aldıkları 100 parça et ve 50 çiğ süt örneğini *C. difficile* varlığı yönünden incelemişler ve 3 parça et örneğinde etken varlığını saptarlarken çiğ süt örneklerinde etkeni izole edememişlerdir. Etkeni izole ettikleri 3 örnek içinde insan suşunu (Human PCR ribotip) tanımlamışlar ancak 028 ve 027 suşuna rastlamamışlardır (38). Bakri ve ark. (2009), İskoçya'nın Glaskow şehrinde yerel marketlerde satılan hazır salata ürünlerinden alınan 40 numuneyi analiz etmişler ve bunların içinde 3 salata örneğini (%7,5) *C. difficile* yönünden pozitif bulmuşlardır (39). Rodriguez-Palacios ve ark. (2007) Kanada'da perakende olarak yerel marketlerde satılan et ürünlerinde *C.difficile* kontaminasyonunu değerlendirmiş ve alınan 60 et örneğinin 12'sinde (%20) etken saptanmış ve etkene ait 11 toksijenik izolat belirlenmişlerdir. Bu toksijenik izolatların 8'inin toxintype 3 olduğı belirtilmiştir. Kontaminasyonun etlerin toplu halde depolama ve paketlenme esnasında oluşabileceğini ifade etmişlerdir. Aynı araştırmacıların 2009 yılında yaptıkları benzer çalışmada 149 parça et ve 65 dana pirzola etinde sırasıyla %6,7 (10/145) ve %4,6 (3/65) oranında *C. difficile* saptamışlar ve elde ettikleri 13 örneğin 10'unda toksijenik yapıyı kaydetmişlerdir (40, 41).

Songer ve ark. (2009), Arizona'da yaptıkları çalışma da toplam 88 et örneğinin (sığır parça et, koyun parça et ve hindi eti) 37'sinde (%42) *C. difficile* saptamışlardır. Et türlerinin enfeksiyonun prevalansında belirleyici bir özellik olmadığını kaydetmişlerdir. 25 izolatta PCR Ribotip 078; 4 örnekte PCR ribotip 027 toxintype 3 tespit edilmiştir (42).

Kanada'da yerel marketlerden alınan toplam 119 deniz ürünü örneğinin (taze, dondurulmuş, pişirilmiş karides, taze ve dondurulmuş midye, yengeç, somon suşu, taze levrek, kedi balığı, somon, istridye, midye, ahtapot, alabalık) 5'inde *C.difficile* izole edilmiştir (43).

Boer ve ark., (2011), Hollanda'da marketlerde satılan farklı hayvan türlerine ait parçalanmış 500 adet çeşitli hayvan türlerine ait et örneğini *C.difficile* kontaminasyonu yönünden incelemişler ve 168 sığır, 63 domuz et örneğinin

hiçbirinde etken tespit edilemezken, kuzu et örneklerinde %6,3, kanatlı et örneklerinde ise %2,7 oranında etkeni izole etmişlerdir. Toplamda 500 örnek içinde %1,6'lık bir pozitif örnek yüzdesi tespit etmişlerdir (44).

SONUÇ

C. difficile'ye bağlı ishal olguları günümüzde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Oluşumunda antibiyotik kullanımı sonucu bozulan intestinal flora ve hijyen uygulamalarının eksikliği etkili olan başlıca faktörler arasında gösterilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda pet ve çiftlik hayvanlarının gastrointestinal sisteminde etkeninin sıklıkla tespit edilmesi, insanlarda görülen *C. difficile*'ye bağlı ishallerin oluşmasında bu canlıların rezervuar olabileceğini görüşünü ortaya koymuştur. *C. difficile*'nin gıdalarda bulunmasına yönelik henüz yeterli veri bulunmamakla beraber yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı gıdalarda özellikle yerel marketlerde perakende olarak satılan etlerde, salatalarda, deniz ürünlerinde ve sulara etken tespit edilmiş ve bunların enfeksiyonun yayılmasında kaynak oluşturabileceğinin olasılığı üzerinde durulmuştur. Etkenin kontrol altına alınmasında çevre, gıda ve personel hijyenine dikkat edilmelidir. Etkenin vejetatif formları dezenfektan vb. maddelerle elimine edilebilse dahi spor formları oldukça dayanıklı olduğundan çevrede uzun süre canlı kalabilmekte ve enfeksiyon için daimi kaynak oluşturabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pothoulakis C, LaMont JT. (1993). *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. 22:623-637. Gastroenterol Clinic, North America.
2. Allen Sd, Emery Cl, Lysterly. (2003). *Clostridium*. Manual Of Clinical Microbiology, 835-856. Asm pres. Washington.
3. Bilgehan H (edt). (1994). Gram pozitif sporlu basiller. Klinik Mikrobiyoloji. 8. Baskı, 282-311. Fakülteler Kitabevi. İzmir.
4. Ondedonk A. B. , Allen S. D. (eds). (1995). *Clostridium*. Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition, 574-586. Washington.
5. Summanen P, Baron EJ, Citron DM. (1995). Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manuel. 5. Ed, 95-101. Star Publishing Company. California.
6. Akan E. *Clostridium difficile*. (1993). Tıbbi Mikrobiyoloji. 2.Baskı, 1993; 286-289. Saray Medikal Yayıncılık. İzmir.
7. Knoop F.C. , Owens M., Crocker I.C.(eds). (1993). *C.difficile* clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev, 6 (3) : 251-265.
8. Kıyan M. (2005). Anaerob, sporlu, gram pozitif basiller. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Tıp Kitabevi Ltd.Şti. Ankara.
9. Gürler N. (2005). Anaerob bakteriler. Tıbbi Mikrobiyoloji. 98-125. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul.
10. Theilman NM. Antibiotic associated colitis. (2000). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. 1111-21. Philadelphia, Churchill Livingstone.

11. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. (2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 7: 421-427.
12. Borriello SP. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother. 4:113-119.
13. Barrasso LA, Wang SZ, Phelps CJ, Jhonson JL, Wilkins TD. (1990). Nucleotide sequence of *C.difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. B. Med. Microbiol Immunol. 179:271-279. Berlin.
14. Drummond LJ, Smith DGE, Poxton IR. (2003). Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. 52:1033-1058.
15. Mikolajczyk FM, Martirosian G, Tang YJ, Silva J. (1997). Genotyping of *Clostridium difficile* isolates from a hospital in Warsaw: A Preliminary Study. Int J Infect Dis. 2:88-90.
16. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2005). Medical Microbiology. 5. Ed. 57: 889-910. Philadelphia:Elsevier.
17. Hatheway, CL, Johnson EA (1998) *Clostridium*: the spore-bearing anaerobes. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds) Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9th edn, vol 2. Arnold, London, pp 731-782
18. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS. (2003). International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. J Clin Microbiol. 41:1543-1547.
19. Riley TV. 1998. *Clostridium difficile*: A pathogen of the nineties. Eur J Clin Microbiol Infect Disease. 17:137-141.
20. Geric B, Johnson S, Gerding DN. (2003). Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. J Clin Microbiol. 41:5227-5232.
21. Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC et al. (2009). *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. Int J Antimicrob Agents. 33: 339–342.
22. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. (2002). Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 46: 1647-1650.
23. Bisharaa J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samrac Z. (2006). Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. Diagn Microbiol Infect Dis. 54: 141–144.
24. Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. (1999). Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest, Diagn. Microbiol Infect Dis. 34; 1–6.
25. Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. (2007). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. J Med Microbiol. 56: 921–929.
26. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, and CDAD-CSI. (2006). Study Group in vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi institutional outbreak in Southern Quebec, Canada., Antimicrob Agents Chemother 50: 3473–3475

27. Ardiç N. (2004). *Clostridium difficile* infeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. Klinik Dergisi. 17(3):142-5.
28. Barbut F, Petit JC. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect. 7: 405-10.
29. Flemming Hansen, Danish MeatKatharina. (2009). *Clostridium difficile* 'A Potentially foodborne zoonose? Significance in humans, animals and food.' Nordic Committee on Food Analysis. www.nmkl.org.
30. Kuijper, E., J. van Dissel, and M. Wilcox. (2007). *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. Curr Opin Infect Dis. 20:376–383
31. Songer JG. (2004). The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. Animal Health Res Rev. 5(2): 321-326.
32. Weese, J. Scott Brent P. Avery, J. Rousseau, and Richard J. Reid-Smith. (2009). Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. Applied and Environmental Microbiology. 75(15): 5009–5011.
33. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. (2005). PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J Med Microbiol. 54: 163-166.
34. Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves and other species. J Clin Microbiol. 45(6): 1963-64.
35. Blasko N, Bilkei G. (2005). *Clostridium difficile* and post-weaning piglet losses in outdoor production. The Pig Journal. 56: 66-70.
36. Mauch CP, Bilkei G. (2003). Illness in periparturient sows caused by *Clostridium difficile*. Folia Veterinaria. 47(4): 210-211
37. Silvapru BX, Bilkei G. (2005). *Clostridium difficile* infections in periparturient cows. 82: Indian Vet J, 82: 243-245.
38. 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(1-2):172-175.
39. Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. (2009). *Clostridium difficile* in ready-to eat salads Scotland. Emerg Infect Dis. 15(5): 817-818
40. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. (2007). *Clostridium difficile* in retail ground meat Canada.. Emerging Infectious Diseases. 13(3): 485-487.
41. Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thompson AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS. (2009). Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat Canada.. Emerging Infectious Diseases 15(5):802-805.
42. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. (2009). *Clostridium difficile* in Retail meat products USA. Emerging Infectious Diseases 15(5): 819-821.
43. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. Anaerob. 17:85-86.
44. Boer E, Nahuis A, Heuvelink a, Hurmanus C, Kuijper. (2011). Prevalance of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. Intrnational J Food Microbiol. 144:561-564.