



Prevalentie *Clostridium difficile* in vlees

**nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit
TWO Laboratorium**

december 2010

SAMENVATTING

Humane infecties veroorzaakt door *Clostridium difficile* zijn meestal gerelateerd aan recente antibioticumtherapie en komen vooral voor bij ouderen en bij langdurige ziekenhuisopname. Recent is een toename geconstateerd van het aantal *C. difficile* infecties veroorzaakt door stammen die niet afkomstig zijn uit de ziekenhuisomgeving. Deze stammen zouden overgebracht kunnen worden via dieren of voedingsmiddelen. Om de mogelijke blootstelling aan *C. difficile* via voedsel na te gaan, werd een onderzoek uitgevoerd naar de prevalentie van *C. difficile* in vlees. Monsters van verschillende soorten onverhit vlees werden verzameld in de detailhandel en onderzocht op de aanwezigheid van *C. difficile* m.b.v. een selectieve ophopingsmethode in *C. difficile* bouillon, gevolgd door een alcohol-shock behandeling en uitplaten op een *C. difficile* selectief medium. *C. difficile* isolaten werden onderzocht op de aanwezigheid van toxine-genen en werden getypeerd m.b.v. PCR-ribotypering. Uit 8 (1,6%) van 500 onderzochte vleesmonsters werd *C. difficile* geïsoleerd; 1 uit lamsvlees (6,3%) en 7 uit kipvlees (2,7%). De geïsoleerde stammen bleken te behoren tot ribotypes die verschillen van de typen die doorgaans bij patiënten in Nederland worden aangetroffen, met uitzondering van *C. difficile* PCR ribotype 001, gevonden in een kipvleesmonster. Het is waarschijnlijk dat andere matrices dan vlees een bron kunnen zijn voor *C. difficile* infecties bij de mens.

SUMMARY

Recent reports indicate that a large proportion of community-acquired *Clostridium difficile* infections (CA-CDI) are not linked to recent antibiotic therapy, older age, significant comorbidity or previous hospitalization. Possible community sources for CA-CDI include animals and food, and therefore a surveillance study on the prevalence of *C. difficile* in meat was performed. Samples of different meat species were collected from the retail trade and analyzed for the presence of *C. difficile* using a method that included selective enrichment in *C. difficile* broth, subsequent alcohol shock-treatment and plating onto *C. difficile* selective medium. *C. difficile* isolates were tested for the presence of toxin genes and were typed using PCR ribotyping. Of 500 samples tested, 8 (1.6%) were positive for the presence of *C. difficile*: 1 from lamb (6.3%) and 7 from chicken meat (2.7%). The isolated strains belonged to PCR ribotypes different from those that are currently most frequently found in patients with CDI in the Netherlands, except for *C. difficile* PCR ribotype 001 which was found in one chicken meat sample. This observation suggests that other matrices than meat may serve as a source for CA-CDI.

1. INLEIDING

Clostridium difficile is een algemeen voorkomende Gram-positieve, obligaet anaerobe, sporevormende, toxineproducerende bacterie. De sporen kunnen langdurig overleven in het milieu door relatieve ongevoeligheid voor verhitting, drogen en desinfectantia.

C. difficile is aanwezig in de darmflora van ca. 2% van gezonde volwassenen en bij 10-20% van de ouderen, maar slechts enkelen worden er ziek van. Pas als de drager van *C. difficile* bepaalde antibiotica gebruikt en de weerstand ernstig is afgenomen kan de bacterie infecties veroorzaken. Symptomen variëren van diarree (CDAD – *Clostridium difficile* associated diarrhoea) tot levensbedreigende pseudomembraneuze colitis. Geïsoleerde gevallen of clusters treden meestal op in het ziekenhuis en zijn in de meeste gevallen gerelateerd aan gebruik van antibiotica. *C. difficile* kan worden overgebracht door contacten tussen personen of via de omgeving.

De afgelopen jaren is CDAD ook geconstateerd bij verschillende diersoorten. Uit recent onderzoek is gebleken dat er een overlap is tussen *C. difficile* isolaten die bij dieren voorkomen en humane isolaten. Met name de meer virulente stammen van PCR ribotype 027 en 078 worden hierbij steeds vaker geïsoleerd.

Infecties door *C. difficile* worden steeds vaker gezien bij patiënten buiten het ziekenhuis en zonder relatie met antibioticagebruik. Besmetting met *C. difficile* zou plaats kunnen vinden vanuit de omgeving, via dieren en voedingsmiddelen. In dit onderzoek werd de mogelijke besmetting van vlees met *C. difficile* onderzocht.

2. MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Monsters

In totaal 500 monsters van onverhit vlees werden genomen in de detailhandel (supermarkten, slagers, poeliers, etc.). De bemonstering vond plaats in de periode oktober 2008 tot maart 2009. De volgende vleessoorten werden bemonsterd: verkleind of gemalen varkens-, rund-, kalfs- en lamsvlees en kipdelen, zonder toevoeging van specerijen en hulpstoffen. De monsters werden na aankomst op het laboratorium gekoeld bewaard (0-2°C) en binnen 48 uur na bemonstering in onderzoek genomen.

2.2 Microbiologisch onderzoek

De monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van *C. difficile* met een ophopingmethode gebaseerd op de methode beschreven door Rodriguez-Palacios et al. (2007). Deze detectiemethode bestaat uit ophoping van 5 g monster in 20 ml *C. difficile* broth (CDB). De samenstelling van CDB (per litre of medium): proteose peptone (40,0 g), disodium hydrogen phosphate (5,0 g), potassium dihydrogen phosphate (1,0 g), magnesium sulphate (0,1 g), sodium chloride (2,0 g), fructose (6,0 g), sodium taurocholate (1,0 g), laked horse blood (Oxoid SR0048C) (50 ml), *C. difficile* selective supplement (Oxoid SR0173E) (2 vials). Incubatie van CDB vond plaats gedurende 10 tot 15 dagen bij 37°C, onder anaërobe omstandigheden. Van de ophopingscultuur werd 2 ml toegevoegd aan 2 ml ethanol (96%) in een centrifugebuis en gehomogeniseerd gedurende 50 min op een schudapparaat. Na centrifugeren (3,800 x g gedurende 10 min), werd een entoog van het sediment uitgestreken op *Clostridium difficile* moxolactam norfloxacin (CDMN) agar (Mediaproducs bv, Groningen). De platen werden geïncubeerd gedurende 24 tot 48 uur bij 37°C, onder anaërobe omstandigheden en maximaal 5 verdachte kolonies werden uitgestreken op tryptone soya agar (Oxoid CM0131). Een eerste bevestiging van verdachte kolonies vond plaats m.b.v. agglutinatie met de *C. difficile* test kit (Oxoid DR1107A). Bij toevoegproeven bleek dat de detectiegrens van deze methode voor gehakt ongeveer 2 kve per 5 g was.

Verdere identificatie en typering van *C. difficile* isolaten werd uitgevoerd m.b.v. real-time PCR, gericht op de genen triose phosphate isomerase (*tpi*), toxine A (*tcdA*) en toxine B (*tcdB*). De gebruikte primers en probes zijn vermeld in tabel 1. Verdere karakterisering en typering vond plaats door het National Reference Laboratory for *Clostridium difficile* bij het Leiden University Medical Center (Dr. Ed J. Kuijper). De isolaten werden getest op aanwezigheid van het glutamaat dehydrogenase gen en de genen *cdtA* and *cdtB*, die coderen voor resp. de enzymatische component en het bindingsdomein van de actin-specific ADP-ribosyltransferase (CDT) (binary toxin), zoals beschreven door Paltansing et al., (2007). Verder karakterisering door PCR ribotypering werd uitgevoerd zoals beschreven door Bidet et al. (2000).

3. RESULTATEN

De resultaten van het prevalentie-onderzoek zijn samengevat in tabel 2. *C. difficile* stammen werden geïsoleerd uit een monster lamsvlees en uit monsters kipvlees, maar niet uit de onderzochte monsters rund-, varkens- en kalfsvlees. Typeringsgegevens betreffende de *C. difficile* isolaten zijn te vinden in tabel 3.

4. DISCUSSIE

C. difficile werd in dit onderzoek niet geïsoleerd uit monsters rund-, varkens- en kalfsvlees. Recent gepubliceerde resultaten van surveillance-onderzoek betreffende de isolatie van *C. difficile* uit onverhit rundvlees laten relatief hoge percentages, (2,4 tot 42,4%) positieve monsters uit de retail zien (Rodriguez-Palacios et al., 2009; Songer et al., 2009; Von Abercron et al., 2009; Weese et al., 2009). *C. difficile* werd ook gevonden in monsters varkensvlees, waarbij 12 to 41,3% van de monsters positief waren (Songer et al., 2009; Weese et al., 2009).

Maar ook lage prevalenties of afwezigheid van *C. difficile* in rauw vlees werd gerapporteerd. Von Abercorn et al. (2009) vonden bij onderzoek van vleesmonsters alleen in rundvlees *C. difficile*. In Frankrijk (Bouttier et al., 2010) en Oostenrijk werden lage prevalenties (3%) voor *C. difficile* in gehaktmonsters gevonden en werden positieve monsters alleen gevonden bij gemengd rund/varkens gehakt en niet in rundergehakt (Jöbstl et al., 2010). *C. difficile* sporen werden aangetoond in 3 (7.5%) van 40 monsters salades (Bakri et al., 2009) en werden geïsoleerd uit 29% van 100 kippenfaeces (Simango and Mwakurudza, 2008). Bij een recent Zwitsers onderzoek bleek slechts één faecesmonster positief van 204 kalveren en 165 varkens (Hoffer et al., 2010).

De verschillen in de isolatiefrequenties gevonden in de verschillende landen zullen vooral het gevolg zijn van de toepassing van verschillende detectie- en isolatiemethoden. Het is duidelijk dat verdere optimalisering en normalisering van methoden voor de isolatie van *C. difficile* uit voedingsmiddelen noodzakelijk zijn.

Tot nu toe is er geen duidelijk verband tussen land van herkomst, vleesproducenten, bewaarcondities, etc. gevonden. Een mogelijk seizoenseffect werd waargenomen, met een hoogste prevalentie in de winterperiode (Rodriguez-Palacios et al., 2009).

De herkomst van *C. difficile* in vlees is niet duidelijk. Karkassen kunnen tijdens het slachtproces verontreinigd worden met darminhoud of vanuit de productieomgeving. Besmetting bij retailers zou vanuit de omgeving of via personeel kunnen komen. De goede overlevingsmogelijkheden van *C. difficile* sporen in de omgeving vergroten de mogelijkheden voor besmetting van dieren en voedingsmiddelen.

Bij kwantificering van de *C. difficile* besmetting van vlees bleek dat in het algemeen lage aantallen, variërend van 60 to 240 sporen/g, kunnen worden gevonden (Weese et al., 2009). De betekenis hiervan is niet duidelijk, aangezien de infectieuze dosis voor *C. difficile* niet bekend is.

Bij typering van *C. difficile* stammen wordt vooral gebruik gemaakt van PCR ribotyping, vanwege het scheidingsvermogen, de reproduceerbaarheid en de eenvoud van deze techniek (Bidet et al., 2000).

Recent is een bijzonder virulente stam, PCR ribotype (RT) 027, opgekomen in verschillende landen, in relatie tot ziekenhuisinfecties (Kuijper et al., 2007, 2008). Stammen van dit ribotype werden in de door ons onderzochte vleesmonsters niet gevonden.

Een andere opkomende stam van het type RT 078 werd recent gevonden bij mensen en dieren in de Verenigde Staten en Canada. RT 078 stammen werden vooral geïsoleerd uit varkens en kalveren (Keel et al., 2007; Weese et al., 2009), hoewel dit type recent ook in 12,8% van monsters kipvlees in Canada werd geïsoleerd (Weese et al., 2010). RT 078 stammen werden ook gevonden op varkensbedrijven in Nederland (Debast et al., 2009). De RT 078 isolaten afkomstig uit dieren bleken vaak genetisch homoloog met humane isolaten (Goorhuis et al., 2008b), hetgeen een gemeenschappelijke bron suggereert. RT 078 is nu het op twee na meest geïsoleerde ribotype in Nederland bij patiënten met CDI. De afwezigheid van dit type in de onderzochte vleesmonsters doet vermoeden dat besmet vlees geen belangrijke bron van *C. difficile* vormt.

De *C. difficile* stammen geïsoleerd uit de vleesmonsters in dit onderzoek behoorden tot de typen RT 001, 003, 045, 071 en 087. De stammen uit de monsters kipvlees 111 en 118 waren van hetzelfde ribotype. Deze monsters waren op dezelfde dag gekocht in verschillende supermarkten van dezelfde keten, hetgeen een gemeenschappelijke besmettingsbron suggereert. Van de vleesisolaten was alleen type RT 001 een bij het National Reference Laboratory in Leiden frequent geïsoleerd type. Van totaal 2.788 *C. difficile* stammen geïsoleerd uit patiënten met CDI en ingestuurd bij het referentie laboratorium tussen april 2005 and juni 2009 waren RT 001, 014 en 078 de meest voorkomende typen, terwijl RT 003, 045 en 087 slecht zelden werden geïsoleerd (Hensgens et al., 2009). RT 001, 003, 045, 071 en 087 waren ook niet vertegenwoordigd bij de RTs die gevonden werden in een recent afgerond onderzoek naar CA-CDI in Nederland (Bauer et al., 2009). Gedurende drie maanden in 2007-2008, testten drie laboratoria in Nederland 2.443 faecesmonsters van patiënten met diarree die een huisarts bezochten. Zevenendertig (1,5%) waren positief voor toxineproducerende *C. difficile* en behoorden tot 13 verschillende PCR-ribotypes, terwijl 24% behoorden tot niet-typeerbare RTs. Het gegeven dat deze RTs geen overlap laten zien met RTs gevonden in vlees, suggereert dat er andere bronnen dan vlees zijn voor het ontstaan van CA-CDI.

Dit onderzoek en andere gepubliceerde onderzoeken laten zien dat transmissie van *C. difficile* naar de mens via de voedselketen mogelijk is. Het besmettingspercentage van voedingsmiddelen in verschillende landen varieert sterk. Tot nu toe zijn geen gevallen beschreven van *C. difficile* infectie als gevolg van consumptie van besmet voedsel.

5. CONCLUSIE

Clostridium difficile komt voor in onverhit vlees van landbouwhuisdieren, met name kip- en lamsvlees. De uit vlees geïsoleerde *C. difficile*-stammen behoorden grotendeels tot ribotypen die verschillen van die van humaan klinische stammen.

6. LITERATUUR

- Bakri, M.M., Brown, D.J., Butcher, J.P., Sutherland, A.D., 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerging Infectious Diseases* 15, 817-818.
- Bauer, M.P., Veenendaal, D., Verhoef, L., Bloembergen, P., van Dissel, J.T., Kuijper, E.J., 2009. Clinical and microbiological characteristics of community-onset *Clostridium difficile* infection in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 1087-1092.
- Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmee, M., Rossier, A., Barbur, F., Petit, J.C., 2000. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2484-2487.
- Bouttier, S., Barc, M.C., Felix, B., Lambert, S., Collignon, A., Barbut, F., 2010. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerging Infectious Diseases* 16, 733-735.
- Chernak, E., Johnson, C.C., Weltman, A., McDonald, L.C., Wiggs, L., Killgore, G., Thompson, A., LeMaile-Williams, M., Tan, E., Lewis, F.M., 2005. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk—four states. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 54, 1201–1205.
- Debast, S.B., van Leengoed, L.A., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E.J., Bergwerff, A.A. 2009. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental Microbiology* 11, 505-511.
- Dial, S., Kezouh, A., Dascal, A., Barkun, A., Suissa, S., 2008. Patterns of antibiotic use and risk of hospital admission because of *Clostridium difficile* infection. *Canadian Medical Association Journal* 179, 767-772.
- Goorhuis, A., Debast, S.B., van Leengoed, L.A., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A.A., Kuijper, E.J., 2008a. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1157-1158.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S.B., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A.A., Dekker, F.W., Kuijper, E.J., 2008b. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases* 47, 162-170.
- Hensgens, M.P., Goorhuis, A., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Kuijper, E.J., 2009. Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveillance* Nov 12;14 (45). pii:19402.
- Hoffer, E., Haechler, H., Frei, R., Stephan, R., 2010. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. *Journal of Food Protection* 73, 973-975.
- Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C., Limbago, B.M., 2008. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1039-1045.
- Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Köfer, J., Wagner, M., 2010. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 138, 172-175.
- Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, S., Songer, J.G., 2007. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1963-1964.

- Kuijper, E.J., van Dissel, J.T., Wilcox, M.H., 2007. *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Current Opinion in Infectious Diseases* 20, 376-383.
- Kuijper, E.J., Barbut, F., Brazier, J.S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T., Lambert, M.L., Drudy, D., Fitzpatrick, F., Wiuff, C., Brown, D.J., Coia, J.E., Pituch, H., Reichert, P., Even, J., Mossong, J., Widmer, A.F., Olsen, K.E., Allerberger, F., Notermans, D.W., Delmée, M., Coignard, B., Wilcox, M., Patel, B., Frei, R., Nagy, E., Bouza, E., Marin, M., Åkerlund, T., Virolainen-Julkunen, A., Lyytikäinen, O., Kotila, S., Ingebretsen, A., Smyth, B., Rooney, P., Poxton, I.R., Monnet, D.L., 2008. Update of *Clostridium difficile* due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveillance* Jul 31;13 (31). pii:18942.
- Kuijper, E.J., van Dissel, J.T., 2008. Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside healthcare facilities. *Canadian Medical Association Journal* 179, 747-748.
- Paltansing, S., van den Berg, R.J., Guseinova, R.A., Visser, C.E., van der Vorm, E.R., Kuijper, E.J., 2007. Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 1058-1064.
- 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.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R.J., Staempfli, H.R., Daignault, D., Janecko, N., Avery, B.P., Martin, H., Thompson, A.D., McDonald, L.C., Limbago, B., Weese, J.S., 2009. Possibility of seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 15, 802-805.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., Gerding, D.N., 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 7, 526-536.
- Simango, C., Mwakurudza, S., 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. *International Journal of Food Microbiology* 124, 268-270.
- 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, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 15, 819-821.
- Von Abercron, S.M.M., Karlsson, F., Wigh, G.T., Wierup, M., Krovacek, K., 2009. Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *Journal of Food Protection* 72, 1732-1734.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5009-5011.
- Weese, J.S., Reid-Smith, R.J., Avery, B.P., Rousseau, J., 2010. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Letters in Applied Microbiology* 50, 362-365.
- Wilcox, M.H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C.D., Fawley, W.N., 2008. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 388-396.

Tabel 1. Primers en probes toegepast voor identificatie van *Clostridium difficile* en bepaling van het toxigene type m.b.v. real-time PCR

| Target gene | Designation ^a | Sequence (5' → 3') | Positie | GenBank accession no. |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|
| <i>tpi</i> | C.diff-TPI-F | TGAATGTCCTATTACAACATAGTCC | 3707412-3707436 | AM180355 |
| | C.diff-TPI-R | ATAAAGATAGGTGCTCAAAATATGC | 3707525-3707501 | |
| | C.diff-TPI-P | AGAGGTGAACTTCTCCTGTAAATGCTCCT | 3707458-3707487 | |
| <i>tcdA</i> | C.diff-TCDA-F | AAATAGCACCATACTTACAAGTAGG | 797185-797209 | AM180355 |
| | C.diff-TCDA-R | GCATAAGCTCCTGGACCAC | 797263-797245 | |
| | C.diff-TCDA-P | ATGCCAGAAGCTCGCTCCACAATAAGTT | 797214-797241 | |
| <i>tcdB</i> | C.diff-TCDB-F | GCACCATCAATAACATATAGAGAGC | 790960-790984 | AM180355 |
| | C.diff-TCDB-R | GTTTTGTGCCATCATTTTCTAAGC | 791140-791117 | |
| | C.diff-TCDB-P | TGTCCATCCTGTTTCCCAAGCAAATACTCT | 791103-791074 | |

^a F = Forward primer; R = Reverse primer; P = Probe, labelled at the 5'-end with the reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and at the 3'-end with the black-hole quencher (BHQ).

Tabel 2. Prevalentie van *Clostridium difficile* in rauw vlees

| Vleessoort | n | Aantal (%) positief |
|---------------|------------|---------------------|
| rund | 145 | 0 |
| varken | 63 | 0 |
| kalf | 19 | 0 |
| lam | 16 | 1 (6,3) |
| kip | 257 | 7 (2,7) |
| totaal | 500 | 8 (1,6) |

Tabel 3. Identificatie and karakterisering van *Clostridium difficile* isolaten uit vlees

| Monster code | Vlees soort | <i>C. difficile</i> agglutination test (Oxoid) | Resultaten real-time PCR voor: | | | | | | PCR ribotype |
|--------------|-------------|------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| | | | <i>GluD</i> ^a | <i>tpi</i> ^b | <i>tcdA</i> ^c | <i>tcdB</i> ^d | <i>cdtA</i> ^e | <i>cdtB</i> ^f | |
| 10 | kip | + | + | + | + | + | - | - | 001 |
| 111 | kip | + | + | + | + | + | - | - | 003 |
| 118 | kip | + | + | + | + | + | - | - | 003 |
| 164 | kip | + | + | + | + | + | - | - | 087 |
| 320 | lam | + | + | + | + | + | + | + | 045 |
| 321 | kip | + | + | + | - | - | - | - | NT ^g |
| 327 | kip | + | + | + | - | - | - | - | NT |
| 422 | kip | + | + | + | - | - | - | - | 071 |

^a *GluD* = glutamate dehydrogenase gen

^b *tpi* = triose phosphate isomerase housekeeping gen

^c *tcdA* = toxin A gen

^d *tcdB* = toxin B gen

^e *cdtA* = gene encoding the enzymatic component of the actin-specific ADP-ribosyltransferase (CDT) (binary toxin)

^f *cdtB* = gene encoding the binding domain of the CDT

^g NT = Non-typable by the National Reference Laboratory for *Clostridium difficile*