

Clostridioides (Clostridium) difficile ve Gıdalardaki Varlığı

Clostridioides (Clostridium) difficile and its Presence in Food

Esra Akkaya*[©], Hamparsun Hampikyan**[©]

*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, İstanbul

**Beykent Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, İstanbul

Öz

Clostridioides (Clostridium) difficile, gram (+), anaerob, sporlu, çomak şeklinde ve özellikle hastane kaynaklı bir bakteri olup, uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucunda psödomembranöz kolit, toksik megakolon, intestinal perforasyon ve diareye neden olmaktadır. Bakterinin virülansı sahip olduğu toksinlerden (enterotoksin ve sitotoksin) kaynaklanmaktadır. Etken hastanelerden başka toprakta, suda, su ürünlerinde, kasaplık hayvanlarda ve kanatlılarda tespit edilmiştir. Bu gıdalar, *C. difficile* için potansiyel yeni rezervuarlar olarak tanımlanmakta ve bu gıdaların tüketimi sonucu insanlarda söz edilen hastalık tablolarının şekillenmesine sebebiyet vermektedir. *C. difficile*'nin neden olduğu herhangi bir gıda kaynaklı hastalık olgusu bildirilmemiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda insanlardan izole edilen *C. difficile* suşlarının besi hayvanlarında da saptanması bu etkenin halk sağlığı yönünden ciddi bir risk oluşturabileceği kaygısını doğurmuştur.

Anahtar kelimeler: *Clostridium difficile*, CDE, PCR-Ribotip, antibiyotik duyarlılık, halk sağlığı

ABSTRACT

Clostridioides (Clostridium) difficile is a gram (+), anaerobic, spore-forming, rod-shaped nosocomial bacterium, which causes pseudomembranous colitis, toxic megacolon, intestinal perforation and diarrhea due to long-term usage of antibiotics. The main virulence of the bacteria takes its source from toxins (enterotoxin and cytotoxin). It can be detected in the soil, water, water products and food animals other than hospitals. These foods identified as a new potential reservoirs for *C. difficile* and the consumption of these foods in humans causes *C. difficile* related enteric diseases. Although there have been no confirmed cases of any foodborne disease caused by *C. difficile*; especially in recent years, *C. difficile* strains isolated both from humans and food animals could pose a serious risk for public health.

Keywords: *Clostridium difficile*, CDI, PCR-Ribotype, antibiotic susceptibility, public health

Alındığı tarih:

07.03.2019

Kabul tarihi:

05.09.2019

Yayın tarihi:

31.12.2019

ORCID Kayıtları

E. Akkaya 0000-0002-2665-4788

H. Hampikyan 0000-0002-9032-7861

✉ esra.akkaya@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-30'undan sorumlu tutulan *Clostridioides (Clostridium difficile)*, ilk kez 1893 yılında insanlarda uygulanan postmortem bir olgu incelemesinde midede saptanan difterik psödomembranlar ile tanımlanmış, ancak nedeninin *Staphylococcus aureus* olduğu düşünülen etken, 1935 yılında sağlıklı bebeklerin dışkı florasyndan gram (+) anaerobik basillerin zor izole edilmesinden dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiştir⁽¹⁾. Bu bakteri, 1978 yılında ilk defa "Psödomembranöz

kolit" ve "antibiyotik ilişkili ishal" olgularında tanımlanmış ve özellikle klindamisin ve linkomisin kullanımı ile semptomların daha erken görüldüğü bildirilmiştir. *C. difficile* 1980'den sonra, ABD'de en önemli hastane kaynaklı (nosokomial) ishal etkeni olarak açıklanmış, 2000'lerden sonra ise tedaviye dirençli ve tekrarlama oranı yüksek *C. difficile* enfeksiyonları saptanmıştır⁽²⁾.

Günümüzde, etkenin neden olduğu enfeksiyonlar, Avrupa ve Amerika'da birçok ülkede önemli bir sağlık sorunu hâline gelmiş, bu sorun hastalığın yalnızca insidansının artmış olmasından değil, şiddetindeki artıştan da kaynaklanmıştır. Kanada'da ve ABD'de

artan bir *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) insidansı ve şiddeti bildirilmiş, Kanada'da 1991-2003 yılları arasında hastanelerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda CDE insidansı her 100.000 kişide 356 olgudan 1.563 olguya çıktığı ve yine 2004 - 2005 yılları arasında Kanada'da yapılan başka bir çalışmada, insidansın her 1.000 hastada 4.6 olgu olduğu kaydedilmiştir. Aynı şekilde, Avrupa'da da 2005 yılında 14 ülke ve 38 hastanenin ishal olgularının incelendiği benzer bir çalışmada, 10.000 hastada CDE 0.13 ile 7.1 olgu arasında değiştiği ve ortalama insidansın her 10.000 hastada 2.45 olgu olduğu belirtilmiştir^(3,4). Ülkemizde de bu bakteriyle ilgili son yıllarda hastanelerde çeşitli çalışmalar yapılmış, özellikle ishal olgularının bazılarında *C. difficile* izole edilmiştir⁽⁵⁻⁷⁾.

GENEL ÖZELLİKLERİ

Clostridioides difficile, gram (+), zorunlu anaerob ve sporlu bir bakteri olup, halk sağlığı açısından en önemli özelliği, çevresel faktörlere karşı yüksek dayanıklılık gösteren spor formlarının bulunması, uygun şartlar (yaşlılık, hastanede uzun süre antibiyotik kullanımı, mide asitliğini düşüren ilaçlar, kemoterapik ajanlar, sigara kullanımı) altında hastalık tablosu şekillendiren ve etkenin temel virülans faktörü olan toksin üretimidir⁽⁸⁾.

Bakterinin vegetatif formu için optimum üreme sıcaklığı 37°C, optimum pH değerleri ise 6.5-7.5 arasındadır. Bunların dışında, etken sporlanarak varlığını uzun bir süre sürdürebilmektedir. Bakterinin virülansı sahip olduğu toksinlerden (enterotoksin ve sitotoksin) kaynaklanmaktadır^(2,9). Fekal-oral yolla bulaşan etkenin vegetatif formları mide asidi ile tahrip olunca, sporları bağırsaklara ulaşır, burada kolonize olmak suretiyle, toksin salgılamakta ve böylece *C. difficile*'ye bağlı ishaller oluşabilmektedir^(10,11).

Clostridioides difficile'nin en önemli özelliklerinden biri ısı, kuruluk ve alkol bazlı antiseptiklere karşı dirençli spor oluşturması ve çeşitli çevresel koşullarda uzun süre canlı kalabilmesidir. Spor formları, kolonizasyon gelişmiş hastalardan ve bu hastaların yakın-

larından temas sonucu, ayrıca hastanede görevli personelin elleri ve kontamine ekipman (rektal termometre vb.) aracılığıyla taşınarak kolaylıkla yayılabilmekte ve özellikle uzun dönem bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilmektedir⁽¹²⁻¹⁵⁾.

İnsanlar bu bakteriyi veya sporlarını diğer asemptomatik kişilerden veya çevreden alarak enfeksiyona yakalanmaktadır^(4,16). Bununla birlikte, kontamine gıdaların tüketilmesi ile etkenin spor formlarının alınması önemli bir diğer bulaşma yoludur. Gıdalarda donma-çözünme safhalarının sporların inaktivasyonu üzerinde fazla etkili olmadığı, ancak ısı işlem uygulamalarının spor üzerine olumsuz etki yaptığı belirtilmektedir. *C. difficile* sporlarının etin pişirilmesi için önerilen iç sıcaklık değeri olan 71°C'ye de dayanabildiği belirlenmiş ve 95°C'de 10-15 dakika ısı işlem uygulanması önerilmiştir. Buna karşın, bazı *C. difficile* türlerine ait sporların düşük sıcaklık değerlerinde (-20°C) bile canlılıklarını korudukları bildirilmiştir^(2,17).

Özellikle hastane kaynaklı olan etken, uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucunda psödomembranöz kolit, fulminant kolit, toksik megakolon, intestinal perforasyon rekkurent CDE formları ve diyare başta olmak üzere diğer sistemleri de etkileyerek bakteriyemi-sepsis sendromu, karaciğer, dalak ve pankreas apseleri, peritonit ve kemik-eklem enfeksiyonları gibi hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır^(2,18).

Clostridioides difficile'nin Patogenezi

Clostridioides difficile enfeksiyonlarının patogenezinde temel virülans faktörleri bakterinin sahip olduğu iki önemli toksin olan toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)'dir⁽¹⁹⁾. Toksin üretimi, bakteri gelişimi evrelerinden biri olan logaritmik fazın son safhası ile durgunluk fazının başlangıç safhasında gözlemlenirken, etkenin spor oluşturması aşamasında herhangi bir toksin üretimi söz konusu olmamaktadır. Ayrıca çeşitli araştırmacılar tarafından ısı, glukoz, aminoasit konsantrasyonu ve biyotin varlığı gibi etkenlerin de toksin oluşumu üzerine etkili olduğu bildirilmiştir^(10,20). Toksin A ve toksin B'nin molekül

ağırlıkları sırasıyla 308 kDa (2710 amino asit) ve 270 kDa (2366 amino asit) olup, her iki toksin yapısal olarak temelde birbirine çok yakın olmakla birlikte, farklı etkiler göstermektedirler^(21,22). Patolojik etkisi bakımından toksin B etkin bir enzimatik aktiviteye sahip olması nedeniyle, toksin A'ya göre daha etkilidir. Toksin A ise bağırsak sekresyonunu arttırabilme özelliğine sahiptir. Söz konusu etki, toksinin hücre membranında bulunan ilgili reseptörlere bağlanması sonucu oluşur ve bu reseptörler toksin A için karbonhidrat reseptörleri iken, toksin B'nin bağlandığı reseptörler henüz açıklığa kavuşturulamamıştır^(10,20,23). Bu farklılıkların yanı sıra toksin A ve B potansiyel sitotoksik aktivite göstererek, hücre yapısında yer alan önemli proteinleri (Ras ve Rho) glikozilasyon sonucu inaktif hâle getirmek suretiyle hücre yapısının bozulmasına, permeabilitenin artmasına ve böylece ishale neden olur. Toksin A, bağırsakta sıvı salınımını arttırmanın yanı sıra mukus permeabilitesinde artışa ve mukozal enflamasyona neden olurken, aynı zamanda epitel hücrelerinin yapısını bozarak toksin B'nin hücrelere girmesine yardımcı olur. Toksin B, makrofaj kökenli TNF- α ve lipoksijenaz aracılığı ile nötrofillerin yoğun şekilde toplanmasını stimüle eder ve böylece hemoraji-nekroz enflamasyon ile bağırsak lümenine sıvı ve protein sızmasına neden olan sitotoksik etkisini gösterir^(19,24).

Toksin A ve B patojenik lokusun (PaLoc) genom bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır. Bu bölgede, toksinler *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* olarak adlandırılan beş farklı gen tarafından düzenlenerek, sentezlenmektedir. Patojenik olmayan *C. difficile* izolatları ise patojenik lokus gen bölgesini içermemektedir. Virülans özelliği yüksek bazı *C. difficile* suşları, toksin A (*tcdA*) ve B (*tcdB*) haricinde *cdtA* (enzimatik komponent) ve *cdtB* (binding komponent) kompleksinden oluşan "*Clostridium difficile* binary toksini" (CDT) de içermektedir. *C. difficile*'nin PaLoc dışındaki CDT lokus bölgesinde mevcut *cdtA* ve *cdtB* genleri tarafından kodlanarak üretilen binary toksin, etkenin kolon yüzeyine tutunmasını kolaylaştırmak amacıyla kolon hücrelerinin dış çeperlerinde sitotoksik etki gösterir⁽²⁵⁻²⁷⁾.

***Clostridium difficile*'nin Ribotiplendirilmesi**

Son yıllarda farklı toksijenik *C. difficile* izolatları tanımlanmış ve bu izolatların 150 farklı ribotiplere sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak en çok rastlananın ribotip O27'nin olduğu belirtilmiştir. "NAP1/BI/O27 hipervirulent suşu" olarak adlandırılan bu *C. difficile* suşu, yüksek oranda toksin salgıladığı vurgulanmıştır. Bu suşun Toksin A ve B'yi 16-23 kat daha fazla salgıladığı ve ayrıca CDT'de salgıladığı saptanmıştır. Bununla birlikte, NAP1/BI/O27 hipervirulent suşu fluorokinonlara dirençli ve sporlanma kapasitesinin diğer suşlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir^(21,27). 2008 yılında 16 Avrupa ülkesinde *C. difficile* PCR Ribotip O27 kaynaklı olgular ortaya çıktığı kaydedilmiştir. Bunların içinde 9 ülkede (İngiltere, Hollanda, Belçika, Fransa, İrlanda, Lüksemburg, İsviçre, Almanya ve Finlandiya) enfeksiyon salgınlar şeklinde seyrederken, 7 ülkede ise (Avustralya, Norveç, Danimarka, İsveç, Hindistan, Polonya ve İspanya) sporadik şekilde seyrettiği saptanmıştır^(10,28).

***Clostridium difficile*'nin Antibiyotik Duyarlılığı**

Clostridium difficile'nin bağırsakta çoğalması ve toksin salgılayabilmesi normal bağırsak florasındaki denge bozulmasına bağlıdır. Bu nedenle enfeksiyon antibiyotik kullanımı ile doğrudan ilişkilidir^(29,30). Tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler yalnızca patojen bakterileri değil, normal flora bakterilerini olumsuz yönde etkileyerek, süperenfeksiyonlara da neden olabilirler. Antibiyotik kullanımına bağlı olarak oluşan bu etki, ilaç kullanımı sonlandırıldıktan sonraki 6. haftaya kadar sürebilmekte ve *C. difficile*'ye bağlı ishal ortaya çıkabilmektedir⁽³¹⁾. *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyonların oluşumu sıklıkla ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin ve linkomisin gibi antibiyotiklerin kullanımı sonucunda oluşabilmektedir. Bunların yanı sıra kloramfenikol, eritromisin, imipenem ve penisilinlerin (aminopenisilinler hariç) de uzun süre ile kullanılması sonucu kolonun normal bakteriyel florasının bozulmasına bağlı olarak nadiren enfeksiyon gelişmesi de söz konusu olabilmektedir^(10,32).

Günümüzde metronidazol veya vankomisin *C. difficile*

enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan standart antibiyotikler olmuştur. Fakat yapılan farklı çalışmalarda, vankomisine ve metronidazole dirençli *C. difficile* suşları da tanımlanmıştır^(33,34). Günümüze azalmış duyarlılığa sahip izolat sayısında yükselen bir artış olduğu belirtilmiş, Mutlu ve ark.⁽³⁵⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, vankomisin için MIC değeri 4 mg/L olan suşların 1999-2000 yıllarında %2.7 iken, 2005 yılında %21.6'ya yükseldiğini belirlenmiştir.

Diğer antibiyotiklere olan direnç düzeyleri farklılık göstermekle birlikte, en yüksek direnç klindamisin-eritromisin grubunda saptanmıştır. Klindamisine direnç, Çin'de 2007 yılında %71.4 oranında saptanmışken, 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 olarak bulunduğu bildirilmiştir^(32,36).

Clostridioides difficile enfeksiyonunun gelişmesinde önemli rol oynayan etkenlerin başında, uzun süre uygulanan antibiyotik tedavileri, ileri yaş, uzun süreli hastane yatışları gelmektedir. Özellikle klindamisin, sefalosporin, florokinolon grubu antibiyotiklerin kullanılması sonucu kolon florası bozulmakta ve baskın hâle geçen *C. difficile* sporları vejetatif hâle geçerek toksin üretmektedir^(27,37). İleri yaşın (≥ 65), CDE için risk oluşturmasının nedeni, yaşlılıkla birlikte toksinlere karşı oluşan bağışıklık sisteminin zayıflamasına bağlı olarak geliştiği öngörülmektedir. Hastanede uzun süreli tedaviye alınan hastalarda da CDE riski, hastanede kısa süreli tedavi uygulanan hastalardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir⁽³⁸⁾.

GIDALARDAKİ VARLIĞI

Günümüzde toplumsal kökenli *C. difficile* enfeksiyonları giderek artan bir risk olarak ortaya çıkmıştır. Bu olguların çoğunda hastaların antibiyotik kullanımı veya yakın tarihli bir hastane geçmişi gibi hastalık riski oluşturabilecek bir faktör yoktur ve diğer formun aksine genellikle yalnızca hafif bir ishal ile kendini göstermektedir. Toplumsal kökenli *C. difficile* enfeksiyonunun düşük riskli gruplarda ortaya çıkışı

akıllara *C. difficile*'nin gıda kaynaklı olarak yayılmış olabileceği düşüncesini getirmektedir. Doğada mevcut olan bir bakterinin hayvanlar aracılığıyla insanlara geçişi olabileceğinden sığır, koyun, keçi, domuz, tavuk eti gibi perakende et ve et ürünlerinden insanlara enfeksiyon geçişine yol açan suşların bulunabileceği bildirilmiştir. *C. difficile* sporlarının olumsuz çevre koşullarına karşı gösterdikleri yüksek dayanıklılık çevrede yaygın olarak bulunmalarına ve enfeksiyon için sürekli rezerv oluşturmalarına yol açmaktadır⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

Clostridioides difficile'nin Kırmızı Et ve Et Ürünlerindeki Varlığı

Bu konu ile ilgili olarak, Rodriguez-Palacios ve ark.⁽⁴²⁾ Kanada'da perakende olarak yerel marketlerde satışı sunulan et ürünlerinde *C. difficile* varlığını araştırmışlar; bu amaç doğrultusunda taradıkları 60 adet et örneğinin 12'sinde (%20) *C. difficile* saptamışlar ve bu etkene ait 11 toksijenik izolat belirlemişlerdir. Araştırmacılar etkenin gıdaya geçişinin etlerin depolanması ve ambalajlanması sırasında meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacıların 2009 yılında yine Kanada'da yaptıkları benzer bir başka araştırmada, 149 adet dana parça etinde ve 65 adet pirzola örneğinde sırasıyla %6.7 (10/149) ve %4.6 (3/65) oranında *C. difficile* varlığını belirlemişler ve bu izolatlardan 10 adedinin toksijenik yapıya sahip olduklarını vurgulamışlardır⁽⁴³⁾.

Benzer bir başka çalışmada, Weese ve ark.⁽⁴⁴⁾ tarafından Kanada'da perakende olarak satılan parçalanmış domuz ve sığır etlerinde *C. difficile* kontaminasyonunu belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, toplam 230 örnekten 28'inde *C. difficile* izole edilmiştir. Bu izolatların 14'ü parça sığır eti, diğer 14'ü ise parça domuz etinde saptanmıştır.

Avustralya'da yapılan bir başka çalışmada ise, yerel marketlerden alınmış 100 adet parça et örneğinde *C. difficile* varlığı aranmış, incelenen 3 parça et örneğinde *C. difficile* varlığı saptanmıştır⁽⁴⁵⁾.

Rodriguez ve ark.⁽⁴⁶⁾ tarafından Belçika'da dana ve

domuz etleri üzerine yapılan bir çalışmada, 133 adet dana etinden 3 adedinin (%2.3) ve 107 adet domuz etinin 5 adedinin (%4.7) söz konusu etkenle kontamine olduğu belirtilmiştir.

Carlos ve ark.⁽⁴⁷⁾ tarafından Kosta Rika'da yapılan bir çalışmada, perakende olarak satışa sunulan farklı hayvan türlerine ait etlerden *C. difficile* 67 adet sığır etinden birinde, 66 adet domuz etinden 2'sinde saptanabilmiştir. Bu bulgulara benzerlik gösteren bir başka çalışmada, Mooyottu ve ark.⁽⁴⁸⁾ 100'er adet kıyma, domuz ve tavuk eti olmak üzere toplam 300 adet örneği analiz etmişler ve yalnızca 2 adet domuz eti örneğinin *C. difficile* varlığı yönünden pozitif bulunduğunu ve bu izolatların nontoksijenik olduğunu belirtmişlerdir.

Esfandiari ve ark.⁽⁴⁹⁾ tarafından İran'da bir hamburgerciye yapılan bir çalışmada, üretim öncesinde hamburger üretiminde kullanılan 54 adet ete ait örneğin üçü (%5.6) *C. difficile* pozitif bulunurken, üretim sonrasında bu oranın %7.1'e ulaştığı rapor edilmiştir.

Yine İran'da yapılan bir başka çalışmada, et ve et ürünlerinden farklı olarak Rahimi ve ark.⁽⁵⁰⁾ değişik bölgelerden topladıkları 135 adet süt örneğinde etkeni %1.43 düzeyinde belirtmişlerdir.

Ülkemizde de Hampikyan ve ark.⁽⁵¹⁾, Marmara Bölgesindeki mezbahalardan topladıkları 247 büyükbaş ve 308 küçükbaş hayvan karkaslarında *C. difficile*'yi araştırmışlar ve 83 (%33.6) adet büyükbaş ile 78 (%25.3) adet küçükbaş karkas örneklerinden etkeni izole etmişlerdir. Sığır karkaslarından elde edilen izolatlardan 15'i (%18.1) ve koyun karkaslarından elde edilen izolatlardan 6'sı (%7.7) ribotip 027 suşu olarak identifiye edilmiştir.

Yetersiz altyapı ve kötü hijyen koşullarına sahip mezbahalarda yapılan kesimler ve iç organların çıkarılması esnasında yapılan hatalar sonucunda hayvanların bağırsaklarında bulunan etkenin karkasa bulaşması, hayvan atıklarının güvenli bir şekilde uzaklaştırılama-

ması, uygun olmayan depolama koşulları bu etkenin gıdalarda bulunmasının temel nedenleri arasında yer alır. Bunlara ek olarak, çevrede uzun süre canlılığını koruyabilen sporlar etkenin yanlış uygulamalar sonucunda personel, ekipman ve yüzeylerden gıdaya geçişine de neden olmaktadır. Bu olumsuzluklara kaynak oluşturan canlı hayvanlar ve onlara ait dışkıları üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artan bir ivme kazanmıştır^(51,52).

***Clostridioides difficile*'nin kanatlı etlerindeki varlığı**

Kanatlı etleri ve ürünlerinde, *C. difficile* varlığı ile ilgili çeşitli ülkelerde yapılmış birçok araştırma dikkat çekmektedir. de Boer ve ark.⁽⁴⁰⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, tavuk karkasına ait 257 örneğin 7'sinde *C. difficile* belirlenmiştir. Kanada'da Weese ve ark.⁽³⁹⁾ tarafından yapılan bir diğer çalışmada, 203 tavuk örneğinin 26'sında (%12.8) bakteri izole edilmiştir. Benzer şekilde, Güran ve İlhak⁽⁵³⁾ marketlerden toplanan 310 tavuk örneğinin 25'inin (%8.1) bu bakteri ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Avusturya'da Indra ve ark.⁽⁵⁴⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, 59 broyler tavuk örneğinin 3'ünde *C. difficile* varlığı belirlenmiştir. Bunların aksine, Mooyottu ve ark.⁽⁴⁸⁾ 100 adet tavuk kanadı örneğinin hiçbirinde *C. difficile* suşunu saptamadıklarını rapor etmişlerdir. Aynı şekilde Limbago ve ark.⁽⁵⁵⁾ da, marketlerden toplanan 614 adet hindi ve 259 adet tavukgöğsü örneğinde bakteriyi saptamamışlardır.

Son yıllarda, kanatlı hayvan karkaslarından izole edilen *C. difficile* suşları, insanlarda CDE salgını ile ilgili R027 ve R078 gibi bazı suşlarla benzerlikler göstermektedir. Bu konu ile ilgili olarak, Varshney ve ark.⁽⁵⁶⁾ inceledikleri 76 adet hindi eti örneğinden 11'inde (%14.5) *C. difficile* belirlemişler ve pozitif örneklerden 1 adedini R027 ve 2 adedini R078 olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, Weese ve ark.⁽³⁹⁾, 203 tavuk örneğinin 26'sında *C. difficile* varlığını belirlemişler ve bütün izolatların R078 olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda da kanatlı eti örneklerinde R027 ve R078'in izole edilemediği de rapor edilmiştir^(40,56,57). Benzer şekilde ülkemizde de Ersöz ve Coşansu⁽⁵⁸⁾

tarafından yürütülen bir çalışmada, araştırmacılar 27 adet tavuk numunesi incelemişler ve hiçbirinde etkeni belirleyememişlerdir.

***Clostridioides difficile*'nin su ürünlerindeki varlığı**

Kasaplık hayvanların yanı sıra yapılan çalışmalar etkenin çeşitli deniz ürünlerinde de bulunabileceğini göstermektedir. Pasquale ve ark.⁽⁵⁹⁾, 2010-2011 yılları arasında Napoli-İtalya'da çift kabuklu yumuşakçalarda yaptıkları araştırmaları sonucunda, 53 örneğin %49'unda etkeni izole ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacıların yaptıkları bir başka çalışmada ise, 6 istiridye örneğinin 4 adedinde etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir⁽⁶⁰⁾. Yine İtalya'da Troiano ve ark.⁽⁶¹⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, incelenen 925 çift kabuklu yumuşakça örneğinin %3.9'unda *C. difficile* belirlenmiştir. Örneklerden elde edilen 18 izolatta hem toksin A hem de toksin B geni saptanırken, yalnızca 1 izolatta toksin B geni bulunmuştur.

Benzer şekilde deniz ürünleri üzerine Kanada'da yapılan bir başka çalışmada, yerel marketlerden alınan toplam 119 deniz ürününden (karides, midye, yengeç, somon levrek, kedi balığı, somon, istiridye, ahtapot, alabalık) beşinde *C. difficile* varlığını belirlediklerini vurgulamışlardır⁽⁴¹⁾.

Norman ve ark.⁽⁶²⁾ Teksas-ABD'de yaptıkları araştırmalarında, 67 adet deniz ürününün (midye, somon, karides) üçünde (%4.5) *C. difficile* varlığını saptamışlardır.

***Clostridioides difficile*'nin salata ve sebzelerdeki varlığı**

Etkenin hayvansal gıdalar haricinde bulunabildiği bir başka gıda grubu da sebzelerdir. Çeşitli çalışmalar ile *C. difficile*'in hayvansal kaynaklı (et, süt, deniz ürünleri ve balıklar) gıdalara ek olarak salata ve sebzelerde de yüksek oranda bulunabileceği belirtilmiştir⁽⁶³⁾. Ancak günümüzde bu konuyla ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

Bu doğrultuda, Glaskow-İskoçya'da Bakri ve ark.⁽⁶⁴⁾ tarafından yapılan ve yerel marketlerde satılan hazır

salata ürünlerinden alınan 40 örneğin üçünde (%7.5) *C. difficile*'yi belirlemişlerdir.

Metcalf ve ark.⁽⁶³⁾ tarafından Kanada'da yapılan bir çalışmada, 111 adet sebze örneğinin beşinde (%4.5) etkeni izole etmişlerdir.

Al Saif ve Brazier⁽⁶⁵⁾ Galler'de yaptıkları araştırmalarında, satışa sunulan 300 çiğ sebze örneğinin yedisinde (%2.3) *C. difficile*'yi izole etmişler ve bu örneklerden beşinin toksin A ürettiğini vurgulamışlardır.

***Clostridium difficile*'nin Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı**

Yapılan araştırmalarda, ruminantlarda *C. difficile* varlığının belirlenmesi bu bakterinin süt ve ürünlerinde bulunma riskini gözler önüne sermektedir. Ancak, bugüne kadar yapılan sınırlı çalışmalarda, sütlerde bu bakterinin varlığına dair bir sonuç bildirilmemiştir. Jöbstl ve ark.⁽⁴⁵⁾ tarafından 50 adet çiğ süt örneği *C. difficile* varlığı yönünden incelenmiş olup, incelenen örneklerin hiç birinde etken izole edilememiştir. Bu kapsamda, çiğ sütün kesin enfeksiyon kaynağı olarak gösterilmesi olası olmamakla birlikte, süt hayvanlarında etkenin bulunabilmesi sütlerin ve sütlerden üretilen farklı süt ürünlerinin *C. difficile* ile kontamine olma riskini olası kılmaktadır⁽⁶⁶⁾.

KORUNMA

Clostridioides difficile sporları toprak, su gibi çevresel ortamlarda ayrıca, hastane, ekipman ve yüzeylerinde canlılıklarını koruyabilmektedirler ve hastalığın bulaşmasında önemli rol üstlenmektedir. Özellikle etkenin sporları nemli/kuru sıcak hava uygulamalarına, UV ışınlamaya, kurutmaya, mekanik parçalama işlemine, etanol, asit, alkali ve aldehit gibi kimyasallara karşı oldukça dirençlidir^(67,68). Buna karşın sodyum hipoklorid, klor dioksit ve klor ürünleri yüzey ve çevresel elemanların dezenfeksiyonu için uygun kimyasallar olarak karşımıza çıkarken, alkol, klorheksidin, heksaklorofen pek çok dezenfektan ajanları etkisiz kalmaktadır. Özellikle çevre dezenfeksiyonunda fosfat ile tamponlanmış hipoklorit (1600ppm serbest klor, pH

7.6) çözeltilerin kullanılması ile başarılı (%98 oranında redüksiyon) sonuçlar elde edilmiştir. Klor oranının 500 ppm seviyelerine düşürülmesi etken sayısının azaltılmasında yetersiz olmuştur (%21 oranında bir azalma). Bu kapsamda çevre dezenfeksiyonu için kullanılacak aktif klor miktarının oranı dezenfeksiyon işleminin başarılı olması bakımından önem göstermektedir⁽⁶⁹⁾. Ancak uzun süre kullanımlarında klorun korozif etkisi göz ardı edilmemesi gereken olumsuz bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Hidrojen peroksit buharı uygulamaları yine çevresel dezenfeksiyonlarda kullanılan başarılı bir yöntem olmakla birlikte, pahalı oluşu ve uygulama zorlukları (hasta odalarının boşaltılarak, bir müddet kullanılamaması vb.) bu yöntemin dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır⁽⁷⁰⁾. Yapılan çalışmalarda, el dezenfektanlarının etkeni yok etmede yetersiz kaldığı, el yolu ile gerçekleşecek olan bulaşmaların etkin ve doğru zamanlarda yapılacak olan eldiven değişimleriyle engellenebileceği sonucuna ulaşılmıştır⁽⁷¹⁾.

Çeşitli araştırmaların sonuçlarına göre, *C. difficile*'nin et, kanatlı hayvan, su ve ürünleri gibi farklı gıda gruplarında da bulunduğu bildirilmiştir. Et işleme tekniklerinde kullanılan sıcaklık değerlerinde etkenin canlılığını koruduğu belirtilmektedir. Rodriguez-Palacios ve ark.⁽¹⁷⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, etkene ait spor sayılarında 71°C'de 2 saat süresince uygulanan ısı işlem sonucunda ancak 2 log₁₀ düzeyinde bir düşüş olduğu ve geri kalan sporların canlılıklarını korudukları saptanmıştır. Rodriguez-Palacios ve LeJeune⁽⁷²⁾ tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, 85°C'de 15 dakika süre ile uygulanan ısı işleminin etken sporları üzerinde 5-6 log₁₀ düzeyinde, 96°C'de 1-2 dakika süre ile uygulanan işlemin ise 6 log₁₀ düzeyinde bir redüksiyon sağladığı rapor edilmiştir. Bu bağlamda, gıdaların kaynama derecelerindeki sıcaklık değerlerinde ısı işleme tabi tutulması etkenin yok edilmesi için önemli bir konu olmakla birlikte, bu sıcaklık derecelerinde yaşanacak olası besin değerlerindeki kayıplar, gıdaların yapısal değişimleri, araştırılması gereken konular arasında yer almaktadır.

SONUÇ

Besi hayvanlarında koruyucu, tedavi edici ve verim arttırıcı olarak bilinçsiz antibiyotik kullanımı dünyada önemli bir sağlık sorunu olan antibiyotik ile ilişkili ishal olgularının %15-30'undan sorumlu tutulan *Clostridioides (Clostridium) difficile*'nin önemini ortaya çıkarmıştır. Etkenin en önemli özelliği, çevresel faktörlere karşı yüksek dayanıklılık gösteren spor formlarının bulunması, uygun şartlar altında hastalık tablosu şekillendiren ve etkenin temel virülans faktörü olan toksin üretimidir.

Özellikle son yıllarda insanlardan izole edilen *C. difficile* suşlarının ekonomik değeri olan besi hayvanlarının dışkı ve karkaslarından izole edilmesi, bunlardan elde edilen hayvansal kökenli gıdaların *C. difficile* için potansiyel yeni bir rezervuar olabileceği düşüncesini akla getirmiştir. Özellikle olumsuz hijyenik koşullar altında işlenen hayvansal ürünler ve hatalı personel uygulamaları sonucu etkenin gıdaya bulaşması kolaylaşmaktadır. Bakterinin az sayıda bulunduğu durumlarda bile, spor oluşturma özelliği ve sıcaklığa karşı gösterdiği direnç ile gıda kaynaklı bulaşmalara olanak sağlanmaktadır. Bu düşünce doğrultusunda Avrupa ve Amerika'da birçok ülkede bu etkenin gıdada bulunabilme olasılığı üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış ve *C. difficile*'nin kasaplık hayvan ve bunlardan elde edilen çeşitli gıdalarda varlığı belirlenmiş olmasına rağmen, *C. difficile*'nin neden olduğu herhangi bir gıda kaynaklı hastalık olgusunun bildirilmediği ifade edilmiştir⁽⁷³⁾.

Bu durumun önüne geçilebilmesi için, gerek insanların tedavilerinde gerekse, hayvanlarda farklı amaçlarla uygulanan antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımları engellenmelidir. *C. difficile*'nin insanlarda hastalık oluşturan suşlarının ekonomik değeri olan hayvanlardan da izole edilmesi nedeniyle, etkenin bir gıda kaynaklı patojen olma olasılığı kuvvetlenmiş olup, bu hayvanların kesim aşamalarından, bunlardan elde edilen ürünlerin üretim aşamalarına kadar olan tüm evrelerde, işletme ve ekipman hijyeni sağlanarak hijyen koşullarının yükseltilmesi, yapılacak olan "İyi

Hijyen Uygulamaları'nın periyodik ve etkin bir şekilde yapılması, özellikle mezbaha, kesimhane ve üretim-hanelerde görev alan tüm personele konu ile ilgili eğitimlerin verilerek hijyen bilinçlerinin artırılması, özellikle hayvansal ürünlere uygulanacak olan ısı işlemlerinin gereken sıcaklık derecesi ve sürelerde uygulanarak olası *C. difficile* vejetatif ve spor formları yok edilmeye çalışılmalıdır. Bu sayede *C. difficile*'nin antibiyotiklere karşı direnç gelişimi önlenerek hastalığın tedavi edilebilme şansı yükseltilebilecek ve böylece hem halk sağlığı korunmuş olacak hem de etkenin toksijenik özelliğine bağlı olarak, kontamine gıdaların tüketimi sonucu ortaya çıkan gastrointestinal hastalıklar ve süperenfeksiyonlar sonucunda oluşacak hastalık tablolarında olası tedavi giderleri ve iş gücü eksikliği nedeniyle oluşacak ekonomik kayıpların önüne geçilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Allen SD, Emery CL, Lyster DM. *Clostridium*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, Washington DC., ABD, 2003:835-56.
- Rodriguez-Palacios A, Borgmann S, Kline TR, LeJeune TJ. *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. Anim Health Res Rev. 2013;14(1):11-29. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000229>
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):529-49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00082-09>
- Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011;8(1):17-26. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.190>
- Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E, et al. Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. Med Mal Infect. 2009;39(6):382-7. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2009.02.001>
- Kostul H, Delialioğlu N, Şahin-Horasan E, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Hastanede yatan ishallerde hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2015;72(3):183-90. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.36024>
- Ayarcı AO, Özakin C, Oral B, ve ark. İshallerde *Clostridium difficile* toksin pozitifliğinin retrospektif analizi. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2012;42(1):10-5. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2012.010>
- Stanley JD, Bartlett JG, Dart BW 4th, Ashcraft JH. *Clostridium difficile* infection. Curr Probl Surg. 2013;50(7): 302-37. <https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2013.02.004>
- Legoh GN, Sosrosumahardjo R. Laboratorium diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Gastroenterol Hepatol Dig Endosc. 2006;7(2):46-50. <https://doi.org/10.24871/72200646-50>
- Yıldız F, Gücükoğlu A. *Clostridium difficile* ve gıda güvenliği açısından önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. 2012;10(1):22-9.
- Pelaez T, Alcalá L, Blanco JL, et al. Characterization of swine isolates of *Clostridium difficile* in Spain: A potential source of epidemic multidrug resistant strains? Anaerobe. 2013;22:45-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.009>
- O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology. 2009;136:1913-24. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.073>
- Karadağ FY, Günel Ö, Barut HŞ. Güncel bilgiler ışığında *Clostridium difficile* enfeksiyonu. Gaziosmanpaşa Üniv Tıp Fak Derg. 2013;5(2):68-73.
- Curry S. *Clostridium difficile*. Clin Lab Med. 2010;30(1):329-42. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.001>
- Di Persio JR, Varga FS, Conwell DL, Kraft JA, Kozak KJ, Willis DH. Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* Toxin A and its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. J Clin Microbiol. 1991;29(12):2724-30.
- McCullum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(6):581-92. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.03.008>
- Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Weese JS. *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. Anaerobe. 2010;16(5):540-2. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.05.004>
- Ardıç N. *Clostridium difficile* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. Klimik Derg. 2004;17(3):142-5.
- Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infection. 2009;58(6):403-10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.03.010>
- Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2001;7(8):421-7.

- <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00287.x>
21. Salnikova MS, Joshi SB, Rytting JH, Warny M, Middaugh CR. Physical characterization of *Clostridium difficile* toxins and toxoids: Effect of the formaldehyde crosslinking on thermal stability. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3735-52.
<https://doi.org/10.1002/jps.21261>.
 22. Zeisera JJ, Klodmann J, Braunb HP, Gerharda R, Justa I, Picha A. Effects of *Clostridium difficile* Toxin A on the proteome of colonocytes studied by differential 2D electrophoresis. *J Proteomics.* 2011;75(82):469-79.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.08.012>
 23. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology.* 5th Ed., Philadelphia: Elsevier, 2005.
 24. Farrell RJ, LaMont JT. Pathogenesis and clinical manifestations of *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;250:109-25.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-06272-2_6
 25. Carroll KC, Bartlett JG. *Biology of Clostridium difficile: implications for epidemiology and diagnosis.* *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:501-21.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102824>
 26. Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):604-30.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00016-13>
 27. Kılıç A. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenezi, klinik özellikler, tanı ve tedavi. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(3):556-66.
<https://doi.org/10.5578/mb.5208>
 28. Kuijper EJ, van Dissel JT, Wilcox MH. *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):376-83.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32818be71d>
 29. Yılmaz GR, Çevik MA, Ünal S. *Saccharomyces boulardii.* *Flora.* 2000;5(Ek 2):E3-28.
 30. Yassin SF, Young-Fadok TM, Zein NN, Pardi DS. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Mayo Clin Proc.* 2001;76(7):725-30.
<https://doi.org/10.4065/76.7.725>
 31. Akan E. *Clostridium difficile.* *Tıbbi Mikrobiyoloji (2. Baskı), İzmir: Saray Medikal Yayıncılık, 1993.*
 32. Huang H, Wu S, Wang M, et al. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(4):339-42.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.022>
 33. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1647-50.
<https://doi.org/10.1128/aac.46.6.1647-1650.2002>
 34. Bisharaa J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samra Z. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(2):141-4.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.09.008>
 35. Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 7):921-9.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.47176-0>
 36. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, et al. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi institutional outbreak in Southern Québec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3473-5.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00479-06>
 37. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(8):1556-64.
 38. Leclair MA, Allard C, Lesur O, Pépin J. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Intens Care Med.* 2010;25(1):23-30.
<https://doi.org/10.1177/0885066609350871>
 39. Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(4):362-5.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x>
 40. de Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Hurmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retail meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2011;144:561-4.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.007>
 41. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe.* 2011;17(2):85-6.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.02.008>
 42. Rodríguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat Canada. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):485-7.
<https://doi.org/10.3201/eid1303.060988>
 43. Rodríguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, et al. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat Canada. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(5):802-5.
<https://doi.org/10.3201/eid1505.081084>
 44. Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(15):5009-11.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00480-09>
 45. Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner

- M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int J Food Microbiol. 2010;138(1-2):172-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022>
46. Rodriguez C, Taminiau B, Avesani V, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. Food Microbiol. 2014;42:166-71. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.021>
 47. Carlos QG, Michael RM, Pablo V, Maria del Mar GC, Cesar R, Evelyn RC. Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. J Food Prot. 2013;76(2):348-51. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-169>
 48. Mooyottu S, Flock G, Kollanoor-Johny A, Upadhyaya I, Jayarao B, Venkitanayaranan K. Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate. Int J Food Microbiol. 2015;192:111-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.002>
 49. Esfandiari Z, Weese JS, Ezzatpanah H, Jalali M, Chamani M. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. BMC Microbiol. 2014;14:283. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0283-6>
 50. Rahimi E, Jalali M, Weese JS. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. BMC Public Health. 2014;14:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-119>
 51. Hampikyan H, Bingöl EB, Muratoğlu K, Akkaya E, Çetin Ö, Çolak H. The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. Meat Sci. 2018;139:120-4. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.020>
 52. Keessen EC, van den Berkt AJ, Haasjes NH, Hermanus C, Kuijper EJ, Lipman LJA. The relation between farm specific factors and prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs. Vet Microbiol. 2011;154(1-2):130-4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.032>
 53. Guran HS, İlhak OI. *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. J Verbr Lebensm. 2015;10(4):359-64. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0950-z>
 54. Indra A, Lassnig H, Baliko N, et al. *C. difficile*: a new zoonotic agent? Wien Klin Wochenschr. 2009;121(3-4):91-5. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1127-x>
 55. Limbago B, Thompson AD, Greene SA, et al. Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of U.S. retail meats. Food Microbiol. 2012;32(2):448-51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.005>
 56. Varshney JB, Very KJ, Williams JL, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates from human fecal samples and retail meat from Pennsylvania. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(10):822-9. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1790>
 57. Abdel-Glil MY, Thomas P, Schmoock G, et al. Presence of *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat in Egypt. Anaerobe. 2018;51:21-5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.009>
 58. 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):759-67. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e14>
 59. Pasquale V, Romano V, Rupnik M, et al. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. Food Microbiol. 2012;31(2):309-12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.001>
 60. Pasquale V, Romano VJ, Rupnik M, et al. Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from shellfish and marine environments. Folia Microbiol (Praha). 2011;56(5):431-7. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0068-3>
 61. Troiano T, Harmanus C, Sanders IMJG, et al. Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes in edible marine bivalve molluscs in Italy. Int J Food Microbiol. 2015;208:30-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.002>
 62. Norman KN, Harvey RB, Andrews K, et al. Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2014;31(6):1127-9. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.888785>
 63. Metcalf DS, Costa MC, Dew WMV, Weese JS. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. Lett Appl Microbiol. 2010;51:600-2. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02933.x>
 64. Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. *Clostridium difficile* in ready-to eat salads Scotland. Emerg Infect Dis. 2009;15(5):817-8. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081186>
 65. al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol. 1996;45(2):133-7. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133>
 66. Öner Ç, Özdemir H. *Clostridium difficile*'nin gıdalarda bulunuşu ve halk sağlığı açısından önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. 2016; 14(1):36-49.
 67. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2008;14(Suppl5):S2-20. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01992.x>
 68. Søres LM. *Clostridium difficile* infection in Denmark: Epidemiology, risk factors and clinical presentation.

- PhD Thesis. Dept. of Microbiological Diagnostics Statens Serum Institut Copenhagen Denmark: 2012.
69. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, et al. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*;12(Suppl 6): S2-18.
70. Boyce JM. New approaches to decontamination of few approaches to decontamination of rooms after patients are discharged. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(6):515-7. <https://doi.org/10.1086/598999>
71. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Aghdam EM, Nazeri S. *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2104:916826. <https://doi.org/10.1155/2014/916826>
72. Rodriguez-Palacios A, LeJeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(9):3085-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.01589-10>
73. Candel-Pérez C, Ros-Berrueto G, Martínez-Graciá C. A review of *Clostridioides [Clostridium] difficile* occurrence through the food chain. *Food Microbiol*. 2019;77:118-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.012>