

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vid ŠUMAK

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH PRISTOPOV ZA PCR-
RIBOTIPIZACIJO BAKTERIJE *Clostridium difficile***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vid ŠUMAK

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH PRISTOPOV ZA PCR-RIBOTIPIZACIJO
BAKTERIJE *Clostridium difficile***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF DIFFERENT APPROACHES FOR PCR-
RIBOTYPING OF *Clostridium difficile***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Oddelka za mikrobiološke raziskave, Centra za mikrobiologijo na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor.

Študijska komisija univerzitetnega študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec, za somentorico asist. dr. Sandro Janežič in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Somentorica: asist. dr. Sandra Janežič

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: asist. dr. Sandra JANEŽIČ

Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo,

Oddelek za mikrobiološke raziskave

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Vid Šumak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25.08+577.21.08:579.852.13(043)=163.6
KG	<i>Clostridium difficile</i> /črevesne okužbe/tipizacija/molekularne metode/PCR-ribotipizacija/začetni oligonukleotidi/gelska elektroforeza/kapilarna elektroforeza/QIAxcel/sekvenator/Beckman Coulter CEQ 8000
AV	ŠUMAK, Vid
SA	MANDIĆ MULEC, Ines (mentorica)/JANEŽIČ, Sandra (somentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	PRIMERJAVA RAZLIČNIH PRISTOPOV ZA PCR-RIBOTIPIZACIJO BAKTERIJE <i>Clostridium difficile</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 67 str., 8 pregl., 5 sl., 2 pril., 155 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterija <i>Clostridium difficile</i> je pomemben povzročitelj bolnišničnih črevesnih okužb. Za spremljanje širjenja okužb se danes po svetu uporablajo različne tipizacijske metode, od katerih se je kot metoda izbora uveljavila PCR-ribotipizacija, pri kateri se ve razdelimo v različne genotipe glede na variabilnost regije med genoma za 16S in 23S rRNK (ISR). Za PCR-ribotipizacijo so opisani trije pari začetnih oligonukleotidov, s katerimi pomnožujemo ISR. Med seboj se razlikujejo v mestih prileganja na gena za 16S oziroma 23S rRNK. Na naboru 48 sevov bakterije <i>C. difficile</i> smo preverili, ali z vsemi opisanimi pari začetnih oligonukleotidov dobimo primerljive vzorce fragmentov in kako so rezultati primerljivi med posameznimi elektroforeznimi sistemi (agarozna gelska elektroforeza, kapilarna gelska elektroforeza na sistemu QIAxcel in na sekvenatorju) ter določili diskriminаторno moč posameznega sistema. Vzorci fragmentov, ki smo jih dobili z različnimi pari začetnih oligonukleotidov, so se med seboj dokaj dobro ujemali. Edina razlika med njimi je bila v velikosti posameznih fragmentov zaradi razlik v mestih prileganja ter v prisotnosti t.i. dvojnih fragmentov, ki pa niso vplivali na pravilnost določitve PCR-ribotipa. Z navadno gelsko elektroforezo smo 48 sevov uvrstili v 23 različnih PCR-ribotipov, s sistemom QIAxcel v 22 in s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju, ki se je izkazala za najbolj diskriminatory, v 25 različnih PCR-ribotipov. Prav tako so bili vzorci fragmentov primerljivi med gelsko elektroforezo in kapilarno elektroforezo na sekvenatorju, ampak ne vedno tudi s sistemom QIAxcel, kjer smo imeli težave z zaznavo določenih fragmentov, zato smo dvema izolatom določili napačen ribotip.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.25.08+577.21.08:579.852.13(043)=163.6
CX *Clostridium difficile*/intestinal infections /typing/molecular methods/PCR-ribotyping/primers/agarose gel electrophoresis/capillary electrophoresis/QIAxcel/sequencer/Beckman Coulter CEQ 8000
AU ŠUMAK, Vid
AA MANDIĆ MULEC, Ines (supervisor)/JANEŽIČ, Sandra (co-advisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2014
TI COMPARISON OF DIFFERENT APPROACHES FOR PCR-RIBOTYPING OF *Clostridium difficile*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 67 p., 8 tab., 5 fig., 2 ann., 155 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Clostridium difficile* is one of the most common causes of nosocomial intestinal infections. Different typing methods are used to monitor spread of *C. difficile* infections, with PCR-ribotyping being a method of choice, especially in European laboratories. Three different primer sets are described for *C. difficile* PCR-ribotyping, which differ in correspondence to bases of the 16S and 23S rRNA genes and are used to multiply intergenic spacer regions between 16S and 23S rRNA (ISR). We have used 48 isolates to compare PCR-ribotyping fragment patterns generated with all three primer sets and to check how the results are comparable among different electrophoresis systems (agarose gel electrophoresis, capillary gel electrophoresis with QIAxcel instrument or with sequencer) and we have also determined discriminatory power of each system. With all three primer pairs we have obtained comparable fragment patterns. The only differences observed were the sizes of individual bands due to the differences in primer annealing sites and the presence or absence of double peaks which did not influence the correct PCR-ribotype determination. The most discriminatory system was the capillary electrophoresis on sequencer on which 25 different PCR-ribotypes could be differentiated. With agarose gel electrophoresis we have identified 23 and with QIAxcel system 22 different PCR-ribotypes. Fragment patterns were comparable among standard gel electrophoresis and sequencer but not always with QIAxcel system due to the missing fragment which resulted in incorrect ribotype determination for some of the isolates.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJE <i>Clostridium difficile</i>	3
2.2 PATOGENEZA OKUŽB S <i>C. difficile</i> IN BOLEZNI, KI JIH POVZROČA	3
2.2.1 Dejavniki tveganja	3
2.2.2 Virulentni dejavniki - toksini in drugi	4
2.2.3 Bolezenski znaki	5
2.3 DIAGNOZA OKUŽB	6
2.4 ZDRAVLJENJE OKUŽB	7
2.4.1 Preprečevanje okužb	8
2.5 TIPIZACIJSKE METODE	9
2.6 METODE ZA TIPIZACIJO BAKTERIJE <i>Clostridium difficile</i>	10
2.6.1 Fenotipske tipizacijske metode	10
2.6.2 Molekularne tipizacijske metode	10
2.6.2.1 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov genomske DNK	11
2.6.2.2 Pulzna gelska elektroforeza	11
2.6.2.3 Toksinotipizacija	12
2.6.2.4 Analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom ponovitev	12
2.6.2.5 PCR-ribotipizacija	13
2.6.2.6 Tipizacija na osnovi nukleotidnega zaporedja več lokusov	14
2.6.2.7 Ostale tipizacijske metode	15

2.7 EPIDEMIOLOGIJA	15
2.7.1 Okužbe s <i>C. difficile</i> pri ljudeh	15
2.7.1.1 Okužbe s <i>C. difficile</i> v Sloveniji	16
2.7.2 Okužbe s <i>C. difficile</i> pri živalih	17
2.7.3 <i>C. difficile</i> v okolju	18
2.7.4 <i>C. difficile</i> v hrani	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Izbrani sevi bakterije <i>Clostridium difficile</i>	19
3.1.2 Gojišče	19
3.1.3 Pufri in druge raztopine	19
3.2 METODE	20
3.2.1 Nacepljanje spor bakterije <i>C. difficile</i>	20
3.2.2 Osamitev DNK	21
3.2.3 PCR-ribotipizacija	21
3.2.3.1 Pomnoževanje medgenskega prostora in ločevanje produktov z aparatom QIAxcel 22	24
3.2.3.2 Ločevanje produktov PCR z uporabo aparata QIAxcel	24
3.2.3.3 Analiza rezultatov aparata QIAxcel	25
3.2.3.4 Pomnoževanje medgenskega prostora in ločevanje produktov s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000	25
3.2.3.5 Ločevanje produktov PCR z uporabo kapilarne elektroforeze na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000	28
3.2.3.6 Analiza rezultatov sekvenatorja Beckman Coulter CEQ 8000	28
4 REZULTATI	30
4.1 OPTIMIZACIJA METOD	30
4.1.1 Optimizacija PCR-ribotipizacije na aparatu QIAxcel	30
4.1.2 Optimizacija PCR-ribotipizacije na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000	30
4.2 PRIMERJAVA VZORCEV FRAGMENTOV PCR-RIBOTIPIZACIJE DOBLJENIH Z RAZLIČNIMI PARI ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	31
4.2.1 Primerjava vzorcev fragmentov dobljenih z aparatom QIAxcel	31
4.2.2 Primerjava vzorcev fragmentov dobljenih s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000	34
4.3 MOČ RAZLIKOVANJA RAZLIČNIH PRISTOPOV PCR-RIBOTIPIZACIJE	37

5 RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1 RAZPRAVA	39
5.1.1 Optimizacija metod	39
5.1.2 Primerjava vzorcev fragmentov z različnimi pari začetnih oligonukleotidov	40
5.1.3 Moč razlikovanja PCR-ribotipizacije na posameznem sistemu	42
5.2 SKLEPI	44
6 POVZETEK	45
7 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema prileganja začetnih oligonukleotidov.	14
Slika 2: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov vseh sevov na aparatu QIAxcel.	33
Slika 3: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov sevov R9385, CD169 in RT010 na aparatu QIAxcel.	34
Slika 4: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov sevov R9385, CD169 in RT010 na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000.	34
Slika 5: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov vseh sevov na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000.	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.	23
Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Bidet F/Bidet R in Janežič F/Janežič R parov začetnih oligonukleotidov.	23
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Stubbs F/Stubbs R para začetnih oligonukleotidov.	24
Preglednica 4: Pogoji pomnoževanja s PCR za Stubbs, Bidet in Janežič pare začetnih oligonukleotidov.	24
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Bidet F/Bidet R in Janežič F/Janežič R parov začetnih oligonukleotidov (Indra in sod., 2008).	26
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Stubbs F/Stubbs R para začetnih oligonukleotidov.	26
Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja s PCR za Stubbs, Bidet in Janežič pare začetnih oligonukleotidov (Indra in sod., 2008).	27
Preglednica 8: Razlikovanje PCR-ribotipov s posameznim sistemom.	38

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled sevov bakterije *C. difficile*, vključenih v diplomsko delo in PCR-ribotipov dobljenih z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov na posameznih sistemih.

Priloga B: Fragmenti dobljeni z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment lenght polymorphism)
AP-PCR	verižna reakcija s polimerazo z naključno prilegajočimi se kratkimi začetnimi oligonukleotidi (angl. arbitrarily primed polymerase chain reaction)
bp	bazni par
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
GTP	gvanozin trifosfat
ISR	medgenski prostor/regija (angl. intergenic spacer region)
kb	kilo bazni par
kDa	kilo dalton
kV	kilo volt
LCTs	veliki klostridijski toksini (angl. large clostridial toxins)
MgCl ₂	magnezijev klorid
MLST	tipizacija na osnovi nukleotidnega zaporedja več lokusov (angl. multilocus sequence typing)
MLVA	analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom ponovitev (angl. multiple locus variable number tandem repeat analysis)
MRSA	na meticilin odporna bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
PaLoc	patogenski lokus (angl. pathogenicity locus)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. pulsed field gel electrophoresis)
REA	polimorfizem restrikcijskih fragmentov genomske DNK (angl. restriction endonuclease analysis)
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid)
TcdA	toksin A bakterije <i>Clostridium difficile</i>

TcdB	toksin B bakterije <i>Clostridium difficile</i>
TRST	sekvenčna tipizacija tandemskih ponovitev (angl. tandem repeat sequence typing)
UPGMA	metoda aritmetičnega povprečja neuteženih parov (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean)
V	volt
VNTR	lokusi z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. variable number tandem repeat)

1 UVOD

Bakterija *Clostridium difficile* je trenutno med najpogostejšimi povzročitelji bolnišničnih črevesnih okužb. Povzroča lahko različne vrste bolezenskih znakov. Od blage driske do resnejših poškodb črevesne sluznice, kot je npr. psevdomembranozni kolitis, ki lahko vodijo tudi v smrt. Tveganju za okužbo so podvržene vse starostne skupine ljudi, najpogosteje pa zbolijo starejši hospitalizirani ljudje, pri katerih pride, najpogosteje zaradi zdravljenja z antibiotiki, do porušenja normalne črevesne mikrobiote, ki je predpogoj za uspešno kolonizacijo bakterije *C. difficile*.

Za spremljanje širjenja okužb z bakterijo *C. difficile* se danes po svetu uporablajo različne tipizacijske metode, od katerih se je kot metoda izbora, predvsem v evropskih referenčnih laboratorijih, uveljavila PCR-ribotipizacija. Metoda razlikuje med različnimi genotipi na podlagi razlik v številu in velikosti pomnoženih medgenskih regij (angl. intergenic spacer region, ISR) v ribosomskih operonih (16S-23S rRNK).

Za PCR-ribotipizacijo so opisani trije pari začetnih oligonukleotidov, ki se med seboj razlikujejo v mestih prileganja na gena za 16S oz. 23S rRNK. Prav tako pa so opisane različne metode za ločevanje pomnoženih medgenskih regij (navadna agarozna gelska elektroforeza, kapilarna elektroforeza na sistemu QIAxcel (Qiagen, Hilden, Nemčija) in kapilarna elektroforeza na sekvenatorju).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil 1. optimizirati metodo PCR-ribotipizacije na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000 in sistemu QIAxcel (aparat za kapilarno gelsko elektroforezo podjetja Qiagen, Nemčija), 2. preveriti, ali z vsemi pari različnih začetnih oligonukleotidov, ki so na voljo za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*, dobimo primerljive vzorce fragmentov in 3. določiti diskriminatorno moč PCR-ribotipizacije na posameznem sistemu.

Predpostavili smo, da bomo z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov dobili primerljive vzorce fragmentov. Edina razlika med njimi bo samo v velikosti posameznih fragmentov zaradi različnih mest prileganja začetnih oligonukleotidov na gena za 16S in 23S rRNK.

Pričakujemo, da bo diskriminatorna moč PCR-ribotipizacije z uporabo kapilarne elektroforeze na sekvenatorju in sistemu QIAxcel večja kot pri klasični PCR-ribotipizaciji, kjer fragmente ločujemo z elektroforezo v agaroznem gelu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJE *Clostridium difficile*

Clostridium difficile je po Gramu pozitivna bakterija iz rodu *Clostridium*. Tako kot ostale bakterije iz rodu *Clostridium*, je tudi *C. difficile* anaerobna bakterija, paličaste oblike in v neugodnih življenjskih razmerah tvori endospore (Ryan in Drew, 2010). Prvič je bila opisana leta 1935, ko sta jo Hall in O'Toole izolirala iz blata zdravega novorojenčka (Hall in O'Toole, 1935, cit. po Lyerly in sod., 1988). Bakterijo *C. difficile* najdemo v različnih naravnih habitatih (vodi, prsti, celo na rastlinah), v prebavnem traktu različnih živali in tudi v domačem okolju, glavni rezervoar pa je bolnišnično okolje (Al Saif in Brazier, 1996; McFarland in sod., 1989; Bartlett in Gerdin, 2008). Pri manjšem odstotku ljudi (2-5 %) pa se pojavlja tudi kot del normalne črevesne mikrobiote (Ryan in Drew, 2010).

2.2 PATOGENEZA OKUŽB S *C. difficile* IN BOLEZNI, KI JIH POVZROČA

C. difficile je eden najpogostejših povzročiteljev nalezljive driske, ki se pojavi pri bolnišničnih bolnikih zdravljenih z antibiotiki (Kelly in sod., 1994; Bartlett, 2002). Težave lahko nastopijo takrat, kadar se bakterija znajde v črevesju, kjer je bila normalna črevesna mikrobiota, največkrat zaradi uporabe antibiotikov, uničena (Ryan in Drew, 2010). *C. difficile* je lahko, napram ostali črevesni mikrobioti, odporen na velik spekter antibiotikov, zato se ima možnost, kljub prisotnosti le-teh, razrasti (Johnson in sod., 1999; McDonald in sod., 2005; Rupnik in sod., 2009).

2.2.1 Dejavniki tveganja

Hospitalizirani starejši ljudje (>60 let) zdravljeni z antibiotiki so še vedno najbolj rizična skupina za okužbo s *C. difficile* (Rupnik in sod., 2009). V zadnjih letih se pojavlja vedno več okužb pri mlajših ljudeh, ki niso bili v stiku z bolnišničnim okoljem, ali se niso zdravili z antibiotiki. Vedno več okužb pa je tudi pri nosečnicah in otrocih, ki so do sedaj spadali med manj ogrožene skupine (Kim in sod., 2008; Rouphael in sod., 2008).

Vir okužbe z bakterijo *C. difficile* v bolnišničnem okolju so lahko s sporami kontaminirano okolje, drugi bolniki, asimptomatski nosilci in predvsem roke bolnišničnega osebja (Johnson in Gerdin, 1998; Kuijper in sod., 2006; Dubberke in sod., 2007). Kot možen vir okužbe v izvenbolnišničnem okolju se največkrat omenjajo okolje (zemlja, voda), živali in hrana (Al Saif in Brazier, 1996; Rupnik, 2007). V živalskem svetu postaja *C. difficile* pomemben patogen pri različnih živalih, predvsem pri konjih, prašičih in govedu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Songer in Anderson, 2006; Rupnik, 2007).

2.2.2 Virulentni dejavniki - toksini in drugi

Najpomembnejša dejavnika virulence bakterije *C. difficile*, ki sta odgovorna za nastanek bolezenskih znakov, sta toksin A (TcdA) in toksin B (TcdB). Toksina spadata med večje bakterijske toksine, toksin A je velikosti 308 kDa, toksin B pa 270 kDa, in pripadata skupini velikih klostridijskih toksinov (LCTs – angl. large clostridial toxins). Po svoji aktivnosti sta TcdA in TcdB glikoziltransferazi, ki inhibirata majhne GTP vezavne proteine (Rho, Rac, Cdc42) (Voth in Ballard, 2005). Rho, Rac in Cdc42 spadajo v Rho družino GTPaz, ki so del večje družine Ras (Allen in sod., 1997). Inhibicija poteka tako, da toksina A in B, ob pomoči kosubstrata UDP-glukoze, katalizirata prenos glukoze na GTPaze (Just in sod., 1995a; Just in sod., 1995b). S tem se prekine od GTPaz odvisna signalizacija, kar vodi do porušitve strukturne integritete, saj se spremeni organizacija F-aktina (Nusrat in sod., 2001). Posledično pride do zaokrožanja celic in celične smrti. Kljub temu, da toksina A in B znotraj celic deluje po istem principu, se do neke mere njuni vlogi pri razvoju s *C. difficile* povezanimi obolenji razlikujeta. Oba toksina deluje citotoksično, toksin A pa deluje tudi enterotoksično (Voth in Ballard, 2005).

Toksin A in B kodirata gena *tcdA* in *tcdB*. Zapis za gena je v kromosому v t.i. toksinskom lokusu (PaLoc), ki je velik 19 kb. Poleg obeh genov najdemo v regiji PaLoc še regulatorne gene *tcdR*, *tcdC* in *tcdE*. Gen *tcdR* kodira alternativni faktor sigma (TcdR), ki pozitivno regulira začetek prepisovanja genov *tcdA* in *tcdB*, tako da omogoči specifično vezavo RNK polimeraze na genski promotor (Mani in Dupuy, 2001). Gen *tcdC* kodira protein TcdC, ki negativno regulira prepisovanja genov *tcdA* in *tcdB*, saj destabilizira holoencim RNK polimeraze in TcdR, kar onemogoči vezavo na promotor (Matamouros in sod., 2007). Gen

tcdE pa kodira protein TcdE, ki je tako strukturno kot funkcionalno podoben bakteriofagnim holinom. Tako bi naj deloval kot litični protein, ki omogoča sproščanje toksina A in B v izvencelično okolje (Tan in sod., 2001).

V netoksigenih sevih, ki ne proizvajajo nobenega od obeh toksinov, je toksinski lokus zamenjan s 115 bp dolgo nekodirajočo sekvenco (Braun in sod., 1996; Brouwer in sod., 2012).

Nekateri sevi pa poleg TcdA in TcdB proizvajajo tudi binarni toksin CDT. Po aktivnosti spada med ADP-riboziltransferaze in vpliva na modifikacijo aktina (Voth in Ballard, 2005). Kakšno vlogo ima binarni toksin na nastanek bolezenskih znakov, pa še ni dobro poznano. Raziskave so pokazale, da deluje citotoksinčno na Vero celične linije, njegov enterotoksični učinek pa so pokazali na *in vivo* modelu kunka (Perelle in sod., 1997; Gerič in sod., 2006).

K večji virulenci bakterije *C. difficile* doprinesejo tudi drugi dejavniki virulence, kot so npr. proteini celične površine (SlpA, Cwp66, Cwp84). Ti so pomembni za pripenjanje bakterije na sluznico črevesa in lahko sprožijo vnetni odziv (Drudy in sod., 2004, Pechine in sod., 2005, Ausiello in sod., 2006). Drugi dejavniki virulence so še hidrolitični encimi, ki sproščajo hranilne snovi (Seddon in sod., 1990), zelo odporne spore, ki jim pomagajo preživeti neugodne razmere (Rupnik in sod., 2009), nekateri sevi pa imajo kapsulo, ki jih ščiti pred fagocitozo (Borriello, 1998).

2.2.3 Bolezenski znaki

Okužba s *C. difficile* ima zelo širok spekter bolezenskih znakov. Ti so lahko lažje narave, kot so blaga driska, ali težji, kot so npr. kolitis, ki ga lahko spremljajo še bruhanje, trebušni krči in drugi simptomi, kot so vročina, levkocitoza in splošna oslabelost. Med najhujše oblike okužbe spada psevdomembranzni kolitis, ki mu lahko sledi toksični megakolon oz. predrtje stene debelega črevesa, sepsa, šok in smrt (Rupnik in sod., 2009). Ni pa še znano, kaj povzroči nenaden preskok iz blažjega bolezenskega stanja v težje (Heinlen in Ballard, 2010).

Psevdomembranozni kolitis je poznan že precej časa. Prve omembe segajo že v konec 19. stoletja (Worsley, 1998), bolezen pa so z bakterijo *C. difficile* začeli povezovati šele v poznih sedemdesetih letih 20. stoletja, ko so se pojavile prve študije toksičnosti bakterij iz rodu *Clostridium* (Bartlett in sod., 1978). Histopatološko lahko psevdomembranozni kolitis opišemo kot vnetne psevdomembrane na črevesni sluznici, ki jih sestavljajo odmrle epiteljske celice, levkociti in sluz. Te se oblikujejo v bele ali rumenkaste zaplate, ki lahko prerastejo celotno sluznico debelega črevesa (Goulston in McGovern, 1965; Price in Davies, 1977).

2.3 DIAGNOZA OKUŽB

Kot prvi zlati standard za diagnostiko okužb s *C. difficile* se je uveljavil citotoksični test, ki zaznava prisotnost toksina B (pri nekaterih celičnih linijah tudi toksina A) v vzorcu blata. Za potrditev, da je citotoksičnost res posledica delovanja toksinov bakterije *C. difficile*, sledi še test nevtralizacije s specifičnimi protitelesi proti omenjenima toksinoma. Za potrditev prisotnosti toksinov bakterije *C. difficile* so ga prvi uporabili Chang in sod. (1978).

V rutinski mikrobiologiji je bolj razširjena izolacija bakterije iz vzorca blata, ki ji sledi dokaz prisotnosti toksinov, ter s tem potrditev sevov, ki so sposobni produkcije toksinov (Rupnik in sod., 2009). Oba testa sta zelo učinkovita, vendar časovno potratna. Nasprotno so komercialni encimski imunski in membranski testi zelo hitri, vendar so manj občutljivi (Carroll, 2011; Bartlett in Gerdin, 2008; Rupnik in sod., 2009). Nekateri zaznajo celo samo toksin A, zato z njimi ne moremo zaznati sevov, ki ne proizvajajo TcdA in moramo biti pri izbiri komercialnih testov na to pozorni (Shanholtzer in sod., 1992; Rupnik in sod., 2009). Zelo hitri so tudi testi za določanje prisotnosti glutamat dehidrogenaze, ki pa žal ne ločijo med toksigenimi in netoksigenimi sevi (Carroll, 2011; Ticehurst in sod., 2006).

Molekularne metode bi lahko nadomestile ostale metode, saj so hitre in imajo dobro občutljivost ter specifičnost. Z molekularnimi metodami zaznavamo enega ali oba od genov, ki kodirata toksina, lahko pa tudi prisotnost gena, ki kodira binarni toksin (Sloan in

sod., 2008; van den Berg in sod., 2005). Na tržišču se je v zadnjih letih pojavilo kar nekaj komercialnih molekularnih testov, kot so »ProGastro CD«, »BD GeneOhm Cdiff«, »Xpert *C. difficile*« in »Illumigene *C. difficile*« (Chapin in sod., 2011; Pancholi in sod., 2012). Pri molekularnih testih je problem predvsem v tem, da so zelo občutljivi in zaznavajo tudi asimptomatične prenašalce, zato je včasih težko interpretirat pozitivni rezultat. Za binarni toksin pa velja, da vsi sevi, ki nosijo gen za toksin, ne proizvajajo nujno tudi toksina, kar je prav tako lahko težava molekularnih metod. Ena od slabosti molekularnih metod je tudi visoka cena (Carroll, 2011; Rupnik in sod., 2009).

2.4 ZDRAVLJENJE OKUŽB

Za zdravljenje okužb s *C. difficile* se uporabljo različne terapije. Izbor je odvisen od resnosti obolenja in glede na to, ali gre za prvo ali ponavljajočo se okužbo. Prvi korak je navadno prekinitev antibiotične terapije, predpisane za zdravljenje primarne okužbe. Bolnika se nato začne zdraviti z antibiotikoma metronidazolom ali vankomicinom. Oba antibiotika naj bi bila po učinkovitosti primerljiva, vendar pa se v zadnjem času pojavlja vse več primerov, ko se bolniki ne odzovejo na zdravljenje z metronidazolom (Heinlen in Ballard, 2010; Musher in sod., 2005).

Zdravljenje z antibiotiki (tudi vankomicinom in metronidazolom) vpliva na sestavo normalne črevesne mikrobiote, ki po antibiotičnem zdravljenju ostane porušena še kar nekaj časa, zato so pogoste (15-25 %) tudi ponovitve okužbe (Kyne in Kelly, 2001; Rupnik in sod., 2009). Pri do polovici primerov gre za okužbo z novim sevom, pri ostalih pa za okužbo z istim sevom, saj lahko spore *C. difficile* v črevesju preživijo kljub zdravljenju z antibiotiki (McFarland, 2005). Bolniki se navadno odzovejo na zdravljenje z enakim antibiotikom, kot je bila zdravljenega prvotna okužba (Kyne in Kelly, 2001).

Ker je porušena črevesna mikrobiota pomemben dejavnik pri ponovni kolonizaciji z bakterijo *C. difficile*, so začeli iskati drugačne načine zdravljenja. Pojavili so se novi antibiotiki z ozkim spektrom delovanja (Rea in sod., 2011). Eden takih je fidaxomicin, ki je že v uporabi in je specifičen za *C. difficile*. Klinične raziskave so pokazale, da je vsaj enakovreden vankomicinu, v nekaterih primerih pa celo učinkovitejši pri preprečevanju

ponavljalajočih se okužb (Louie in sod., 2011; Crawford in sod., 2012). Drugi načini zdravljenja so še različni polimeri, ki vežejo toksine (Leffler in Lamont, 2009), monoklonska protitelesa proti toksinoma TcdA in TcdB ter različna cepiva, ki pa so še v fazi razvoja (Lowy in sod., 2010; Foglia in sod., 2012).

Kot dopolnilno zdravljenje vsem tem terapijam se lahko uporabijo tudi probiotiki. Probiotiki so nepatogeni mikroorganizmi, s pozitivnimi učinki na gostitelja. Med najbolj raziskane sodijo kvasovka *Saccharomyces boulardii* in različne vrste laktobacilov (Heinlen in Ballard, 2010). Probiotiki delujejo kot naravna prepreka, s tem ko tekmujejo za vezavna mesta, za hranilne snovi, regulirajo imunski odziv ter imajo neposreden antimikrobni vpliv s produkcijo zaviralnih substanc (McFarland, 2009). Rezultati učinkovitosti terapij s probiotiki pa so do sedaj bili skromni in nobena dosedanja raziskava ni podala močnih dokazov v podporo tej terapiji (Lawrence in sod., 2005; McFarland, 2009; Miller, 2009).

Pri bolnikih s pogostimi ponovitvami okužb se je kot zelo uspešen pokazal nov način zdravljenja, t.i. fekalna transplantacija. Gre za postopek, kjer obnovijo porušeno črevesno mikrobioto bolnika z mikrobioto zdravega prostovoljca, najpogosteje je to družinski član, in s tem preprečijo ponoven razrast bakterije *C. difficile* (Brandt in Reddy, 2011; van Nood in sod., 2009). Postopek uporablja vse pogosteje predvsem zaradi svoje učinkovitosti (Brandt in sod., 2012).

2.4.1 Preprečevanje okužb

Pri obvladovanju okužb s *C. difficile* ima velik pomen že samo preprečevanje okužb. Za preprečevanje širjenja okužb je pomembna predvsem higiena rok. Umivanje rok ima prednost pred uporabo antiseptikov, saj so spore bakterije *C. difficile* odporne na alkohol, ki je pogosto glavna sestavina splošno uporabljenih antiseptikov ter razkužil (Rupnik in sod., 2009). Drugi ukrepi za omejevanje širjenja okužbo s *C. difficile* so še izolacija pacienta, uporaba zaščitnih rokavic, halje in uporaba medicinske opreme za enkratno uporabo (Johnson in sod., 1990; Jernigan in sod., 1998). Nekoliko težje pa je v okoljih, ki predstavljajo tveganje za okužbo s *C. difficile*, zagotoviti, da ne pride do kontaminacije prostorov. Spore, ki jih navadna čistila ne uničijo in lahko celo spodbudijo sporulacijo

(Wilcox in Fawley, 2000; Rupnik in sod., 2009), lahko uničimo z uporabo raztopine natrijevega hipoklorita oz. belila. Čiščenja z belilom pa se poslužujemo samo v izrednih primerih (v primeru izbruho) zaradi negativnih učinkov belila (draženje sluznice in korozivnost za okolje) (Rupnik in sod., 2009).

Med ukrepe, ki zmanjšajo tveganje za razvoj bolezni povezanimi s *C. difficile*, spada tudi predpisovanje antibiotikov, ki so manj povezani s posledičnim razvojem okužbe s *C. difficile* (penicilin, vankomicin in gentamicin) (Rupnik in sod., 2009).

2.5 TIPIZACIJSKE METODE

Bakterija *C. difficile* je ena najpogostejših povzročiteljic bolnišničnih okužb, zato je pomembno, da spremljamo širjenje okužb, za kar uporabljamo različne tipizacijske metode. Za tipizacijske metode je pomembno, da zadostijo določenim kriterijem, med katere spadajo:

- Stabilnost izbranega markerja - pomeni, da je izbrana lastnost (fenotipska ali genotipska) stabilna v vseh izolatih, v različnih pogojih shranjevanja, v različnih časovnih obdobjih in pri večkratnem subkultiviranju.
- Sposobnost razlikovanja (diskriminatorna moč) metode - je sposobnost metode, da razlikuje med nesorodnimi izolati. Izrazimo jo s pomočjo Simpsonovega indeksa kot verjetnost, da dvema nesorodnima izolatom določimo različna tipa (Hunter in Gaston, 1988).
- Ponovljivost - pomeni sposobnost metode, da določi isti tip izolatu testiranem v neodvisnih razmerah, se pravi v različnem časovnem obdobju in prostoru.

Za tipizacijske metode je pomembno tudi, da je metoda cenovno sprejemljiva, hitra in tehnično nezahtevna ter da lahko določimo tip vsem izolatom, ki jih tipiziramo. Za medlaboratorijsko primerljivost pa je zaželeno tudi, da lahko rezultate računalniško analiziramo in jih shranjujemo v elektronski obliki, kar olajša samo izmenjavo/primerjavo podatkov (van Belkum in sod., 2007).

2.6 METODE ZA TIPIZACIJO BAKTERIJE *Clostridium difficile*

Prvi zapisi o tipizaciji bakterije *C. difficile* segajo že v leto 1982. Prve tipizacijske metode so temeljile predvsem na razlikovanju fenotipskih lastnosti. Šele konec 80. let so začeli razvijati genotipske tipizacijske metode. Odkritja, kot so razvoj metode za določanje zaporedja DNK leta 1977 (Sanger in sod., 1977) in tudi kasnejša prva določitev celotnega genoma bakterije (Fleischmann in sod., 1995), so vplivala na poznavanje in razumevanje bakterijskega genoma in s tem posledično tudi na razvoj genotipskih tipizacijskih metod (van Belkum in sod., 2007).

2.6.1 Fenotipske tipizacijske metode

Fenotipske metode, kot že samo ime pove, temeljijo na fenotipskih lastnostih in se danes uporabljajo redko. V to skupino sodijo antibiogrami, imunoelktroforeza zunajceličnih antigenov, poliakrilamidna elektroforeza topnih proteinov (PAGE), kombinirana bakteriocin in bakterifagna tipizacijska metoda in druge (Brazier, 2001).

Prva širše uporabljeni metoda za tipizacijo *C. difficile* je bila serotipizacija. Serotipizacija razlikuje med sevi na podlagi razlik v površinskih antigenih (aglutinacija s kunčjimi protitelesi). S serotipizacijo razlikujemo več kot 20 seroloških skupin oz. serotipov (Delmee in sod., 1985; Toma in sod., 1988; Meisel-Mikolajczyk in Sokol, 1991). Delmee in sod. (1985) ter Toma in sod. (1988) so v dveh raziskavah ugotovili zelo dobro ujemanje (85 % do 100 %) med serološkimi skupinami in toksinskim statusom (toksigenimi in netoksgenimi sevi).

2.6.2 Molekularne tipizacijske metode

Molekularne ali genotipske metode razdelijo izolate v različne skupine (genotipe) glede na razlike v bakterijskem genomu. Prve genotipske metode so temeljile na analizi plazmidnih profilov in analizi vzorca fragmentov, ki ga dobimo po restrikciji celotne DNK (REA) (Brazier, 2001; Kuijper in sod., 1987). Molekularne tipizacijske metode lahko razdelimo na metode, ki temeljijo na analizi genomske DNK po restrikciji, metode, ki temeljijo na

pomnoževanju specifičnih odsekov genoma s PCR oz. kombinaciji restrikcije in pomnoževanja ter metode, ki temeljijo na analizi nukleotidnega zaporedja genoma ali delov genoma (Singh in sod., 2006).

2.6.2.1 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov genomske DNK

Ena prvih molekularnih metod, ki je bila razvita za tipizacijo bakterije *C. difficile*, je polimorfizem restrikcijskih fragmentov genomske DNK (REA). Pri tej metodi genomsko DNK razrežemo z restrikcijskim encimom *HindIII*. Razrezane fragmente potem ločimo z gelsko elektroforezo. Na podlagi razlik v restrikcijskih vzorcih izolate razdelimo v različne skupine t.i. tipe REA (Kuijper in sod., 1987). REA ima dobro moč razlikovanja med nesorodnimi izolati. Zaradi zahtevne interpretacije rezultatov, saj je potrebno restrikcijske vzorce primerjati z vzorci referenčnih sevov na istem gelu, metodo rutinsko uporablja samo en laboratorij (Clabots in sod., 1993).

2.6.2.2 Pulzna gelska elektroforeza

Razvoj pulzne gelske elektroforeze (PFGE) je omogočil ločevanje večjih fragmentov DNK v agaroznem gelu. Od navadne gelske elektroforeze se loči po tem, da se orientacija električnega polja periodično spreminja, ravno to pa omogoča ločevanje večjih fragmentov (Fey, 2005). Pri PFGE uporabimo restrikcijske encime, ki prepoznajo 6 ali več baznih parov dolga restrikcijska mesta, zato cepijo DNK na manj mestih, kar posledično da večje fragmente. PFGE se uporablja za tipizacijo številnih bakterij, tudi *C. difficile* (van Belkum in sod., 2007; Knetsch in sod., 2013). Za tipizacijo *C. difficile* se uporablja encima *SmaI* ali *SacII* (Janežič in Rupnik, 2010; Janežič in sod., 2011a).

Nekaj problemov je pri tipizaciji s PFGE povzročala razgradnja DNK pri nekaterih sevih (Kato in sod., 1994; Bidet in sod., 2000). Težave so deloma odpravili z modifikacijo protokolov in dodatkom tiosečnine elektroforeznemu pufru (Corkill in sod., 2000; Alonso in sod., 2005; Goering, 2010). Kljub zelo dobri moči razlikovanja je slabost metode še vedno njena zamudnost in pa, kot velja za vse metode, ki temeljijo na analizi vzorca fragmentov po gelski elektroforezi, da je rezultate težko primerjati med laboratorijski.

Primerljivost rezultatov lahko dosežemo s standardizacijo metode, kot je bilo to narejeno za nekatere pomembnejše povzročitelje okužb s hrano (Ribot in sod., 2006; Brazier, 2001).

2.6.2.3 Toksinotipizacija

Metoda temelji na pomnoževanju in potem restrikciji delov toksinskega lokusa (PaLoc) bakterije *C. difficile*. S PCR pomnožimo dva odseka DNK, B1 (katalitična domena toksina B) in A3 (vezavna domena toksina A). Nato odsek A3 režemo z restrikcijskim encimom *EcoRI* in odsek B1 z encimoma *AccI* in *HincII*. Restrikcijske fragmente ločimo z gelsko elektroforezo in glede na dobljene restrikcijske vzorce seve razdelimo v različne toksinotipe. Toksinotipe označujemo z rimskimi številkami (Rupnik in sod., 1997; Rupnik in sod., 1998; Rupnik, 2011). Do zdaj je znanih 32 toksinotipov (Rupnik, 2008), vključno s toksinotipom 0, ki predstavlja toksinotip referenčnega seva VPI 10463 (Rupnik in sod., 1998). Spremembe, ki se lahko pojavljajo v toksinskem lokusu, so insercije, delecije in točkovne mutacije in zanimivo, da vsaka od teh treh prevladuje v svojem delu toksinskega lokusa (Rupnik, 2008). Pri primerjavi z drugimi tipizacijskimi metodami se toksinotipizacija zelo dobro ujema s PCR-ribotipizacijo in polimorfizmom restrikcijskih fragmentov genomske DNK (REA), nekoliko slabše pa s serotipizacijo (Rupnik in sod., 2001; Johnson in sod., 2003; Rupnik in sod., 1998).

2.6.2.4 Analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom ponovitev

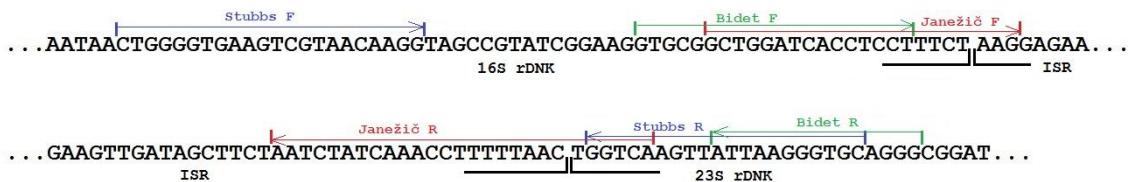
Analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom zaporednih ponovitev (MLVA - angl. multiple locus variable number tandem repeat analysis) spada med molekularne metode, ki temeljijo na pomnoževanju. Metoda temelji na določanju števila ponovitev v lokusih z variabilnim številom tandemskih ponovitev (VNTR - angl. variable number tandem repeat) (Marsh in sod., 2006). Do razlik v številu ponovitev pride zaradi napake pri podvojevanju DNK, ko polimeraza zdrsne in se ponavljače zaporedje doda ali odstrani (van Belkum in sod., 2007). Tipizacija MLVA pri *C. difficile* poteka tako, da najprej s PCR pomnožimo izbrano (običajno 7) število lokusov VNTR. Nato pa z analizo nukleotidnega zaporedja ali glede na velikosti pomnoženih lokusov (določenih z gelsko ali kapilarno elektroforezo) določimo število ponavljačih se enot v vsakem lokusu. To naredimo za

vse lokuse VNTR, ki so vključeni v analizo. Zaporedje številk, ki predstavljajo število ponovitev v posameznih lokusih, nam da tip MLVA. Metoda je enostavna in ima dobro moč razlikovanja (Marsh in sod., 2006; van den Berg in sod., 2007). Broukhanski in sod. (2011) so metodo izboljšali tako, da lahko MLVA tipe določamo neposredno iz vzorca blata, kar skrajša čas analize.

2.6.2.5 PCR-ribotipizacija

V evropskih laboratorijih se je od metod, ki se uporabljam za tipizacijo bakterije *C. difficile*, uveljavila PCR-ribotipizacija. Metoda razlikuje med različnimi sevi glede na prstni odtis, ki ga dobimo po pomnoževanju medgenskih regij oz. ISR (angl. intergenic spacer region) v ribosomskih operonih. Te regije se nahajajo med genoma za 16S in 23S rRNK. Bakterija *C. difficile* v svojem kromosому vsebuje več alelov operona rRNK, ki se razlikujejo v dolžini medgenske regije (Janežič in Rupnik, 2010; Stubbs in sod., 1999; Bidet in sod., 1999). Začetni oligonukleotidi so zasnovani tako, da se prilegajo na 3` konec gena za 16S in 5` konec gena za 23S rRNK, zato je s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) možno pomnožiti toliko različnih fragmentov, kot je različnih alelov operona rRNK. Fragmente potem ločimo v agaroznem gelu. Glede na dobljene vzorce fragmentov lahko seve razdelimo v različne skupine imenovane PCR-ribotipi, ki jih označimo z arabskimi številkami (001, 002... 300) (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Janežič in Rupnik, 2010).

Poleg začetnih oligonukleotidov, ki so jih opisali O'Neill in sod. (1996) (in prvič na večjem številu izolatov uporabili Stubbs in sod., 1999), so v splošni uporabi še oligonukleotidi, ki so jih opisali Bidet in sod. (1999). Razlika med obema paroma začetnih oligonukleotidov je samo v mestih prileganja na gena za 16S in 23S rRNK (Bidet in sod., 1999; O'Neill in sod., 1996; Stubbs in sod., 1999). Pred kratkim so Janežič in sod. (2011b) opisali modificirane začetne oligonukleotide, ki prilegajo deloma na gena za 16S in 23S rRNK in deloma na ISR (slika 1). S tem so dosegli, da so začetni oligonukleotidi specifični za bakterijo *C. difficile* in omogočajo PCR-ribotipizacijo bakterije direktno iz vzorca blata.



Slika 1: Shema prileganja začetnih oligonukleotidov.

F – forward začetni oligonukleotid, R – reverse začetni oligonukleotid

Kljub temu, da je PCR-ribotipizacija hitra in enostavna metoda, največjo oviro še vedno predstavlja analiza vzorcev fragmentov v agaroznem gelu, zaradi česar je rezultate težko neposredno primerjati med laboratoriji. PCR-ribotipe lahko namreč pravilno določimo samo če v laboratoriju hranimo tudi referenčne seve. Če le-teh nimamo, ribotipom dodelimo lokalno oznako in jih lahko primerjamo samo z lokalno zbirkо (Janežič in Rupnik, 2010). Da bi izboljšali moč razlikovanja metode in primerjavo ter izmenjavo podatkov med laboratoriji, so Indra in sod. (2008) razvili modificirano metodo PCR-ribotipizacije, pri čemer so za ločevanje pomnoženih ISR uporabili kapilarno elektroforezo na sekvenatorju, s katero lahko do nukleotida natančno določimo velikosti posameznih ISR. Za primerjavo rezultatov so ustvarili podatkovno bazo WEBRIBO (2013), ki je dostopna preko svetovnega spleta (Indra in sod., 2008). S tem je metoda postala bolj uporabna za medlaboratorijsko primerjavo rezultatov.

2.6.2.6 Tipizacija na osnovi nukleotidnega zaporedja več lokusov

Tipizacija na osnovi nukleotidnega zaporedja več lokusov (MLST - angl. multilocus sequence typing) spada med molekularne metode, ki temelji na določanju nukleotidnega zaporedja. Metoda razlikuje med različnimi sevi na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju večih genov, pomembnih za osnovne celične funkcije (ti. »hišni geni« oz. angl. housekeeping genes). Najprej s PCR pomnožimo del (približno 400 do 500 bp) vseh izbranih genov in jim določimo nukleotidno zaporedje. Vsem različnim zaporedjem posameznega gena dodelimo svojo številko. Zaporedja vseh alelnih številk pa določijo sekvenčni tip (ST) (Maiden in sod., 1998). MLST ima manjšo moč razlikovanja od PCR-ribotipizacije in pulzne gelske elektroforeze, vendar pa je rezultate MLST lažje primerjati

med laboratorijski kot npr. rezultate PFGE in drugih metod, ki temeljijo na analizi vzorca fragmentov (Lemee in sod., 2004; Lemee in sod., 2005).

2.6.2.7 Ostale tipizacijske metode

Za tipizacijo bakterije *C. difficile* so v uporabi še nekatere druge molekularne metode, ki pa za razliko od zgoraj naštetih niso v splošni uporabi. To so npr. polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP - angl. amplified fragment length polymorphism). Pri tej metodi s pomočjo verižne reakcije s polimerazo selektivno pomnožimo restrikcijske fragmente, ki jih dobimo z restrikcijo celotne genomske DNK (Vos in sod., 1995). Med druge molekularne metode spadajo še: verižna reakcija s polimerazo z naključno prilegajočimi se kratkimi (do 10 bp) začetnimi oligonukleotidi (AP-PCR - angl. arbitrary primer polymerase chain reaction) (Killgore in Kato, 1994), tipizacija SlpA, pri kateri izolate razdelimo v različne skupine glede na razlike v nukleotidnem zaporedju variabilne regije gena *slpA* (Karjalainen in sod., 2002; Kato in sod., 2005) in sekvenčna tipizacija tandemskih ponovitev (TRST - angl. tandem repeat sequence typing). Metoda temelji na analizi zaporedja dveh variabilnih lokusov s ponavljajočimi se zaporedji, ki se razlikujejo tako v sekvenci kot v dolžini (Zaiß in sod., 2009).

2.7 EPIDEMIOLOGIJA

2.7.1 Okužbe s *C. difficile* pri ljudeh

Po objavljenih podatkih naj bi bilo z bakterijo *C. difficile* koloniziranih do 5 % zdravih, odraslih ljudi. Ta odstotek se povisha na 25-55 % pri hospitaliziranih ljudeh in ljudeh v domovih za ostarele (Lessa in sod., 2012). Za razliko od zdravih odraslih pa naj bi bilo s *C. difficile* koloniziranih kar do 70 % dojenčkov starih do 1 leta (Al-Jumaili in sod., 1984; Jangi in Lamont, 2010). Ta odstotek potem počasi upade, in sicer pri otrocih do drugega leta, na približno 6 % in pri otrocih starejših od 2 let na približno 2 % (Bryant in McDonald, 2009).

Se pa število okužb s *C. difficile* po svetu iz leta v leto povečuje (Rupnik in sod., 2009). V zadnjih letih bi naj okužbe s *C. difficile* po številu prehitale do sedaj najbolj pogostega povzročitelja bolnišničnih okužb, na meticilin odporno bakterijo *Staphylococcus aureus* (MRSA - angl. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Miller in sod., 2011). V zadnjem času opažajo tudi vse več izvenbolnišničnih okužb. Takih bi naj bilo tudi do 40 % (Khanna in sod., 2012). Vzroke za naraščanje okužb s *C. difficile* lahko povežemo predvsem s prekomerno uporabo antibiotikov, kar je privelo do pojava novih sevov s sposobnostjo hitrega širjenja (kot je tudi sev PCR-ribotipa 027), pojavom novih rezervoarjev in/ali novih poti, po katerih pride do okužbe (npr. živali in hrana) (Rupnik in sod., 2009; Rupnik, 2007; Weese, 2010). Vse to bi lahko povezali tudi z naraščanjem izvenbolnišničnih okužb (Lessa in sod., 2012; Freeman in sod., 2010).

V eni največjih epidemioloških študij okužb s *C. difficile* v Evropi iz leta 2008, ki je zajemala kar 34 evropskih držav, so prišli do ugotovitve, da je večina okužb s *C. difficile* še vedno pri ljudeh z znanimi dejavniki tveganja (starejši bolniki, ki so nedavno jemali antibiotike). Splošno gledano so najbolj pogosti PCR-ribotipi 014/020, 001 in 078, se pa pogostost ribotipov med državami razlikuje. V zadnjih letih zloglasni PCR-ribotip 027 se po pogostosti v Evropi uvršča šele za prej omenjenimi tremi PCR-ribotipi. Vsekakor je PCR-ribotip 027 delni vzrok za večji porast okužb s *C. difficile* od leta 2003 naprej, ko so ob izbruhu v Kanadi in ZDA zabeležili večje število hudih in ponavljajočih se obolenj s *C. difficile*, vendar pa so ga v Evropi prvič omenili šele leta 2005 v Veliki Britaniji, od koder se je potem razširil po Evropi (Bauer in sod., 2011).

2.7.1.1 Okužbe s *C. difficile* v Sloveniji

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja smo tudi v Sloveniji v letu 2011 zabeležili prvi izbruh okužbe s *C. difficile*, PCR-ribotipa 027. Pri tem izbruhu je bilo izpostavljenih 40 ljudi, zbolelo jih je 9 in prav toliko jih je bilo hospitaliziranih. Umrlih zaradi tega izbruha ni bilo (Epidemiološko spremljanje..., 2012). Se je pa delež hospitaliziranih zaradi okužbe s *C. difficile* v primerjavi z letom 2010 povečal celo za 100 %. Od leta 1999 naprej delež prijav akutnih gastroenterokolitisov, katerih povzročitelj je *C. difficile*, vztrajno narašča. Leta 1999 so na Inštitutu za varovanje zdravja prejeli 2 prijavi, v letu 2011 pa že 135

(Epidemiološko spremeljanje..., 2012). Prevladajoči PCR-ribotipi v Sloveniji, ki se pri teh okužbah pojavljajo, so, podobno kot drugje v Evropi, PCR-ribotipi 014/020, 002 in 001/072 (Janežič in sod., 2012a). Okužbe se pojavljajo predvsem pri bolnikih z običajnimi dejavniki tveganja, kot so višja starost, prejemanje antibiotikov, zdravljenje v bolnišnici in kronična obolenja pacientov. So pa okužbe zabeležili v vseh starostnih skupinah. Po podatkih pasivnega sistema prijavljanja nalezljivih bolezni – SURVIVAL so za posledicami okužbe s *C. difficile*, v letu 2011, umrli 4 ljudje (Epidemiološko spremeljanje..., 2012).

2.7.2 Okužbe s *C. difficile* pri živalih

Bakterija *C. difficile* je pomemben patogen tudi pri različnih živalih, kot so npr. konji, telički in prašiči, bakterijo pa so izolirali tudi iz blata drugih živali (mačk, psov, kokoši, hrčkov, miši, zajcev, ovac, celo slonov in nojev...) (Rupnik, 2007; Baverud, 2002; Hensgens in sod., 2012; Zidarič in sod., 2008; Avberšek in sod., 2009; Knight in Riley, 2013). Prisotnost bakterije *C. difficile* pri živalih ni vedno pogojena z obolenjem. So pa pri konjih (Weese in sod., 2006; Songer in sod., 2009a), govedu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006) in prašičih (Songer in Uzal, 2005) že pokazali, da bakterija povzroča črevesne infekcije. Po nekaterih raziskavah sodeč pri govedu in prašičih prevladuje PCR-ribotip 078, pri mačkah in psih pa netoksinogeni ribotip 010 (Keel in sod., 2007; Koene in sod., 2012). Za primerjavo je ena večjih raziskav v Sloveniji pokazala nekoliko drugačne rezultate, kjer je pri prašičih prevladoval PCR-ribotip 045 (prej 066) in PCR-ribotip 150 (prej SLO 011) (Avberšek in sod., 2009; Janežič in sod., 2012a).

Pri živalih se pojavljajo enaki ribotipi kot pri ljudeh. Ljudje in živali si torej delimo mnoge ribotipe. Marsikateri prevladajoči človeški PCR-ribotip (npr. 014/020) je zmožen preziveti tudi v živalih in celo prosto v okolju. Vse to in tudi genetska sorodnost skupnih ribotipov pa nakazuje na možne prenose iz živali na ljudi in obratno (Janežič in sod., 2012a; Bakker in sod., 2010).

2.7.3 *C. difficile* v okolju

Prisotnost *C. difficile* so dokazali tudi v naravnem okolju, kot so prst, tekoče ter stope vode in rastline (Al Saif in Brazier, 1996; Zidarič in sod., 2010). Tudi v naravnem okolju se pojavljajo isti ribotipi kot pri ljudeh. Zidarič in sod. (2010) so v rekah odkrili več kot polovico takšnih ribotipov, ki jih najdemo tudi pri ljudeh. Na tem področju v preteklosti ni potekalo veliko raziskav, zato ni veliko znanega, kakšno vlogo ima okolje na infekcije pri ljudeh in živalih (Rodriguez-Palacios in sod., 2013).

2.7.4 *C. difficile* v hrani

Glede na to, da odkrivamo vse več prekrivanj med sevi *C. difficile* identificiranimi pri človeku, živalih in v okolju, se raziskave vedno bolj usmerjajo tudi v odkrivanje bakterije v hrani. *C. difficile* so izolirali iz surovega mletega govejega mesa (Rodriguez-Palacios in sod., 2007), perutninskega mesa (Harvey in sod., 2011a), svinjine (Harvey in sod., 2011b), morske hrane (Metcalf in sod., 2011, Pasquale in sod., 2012) in zelenjave (Al Saif in Brazier, 1996; Metcaf in sod., 2010), kot tudi iz v naprej pripravljenih živil, npr. solate (Bakri in sod., 2009). Tudi v hrani so našli enake PCR-ribotipe kot pri ljudeh, živalih in okolju (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Songer in sod., 2009b; Bakri in sod., 2009). Do danes še ni bilo potrjenega primera prenosa in okužbe s *C. difficile* s hrano. Ob morebitnih epidemijah ne smemo zanemariti nobenega znanega vira *C. difficile*, tudi hrane ne. So pa potrebne nadaljnje raziskave, da izvemo več o morebitnih poteh in prenosih na ljudi (Gould in Limbago, 2010; Hensgens in sod., 2012; Rodriguez-Palacios in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Izbrani sevi bakterije *Clostridium difficile*

Seve bakterije *C. difficile*, uporabljene pri diplomskem delu, smo izbrali iz zbirke sevov Oddelka za mikrobiološke raziskave, Centra za mikrobiologijo, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Zbirka vključuje seve bakterije *C. difficile* iz različnih geografskih območij in gostiteljev ter iz različnih drugih svetovnih zbirk. Izbirali smo seve, ki jih na Oddelku za mikrobiološke raziskave uporablajo kot referenčne seve pri PCR-ribotipizaciji. V analizo smo vključili 48 izolatov, ki pripadajo 22 različnim PCR-ribotipom (priloga A). Vse seve smo PCR-ribotipizirali s kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel in sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000 z vsemi tremi pari opisanih začetnih oligonukeotidov (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Janežič in sod., 2011b).

Izbrani sevi so bili predhodno že tipizirani z navadno gelsko elektroforezo, zato te ribotipizacije nismo ponavljali. Vzorci fragmentov PCR-ribotipov navadne gelske elektroforeze so bili shranjeni v podatkovni bazi programa BioNumerics (Applied Maths, Belgija).

3.1.2 Gojišče

Columbia agar s 5 % konjsko krvjo (COH) (bioMerieux, Francija).

3.1.3 Pufri in druge raztopine

Pufre in druge raztopine smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali potrebno količino suhe snovi in dodali polovico končnega volumna destilirane vode. Ko se je suha snov v čaši raztopila, smo raztopino prelili v merilni valj in dodali še preostanek destilirane vode do končnega volumna. V primeru, da je bilo potrebno izmeriti pH, smo to storili po tem, ko

je bila suha snov v čaši raztopljena, vendar še preden smo dodali destilirano vodo do končnega volumna.

Pufer TBE (5x)

Baza Tris (Roth)	54 g
Borova kislina (Sigma)	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	20 ml
Do 1000 ml smo dopolnili z dH ₂ O	
Hranili smo pri 4 °C	
Pred uporabo smo pufer 10x redčili z destilirano vodo.	

Fiziološka raztopina

NaCl	8,5 g
Dodali smo dH ₂ O do 1000 ml	
Sterilizirali smo z avtoklaviranjem.	

0,5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA (Sigma)	93,6 g
Dodali smo dH ₂ O do 500 ml	
pH smo uravnali na 8,0 z 10 M NaOH	
Hranili smo pri sobni temperaturi.	

Nanašalni pufer

Bromfenol modro	25 µl
Saharoza	4 g
dH ₂ O	10 ml

3.2 METODE

3.2.1 Nacepljanje spor bakterije *C. difficile*

Spore sevov bakterije *C. difficile*, hranjene pri -80 °C, smo nacepili na trdno gojišče COH (bioMerieux, Francija). Nacepljene plošče smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C, v anaerobnih pogojih (uporabili smo anaerobne lonce z »GENbox anaer« (bioMerieux, Francija) generatorjem atmosfere). Po 2 do 4 dneh smo kolonije precepili na sveže gojišče in pri istih pogojih inkubirali 24 ur. En dan stara kultura namreč še ne tvori spor, zato je najbolj primerna za izolacijo DNK.

3.2.2 Osamitev DNK

Za osamitev DNK smo uporabili komplet »QIAamp DNA Mini Kit« (Qiagen, Hilden, Nemčija) in postopali po navodili proizvajalca. Pripravili smo si 1,5 ml mikrocentrifugirke, v katere smo dodali po 400 µl fiziološke raztopine. V te smo nato s suhim brisom prenesli 1 dan staro kulturo bakterije *C. difficile*. Mikrocentrifugirke smo nato centrifugirali 10 min pri 10000 obratih/min (v vseh korakih centrifugiranja smo uporabljali centrifugo Eppendorf Mini spin plus in pripadajoči rotor F-45-12-11). Supernatant smo odstranili s pipeto, usedljivo pa resuspendirali v 180 µl lizocima (20 mg/ml) in inkubirali pri 37 °C, 30 min.

Po inkubaciji smo dodali 20 µl proteinaze K in 200 µl pufra AL (oboje je bilo priloženo kompletu za izolacijo) in inkubirali 30 min pri temperaturi 56 °C.

Nato smo mešanici dodali 200 µl absolutnega etanola (96 % - 100 %), vse skupaj premešali na mešalu in na kratko centrifugirali. Lizat smo odpipetirali na kolono (QIAamp Spin Column) in centrifugirali 1 min pri 8000 obratih/min.

Zbiralno mikrocentrifugirko s filtratom smo zavrgli. Kolono, z na silikagelsko membrano vezano DNK, pa smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, dodali 500 µl pufra AW1 in ponovno centrifugirali 1 min pri 8000 obratih/min.

Mikrocentrifugirko s filtratom smo zavrgli in kolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, dodali 500 µl pufra AW2 in centrifugirali 3 min pri 14500 obratih/min. Filtrat smo zavrgli in ponovno centrifugirali 1 min pri 14500 obratih/min.

Preostanek filtrata in zbiralno mikrocentrifugirko smo zavrgli in kolono prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Iz silikagelske membrane v koloni smo nato izprali DNK z dodatkom 200 µl sterilne ddH₂O. Po 1 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi je sledilo še centrifugiranje, 1 min pri 8000 obratih/min.

Mikrocentrifugirke z izolirano DNK smo ustrezno označili in do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

3.2.3 PCR-ribotipizacija

Za pomnoževanje medgenskega prostora (ISR) so opisani trije pari začetnih oligonukleotidov (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Janežič in sod., 2011b).

Opisani pari začetnih oligonukleotidov se med seboj razlikujejo v mestu prileganja na gena za 16S in 23S rRNK (slika 1).

Protokoli za pomnoževanje medgenskega prostora (med genoma 16S in 23S rRNK) ter pogoji za ločevanje produktov PCR (kapilarna elektroforeza na aparatu QIAxcel in kapilarna elektroforeza na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000) so opisani v nadaljevanju.

3.2.3.1 Pomnoževanje medgenskega prostora in ločevanje produktov z aparatom QIAxcel

V 1,5 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali sestavine v vrstnem redu, kot si sledijo po protokolu (preglednici 2 in 3). Mešanico smo dobro premešali in jo v ustrezeni količini odpipetirali v 200 μ l mikrocentrifugirke ter dodali 2 μ l DNK. Za pomnoževanje smo uporabili cikličen termostat T3000 (Biometra, Nemčija).

Začetni oligonukleotidi, sestava reakcijskih mešanic in programi PCR so opisani v preglednicah 1, 2, 3 in 4.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.

Oznaka ZO ¹	Nukletidno zaporedje ZO (5'-3')	Mesto prileganja	Vir
Bidet F	D4*-GTGCGGCTGGATCACCTCCT	1482 – 1501 (16S rDNK)	Bidet in sod., 1999
Bidet R	CCCTGCACCCCTTAATAACTTGACC	1 – 24 (23S rDNK)	Bidet in sod., 1999
Stubbs F	D2*-CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG	1445 – 1466 (16S rDNK)	Stubbs in sod., 1999
Stubbs R	GCGCCCTTGTAGCTTGACC	20 – 1 (23S rDNK)	Stubbs in sod., 1999
Janežič F	D3*-GCTGGATCACCTCCTTCTAAG	1489–1507 (16S rDNK) in na prve 3 bp ISR ²	Janežič in sod., 2011b
Janežič R	TGACCAAGTTAAAAAGGTTGATAGATT	Na zadnjih 21 bp ISR ² in 1–6 (23S rDNK)	Janežič in sod., 2011b

¹ZO - začetni oligonukleotidi

²ISR - medgenska regija (angl. - intergenic spacer region)

* - wellRED fluorescenčni označevalci (D2 do D4 – Sigma-Aldrich, ZDA) – označeni začetni oligonukleotidi so potrebni samo za PCR-ribotipizacijo na sekvenatorju

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Bidet F/Bidet R in Janežič F/Janežič R parov začetnih oligonukleotidov.

	1x 50 µl
dd H ₂ O	39 µl
10x pufer PCR ¹	5 µl
dNTPs (20 mM mešanica)	2 µl
P1 – Bidet F/Janežič F (50 pmol/ µl)	1 µl
P2 – Bidet R/Janežič R (50 pmol/ µl)	1 µl
Taq polimeraza (5 U/ µl)	0,25 µl
DNK	2 µl

¹ Sestava 10x pufra PCR: 10mM Tris-HCl (ph 8,8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Stubbs F/Stubbs R para začetnih oligonukleotidov.

	1x 50 µl
dd H ₂ O	39 µl
10x pufer PCR ¹	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTPs (20 mM mešanica)	2 µl
P1 –Stubbs F (50 pmol/ µl)	1 µl
P2 – Stubbs R (50 pmol/ µl)	1 µl
Taq polimeraza (5 U/ µl)	0,25 µl
DNK	2 µl

¹ Sestava 10x pufra PCR: 10mM Tris-HCl (ph 8,8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂

Preglednica 4: Pogoji pomnoževanja s PCR za Stubbs, Bidet in Janežič pare začetnih oligonukleotidov.

	Stubbs		Bidet		Janežič		Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min	
Denaturacija	94 °C	1 min	95 °C	1 min	95 °C	1 min	
Prileganje ZO ¹	55 °C	1 min	57 °C	1 min	57 °C	1 min	35 x
Podaljševanje	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	15 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	

¹ZO – začetni oligonukleotidi

Po koncu PCR je bilo potrebno PCR produkte še skoncentrirati, zato smo jih segrevali v mikrocentrifugirkah. Mikrocentrifugirkam smo odprli pokrovčke, pustili smo odprt tudi pokrov cikličnega termostata in segrevali pri 75 °C, 30 min.

3.2.3.2 Ločevanje produktov PCR z uporabo aparata QIAxcel

Za ločevanje produktov PCR smo uporabili aparat QIAxcel. Z aparatom je mogoče popolnoma avtomatizirano ločiti fragmente DNK glede na velikost. Ločevanje poteka v kapilarah napolnjenih z gelom, pri v naprej nastavljenih parametrih (čas in napetost nalaganja vzorca ter čas in napetost ločevanja). DNK molekule so negativno nabite in potujejo skozi kapilaro proti pozitivno nabitem koncu. Ko molekule, ki potujejo po kapilari, preidejo detektor, jih le-ta zazna in izmeri njihov signal. Aparat nato signal pretvori v elektronske podatke, ki jih posreduje računalniku za nadaljnjo obdelavo s pomočjo programske opreme (QIAxcel DNA handbook, 2011).

Za ločevanje fragmentov smo uporabili kartušo »QIAxcel DNA High Resolution« (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki omogoča ločevanje fragmentov v velikostnem razponu 50 – 1000 bp. Pri pripravi aparata QIAxcel za ločevanje smo postopali po navodilih proizvajalca. Izbrana metoda ločevanja je bila OM500 (čas injiciranja vzorca: 20 s pri napetosti 5 kV; čas ločevanja: 500 s pri napetosti 5 kV). Da smo lahko vzorce fragmentov analizirali, smo vsakič skupaj z vzorci ločili tudi standardno DNK lestvico (QX Size Marker 50 bp – 800 bp v2.0) ter orientacijsko lestvico (QX DNA Alignment Marker 15 bp/1 kbp) (Qiagen, Hilden, Nemčija).

3.2.3.3 Analiza rezultatov aparata QIAxcel

Rezultate smo najprej normalizirali s programom QIAxcel Screen Gel (Qiagen, Hilden, Nemčija) in nato sliko gela shranili kot slikovni format. Vzorce fragmentov smo analizirali s programom BioNumerics vezija 7.0 (Applied Maths, Belgija). Po normalizaciji gela s pomočjo standardne DNK-lestvice smo izračunali sorodnost med sevi s koeficientom Dice in potem z algoritmom UPGMA – metodo aritmetičnega povprečja neuteženih parov (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean) narisali dendrogram. Pri primerjavi fragmentov smo dovolili 0,7 % tolerance in 1 % optimizacijo. V isti PCR-ribotip smo uvrstili seve, ki so imeli isti vzorec fragmentov. Če sta se vzorca fragmentov razlikovala v vsaj enem fragmentu, smo jima pripisali različna PCR-ribotipa.

3.2.3.4 Pomnoževanje medgenskega prostora in ločevanje produktov s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

Tudi PCR-ribotipizacijo na sekvenatorju smo naredili z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov. Metoda z uporabo začetnih oligonukleotidov opisanih v Bidet in sod. (1999) je bila že optimizirana, bilo pa je potrebno optimizirati še metodo za ostala para začetnih oligonukleotidov (Stubbs in sod., 1999; Janežič in sod., 2011b). Za začetne oligonukleotide, opisane v Janežič in sod. (2011b), smo uporabili enak protokol kot za Bidetove (Indra in sod., 2008), optimizirati pa je bilo potrebno protokol za Stubbsove začetne oligonukleotide. Preizkusili smo različne koncentracije MgCl₂, začetnih

oligonukleotidov in DNK v reakcijski mešanici. Spreminjali smo program pomnoževanja ISR tako, da smo spremajali število ciklov. Optimiziran protokol, ki smo ga uporabili za tipizacijo, je podrobneje podan v nadaljevanju.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje medgenskega prostora (ISR), so enaka kot za klasično PCR-ribotipizacijo, le da so začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo na 3' konec gena za 16S, označeni z wellRED fluorescenčnimi označevalci (D2, D3 in D4) (Sigma-Aldrich, ZDA) (preglednica 1). Sestava reakcijskih mešanic in programi na cikličnem termostatu so opisani v preglednicah 5, 6 in 7.

V 1,5 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali sestavine v vrstnem redu, kot si sledijo na protokolu. Mešanico smo dobro premešali in jo v ustrezeni količini odpipetirali v 200 µl mikrocentrifugirke ter dodali ustrezeno količino DNK. Za PCR smo uporabili cikličen termostat T3000 (Biometra, Nemčija).

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Bidet F/Bidet R in Janežič F/Janežič R parov začetnih oligonukleotidov (Indra in sod., 2008).

	1x 10 µl
Hotstar Mastermix (Qiagen)	5 µl
Bidet F/Janežič F – (5µM)	0,12 µl
Bidet R/Janežič R – (5µM)	0,12 µl
dd H ₂ O	4,3 µl
DNK	0,5 µl

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice z uporabo Stubbs F/Stubbs R para začetnih oligonukleotidov.

	1x 10 µl
Hotstar Mastermix (Qiagen)	5 µl
MgCl ₂	1 µl
Stubbs F – (5µM)	0,2 µl
Stubbs R – (5µM)	0,2 µl
dd H ₂ O	2,6 µl
DNK	1 µl

Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja s PCR za Stubbs, Bidet in Janežič pare začetnih oligonukleotidov (Indra in sod., 2008).

	Stubbs		Bidet		Janežič		Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C	15 min	95 °C	15 min	95 °C	15 min	
Denaturacija	94 °C	1 min	94 °C	1 min	94 °C	1 min	20 x (Janežič in Bidet)
Prileganje ZO ¹	55 °C	1 min	57 °C	1 min	58 °C	1 min	40 x (Stubbs)
Podaljševanje	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	30 min	72 °C	30 min	72 °C	30 min	

¹ZO – začetni oligonukleotidi

Po koncu pomnoževanja smo najprej preverili prisotnost produktov PCR s pomočjo navadne gelske elektroforeze. V primeru, da so bili produkti na gelu zelo močno vidni, smo jih pred ločevanjem na sekvenatorju ustreznno redčili. Pripravili smo si 1,5 % agarozni gel. V čašo smo natehtali 1,2 g agaroze in dodali 80 ml ohlajenega 0,5x TBE pufera. V mikrovalovni pečici smo vse skupaj segrevali približno 90 do 120 sekund, dokler se ni agaroza povsem raztopila. Raztopino smo nato v hladni vodni kopeli ohladili na približno 50 °C in gel prelimili v plastični modelček ter mu dodali glavniček, s katerim smo ustvarili luknjice za nanašanje vzorcev. Približno 30 min smo počakali, da se je gel strdil, ga s podstavkom modelčka prenesli v elektroforezno banjico (Bio-Rad, ZDA) in prelimili s 0,5x TBE pufrom. V prvo luknjico gela smo nanesli 7 µl standardne 100-bp DNK lestvice (Biotoools, Španija). V vsako naslednjo luknjico smo nato nanesli mešanico 5 µl nanašalnega pufera in 5 µl produktov PCR. Elektroforeza je tekla približno 45 min pri napetosti 120 V.

Po končani elektroforezi smo gel za 10 min prenesli v kopel raztopine etidijevega bromida s koncentracijo 0,2 µg/ml, da so se produkti PCR obarvali. Gel smo nato razbarvali z destilirano vodo (10 min) in ga slikali z digitalnim dokumentacijskim sistemom Biometra (Biometra, Nemčija).

3.2.3.5 Ločevanje produktov PCR z uporabo kapilarne elektroforeze na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

Za ločevanje produktov PCR na sekvenatorju je bilo potrebno produkte najprej denaturirati. Denaturacijska mešanica je bila sestavljena iz 40 µl formamida, 0,3 µl standardne DNK lestvice (CEQ 600 bp; Beckman Coulter, ZDA) ter 1 µl produkta PCR. Mešanico smo odpipetirali v vdolbinice mikrotiterske plošče ter dodali še kapljico mineralnega olja, da smo preprečili izhlapevanje.

Tako pripravljeni produkti PCR smo analizirali na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000. Za ločevanje smo uporabili kapilaro dolgo 33 cm in gel LPAI (Beckman Coulter, ZDA) ter nastavili naslednje parametre:

Denaturacija:

Temperatura = 90 °C

Čas = 90 s

Ločevanje fragmentov:

Napetost = 4,8 kV

Čas = 80 min

Injiciranje vzorca:

Napetost = 2,0 kV

Čas = 60 s

3.2.3.6 Analiza rezultatov sekvenatorja Beckman Coulter CEQ 8000

Rezultate smo obdelali s pripadajočo programsko opremo sekvenatorja Beckman Coulter CEQ 8000. Po normalizaciji smo velikosti pomnoženih medgenskih regij (izražene kot vrhovi na elektroferogramu) izvozili v Excelovi tabeli. Za vsak fragment smo poleg velikosti potrebovali tudi podatek o višini vrha (intenziteta fluorescence, ki je sorazmerna s količino produkta PCR). Vsi fragmenti, katerih višina pada pod 10 % vrednosti najvišjega vrha, se pri analizi ne upoštevajo (gre za nespecifične produkte pomnoževanja ISR) (Indra in sod., 2008). PCR-ribotipe smo nato določili s primerjavo vzorcev fragmentov z vzorci v spletni bazi podatkov WEBRIBO (WEBRIBO, 2013; Indra in sod., 2008).

Za preglednejšo predstavitev rezultatov smo velikosti in jakosti fragmentov vnesli še v program BioNumerics, ki nam je potem na podlagi teh podatkov narisal gel. Primerjava vzorcev fragmentov je potekala enako kot za PCR-ribotipizacijo z aparatom QIAxcel opisano v poglavju 3.2.3.3.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA METOD

V diplomskem delu smo primerjali tri metode tipizacije, od katerih je navadna gelska elektroforeza že bila v rutinski uporabi, drugi dve (metodo PCR-ribotipizacije na aparatu QIAxcel in na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000) pa smo optimizirali v sklopu te diplome.

4.1.1 Optimizacija PCR-ribotipizacije na aparatu QIAxcel

Preizkušali smo različne, v naprej nastavljene metode. Najboljše rezultate smo dobili z metodo OM500 (čas injiciranja vzorca: 20 s pri napetosti 5 kV; čas ločevanja: 500 s pri napetosti 5 kV). Ker so bili fragmenti na elektroferogramu oziroma gelu šibki, smo metodo spremenili tako, da smo podaljšali čas injiciranja vzorcev v kapilaro iz prvotno nastavljenih 10 sekund na 20 sekund. S tem smo dobili bolj močne fragmente, kar nam je v nadaljevanju olajšalo analizo vzorcev fragmentov s programom BioNumerics.

Optimiziran protokol je opisan v poglavju 3.2.3.2.

4.1.2 Optimizacija PCR-ribotipizacije na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

Za začetne oligonukleotide opisane v Bidet in sod. (1999) in Janežič in sod. (2011b) smo po protokolu, kot so ga opisali Indra in sod. (2008), dobili dovolj dobre rezultate, zato dodatna optimizacija ni bila potrebna.

S PCR-ribotipizacijo na sekvenatorju za Stubbsove začetne oligonukleotide nismo bili zadovoljni, zato smo morali PCR optimizirati. Z optimizacijo smo želeli doseči čim več PCR produkta ter s tem izboljšavo fluorescence, in sicer do te mere, da je vrhove, s pomočjo programske opreme sekvenatorja Beckman Coulter CEQ 8000, bilo mogoče zaznati. Optimiziran protokol je opisan v poglavju 3.2.3.4. Najboljše rezultate (dovolj visoke vrhove na elektroferogramu) smo dobili s povečanjem koncentracije začetnih

oligonukleotidov iz 0,06 pmol/µl na 0,1 pmol/µl in pa s povečanjem števila ciklov PCR iz 20 na 40.

4.2 PRIMERJAVA VZORCEV FRAGMENTOV PCR-RIBOTIPIZACIJE DOBLJENIH Z RAZLIČNIMI PARI ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

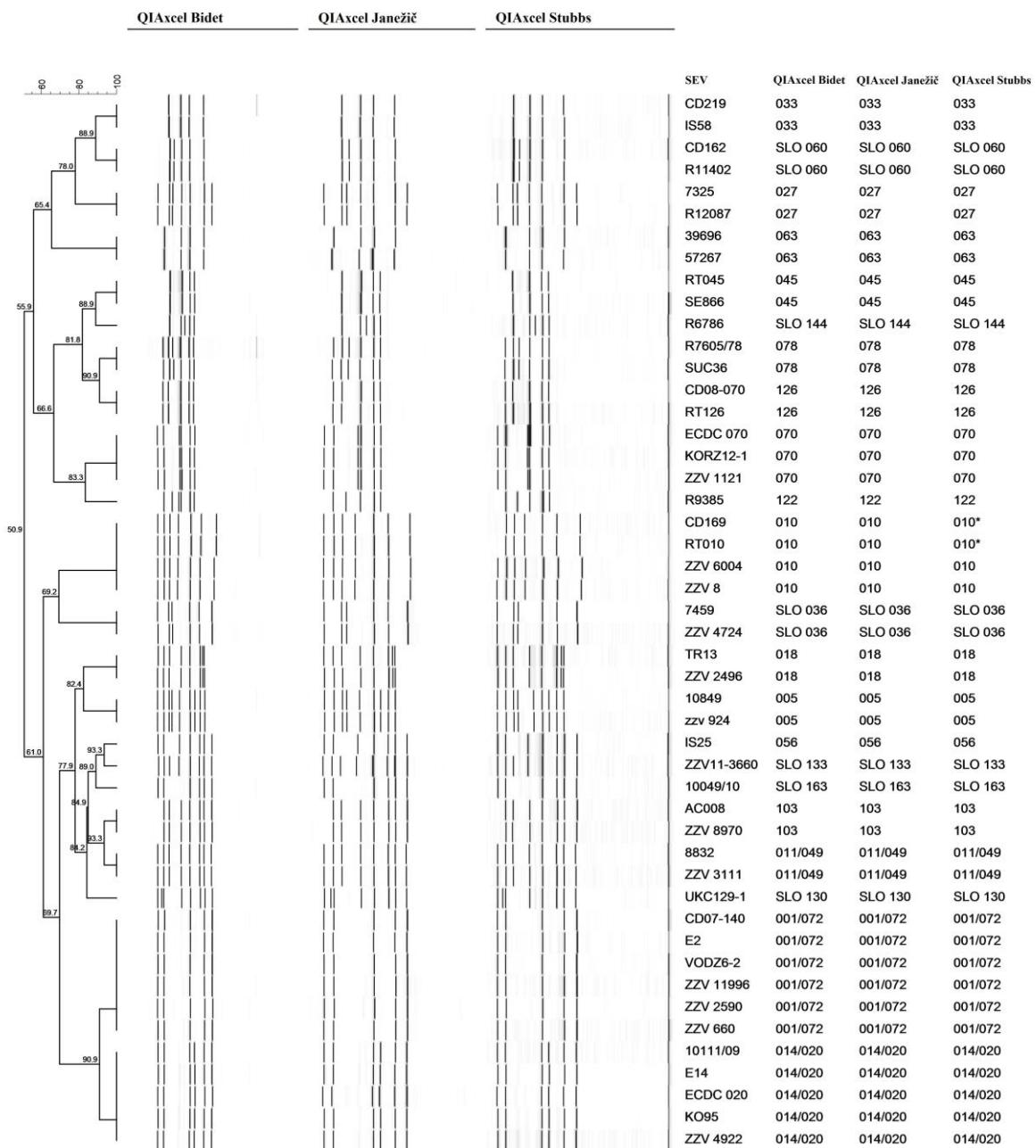
Vsem 48 sevom vključenim v analizo smo pomnožili medgenske regije z vsemi tremi opisanimi pari začetnih oligonukleotidov (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Janežič in sod., 2011b). Pomnožene fragmente smo enkrat ločili s kapilarno elektroforezo na aparatu QIAxcel drugič pa s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000 in primerjali vzorce fragmentov dobljene z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov.

4.2.1 Primerjava vzorcev fragmentov dobljenih z aparatom QIAxcel

Vzorci fragmentov posameznih sevov, ki smo jih dobili z različnimi pari začetnih oligonukleotidov, so se med seboj zelo dobro ujemali (slika 2). Pri treh izolatih smo opazili razliko v vzorcu fragmentov dobljenim z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (slika 3). Primer je vzorec fragmentov seva R9385, kjer vidimo, pri profilu dobljenem z Bidetovimi začetnimi oligonukleotidi, dodaten fragment velikosti približno 400 bp. Tega fragmenta ne vidimo, ko za pomnoževanje uporabimo ostala para začetnih oligonukleotidov. Prav tako tega fragmenta ni, če pogledamo rezultate dobljene s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju (slika 4) in tudi če fragmente (pomnožene z Bidetovimi začetnimi oligonukleotidi) ločimo z navadno agarozno gelsko elektroforezo (na podlagi katere so določeni PCR-ribotipi sevom, ki smo jih vključili v analizo, in je standard pri določanju PCR-ribotipov na Oddelku za mikrobiološke raziskave na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor – podatki niso prikazani).

Pri dveh izolatih, CD169 in RT010, s Stubbsovimi začetnimi oligonukleotidi ne vidimo največjega fragmenta velikosti približno 600 bp, ki pa je viden pri ostalih dveh parih začetnih oligonukleotidov (slika 3) ter tudi pri vzorcu fragmentov (Bidetovi začetni oligonukleotidi), dobljenem z navadno agarozno gelsko elektroforezo (ni prikazano) in kapilarno elektroforezo na sekvenatorju z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov (slika

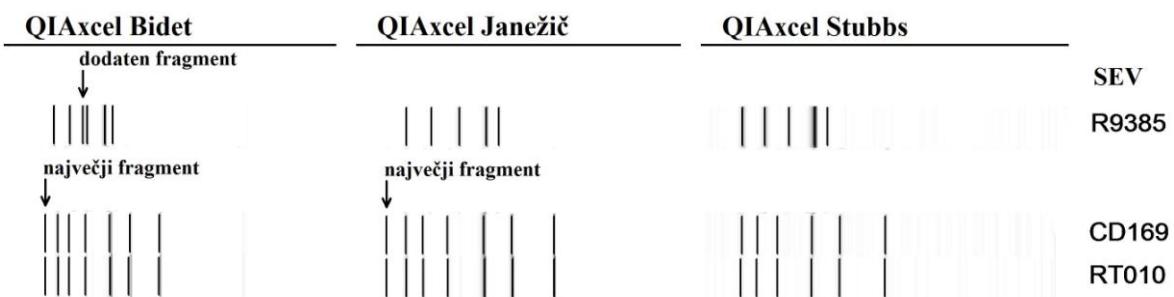
5). Pri vseh ostalih sevih so bili vzorci fragmentov primerljivi (število in razporeditev) – edine razlike med njimi so bile samo v velikosti posameznih fragmentov zaradi različnih mest, kamor prilegajo posamezni pari začetnih oligonukleotidov (priloga B).



Slika 2: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov vseh sevov na aparatu QIAxcel.

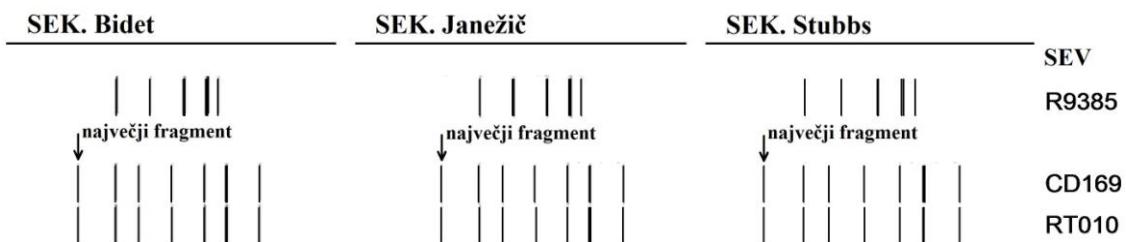
QIAxcel Bidet – vzorci fragmentov z Bidet parom začetnih oligonukleotidov, QIAxcel Janežič – vzorci fragmentov z Janežič parom začetnih oligonukleotidov, QIAxcel Stubbs – vzorci fragmentov s Stubbs parom začetnih oligonukleotidov.

(001/072), (011/049), (014/020) – pari različnih, vendar po vzorcu fragmentov zelo podobnih ribotipov, ki se jih z navadno gelsko elektroforezo ali aparatom QIAxcel ne da vedno ločit.



Slika 3: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov sevov R9385, CD169 in RT010 na aparatu QIAxcel.

QIAxcel Bidet – vzorci fragmentov z Bidet parom začetnih oligonukleotidov, QIAxcel Janežič – vzorci fragmentov z Janežič parom začetnih oligonukleotidov, QIAxcel Stubbs – vzorci fragmentov s Stubbs parom začetnih oligonukleotidov.



Slika 4: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov sevov R9385, CD169 in RT010 na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000.

SEK. Bidet – vzorci fragmentov z Bidet parom začetnih oligonukleotidov, SEK. Janežič – vzorci fragmentov z Janežič parom začetnih oligonukleotidov, SEK. Stubbs – vzorci fragmentov s Stubbs parom začetnih oligonukleotidov.

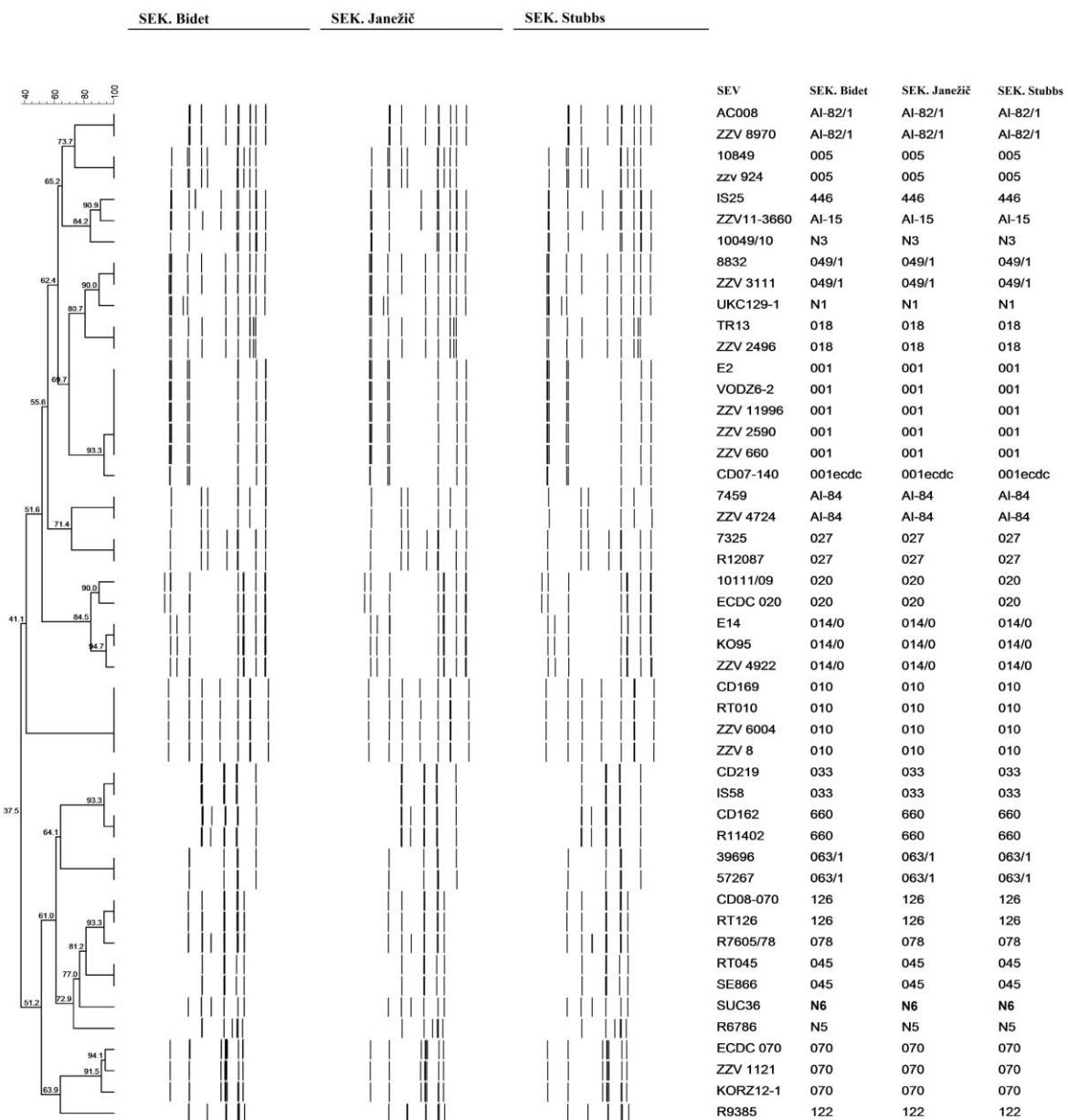
4.2.2 Primerjava vzorcev fragmentov dobljenih s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000

Tudi vzorci fragmentov posameznih sevov, ki smo jih dobili s tremi različnimi začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju, so se dokaj dobro ujemali. Z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov smo dobili primerljive vzorce fragmentov. So se pa razlikovali v velikosti posameznih fragmentov, zaradi že prej omenjenih razlik, v mestih prileganja začetnih oligonukleotidov na gena za 16S oz. 23S rRNK. V primerjavi s fragmenti Bidetovih začetnih oligonukleotidov so bili fragmenti pomnoženi z začetnimi oligonukleotidi opisanimi v Janežič in sod. (2011b) za 24 ± 3 bp.

(teoretična razlika 24 bp) manjši in fragmenti z začetnimi oligonukleotidi opisanimi v Stubbs in sod. (1999) za 33 ± 3 bp (teoretična razlika 33 bp) večji.

Od 48 sevov je 9 takih, katerih vzorci fragmentov se med seboj ne ujemajo povsem. Pri teh 9 sevih so bile razlike samo v prisotnosti oz. odsotnosti t.i. dvojnih fragmentov (z razliko v velikosti približno 2 bp) (slika 5, priloga B). Primer je sev ECDC 070, ki ima z Bidetovimi začetnimi oligonukleotidi fragment velikosti 486 bp in dodaten fragment velikosti 488 bp, medtem ko ima z ostalima paroma začetnih oligonukleotidov na tem mestu samo fragment velikosti 486. Te razlike so za vse seve označene/razvidne v prilogi B.

PCR-ribotipe smo identificirali s spletno podatkovno bazo WEBRIBO (2013). Za vse seve smo dobili ponujen enak PCR-ribotip ne glede na to, s katerim parom začetnih oligonukleotidov so bile pomnožene medgenske regije. Tudi za vseh 9 sevov, ki so se razlikovali med seboj glede na prisotnost oz. odsotnost dvojnih fragmentov, je WEBRIBO (2013) ponudil kot najverjetnejšega enak PCR-ribotip (priloga A).



Slika 5: Vzorci fragmentov za vse tri pare začetnih oligonukleotidov vseh sevov na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000.

SEK. Bidet – vzorci fragmentov z Bidet parom začetnih oligonukleotidov, SEK. Janežič – vzorci fragmentov z Janežič parom začetnih oligonukleotidov, SEK. Stubbs – vzorci fragmentov s Stubbs parom začetnih oligonukleotidov.

4.3 MOČ RAZLIKOVANJA RAZLIČNIH PRISTOPOV PCR-RIBOTIPIZACIJE

Kot že zgoraj opisano smo z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov določili enake PCR-ribotipe posameznim sevom. Pri primerjavi moči razlikovanja med navadno gelsko elektroforezo in kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel ter sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000 smo se zato omejili samo na rezultate dobljene z Bidetovimi začetnimi oligonukleotidi.

S kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel smo 48 sevov razdelili v 22 različnih PCR-ribotipov. Z navadno gelsko elektroforezo smo iste seve razdelili v 23 različnih PCR-ribotipov in s kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju v 25 različnih PCR-ribotipov (določenih s spletno podatkovno bazo WEBRIBO, 2013) (priloga A).

S sekvenatorjem smo razlikovali med sevoma R7605/78 in SUC36 ter jima določili različna PCR-ribotipa (078 in N6*). Z aparatom QIAxcel in navadno gelsko elektroforezo pa sta oba seva imela enak vzorec fragmentov in smo ju uvrstili v isti PCR-ribotip (078). Prav tako smo s sekvenatorjem razlikovali med sevi ribotipa 001, saj je bil sev CD07-140 uvrščen v drug PCR-ribotip (001ecdc) (preglednica 8).

Za razliko od navadne gelske elektroforeze in kapilarne elektroforeze na sekvenatorju pa z elektroforezo na aparatu QIAxcel nismo mogli razlikovati med ribotipoma 014 (sevi K095, E14, ZZV 4922) in 020 (seva ECDC020, 10111/09) (preglednica 8).

*N6 je, tako kot N1, N3 in N5, interna oznaka PCR-ribotipa

Preglednica 8: Razlikovanje PCR-ribotipov s posameznim sistemom.

Sev	Gel ¹ - ribotip	QIAxcel ² - ribotip	SEK ³ - ribotip		
R7605/78	078	078	078		
SUC36			N6		
ZZV 11996	001/072*	001/072*	001		
ZZV 2590					
E2					
ZZV 660			001ecdc		
VODZ6-2					
CD07-140					
ZZV 3111	011/049*	011/049*	049/1		
8832			AI-15		
ZZV 11-3660					
ECDC020	020	014/020*	020		
10111/09			014/0		
KO95	014				
E14					
ZZV 4922					

¹Gel – navadna gelska elektroforeza

²QIAxcel – kapilarna gelska elektroforeza na aparatu QIAxcel

³SEK – kapilarna gelska elektroforeza na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

*(001/072), (011/049), (014/020) – pari različnih, vendar po vzorcu fragmentov zelo podobnih ribotipov, ki se jih z navadno gelsko elektroforezo ali aparatom QIAxcel ne da vedno ločit

S pomočjo Simpsonovega indeksa, ki pove kakšna je verjetnost, da dva nesorodna izolata uvrstimo v dva različna tipa (Hunter in Gaston, 1988) – program za izračun je dostopen na: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php - smo izračunali moč razlikovanja PCR-ribotipizacije na vseh treh elektroforeznih platformah. Moč razlikovanja PCR-ribotipizacije z navadno gelsko elektroforezo, je bila 0,965, za kapilarno gelsko elektroforezo z aparatom QIAxcel 0,960 in za kapilarno gelsko elektroforezo s sekvenatorjem, 0,970.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V sklopu diplomske naloge smo optimizirali in primerjali različne pristope za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*. Zanimalo nas je, ali z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov, ki so trenutno na voljo za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*, dobimo primerljive vzorce fragmentov, ter kakšna je primerljivosti rezultatov na različnih elektroforeznih sistemih (navadna agarozna gelska elektroforeza, kapilarna elektroforeza na aparatu QIAxcel in sekvenatorju). Za vsak elektroforezni sistem smo določili tudi njegovo moč razlikovanja.

PCR-ribotipizacija je namreč najpogosteje uporabljena metoda za tipizacijo bakterije *C. difficile* v Evropi. Za tipizacijo so opisani trije pari začetnih oligonukleotidov, od katerih sta dva od njih že v splošni uporabi (Bidet in sod., 1999 in Stubbs in sod., 1999). Pred kratkim so Janežič in sod. (2011b) opisali še tretje začetne oligonukleotide, ki za enkrat še niso v splošni uporabi, omogočajo pa PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile* direktno v vzorcu blata. So namreč dovolj specifični, da prilegajo samo na zaporedja v genomu bakterije *C. difficile*, kar ostala dva para začetnih oligonukleotidov nista (Janežič in sod., 2011b).

V dveh delovnih hipotezah smo predpostavili, da bomo z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov dobili primerljive vzorce fragmentov, ter da bo moč razlikovanja PCR-ribotipizacije na sekvenatorju večja v primerjavi z močjo razlikovanja s kapilarno elektroforezo na sistemu QIAxcel (Qiagen, Hilden, Nemčija) in klasično agarozno gelsko elektroforezo.

5.1.1 Optimizacija metod

Za čim boljše ovrednotenje in primerjavo rezultatov je bilo potrebno protokole za PCR-ribotipizacijo na sistemu Beckman Coulter CEQ 8000 in QIAxcel najprej optimizirati. Za PCR-ribotipizacijo na aparatu QIAxcel smo za pomnoževanje medgenskega prostora med

genoma za 16S in 23S rRNK s PCR uporabili protokole, ki jih uporabljajo na Oddelku za mikrobiološke raziskave (Janežič in Rupnik, 2010; Janežič in sod., 2011b; Stubbs in sod., 1999). Ti so se izkazali za dovolj dobre, zato jih ni bilo potrebno nadalje optimizirati. Za ločevanje pomnoženih fragmentov na aparatu QIAxcel smo uporabili metodo OM500 (čas injiciranja vzorca: 20 s pri napetosti 5 kV; čas ločevanja: 500 s pri napetosti 5 kV), ki je bila predlagana s strani proizvajalca. Ker so bili fragmenti šibki, smo povečali čas nalaganja vzorca v kapilaro iz 10 s na 20 s. Zato se je v kapilaro naložilo več DNK in posledično so bili vrhovi na elektroferogramu močnejši.

Pri PCR-ribotipizaciji na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000 smo za pomnoževanje ISR s PCR uporabili protokol, ki je bil opisan za Bidetove začetne oligonukleotide v Indra in sod. (2008). Opisani pogoji so bili ustrezní tudi za začetne oligonukleotide, opisane v Janežič in sod. (2011b). Količina produktov PCR je bila dovolj velika, da smo jih lahko zaznali po kapilarni elektroforezi na sekvenatorju.

Za Stubbsove začetne oligonukleotide po enakem protokolu nismo dobili pomnoženih fragmentov oz. so bili ti zelo šibki zato smo morali protokol najprej optimizirati. V reakcijsko mešanico smo dodali MgCl₂. Dodatek Mg²⁺ ionov vpliva na delovanje DNK polimeraze in stabilizira vezavo nespecifičnih Stubbsovih začetnih oligonukleotidov (Grunenwald, 2003). Povečali smo tudi koncentraciji začetnih oligonukleotidov in količino DNK ter povečali število ciklov v PCR iz 20 na 40. S tem smo dobili dovolj produktov PCR, da smo jih po elektroforezi na sekventorju lahko zaznali. Protokol je podrobneje opisan v poglavju 3.2.3.4.

5.1.2 Primerjava vzorcev fragmentov z različnimi pari začetnih oligonukleotidov

Vzorci fragmentov, ki smo jih dobili s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov, so se, glede na izbor sevov, med seboj zelo dobro ujemali. S kapilarno elektroforezo na aparatu QIAxcel smo pri 3 sevih opazili razlike v manjkajočih oz. dodatnih fragmentih. Tako je npr. pri sevu R9385 dodaten fragment velikosti približno 400 bp, ko medgenske regije pomnožimo z Bidetovimi začetnimi oligonukleotidi (slika 3). Na aparatu QIAxcel, enako kot pri navadni agarozni gelski elektroforezi, ločujemo dvoverižne fragmente DNK, na sekvenatorju pa ločujemo denaturirano oz. enoverižno DNK (Zimm in Levene, 1992;

QIAxcel DNA handbook, 2011; CEQ™ 8000 ... , 2004). Dodatni fragmenti, ki jih vidimo pri navadni gelski elektroforezi ter elektroforezi na aparatu QIAxcel in ne tudi, če pomnožene fragmente ločimo na sekvenatorju, bi lahko bili posledica nepravilne hibridizacije različnih 16S-23S medgenskih regij s podobnimi nukleotidnimi zaporedji, kar so pokazali Indra in sod. (2008). Ugotovili so, da pri vseh izolatih PCR-ribotipa AI-5 vzorec fragmentov, ki ga dobijo pri navadni agarozni gelski elektroforezi, ni enak tistemu na sekvenatorju. Razlika je en dodaten fragment, ki je viden pri navadni elektroforezi. Ta dodaten fragment so zato izrezali, očistili iz gela in ga analizirali s sekvenatorjem. Dobili so tri fragmente različnih velikosti, ki se ujemajo z velikostmi ostalih pomnoženih medgenskih regij (Indra in sod., 2008). Medgenske regije imajo modularno zgradbo s ponavljačimi se zaporedji DNK z zelo podobnimi nukleotidnimi zaporedji, ki bi lahko bili odgovorni za nepravilno parjenje dveh enoverižnih molekul DNK (Indra in sod., 2008; Indra in sod., 2010; Sadeghfard in sod., 2006).

Na aparatu QIAxcel pri dveh sevih ribotipa 010 (CD169, RT010) s Stubbsovimi začetnimi oligonukleotidi nismo zaznali največjega fragmenta velikosti približno 600 bp, ki pa je viden pri ostalih dveh parih začetnih oligonukleotidov (slika 3). Na isto težavo so naleteli tudi Xiao in sod. (2012), ki predvidevajo, da največjega fragmenta na aparatu QIAxcel niso zaznali zaradi tekmovanja pri pomnoževanju PCR, ki zaradi dobljene manjše količine fragmenta največje velikosti, povzroča slabši signal. Naše mnenje je, da največjega fragmenta nismo zaznali tudi zaradi tekmovanja fragmentov pri nalaganju v kapilaro in ne samo zaradi kompeticije pri PCR. To lahko vpliva na določitev ribotipa z aparatom QIAxcel, saj se nekateri ribotipi razlikujejo samo v prisotnosti ali odsotnosti enega fragmenta, zato lahko en fragment razlike pomeni že drugi ribotip.

Pri analizi podatkov dobljenih z aparatom QIAxcel smo opazili tudi veliko ozadja (nespecifičnih fragmentov), zaradi česar je bilo pri fragmentih s šibkejšim signalom težje določiti oz. se odločiti, ali dejansko gre za fragmente ali ne.

Pri vzorcih fragmentov vseh treh parov začetnih oligonukleotidov, ki smo jih dobili s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju, smo opazili, da so med njimi razlike v t.i. dvojnih vrhovih, med katerimi je bila razlika ± 2 bp. Analiza nukleotidnega zaporedja medgenskih

regij večjega števila PCR-ribotipov je pokazala, da do te razlike pride zaradi dodanih/manjkajočih AT (adenin, timin) ali TA (timin, adenin) nukleotidnih baz proti 3' koncu ISR, kar bi lahko bila posledica napake (t.i. zdrs DNK-polimeraze) pri pomnoževanju DNK (Janežič, 2012b).

V podatkovni bazi WEBRIBO (2013) nismo imeli težav z identifikacijo posameznih ribotipov kljub razlikam v dvojnih vrhovih. WEBRIBO (2013) je za vse seve, ne glede na to, kateri par začetnih oligonukleotidov smo uporabili, ponudil isti PCR-ribotip. WEBRIBO (2013) deluje tako, da vnešeni vzorec fragmentov primerja z že obstoječimi vzorci fragmentov v bazi in tako na podlagi izbranih nastavitev (izbira sekvenatorja, kapilare, njene dolžine in temperature, ter začetnih oligonukleotidov) izbere najbolj podoben PCR-ribotip.

5.1.3 Moč razlikovanja PCR-ribotipizacije na posameznem sistemu

Pri primerjavi moči razlikovanja posameznih sistemov smo se omejili samo na Bidetove začetne oligonukleotide. Z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov smo namreč dobili enake vzorce fragmentov in s tem posledično enake PCR-ribotipe. Dodatni razlogi za takšno omejitev so bili še, da so Bidetovi začetni oligonukleotidi najbolj splošno uporabljeni, prav tako pa za Bidetove začetne oligonukleotide na Oddelku za mikrobiološke raziskave, Centra za mikrobiologijo, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, že imajo knjižnico vzorcev fragmentov referenčnih PCR-ribotipov, dobljenih z navadno gelsko elektroforezo, ki smo jo lahko vključili v primerjavo moči razlikovanja na posameznem sistemu.

Primerjava vseh treh elektroforetskih sistemov pokaže, da je najbolj diskriminatorna kapilarna gelska elektroforeza na sekvenatorju. Na sekvenatorju smo namreč lahko razlikovali med nekaterimi PCR-ribotipi, ki jih z aparatom QIAxcel ali navadno gelsko elektroforezo nismo mogli razlikovati. Največ je k temu seveda pri pomogla moč razlikovanja sekvenatorja do 2 bp natančno (CEQ™ 8000 ... , 2004). Po zagotovilih proizvajalca aparata QIAxcel pa je natančnost moči razlikovanja aparata samo od 3 do 5 bp

za fragmente med 100 in 500 bp s »High Resolution« kartušo (QIAxcel DNA handbook, 2011).

Navadna gelska elektroforeza ima malenkost večjo diskriminatorno moč (0,965) kot kapilarna gelska elektroforeza na aparatu QIAxcel (0,960). Večjo diskriminatorno moč od obeh prej omenjenih sistemov pa ima kapilarna gelska elektroforeza na sekvenatorju (0,97), s katero smo razlikovali različne ribotipe znotraj posameznega PCR-ribotipa določenega s klasično PCR-ribotipizacijo (preglednica 8), kar so pokazali že tudi drugi avtorji (Indra in sod., 2008; Xiao in sod., 2012). Diskriminatorna moč klasične ribotipizacije na našem naboru vzorcev je nekoliko večja, kot to poročajo drugi avtorji (0,688 do 0,86) (Bidet in sod., 2000; Eckert in sod., 2011; Green in sod., 2011; Killgore in sod., 2008), kar je pogojeno z raznolikostjo sevov, ki smo jih vključili v raziskavo.

PCR-ribotipizacija z aparatom QIAxcel, kjer rezultate dobimo že po 9 minutah, je hitrejša od PCR-ribotipizacije s klasično agarozno gelsko elektroforezo kjer elektroforeza teče 5 ur. Vendar pa zaradi zgoraj omenjene slabše občutljivosti metode s QIAxcelom ne moremo vedno razlikovati med PCR-ribotipi s podobnimi vzorci fragmentov (slika 2 in preglednica 8) in, kot so dokazali Xiao in sod. (2012), med epidemičnim PCR-ribotipom 027 in PCR-ribotipom 176.

PCR-ribotipizacija s sekvenatorjem je prav tako hitrejša kot klasična PCR-ribotipizacija, saj elektroforeza teče 80 minut. Tudi PCR program je krajsi (2 h v primerjavi s 5 h za klasično PCR-ribotipizacijo). Je tudi bolj občutljiva in ima najboljšo moč razlikovanja med vsemi tremi primerjanimi sistemi. Prednost PCR-ribotipizacije na sekvenatorju je v medlaboratorijski primerljivosti rezultatov. Rezultate dobimo tako za sistem QIAxcel kot za sekvenator v digitalni obliki, vendar pa za vzorce fragmentov dobljene s sekvenatorjem že obstaja spletna podatkovna baza WEBRIBO (2013), ki omogoča primerjavo podatkov (Indra in sod., 2008). Slaba stran je le višja cena v primerjavi z ostalima sistemoma.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov dobljenih v diplomski delu lahko sklepamo, da:

- so vsi trije pari začetnih oligonukleotidov primerni za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*;
- z vsemi pari začetnih oligonukleotidov dobimo primerljive vzorce fragmentov, edina razlika je v velikosti posameznih fragmentov, zaradi razlik v mestih prileganja začetnih oligonukleotidov v ribosomskem operonu;
- so vsi trije sistemi (navadna gelska elektroforeza, kapilarna gelska elektroforeza na aparatu QIAxcel in kapilarna gelska elektroforeza s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000) primerni za ločevanje pomnoženih ISR. Pri rezultatih, ki jih dobimo z aparatom QIAxcel, moramo upoštevati, da se včasih fragmenti, ki so večji od 500 bp, ne vidijo, in da v tem primeru PCR-ribotipe, ki se razlikujejo v enem od večjih fragmentov, potrdimo s katerim od ostalih elektroforeznih sistemov;
- ima od primerjanih sistemov največjo moč razlikovanja PCR-ribotipizacija na sekvenatorju, najmanjšo pa v nasprotju z našo predpostavko PCR-ribotipizacija na sistemu QIAxcel.

6 POVZETEK

Bakterija *Clostridium difficile* spada med najpogosteje povzročitelje bolnišničnih črevesnih okužb. Kljub temu, da je glavni rezervoar bakterije bolnišnično okolje, jo lahko najdemo tudi v naravnih habitatih (voda, prst, rastline), blatu živali in v hrani. Okužbi so najbolj podvrženi starejši hospitalizirani ljudje, pri katerih je, največkrat zaradi zdravljenja z antibiotiki, prišlo do porušenja normalne črevesne mikrobiote, kar je predpogoj za kolonizacijo *C. difficile*. V zadnjih letih je vse več okužb tudi pri mlajših ljudeh, ki niso bili zdravljeni v bolnišnici in/ali z antibiotiki.

Za prepoznavanje in spremljanje širjenja okužb z bakterijo *C. difficile* se uporablajo različne tipizacijske metode, v evropskih laboratorijih pa se je uveljavila predvsem PCR-ribotipizacija. PCR-ribotipizacija spada med molekularne tipizacijske metode in temelji na pomnoževanju medgenskih regij (ISR) med genoma za 16S in 23S rRNK.

V diplomskem delu smo na naboru 48 sevov bakterije *C. difficile* primerjali vzorce fragmentov, dobljene s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov, ki so opisani za PCR-ribotipizacijo. Začetni oligonukleotidi se med seboj razlikujejo v mestih prileganja na gena za 16S oziroma 23S rRNK (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Janežič in sod., 2011b). Prav tako smo primerjali različne sisteme za ločevanje pomnoženih ISR (navadno gelsko elektroforezo in kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel ter na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000) in določili njihove moči razlikovanja.

PCR-ribotipizacijo na aparatu QIAxcel in na sekvenatorju je bilo najprej potrebno optimizirati. Z optimiziranimi protokoli smo nato pomnožili ISR ter primerjali vzorce fragmentov dobljene z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov.

Vzorci fragmentov, dobljeni s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov, so se med seboj dobro ujemali. Do razhajanj med vzorci fragmentov je prišlo pri 3 sevih na aparatu QIAxcel. Pri enem sevu smo z Bidet začetnimi oligonukleotidi zaznali dodaten fragment, najverjetneje zaradi nepravilne hibridizacije, po zaporedju podobnih, ISR regij. S kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju tega fragmenta nismo zaznali, saj s sekvenatorjem

ločujemo enoverižno DNK, z aparatom QIAxcel pa dvoverižno. Pri dveh izolatih istega PCR-ribotipa pa s Stubbs začetnimi oligonukleotidi nismo zaznali največjega fragmenta (velikosti približno 600 bp). Ker ena razlika že pomeni drug PCR ribotip, to lahko vpliva na napačno določitev PCR-ribotipa.

Do razlik v vzorcih fragmentov (pri 9 sevih) je prišlo tudi, ko smo ISR ločili s kapilarno elektroforezo na sekvenatorju. Te razlike so predstavljali t.i. dvojni vrhovi, kjer se fragmenta v velikosti razlikujeta samo za 2 bp. Pri primerjavi rezultatov s podatki v podatkovni bazi WEBRIBO (2013) pa zaradi teh razlik ni bilo težav pri določitvi PCR-ribotipa. Fragmenti dobljeni z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov so se razlikovali tudi v velikosti zaradi razlik v mestih prileganja začetnih oligonukleotidov. Vzorci fragmentov dobljeni z Janežič začetnimi oligonukleotidi so bili v primerjavi s tistimi, dobljenimi z Bidet začetnimi oligonukleotidi, približno 24 bp manjši, vzorci fragmentov dobljeni s Stubbs začetnimi oligonukleotidi pa približno 33 bp večji.

Med posameznimi sistemi je bilo ujemanje vzorcev fragmentov dobro. Razlike so se pojavljale samo zaradi razlik v moči razlikovanja med posameznimi elektroforeznimi sistemi. S sekvenatorjem, ki ima sposobnost razlikovanja do 2 bp natančno, smo zato lahko ločili fragmente, ki so bližje skupaj in ki jih z drugima sistemoma nismo mogli ločiti.

Ker smo z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov dobili primerljive vzorce fragmentov, smo se pri primerjavi moči razlikovanja med posameznimi elektroforeznimi sistemi omejili samo na rezultate dobljene z Bidet začetnimi oligonukleotidi. Najbolj diskriminatorna metoda je bila PCR-ribotipizacija na sekvenatorju, kjer smo se veve razdelili na 25 različnih PCR-ribotipov (diskriminatorna moč 0,970). Z navadno gelsko elektroforezo in kapilarno elektroforezo na sistemu QIAxcel pa smo seve razdelili v 23 (diskriminatorna moč 0,965) oziroma 22 različnih PCR-ribotipov (diskriminatorna moč 0,960).

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da so vsi trije pari začetnih oligonukleotidov primerni za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*. Prav tako so vsi trije sistemi (navadna gelska elektroforeza, kapilarna gelska elektroforeza na aparatu QIAxcel in kapilarna gelska

elektroforeza s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000) primerni za ločevanje pomnoženih medgenskih regij, vendar moramo biti pri interpretaciji rezultatov, dobavljenih z aparatom QIAxcel, pazljivi na večje fragmente (>500 bp), ki se včasih ne vidijo in zaradi česar lahko se večje uvrstimo v napačen PCR-ribotip. Najboljšo moč razlikovanja med primerjanimi sistemi je imela, po pričakovanju, kapilarna gelska elektroforeza na sekvenatorju.

7 VIRI

Al-Jumaili I.J., Shibley M., Lishman A.H., Record C.O. 1984. Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *Journal of Clinical Microbiology*, 19, 1: 77-78

Allen W.E., Jones G.E., Pollard J.W., Ridley A.J. 1997. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of Cell Science*, 110, 6: 707-720

Alonso R., Martín A., Peláez T., Marín M., Rodríguez-Creixéms M., Bouza E. 2005. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 2: 155-157

Al Saif N., Brazier J.S. 1996. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 45, 2: 133-137

Ausiello C.M., Cerquetti M., Fedele G., Spensieri F., Palazzo R., Nasso M., Frezza S., Mastrantonio P. 2006. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes and Infection*, 8, 11: 2640-2646

Avberšek J., Janežič S., Pate M., Rupnik M., Zidarič V., Logar K., Vengušt M., Zemljič M., Pirš T., Ocepek M. 2009. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 15, 6: 252-255

Bakker D., Corver J., Harmanus C., Goorhuis A., Keessen E.C., Fawley W.N., Wilcox M.H., Kuijper E.J. 2010. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 10: 3744-3749

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, 5: 817-818

Bartlett J.G. 2002. Anitibiotic-associated diarrhea. New England Journal of Medicine, 346, 5: 334-339

Bartlett J.G., Chang T.W., Gurwith M., Gorbach S.L., Onderdonk A.B. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia*. New England Journal of Medicine, 298, 10: 531-534

Bartlett J.G., Gerding D.N. 2008. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clinical Infectious Diseases, 46, Suppl. 1: S12-S18

Bauer M.P., Notermans D.W., van Benthem B.H., Brazier J.S., Wilcox M.H., Rupnik M., Monnet D.L., van Dissel J.T., Kuijper E.J. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet, 377, 9759: 63-73

Båverud V. 2002. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. Veterinary Quarterly, 24, 4: 203-219

Bidet P., Barbut F., Lalande V., Burghoffer B., Petit J.C. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiology Letters, 175, 2: 261-266

Bidet P., Lalande V., Salauze B., Burghoffer B., Avesani V., Delmée M., Rossier A., Barbut 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, 7: 2484-2487

Borriello S.P. 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl. C: 13-19

Brandt L.J., Aroniadis O.C., Mellow M., Kanatzar A., Kelly C., Park T., Stollman N., Rohlke F., Surawicz C. 2012. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota

transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. American Journal of Gastroenterology, 107, 7: 1079-1087

Brandt L.J., Reddy S.S. 2011. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. Journal of Clinical Gastroenterology, 45, Suppl.: S159-S167

Braun V., Hundsberger T., Leukel P., Sauerborn M., von Eichel-Streiber C. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. Gene, 181, 1-2: 29-38

Brazier J. S. 2001. Typing of *Clostridium difficile*. Clinical Microbiology and Infection, 7, 8: 428-431

Broukhanski G., Low D.E., Pillai D.R. 2011. Modified multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid identification and typing of *Clostridium difficile* during institutional outbreaks. Journal of Clinical Microbiology, 49, 5: 1983-1986

Brouwer M.S., Allan E., Mullany P., Roberts A.P. 2012. Draft genome sequence of the nontoxigenic *Clostridium difficile* strain CD37. Journal of Bacteriology, 194, 8: 2125-2126

Bryant K., McDonald L.C. 2009. *Clostridium difficile* infections in children. Pediatric Infectious Disease Journal, 28, 2: 145-146

Carroll K.C. 2011. Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. Anaerobe, 17, 4: 170-174

CEQ™ 8000 Genetic Analysis System – User's guide. 2004. Brea California, Beckman Coulter, Inc.: 368 str.

Chang T.W., Bartlett J.G., Gorbach S.L., Onderdonk A.B. 1978. Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infection and Immunity*, 20, 2: 526-529

Chapin K.C., Dickenson R.A., Wu F., Andrea S.B. 2011. Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin. *Journal of Molecular Diagnostics*, 13, 4: 395-400

Clabots C.R., Johnson S., Bettin K.M., Mathie P.A., Mulligan M.E., Schaberg D.R., Peterson L.R., Gerding D.N. 1993. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 7: 1870-1875

Corkill J.E., Graham R., Hart C.A., Stubbs S. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 7: 2791-2792

Crawford T., Huesgen E., Danziger L. 2012. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69, 11: 933-943

Delmée M., Homel M., Wauters G. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 3: 323-327

Delmée M., Avesani V., Delferriere N., Burtonboy G. 1990. Characterization of flagella of *Clostridium difficile* and their role in serogrouping reactions. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 10: 2210-2214

Drudy D., Calabi E., Kyne L., Sougioultzis S., Kelly E., Fairweather N., Kelly C.P. 2004. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 41, 3: 237-242

Dubberke E.R., Reske K.A., Noble-Wang J., Thompson A., Killgore G., Mayfield J., Camins B., Woeltje K., McDonald J.R., McDonald L.C., Fraser V.J. 2007. Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. American Journal of Infection Control, 35, 5: 315-318

Eckert C., Van Broeck J., Spigaglia P., Burghoffer B., Delmée M., Mastrandrea P., Barbut F. 2011. Comparison of a commercially available repetitive-element PCR system (DiversiLab) with PCR ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. Journal of Clinical Microbiology, 49, 9: 3352-3354

Epidemiološko spremjanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2011. 2012. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 109 str.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=6179.pdf&_5_MediaId=6179&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (16. dec. 2012)

Fey P.D. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): the molecular epidemiologists tool. Nebraska, Nebraska Public Health Laboratory: 2 str.
<http://www.nphl.org/documents/pfge.pdf> (3. dec. 2012)

Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M., McKenney K., Sutton G., FitzHugh W., Fields C., Gocayne J.D., Scott J., Shirley R., Liu L., Glodek A., Kelley J.M., Weidman J.F., Phillips C.A., Spriggs T., Hedblom E., Cotton M.D., Utterback T.R., Hanna M.C., Nguyen D.T., Saudek D.M., Brandon R.C., Fine L.D., Fritchman J.L., Fuhrmann J.L., Geoghegan N.S.M., Gnehm C.L., McDonald L.A., Small K.V., Fraser C.M., Smith H.O., Venter J.G. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science, 269, 5223: 496-512

Foglia G., Shah S., Luxemburger C., Pietrobon P.J. 2012. *Clostridium difficile*: development of a novel candidate vaccine. Vaccine, 30, 29: 4307-4309

Freeman J., Bauer M.P., Baines S.D., Corver J., Fawley W.N., Goorhuis B., Kuijper E.J., Wilcox M.H. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clinical Microbiology Reviews, 23, 3: 529-549

Gerič B., Carman R.J., Rupnik M., Genheimer C.W., Sambol S.P., Lyerly D.M., Gerding D.N., Johnson S. 2006. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. Journal of Infectious Diseases, 193, 8: 1143-1150

Goering R.V. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infection, Genetics and Evolution, 10, 7: 866-875

Green L.M., Worthington T., Hilton A.C., Lambert P.A. 2011. Genetic characterization of clinical isolates of *Clostridium difficile* using an optimized RAPD protocol and PCR ribotyping reveals strain diversity between two tertiary referral Trusts in the West Midlands, UK. Journal of Medical Microbiology, 60, 9: 1287-1291

Grunenwald H. 2003. Optimization of polymerase chain reactions. V: PCR protocols 2nd ed. Bartlett J.S., Stirling D. (eds.). Totowa, Human Press: 89-100

Gould L.H., Limbago B. 2010. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clinical Infectious Diseases, 51, 5: 577-582

Goulston S.J., McGovern V.J. 1965. Pseudo-membranous colitis. Gut, 6, 3: 207-212

Hall I.C., O'Toole E. 1935. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. American Journal of Diseases of Children, 49: 390-402. Cit. po Lyerly D.M., Krivan H.C., Wilkins T.D. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clinical Microbiology Reviews, 1, 1: 1-18

Harvey R.B., Norman K.N., Andrews K., Hume M.E., Scanlan C.M., Callaway T.R., Anderson R.C., Nisbet D.J. 2011a. *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat. Foodborne Pathogens and Disease, 8, 12: 1321-1323

Harvey R.B., Norman K.N., Andrews K., Norby B., Hume M.E., Scanlan C.M., Hardin M.D., Scott H.M. 2011b. *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23, 4: 807-811

Heinlen L., Ballard J.D. 2010. *Clostridium difficile* infection. American Journal of the Medical Sciences, 340, 3: 247-252

Hensgens M.P., Keessen E.C., Squire M.M., Riley T.V., Koene M.G., de Boer E., Lipman L.J., Kuijper E.J. 2012. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? Clinical Microbiology and Infection, 18, 7: 635-645

Hunter P.R., Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. Journal of Clinical Microbiology, 26, 11: 2465-2466

Indra A., Huhulescu S., Schneeweis M., Hasenberger P., Kernbichler S., Fiedler A., Wewalka G., Allerberger F., Kuijper E.J. 2008. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. Journal of Medical Microbiology, 57, 11: 1377-1382

Indra A., Blaschitz M., Kernbichler S., Reischl U., Wewalka G., Allerberger F. 2010. Mechanisms behind variation in the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA intergenic spacer region. Journal of Medical Microbiology, 59, 11: 1317-1323

Janežič S. 2012. Analiza medgenske regije ribosomskih operonov pri bakteriji *Clostridium difficile*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 50-51, 69-69

Janežič S., Indra A., Allerberger F., Rupnik M. 2011a. Use of different molecular typing methods for the study of heterogeneity within *Clostridium difficile* toxinotypes V and III. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 8: 1101-1107

Janežič S., Ocepek M., Zidarič V., Rupnik M. 2012a. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiology*, 12: 48, doi: 10.1186/1471-2180-12-48: 8 str.

Janežič S., Rupnik M. 2010. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods in Molecular Biology*, 646: 55-65

Janežič S., Štrumbelj I., Rupnik M. 2011b. Use of modified PCR ribotyping for direct detection of *Clostridium difficile* ribotypes in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 8: 3024-3025

Jangi S., Lamont J.T. 2010. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51, 5: 2-7

Jernigan J.A., Siegman-Igra Y., Guerrant R.C., Farr B.M. 1998. A randomized crossover study of disposable thermometers for prevention of *Clostridium difficile* and other nosocomial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19, 7: 494-499

Johnson S., Gerding D.N., Olson M.M., Weiler M.D., Hughes R.A., Clabots C.R., Peterson L.R. 1990. Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *American Journal of Medicine*, 88, 2: 137-140

Johnson S., Gerding D.N. 1998. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 5: 1027-1034

Johnson S., Samore M.H., Farrow K.A., Killgore G.E., Tenover F.C., Lyras D., Rood J.I., DeGirolami P., Baltch A.L., Rafferty M.E., Pear S.M., Gerding D.N. 1999. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. New England Journal of Medicine, 341, 22: 1645-1651

Johnson S., Sambol S.P., Brazier J.S., Delmée M., Avesani V., Merrigan M.M., Gerding D.N. 2003. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. Journal of Clinical Microbiology, 41, 4: 1543-1547

Just I., Selzer J., Wilm M., von Eichel-Streiber C., Mann M., Aktories K. 1995a. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. Nature, 375, 6531: 500-503

Just I., Wilm M., Selzer J., Rex G., von Eichel-Streiber C., Mann M., Aktories K. 1995b. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglycosylates the Rho proteins. Journal of Biological Chemistry, 270, 23: 13932-13936

Karjalainen T., Saumier N., Barc M.C., Delmée M., Collignon A. 2002. *Clostridium difficile* genotyping based on slpA variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. Journal of Clinical Microbiology, 40, 7: 2452-2458

Kato H., Kato N., Watanabe K., Ueno K., Ushijima H., Hashira S., Abe T. 1994. Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. Journal of Clinical Microbiology, 32, 9: 2067-2070

Kato H., Yokoyama T., Arakawa Y. 2005. Typing by sequencing the slpA gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. Journal of Medical Microbiology, 54, 2: 167-171

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, 6: 1963-1964

Kelly C.P., Pothoulakis C., LaMont J.T. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *New England Journal of Medicine*, 330, 4: 257-262

Khanna S., Pardi D.S., Aronson S.L., Kammer P.P., Orenstein R., St Sauver J.L., Harmsen W.S., Zinsmeister A.R. 2012. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *American Journal of Gastroenterology*, 107, 1: 89-95

Killgore G.E., Kato H. 1994. Use of arbitrary primer PCR to type *Clostridium difficile* and comparison of results with those by immunoblot typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 6: 1591-1593

Killgore G.E., Thompson A., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pepin J., Frost E.H., Savelkoul P., Nicholson B., van den Berg R.J., Kato H., Sambol S.P., Zukowski W., Woods C., Limbago B., Gerding D.N., McDonald L.C. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2: 431-437

Kim J., Smathers S.A., Prasad P., Leckerman K.H., Coffin S., Zaoutis T. 2008. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *Pediatrics*, 122, 6: 1266-1270

Knetsch C.W., Lawley T.D., Hensgens M.P., Corver J., Wilcox M.W., Kuijper E.J. 2013. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveillance*, 18, 4: 57-67

Knight D.R., Riley T.V. 2013. Prevalence of *Clostridium difficile* gastrointestinal carriage in Australian sheep and lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 18: 5689-5692

Koene M.G., Mevius D., Wagenaar J.A., Harmanus C., Hensgens M.P., Meetsma A.M., Putirulan F.F., van Bergen M.A., Kuijper E.J. 2012. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 8: 778-784

Kuijper E.J., Oudbier J.H., Stuifbergen W.N., Jansz A., Zanen H.C. 1987. Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 4: 751-753

Kuijper E.J., Coignard B., Tüll P. 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, Suppl. 6: 2-18

Kyne L., Kelly C. 2001. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Gut*, 49, 1: 152-153

Lawrence S.J., Korzenik J.R., Mundy L.M. 2005. Probiotics for recurrent *Clostridium difficile* disease. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 5: 905-906

Leffler D.A., Lamont J.T. 2009. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, 136, 6: 1899-1912

Lemee L., Bourgeois I., Ruffin E., Collignon A., Lemeland J.F., Pons J.L. 2005. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 151, 10: 3171-3180

Lemee L., Dhalluin A., Pestel-Caron M., Lemeland J.F., Pons J.L. 2004. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 6: 2609-2617

Lessa F.C., Gould C.V., McDonald L.C. 2012. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 55, Suppl. 2: S65-S70

Louie T.J., Miller M.A., Mullane K.M., Weiss K., Lentnek A., Golan Y., Gorbach S., Sears P., Shue Y.K. 2011. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 364, 5: 422-431

Lowy I., Molrine D.C., Leav B.A., Blair B.M., Baxter R., Gerding D.N., Nichol G., Thomas W.D. Jr., Leney M., Sloan S., Hay C.A., Ambrosino D.M. 2010. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *New England Journal of Medicine*, 362, 3: 197-205

Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6: 3140-3145

Mani N., Dupuy B. 2001. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 10: 5844-5849

Marsh J.W., O'Leary M.M., Shutt K.A., Pasculle A.W., Johnson S., Gerding D.N., Muto C.A., Harrison L.H. 2006. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 7: 2558-2566

Matamouros S., England P., Dupuy B. 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, 64, 5: 1274-1288

McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C. Jr., Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S., Gerding D.N. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 353, 23: 2433-2441

McFarland L.V., Mulligan M.E., Kwok R.Y., Stamm W.E. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 320, 4: 204-210

McFarland L.V. 2005. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *Journal of Medical Microbiology*, 54, 2: 101-111

McFarland L.V. 2009. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*, 15, 6: 274-280

Meisel-Mikolajczyk F., Sokół B. 1991. New *Clostridium difficile* serotypes in Poland. *European Journal of Epidemiology*, 7, 4: 434-436

Metcalf D.S., Avery B.P., Janecko N., Matic N., Reid-Smith R., Weese J.S. 2011. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 2: 85-86

Metcalf D.S., Costa M.C., Dew W.M., Weese J.S. 2010. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 5: 600-602

Miller B.A., Chen L.F., Sexton D.J., Anderson D.J. 2011. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32, 4: 387-390

Miller M. 2009. The fascination with probiotics for *Clostridium difficile* infection: lack of evidence for prophylactic or therapeutic efficacy. *Anaerobe*, 15, 6: 281-284

- Musher D.M., Aslam S., Logan N., Nallacheru S., Bhaila I., Borchert F., Hamill R.J. 2005. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 11: 1586-1590
- Nusrat A., von Eichel-Streiber C., Turner J.R., Verkade P., Madara J.L., Parkos C.A. 2001 *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infection and Immunity*, 69, 3: 1329-1336
- O'Neill G.L., Ogunsola F.T., Brazier J.S., Duerden B.I. 1996. Modification of a PCR-ribotyping method for application as a routine typing scheme for *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 2, 4: 205-209
- Panchole P., Kelly C., Raczkowski M., Balada-Llasat J.M. 2012. Detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of the cell culture neutralization, Xpert *C. difficile*, Xpert *C. difficile*/Epi, and Illumigene *C. difficile* assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 4: 1331-1335
- Pasquale V., Romano V., Rupnik M., Capuano F., Bove D., Aliberti F., Krovacek K., Dumontet S. 2012. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiology*, 31, 2: 309-12
- Péchiné S., Janoir C., Collignon A. 2005. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5018-5025
- Perelle S., Gibert M., Bourlioux P., Corthier G., Popoff M.R. 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infection and Immunity*, 65, 4: 1402-1407

Price A.B., Davies D.R. 1977. Pseudomembranous colitis. Journal of Clinical Pathology, 30, 1: 1-12

QIAxcel DNK handbook. 2011. 2nd ed. Hilden, Qiagen: 58 str.

Rea M.C., Dobson A., O'Sullivan O., Crispie F., Fouhy F., Cotter P.D., Shanahan F., Kiely B., Hill C., Ross R.P. 2011. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, Suppl. 1: 4639-4644

Ribot E.M., Fair M.A., Gautam R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogens and Disease, 3, 1: 59-67

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 Research Reviews, 16: 1-19

Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Duffield T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese J.S. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. Emerging Infectious Diseases, 12, 11: 1730-1736

Rodriguez-Palacios A., Henry R., Stämpfli H.R., Duffield T., Scott Weese J.S. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerging Infectious Diseases, 13, 3: 485-487

Rouphael N.G., O'Donnell J.A., Bhatnagar J., Lewis F., Polgreen P.M., Beekmann S., Guarner J., Killgore G.E., Coffman B., Campbell J., Zaki S.R., McDonald L.C. 2008. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 198, 6: 635.e1-635.e6

Rupnik M. 2011. *Clostridium difficile* toxinotypes. Maribor, Institute of Public Health Maribor, Faculty of Medicine, University of Maribor: 1str.

<http://www.mf.uni-mb.si/tox/> (7. dec. 2012)

Rupnik M. 2008. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. FEMS Microbiology Reviews, 32, 3: 541-555

Rupnik M. 2007. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? Clinical Microbiology and Infection, 13, 5: 457-459

Rupnik M., Avesani V., Janc M., von Eichel-Streiber C., Delmée M. 1998. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 36, 8: 2240-2247

Rupnik M., Braun V., Soehn F., Janc M., Hofstetter M., Laufenberg-Feldmann R., von Eichel-Streiber C. 1997. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiology Letters, 148, 2: 197-202

Rupnik M., Brazier J.S., Duerden B.I., Grabnar M., Stubbs S.L. 2001. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. Microbiology, 147, 2: 439-447

Rupnik M., Wilcox M.H., Gerdin D.N. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology, 7, 7: 526-536

Ryan K.J., Drew W.L. 2010. *Clostridium, Peptostreptococcus, Bacteroides & other anaerobes*. V: Sherris medical microbiology. 5th ed. Ryan K.J., Ray C.G. (eds.). New York, McGraw-Hill: 515-533

Sadeghifard N., Görtler V., Beer M., Seviour R.J. 2006. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. Applied and Environmental Microbiology, 72, 11: 7311-7323

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 12: 5463-5467

Seddon S.V., Hemingway I., Borriello S.P. 1990. Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. Journal of Medical Microbiology, 31, 3: 169-174

Shanholtzer C.J., Willard K.E., Holter J.J., Olson M.M., Gerding D.N., Peterson L.R. 1992. Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *C. difficile* culture and cytotoxin and latex tests. Journal of Clinical Microbiology, 30, 7: 1837-1840

Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M.J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clinical Microbiology Reviews, 19, 3: 512-530

Sloan L.M., Duresko B.J., Gustafson D.R., Rosenblatt J.E. 2008. Comparison of real-time PCR for detection of the tcdC gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Journal of Clinical Microbiology, 46, 6: 1996-2001

Songer J.G., Anderson M.A. 2006. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. Anaerobe, 12, 1: 1-4

Songer J.G., Trinh H.T., Dial S.M., Brazier J.S., Glock R.D. 2009a. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 21, 3: 377-380

Songer J.G., Trinh H.T., Killgore G.E., Thompson A.D., McDonald L.C., Limbago B.M. 2009b. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. Emerging Infectious Diseases, 15, 5: 819-821

Songer J.G., Uzal F.A. 2005. Clostridial enteric infections in pigs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17, 6: 528-536

Stubbs S.L., Brazier J.S., O'Neill G.L., Duerden B.I. 1999. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. Journal of Clinical Microbiology, 37, 2: 461-463

Tan K.S., Wee B.Y., Song K.P. 2001. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. Journal of Medical Microbiology, 50, 7: 613-619

Ticehurst J.R., Aird D.Z., Dam L.M., Borek A.P., Hargrove J.T., Carroll K.C. 2006. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. Journal of Clinical Microbiology, 44, 3: 1145-1149

Toma S., Lesiak G., Magus M., Lo H.L., Delmée M. 1988. Serotyping of *Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology, 26, 3: 426-428

van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13, Suppl. 3: 1-46

van den Berg R.J., Bruijnesteijn van Coppenraet L.S., Gerritsen H.J., Endtz H.P., van der Vorm E.R., Kuijper E.J. 2005. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5338-5340

van den Berg R.J., Schaap I., Templeton K.E., Klaassen C.H., Kuijper E.J. 2007. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 3: 1024-1028

van Nood E., Speelman P., Kuijper E.J., Keller J.J. 2009. Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: is donor faeces the solution? *Euro Surveillance*, 14, 34: 465-470

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 21: 4407-4414

Voth D.E., Ballard J.D. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 2: 247-263

WEBRIBO. 2013. Wien, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit: baza podatkov
<http://webribo.ages.at/> (21. feb. 2012)

Weese J.S. 2010. *Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious threat? *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1: 3-10

Weese J.S., Toxopeus L., Arroyo L. 2006. *Clostridium difficile* associated diarrhoea in horses within the community: predictors, clinical presentation and outcome. *Equine Veterinary Journal*, 38, 2: 185-188

Wilcox M.H., Fawley W.N. 2000. Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. Lancet, 356, 9238: 1324-1324

Worsley M.A. 1998. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl. 3: 59-66

Xiao M., Kong F., Jin P., Wang Q., Xiao K., Jeoffreys N., James G., Gilbert G.L. 2012.
Comparison of two capillary gel electrophoresis systems for *Clostridium difficile* ribotyping, using a panel of ribotype 027 isolates and whole-genome sequences as a reference standard. Journal of Clinical Microbiology, 50, 8: 2755-2760

Zaiß N.H., Rupnik M., Kuijper E.J., Harmanus C., Michielsen D., Janssens K., Nübel U. 2009. Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. BMC Microbiology, 9: 6, doi: 10.1186/1471-2180-9-6: 11 str.

Zidarič V., Beigot S., Lapajne S., Rupnik M. 2010. The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. Anaerobe, 16, 4: 371-375

Zidarič V., Zemljič M., Janežič S., Kocuvan A., Rupnik M. 2008. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. Anaerobe, 14, 6: 325-327

Zimm B.H., Levene S.D. 1992. Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. Quarterly Reviews of Biophysics, 25, 2: 171-204

ZAHVALA

Največja zahvala je namenjena somentorici asist. dr. Sandri Janežič za vso pomoč, tako pri laboratorijskem delu, kot pri pisanju diplomskega dela. Hvala za vse nasvete, potrpežljivost in nova znanja. Hvala tudi prof. dr. Maji Rupnik, da me je kolektiv Oddelka za mikrobiološke raziskave, Centra za mikrobiologijo, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor sploh sprejel medse in mi omogočil opravljanje diplomskega dela v njihovem laboratoriju. Prav tako hvala vsem v kolektivu za pomoč pri delu in sproščene trenutke ob delu.

Hvala prof. dr. Ines Mandić Mulec za mentorstvo in prof. dr. Darji Žgur Bertok za recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem pa se tudi vsem svojim najbližnjim, da so mi stali ob strani in v vsakem trenutku na kakeršen koli način pomagali.

PRILOGE

Priloga A: Pregled sevov bakterije *C. difficile*, vključenih v diplomsko delo in PCR-ribotipov dobljenih z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov na posameznih sistemih.

Št.	Sev	Gel Bidet ribotip ¹	QIAxcel Bidet ribotip ²	QIAxcel Janežič ribotip ³	QIAxcel Stubbs ribotip ⁴	Sek. Bidet ribotip ⁵	Sek. Janežič ribotip ⁶	Sek. Stubbs ribotip ⁷
1	E2	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001	001	001
2	ZZV 2590	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001	001	001
3	CD07-140	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001ecdc	001ecdc	001ecdc
4	ZZV 660	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001	001	001
5	ZZV 11996	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001	001	001
6	VODZ6-2	001/072*	001/072*	001/072*	001/072*	001	001	001
7	10849	005	005	005	005	005	005	005
8	ZZV 924	005	005	005	005	005	005	005
9	RT010	010	010	010	010	010	010	010
10	CD169	010	010	010	010	010	010	010
11	ZZV 8	010	010	010	010	010	010	010
12	ZZV 6004	010	010	010	010	010	010	010
13	ZZV 3111	011/049*	011/049*	011/049*	011/049*	049/1	049/1	049/1
14	8832	011/049*	011/049*	011/049*	011/049*	049/1	049/1	049/1
15	E14	014	014/020*	014/020*	014/020*	014/0	014/0	014/0
16	ZZV 4922	014	014/020*	014/020*	014/020*	014/0	014/0	014/0
17	KO95	014	014/020*	014/020*	014/020*	014/0	014/0	014/0
18	ZZV 2496	018	018	018	018	018	018	018
19	TR13	018	018	018	018	018	018	018
20	ECDC 020	020	014/020*	014/020*	014/020*	020	020	020
21	10111/09	020	014/020*	014/020*	014/020*	020	020	020
22	R12087	027	027	027	027	027	027	027
23	7325	027	027	027	027	027	027	027
24	IS58	033	033	033	033	033	033	033
25	CD219	033	033	033	033	033	033	033
26	RT045	045	045	045	045	045	045	045
27	SE866	045	045	045	045	045	045	045
28	IS25	056	056	056	056	446	446	446
29	57267	063	063	063	063	063/1	063/1	063/1
30	39696	063	063	063	063	063/1	063/1	063/1
31	ECDC 070	070	070	070	070	070	070	070
32	KORZ12-1	070	070	070	070	070	070	070
33	ZZV 1121	070	070	070	070	070	070	070

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Št.	Sev	Gel Bidet ribotip ¹	QIAxcel Bidet ribotip ²	QIAxcel Janežič ribotip ³	QIAxcel Stubbs ribotip ⁴	Sek. Bidet ribotip ⁵	Sek. Janežič ribotip ⁶	Sek. Stubbs ribotip ⁷
34	R7605/78	078	078	078	078	078	078	078
35	SUC36	078	078	078	078	N6	N6	N6
36	AC008	103	103	103	103	AI-82/1	AI-82/1	AI-82/1
37	ZZV 8970	103	103	103	103	AI-82/1	AI-82/1	AI-82/1
38	R9385	122	122	122	122	122	122	122
39	RT126	126	126	126	126	126	126	126
40	CD08-070	126	126	126	126	126	126	126
41	ZZV 4724	SLO 036	SLO 036	SLO 036	SLO 036	AI-84	AI-84	AI-84
42	7459	SLO 036	SLO 036	SLO 036	SLO 036	AI-84	AI-84	AI-84
43	R11402	SLO 060	SLO 060	SLO 060	SLO 060	660	660	660
44	CD162	SLO 060	SLO 060	SLO 060	SLO 060	660	660	660
45	UKC129-1	SLO 130	SLO 130	SLO 130	SLO 130	N1	N1	N1
46	ZZV11-3660	SLO 133	SLO 133	SLO 133	SLO 133	AI-15	AI-15	AI-15
47	R6786	SLO 144	SLO 144	SLO 144	SLO 144	N5	N5	N5
48	10049/10	SLO 163	SLO 163	SLO 163	SLO 163	N3	N3	N3

¹Gel Bidet ribotip – ribotip dobljen z Bidet začetnimi oligonukleotidi z navadno gelsko elektroforezo

²QIAxcel Bidet ribotip - ribotip dobljen z Bidet začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel

³QIAxcel Janežič ribotip - ribotip dobljen z Janežič začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel

⁴QIAxcel Stubbs ribotip - ribotip dobljen s Stubbs začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na aparatu QIAxcel

⁵Sek. Bidet ribotip - ribotip dobljen z Bidet začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

⁶Sek. Janežič ribotip - ribotip dobljen z Janežič začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

⁷Sek. Stubbs ribotip - ribotip dobljen s Stubbs začetnimi oligonukleotidi s kapilarno gelsko elektroforezo na sekvenatorju Beckman Coulter CEQ 8000

^{*}(001/072), (011/049), (014/020) – pari različnih, vendar po vzorcu fragmentov zelo podobnih ribotipov, ki se jih z navadno gelsko elektroforezo ali aparatom QIAxcel ne da vedno ločit

Priloga B: Fragmenti dobljeni z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov s sekvenatorjem Beckman Coulter CEQ 8000.

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
E2 - 001					
	236,25	235,01	211,01	235,68	268,68
	266,34	265,44	241,44	265,68	298,68
	327,17	327,13	303,13	327,28	360,28
	488,42	487,51	463,51	489,04	522,04
	494,30	492,26	468,26	494,38	527,38
	547,30	546,44	522,44	548,38	581,38
	551,49	550,72	526,72	552,19	585,19
	553,40	552,72	528,72	554,26	587,26
UKC129-1 - N1					
	238,28	236,69	212,69	237,31	270,31
	268,30	267,14	243,14	267,84	300,84
	288,34	287,68	263,68	288,50	321,50
	327,09	326,65	302,65	327,19	360,19
	368,55	368,33	344,33	369,88	402,88
	494,07	492,18	468,18	494,45	527,45
	508,74	507,37	483,37	509,69	542,69
	547,20	546,49	522,49	548,25	581,25
	549,42	548,38	524,38	550,08	583,08
	553,60	552,71	528,71	554,22	587,22
ZZV 2590 - 001					
	236,48	235,32	211,32	235,60	268,60
	266,59	265,23	241,23	265,83	298,83
	326,96	326,09	302,09	327,43	360,43
	487,90	487,00	463,00	489,28	522,28
	493,93	492,69	468,69	494,57	527,57
	547,12	546,09	522,09	548,34	581,34
	551,17	549,82	525,82	552,27	585,27
	553,12	552,16	528,16	554,51	587,51
10849 - 005					
	268,37	267,46	243,46	268,02	301,02
	288,44	287,52	263,52	288,08	321,08
	307,36	306,80	282,80	307,76	340,76
	326,91	326,37	302,37	327,56	360,56
	329,17	328,53	304,53	329,71	362,71
	429,01	428,27	404,27	428,99	461,99
	447,94	446,78	422,78	448,58	481,58

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
ZZV 924 - 005	488,13	486,69	462,69	489,17	522,17
	494,16	492,42	468,42	494,70	527,70
	546,67	545,93	521,93	548,70	581,70
RT010 - 010					
CD169 - 010	227,57	226,48	202,48	226,65	259,65
	286,22	285,59	261,59	286,46	319,46
	288,38	288,37	264,37	288,18	321,18
	327,14	327,72	303,72	327,39	360,39
	386,48	383,58	359,58	387,32	420,32
	446,80	444,45	420,45	447,11	480,11
	488,92	486,59	462,59	489,96	522,96
	556,87	555,70	531,70	557,49	590,49
E14 - 014/0					
	236,27	235,47	211,47	236,20	269,20
	238,28	237,50	213,50	238,23	271,23
	268,31	267,53	243,53	268,54	301,54
	307,52	306,77	282,77	306,66	339,66
	310,46	309,78	285,78	307,40	340,40
	326,98	326,14	302,14	326,70	359,70

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
		485,03	461,03		
	487,46	486,97	462,97	488,82	521,82
	529,11	527,67	503,67	530,85	563,85
	551,01	549,22	525,22	551,77	584,77
ZZV 4922 - 014/0					
	236,30	235,06	211,06	233,89	266,89
	238,34	237,17	213,17	235,99	268,99
	268,25	267,10	243,10	266,94	299,94
	307,52	306,90	282,90	307,86	340,86
	309,60	308,92	284,92	309,77	342,77
	326,95	326,72	302,72	328,18	361,18
	486,56	485,68	461,68	487,67	520,67
	528,81	527,81	503,81	529,49	562,49
	550,81	549,41	525,41	550,99	583,99
ZZV 2496 - 018					
	269,54	268,33	244,33	269,02	302,02
	276,44	275,72	251,72	276,07	309,07
	288,41	287,47	263,47	288,13	321,13
	327,03	326,60	302,60	327,66	360,66
	368,17	367,95	343,95	369,61	402,61
	446,67	445,66	421,66	447,58	480,58
	492,40	491,00	467,00	493,31	526,31
	547,61	547,05	523,05	549,30	582,30
	553,15	552,34	528,34	554,15	587,15
TR13 - 018					
	269,42	267,80	243,80	268,97	301,97
	276,38	275,70	251,70	275,87	308,87
	288,41	287,48	263,48	288,40	321,40
	327,03	327,06	303,06	327,61	360,61
	368,21	367,78	343,78	369,53	402,53
	446,60	445,90	421,90	447,59	480,59
	491,35	489,98	465,98	492,11	525,11
	547,77	546,92	522,92	548,94	581,94
	553,38	552,14	528,14	554,51	587,51
ECDC020 - 020					
	236,38	234,98	210,98	235,71	268,71
	238,39	237,00	213,00	237,43	270,43
	268,44	267,60	243,60	267,77	300,77
	307,65	307,45	283,45	307,50	340,50

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	309,57	309,20	285,20	309,39	342,39
	327,10	326,89	302,89	327,36	360,36
	486,95	486,57	462,57		
	488,36			488,72	521,72
	551,07	549,92	525,92	551,90	584,90
	569,58	569,47	545,47	571,06	604,06
10111/09 - 020					
	236,52	234,84	210,84	235,90	268,90
	238,60	236,57	212,57	237,94	270,94
	268,39	267,54	243,54	267,50	300,50
	307,50	306,74	282,74	307,49	340,49
	310,48	309,23	285,23	310,31	343,31
	326,99	326,91	302,91	327,29	360,29
	486,89	485,32	461,32	487,98	520,98
	549,56	549,36	525,36		
	551,15			551,30	584,30
	569,55	568,73	544,73	570,83	603,83
R12087 - 027					
	236,37	235,32	211,32	235,33	268,33
	268,49	267,87	243,87	268,37	301,37
	327,10	326,84	302,84	327,54	360,54
	329,14	329,25	305,25	329,00	362,00
	364,60	364,79	340,79	365,48	398,48
	427,73	426,20	402,20	427,47	460,47
	448,88	448,39	424,39	450,16	483,16
	550,99	549,93	525,93	552,50	585,50
7325 - 027					
	236,25	234,46	210,46	236,25	269,25
	268,64	267,46	243,46	268,33	301,33
	327,13	325,99	301,99	327,01	360,01
	328,92	327,91	303,91	329,05	362,05
	364,19	363,22	339,22	364,53	397,53
	427,03	424,88	400,88	427,90	460,90
	449,31	447,14	423,14	450,19	483,19
	551,05	549,52	525,52	552,20	585,20
IS58 - 033					
	268,24	267,83	243,83	267,74	300,74
	330,11	330,03	306,03	330,17	363,17
	333,03	332,52	308,52	332,10	365,10

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	372,32	371,57	347,57	372,68	405,68
	374,90	374,06	350,06	374,90	407,90
	446,99	446,30	422,30	447,92	480,92
	449,47	448,53	424,53		
CD219 - 033					
	268,33	268,44	244,44	268,15	301,15
	330,04	330,23	306,23	330,69	363,69
	333,06	332,80	308,80	332,95	365,95
	372,28	370,78	346,78	372,30	405,30
	374,86	373,30	349,30	374,79	407,79
	447,14	445,44	421,44	447,68	480,68
	449,61	447,92	423,92		
RT045 - 045					
	306,79	306,43	282,43	306,19	339,19
	332,24	331,77	307,77	332,40	365,40
	371,99	371,90	347,90	372,29	405,29
	374,48	374,33	350,33	374,71	407,71
	446,37	445,96	421,96	447,43	480,43
SE866 - 045					
	307,22	306,77	282,77	307,28	340,28
	332,59	332,14	308,14	332,42	365,42
	372,24	371,46	347,46	372,82	405,82
	374,68	373,84	349,84		
	446,96	446,19	422,19	447,82	480,82
IS25 - 446					
	236,12	235,08	211,08	235,82	268,82
	266,14	265,37	241,37	265,77	298,77
	268,42	267,35	243,35	267,48	300,48
	288,31	287,83	263,83	288,23	321,23
	325,41	325,60	301,60	325,85	358,85
	330,73	329,56	305,56	330,43	363,43
	383,52	382,64	358,64	384,05	417,05
	488,68	488,40	464,40	490,77	523,77
	546,66	546,78	522,78	548,54	581,54
	549,65	549,11	525,11	550,37	583,37
CD07-140 - 001ecdc					
	236,04	235,03	211,03	235,95	268,95
	266,31	265,58	241,58	266,24	299,24
	327,35	327,09	303,09	327,50	360,50

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	488,31	487,11	463,11	489,00	522,00
	494,00	492,32	468,32	494,10	527,10
	551,40	550,50	526,50	552,65	585,65
	553,36	552,36	528,36	554,27	587,27
57267 - 063/1					
	268,07	265,67	241,67	267,34	300,34
	326,86	326,08	302,08	326,61	359,61
	329,75	328,92	304,92	329,96	362,96
	374,13	373,96	349,96	374,17	407,17
	489,05	488,67	464,67	490,27	523,27
39696 - 063/1					
	268,29	267,37	243,37	268,21	301,21
	327,21	327,26	303,26	326,97	359,97
	330,00	329,62	305,62	330,05	363,05
	374,39	373,67	349,67	373,94	406,94
	489,12	488,47	464,47	489,27	522,27
ECDC 070 - 070					
	311,58	309,53	285,53	310,65	343,65
	326,02	324,18	300,18	325,49	358,49
	363,38	362,30	338,30	364,96	397,96
	367,78	366,83	342,83	369,57	402,57
	369,95	369,14	345,14	371,28	404,28
	383,25	382,52	358,52	384,00	417,00
	486,52				
	488,27	487,32	463,32	489,79	522,79
	551,82	550,12	526,12	552,78	585,78
KORZ12-1 - 070					
	310,70	309,16	285,16	310,29	343,29
	325,48	324,84	300,84	325,54	358,54
	327,64	326,87	302,87	327,38	360,38
	364,30	364,20	340,20	365,14	398,14
	368,66	368,39	344,39	369,74	402,74
	370,83	370,49	346,49	371,24	404,24
	384,17	383,40	359,40	384,44	417,44
	488,72	487,68	463,68	489,72	522,72
	551,94	550,24	526,24	552,15	585,15
ZZV 1121 - 070					
	310,92	309,64	285,64	309,64	342,64
	325,47	325,48	301,48	325,00	358,00

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	364,94	364,44	340,44	364,25	397,25
	368,75	368,51	344,51	368,66	401,66
	371,00	370,69	346,69	370,76	403,76
	384,17	384,40	360,40	384,50	417,50
	489,06	487,42	463,42	489,46	522,46
	551,75	550,41	526,41	552,61	585,61
R7605/78 - 078					
	306,70	306,71	282,71	307,15	340,15
	327,42	327,06	303,06	327,66	360,66
	329,96	329,62	305,62	329,50	362,50
	372,08	371,49	347,49	371,79	404,79
	374,28	373,54	349,54	374,31	407,31
	416,91	415,65	391,65	417,38	450,38
	446,43	446,10	422,10	447,89	480,89
	491,72	490,63	466,63	493,04	526,04
SUC36 – N6					
	307,24	306,77	282,77	307,09	340,09
	327,81	327,03	303,03	327,76	360,76
	374,52	373,75	349,75	374,17	407,17
	416,78	415,78	391,78	416,67	449,67
	449,38	447,98	423,98	450,02	483,02
	492,04	490,63	466,63	492,99	525,99
AC008 - AI-82/1					
	236,39	234,35	210,35	235,63	268,63
	268,42	267,14	243,14	268,05	301,05
	287,19	286,34	262,34	287,25	320,25
	324,84	324,16	300,16	324,87	357,87
	326,91	326,19	302,19	326,60	359,60
	368,25	367,79	343,79	368,42	401,42
	448,89	447,09	423,09	449,78	482,78
	485,96	484,78	460,78	487,07	520,07
	488,95	487,58	463,58	490,25	523,25
ZZV 8970 - AI-82/1					
	236,44	234,83	210,83	236,22	269,22
	268,42	266,56	242,56	268,08	301,08
	287,16	285,62	261,62	287,27	320,27
	325,31	323,84	299,84	325,77	358,77
	327,22	325,78	301,78	327,18	360,18
	368,61	368,38	344,38	368,93	401,93

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
R9385 - 122	449,03	448,62	424,62	449,66	482,66
	486,48	485,57	461,57	487,34	520,34
	489,48	488,59	464,59	490,20	523,20
RT126 - 126					
	305,36	305,22	281,22	304,22	337,22
	324,41	324,12	300,12	324,03	357,03
	327,52	327,43	303,43	327,06	360,06
	366,18	366,46	342,46	366,37	399,37
	368,18	368,15	344,15	368,11	401,11
		427,67	403,67		
	429,03	429,27	405,27	429,14	462,14
CD08-070 - 126	490,18	489,32	465,32	491,06	524,06
ZZV 660 - 001					
	307,02	307,16	283,16	307,13	340,13
	327,60	327,41	303,41	328,06	361,06
	330,12	329,78	305,78	330,45	363,45
	372,04	371,42	347,42	372,46	405,46
	374,28	373,55	349,55	374,44	407,44
	446,68	446,11	422,11	447,77	480,77
	492,12	490,64	466,64	493,27	526,27
ZZV 11996 - 001					
	236,06	234,90	210,90	236,04	269,04
	266,45	265,76	241,76	266,84	299,84
	327,48	326,97	302,97	327,51	360,51
	488,39	487,12	463,12	489,31	522,31
	493,92	492,17	468,17	495,03	528,03
	547,61	546,60	522,60	548,12	581,12
	551,63	550,48	526,48	552,47	585,47
	553,58	552,44	528,44	554,42	587,42
	236,07	234,58	210,58	235,82	268,82

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	266,51	265,54	241,54	265,75	298,75
	327,59	327,04	303,04	327,00	360,00
	488,49	486,97	462,97	489,38	522,38
	493,98	492,23	468,23	494,32	527,32
	547,75	546,44	522,44	548,44	581,44
	551,69	550,37	526,37	552,28	585,28
	553,67	552,35	528,35	554,21	587,21
VODZ6-2 - 001					
	236,10	234,88	210,88	235,86	268,86
	266,88	265,37	241,37	266,38	299,38
	327,52	326,88	302,88	327,88	360,88
	488,46	487,18	463,18	489,51	522,51
	493,99	492,83	468,83	494,38	527,38
	547,77	546,20	522,20	548,21	581,21
	551,68	550,67	526,67	552,47	585,47
	553,74	552,60	528,60	554,29	587,29
10049/10 - N3					
	236,24	234,54	210,54	235,50	268,50
	265,92	265,23	241,23	265,69	298,69
	268,38	267,38	243,38	267,97	300,97
	288,34	287,86	263,86	288,05	321,05
	325,97	325,14	301,14	325,07	358,07
	330,58	330,09	306,09	330,14	363,14
	488,70	487,77	463,77	489,59	522,59
		545,52	521,52	547,37	580,37
	550,27	548,52	524,52	550,73	583,73
ZZV 3111 - 049/1					
	238,74	237,06	213,06	237,66	270,66
	269,02	267,60	243,60	268,04	301,04
	289,13	287,77	263,77	288,19	321,19
	328,18	326,59	302,59	327,65	360,65
	369,00	368,68	344,68	369,65	402,65
	447,64	446,55	422,55	448,20	481,20
	493,52	491,94	467,94	494,66	527,66
	548,27	545,96	521,96	548,84	581,84
	550,29	547,87	523,87	550,18	583,18
	554,62	552,44	528,44	554,42	587,42
8832 - 049/1					
	237,91	236,92	212,92	237,97	270,97

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
	268,11	267,17	243,17	268,25	301,25
	288,22	287,37	263,37	287,85	320,85
	327,27	326,86	302,86	327,62	360,62
	368,96	368,80	344,80	369,52	402,52
	448,09	446,87	422,87	448,84	481,84
	493,96	491,87	467,87	494,53	527,53
	547,21	546,34	522,34	548,45	581,45
	549,36	548,29	524,29	550,02	583,02
	553,70	552,67	528,67	554,60	587,60
ZZV 11-3660 - AI-15					
	235,89	235,08	211,08	288,44	269,00
	266,17	265,55	241,55	325,92	298,90
	268,28	267,57	243,57	329,98	301,00
	288,27	287,23	263,23	384,25	321,44
	326,06	325,25	301,25	445,86	358,92
	330,34	329,54	305,54	489,93	362,98
	383,71	383,10	359,10	547,93	417,25
	444,82	444,01	420,01	551,25	478,86
	489,30	487,89	463,89		522,93
	547,29	545,71	521,71	311,87	580,93
	550,48	549,36	525,36	327,60	584,25
R6786 - N5					330,22
	312,60	311,92	287,92	346,90	344,87
	327,81	326,50	302,50	374,52	360,60
	330,11	329,64	305,64	447,84	363,22
	346,25	345,11	321,11		379,90
	374,40	373,51	349,51	232,82	407,52
	447,18	445,10	421,10	287,18	480,84
ZZV 4724 - AI-84					328,10
	235,91	234,63	210,63	429,70	265,82
	288,35	287,36	263,36	450,34	320,18
	327,30	326,72	302,72	547,75	361,10
	427,56	426,97	402,97	288,44	462,70
	448,60	447,81	423,81	325,92	483,34
	547,93	547,01	523,01	329,98	580,75
7459 - AI-84					
	236,04	234,99	210,99	235,49	268,49
	288,30	286,96	262,96	288,14	321,14
	327,24	326,53	302,53	327,65	360,65

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
ZZV 8 - 010	427,72	426,61	402,61	427,86	460,86
	448,91	447,83	423,83	449,81	482,81
	547,92	546,87	522,87	549,42	582,42
ZZV 8 - 010					
R11402 - 660	227,05	225,73	201,73	226,93	259,93
	286,27	285,85	261,85	286,35	319,35
	288,44	287,77	263,77	288,08	321,08
	327,48	327,25	303,25	327,47	360,47
	386,82	386,16	362,16	387,42	420,42
	446,48	444,60	420,60	447,12	480,12
	488,89	488,03	464,03	490,08	523,08
	556,84	555,25	531,25	557,46	590,46
R11402 - 660					
CD162 - 660	268,08	267,26	243,26	267,69	300,69
	330,15	329,61	305,61	330,08	363,08
	332,87	331,80	307,80	332,57	365,57
	372,28	371,85	347,85	372,23	405,23
	374,62	374,15	350,15	374,18	407,18
	418,11	417,63	393,63	418,34	451,34
	446,85	446,09	422,09	447,86	480,86
	449,32	448,38	424,38	449,81	482,81
CD162 - 660					
ZZV 6004 - 010	268,14	267,62	243,62	267,88	300,88
	330,17	329,98	305,98	330,08	363,08
	332,85	332,26	308,26	332,54	365,54
	372,24	371,93	347,93	372,51	405,51
	374,58	373,29	349,29	374,76	407,76
	418,06	416,71	392,71	418,54	451,54
	446,88	446,17	422,17	448,08	481,08
	449,35	448,30	424,30	450,30	483,30
ZZV 6004 - 010					
	227,22	225,77	201,77	226,97	259,97
	286,42	285,63	261,63	286,05	319,05
	288,41	287,62	263,62	288,20	321,20
	327,51	326,99	302,99	327,83	360,83
	387,08	386,78	362,78	387,77	420,77
	446,72	444,45	420,45	446,69	479,69
	489,09	487,87	463,87	490,14	523,14
	556,93	555,84	531,84	557,56	590,56

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Sev - PCR-ribotip	Bidet dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Janežič fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Janežič dobljena velikost fragmentov	Preračunana velikost dobljenih Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov*	Stubbs dobljena velikost fragmentov
KO95 - 014/0					
	236,12	234,74	210,74	235,47	268,47
	238,11	236,79	212,79	237,25	270,25
	268,34	267,26	243,26	268,23	301,23
	307,59	307,00	283,00	307,99	340,99
	310,53	309,45	285,45	310,05	343,05
	327,08	326,82	302,82	327,33	360,33
	486,22	486,43	462,43	488,34	521,34
	528,58	528,83	504,83	531,02	564,02
	550,37	549,98	525,98	551,76	584,76

*Preračunana velikost Janežič/Stubbs fragmentov na velikost Bidet fragmentov – Fragmenti dobljeni z Janežič začetnimi oligonukleotidi so 24 bp manjši od tistih dobljenih z Bidet začetnimi oligonukleotidi. Fragmenti dobljeni s Stubbs začetnimi oligonukleotidi pa 33 bp večji od tistih dobljenih z Bidet začetnimi oligonukleotidi.