



Clostridium difficile: új élelmiszer-biztonsági veszély?

Kulcsszavak: *Clostridium difficile*, kórházi fertőzések, élelmiszer-biztonság, bélrendszer, zoonózis, élelmiszer-szennyezettség, bakteriológiai jellemzők, toxinok, inaktiválás, kimutatás, vizsgálati módszerek, kockázatbecslési feladatok.

Összefoglalás

A *Clostridium difficile* anaerob spóráképző és polipeptid toxinokat képző baktérium nagy virulenciájú törzsei a bél mikrobiota antibiotikumok okozta károsodása esetén csökkent immunitású egyéneknél életveszélyes vastagbélgyulladást okozhatnak. A *C. difficile* fertőzés (CDI) korunkra kiemelkedő jelentőségű kórházi járványügyi problémává vált. A jelen közlemény a közelmúlt releváns szakirodalmából válogatva hívja fel a figyelmet arra a problémára, hogy ez a kórokozó potenciálisan zoonotikus jellegű és élelmiszerekkel is közvetíthető lehet. Bár az élelmiszer okozta CDI-nek nincsenek bizonyított esetei, az utóbbi években a baktérium járványügyi jelentőségű törzseit kisebb-nagyobb gyakorisággal különféle élelmiszerekből is izolálták. A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban eredményesen alkalmaznak molekuláris diagnosztikai módszereket. Élelmiszer-biztonsági célokra azonban még sokirányú kutatás és szabványosítható vizsgálati módszerek kidolgozása, elfogadása és alkalmazása szükséges.

1. Összefoglalás

A *Clostridium difficile* anaerob spóráképző és polipeptid toxinokat képző baktérium, amely körülbelül az ezredforduló óta kiemelkedő jelentőségű kórházi járványügyi problémává vált hazánkban is (1), (2). Ennek oka az először Észak-Amerikában, majd rövidesen Európában is megjelent, nagy virulenciájú törzseinek az elterjedése. A fertőzés akkor alakul ki, ha a bél „normál” mikrobiotája (3) károsodik, például antibiotikum-használat következtében. A megbetegedés tünetei az enyhe hasmenéstől az életveszélyes „álhártyás vastagbél gyulladásig” (pseudomembranosus colitis-ig) terjednek. Különösen idősebb életkor és legyöngült immunrendszer fontos kockázati tényezői. Az előbbi tapasztalat az előregedő népességű társadalmakban különösen fontos problémává válik. Ugyanakkor a népesség kisebb-nagyobb hányada a baktérium klinikai tünetektől mentes „hordozója”. A nem toxinogén törzsei is széles körben elterjedtek természetben.

Ennek az „új” patogénnek az élelmiszer-biztonsági jelentőségét mutatja, hogy az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (EFSA) szakértői is foglalkoznak a *Clostridium difficile* potenciális problémájával (Szerítné Dr. Szabó Mária, személyes közlés). Különösen

megfontolandó, hogy a legvirulensebb PCR-ribotípusai (027 és 078) azok, amelyeket a leggyakrabban izolálnak élelmiszerekből is. Korunkra a *Clostridium difficile* fertőzés (*Clostridium difficile* infection, CDI) globális jellegűvé és a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*-okozta fertőzésekhez hasonló közegészségügyi és gazdasági kihívássá vált. Indokoltnak tartjuk ezért, hogy e folyóirat olvasóinak is felhívjuk a figyelmét a cikk címében jelzett témára, és a következőkben rövid áttekintést adjunk a közelmúltban megjelent releváns szakirodalomból kivonatolt ismeretanyagról. Áttekintésünkben elsősorban a Rodriguez-Palacios és szerzőtársai (4), (5) valamint Doyle (6) által írott tanulmányokat vettük alapul.

3. Rövid történeti áttekintés

Ezt a baktériumot első alkalommal már 1935-ben izolálták, de hosszú évekig gyermekek bél mikrobiotája humán patogenitással nem rendelkező tagjaként könyvelték el. Csupán az antibiotikumok használatának elterjedésével, az 1970-es évek közepén állapították meg, hogy fertőzést okoz, az antibiotikum által károsodott „bélflorában” elszaporodási lehetőséget nyerve. A XX. század utolsó évtizedeiben még vitatott volt, hogy a *C. difficile*-t élelmiszer közvetítheti-e (5). Élelmiszerből, mintegy mellékesen, elsőként 1996-

¹ Budapesti Corvinus Egyetem, Hűtő- és Állattermék-Technológiai Tanszék

² Budapesti Corvinus Egyetem, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

¹ Corvinus University of Budapest, Faculty of Food Science, Department of Refrigeration and Livestock's Products Technology

² Corvinus University of Budapest, Faculty of Food Science, Department of Microbiology and Biotechnology

ban izoláltak *Clostridium difficile*-t, vákuum-csomagoltan, hűtőtárolás közben megromlott darált marha- és sertéshús mintákból (7). Az azonban az utolsó két évtizedben egyértelművé vált, hogy a *C. difficile* fő rezervoárja az ember és a melegvérű állatok béltraktusa. Úgy látszik, hogy lassú szaporodása és gyenge szaporodási versenyképessége miatt az egészséges bélrendszerben nem jut szerephez, azonban a bél mikrobiótának bármilyen antibiotikummal történő megzavarása, vagy a mikrobiota egyensúlyának más okok miatti megbomlása érzékeny egyéneknél CDI-t okozhat

4. Élelmiszer-biztonsági vonatkozások

Az orvostudományi szakirodalommal ellentétben az élelmiszer-mikrobiológiai, élelmiszer-tudományi szakirodalomban *C. difficile*-vel kapcsolatos közlemények még csupán gyéren találhatók, de már az eddigiek is jelzik azt, hogy olyan, eddig nem kellően figyelembe vett kórokozóról van szó, amely potenciálisan zoonotikus jellegű, illetve élelmiszerrel is közvetíthető lehet (8). Bár közvetlenül élelmiszer-okozta CDI-nek nincsenek bizonyított esetei, nem lehet kizárni, hogy kórházon kívüli környezet és különösen állati eredetű, a baktériummal szennyezett élelmiszerek is forrásaivá válhatnak *C. difficile* fertőzésnek (4). 2006. óta járványügyi jelentőségű törzseit is izolálták különféle élelmiszerekből, főként húsok és egyes húskészítmények kiskereskedelmi mintáinak kisebb-nagyobb hányadából (9), (10), leginkább Kanadában és az USA-ban. Izoláltak azonban *Clostridium difficile*-t növényi termékekből is (11). Európában az élelmiszereken való előfordulása kisebb gyakoriságúnak látszik, mint Észak-Amerikában.

A baktérium szaporodási hőmérséklet-tartománya 25 és 45 °C közötti, 30 és 37 °C közötti optimális hőmérséklettel. Spórái miatt környezeti szennyezőként hosszú ideig életben maradhat. Bár konzervtechnológiai értelemben a spórái nem látszanak más spóras fajokhoz képest kimagaslóan hőtűrőnek, az ételek szokásos háztartási főzési körülményei kellő biztonsággal nem inaktiválják őket (12). A *C. difficile* toxinjainak stabilitásáról, különösen élelmiszer-összetevők jelenlétében, még nincs elegendő információ (6).

Vitatott, hogy probiotikumokkal (laktobacillusok, bifidobaktériumok, stb) mennyire megbízhatóan lehet a CDI ellen védekezni (13), (14), (15). Az alapvető higiéniai rendszabályok (kézmosás) és a dezinficiálás klasszikus módszerei természetesen nem nélkülözhetők ebben a kockázati körben sem, de figyelmet érdemes fordítani a spóra-inaktiválás innovatív, új módszereire, például az atmoszferikus hideg plazmával történő fertőtlenítési metodikára is (16), (17).

5. Vizsgálati szempontok

A molekuláris biológiai metodikák, főként a polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó „ribotyping” az emberi és állati eredetű minták fontos vizsgálati területe (2). A tenyésztéses módszerek kezdeti alkalmazásainak nehézségére a baktérium első elnevezése (*Bacillus difficilis*) is utal. Ma már azonban – legalábbis a klinikai mikrobiológia gyakorlatában – a különféle szelektív táptalajok használatát és egyéb más megoldásokat számos kereskedelmi készítmény és eszköz szolgálja, még ha költségesek is (2). A tenyészteteinek jellegzetes szaguk van, és UV fluoreszcenciát mutat-

nak. A toxin(ok) kimutatására enzim immunoassay (EIA) módszerek és immunkromatográfián alapuló tesztek használatosak. A glutamát-dehidrogenáz (GDH) metabolikus enzim kimutatása azoknak a laboratóriumoknak ajánlott, amelyek nincsenek felkészülve molekuláris diagnosztikai módszerek használatára. A GDH-t a *Clostridium difficile* törzsei nagy mennyiségben képzik, de az enzim kimutatása csak szűrővizsgálatra használható, mert egy másik baktérium, a *Clostridium sordelli* is termeli. A viszonylag olcsó GDH teszt pozitivitása esetén ezért a *C. difficile* jelenlétét más módszerekkel meg kell erősíteni. A negatív szűrővizsgálati eredményt is nagy információ értékűnek tekintik a klinikai mikrobiológiában. Olyan gyári készítmények is forgalomban vannak, amelyek kombinálják a GDH- és a toxinkimutatást. Az élelmiszer-biztonsági kockázatbecslés céljára azonban még sokirányú kutatás és szabványosított, összehasonlítható módszerek kidolgozása, elfogadása és alkalmazása lenne szükséges. A genomikai és a rendszerbiológiai szemléletnek az elterjedése (18) ilyen értelemben is fontos kihívássá válik a XXI. század élelmiszer-mikrobiológusai számára.

6. Irodalom/References

- (1) OEK (2013) Összefoglaló az egészségügyi ellátással összefüggő *Clostridium difficile* fertőzések hazai járványügyi helyzetéről. EPINFO, Epidemiológiai Információs Hetilap, Országos Epidemiológiai Központ, 20 (16) 169-173.
- (2) Urbán, E. (2013): A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei. IME, 12 (8) 24-30.
- (3) Farkas J. (2013): Bél mikrobiotánk táplálkozás-tudományi és élelmiszer-vizsgálati jelentősége. Élelmiszervizsgáló Közlemények, 59 (3) 89-94.
- (4) Rodriguez-Palacios, A., Le Jeune, J. T. & Hoover, D. G. (2012): *Clostridium difficile*: an emerging food safety risk. Food Technol., (9) 40-48.
- (5) Rodriguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T. R., LeJeune, J. T. (2013) *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. Animal Health Reviews, pp. 1-19. <http://journals.cambridge.org/action/displayJournal?jid=AHR>
- (6) Doyle, M. E. (2013): *Clostridium difficile* as a risk associated with animal sources. FRI Food Safety Review. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, January 2013. pp. 1-18.
- (7) Broda, D. M., De Lacy, K. M., Bell, R. G. et al. (1996): Psychrotrophic *Clostridium* sp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. Int. J. Food Microbiol., 29, 335-352.
- (8) Hensgens, M. P., Keessen, E.C., Squire, M. M. et al. (2012) *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? Clin. Microbiol. Infect., 18 (7) 635-645.
- (9) Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T. & Weese, J. S. (2007): *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerging Infectious Diseases, 13, 485-487.
- (10) Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A. et al. (2010) *Clostridium difficile* in raw products of animal origin.

Clostridium difficile: a new food safety hazard?

József Farkas¹ and Csilla Mohácsiné Farkas²

Keywords: *Clostridium difficile*, hospital infections, food safety, intestinal tract, zoonosis, food contamination, bacteriological characteristics, toxins, inactivation, detection, analytical methods, risk assessment tasks.

1. Summary

When the gut microbiota is damaged by antibiotics, life-threatening inflammation of the colon can be caused in persons with a weakened immune system by highly virulent strains of *Clostridium difficile*, an anaerobic spore-forming and polypeptide toxin producing bacterium. *C. difficile* infection (CDI) has become an epidemic problem of paramount importance in hospitals. In the present paper, surveying relevant recent literature, attention is called to the problem that this pathogen can potentially zoonotic and might be transmitted with foods. Although there are no proven cases of foodborne CDI, strains of epidemiological importance of the bacteria have been isolated from different foods more or less frequently in recent years. Molecular diagnostic methods are employed successfully in clinical microbiological practice. However, for food safety purposes, multifaceted research is still necessary, as well as the development, adoption and implementation of analytical methods that can be standardized.

2. Introduction

Clostridium difficile is an anaerobic spore-forming and polypeptide toxin producing bacterium that has been an epidemiological problem of paramount importance in Hungarian hospitals as well, since the turn of the millennium (1), (2). The reason for this is the spreading of its highly virulent strains first in North America and then, shortly afterwards, in Europe. Infection occurs when the „normal” gut microbiota is damaged (3), due to, for instance, the use of antibiotics. Symptoms of the illness range from mild diarrhea to life-threatening pseudomembranous colitis. Advanced age and a weakened immune system are especially important risk factors. These factors can cause a particularly important problem in societies with aging populations. However, a smaller or larger fraction of the population is a „carrier” of the bacterium, free of clinical symptoms. Nontoxic strains of it are also widespread in nature.

The importance of this „new” pathogen from a food safety point of view is demonstrated by the potential problem of fact *Clostridium difficile* is also investigated by experts of the European Food Safety Authority (EFSA; Dr. Mária Szeitzné Szabó, personal communication). It is especially important to consider that the most virulent PCR ribotypes (027 and 078) are the ones that are isolated from foods most frequently. By this time, *Clostridium difficile* infection (CDI) has become global in nature, a public health and economic challenge similar to infections caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Therefore, we consider it appropriate to draw the attention

of the readers of this journal to the subject indicated in the title of the article, and in the next section a short overview of relevant recent literature is given. This review is based mostly on studies published by Rodriguez-Palacios et al. (4), (5) and Doyle (6).

3. Brief historical overview

This bacterium was first isolated in 1935, but for many years it was considered a member of children’s gut microbiota with no human pathogenicity. It was only determined in the mid-1970s, after the use of antibiotics had become widespread, that it could cause an infection when proliferating in the „gut flora” damaged by antibiotics. In the last decades of the 20th century it was still in question whether *C. difficile* can be transmitted by foods (5). *Clostridium difficile* was first isolated from foods in 1996, almost as an aside, from vacuum packaged ground beef and pork samples that perished during refrigerated storage (7). However, it became evident in the last two decades that the main reservoirs of *C. difficile* are the intestinal tracts of humans and warm-blooded animals. It seems that, because of its slow growth and its low proliferation competitiveness, it does not play a role in a healthy intestinal tract, however, any disturbance to the gut microbiota by antibiotics, or a disruption of the balance of the microbiota due to other factors, can cause CDI in sensitive individuals.

4. Food safety aspects

Contrary to medical literature, publication related to *C. difficile* only rarely found in food microbiology and food science literature, but the ones so far already show that it is a pathogen, not given the proper attention previously, that is potentially zoonotic in nature and can be transmitted by foods (8). Although there are no known cases of directly food-induced CDI, it cannot be excluded that non-hospital environment and especially foods of animal origin, contaminated with the bacterium, can become sources of *C. difficile* infections (4). Since 2006, its strains of epidemiological importance have been isolated from various foods, especially from smaller and larger fractions of retail samples of meats and meat products (9), (10), mainly in Canada and the USA. However, *Clostridium difficile* was also isolated from plant products (11). It seems that it occurs in foods in Europe less frequently than it does in North America.

Growth temperature range of the bacterium is between 25 and 45 °C, with the optimal temperature being between 30 and 37 °C. Because of its spores, it can survive as an environmental contaminant for a long time. Although in terms of canned food technology its spores do not appear to be especially heat resistant compared to other spore-forming species, they are not inactivated sufficiently under normal household cooking conditions (12). There is still a lack of information on the stability of *C. difficile* toxins, especially in the presence of food ingredients (6).

It is disputed how effective protection probiotics (lactobacilli, bifidobacteria, etc.) provide against CDI (13), (14), (15). Naturally, basic hygiene measures (handwashing) and classical methods of disinfection cannot be avoided by people at risk, but it is also worthwhile to pay attention to new, innovative methods of spore inactivation, such as cold atmospheric plasma disinfection (16), (17).

Int. J. Food Microbiol., 138, 172-175.

(11) Metcalf, D. S., Costa, M. C. Dew, M. W. & Weese, J. S.. (2010): *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. Lett. Appl. Microbiol., 51, 600-602.

(12) Rodriguez-Palacios, A. & Le Jeune, J. T. (2011) Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. Appl. Environ. Microbiol., 77, 3085-3091.

(13) NDA (2010): EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114 001 plus yoghurt symbiosis (Actimel®) and reduction of *Clostridium difficile* toxins in the gut of patients receiving antibiotics and reduced risk of acute diarrhoea in receiving antibiotics pursuant to Article 14 of Regulation (EC) no. 1924/2006. EFSA J., 8, 1903. www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

(14) Guarner, F., Sanders, M. E., Gibson, G. et al.

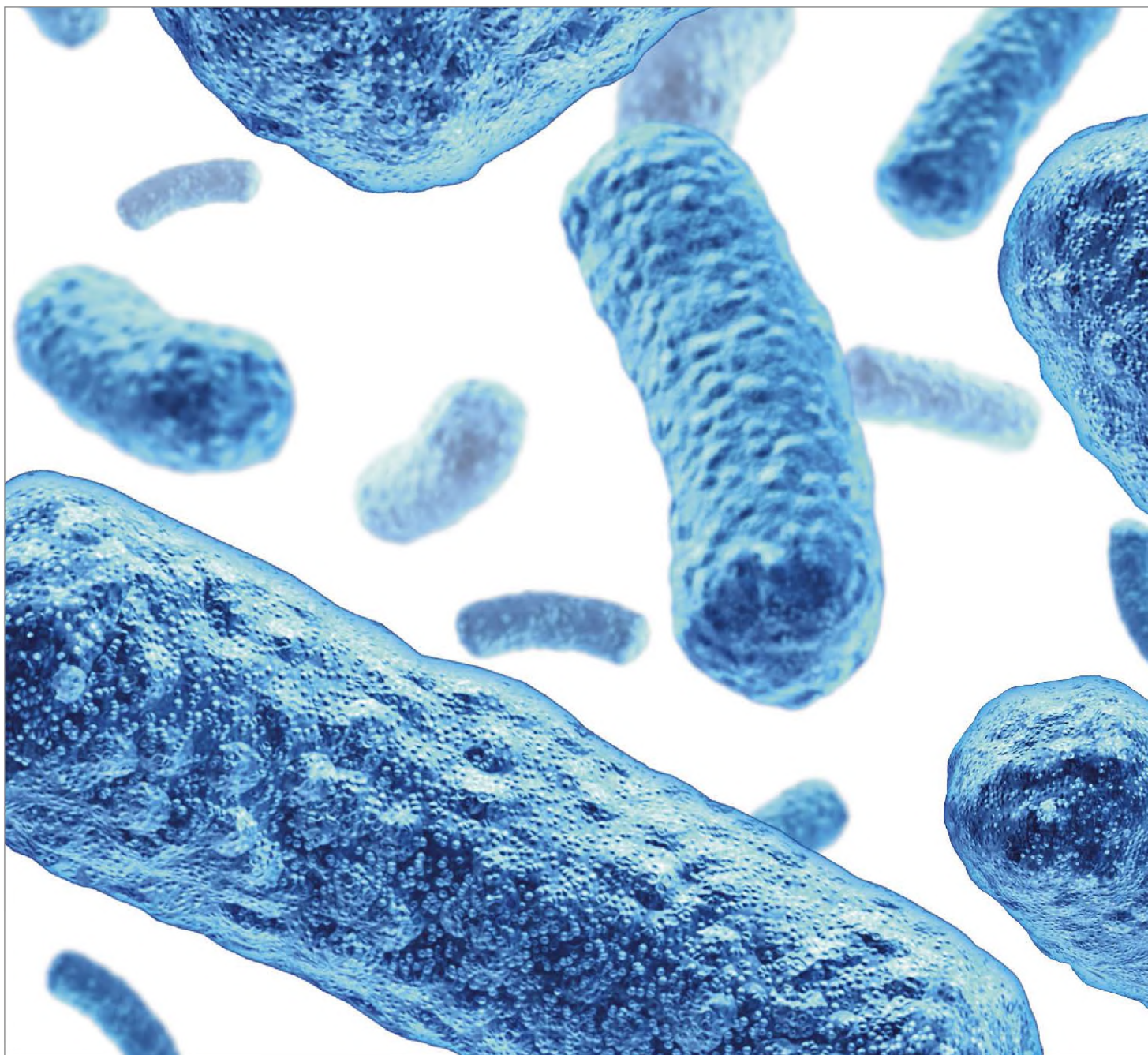
(2011): Probiotic and prebiotic claims in Europe: seeking a clear roadmap. Letter to the Editor. British J. Nutrition, pp. 1-3.

(15) De Vrese, M. & Scherzenmeier, J. (2012): The role of probiotics in maintaining a healthy gut when antibiotics are used. Annals Gastroenterol. & Hepatol., 3 (1) 15

(16) Farkas J. (2012): Igéretes, új élelmiszeripari fertőtlenítő módszer: az atmoszferikus hideg plazma alkalmazása. Élelmiszer Tudomány Technológia, 66, 2-3.

(17) Tseng, S., Abramzon, N., Jackson, J. O., Liu, W. J. (2012): Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* species. Appl. Microbiol. Biotechnol., 93, 2563-2570.

(18) Farkas J. & Mohácsiné Farkas Cs. (2013): Új tudományterületek, amelyekre az élelmiszer mikrobiológusnak is érdemes odafigyelni. Élelmiszer Tudomány Technológia, 67 (1) 7-11.



5. Analytical aspects

Molecular biological methodologies, especially „ribotyping” by polymerase chain reaction (PCR), are an important area of analysis for samples of human and animal origin (2). Difficulties of the initial application of culturing methods is indicated by the first name of the bacterium (*Bacillus difficilis*). These days, however, at least in the practice of clinical microbiology, the use of selective media and other solutions are aided by several commercial products and instruments, even though these are quite costly (2).

Its cultures have a characteristic odor, and show UV fluorescence. To detect the toxin(s), enzyme immunoassay (EIA) methods and tests based on immunochromatography are used. Detection of the metabolic enzyme glutamate dehydrogenase (GDH) is recommended for laboratories that are not equipped for the use of molecular diagnostics

methods. GDH is produced by the strains of *Clostridium difficile* in large quantities, but detection of the enzyme can be used only for screening, because it is also produced by another bacterium, *Clostridium sordelli*. Therefore, the presence of *C. difficile* has to be confirmed by other methods, if the results of the relatively cheap GDH test are positive. Negative screening test results are also considered highly valuable information in clinical microbiology.

There are also commercial products on the market that combine GDH and toxin detection. However, for food safety risk assessment, multifaceted research is still necessary, as well as the development, adoption and implementation of analytical methods that can be standardized and compared. For food microbiologists of the 21st century, spreading of the genomics and system biology approach (18) will be a major challenge in this sense as well.

