

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sandra JANEŽIČ

**MOLEKULARNE METODE ZA TIPIZACIJO  
ČREVESNIH PATOGENIH BAKTERIJ**  
*Clostridium difficile*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sandra JANEŽIČ

**MOLEKULARNE METODE ZA TIPIZACIJO ČREVESNIH  
PATOGENIH BAKTERIJ *Clostridium difficile***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MOLECULAR TYPING METHODS FOR INTESTINAL  
PATHOGENIC BACTERIUM *Clostridium difficile***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Oddelka za raziskovalno dejavnost, Centra za mikrobiologijo na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorico prof. dr. Majo Rupnik in za recenzentko doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentorica: prof. dr. Maja Rupnik

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja RUPNIK

Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo, Oddelek za raziskovalno dejavnost

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela

Sandra Janežič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.25.08: 577.21.08: 616 - 071 (043) = 863
- KG *Clostridium difficile*/postantibiotična driska/tipizacija/molekularne metode/pulzna gelska elektroforeza/PCR-ribotipizacija/toksintipizacija/PFGE/črevesne infekcije
- AV JANEŽIČ, Sandra
- SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/RUPNIK, Maja (somentorica)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2008
- IN MOLEKULARNE METODE ZA TIPIZACIJO ČREVESNIH PATOGENIH BAKTERIJ *Clostridium difficile*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 72 str., 10 pregl., 11 sl., 1 pril., 132 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakterija *Clostridium difficile* je trenutno najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih infekcij. Za učinkovit nadzor okužb moramo spremljati širjenje določenih tipov *C. difficile*, ki so bolj povezani s povzročanjem težjih oblik bolezni. Povzročitelja moramo najprej izolirati, nato pa s tipizacijskimi metodami določiti tip. Najpogosteje se za tipizacijo *C. difficile* uporabljata PFGE in PCR-ribotipizacija. Obe metodi smo primerjali na zbirki 47 sevov toksinotipov III (n=20), V (n=10) in VIII (n=17), ki so trenutno povezani s povzročanjem epidemij povsod po svetu. Seve toksinotipa III smo razdelili v 8 različnih PCR-ribotipov in 10 pulstipov, seve toksinotipa V v 2 PCR-ribotipa in 3 pulstipe, ter seve toksinotipa VIII v 3 različne PCR-ribotipe in 6 različnih pulstipov. Največjo variabilnost smo pokazali pri sevih toksinotipa III. Odstotek sevov, ki smo jih z obema metodama lahko tipizirali je 100 %. Metoda PCR-ribotipizacije se dobro ujema s PFGE, saj ima večina sevov z enakim pulstipom tudi enak PCR-ribotip. Zaključili smo, da je PCR-ribotipizacija, kljub nekoliko slabši moči razlikovanja, v primerjavi s PFGE boljše metoda za tipizacijo *C. difficile*. Je namreč hitrejša in ni tako delovno zahtevna kot PFGE.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 579.25.08: 577.21.08: 616-071 (043) = 863
- CX *Clostridium difficile*/postantibiotic diarrhoea/typing/molecular methods/pulsed field gel electrophoresis/PCR-ribotyping/toxinotyping/PFGE/intestinal infections
- AU JANEŽIČ, Sandra
- AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/RUPNIK, Maja (co-advisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2008
- TI MOLECULAR TYPING METHODS FOR INTESTINAL PATHOGENIC BACTERIUM *Clostridium difficile*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 72 p., 10 tab., 11 fig., 1 ann., 132 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Clostridium difficile* is an important cause of nosocomial diarrhoea. Monitoring the specific *C. difficile* types, which are more likely to cause nosocomial outbreaks and severe disease, is necessary. PFGE and PCR-ribotyping are most widely used to type *C. difficile* isolates. In these work, we performed a comparison of PFGE and PCR-ribotyping on a collection of 47 *C. difficile* isolates, that belongs to toxinotypes III (n=20), V (n=10) and VIII (n=17), and which are currently responsible for causing outbreaks worldwide. We designated 8 different PCR-ribotypes and 10 different pulsotypes to strains from toxinotype III, 3 different PCR-ribotypes and 6 different pulsotypes to strains from toxinotype VIII, and 2 different PCR-ribotypes and 3 different pulsotypes to strains from toxinotype V. We have shown that strains from toxinotype III are the most variable. Typing ability for both methods was 100 %. Typing results for PFGE and PCR-ribotyping correlated well and most strains within the same pulsotype belong to a single PCR-ribotype. We have concluded that PCR-ribotyping, even though it has lower discriminatory power than PFGE, offers the best combination of advantages as an typing tool for *C. difficile*. It is faster and not so labor intensive as PFGE.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 BAKTERIJA <i>Clostridium difficile</i> .....	2
2.2 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA <i>C. difficile</i> .....	2
2.2.1 Zgodovinski pregled .....	2
2.2.2 Patogeneza okužbe s <i>C. difficile</i> .....	3
2.2.2.1 Patogeneza in antibiotiki .....	4
2.2.3 Virulenčni dejavniki bakterije <i>C. difficile</i> .....	4
2.3 BOLEZENSKI ZNAKI .....	6
2.4 DIAGNOZA BOLEZNI.....	7
2.5 ZDRAVLJENJE .....	8
2.6 TIPIZACIJSKE METODE.....	9
2.6.1 Kriteriji za vrednotenje tipizacijskih metod.....	10
2.6.2 Fenotipske metode .....	11
2.6.2.1 Serotipizacija .....	11
2.6.2.2 SDS-PAGE (denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza).....	12
2.6.3 Genotipske tipizacijske metode .....	13
2.6.3.1 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (REA).....	13

2.6.3.2	Pulzna gelska elektroforeza (PFGE).....	14
<b>2.6.4</b>	<b>Tipizacijske metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA.....</b>	<b>15</b>
2.6.4.1	Verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom	15
2.6.4.2	Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP) .....	15
2.6.4.3	Toksinotipizacija .....	15
2.6.4.4	PCR-ribotipizacija .....	16
2.6.4.5	MLVA .....	17
<b>2.6.5</b>	<b>Genotipske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja</b>	<b>17</b>
2.6.5.1	Alternativna metoda serotipizacije - slpA .....	17
2.6.5.2	Tipizacija zaporedij multiplih lokusov ( MLST).....	18
2.7	EPIDEMIOLOGIJA IN VPLIV BAKTERIJE <i>C. difficile</i> NA JAVNO ZDRAVSTVO .....	19
2.7.1	<i>C. difficile</i> pri ljudeh .....	19
2.7.2	<i>C. difficile</i> pri živalih .....	21
2.7.3	Podatki za Slovenijo .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1	MATERIALI .....	23
3.1.1	Proučevani sevi bakterije <i>Clostridium difficile</i> .....	23
3.1.2	Sestava gojišč .....	23
3.1.3	Priprava pufrov in drugih raztopin .....	23
3.2	METODE .....	25
3.2.1	Priprava suspenzije spor.....	25
3.2.2	Osamitev DNA .....	25
3.2.3	Toksinotipizacija.....	27
3.2.3.1	Verižna reakcija s polimerazo .....	28
3.2.3.2	Restrikcija pomnožkov PCR .....	29
3.2.3.3	Gelska elektroforeza pomnožkov PCR. ....	30
3.2.4	PCR-ribotipizacija.....	30
3.2.4.1	Optimizacija metode.....	30
3.2.4.2	Pomnoževanje medgenskega prostora med 16S in 23S rDNA .....	31

3.2.4.3	Gelska elektroforeza pomnožkov PCR .....	33
3.2.4.4	Analiza rezultatov .....	33
<b>3.2.5</b>	<b>Pulzna gelska elektroforeza .....</b>	<b>34</b>
3.2.5.1	Optimizacija metode.....	34
3.2.5.2	Osamitev genomske DNA v agaroznih blokcih .....	34
<b>3.2.5.2.1</b>	<b>Določanje koncentracije bakterij .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5.2.2</b>	<b>Priprava agaroznih blokcev.....</b>	<b>35</b>
3.2.5.3	Restrikcija genomske DNA v agaroznih blokcih .....	35
3.2.5.4	Gelska elektroforeza .....	36
3.2.5.5	Analiza rezultatov .....	37
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
4.1	POTRDITEV TOKSINOTIPOV IN DOLOČITEV PODTIPOV SEVOV TOKSINOTIPA III.....	38
4.2	OPTIMIZACIJA TIPIZACIJSKIH METOD .....	39
<b>4.2.1</b>	<b>Optimizacija PCR-ribotipizacije.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Optimizacija pulzne gelske elektroforeze.....</b>	<b>41</b>
4.3	DOLOČITEV PCR-RIBOTIPA IN PULSOTIPA IZBRANIM SEVOM .....	42
<b>4.3.1</b>	<b>PCR-ribotipizacija.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Pulzna gelska elektroforeza .....</b>	<b>44</b>
4.4	PRIMERJAVA TOKSINOTIPIZACIJE, PCR-RIBOTIPIZACIJE IN PFGE....	45
4.5	AKTUALNI ŠTUDIJI .....	46
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>48</b>
5.1	RAZPRAVA.....	48
5.2	SKLEPI.....	53
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>56</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		



## KAZALO SLIK

Slika 1: Vzorec fragmentov, ki ga dobimo po restrikciji celotne DNA z encimom <i>HindIII</i> in gelski elektroforezi (Johnson in sod., 2003).....	14
Slika 2: Operon rRNA.....	16
Slika 3: Strukturna organiziranost gena <i>slpA</i> bakterije <i>C. difficile</i> (Karjalainen in sod., 2002).....	18
Slika 4: Patogeni lokus PaLoc (Rupnik, 2007c).....	28
Slika 5: Restrikcijski vzorci fragmentov PCR: B2s in B3s .....	38
Slika 6: Rezultati optimizacije PCR-ribotipizacije.....	40
Slika 7: Primerjava rezultatov dveh metod PCR-ribotipizacije.....	40
Slika 8: Rezultati optimizacije pulzne gelske elektroforeze.....	41
Slika 9: PCR-ribotipi, ki jih najdemo pri sevih toksinotipa III, V in VIII.....	43
Slika 10: Nekateri od pulsotipov, v katere smo uvrstili izbrane seve <i>C. difficile</i> .....	44
Slika 11: Trije različni pulsotipi 11, 9 in 10, ki jih najdemo pri sevih toksinotipa V bakterije <i>C. difficile</i> .....	47

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (ZO).....	28
Preglednica 2: Pogoji pomnoževanja s PCR.....	28
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za posamezne PCR .....	29
Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.....	31
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za PCR po protokolu, ki so ga opisali Stubbs in sod. (1999).....	32
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za PCR po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999).....	32
Preglednica 7: Število sevov posameznega toksinotipa <i>C. difficile</i> , vključenih v študijo...39	
Preglednica 8: Število različnih PCR-ribotipov znotraj posameznega toksinotipa bakterije <i>C. difficile</i> .....	42
Preglednica 9: Število različnih pulstipov znotraj posameznega toksinotipa bakterije <i>C. difficile</i> .....	45
Preglednica 10: Primerjava toksinotipizacije, PCR-ribotipizacije in PFGE.....	45

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Lastnosti sevov, vključenih v študijo.....	74
---	----

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. Amplified fragment length polymorphism)
AP-PCR	verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (angl. Arbitrarily primed polymerase chain reaction)
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine serum albumin)
CDAD	spekter bolezni, ki jih lahko pripišemo bakteriji <i>C. difficile</i> (angl. <i>C. difficile</i> -associated disease)
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
ISR	medgenski prostor (angl. Intergenic spacer region)
kbp	kilo bazni par
LCT	veliki klostridijski toksini (angl. Large clostridial toxins)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	tipizacija zaporedij multiplih lokusov (angl. Multilocus sequence typing)
MLVA	hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. Multiple locus variable number tandem repeat analysis).
PaLoc	patogenski lokus (angl. Pathogenicity locus)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. Pulsed field gel electrophoresis)
PMC	pseudomembranozni kolitis (angl. Pseudomembranous colitis)
REA	polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (angl. restriction endonuclease analysis)
SDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
V	volt
VNTR	lokusi z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. Variable number tandem repeat)

## 1 UVOD

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) je najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih infekcij. Razen blagih drisk, lahko povzroča tudi hude in celo smrtne nevarne črevesne okužbe, zaradi katerih v svetu zbolijo in umre vedno več ljudi. Obolevajo predvsem starejši ljudje in ljudje pri katerih je prišlo zaradi zdravljenja z antibiotiki ali kemoterapijo do porušanja sestave normalne črevesne flore. Vedno več pa je tudi izven bolnišničnih okužb in okužb otrok.

V zadnjih letih se je pogostost okužb povečala, kar je deloma posledica širjenja hipervirulentnega seva BI/NAP1/027, ki je povezan s povzročanjem zelo hudih oblik bolezni. Epidemija se je pričela v Združenih državah Amerike in Kanadi, kasneje pa se je razširila tudi v nekatere države Evropske Unije.

Zaradi opisane epidemiologije, je pomembno ugotavljanje istovetnosti sevov z različnimi tipizacijskimi metodami. Tako lahko potrdimo izbruhe, pot in pa vir širjenja okužbe. Za tipizacijo bakterije *C. difficile* različni laboratoriji po svetu uporabljajo različne metode. Najbolj razširjene so: pulzna gelska elektroforeza (PFGE), PCR-ribotipizacija in analiza restrikcijskih fragmentov (REA).

### 1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je primerjava in optimizacija dveh molekularnih metod za tipizacijo bakterije *C. difficile*, in sicer PFGE in PCR-ribotipizacije. Na manjšem vzorcu izbranih sevov, iz trenutno treh najpomembnejših *C. difficile* toksinotipov III, V in VIII, smo želeli določiti tudi diskriminativnost (moč razlikovanja) posamezne metode.

- Obe metodi sta primerni za tipizacijo bakterije *C. difficile*.
- PFGE ima večjo moč razlikovanja kot PCR-ribotipizacija.
- Interpretacija rezultatov PCR-ribotipizacije, je zaradi majhnih razlik v velikosti posameznih fragmentov in nestabilnosti le teh bolj zahtevna, kot interpretacija rezultatov pulzne gelske elektroforeze.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJA *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) je gibljava po Gramu pozitivna anaerobna paličasta bakterija velikosti, 0,5-1,9  $\mu\text{m}$  x 3,0-16,9  $\mu\text{m}$ . Je sporogena, s subterminalno lociranimi endosporami (Hatheway, 1990).

Po Bergeyevem priročniku uvrščamo *C. difficile* v deblo *Firmicutes*, razred *Clostridia* in družino *Clostridiaceae*. Prva sta bakterijo izolirala Hall in O`Tool leta 1935 iz blata zdravega novorojenčka (Hall in o`Toole, 1935, cit. po Lyerly in sod. 1988). Poimenovala sta jo *Bacillus difficilis*, zaradi težav s katerimi sta se srečala pri izolaciji le te, bila pa sta tudi prva, ki sta pokazala, da je *C. difficile* toksigena bakterija (Lyerly in sod., 1988).

*C. difficile* je normalno prisoten v okolju. Najdemo ga tako v zemlji, vodi, prebavnem traktu domačih in divjih živali, na surovi zelenjavi, kot tudi na površinah v domačem okolju, glavni rezervoar pa je bolnišnično okolje (Lindberg in sod. 1955; Malamou-Ladas in sod., 1983; Al Saif in Brazier, 1996).

### 2.2 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA *C. difficile*

#### 2.2.1 Zgodovinski pregled

V 60. letih prejšnjega stoletja so začeli odkrivati, da so anaerobne bakterije tiste, ki prevladujejo v prebavnem traktu človeka. S tem je *Escherichia coli* (*E. coli*) izgubila vlogo najštevilčnejše bakterije v debelem črevesju, za številne okužbe sterilnih ran pa se je izkazalo, da jih v veliki meri povzročajo anaerobne bakterije. To odkritje je spodbudilo številna farmacevtska podjetja, da so začela razvijati nove antibiotike, ki delujejo na anaerobne bakterije. Najpogosteje uporabljeni antibiotiki, kot so kanamicin in drugi aminoglikozidi, so bili sicer zelo učinkoviti proti aerobnim in fakultativno anaerobnim bakterijam, niso pa učinkovali na anaerobne bakterije.

Prvi uspeh je bil antibiotik klindamicin. V začetku 70. let so ga uspešno uporabljali za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo anaerobne bakterije, vendar so se kmalu začela pojavljati poročila o smrti bolnikov, zdravljenih s klindamicinom in tudi drugimi antibiotiki. Stranski učinek zdravljenja je bila driska, ki je pri nekaterih bolnikih napredovala v hudo vnetje sluznice debelega črevesja, imenovano psevdomembranozni kolitis (PMC), za katerega je bila značilna visoka smrtnost (Lyerly in sod., 1988).

George in sodelavci (1978) so v študiji, ki je vključevala 8 pacientov s PMC in 20 pacientov s postoperativno diarejo, v fecesu odkrili visok titer toksina, ki ga je bilo mogoče nevtralizirati z antitoksinom bakterije *Clostridium sordellii* (*C. sordellii*). Zaradi tega so sklepali, da je ta bakterija povzročitelj postantibiotične driske in PMC (Lyerly in sod., 1988). Sledila so številna poročila, da iz blata pacientov niso uspeli izolirati bakterije *C. sordellii* temveč *C. difficile* (George in sod., 1978; Willey in Bartlett, 1979; Taylor in sod., 1981).

Kasneje so študije na živalskih modelih in študije, v katerih so preučevali toksičnost filtratov fecesa na celičnih kulturah, še dodatno potrdile, da je *C. difficile* s svojimi toksini povzročitelj postantibiotične driske in PMC (Dabard in sod., 1979; George in Symonds, 1978; Donta in sod., 1982; Mitchell in sod., 1986; Onderdonk in sod., 1980).

### **2.2.2 Patogeneza okužbe s *C. difficile***

*Clostridium difficile* je najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih infekcij. Odgovoren je za približno 10 – 25 % vseh primerov postantibiotične driske in več kot 95 % PMC (Bartlett, 1994; Gerding in sod., 1995; Gilligan in sod., 1981).

Patogeneza okužbe s *C. difficile* še ni popolnoma jasna. Ljudje, ki se okužijo s toksigenimi sevi bakterije *C. difficile* lahko, odvisno od imunskega statusa posameznika, ostanejo asimptomatični nosilci ali pa se pri njih pojavijo bolezenski znaki. Večja verjetnost za razvoj bolezni je pri ljudeh, pri katerih je imunski status zaradi predhodne ali trenutne bolezni, oziroma zdravljenja le te, oslavljen (Aslam in sod., 2005).

Normalna črevesna flora je glavna pregrada pred kolonizacijo s patogenimi bakterijami. Zdravljenje z antibiotiki poruši ravnotežje v sestavi normalne črevesne flore, kar omogoči kolonizacijo bakterije *C. difficile* (Lyerly in sod., 1988). Poleg zdravljenja z antibiotiki so dejavniki tveganja za razvoj bolezni še starost nad 60 let, bivanje v bolnišnici, bolezen pa se lahko razvije tudi pri ljudeh po gastrointestinalnih kirurških posegih in kemoterapiji (Gerding in sod., 1995). Opisani so bili tudi primeri bolezni pri otrocih in dojenčkih (Borriello, 1998; Richardson in sod., 1981). V današnjem času pa narašča tudi število okužb v populaciji z nizkim tveganjem (mladi, brez predhodne terapije z antibiotiki in/ali hospitalizacije) (Chernak in sod., 2005).

#### 2.2.2.1 Patogeneza in antibiotiki

Do okužbe lahko pride po zdravljenju z večino antibiotikov. Najpogosteje pa se bolezen razvije po uporabi klindamicina in betalaktamskih antibiotikov, predvsem cefalosporinov in širokospektralnih penicilinov, kot sta ampicilin in amoksiciklin (Gerding in sod., 1995; George in sod., 1982; Lyerly in sod., 1988), v zadnjem času pa še po zdravljenju z antibiotiki iz družine fluorokinolonov (Barbut in sod., 2007).

Nekateri antibiotiki poleg tega, da porušijo sestavo normalne črevesne flore, vplivajo tudi na povečano izražanje faktorjev, pomembnih pri kolonizaciji bakterije *C. difficile*. Prisotnost subinhibitornih koncentracij (1/2 MIC, minimalna inhibitorna koncentracija) ampicilina in klindamicina vpliva na povečano izražanje genov, ki kodirajo faktorje, pomembne pri kolonizaciji, prisotnost moksifloksacina (antibiotik iz družine fluorokinolonov s širokim spektrom delovanja, tako na po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije) in kanamicina pa bistveno ne vpliva na spremembo izražanja teh genov (Deneve in sod., 2007).

#### 2.2.3 Virulenčni dejavniki bakterije *C. difficile*

*C. difficile* ni invazivna bakterija, pač pa je bolezen tipično toksinska. *C. difficile* lahko izdeluje tri toksine; toksin A (TcdA), toksin B (TcdB) in binarni toksin CDT. Seve, ki ne delajo nobenega od teh toksinov, označujemo kot netoksigene. Takšni sevi ne povzročajo



bolezni (Rupnik in sod., 2005). Razen toksinov pa *C. difficile* izdeluje še druge virulenčne dejavnike.

Toksina TcdA in TcdB, ki veljata za glavna virulenčna dejavnika odgovorna za razvoj bolezni, sodita v družino velikih klostridijskih toksinov (LCTs, angl. Large clostridial toxins). LCT je družina toksinov, ki so si podobni v strukturi, aminokislinskem zaporedju in mehanizmu delovanja. V družino LCT uvrščamo še letalni (TcsL) in hemoragični (TcsH) toksin bakterije *C. sordellii* in  $\alpha$ -toksin (TcnA) bakterije *Clostridium novyi* (*C. novyi*). Vsi LCT delujejo citotoksično in samo TcdA in TcsH tudi enterotoksično (Rupnik in Just, 2006).

LCT so enoveržni proteinski toksini z molekulsko maso med 250 in 308 kDa. Strukturno ločimo domeno za vezavo na celico, ki je na C-terminalnem delu proteina, encimsko domeno na N-terminalnem delu in centralno hidrofobno domeno, verjetno povezano s translokacijo toksina (von Eichel-Streiber in sod., 1996; Rupnik in Just, 2006).

Toksina TcdA in TcdB sta glikoziltransferazi, ki katalizirata prenos glukoznega ostanka iz UDP-glukoze na majhne GTPaze iz poddružin Rho in Ras. Modifikacija GTPaz onemogoči interakcije z njihovimi efektorskimi molekulami in tako prekine od GTPaz odvisno signalizacijo (Rupnik in Just, 2006). Posledica je depolimerizacija aktina F, kar vodi do porušanja citoskeleta in zaokrožanja celic (Rupnik in Just, 2006; von Eichel-Streiber in sod., 1996).

Oba toksina imata enak znotrajcelični mehanizem delovanja, vendar se njuna učinka *in vivo* razlikujeta. Toksin A deluje enterotoksično in citotoksično ter povzroča vnetne spremembe v črevesni steni. Poveča žilno prepustnost, v svetlini se nabira viskozna krvava tekočina, ki vsebuje nevtrofilce, limfocite, eritrocite, serumske proteine in sluz. Posledica je driska. Toksin B deluje citotoksično in okvarja steno debelega črevesja tako, da povzroči razpad aktinskih filamentov in posledično zaokrožanje in propad celic, zaradi česar nastajajo na njej razjede in rumeno bele obloge ali psevdomembrane (Hurley in Nguyen, 2002; Gubina, 2002).

Toksina TcdA in TcdB kodira 19 kb veliki patogeni lokusu (PaLoc), ki leži v kromosomu. Poleg genov, ki kodirajo toksina TcdA in TcdB, najdemo v PaLoc še tri dodatne gene *tcdC*, *tcdE*, in *tcdR* (prej imenovan *tcdD*) (Braun in sod., 1996; Rupnik in Just, 2006). Gen *tcdE* kodira hidrofobni protein (TcdE), ki je verjetno odgovoren za sprostitvev toksina iz celice (Tan in sod., 2001), gen *tcdC* kodira negativni regulator prepisa *tcdA* in *tcdB* (Matamouros in sod., 2007), *tcdR* pa kodira alternativni faktor sigma RNA-polimeraze in tako deluje kot pozitivni regulator prepisovanja obeh toksinskih genov (Dupuy in sod., 2006).

Tretji toksin, binarni toksin CDT, spada v skupino klostridijskih binarnih toksinov. Je ADP-riboziltransferaza in povzroči depolimerizacijo aktinskih mikrofilamentov. Vlogo binarnega toksina, kot dodatnega virulenčnega dejavnika nekaterih sevov bakterije *C. difficile*, pa zaenkrat še raziskujejo (Perelle in sod., 1997; Goncalves in sod., 2004; Lyerly in sod., 1988). Sev, pri katerem so binarni toksin prvič odkrili, so izolirali iz pacienta s hudim psevdomembranoznim kolitisom (Popoff in sod., 1988).

Drugi virulenčni dejavniki, ki doprinesejo k večji virulenci sevov, so še proteini na bakterijski površini (Cwp66, SlpA), ki sodelujejo pri interakciji sluznice črevesja in bakterijske celice (Waligora in sod., 2001; Karjalainen in sod., 2001) in hidrolitični encimi (hialuronidaza, želatinaza, nevraminidaza in kolagenaza), ki lahko sproščajo hranilne snovi in sodelujejo pri razgradnji vezivnega tkiva (Seddon in sod., 1990; Wilson in Perini, 1988). Nekateri sevi imajo tudi kapsulo, ki jih ščiti pred fagocitozo (Borriello, 1998), vlogo bičkov pri kolonizaciji pa še raziskujejo (Tasteyre in sod., 2000).

### 2.3 BOLEZENSKI ZNAKI

Okužba s *C. difficile* lahko mine neopazno ali pa se pojavi blaga driska, ki jo spremljajo želodčne bolečine. Od 90 do 95 % bolnikov ima rjavo ali vodeno drisko, preostalih 5 – 10 % pa krvavo drisko. Najhujša oblika okužbe je psevdomembranozni kolitis, ki je nemalokrat tudi smrtna. Bolniki imajo lahko povišano telesno temperaturo in levkocitozo, bolezen pa spremljajo še bruhanje, vrtoglavica in splošna oslabeledost. Redko lahko pride

tudi do predrtja debelega črevesa in do pojava imenovanega toksični megakolon. Do pojava bolezenskih znakov pride navadno peti do deseti dan od začete antimikrobne terapije (Borriello, 1998; Knoop in sod., 1993).

PMC je ponavadi omejen na debelo črevo in danko (Hurley in sod., 2002; Borriello, 1998). Histopatološka slika pokaže vnetje črevesne sluznice s prisotnimi psevdomembranami, ki so sestavljene iz sluzi, nekrotičnih epitelijskih celic in levkocitov. Te se oblikujejo v rumene ali bele od 0,2 do 2 milimetra velike lehe (angl. plaque). Med lehami so območja z nepoškodovano sluznico. Psevdomembrane se lahko, vendar redko, konfluentno razrastejo po vsej površini sluznice debelega črevesa (Price in Davies, 1977; Lysterly in sod., 1988).

Izvenčrevesne infekcije so redke. Opisani so bili primeri bakteriemije, okužbe ran, vnetja peritoneja, osteomielitisa, plevritisa ter okužb urogenitalnega trakta (Smith in King, 1962; Lysterly in sod., 1988).

Pri približno 5-30 % bolnikov se kljub zdravljenju bolezen ponovi, navadno po enem do dveh tednih po prenehanju zdravljenja prvotne epizode (Johnson in Gerding 1998). Pri približno 50 % gre za okužbo z novim sevom. Ker pa lahko bakterija *C. difficile* v obliki spor preživi v črevesju tudi do 6 mesecev, je možna tudi okužba z istim sevom (Barbut in sod., 2000; Walters in sod., 1983). Ponovitev diareje ni odraz odpornosti proti antibiotiku, saj se bolniki odzovejo na zdravljenje z antibiotikom, s katerim je bila zdravljena primarna epizoda (Johnson in Gerding, 1998).

Za celoten spekter bolezni, ki jih lahko pripišemo bakteriji *C. difficile*, uporabljamo kratico CDAD (angl. *C. difficile*-associated disease).

## 2.4 DIAGNOZA BOLEZNI

Za potrditev klinične diagnoze CDAD pri bolnikih z diarejo so v uporabi številni testi. Najzanesljivejša sta izolacija bakterije iz blata in dokaz citotoksičnosti na celičnih kulturah, ki velja za »zlati standard«. Oba testa sta zelo specifična in občutljiva, njuna

slabost pa je zamudnost, saj dobimo rezultate šele po 48 urah (Hurley in sod., 2002; Staneck in sod., 1996).

Zelo hiter test je test lateksne aglutinacije, s katerim dokažemo prisotnost encima glutamat-dehidrogenaze, bakterije *C. difficile*, vendar ima test nizko občutljivost in specifičnost in ne loči med toksigenimi in netoksigenimi sevi (Staneck in sod., 1996; Lyerly in sod., 1991).

Encimsko imunski testi za dokaz prisotnosti toksinov TcdB in/ali TcdA, so visoko specifični vendar manj občutljivi kot dokaz citotoksičnosti na celični kulturi. Testi so zelo hitri, saj rezultate odčitamo že po 2 – 4 urah (DiPersio in sod., 1991). Priporoča se uporaba testov, ki zaznajo prisotnost obeh toksinov, predvsem zaradi širjenja sevov, ki izdelujejo samo toksin TcdB in ne tudi toksina TcdA (Alfa in sod., 2000; Kuijper in sod., 2006).

Opisane so tudi molekularne metode, ki zaenkrat še niso v rutinski uporabi, s katerimi dokazujemo prisotnost bakterijske nukleinske kisline. V začetni fazi so bile molekularne metode omejene na dokazovanje gena za 16S rRNA, vendar je njihova slabost ta, da ne ločijo med toksigenimi in netoksigenimi sevi. Boljša je metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-PCR) za dokazovanje prisotnosti toksinskih genov *tcdA* in/ali *tcdB*. Metoda je zelo hitra, saj dobimo rezultate v nekaj urah (Kuijper in sod. 2006; van den Berg in sod., 2005).

## 2.5 ZDRAVLJENJE

Prvi korak pri zdravljenju simptomatične okužbe s *C. difficile* je prekinitev antimikrobne terapije. Če prekinitev antimikrobne terapije v nekaj dneh ne izboljša stanja, se zdravi bolnika z vankomicinom ali metronidazolom. Vankomicin je najpogosteje uporabljeni antibiotik za zdravljenje CDAD v Združenih državah Amerike, v Evropi pa je zdravilo izbora metronidazol. Oba antibiotika sta po učinkovitosti primerljiva, s tem da je metronidazol manj toksičen in cenejši (Lyerly in sod., 1988).

Razvoj novih terapevtskih učinkovin je usmerjen predvsem v smeri iskanja novih načinov zdravljenja, brez uporabe antibiotikov. V razvoju so monoklonska protitelesa proti toksinom TcdA in TcdB (Babcock in sod., 2006) in toksoidno cepivo kot zaščita pred CDAD (Kotloff in sod., 2001).

Tudi alternativne terapije, kot so uporaba probiotikov in prebiotikov so lahko v posameznih primerih uspešne. Probiotiki so žive kulture mikroorganizmov, ki pozitivno delujejo na gostitelja. Najpogosteje se kot probiotiki uporabljajo *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) (Elmer in McFarland, 1987), laktobacili in bifidobakterije (Hickson in sod., 2007). Mehanizmi s katerimi probiotiki preprečujejo kolonizacijo s patogenimi bakterijami so: produkcija inhibitornih substanc (organske kisline, vodikov peroksid, bakteriocini), tekmovanje za vezavna mesta, tekmovanje za hranila, razgradnja receptorjev za vezavo toksina (*S. boulardii* izdeluje proteaze, ki cepijo toksine), ter spodbujanje imunskega odziva (Rolfé 2000; Costagliuolo in sod., 1999). Prebiotiki so komponente hrane, ki jih človek ne more prebaviti, vendar pozitivno vplivajo na normalno črevesno floro. Predvsem so uspešni nekateri oligosaharidi (fruktooligosaharidi, inulin...) (Hopkins in Macfarlane, 2003)

## 2.6 TIPIZACIJSKE METODE

Za kvaliteten epidemiološki nadzor (za določitev prevalece posameznih sevov ter geografskega širjenja epidemičnih in endemičnih sevov), je potrebno razviti kvalitetne tipizacijske metode, ki bi hitro in zanesljivo razlikovale med sorodnimi bakterijskimi izolati. Za pravočasno ukrepanje v primeru epidemije je namreč nujno, da hitro in zanesljivo identificiramo epidemiološko povezane izolate, določimo rezervoar in poti širjenja okužbe ter obseg epidemije. Konvencionalne tipizacijske metode, kot so fagotipizacija, serotipizacija, antibiogramska tipizacija, so v preteklosti doprinesle veliko k razumevanju epidemiologije nalezljivih bolezni, vendar so bile te metode, ki temeljijo na fenotipskih značilnostih, omejene predvsem za razumevanje lokalnih izbruhov. Kljub temu, da so nekatere še danes v uporabi, imajo te metode določene, predvsem praktične omejitve, zaradi katerih so manj primerne za študije strukture in dinamike bakterijske

populacije. Večina fenotipskih tipizacijskih metod je bila razvita za določeno bakterijsko vrsto in zato niso splošno uporabne. Ker se fenotipske lastnosti ne izrazijo vedno, niso dober epidemiološki pokazatelj. Zato so v zadnjih dveh desetletjih fenotipske metode zamenjale genotipske oziroma molekularne metode (van Belkum in sod., 2007).

### 2.6.1 Kriteriji za vrednotenje tipizacijskih metod

**Sposobnost razlikovanja** (discriminatory power) je sposobnost metode, da loči med dvema sevoma naključno izbranimi iz populacije določene bakterijske vrste. Indeks diskriminativnosti izračunamo s pomočjo Simpsonovega indeksa (1), ki je bil razvit za opis vrstne diverzitete v določenem habitatu. Izrazimo ga kot verjetnost, da metoda dva nesorodna seva iz testne populacije uvrsti v dva različna tipa.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1) \quad \dots(1)$$

N je skupno število sevov v vzorčni populaciji, S je število opisanih tipov in  $n_j$  je število sevov, ki pripadajo  $j$ -temu tipu.

S tem indeksom lahko med seboj primerjamo različne tipizacijske metode in izberemo tisto z največjo sposobnostjo razlikovanja (Hunter and Gaston, 1988).

**Ponovljivost metode**, to je sposobnost metode, da istemu izolatu določi isti tip vsakokrat, ko test ponovimo. Na ponovljivost vplivajo različni faktorji kot so: razmere gojenja, osamitve DNA, uporaba različnih reagentov, opreme in pristranskost pri analizi rezultatov (van Belkum in sod., 2007). Ponovljivost metode izrazimo v odstotkih (Hunter in Gaston, 1988).

**Odstotek sevov, ki jih lahko z izbrano metodo tipiziramo**. Izračunamo ga tako, da število sevov, ki jih lahko tipiziramo, delimo s številom vseh sevov, vključenih v test. Idealna metoda mora dati rezultate z vsemi izolati, ki jih testiramo (van Belkum in sod., 2007).

Za tipizacijske metode pa je dobrodošla tudi:

- Fleksibilnost, to pomeni, da jih lahko uporabimo za tipizacijo različnih bakterijskih vrst z le minimalno modifikacijo protokola. Moderne metode, ki temeljijo na analizi nukleotidnega zaporedja so fleksibilne (isti princip delovanja, ista oprema in potrebno znanje) vendar jih je potrebno optimizirati za vsako bakterijsko vrsto posebej.
- Hitrost.
- Dostopnost metode, ki je odvisna od reagentov in opreme, ki so na razpolago in tudi spretnosti in znanja osebja v določenem laboratoriju.
- Enostavnost izvajanja metode ter interpretacije rezultatov.
- Cena.
- Možnost računalniške analize rezultatov in shranjevanje rezultatov v elektronski obliki ter izmenjava le teh med laboratoriji.

Za spremljanje okužb s *C. difficile* ni v uporabi samo ena metoda, ki bi omogočala globalno primerjavo, pač pa različni laboratoriji uporabljajo različne metode. Te metode lahko v osnovi razdelimo na fenotipske in molekularne metode, slednje pa še na od nukleotidnega zaporedja odvisne in neodvisne.

## **2.6.2 Fenotipske metode**

Prve metode, ki so se uporabljale za tipizacijo *C. difficile*, so temeljile na fenotipskih lastnostih. To so bili antibiogrami, analiza celičnih proteinov, imunoelektroforeza, kombinirane bakteriocin in fagotipizacije ter druge. Te metode so bile uporabne predvsem za spremljanje lokalnih izbruhov in niso imele velike sposobnosti razlikovanja med sevi (Brazier, 1998; Brazier, 2001).

### **2.6.2.1 Serotipizacija**

Prva široko uporabljena metoda, ki je deloma v uporabi še danes, je bila serotipizacija. To je fenotipska metoda, ki pokaže razlike v površinskih antigenih. Temelji na aglutinaciji

bakterij s kunčjimi antiserumi. Metoda razdeli seve na več kot 20 seroloških skupin, ki jih označimo z velikimi tiskanimi črkami. Dobra je korelacija med serološkimi skupinami in toksigenimi/netoksigenimi sevi. V seroloških skupinah A, C, G, H in K najdemo povečini toksigene seve, izolirane iz simptomatskih bolnikov, v serološki skupini D pa netoksigene seve, izolirane iz asimptomatskih bolnikov (Delmee in sod., 1985; Delmee in sod., 1986; Toma in sod., 1988).

Težava metode je slabša moč razlikovanja zaradi navzkrižne reaktivnosti, za katero je odgovoren protein flagelin, ki sestavlja biček. Za vse predstavnike serološke skupine A (ki jih na osnovi različnih proteinskih profilov, dobljenih s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE), nadalje razdelimo še na skupine A1, A2...), se je izkazalo, da imajo bičke, prav tako tudi za nekatere seve znotraj skupin H, G, D in K. Diskriminativnost metode je mogoče izboljšati s kombiniranjem serotipizacije s SDS-PAGE (denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza) ali z odstranitvijo bičkov (Delmee in sod., 1985; Delmee in sod., 1986; Toma in sod., 1988; Delmee in sod., 1990). Encimsko imunsko metoda (ELISA), za detekcijo antigenov, specifičnih za določeno serološko skupino, je izboljšana metoda serotipizacije (Delmee in sod., 1993).

#### 2.6.2.2 SDS-PAGE (denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza)

Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza je metoda za ločevanje proteinov na osnovi njihove elektroforezne mobilnosti. S PAGE lahko primerjamo samo površinske proteine ali vse celične proteine. Metoda, ki je bila v uporabi v 80. letih prejšnjega stoletja, razdeli izolate na podlagi različnih proteinskih profilov v različne skupine. PAGE je dokaj zahtevna metoda, zato so za izvedbo potrebne izkušnje, prednost metode pa je ta, da so materiali in reagenti relativno poceni. Ob ustrezni standardizaciji je metoda ponovljiva in uporabna za tipizacijske študije (Tabaqchali in sod., 1986; McKay in sod., 1989; van Belkum in sod., 2007). Po elektroforezi lahko nadaljujemo z imunskim prenosom (Immunoblot), ter tako ugotovljamo vzorec specifičnih proteinov, kar olajša interpretacijo rezultatov (Heard in sod., 1986).



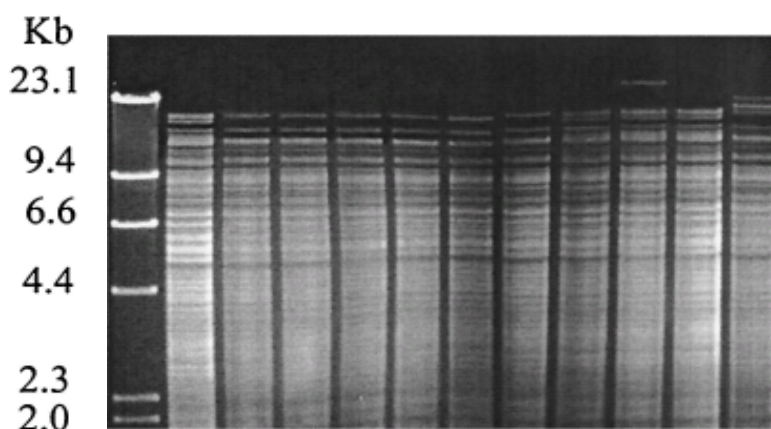
### 2.6.3 Genotipske tipizacijske metode

Z genotipskimi tipizacijskimi metodami odkrivamo spremembe na nivoju bakterijskega genoma. Metode temeljijo na:

- analizi plazmidov, kjer ugotavljamo število in velikost plazmidov pri različnih sevih. Pri bakteriji *C. difficile* ta metoda ni uporabna, saj vsi sevi nimajo plazmidov (Brazier, 1998),
- analizi genomske DNA po razrezu z restrikcijskimi encimi,
- pomnožitvi specifičnih odsekov genoma z verižno reakcijo s polimerazo,
- določitvi in analizi nukleotidnega zaporedja izbranih odsekov DNA,
- kombinaciji različnih metod (van Belkum in sod., 2007).

#### 2.6.3.1 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (REA).

Prvi so to metodo uporabili Kuijper in sod. (1987), da bi ugotovili ali sta dve ženski s psevdomembranoznim kolitisom okuženi z istim sevom. Kasneje jo je pričel rutinsko uporabljati laboratorij prof. Gerdinga v Chicagu, kjer je danes zbirka več tisoč sevov *C. difficile*, tipiziranih z metodo REA (Clabots in sod., 1993). Metoda temelji na razrezu genomske DNA z restrikcijskim encimom, ki pogosto reže, razrezani fragmenti (velikosti od 0,5 do 30 kbp, slika 1) pa po ločitvi z gelsko elektroforezo tvorijo vzorec, ki je značilen za določen tip. REA je dokaj enostavna tipizacijska metoda z dobro močjo razlikovanja vendar je, zaradi velikega števila fragmentov, ki jih dobimo po razrezu kromosomske DNA in slabi ločitvi le teh z gelsko elektroforezo, interpretacija rezultatov izjemno zahtevna. Ker direktna interpretacija rezultatov ni zanesljiva, je posamezne profile REA potrebno primerjati z referenčnimi sevi že znanih tipov na istem gelu (Wren in Tabaqchali, 1987; Kristjansson in sod. 1994; Johnson in sod., 2003).



Slika 1: Vzorec fragmentov, ki ga dobimo po restrikciji celotne DNA z encimom *HindIII* in gelski elektroforezi (Johnson in sod., 2003).

#### 2.6.3.2 Pulzna gelska elektroforeza (PFGE)

Pulzna gelska elektroforeza (PFGE) je metoda, ki se uporablja za ločevanje zelo velikih molekul DNA. S periodičnim spreminjanjem smeri električnega toka morajo molekule ob vsaki zamenjavi spremeniti smer potovanja. Večje molekule DNA so bolj okorne in težje spremenijo smer potovanja kot manjše molekule in zato po gelu potujejo počasneje.

Celotno genomsko DNA režemo z encimom, ki redko reže. Za tipizacijo *C. difficile* se najpogosteje uporablja encim *SmaI* (van Dijck in sod., 1996; Bidet in sod., 2000; Spigaglia in sod., 2001; Gal in sod., 2005) lahko pa tudi encim *SacII* (Kato in sod., 1994). Z restrikcijo dobimo od 5 do 10 restrikcijskih fragmentov, velikosti od 40 do 700 kbp (van Dijck in sod., 1996; Spigaglia in sod., 2001).

Metoda PFGE je ena izmed standardnih metod, ne le za tipizacijo *C. difficile*, temveč tudi drugih bakterij. Je metoda z dobro ponovljivostjo in sposobnostjo razlikovanja. Slabost metode je draga oprema in nekoliko daljši čas, ki je potreben, da dobimo rezultate (van Belkum in sod., 2007; Brazier, 2001). Problem metode pri tipizaciji bakterije *C. difficile* je bil dolgo časa tudi ta, da se sevi, ki pripadajo serološki skupini G, zaradi konstantne razgradnje DNA, niso dali tipizirati (Bidet in sod., 2000; Kato in sod., 1994). Z razvojem novih protokolov pa se je uspešnost tipizacije izboljšala (Gal in sod., 2005).

## 2.6.4 Tipizacijske metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA

### 2.6.4.1 Verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (AP-PCR)

Pri tej metodi s poljubno izbranim začetnim oligonukleotidom in manj strogimi pogoji pomnoževanja, pomnožimo naključne dele genoma. Po gelski elektroforezi pridelkov PCR dobimo vzorec pomnoženih fragmentov različnih velikosti in jakosti. Število fragmentov, ki jih dobimo, je ponavadi manjše od 10 (Bidet in sod., 2000; Killgore in Kato, 1994). Slabost metode je slaba ponovljivost in slaba primerljivost med laboratoriji (Collier in sod., 1996).

### 2.6.4.2 Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP)

Metoda temelji na selektivni pomnožitvi restrikcijskih delov genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo. Metoda vsebuje tri korake: i) restrikcija DNA in ligacija dvoverižnih oligonukleotidnih adapterjev, ii) selektivno pomnoževanje restrikcijskih fragmentov, iii) analiza pomnoženih fragmentov. S pomočjo te metode lahko odkrivamo razlike med organizmi brez predhodnega znanja o nukleotidnem zaporedju. Razlike so odvisne od sprememb prepoznavnih mest restrikcijskih encimov, ki nastanejo zaradi mutacij (Vos in sod., 2005).

V primerjavi s PFGE, ki velja za »zlati standard« med tipizacijskimi metodami, ima AFLP podobno ponovljivost in moč razlikovanja, vendar je dosti bolj delovno zahtevna in tudi optimizacija je dolgotrajna (Klaassen in sod., 2002; van den Berg in sod., 2004).

### 2.6.4.3 Toksinotipizacija

Toksinotipizacija je metoda, ki temelji na PCR-RFLP analizi regije PaLoc (pathogenicity locus – patogeni lokus). Z metodo PCR najprej pomnožimo določen odsek DNA, dobljeni pomnožek PCR pa nato še režemo z izbranim restrikcijskim encimom oziroma kombinacijo različnih encimov. Glede na kombinacijo dobljenega vzorca, ki odraža variabilnost patogenskega lokusa, seve razdelimo na skupine, imenovane toksinotipi. Seve,

ki so identični referenčnemu sevu bakterije *C. difficile* (VPI 10463), označimo kot toksinotip 0. Variantne seve, ki se v zgradbi patogenskega lokusa razlikujejo od referenčnega seva, pa označimo z rimskimi številkami (Rupnik in sod., 1998; Rupnik in sod., 1997). Do danes je znanih 28 različnih toksinotipov (0, I – XXVII) (Rupnik, 2007c). Variantni sevi se lahko v zgradbi patogenskega lokusa le malo razlikujejo od referenčnega seva, lahko pa so spremembe obsežnejše in obsegajo delecije, insercije in substitucije v nukleotidnem zaporedju PaLoc (Rupnik in sod., 1998).

Toksinotipizacija se deloma ujema z metodo serotipizacije, zelo dobro pa s PCR-ribotipizacijo in PFGE (Rupnik in sod., 1998; Rupnik in sod., 2001).

#### 2.6.4.4 PCR-ribotipizacija

PCR-ribotipizacija je metoda, ki temelji na razlikovanju polimorfizma medgenskega prostora med 16S rDNA in 23S rDNA (slika 2). Pri tej metodi z dvema začetnima oligonukleotidoma, pri čemer se en veže na 3' konec gena za 16S rRNA, drugi pa na 5' konec gena za 23S rRNA, pomnožimo prostor (intergenic spacer region, ISR) med obema genoma (Cartwright in sod., 1995; Stubbs in sod., 1999; Bidet in sod., 1999). Regije ISR so zelo variabilne, tako v dolžini kot tudi v nukleotidnem zaporedju. Ker ima *C. difficile* več kopij operona rRNA (sev 630 jih ima 11) (Sadeghifard in sod., 2006) lahko s pomnožitvijo teh regij in ločitvijo fragmentov različnih dolžin z gelsko elektroforezo, seve (glede na dobljene vzorce fragmentov) razdelimo v različne skupine imenovane PCR-ribotipi, ki jih označimo z arabskimi številkami (Stubbs in sod., 1999; Bidet in sod., 1999). Metoda je hitra, enostavna in ponovljiva (Cartwright in sod., 1995) z dobro močjo razlikovanja (van Dijck in sod., 1996; Rupnik in sod., 2001; Collier in sod., 1996). Do danes je znanih že več kot 200 različnih PCR-ribotipov (Kuijper in sod., 2006).



Slika 2: Operon rRNA. ISR-medgenski prostor, P1, P2-mesto prileganja začetnih oligonukleotidov.

#### 2.6.4.5 MLVA

MLVA je hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. Multiple locus variable number tandem repeat analysis).

V genomu nekaterih bakterijskih vrst najdemo odseke DNA iz tandemskih ponavljajočih se zaporedij. Za ta zaporedja je značilna visoka stopnja polimorfizma, ki je največkrat posledica napak pri podvojevanju DNA, ko pride zaradi zdrsa DNA polimeraze do insercij ali delecij ponavljajočih se enot (van Belkum in sod., 2007).

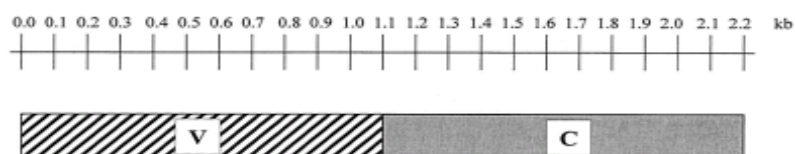
MLVA je metoda, pri kateri najprej z metodo verižne reakcije s polimerazo pomnožimo poljubno število lokusov VNTR (lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev). Ti lokusi pri različnih sevih vsebujejo različno število teh tandemskih ponovitev. V primeru daljših ponovitev, lahko pridelke PCR ločimo z gelsko elektroforezo in nato iz velikosti fragmentov izračunamo število tandemskih ponovitev v določenem lokusu ali pa število ponovitev določimo z analizo nukleotidnega zaporedja. To storimo za vsak lokus, ki je vključen v analizo. Rezultat je kombinacija števil, ki predstavljajo število tandemskih ponovitev posameznega lokusa (Marsh in sod., 2006; van Belkum in sod., 2007). Če so kot molekularni označevalci izbrani lokusi s krajšimi tandemskimi ponovitvami (2-9 bp), lahko število teh ponovitev določimo z uporabo kapilarne elektroforeze (van den Berg in sod., 2007). Metoda je enostavna in hitra in ima odlično sposobnost razlikovanja. MLVA razlikuje med izolati istih tipov REA (Marsh in sod., 2006), PCR- ribotipov in pulstipov (van den Berg in sod., 2007). Slabost metode pa je (morda) prehitra evolucija teh tandemskih ponovitev (van Belkum in sod., 2007).

### 2.6.5 Genotipske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja

#### 2.6.5.1 Alternativna metoda serotipizacije - *slpA*

Alternativna metoda serotipizacije je sekvenčna metoda ali metoda PCR-RFLP, ki odraža variabilnost gena *slpA*, za površinski antigen (Karjalainen in sod., 2002). Gen *slpA* kodira veliki prekursor protein, ki se kasneje razcepi na dva različna proteina, ki sestavljata S-sloj (S-layer) (Karjalainen in sod., 2001). S-sloj je dvodimenzionalna proteinska mreža, ki se nahaja na površini nekaterih bakterijskih celic in je vidna le pod elektronskim

mikroskopom. Pri bakteriji *C. difficile* je sestavljen iz dveh proteinov, ki ju lahko ločimo glede na molekularno maso. Protein z nižjo molekularno maso, ki ga kodira variabilna regija gena *slpA* (N –terminalni konec, slika 3) je v zunanji ovojnici usmerjen navzven in verjetno določa tudi serološko specifičnost. Po pomnožitvi variabilne regije gena *slpA* in restrikcijski analizi oziroma določitvi nukleotidnega zaporedja pridelka PCR lahko seve razdelimo v različne skupine. Metoda je dobra alternativa serotipizacije, saj so nukleotidna zaporedja variabilnih regij identična znotraj določene serološke skupine in različna med skupinami. Težava metode pa je, da so regije, ki bi bile primerne za prileganje začetnih oligonukleotidov, premalo ohranjene med različnimi bakterijskimi izolati (Karjalainen in sod., 2002; Kato in sod., 2005; Eidhin in sod., 2006).



Slika 3: Strukturna organiziranost gena *slpA* bakterije *C. difficile*. V: variabilna regija, C: ohranjena regija (Karjalainen in sod., 2002).

#### 2.6.5.2 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (Multilocus sequence typing, MLST)

MLST je metoda, ki odraža variabilnost v nukleotidnem zaporedju večjega števila genov, pomembnih za esencialne metabolične funkcije, t.i. »hišnih genov« (angl. housekeeping genes). Po pomnožitvi dela gena z metodo PCR in analizi nukleotidnega zaporedja le tega, vsakemu zaporedju, ki je drugačno od prejšnjega, dodelimo novo številko. Kombinacija številke vseh genov, vključenih v analizo nam da sekvenčni tip (ST) (Lemee in sod., 2004; Lemee in sod., 2005). Do sprememb v nukleotidnem zaporedju pride predvsem zaradi točkovnih mutacij, katerih frekvenca je približno osem krat večja kot frekvenca rekombinacij (Lemee in sod., 2004).

Metoda je ponovljiva in hitra, moč razlikovanja (discriminatory power) pa je odvisna od genov, ki jih vključimo v analizo. Analiza MLST »hišnih genov« (nevtralni geni, niso pod selekcijskim pritiskom) je primerna predvsem za dolgoročne epidemiološke študije za kratkoročne študije pa je potrebno v analizo vključiti tudi gene, katerih molekularna ura teče

hitreje (npr. geni, ki kodirajo virulenčne dejavnike). S kombinacijo dveh ali treh visoko variabilnih genov, kot so npr. *slpA*, *cwp66* in *fliC* in »hišnih genov«, bi bila metoda bolj primerna za kratkoročne epidemiološke študije (Lemee in sod., 2005).

Metode, ki temeljijo na primerjavi nukleotidnega zaporedja, imajo določene prednosti pred drugimi molekularnimi metodami. Rezultati so številčni in zato nedvoumni, lahko jih brez težav primerjamo med laboratoriji in jih tudi shranjujemo v centralno bazo podatkov, kjer so dostopni vsem, ki te podatke potrebujejo (Lemee in sod., 2005; Lemee in sod., 2004).

## 2.7 EPIDEMIOLOGIJA IN VPLIV BAKTERIJE *C. difficile* NA JAVNO ZDRAVSTVO

### 2.7.1 *C. difficile* pri ljudeh

Z bakterijo *C. difficile* je koloniziranih 3 % zdravih odraslih ljudi in do 70 % zdravih novorojenčkov (Bartett, 1994). Kolonizacija novorojenčkov in dojenčkov skoraj vedno poteka asimptomatično. Zakaj dojenčki ne zbolijo, kljub visokim titrom toksina A in B v blatu, še ni jasno (Lyerly in sod., 1988). Z bakterijo *C. difficile* je koloniziranih tudi od 16-35 % hospitaliziranih pacientov (Kuijper in sod., 2006). Z daljšim časom hospitalizacije pa narašča tudi verjetnost okužbe (Johnson in Gerding, 1998).

Najverjetnejši vir okužbe s *C. difficile* so kontaminirano okolje, asimptomatski nosilci bakterije, bolniki s CDAD in roke bolnišničnega osebja (Johnson in Gerding, 1998; Kuijper in sod., 2006). Ker so spore bakterije *C. difficile* odporne na večino dezinfekcijskih sredstev, ki jih uporabljajo v bolnišnicah, lahko ostanejo prisotne v bolnišničnem okolju tudi več mesecev. Najpogosteje so kontaminirana tla, komode, in okvir postelje (Kuijper in sod., 2006).

*C. difficile* je primarno povzročitelj bolnišničnih okužb. V zadnjih nekaj letih se je povečalo tudi število izvenbolnišničnih okužb in okužb v populaciji z nizkim tveganjem (Chernak in sod., 2005). Spremembe v epidemiologiji so lahko posledica:

- Širjenja novega močno virulentnega tipa bakterije *C. difficile*, ki ga s PCR-ribotipizacijo uvrstimo v tip 027, s PFGE v tip NAP1 (North America pulsotype1), s tipizacijo REA v tip BI in toksinotipizacijo v toksinotip III (*C. difficile* 027/NAP1/BI/III). Za ta sev je značilna tudi povečana produkcija toksinov TcdA in TcdB, prisotnosti binarnega toksina CDT ter odpornost proti eritromicinu, moksifloksacinu in drugim fluorokinolonom.
- Sprememb v uporabi antibiotikov (povečana uporaba fluorokinolonov).
- Pojav novega rezervoarja oziroma novih poti širjenja okužbe (Rupnik, 2007a; Barbut in sod., 2007).

Število okužb s *C. difficile* pa narašča tudi pri različnih živalih (Songer in Anderson, 2006), ki so tudi lahko možen rezervoar okužbe. V nedavni kanadski raziskavi, so namreč odkrili precejšnje prekrivanje med izolati bakterije *C. difficile*, izoliranih iz ljudi in teličkov. Največ izolatov iz teličkov je pripadalo PCR-ribotipu 017 (toksinotip VIII, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>-</sup>) in PCR-ribotipu 027 (toksinotip III, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup>), ki sta tudi dva prevladujoča tipa, povezana z izbruhi CDAD pri ljudeh (Barbut in sod., 2007), ter PCR-ribotipu 078 (toksinotip V, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup>) (Rodriguez-Palacios in sod., 2006), ki je najpogosteje izolirani tip tudi pri novorojenih prašičkih (Keel in sod., 2007).

Epidemični sev 027 pa so izolirali tudi iz psa, ki je z obiski razveseljeval bolnike v nekaterih bolnišnicah v Kanadi (Lefebvre in sod., 2006).

Da prihaja do preliivanja človeških in živalskih rezervoarjev je vidno tudi v spremembi prevalence sevov, ki proizvajajo binarni toksin CDT. V začetnih raziskavah je bila pogostost sevov, ki delajo CDT pri ljudeh veliko nižja v primerjavi z živalskimi sevi, v zadnjih letih pa se je število CDT pozitivnih sevov, izoliranih iz ljudi močno povišalo, predvsem pri ljudeh z izvenbolnišničnimi okužbami (Spigaglia in Mastrantonio, 2004; Terhes in sod., 2004; Rupnik, 2007a). Izolacija *C. difficile* iz mesa, pa kaže, da je ena izmed možnih poti okužbe tudi preko uživanja okuženega mesa (Rodriguez-Palacios in sod., 2007).

Število okužb s *C. difficile* in tudi število težkih primerov bolezni naraščata v številnih državah (ZDA, Kanada, Nizozemska, Belgija, Velika Britanija, Francija) (Barbut in sod., 2007). V Angliji zaradi okužbe s *C. difficile* umre dvakrat več bolnikov kot zaradi okužbe



z MRSA (proti meticilinu odporno bakterijo *Staphylococcus aureus*). Število smrtnih primerov se je v Angliji, od leta 1999 do leta 2004, povečalo kar za 2,3 krat (Kuijper in sod., 2006).

Vpliv okužb s *C. difficile* na javno zdravstvo je velik. Bolnike je potrebno zdraviti zaradi primarne bolezni in dodatno še zaradi okužbe s *C. difficile*. Potrebna je tudi osamitev bolnika, ostrejši higieniški ukrepi, ter dekontaminacija okolja v katerem je tak bolnik prebival. Taki bolniki ponavadi v bolnišnici preživijo 1 – 3 dodatne tedne, kar poveča tudi stroške zdravljenja. Izračunali so, da naj bi povprečni stroški zdravljenja bolnikov s CDAD v Evropski Uniji znašali okrog 3 milijarde evrov na leto. Ti stroški naj bi se s staranjem prebivalstva ter večanjem deleža ljudi starih, nad 65 let, le še poviševali (Kuijper in sod., 2006).

### **2.7.2 *C. difficile* pri živalih**

*C. difficile* so izolirali iz fecesa številnih živali, kot so hrčki (Chang in sod., 1978), podgane (Czuprynski in sod., 1983), miši (Onderdonk in sod., 1980), zajci (Dabard in sod., 1979), prašiči (Songer in Uzal, 2005; Yaeger in sod., 2002), konji (Madewell in sod., 1995; Jones in sod., 1987), telički (Rodriguez-Palacios in sod., 2006), mačke, psi (Madewell in sod., 1999; Boriello in sod., 1983), piščanci (Simango, 2006) in tudi sloni (Bojesen in sod., 2006).

Enako kot pri ljudeh, tudi pri živalih *C. difficile* povzroča širok spekter bolezni, od asimptomatične okužbe do postantibiotske driske in enterokolitisa ter posledično tudi smrti. Porušenje normalne črevesne flore z antibiotiki in imunosupresivnimi zdravili omogoči kolonizacijo *C. difficile* (Brazier, 1998; Boriello in sod., 1983; Chang in sod., 1978; Bojesen in sod., 2006). *C. difficile* je glavni povzročitelj enteritisa pri neonatalnih prašičkih. Točnih podatkov o incidenci in prevalenci CDAD med prašički še ni, vendar je v ZDA *C. difficile* najpogosteje izoliran povzročitelj enteritisa pri novorojenih prašičkih (Songer in Anderson., 2006).

Različne živali se uporabljajo tudi za študije okužb s *C. difficile*. Največ in vivo poskusov je bilo opravljenih na hrčkih. Nekaj študij je bilo opravljenih tudi na akseničnih miškah in podganah. Nobena od teh pa ni tako občutljiva na okužbo kot hrčki (Onderdonk in sod.,

1980; Czuprynski in sod., 1983; Lyrey in sod., 1988). Pri hrčkih so pokazali, da novorojeni hrčki, kolonizirani s *C. difficile* ne zbolijo, odrasle živali pa so za okužbo zelo dovzetne (Rolfé in Iaconis, 1983; Lyrey in sod., 1988).

### 2.7.3 Podatki za Slovenijo

Ker v Sloveniji javljanje okužb z bakterijo *C. difficile* ni obvezno, točnih podatkov o obolevnosti in smrtnosti zaradi *C. difficile* nimamo. Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je bilo leta 2002 v Sloveniji prijavljenih 33 primerov enterokolitisa povzročena s *C. difficile*, leta 2003 17 primerov in leta 2004 17 primerov pri čemer je ena oseba tudi umrla (Epidemiološko spremljanje... 2002; Epidemiološko spremljanje...2003; Epidemiološko spremljanje... 2004).

Čeprav za CDAD zbolijo predvsem starejši ljudje, so v Sloveniji na Infekcijski kliniki, med letoma 2006 in 2007 obravnavali 8 primerov, ko so zboleli otroci stari med 3 meseci in 13 leti. V treh primerih so otroci potrebovali oskrbo na intenzivni negi, pri enem je bila potrebna tudi odstranitev dela debelega črevesja, preostalih šest bolnikov pa je bilo potrebno zdraviti z metronidazolom in/ali vankomicinom (Radsel in sod., 2007).

Po podatkih Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, kjer so v letih od 2004 do 2006 na leto testirali med 250 in 300 vzorcev blata, ni zaznati občutnega povečanja testiranih vzorcev, niti povečanja števila *C. difficile* pozitivnih vzorcev, ki se letno giblje med 34 in 45 vzorcev. Molekularna opredelitev vzorcev, izoliranih v času od junija 2006 do marca 2007 je pokazala, da prevladujejo sevi toksinotipa 0, med variantnimi sevi pa sevi tipa IV, V in XII. Niso pa še potrdili nobenega izmed dveh prevladujočih tipov, ki sta trenutno povezana z izbruhi: III/BI/NAP1/027 in toksinotip VIII (A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>-</sup>). V mariborski regiji tudi ni zaznati povišanega števila izvenbolnišničnih okužb, saj so večino sevov izolirali pri bolnikih s klasičnimi dejavniki tveganja (Rupnik, 2007b).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Proučevani sevi bakterije *Clostridium difficile*

Uporabljeni sevi *C. difficile* izvirajo iz zbirke sevov Oddelka za raziskovalno dejavnost, Centra za mikrobiologijo, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Zbirka vključuje seve *C. difficile* iz različnih geografskih območij ter iz različnih drugih svetovnih zbirk. V raziskavo smo vključili samo seve, ki pripadajo toksinotipu III, V in VIII, ker so prav ti najpogosteje izolirani variantni sevi iz blata bolnikov s CDAD (Barbut in sod., 2007). Sevi toksinotipa V pa so tudi najpogostejši variantni sevi, izolirani iz blata živali (Keel in sod., 2007). V raziskavo smo tako vključili 20 sevov toksinotipa III, 17 sevov toksinotipa VIII in 10 sevov toksinotipa V. Od 10 sevov toksinotipa V, so štirje sevi izolirani iz ljudi, preostalih šest pa je izoliranih iz novorojenih prašičkov iz dveh večjih farm v Sloveniji. Pregled sevov je podan v prilogi A.

##### 3.1.2 Sestava gojišč

<u>BHI (Brain Heart infusion broth)</u>		<u>KA (Krvni agar)</u>	
»Brain infusion solids«	12,5 g/L	Pepton	15,0 g/L
»Beef heart infusion solids«	5,0 g/L	Jetrni ekstrakt	2,5 g/L
Peptokompleks	10,0 g/L	Kvasni ekstrakt	5,0 g/L
Glukoza	2,0 g/L	Natrijev klorid	5,0 g/L
Natrijev klorid	5,0 g/L	Agar	13,0 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g/L	Defibrinirana ovčja kri	5 – 7 %
		pH 7,4 ± 0,1	

##### 3.1.3 Priprava pufrov in drugih raztopin

Pufre in raztopine smo pripravili tako, da smo suhe snovi zatehtali in jih prenesli v čašo s polovico končnega volumna destilirane vode. Ko so se vse sestavine raztopile, smo

raztopino prelili v merilni valj in dopolnili z vodo do ustreznega volumna. Če smo morali izmeriti pH, smo to storili, ko so bile vse sestavine raztopljene in preden smo dopolnili z vodo do ustreznega volumna.

#### Pufer TBE (5x)

Baza Tris (Roth) 54 g  
Borova kislina (Sigma) 27.5 g  
0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml  
Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1000 ml  
Hranimo pri 4 °C, pred uporabo smo pufer 10 x redčili z destilirano vodo.

#### Pufer TAE (50x)

Baza Tris (Roth) 121.0 g  
Acetat (Fluka) 51.1 ml  
0.5 M EDTA (pH 8.0) 50 ml  
Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 500 ml  
pH med 7.5 in 8.0  
Hranimo pri temperaturi 4 °C, pred uporabo smo pufer 50 x redčili z destilirano vodo.

#### Pufer TES

5 M NaCl 6.6 ml  
1.0 M Tris 2 ml  
dH<sub>2</sub>O 171,5 ml  
Steriliziramo z avtoklaviranjem pri 100 °C, 15 minut. Hranimo pri sobni temperaturi.

#### Pufer TE2

1,0 M Tris 5,0 ml  
0,5 M EDTA (pH 8,0) 2,0 ml  
dH<sub>2</sub>O do 500 ml  
Steriliziramo z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 minut. Hranimo pri sobni temperaturi.

#### Pufer TE0.5-S1

0.5 M EDTA (pH 8.0) 99,0 ml  
1.0 M Tris 1,0 ml  
SDS 1,0 g  
Steriliziramo s filtracijo. Hranimo pri sobni temperaturi. Pred uporabo pufer segrejemo na temperaturo 37 °C.

#### 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA (Sigma) 93,6 g  
dH<sub>2</sub>O do 500 ml  
Z 10 M NaOH uravnamo pH na 8.0.  
Hranimo pri sobni temperaturi.

#### Fiziološka raztopina

NaCl 8,5 g  
dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1000 ml.  
Steriliziramo z avtoklaviranjem.

<u>10 M NaOH</u>		<u>Proteinaza K (10 mg/ml)</u>	
NaOH	40,0 g	Proteinaza K (Sigma)	10 mg
dH <sub>2</sub> O do 100 ml		sterilna ddH <sub>2</sub> O	1,0 ml
		Hranimo pri -20 °C	
<u>Nanašalni pufer</u>		<u>Lizocim (20 mg/ml)</u>	
Bromfenol modro	25 µl	Lizocim (Sigma)	20 mg
Saharozna	4,0 g	sterilna ddH <sub>2</sub> O	1,0 ml
ddH <sub>2</sub> O	10,0 ml	Hranimo pri -20 °C	

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava suspenzije spor

Seve, ki so bili shranjeni pri -20 °C, smo cepili na plošče krvnega agarja. Po dvodnevni inkubaciji v anaerobni atmosferi pri 37 °C, smo kolonije z morfologijo tipično za *C. difficile* (ploščate, hrapave kolonije, sivkaste barve, brez hemolize, ki lahko tudi rojijo) precepili na plošče krvnega agarja in pri enakih pogojih inkubirali 2 do 4 dni.

Iz poraslih kultur, kjer ni bilo prisotnih kontaminant, smo pripravili spore tako, da smo kulturo s suhim brisom prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko z 900 µl sterilne destilirane vode. Po 5 minutnem centrifugiranju pri 10000 obratih/min (uporabljali smo centrifugo Eppendorf Mini spin plus in pripadajoči rotor F-45-12-11) smo odvzeli 600 µl supernatanta ter tako pripravljeno suspenzijo spor do nadaljnje uporabe hranili pri 4 °C.

### 3.2.2 Osamitev DNA

Osamitev DNA z uporabo kompleta za osamitev DNA »QIAamp® DNA Mini Kit« (Qiagen, Gmbh, Hilden, Nemčija), po navodilih proizvajalca za izolacijo genomske DNA po Gramu pozitivnih bakterij.

Po 10  $\mu$ l suspenzije spor smo nacepili na plošče krvnega agarja. Po dvodnevni inkubaciji v anaerobni atmosferi pri 37 °C, smo eno kolonijo precepili na ploščo krvnega agarja in inkubirali v anaerobni atmosferi pri 37 °C.

Po 24 urni inkubaciji smo s suhim brisom prenesli kulturo v 1,5 ml mikrocentrifugirko s 400  $\mu$ l fiziološke raztopine. Po 10 minutnem centrifugiranju pri 14500 obratih/minuto (uporabljali smo centrifugo Eppendorf Mini spin plus in pripadajoči rotor F-45-12-11) smo odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 180  $\mu$ l lizocima (20 mg/ml). Mešanico smo inkubirali 30 min pri temperaturi 37 °C.

Vzorcju smo dodali 20  $\mu$ l proteinaze K (priložena kompletu za osamitev DNA) in 200  $\mu$ l pufra AL (angl. Lysis Buffer), premešali na mešalu in inkubirali pri 56 °C 30 min.

Po inkubaciji smo vzorcju dodali 200  $\mu$ l etanola (96 - 100-odstotni) in dobro premešali na mešalu. Na kratko smo centrifugirali in lizat odpipetirali na kolono (QIAamp Spin Column), ki je priložena setu. Kolono, nameščeno v 2 ml zbiralno epruveto, smo centrifugirali 1 min pri 8000 obratih/min.

Zbiralno epruveto s filtratom smo zavrgli, kolono z vezano DNA pa prenesli v novo zbiralno epruveto. Dodali smo 500  $\mu$ l pufra AW1 (angl. Wash Buffer 1) in centrifugirali 1 min pri 8000 obratih/min.

Zbiralno epruveto s filtratom smo ponovno zavrgli in kolono prenesli v novo zbiralno epruveto. Dodali smo 500  $\mu$ l pufra AW2 (angl. Wash Buffer 2) in centrifugirali 3 min pri 14500 obratih/min. Zbiralno epruveto s filtratom smo zavrgli, kolono prenesli v novo zbiralno epruveto in centrifugirali 1 min pri 14500 obratih/min.

Filtrat in zbiralno epruveto smo ponovno zavrgli in kolono prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko.

DNA, vezano na silikagelsko membrano, smo iz kolone izprali tako, da smo dodali 200  $\mu$ l sterilne ddH<sub>2</sub>O, 1 minuto inkubirali pri sobni temperaturi nato pa centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/min.

Izolirano DNA v mikrocentrifugirki smo ustrezno označili in do nadaljnje obdelave hranili pri -20 °C.

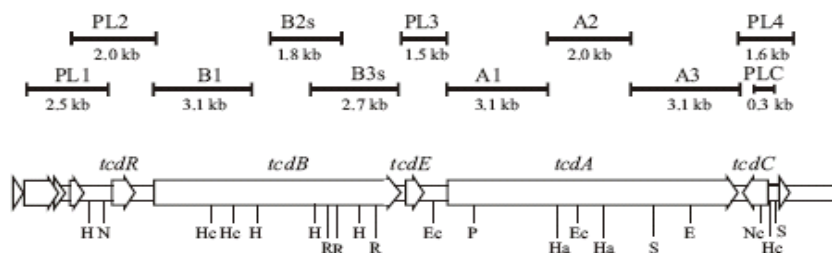
Osamitev grobega ekstrakta DNA s Chelexom. Bakterije smo gojili na enak način kot za osamitev DNA s kompletom za osamitev DNA.

V 1.5 ml mikrocentrifugirki smo zmešali 120 µl 5 % vodne raztopine »Chelex-100 Resin« (Bio-Rad, Kalifornija) in 1 µl zanko kulture. Suspenzijo smo premešali na mešalu in jo 10 minut inkubirali v vreli vodni kopeli. Po končani inkubaciji smo mešanico centrifugirali 10 min pri 12.000 obratih/min (centrifuga Eppendorf Mini spin plus in pripadajoči rotor F-45-12-11). Supernatant, v katerem se nahaja DNA, smo nato prenesli v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Tako pripravljeno DNA smo do uporabe hranili pri -20 °C, oziroma do največ 7 dni pri temperaturi 4 °C.

### **3.2.3 Toksinotipizacija**

Da so naši sevi res toksinotipa III, V in VIII, smo preverili tako, da smo pomnožili fragmenta B1 in A3 patogenega lokusa PaLoc. V nadaljevanju smo sevom toksinotipa III določili tudi podtip a, b, c ali d in sicer s pomnožitvijo in restrikcijsko analizo še dveh fragmentov gena *tcdB*, znotraj patogenega lokusa PaLoc B2s in B3s (slika 4). Pomnoženi fragment A3 smo rezali z restrikcijskim encimom *EcoRI*, fragment B1 pa z restrikcijskima encimoma *HincII* in *AccI*. Glede na dobljeni restrikcijski vzorec smo določili toksinotip tako, da smo dobljene vzorce primerjali z že znanimi vzorci (Rupnik, 2007c).

Pomnožena fragmenta B2s in B3s smo rezali z restrikcijskima encimoma *HindIII* in *RsaI*. Glede na dobljeni restrikcijski vzorec smo določili podtipe izbranim sevom toksinotipa III (Gerič, 2004).



Slika 4: Patogeni lokus PaLoc (Rupnik, 2007c)

### 3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo

Uporabljeni začetni oligonukleotidi, pogoji pomnoževanja in sestava reakcijske mešanice so opisani v preglednicah 1, 2, 3.

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (ZO).

Produkt PCR	Program PCR	Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje ZO	Vir
A3	2step47	A4N	5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3'	Rupnik in sod., 1997
		A3C	5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATAACAAG-3'	
B1	2step57	B1C	5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3'	Rupnik in sod., 1997
		B2N	5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'	
B2s	2step47	LJP4	5'-GCGCTGCAGTTCTTCACTAGTTGACATAAGAAT-3'	Gerič, 2004
		LJP7	5'-CGAGTCGACCAAGATGATTTAGTGATATCAGAA-3'	
B3s	2step47	LJP9	5'-CGCGTCGACTATATAGGATTCAATAGCGAATTA-3'	Gerič, 2004
		LJP16	5'-GCGCTGCAGCTATTCATAACTACTAATTGAGC-3'	

Preglednica 2: Pogoji pomnoževanja s PCR.

Program PCR	Začetna denaturacija	denaturacija	Prileganje in podaljševanje	Končno podaljševanje	Št. ciklov*
2step47	93 °C, 3 min	93 °C, 4 s	47 °C, 8 min	47 °C, 10 min	35
2step57	93 °C, 3 min	93 °C, 4 s	57 °C, 8 min	57 °C, 10 min	30

\* en cikel predstavlja denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.



Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za posamezne PCR.

	A3 100 µl (za dve reakcijski mešanici)	B1, B2s in B3s 100 µl (za dve reakcijski mešanici)
H <sub>2</sub> O	67 µl	77 µl
10x pufer PCR <sup>1</sup>	10 µl	10 µl
TMA (10 <sup>-3</sup> M)	10 µl	-
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 µl	2 µl
dNTP-ji (20mM mešanica)	4 µl	4 µl
P1 (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl
P2 (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl
Taq DNA-polimeraza (5U/µl)	0,25 µl	0,25 µl
DNA	3 µl »Chelex DNA« ali 1,5 µl čiste DNA <sup>2</sup>	3 µl »Chelex DNA« ali 1,5 µl čiste DNA <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sestava 10 x pufera PCR: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

<sup>2</sup> DNA izolirana z uporabo kompleta za izolacijo DNA.

Mešanico za PCR smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: ddH<sub>2</sub>O, pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-je, oba začetna oligonukleotida in nazadnje še DNA-polimerazo. Mešanico smo dobro premešali in po 46 µl odpipetirali v 200 µl mikrocentrifugirke ter dodali ustrezno količino DNA. Reakcija je potekala v cikličnem termostatu T3000 (Biometra, Nemčija).

### 3.2.3.2 Restrikcija pomnožkov PCR

Pomnožene fragmente smo rezali z ustreznimi restrikcijskimi encimi. Restrikcijaska mešanica (za encime *AccI*, *HincII*\*, *HindIII* in *RsaI*), za eno reakcijo, je vsebovala:

- 8 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl pufera »NEBuffer« (New England Biolabs)
- 0,2 µl restrikcijskega encima (New England Biolabs)
- 10 µl pridelka PCR.

\* za encim *HincII*, smo v restrikcijsko mešanico dodali tudi 0,2 µl BSA.

Za restrikcijo fragmenta A3 z encimom *EcoRI* pa je reakcijska mešanica vsebovala:

- 4 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl pufra »NEBuffer« (New England Biolabs)
- 0,2 µl restrikcijskega encima (New England Biolabs)
- 15 µl PCR pridelka.

Restrikcijsko mešanico smo inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C.

### 3.2.3.3 Gelska elektroforeza pomnožkov PCR.

Prisotnost pomnožkov PCR in velikost fragmentov, dobljenih po restrikciji smo dokazovali v 1 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili s pufrom 0,5 x TBE. Elektroforeza je tekla pri napetosti 120 V približno 45 minut. Po končani elektroforezi smo gel 10 minut barvali z raztopino etidijevega bromida v koncentraciji 0,2 µg/ml, nato pa 10 min razbarvali z destilirano vodo. Slike smo shranili v digitalni obliki z dokumentacijskim sistemom (Biometra).

### 3.2.4 PCR-ribotipizacija

Za pomnoževanje medgenskega prostora smo uporabili dva različna protokola. In sicer protokol, ki so ga opisali Stubbs in sod. (1999) in protokol, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999). Protokola se med seboj razlikujeta po uporabljenih začetnih oligonukleotidih, programu PCR in sestavi reakcijske mešanice.

#### 3.2.4.1 Optimizacija metode

Za optimizacijo metode smo uporabili referenčne seve toksinotipa III, in sicer SE844 (IIIa), R12078 (IIIb), in CH6230 (IIIc). DNA smo osamili s kompletom za osamitev DNA, »QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit« (Qiagen, Gmbh, Hilden, Nemčija).

Optimizacija metode je vključevala spreminjanje agaroze in pufru za pripravo agaroznega gela za ločevanje fragmentov. Uporabili smo dve vrsti agaroze in sicer, »Metaphor agarose« (FMC, Bioproducts) in »Certified™ Low Range ultra agarose« (Bio-Rad, Kalifornija) ter dva različna pufru 0,5 x TBE in 1 x TAE.

Spreminjali smo tudi koncentracijo ionov  $Mg^{2+}$  v reakcijski mešanici za PCR v kombinaciji s segrevanjem pomnožkov PCR pri 75 °C.

S spreminjanjem napetosti, pri kateri je tekla elektroforeza, smo poskušali doseči optimalno ločitev fragmentov.

Ko smo metodi optimizirali smo sevom toksinotipov III, V in VIII določili PCR- ribotipe. DNA vseh sevov toksinotipa III, smo osamili z uporabo kompleta za osamitev DNA, DNA sevov toksinotipov V in VIII pa smo osamili s Chelexom. Optimiziran protokol, ki smo ga uporabili za tipizacijo je podrobneje opisan v nadaljevanju.

#### 3.2.4.2 Pomnoževanje medgenskega prostora med 16S in 23S rDNA

Mešanico za PCR smo pripravili tako, da smo v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: ddH<sub>2</sub>O, pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-je, oba začetna oligonukleotida in DNA-polimerazo. Nato smo mešanico dobro premešali in ustrezno količino odpipetirali v 200 µl mikrocentrifugirke ter dodali DNA. Reakcija je potekala v cikličnem termostatu T3000 (Biometra, Nemčija).

Uporabljeni začetni oligonukleotidi in sestava reakcijskih mešanic so opisani v preglednicah 4, 5, 6.

Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.

Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje ZO (5'-3')	Mesto prileganja	Vir
RiboF	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	1482 – 1501 (16S rDNA)	Bidet in sod., 1999
RiboR	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	1 – 24 (23S rDNA)	Bidet in sod., 1999
Ribo1	CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG	1445 – 1466 (16S rDNA)	Stubbs in sod., 1999
Ribo2	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC	20 – 1 (23S rDNA)	Stubbs in sod., 1999

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice po protokolu, ki so ga opisali Stubbs in sod. (1999).

	1 x 100 µl
dd H <sub>2</sub> O	70,5 µl
10 x pufer PCR <sup>1</sup>	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP-ji (20 mM mešanica)	4 µl
P1 Ribo 1 (50 pmol/µl)	1 µl
P2 Ribo 2 (50 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA-polimeraza (5U/µl)	0,5 µl
DNA	3 µl čiste <sup>2</sup> + 7 µl ddH <sub>2</sub> O 10 µl »Chelex« DNA

<sup>1</sup> Sestava 10 x pufera PCR: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

<sup>2</sup> DNA, izolirana z uporabo kompleta za izolacijo DNA

#### Program PCR (Stubbs in sod., 1999)

94 °C	3 min	
<hr/>		
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	35 x
72 °C	2 min	
<hr/>		
72 °C	15 min	

Po končanem cikličnem pomnoževanju smo pomnožke PCR še segrevali pri 75 °C, 105 minut. Pokrov bloka na cikličnem termostatu in pokrovčke mikrocentrifugirk smo pustili odprte.

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999).

	1 x 50 µl
dd H <sub>2</sub> O	37,0 µl
10 x pufer PCR <sup>1</sup>	5,0 µl
dNTP-ji (20 mM mešanica)	2,0 µl
P1 Ribo F (50 pmol/µl)	1,0 µl
P2 Ribo R (50 pmol/µl)	1,0 µl
Taq DNA-polimeraza (5U/µl)	0,25 µl
DNA	3 µl čiste <sup>2</sup> DNA 5 µl »Chelex« DNA

<sup>1</sup> Sestava 10 x pufera PCR: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

<sup>2</sup> DNA, izolirana z uporabo kompleta za izolacijo DNA

#### Program PCR (Bidet in sod., 1999)

94 °C	5 min	
<hr/>		
94 °C	1 min	
57 °C	1 min	35 x
72 °C	2 min	
<hr/>		
72 °C	10 min	

Po končanem cikličnem pomnoževanju smo pomnožke PCR še segrevali pri 75 °C, 45 minut. Pokrov bloka na cikličnem termostatu in pokrovčke mikrocentrifugirk smo pustili odprte.

#### 3.2.4.3 Gelska elektroforeza pomnožkov PCR

Za ločevanje pomnožkov PCR smo si pripravili 3-odstotni agarozni gel tako, da smo zmešali 3,0 g agaroze (Certified™ Low range Ultra Agarose, Bio-Rad, Kalifornija ali Metaphor agarose, FMC Bioproducts) in 100 ml hladnega pufra 1 x TAE. Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici, z občasnim nežnim mešanjem na magnetnem mešalu. Po segrevanju smo gel počasi ohladili v vroči vodni kopeli do približno 55-60 °C, ga nato vlili v plastični nosilec, vstavili glavniček in počakali, da se strdi. Gel smo z nosilcem prenesli v elektroforezno banjico (Bio-Rad, Kalifornija), odstranili glavniček in gel prelili s hladnim pufrom 1 x TAE. V vdolbinice gela smo vnesli 20 µl pomnožka PCR in 7 µl nanašalnega pufra. V prvo in nato vsako šesto vdolbinico smo vnesli standardno DNA lestvico 100-bp (Biotools). Elektroforeza je tekla pri napetosti 80 V (2,5 V/cm), 5 ur.

Po končani elektroforezi smo gel z DNA 15 minut barvali z raztopino etidijevega bromida v koncentraciji 0,2 µg/ml, nato pa 20 min razbarvali z destilirano vodo. Sliko smo shranili v digitalni obliki z dokumentacijskim sistemom (Biometra).

#### 3.2.4.4 Analiza rezultatov

Vzorke fragmentov, ki smo jih dobili s PCR-ribotipizacijo smo analizirali ročno. Dva seva smo uvrstili v isti PCR-ribotip, če sta imela identičen vzorec fragmentov in v dva različna tipa, če sta se razlikovala v vsaj enem fragmentu.

### **3.2.5 Pulzna gelska elektroforeza**

#### **3.2.5.1 Optimizacija metode**

Pri pripravi agaroznih blokcev, v katerih je potekala osamitev in restrikcija genomske DNA, smo spreminjali: odstotek gela za pripravo blokcev (1 %, 1,5 % in 2 %), vrsto agaroze (LMA ali Pulsed Field Certified™ Agarose, Bio-Rad, Kalifornija) in topilo v katerem smo pripravili agarozne blokce (sterilna bidestilirana voda ali pufer TE2).

Spreminjali smo tudi koncentracijo bakterijske suspenzije, ki smo jo uporabili za pripravo blokcev in program za ločevanje makrorestrikcijskih fragmentov.

Optimiziran protokol, ki smo ga uporabili za tipizacijo, je podrobneje opisan v nadaljevanju.

#### **3.2.5.2 Osamitev genomske DNA v agaroznih blokcih**

Po 10 µl suspenzije spor smo nacepili na plošče KA. Po dvodnevni inkubaciji v anaerobni atmosferi pri 37 °C, smo tri srednje velike kolonije cepili v 5 ml tekočega gojišča BHI (Brain heart infusion) in inkubirali preko noči v anaerobni atmosferi pri temperaturi 37 °C. Gojišče BHI smo pred inokulacijo 10 minut inkubirali v vreli vodi in ga nato ohladili na približno 37 °C.

Naslednji dan smo 0,1 ml prekonočne kulture precepili v 5 ml tekočega gojišča BHI (ki smo ga čez noč inkubirali v anaerobni atmosferi pri 37 °C) in inkubirali 5 ur v anaerobni atmosferi pri 37 °C.

##### **3.2.5.2.1 Določanje koncentracije bakterij**

Po 5 urah gojenja smo najprej ocenili koncentracijo bakterij tako, da smo 200 µl kulture odpipetirali v vdolbinice mikrotitrne plošče ter izmerili optično gostoto (O.D.) pri 620

nm. Delali smo v treh ponovitvah in nato izračunali povprečne vrednosti. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili koncentracijo bakterij.

### 3.2.5.2.2 Priprava agaroznih blokcev

V 1,5 ml mikrocentrifugirke smo prenesli 1,5 ml kulture, ter centrifugirali 10 min pri 12000 obratih/min (uporabljali smo centrifugo Eppendorf Mini spin plus in pripadajoči rotor F-45-12-11). Supernatant smo odstranili s pipeto ter v isto mikrocentrifugirko ponovno odpipetirali 1,5 ml kulture. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 12000 obratih/min. Supernatant smo odstranili s pipeto in bakterije sprali s 500 µl pufru TES. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 12000 obratih/min, odstranili supernatant in nato bakterije resuspendirali v izračunanem volumnu pufru TES tako, da smo pripravili suspenzijo celic v koncentraciji  $1 \times 10^9$  celic/ml.

Suspenzijo celic smo zmešali z enakim volumenom 1,5-odstotnega agaroznega gela (Pulsed Field Certified™ Agarose, Bio-Rad v pufru TE2), ohlajenega na 60 °C.

Po 150 µl tako pripravljene suspenzije celic smo nato odpipetirali v modelček za pripravo blokcev in pustili 20 minut pri 4 °C, da so se strdili.

Blokce smo, s pomočjo spatule, prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke v katere smo odpipetirali 990 µl pufru TE 0.5-SI in 10 µl proteinaze K (10 mg/ml) in inkubirali preko noči pri 37 °C.

Naslednji dan smo odstranili pufer s proteinazo K in blokce šest krat sprali z 1 ml pufru TE2. Blokce smo v pufru TE2 inkubirali 30 min pri temperaturi 37 °C.

### 3.2.5.3 Restrikcija genske DNA v agaroznih blokcih

Po spiranju smo blokec s pomočjo spatule prenesli na parafilm in s skalpelom odrezali približno 4 x 4 mm velik košček, ki smo ga prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko, v kateri smo imeli pripravljeno mešanico 108 µl ddH<sub>2</sub>O in 12 µl pufru »NEBuffer 4« (New England Biolabs) in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo mešanico pufra in vode zamenjali z restrikcijsko mešanico.

Restrikcijska mešanica za en vzorec je vsebovala:

- 107,25 µl ddH<sub>2</sub>O
- 12 µl pufra »NEBuffer 4« (New England Biolabs)
- 0,75 µl restrikcijskega encima *Sma*I (20.000U/ml, New England Biolabs)

Blokce smo v restrikcijski mešanici inkubirali preko noči na sobni temperaturi.

#### 3.2.5.4 Gelska elektroforeza

Makrorestrikcijske fragmente smo ločili v 1-odstotnem agaroznem gelu (Pulsed field Certified™ Agarose, Bio-Rad, Kalifornija), ki smo ga pripravili s pufrom 0,25 x TBE in uporabo sistema PFGE (Biometra - Pulsed Field Gel Electrophoresis system).

Blokce smo nanесли na glavniček in vsakega zalili s kapljico 1-odstotnega agaroznega gela (enak gel kot za ločevanje fragmentov).

Gel smo pripravili tako, da smo zatehtali 3 g agaroze v 300 ml pufra 0,25 x TBE in segrevali (z občasnim mešanjem na magnetnem mešalu) v mikrovalovni pečici. Ko je bila vsa agarozna raztopljena, smo gel v vroči vodni kopeli počasi ohladili na približno 55 – 60 °C ter ga vlili v plastični okvir za vlivanje gela, kamor smo že prej postavili glavniček z našimi vzorci. Iz strjenega gela smo previdno odstranili glavniček in plastični okvir, nastale vdolbinice pa zalili z 1-odstotnim agaroznim gelom. S skalpelom smo nato še previdno obrezali dvignjene robove gela, ki so (zaradi adhezije) nastali med odstranjevanjem okvirja in glavnička. S tem smo omogočili neovirano kroženje pufra med samo elektroforezo.

V elektroforezno komoro smo nalili 2,4 litre pufra 0,25 x TBE ter počakali, da se je ohladil na izbrano temperaturo, pri kateri je tekla elektroforeza (13 °C). Nosilec z gelom smo vstavili v elektroforezno banjico, počakali, da se je temperatura gela izenačila s temperaturo pufra, ter zagnali elektroforezo.

Elektroforeza je tekla 24 ur s programom za ločevanje fragmentov velikosti od 2 do 800 kbp.



Po končani elektroforezi smo gel 20 minut barvali z raztopino etidijevega bromida v koncentraciji 0,2 µg/ml, nato pa 30 minut razbarvali z destilirano vodo. Sliko smo shranili v digitalni obliki z dokumentacijskim sistemom (Biometra).

#### 3.2.5.5 Analiza rezultatov

Vzorci fragmentov, ki smo jih dobili s pulzno gelsko elektroforezo, smo analizirali ročno. Če sta imela dva seva identičen vzorec fragmentov, smo ju uvrstili v isti pulсотip. Če sta se dva seva razlikovala v 2-3 fragmentih smo, ju uvrstili v isti pulсотip vendar različna podtipa, če pa sta se razlikovala v 4 ali več fragmentih, pa smo taka seva uvrstili v dva različna pulсотipa.

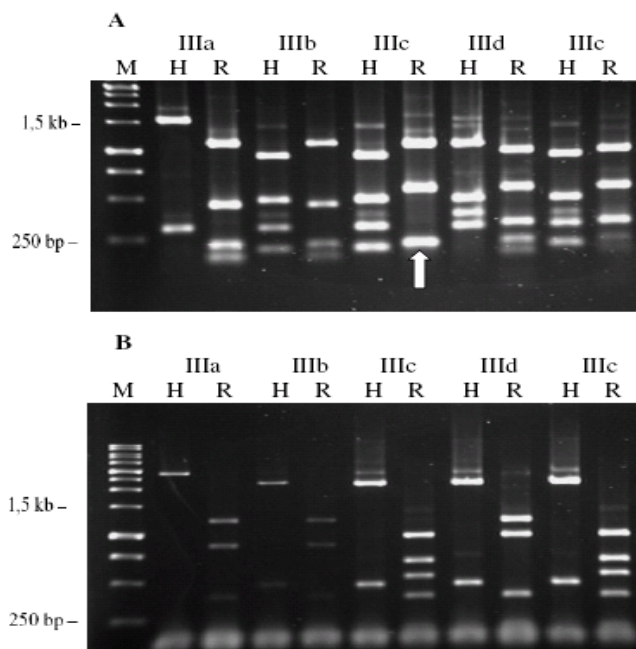
## 4 REZULTATI

### 4.1 POTRDITEV TOKSINOTIPOV IN DOLOČITEV PODTIPOV SEVOV TOKSINOTIPA III.

Za potrditev toksinotipa sevov, ki smo jih vključili v študijo, smo pomnožili dva fragmenta toksinskega lokusa PaLoc: B1 in A3. Po restrikciji pomnožkov PCR in gelski elektroforezi smo s pomočjo že znanih restrikcijskih vzorcev določili toksinotip.

Pri vseh izbranih sevih smo potrdili toksinotip. V preglednici 7 in prilogi A je prikazano število sevov posameznega toksinotipa, ki smo jih vključili v študijo.

V nadaljevanju smo sevom toksinotipa III določili tudi podtip, glede na restrikcijski vzorec fragmentov PCR, B1s in B2s. Seve smo razdelili v 4 podtipe. Trije od teh so bili opisani že prej, in sicer IIIa, IIIb in IIIc (Gerič, 2004), pri sevu 3073 pa smo po restrikciji fragmentov B2s in B3s dobili restrikcijski vzorec, ki prej ni bil opisan. Sevu 3073 smo tako določili podtip IIId (slika 5).



Slika 5: Restrikcijski vzorci fragmentov PCR B2s (A) in B3s (B) pri posameznih podtipih toksinotipa III bakterije *C. difficile*. H – *Hind*III, R – *Rsa*I, M – standardna DNA-lestevica 1 kb (Biotools). S puščico je označen fragment, ki se pri sevu IIIc ne ujema s prej opisanim vzorcem.

Pri tipskem sevu toksinotipa IIIc (sev CH6230) se vzorec, ki smo ga dobili po restrikciji fragmenta B2s, ni ujema s prej opisanim restrikcijskim vzorcem (Gerič, 2004). Na sliki 5 je s puščico označen fragment, ki se ne ujema. Sev smo označili kot IIIc-1. Večina sevov toksinotipa III je pripadala podtipu IIIb (n=16), en sev je pripadal tipu IIIa, en sev IIIc, en sev IIIc-1 in en sev IIId.

Preglednica 7: Število sevov posameznega toksinotipa *C. difficile*, vključenih v študijo

Toksintip	Število sevov
IIIa	1
IIIb	16
IIIc	1
IIIc-1	1
III d	1
V	10
VIII	17

## 4.2 OPTIMIZACIJA TIPIZACIJSKIH METOD

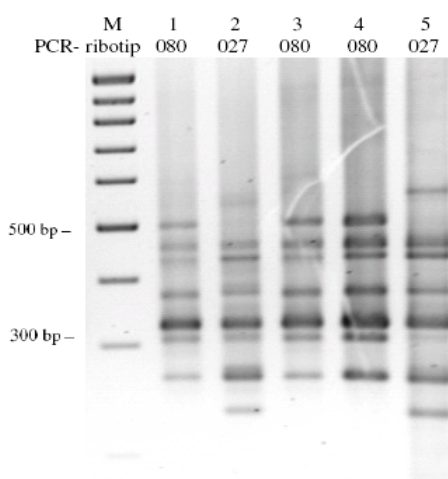
### 4.2.1 Optimizacija PCR-ribotipizacije

Ker z rezultati PCR-ribotipizacije, ki smo jo izvedli po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod, (1999) nismo bili zadovoljni, smo metodo najprej optimizirali. Postopek optimizacije metode je podrobneje opisan v poglavju 3.2.4.

Na sliki 6 so prikazani rezultati PCR-ribotipizacije, ki smo jih dobili s kombiniranjem različnih koncentracij  $Mg^{2+}$  v reakcijski mešanici in segrevanjem pomnožkov PCR pri 75 °C. Gel smo pripravili iz agaroze »Certified™ Low range ultra agarose« (Bio-Rad, Kalifornija).

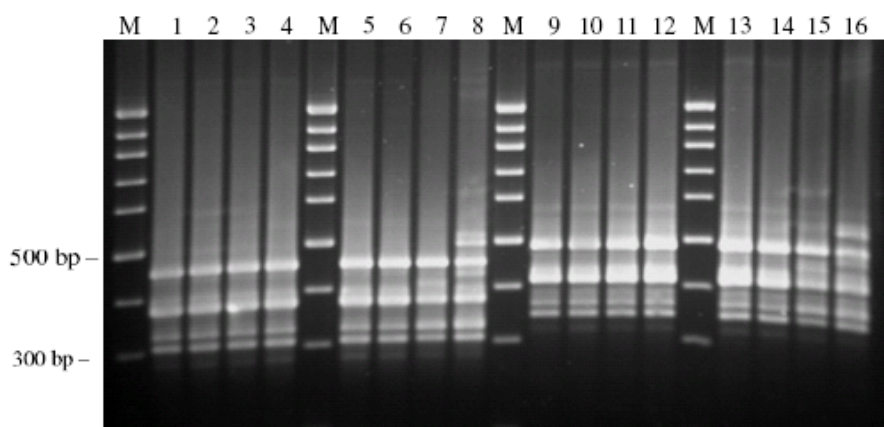
Naši rezultati so primerljivi z objavljenimi, tako po število fragmentov, ki smo jih dobili, kot tudi po velikosti posameznih fragmentov.

Posamezni PCR-ribotipi so kazali od 5 do 8 fragmentov, velikosti od 200 do 600 bp.



Slika 6: Rezultati optimizacije PCR-ribotipizacije. Progi 1, 2 – [Mg<sup>2+</sup>] = 1,5 mM; proga 3 – [Mg<sup>2+</sup>] = 2,0 mM, progi 4 in 5 – [Mg<sup>2+</sup>] = 1,5 mM + segrevanje pri 75 °C. M – standardna DNA-lestvica 100 bp (Biotools).

Najbolj ostre in jasno ločene fragmente smo dobili z 1,5 mM koncentracijo Mg<sup>2+</sup> v reakcijski mešanici ter segrevanjem pomnožkov PCR pri 75 °C (slika 6). S kombinacijo nižje koncentracije Mg<sup>2+</sup> brez segrevanja ali višje koncentracije Mg<sup>2+</sup> (2,0 mM oziroma 2,25 mM) s segrevanjem pomnožkov PCR, nismo dobili lepih rezultatov (ni prikazano).

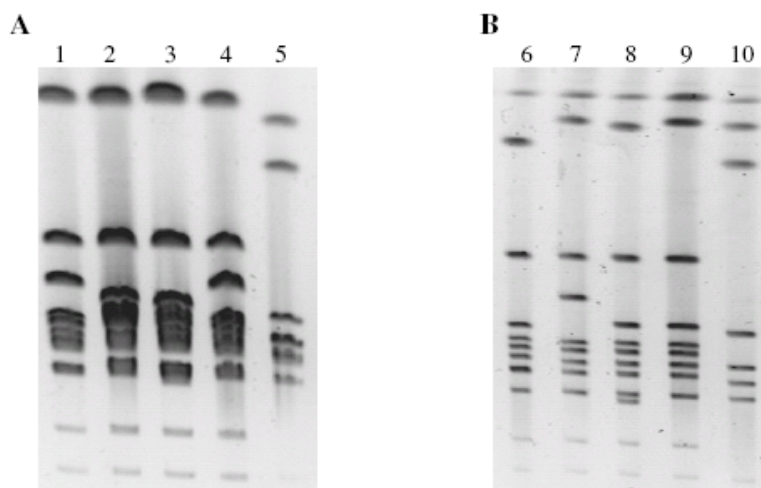


Slika 7: Primerjava rezultatov dveh metod PCR - ribotipizacije. Proge 1 – 8 PCR-ribotipizacija po Bidetu; Proge 9 – 16 (isti sevi *C. difficile* kot na progah 1-8) PCR-ribotipizacija po Stubbsu. M – standardna DNA-lestvica 100 bp (Biotools).

Pri metodi, ki so jo opisali Stubbs in sod. (1999) metode verižne reakcije nismo spreminjali, zamenjali smo samo agarozo za pripravo gela za ločevanje pomnožkov PCR. Rezultati so primerljivi v obeh agarozah, vendar je agarosa Metaphor bolj zahtevna za pripravo gela (slika 7).

#### 4.2.2 Optimizacija pulzne gelske elektroforeze

Tudi metodo pulzne gelske elektroforeze je bilo najprej potrebno optimizirati. Blokci pripravljene iz agaroze LMA (Low melting point) so bili zelo občutljivi na zunanje dražljaje in so se zelo hitro poškodovali, ali pa so med postopki spiranja in rezanja celo razpadli. Za dobro ločitev fragmentov po restrikciji pa je pomembno, da so blokci, ki jih damo na gel, nepoškodovani. Za pripravo blokcev smo zato uporabili enako agarozo (Pulsed Field Certified™, Bio-Rad, Kalifornija) kot za pripravo gela. V nadaljevanju smo znižali tudi koncentracijo suspenzije bakterij, iz katere smo pripravili blokce (iz  $3 \times 10^9$  bakterij/ml na  $1 \times 10^9$  bakterij/ml). Rezultati PFGE pred in po optimizaciji so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Rezultati optimizacije pulzne gelske elektroforeze (A) pred optimizacijo metode (B) po optimizaciji. Proge 1-5 - agarosa LMA in koncentracija bakterij  $3 \times 10^9$  bakterij/ml; Proge 6-10 - agarosa »Pulsed Field Certified™« (Bio-Rad, Kalifornija) in koncentracija bakterij  $1 \times 10^9$  bakterij/ml.

### 4.3 DOLOČITEV PCR-RIBOTIPA IN PULSOTIPA IZBRANIM SEVOM

Iz zbirke sevov Oddelka za raziskovalno dejavnost, Centra za Mikrobiologijo, ZZV Maribor, smo izbrali seve toksinotipov III, V in VIII. Del sevov je bil izbran iz potekajočih tipizacijskih študij, katerih osnovni namen je bil ugotoviti prisotnost PCR-ribotipa 027 ali primerjava človeških in živalskih izolatov, del sevov pa je iz že zaključenih študij. Vsakemu sevu smo z optimiziranimi metodama določili PCR-ribotip in pulsotip. Za vsak sev je podan izvor in, če je znana, tudi serološka skupina (priloga A).

#### 4.3.1 PCR-ribotipizacija

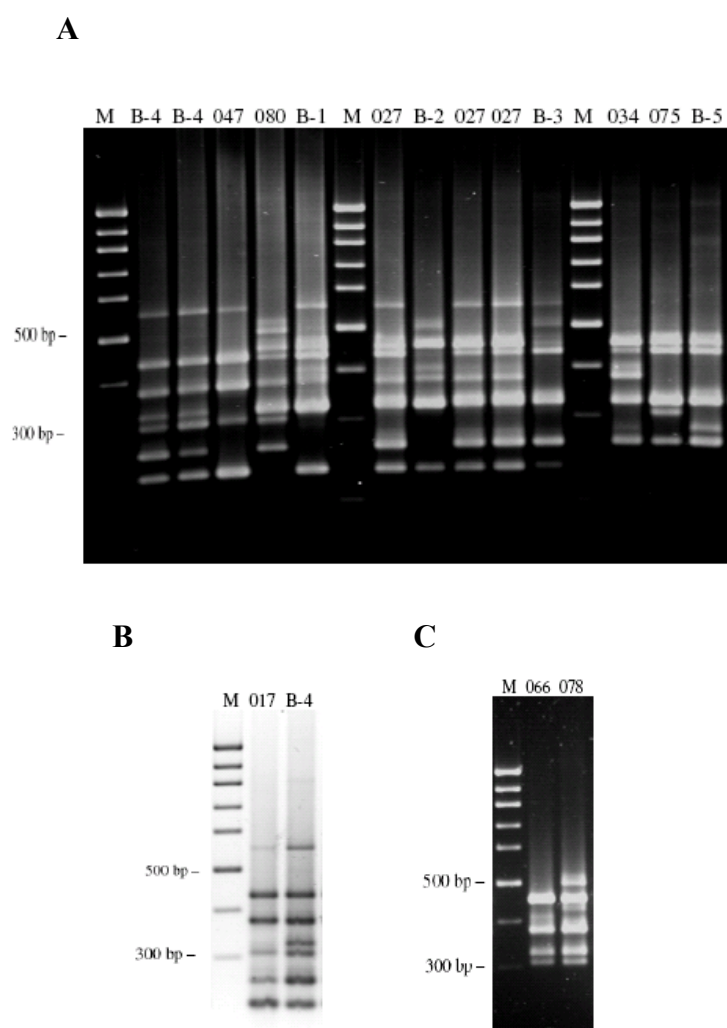
Za določitev PCR-ribotipa smo uporabili metodo, ki so jo opisali Bidet in sod. (1999).

PCR-ribotip smo določili vsem 47 sevom. Uvrstili smo jih v 13 različnih PCR-ribotipov. PCR-ribotipe, ki so označeni z arabskimi številkami (080, 027, 017, 047, 066, 034, 075 in 078), smo določili na podlagi primerjave s sevi z znanim PCR-ribotipom (v prilogi A so znani PCR-ribotipi napisani poudarjeno). V primeru, da se vzorec fragmentov pri sevu z neznanim PCR-ribotipom ni ujemal z nobenim od znanih, smo tak PCR-ribotip označili s svojo oznako (B-1 do B-5) (slika 9 in priloga A). Dva seva smo uvrstili v isti PCR-ribotip, če sta imela identičen vzorec fragmentov. Če se seva nista ujemala v vseh fragmentih smo ju uvrstili v različna PCR-ribotipa. Razdelitev PCR-ribotipov znotraj posameznega toksinotipa je predstavljena v preglednici 8.

Preglednica 8: Število različnih PCR-ribotipov znotraj posameznega toksinotipa bakterije *C. difficile*.

Toksinotip	Število različnih PCR-ribotipov (število sevov)	PCR-ribotipi (število sevov posameznega tipa)
IIIa	1 (1)	080
IIIb	4 (16)	027 (12), 034 (1), 075 (2), B-5(1)
IIIc-1	1 (1)	B-1
IIIc	1 (1)	B-3
IIIId	1 (1)	B-2
V	2 (10)	066 (8), 078 (2)
VIII	3 (17)	017 (11), 047 (1), B-4 (5)

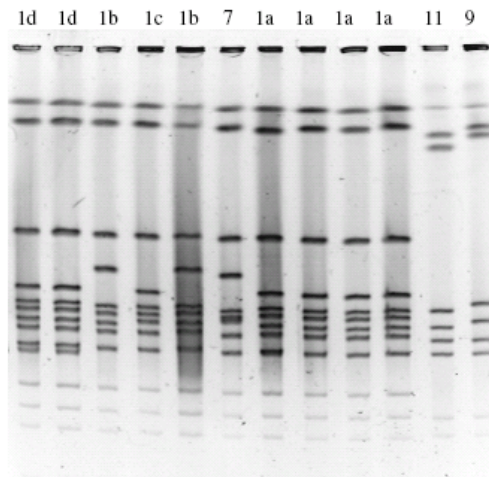
Največ različnih PCR-ribotipov (n=8) najdemo pri sevih toksinotipa III, sledijo sevi toksinotipa VIII (n=3) in V (n=2). Pri podtipih toksinotipa III, pa je največ različnih PCR-ribotipov znotraj IIIb (n=4). Med štirimi različnimi PCR-ribotipi, ki jih najdemo znotraj IIIb, s 75 % (12/16) prevladuje tip 027, pri toksinotipu VIII s 65 % tip 017 (11/17), pri toksinotipu V pa večina sevov, 80 % (8/10) spada v PCR-ribotip 066. Ta porazdelitev je bila odvisna od izbora sevov, ki je vključevala veliko geografsko različnih izolatov tipa 027.



Slika 9: PCR-ribotipi, ki jih najdemo pri sevih toksinotipa III (A) (z izjemo B-4 in 047, ki sta značilna za toksinotip VIII), toksinotipa VIII (B) in toksinotipa V (C). M – standardna DNA-lestvica 100 bp (Biotools).

### 4.3.2 Pulzna gelska elektroforeza

Z metodo PFGE smo določili pulstipe 46 sevom. Vzorce fragmentov smo podrobno analizirali in jih primerjali po merilih, ki jih je objavil Tenover s sodelavci leta 1995. V isti tip smo uvrstili seve z identičnim makrorestriksijskim vzorcem. Seve, ki so se razlikovali v 2-3 fragmentih smo označili kot podtipe glavnega tipa in seve, ki so se razlikovali v 4 ali več fragmentih smo uvrstili v drugi pulstip (slika 10) (Tenover in sod., 1995).



Slika 10: Nekateri od pulstipov, v katere smo uvrstili izbrane seve *C. difficile*.

Seve smo uvrstili v 19 različnih pulstipov. Seve, ki so pripadali pulstipu 1, pa smo uvrstili še v 4 podtipe (1a, 1b, 1c, 1d).

Največ sevov toksinotipa IIIb je spadalo v pulstip 1 (n=11) in podtip 1a (n=4) (preglednica 9).

Sevom toksinotipa V smo določili 3 in sevom toksinotipa VIII 6 različnih pulstipov. Pri enem sevu toksinotipa V (233flor) pulstipa nismo določali. V preglednici 9 so predstavljeni pulstipi in število različnih pulstipov znotraj posameznega toksinotipa.



Preglednica 9: Število različnih pulсотipov znotraj posameznega toksinotipa bakterije *C. difficile*.

Toksinotip	Število različnih pulсотipov (število sevov*)	Pulсотip (število sevov posameznega tipa in podtipa)
IIIa	1 (1)	3
IIIb	6 (16)	1a (4), 1b (3), 1c (1), 1d (3), 15 (1), 4 (1), 5 (1), 6 (1), 7 (1)
IIIc-1	1(1)	2
IIIc	1(1)	19
III d	1 (1)	8
V	3 (9)	9 (2), 10 (6), 11 (1)
VIII	6 (17)	12 (3), 13 (3), 14 (8), 16 (1), 17 (1), 18 (1)

\*Število sevov določenega toksinotipa.

#### 4.4 PRIMERJAVA TOKSINOTIPIZACIJE, PCR-RIBOTIPIZACIJE IN PFGE

Tipi, ki smo jih določili z vsemi tremi metodami, se med seboj dokaj dobro ujemajo (preglednica 10). Seve toksinotipa III, smo s PCR-ribotipizacijo razdelili v 8, s PFGE pa v 10 različnih tipov (podtipi niso všteti). Vsi sevi (razen K1710/06), ki so spadali v PCR-ribotip 027, so imeli enak pulсотip 1.

Seve toksinotipa VIII, smo s PCR-ribotipizacijo uvrstili v 3 in s PFGE v 6 različnih tipov, seve toksinotipa V pa v 2 različna PCR-ribotipa in 3 različne pulсотipe.

Večina sevov z enakim pulсотipom ima tudi enak PCR-ribotip (preglednica 10 in priloga A).

Preglednica 10: Primerjava toksinotipizacije, PCR-ribotipizacije in PFGE

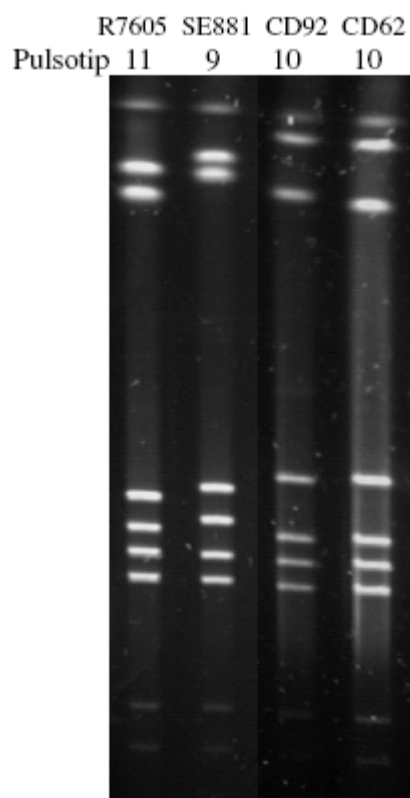
Toksinotip	PCR-ribotip	Pulсотip
III	080	3
	027	1 (1a-1d), 4
	034	5
	075	6, 7
	B-5	15
	B-3	19
	B-1	2
	B-2	8
VIII	017	14, 16, 13, 18
	B-4	12, 17, 14
	047	13
V	066	9, 10
	078	11

#### 4.5 AKTUALNI ŠTUDIJI

Obe metodi smo uporabili tudi za določitev PCR-ribotipa in pulsotipa v dveh študijah. V okviru študije humanih kliničnih izolatov (Goettingen, Nemčija), katere namen je bil določiti prevalenco variantnih sevov *C. difficile* izoliranih iz blata bolnikov iz različnih bolnišnic v Goettingenu, smo z metodo PCR-ribotipizacije želeli ugotoviti ali kateri od treh sevov toksinotipa III (3248/03, 3232/03 in 3012/03), pripada PCR-ribotipu 027. PCR-ribotip 027 smo pokazali pri dveh sevih (3248/03 (IIIb) in 3232/03 (IIIb)), ki sta bila izolirana iz istega bolnika, tretji sev (3012/03 (IIIc)) pa je pripadal tipu B-3. Pozneje smo oba seva tipa 027, uvrstili tudi v isti pulsotip 1a, tretji sev tipa B-3 pa v pulsotip 19.

Rezultati toksinotipizacije in PCR-ribotipizacije so bili v obliki posterja predstavljeni na drugem mednarodnem kongresu o bakteriji *C. difficile*, ki je potekal od 6 do 9 junija v Mariboru, Slovenija (2<sup>nd</sup> ICDS, Maribor, Slovenia) (Zimmermann in sod., 2007).

V drugi študiji smo šestim izolatom toksinotipa V, ki so bili izolirani iz blata novorojenih prašičkov dveh večjih prašičjih farm v Sloveniji, določili PCR-ribotip in pulsotip. Vzorce fragmentov prašičjih izolatov smo primerjali z vzorci štirih človeških sevov toksinotipa V (dva seva s PCR-ribotipom 066 in dva z 078). Pri vseh šestih prašičjih izolatih smo določili isti PCR-ribotip (066) in isti pulsotip (10). Dva seva PCR-ribotipa 066 (SE881 in SE866), izolirana iz človeka, pa sta imela drugačen pulsotip (9), kot šest prašičjih izolatov (slika 11).



Slika 11: Trije različni pulsotipi 11, 9 in 10, ki jih najdemo pri sevih toksinotipa V bakterije *C. difficile*. CD62 (V/066) in CD92 (V/066)-prašičja izolata, SE881 (V/066) in R7605 (V/078)- človeška izolata.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo primerjali dve molekularni metodi, PCR-ribotipizacijo in pulzno gelsko elektroforezo, ki sta trenutno najbolj razširjeni metodi za tipizacijo bakterije *C. difficile*. PCR-ribotipizacija je metoda, ki razdeli izolate v različne skupine na osnovi polimorfizma intergenske regije med genoma za 16S rRNA in in 23S rRNA (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999), pulzna gelska elektroforeza pa razdeli izolate na različne skupine na osnovi različnih vzorcev, ki jih dobimo z restrikcijsko analizo bakterijskega genoma.

Ker z rezultati PCR-ribotipizacije, ki smo jo izvedli po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999) nismo bili zadovoljni, smo metodo najprej optimizirali. Optimizacije smo se lotili korak za korakom.

Ker je bila agarozna »Metaphor« (FMC, Bioproducts), ki smo jo najprej uporabili za ločevanje pomnožkov PCR, zelo občutljiva na majhne spremembe pri pripravi gela smo uporabili drugo agarozo. Z agarozo »Certified™ low range ultra agarose« (Bio-Rad, Kalifornija), ki je prav tako kot agarozna »Metaphor«, primerna za ločevanje kratkih fragmentov DNA, smo dobili dobro ločene fragmente. Ker pa fragmenti še vedno niso bili dovolj ostri in se v nekaterih primerih ni dalo razbrati ali gre za en, dva ali celo več fragmentov, smo se odločili, da poskusimo s spremembo metode PCR. Spreminjali smo koncentracijo  $Mg^{2+}$  v kombinaciji s segrevanjem pomnožkov PCR pri 75 °C. Najboljša kombinacija je bila uporaba osnovnega protokola (brez dodajanja  $Mg^{2+}$ ) s segrevanjem pomnožkov PCR pri 75 °C.

S tako optimizirano metodo smo v nadaljevanju lahko določili PCR-ribotipe izbranim sevom.

Pri metodi, ki so jo opisali Stubbs in sod. (1999) smo zaradi lažje priprave spremenili samo agarozo za pripravo gela. Slabost na katero smo naleteli pri Stubbs-ovi metodi pa je, da je včasih potrebno PCR, zaradi neuspešnega pomnoževanja in/ali razgradnje pomnožkov PCR, ponoviti. Pri Bidet-ovi metodi na takšne težave nismo naleteli.

Pri manjšem številu sevov smo za določitev PCR-ribotipa uporabili obe metodi. Z obema metodama smo pri sevih z istim PCR-ribotipom dobili isti vzorec fragmentov. Razlike so bile samo v velikosti posameznih fragmentov, saj Bidet in sod. za pomnoževanje medgenskega prostora uporabijo začetne oligonukleotide, ki prilegajo bližje medgenskemu prostoru, kot začetni oligonukleotidi, ki ji uporabijo Stubbs in sod. (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999). Ali so samo različne velikosti posameznih fragmentov edina razlika med obema metodama ne moremo trditi, saj smo testirali premalo število sevov.

Pri optimizaciji metode PFGE smo najprej zamenjali agarozo iz katere smo pripravljali agarozne blokce, v katerih je potekala izolacija genomske DNA. Za pripravo blokcev smo uporabili enako agarozo, kot za pripravo gela za ločevanje makrorestripcijskih fragmentov. Tako pripravljene blokci so bili veliko bolj trpežni in se niso tako hitro poškodovali. Zmanjšali smo tudi koncentracijo suspenzije bakterij za pripravo blokcev. Ker so nekateri restripcijski fragmenti, po ločitvi s pulzno gelsko elektroforezo zelo blizu skupaj, je bilo v določenih primerih, zaradi prevelike količine DNA, težko razbrati ali gre za en ali dva fragmenta. Z znižanjem koncentracije bakterij smo dobili ostre in jasno ločene fragmente.

V prvih nekaj poskusih smo v prvo in zadnjo vdolbinico vnesli tudi standardno DNA-lestvico, 24-300 kb (MidRange Marker II, BioLabs, New England). Ker pa se fragmenti DNA niso lepo ločili, je v nadaljnjih poskusih nismo več uporabili. Zaradi tega je bila tudi interpretacija rezultatov težavnejša in manj zanesljiva. Pri sevih, ki so po makrorestripcijski analizi kazali zelo podoben vzorec fragmentov, na dveh različnih gelih, smo morali analizo ponoviti in take vzorce primerjati na istem gelu. Na tak način smo preverili ali so vzorci enaki ali pa pripadajo kateremu od podtipov.

Po optimizaciji obeh metod smo izbranim sevom določili PCR-ribotipe in pulstipe. Sevi, ki smo jih vključili v raziskavo, pripadajo toksinotipom III, V in VIII. Ti so po zadnji študiji, ki je potekala v Evropi, z namenom določiti trenutno prevalenco epidemičnega seva 027, določiti incidenco CDAD pri hospitaliziranih bolnikih in pridobiti pregled o fenotipskih in genotipskih lastnostih izolatov iz različnih bolnišnic in držav, najpogostejši variantni sevi, izolirani iz blata bolnikov (Barbut in sod., 2007). Sevi toksinotipa V pa so tudi najpogostejše izolirani variantni sevi iz blata novorojenih prašičkov (Keel, 2007). Za

seve toksinotipa V in III je značilno, da delajo oba toksina (TcdA in TcdB) ter binarni toksin CDT, sevi toksinotipa VIII pa delajo samo TcdB in ne tudi TcdA in CDT (Rupnik, 2007c).

Seve toksinotipa III, ki smo jih vključili v raziskavo, smo na podlagi variacij v fragmentih B2s in B3s razdelili na podtipe IIIa, IIIb, IIIc in IIId. Trije podtipi so bili opisani že prej (Gerič, 2004), tip IIId pa smo določili v tem delu pri sevu 3073.

Seve določenega toksinotipa pa lahko nadalje razlikujemo tudi z metodo PCR-ribotipizacije in pulzne gelske elektroforeze (Rupnik in sod., 2001, McDonald in sod., 2005).

Da se rezultati obeh metod (PCR-ribotipizacije in toksinotipizacije) zelo dobro ujemajo, je bilo pokazano že prej. Za seve toksinotipa III so značilni PCR-ribotipi 027, 080, 035 in 075, za seve toksinotipa VIII so značilni PCR-ribotipi 017, 047 in 110 ter za seve toksinotipa V PCR-ribotipa 078 in 066 (Rupnik in sod., 2001). V iste PCR-ribotipe in še pet novih (B-1 do B-5) smo uvrstili tudi izbrane seve. Pri sevih toksinotipa VIII nismo našli tipa tipa 110.

Izbrane seve toksinotipa III smo z metodo PCR-ribotipizacije razdelili na 8 različnih PCR-ribotipov, seve toksinotipa VIII na 3 in seve toksinotipa V na 2 različna PCR-ribotipa. PCR-ribotipi, ki smo jih našli pri določenem toksinotipu, nismo našli pri drugih dveh in obratno. Tudi pri podtipih toksinotipa III se PCR-ribotipi znotraj enega podtipa niso pojavljali pri ostalih.

V redkih primerih pa lahko isti PCR-ribotip najdemo pri dveh različnih toksinotipih. Primer je PCR-ribotip 066, ki ga najdemo pri sevih toksinotipov V in VI in tip 063, ki ga najdemo pri sevih toksinotipov VI, VII in IV (Rupnik in sod., 2001). Ker toksinotipe V, VI in VII med sabo ločimo na podlagi minimalnih razlik v regiji PaLoc, predvidevajo, da naj bi se sevi toksinotipov V, VI in VII razvili iz skupnega prednika. Ker s toksinotipizacijo razdelimo seve v različne skupine na podlagi razlik v toksinskih genih (Rupnik in sod., 1997), s PCR-ribotipizacijo pa na podlagi polimorfizma medgenskega prostora med genoma za 16S in 23S rRNA (Cartwright in sod., 1995), lahko razložimo pojavljanje istih PCR-ribotipov pri različnih toksinotipih s hitrejšo evolucijo, v tem primeru toksinskih

genov ali s horizontalnim prenosom toksinskih genov med različnimi sevi (Rupnik in sod., 2001).

Z metodo pulzne gelske elektroforeze smo seve toksinotipa III razdelili na 10, seve toksinotipa VIII na 6 in seve toksinotipa V na 3 različne pulsotipe. Pulsotipi, ki smo jih našli znotraj določenega toksinotipa, niso bili prisotni pri drugih. Prav tako smo našli pri podtipih toksinotipa III, pulsotipe značilne samo za določen podtip.

Metoda PFGE je bolj diskriminatorna kot PCR-ribotipizacija. Seve tipa 027 smo s PFGE razdelili na dva večja pulsotipa, 1 in 4 ter znotraj tipa 1 še na 4 podtipe (1a do 1d). Pri sevih toksinotipa VIII so sevi PCR-ribotipa 017 spadali v štiri različne pulsotipe in sevi tipa B-4 v tri različne pulsotipe. Večina sevov z enakim pulsotipom je imela tudi enak PCR-ribotip.

O dobrem ujemanju med obema metodama poročajo tudi Spigaglia in sod. (2001), od 92 testiranih izolatov, so se rezultati PCR-ribotipizacije in PFGE ujemali pri 77 (84 %). Do podobnih rezultatov pa so prišli tudi Bidet in sod. (2000). Od 99 testiranih izolatov, se samo v šestih primerih rezultati PCR-ribotipizacije in PFGE niso ujemali.

Tako z metodo PCR-ribotipizacije kot PFGE smo dva seva toksinotipa III, izolirana iz istega bolnika uvrstili v isti tip. Pri šestih izolatih iz novorojenih prašičkov in dveh nesorodnih sevih, izoliranih iz človeka, smo z metodo PCR-ribotipizacije določili enak PCR-ribotip, z metodo pulzne gelske elektroforeze pa smo ločili med prašičjimi in človeškimi izolati.

Da ima metoda pulzne gelske elektroforeze večjo moč razlikovanja kot PCR-ribotipizacija, je bilo pokazano v številnih objavah (Bidet in sod., 2000; Spigaglia in sod., 2001; Kato in sod., 2001). Tudi v zadnji študiji, v kateri so primerjali 7 različnih metod za tipizacijo bakterije *C. difficile* (MLVA, *slpA*-tipizacija, PFGE, AFLP, REA, PCR-ribotipizacija in MLST), so prišli do enakih zaključkov. PFGE ima v primerjavi s PCR-ribotipizacijo večjo moč razlikovanja, vendar manjšo v primerjavi z MLVA, REA in *slpA*-tipizacijo (Killgore in sod., 2007).

Odstotek sevov, ki smo jih z eno ali drugo metodo lahko tipizirali je bil 100 %. Številni avtorji so poročali, da se nekaterih sevov bakterije *C. difficile*, zaradi konstantne razgradnje DNA, ni dalo tipizirati. Največkrat je šlo za seve, ki pripadajo serološki skupini G in PCR-ribotipu 001 (van Dijck in sod., 1996; Rupnik in sod., 1998; Spigagli in sod., 2001; Kato in sod., 2001; Bidet in sod., 2000). Z razvojem novih protokolov pa so lahko tipizirali tudi te seve (Gal in sod., 2005; Corkill in sod., 2000). S PCR-ribotipizacijo pa so v vseh do sedaj objavljenih raziskavah uspešno tipizirali vse seve, ki so jih vključili v raziskavo (Bidet in sod., 1999; 2000; Stubbs in sod., 1999; Spigaglia in sod., 2001; Kato in sod., 2001).

Kljub večji moči razlikovanja, ki jo ima PFGE, pa je za tipizacijo bakterije *C. difficile* manj primerna. Za pravočasno ukrepanje v primeru epidemije potrebujemo kvalitetne tipizacijske metode, ki lahko hitro in zanesljivo razlikujejo med sorodnimi in nesorodnimi bakterijskimi izolati (van Belkum in sod., 2007). PFGE pa je metoda, ki je časovno zamudna, saj je čas, potreben za tipizacijo najmanj 5 dni.

Zato je PCR-ribotipizacija, kljub nekoliko slabši moči razlikovanja, boljša izbira za tipizacijo bakterije *C. difficile*. Čas, potreben za tipizacijo je krajši, prav tako pa ni težav z neuspešnostjo pri tipizaciji izolatov določenih skupin ali tipov. Prednost PCR-ribotipizacije je tudi nižja cena, predvsem kar se tiče opreme, potrebne za izvedbo metode.

Nekateri avtorji poročajo o težavnejši interpretaciji rezultatov PCR-ribotipizacije, zaradi majhnih razlik v velikosti fragmentov, in slabši ločitvi le teh z gelsko elektroforezo ter nestabilnosti posameznih fragmentov (Bidet in sod., 1999). V našem primeru pa zaradi manjšega vzorca izbranih sevov z znanim toksinotipom in pri nekaterih sevih tudi znanim PCR-ribotipom, ki smo jih lahko primerjali na istem gelu interpretacija rezultatov ni bila zahtevna. Interpretacija rezultatov PFGE pa je bila predvsem dolgotrajna, saj smo zaradi ročne primerjave vzorcev makrorestrikcijskih fragmentov, brez dodane standardne DNA-lestvice morali seve, ki so na dveh različnih gelih kazali podoben vzorec fragmentov še enkrat primerjati na istem gelu, za kar smo pa porabili še dva do tri dodatne dni.

PCR-ribotipizacija in PFGE sta trenutno najbolj razširjeni metodi za tipizacijo bakterije *C. difficile*. Obe metodi imata dobro ponovljivost rezultatov (Bidet in sod., 2000), slabost obeh pa je, da je rezultate težko primerjati med laboratoriji. PCR-ribotipizacijo uprabljajo



predvsem v evropskih državah, v referenčnem laboratoriju za PCR-ribotipizacijo bakterije *C. difficile*, Anaerobe Reference Laboratory, Univesity of Wales, Cardiff, Velika Britanija, uporabljajo metodo, ki so jo opisali Stubbs in sod. (1999). Trenutno je tam zbranih že več kot 200 različnih PCR-ribotipov (Kuijper in sod., 2006; Stubbs in sod., 1999). Metodo pulzne gelske elektroforeze pa uporabljajo predvsem v Kanadi in ZDA (Kuijper in sod., 2006). Metode z boljšo močjo razlikovanja, kot so slpA, REA, MLVA in druge metode, ki temeljijo predvsem na analizi nukleotidnega zaporedja, pa so se, z izjemo REA, šele začele razvijati.

Vsekakor pa sta, glede na trenutno stanje v Sloveniji, PCR-ribotipizacija in pulzna gelska elektroforeza, metodi z dovolj veliko diskriminatorno močjo, s katerima bo možno slediti izbruhom in pravočasno odkriti pojav hipervirulentnega seva (BI/NAP1/027), ki je trenutno povezan s povzročanjem epidemij v številnih državah po svetu, tudi pri nas.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo:

- Obe metodi, PCR-ribotipizacija in PFGE, sta primerni za tipizacijo bakterije *C. difficile*.
- PCR-ribotipizacija ima nižjo moč razlikovanja kot pulzna gelska elektroforeza.
- Interpretacija rezultatov PCR-ribotipizacije ni zahtevna, če vzorce fragmentov različnih sevov primerjamo na istem gelu.
- Pulzna gelska elektroforeza, je kljub boljši moči razlikovanja, manj primerna za tipizacijo bakterije *C. difficile*, saj je časovno zamudna in delovno zahtevnejša kot PCR-ribotipizacija.
- Rezultati, ki jih dobimo z metodami toksinotipizacije, PCR-ribotipizacije in pulzne gelske elektroforeze se med seboj dobro ujemajo.

## 6 POVZETEK

Bakterija *Clostridium difficile* je najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih infekcij. Povzroča od 10 do 25 % vseh primerov postantibiotičnih drisk in več kot 95 % primerov psevdomembranoznega kolitisa. V zadnjih letih narašča tudi število izvenbolnišničnih okužb in okužb v populaciji z nizkim tveganjem (mladi, brez predhodne antibiotične terapije), prav tako pa je vse več primerov okužb pri živalih. Te spremembe so lahko deloma posledica širjenja novega hipervirulentnega seva bakterije *C. difficile* BI/NAP1/027, drugačnega selekcijskega pritiska ali pojava novega rezervoarja.

Zaradi opisane epidemiologije je pomembno ugotavljanje istovetnosti sevov z različnimi tipizacijskimi metodami. Tako lahko potrdimo izbruhe, pot in pa vir širjenja okužbe. Za tipizacijo *C. difficile*, različni laboratoriji po svetu uporabljajo različne metode. Večina teh metod temelji na genotipskih značilnostih, le serotipizacija, ki je danes samo še deloma v uporabi, temelji na razlikovanju med različnimi izolati bakterije *C. difficile*, na osnovi razlik v površinskih antigenih. Najbolj razširjene tipizacijske metode so: pulzna gelska elektroforeza (PFGE), PCR-ribotipizacija in analiza restrikcijskih fragmentov (REA).

V diplomski nalogi smo primerjali dve tipizacijski metodi, PFGE in PCR-ribotipizacijo. Obe metodi smo najprej optimizirali in nato z njima določili tipe izbranim sevom toksinotipov III (n=20), V (n=10) in VIII (n=17), to so tudi najpogosteje izolirani variantni sevi iz blata bolnikov s CDAD (Barbut in sod., 2007). Z metodo toksinotipizacije smo najprej potrdili toksinotipe izbranih sevov, sevom toksinotipa III, pa smo določili tudi podtip (IIIa, IIIb, IIIc in IIId). Podtipi IIIa, IIIb in IIIc so bili opisani že prej (Gerič, 2004), podtip IIId pa smo pri sevu 3073 prvič opisali v tem delu.

Pulzna gelska elektroforeza ima večjo moč razlikovanja med nesorodnimi bakterijskimi izolati, saj smo s PFGE seve razdelili v 19 različnih tipov, s PCR-ribotipizacijo pa v 13 različnih tipov. Največjo variabilnost vidimo pri toksinotipu III, ki ga s PCR-ribotipizacijo razdelimo na 8, s PFGE pa na 10 različnih tipov. Seve toksinotipa VIII smo s PCR-

ribotipizacijo razdelili na 3 in s PFGE na 6 različnih tipov, seve toksinotipa V pa na dva različna PCR-ribotipa in 3 različne pulso tipe.

Obe metodi smo uporabili tudi za določitev PCR-ribotipa in pulso tipa v dveh študijah. V okviru študije humanih kliničnih izolatov (Goettingen, Nemčija), smo z metodo PCR-ribotipizacije pokazali, da dva seva toksinotipa III, ki sta bila izolirana iz istega bolnika, spadata v tip 027, tretji sev pa v tip B-3.

V drugi študiji smo šestim izolatom toksinotipa V, ki so bili izolirani iz blata novorojenih prašičkov dveh večjih prašičjih farm v Sloveniji, določili PCR-ribotip in pulso tip. Vzorce fragmentov prašičjih izolatov smo primerjali z vzorci štirih človeških sevov toksinotipa V. Medtem, ko s PCR-ribotipizacijo nismo mogli razlikovati med človeškimi in prašičjimi izolati, smo s pulzno gelsko elektroforezo prašičjim izolatom določili drugačen pulso tip kot človeškim.

Ugotovili smo, da sta obe metodi primerni za tipizacijo bakterije *C. difficile*, da ima pulzna gelska elektroforeza večjo moč razlikovanja med nesorodnimi izolati, vendar je čas, ki je potreben, da pridemo do rezultatov veliko daljši, kot v primeru PCR-ribotipizacije. Rezultati, ki jih dobimo z obema metodama, pa se med seboj zelo dobro ujemajo, kar so že prej pokazali številni avtorji (Bidet in sod., 2000; Spigaglia in sod., 2001).

## 7 VIRI

- 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
- Alfa M.J., Kabani A., Lyerly D., Moncrief S., Neville L.M., Al-Barrak A., Harding G.K.H., Dyck B., Olekson K., Embil J.M. 2000. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 7: 2706-2714
- Aslam S., Hamill R.J., Musher D.M. 2005. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infectious Disease*, 5, 9:549-557
- Babcock G.J., Broering T.J., Hernandez H.J., Mandell R.B., Donahue K., Boatright N., Stack A.M., Lowy I., Graziano R., Molrine D., Ambrosino D.M., Thomas W.D. Jr. 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infection and Immunity*, 74, 11: 6339-6347.
- Barbut F., Mastrantonio P., Delmee M., Brazier J., Kuijper E., Poxton I. 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbial Infections*, 13, 11: 1048-1057
- Barbut F., Richard A., Hamadi K., Chomette V., Burghoffer B., Pettitt J.C. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 6: 2386-2388
- Bartlett J.G. 1994. *Clostridium difficile*: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clinical Infectious Diseases*, 18, 4: 265-272

- 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., Delmee M., Rossier A., Barbut F., Pettitt 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
- Bojesen A.M., Olsen K.E., Bertelsen M.F. 2006. Fatal enterocolitis in asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*, 116, 4: 329-335
- Borriello S.P., Honour P., Turner T., Barclay F. 1983. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Pathology*, 36,1: 84-87
- Borriello S.P. 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 13-19
- 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: 29-38
- Brazier J.S. 1998. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 47-57
- Brazier J.S. 2001. Typing of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbial Infection*, 7, 8: 428-431
- Cartwright C.P., Stock F., Beekmann S.E., Williams E.C., Gill V.J. 1995. PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1: 184-187

- 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.
- Chernak E., Johnson C.C., Weltman A., McDonald L.C., Wiggs L., Killgore G., Thompson A., LeMaile-Williams M., Tan E., Lewis F.M. 2005. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in population previously at low risk-four states, 2005. *Journal of the American Medical Association*, 295,1: 25-27
- Clabots C.R., Johnson S., Bettin K., 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
- Collier M., Stock F., DeGirolami P., Samore M., Cartwright C.P. 1996. Comparison of PCR-based approaches to molecular epidemiologic analysis of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 5: 1153-1157
- 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*, 37, 7: 2791-2792
- Costagliuolo I., Riegler M.F., Valenick L., LaMont T., Pothoulakis C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effect of *Clostridium difficile* toxin A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67, 1: 302-307
- Czuprynski C.J., Johnson W.J., Balish E., Wilkins T. 1983. Pseudomembranous colitis in *Clostridium difficile*-monoassociated rats. *Infection and Immunity*, 39, 3: 1368-1376
- Delmee 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

- Dabard J., Dubos F., Martinet L., Ducluzeau R. 1979. Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*, 24, 1: 7-11
- Delmee M., Depitre C., Corthier G., Ahoyo A., Avesani V. 1993. Use of an enzyme-linked immunoassay for *Clostridium difficile* serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 9: 2526-2528
- Delmee M., Homel M., Wauters G. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 3: 323-237
- Delmee M., Laroche Y., Avesani V., Cornelis G. 1986. Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 6: 991-994
- Deneve C., Janoir C., Delomenie C., Collignon A. 2007. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression V: *Clostridium difficile*: Organism, disease, control and prevention: Abstract book. 2<sup>nd</sup> International *Clostridium difficile* Symposium, 2007, Maribor, 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> June. Rupnik M. (ed.). Maribor, [s.n.]: 29-29
- DiPersio J.R., Varga F.J., Conwell D.L., Kraft J.A., Kozak K.J., Willis D.H. 1991. Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 12: 2724-2730
- Dupuy B., Raffestein S., Matamouros S., Mani N., Popoff M.R., Sonenshein A.L. 2006. Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium difficile* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. *Molecular Microbiology*, 60, 4: 1044-1057

Eidhin D.N., Ryan A.W., Doyle R.M., Walsh J.B., Kelleher D. 2006. Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 69-83

Elmer G.W., McFarland L.V. 1987. Suppression by *Saccharomyces boulardii* of toxigenic *Clostridium difficile* overgrowth after vancomycin treatment in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 1: 129-131

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2002. 2003. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.

[http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/798-epidemiolosko\\_spremljanje\\_nalezljivih\\_bolezni\\_2002.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2002.pdf)  
(november 2007): 72-72

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2003. 2005. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.

[http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko\\_spremljanje\\_nalezljivih\\_bolezni\\_2003.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2003.pdf)  
(november, 2007): 68-68

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2004. 2005. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.

[http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/798-PorocilocCNB\\_2004.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-PorocilocCNB_2004.pdf) (november 2007): 21-29

Falsen E., Kaijser B., Nehls L., Nygren B., Svedhem A. 1980. *Clostridium difficile* in relation to enteric bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 12, 3: 297-300

Gal M., Northey G., Brazier J.S. 2005. A modified pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol for subtyping previously non-PFGE typeable isolates of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 001. *Journal of Hospital Infection*, 61, 3: 231-236



- George W.L., Rolfe R.D., Finegold S.M. 1982. *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 6: 1049-1053.
- George R.H., Symonds J.M., Dimock F., Brown J.D., Arabi Y., Shinagawa N., Keighley M.R., Alexander-Williams J., Burdon D.W. 1978. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*, 1: 695
- Gerding D.N., Johnson S., Peterson L.R., Mulligan M.E., Silva J. Jr. 1995. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 16, 8: 459-477
- Gerič B. 2004. Pogostotst, virulenca in opis toksinskega lokusa PaLoc sevov bakterije *Clostridium difficile* z zapisom za binarni toksin. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 26, 33, 38, 63.
- Gilligan P.H., McCarthy L.R., Genta V.M. 1981. Relative frequency of *Clostridium difficile* in patients with diarrheal disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 14, 1: 26-31
- Goncalves C., Decre D., Barbut F., Burghoffer B., Petitt J.C. 2004. Prevalence and characterization of binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5: 1933-1939
- Gubina M. 2002. Klostridiji. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A (ur). Ljubljana, Medicinski razgledi: 240-241
- Hall L.C., O'Toole. 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

- Hatheway C.L. 1990. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 1: 66-98
- Heard S., Rasburn B., Matthews R.C., Tabaqchali S. 1986. Immunoblotting to demonstrate antigenic and immunogenic differences among nine standard strains of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 3: 384-387
- Hickson M., D'Souza A.L., Mothu N., Rogers T.R., Want S., Rajkumar C., Bulpitt C.J. 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, 335, 7623: 5 str.
- Hopkins M.J., Macfarlane G.T. 2003. Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4: 1920-1927
- 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
- Hurley B.W., Nguyen C.C. 2002. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Archives of Internal Medicine*, 162, 19: 2177-2184
- Johnson S., Gerding D.N. 1998. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 1027-1036
- Johnson S., Sambol S.P., Brazier J.S., Delmee 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
- Jones R.L., Adney W.S., Shideler R.K. 1987. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 7: 1225-1227

- Karjalainen T., Waligora-Dupriet A.J., Cerquetti M., Spigaglia P., Maggioni A., Mauri P., Mastrantonio P. 2001 Molecular and genomic analysis of gene encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 69, 5: 3442-3446
- Karjalainen T., Saumier N., Barc M.C., Delmee 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., Kita H., Karasawa T., Maegawa T., Koino Y., Takakuwa H., Saikai T., Kobayashi K., Yamagishi T., Nakamura S. 2001. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 8: 720-727
- 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: 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.
- 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., Johnson S., Brazier J., Thompson A., Kuijper E., Frost E., Sambol S., Zukowski W.E. Gerding D.N., Pepin J., Nicholson B., Savelkoul P., van den Berg R.J.,

- Kato H., Limbago B., Woods C., McDonald C.L. 2007. International multi-laboratory comparison of seven *Clostridium difficile* typing techniques. V: *Clostridium difficile*: Organism, disease, control and prevention: Abstract book. 2<sup>nd</sup> International *Clostridium difficile* Symposium, 2007, Maribor, 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> June. Rupnik M. (ed.). Maribor, [s.n.]: 25-25
- Klaassen C.W., van Haren H.A., Horrevorts A.M. 2002. Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1: 101-104
- Knoop C.F., Owens M., Crocker C. 1993. *Clostridium difficile*: Clinical disease and diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 6, 3: 251-265
- Kotloff K.L., Wasserman S.S., Losonsky G.A., Thomas W. Jr., Nichols R., Edelman R., Bridwell M., Monath T.P. 2001. Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infection and Immunity*, 69, 2: 988-995
- Kristjansson M., Samore M.H., Gerding D.N., DeGirolami P.C., Bettin K.M., Karchmer A.W., Arbeit R.D. 1994. Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 8: 1963-1969
- Kuijper E., Oudbier J.H., Stuifbergen W.N.H.M., 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., Coignard B., Tull P. 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe *Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 12: 2-18

- Larson H.E., Parry J.V., Price A.B., Davies D.R., Dolby J., Tyrrell D.A.J. 1977. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*, 1, 6071: 1246-1248
- Lefebvre S.L., Arroyo L.G., Weese J.S. 2006. Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerging Infectious Disease*, 12, 6: 1036
- 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, 110: 3171-3180
- Lemee L., Dhalluin A., Peste-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
- Lindberg R.B., Wetzler T.F., Marshall J.D., Newton A., Strawitz J., Howard J.M. 1955. The bacterial flora of battle wounds at the time of primary debridement. *Annals of Surgery*, 141, 3: 369-374
- Lyerly D.M., Barroso L.A., Wilkins T.D. 1991. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 11: 2639-2642
- Lyerly D.M., Krivan H.C., Wilkins T.D. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 1: 1-18
- Madewell B.R., Bea J.K., Kraegel S.A., Winthrop M., Tang Y.J., Silva J. Jr. 1999. *Clostridium difficile*: a survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 1: 50-54
- Madewell B.R., Tang Y.J., Jang S., Madigan J.E., Hirsh D.C., Gumerlock P.H., Silva J.Jr. 1995. Apparent outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in horses in a

veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7, 3: 343-346.

Malamou-Ladas H., O'Farrell S., Nash J.Q., Tabaqchali S. 1983. Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards. *Journal of Clinical Pathology*, 36, 1: 88-92

Marsh J.W., O'Leary M.M., Shutt K.A., Pasculle 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

Matamourus 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

McKay I., Coia J.E., Poxton I.R. 1989. Typing of *Clostridium difficile* causing diarrhoea in an orthopedic ward. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 5: 511-515

Mitchell T.J., Ketley J.M., Haslam S.C., Stephen J., Burdon D.W., Candy D.C., Daniel R. 1986. Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut*, 27, 1: 78-85

Onderdonk A.B., Cisneros R.I., Bartlett J.G. 1980. *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Infection and Immunity*, 28, 1: 277-282

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

- Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M., Boquet P. 1988. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium difficile* strain. *Infection and Immunity*, 56, 9: 2299-2306
- Price A.B., Davies D.R. 1977. Pseudomembranous colitis. *Journal of Clinical Pathology*, 30, 1: 1-12
- Radsel A., Pokorn M., Rupnik M., Cizman M. 2007. Emerging cases of *Clostridium difficile* infection in children. V: *Clostridium difficile*: Organism, disease, control and prevention: Abstract book. 2<sup>nd</sup> International *Clostridium difficile* Symposium, 2007, Maribor, 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> June. Rupnik M. (ed.). Maribor, [s.n.]: 21-21
- Richardson S.A., Brookfield D.S.K., French T.A., Gray J. 1981. Pseudomembranous colitis in a 5-week-old infant. *British Medical Journal*, 283: 1510: 1 str.
- Rodriguez -Palacios A., Staempfli H.R., Duffield T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese S.J. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Disease*, 12, 11: 1730-1736
- Rodriguez-Palacios A., Staempfli H.R., Duffield T., Weese J.S. 2007. Isolation of *Clostridium difficile* from retail ground meat, Canada. *Emerging Infectious Disease*, 13, 3: 485-487
- Rolfe R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130: 396-402
- Rolfe R.D., Iaconis J.P. 1983. Intestinal colonization of infant hamsters with *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 42, 2: 480-486
- 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. 2007c. *Clostridium difficile* Toxinotypes. Maribor. Institute of Public Health Maribor, Slovenia and Faculty of Medicine, University of Maribor, Slovenia  
<http://www.mf.uni-mb.si/Mikro/tox/> (1.12.2007): 3 str.
- Rupnik M. 2007b. *Clostridium difficile* in z antibiotiki povezana driska. V: Črevesne okužbe, zbornik predavanj. Črevesne okužbe, 2007, Otočec ob Krki, 23-24 november. Vovk P., Harlander T. (ur.). Medicinski razgledi, 46, Suppl. 2: 43- 47
- Rupnik M. 2007a. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease. *Clinical Microbial Infection*, 13, 5: 457-459
- Rupnik M., Avesani V., Janc M., von Eichel-Streiber C., Delmee 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., Brazier J.S., Duerden B.I., Grabnar M., Stubbs S.L.J. 2001. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology*, 147: 439-447
- Rupnik M., Dupuy B., Fairweather N.F., Gerding D.N., Johnson S.J., Just I., Lyerly D.M., Popoff M.R., Rood J.I., Sonenshein A.L., Thelestam M., Wren B.W., Wilkins T.D., von Eichel-Streiber C. 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 2: 113-117
- Rupnik M., Just I. 2006. Large Clostridial cytotoxins modifying small GTPases. V: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. 3<sup>rd</sup> ed. Alouf J.E., Popoff M. (eds.). New York: Academic Press: 409 - 429
- Sadeghifard N., Gürtler 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



- 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
- Simango C. 2006. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 12:1146-1150
- Smith L.D.S., King E.O. 1962. Occurrence of *Clostridium difficile* in infection of man. *Journal of Bacteriology*, 84: 65-67
- Songer J.G., Uzal F.A. 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 6: 528-536
- Songer J.G., Anderson M.A. 2006. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 12, 1: 1-4
- Spigaglia P., Mastrantonio P. 2004. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 1129-1136
- Spigaglia P., Cardines R., Rossi S., Menozzi M.G., Mastrantonio P. 2001. Molecular typing and long-term comparison of *Clostridium difficile* strains by pulsed-field gel electrophoresis and PCR-ribotyping. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 5: 407-414
- Staneck J.L., Weckbach L.S., Allen S.D., Siders J.A., Gilligan P.H., Coppitt G., Kraft J.A., Willis D.H. 1996. Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture and latex agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 11: 2718-2721
- 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
- Tabaqchali S., O'Farrell S., Holland D., Silman R. 1986. Method for the typing of *Clostridium difficile* based on polyacrylamide gel electrophoresis of [<sup>35</sup>S] Methionine-labeled proteins. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 1: 197-198
- 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
- Tasteyre A., Barc M.C., Karjalainen T., Dodson P., Hyde S., Bourlioux P., Borriello P. 2000. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. *Microbiology*, 146: 957-966
- Taylor R.H., Borriello S.P., Taylor A.J. 1981. Isolation of *Clostridium difficile* from the small bowel. *British Medical Journal*, 283, 6288: 412-412
- Terhes G., Urban E., Soki J., Hamid K.A., Nagy E. 2004. Community-acquired *Clostridium difficile* diarrhea caused by binary toxin, toxin A, and toxin B gene-positive isolates in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 9: 4316-4318
- Toma S., Lesiak G., Magus M., Lo H. L., Delmee M. 1988. Serotyping of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 3: 426-428
- van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggmann S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 13, 3: 1-46
- van den Berg R., Bruijnesteijn van Coppenraet L.S., Gerritsen H.J., Endtz H.P., van der Vorm E.R., Kuijper E. 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., Claas E.C., Oyib D.H., Klaassen C.H., Dijkshoorn L., Brazier J.S., Kuijper E.J. 2004. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3: 1035-1041
- van den Berg R.J., Schaap I., Templeton K.E., Klaassen C.H.W., Kuijper E. 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 Dijk P., Avesani V., Delmee M. 1996. Genotyping of outbreak-related and sporadic isolates of *Clostridium difficile* belonging to serogroup C. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 12: 3049-3055
- von Eichel-Streiber C., Boquet P., Sauerborn M., Thelstam M. 1996. Large clostridial cytotoxins-a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in Microbiology*, 4, 10: 375-382
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Pelman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 21: 4407-7714
- Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A., Karjalainen T. 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and Immunity*, 69, 4: 2144-2153
- Walters B.A., Roberts R., Stafford R., Seneviratne E. 1983. Relapse of antibiotic associated colitis: endogenous persistence of *Clostridium difficile* during vancomycin therapy. *Gut*, 24, 3: 206-212
- Willey S.H., Bartlett J.G. 1979. Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 6: 880-884

- Wilson K.H., Perini F. 1988. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infection and Immunity*, 56, 10: 2610-2614
- Wren B.W., Tabaqchali S. 1987. Restriction endonuclease DNA analysis of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 12: 2402-2404
- Zimmermann O., Zemljic M., Janezic S., Gross U., Rupnik M. 2007. Prevalence of variant strains in hospital-associated *C. difficile* from Germany. V: *Clostridium difficile: Organism, disease, control and prevention: Abstract book. 2<sup>nd</sup> International Clostridium difficile Symposium, 2007, Maribor, 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> June*. Rupnik M. (ed.). Maribor, [s.n.]:70-70
- Yaeger M., Funk N., Hoffman L. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 4: 281-287

## ZAHVALA

Največja zahvala gre somentorici prof. dr. Maji Rupnik za vso pomoč pri laboratorijskem delu, za sproščenost in potrpežljivost, ki sta mi pomagali premagati začetno nerodnost in tremo ter uživati ob delu, ki sem ga opravljala. Hvala tudi za prejeta znanje in strokovne nasvete ter kritičen pregled besedila.

Hvala prof. dr. Darji Žgur Bertok za mentorstvo ter recenzentki doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja za temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala Nataši Babič za prijaznost in pomoč pri mojih prvih laboratorijskih korakih. Mateji in Aleksandru hvala za prijetno delovno okolje in zvrhano mero humorja.

Iz vsega srca se zahvaljujem tudi staršema in bratu zato, ker mi stojite ob strani, ko vas potrebujem, se veselite z mano, ko gre vse po načrtih in, da verjamete vame in v moje sanje.

Hvala vsem!

Priloga A: Pregled sevov bakterije *C. difficile*, vključenih v študijo.

Sev	Toksinotip	Ribotip	Pulsotip	Serološka skupina	Izvor
SE844	IIIa	<b>080</b>	3	A1	Bruselj, Belgija
R12078	IIIb	<b>027</b>	1a	NZ	ARU (orig. Francija)
K1710/06	IIIb	<b>027</b>	4	NZ	Švica, Basel
AT22	IIIb	027	1b	NZ	Švica, Basel
AT26	IIIb	027	1b	NZ	Švica, Basel
AT96	IIIb	027	1c	NZ	Švica, Basel
A420/R5	IIIb	<b>027</b>	1b	NZ	Duncan, Kanada
M42/R5	IIIb	<b>027</b>	1d	NZ	Duncan, Kanada
M242	IIIb	<b>027</b>	1a	NZ	Irska
V22/06	IIIb	<b>027</b>	1d	NZ	Irska
C1	IIIb	<b>027</b>	1d	NZ	Irska
IS81/34	IIIb	<b>034</b>	5	NZ	ARU, Cardiff, VB
IS93/75	IIIb	<b>075</b>	6	NZ	ARU, Cardiff, VB
CH6186	IIIb	075	7	NZ	Chicago
OG45	IIIb	B-5	15	NZ	Japonska
3232/03	IIIb	027	1a	NZ	Nemčija, Goettingen
3248/03	IIIb	027	1a	NZ	Nemčija, Goettingen
3012/06	IIIc	B-3	19	NZ	Nemčija, Goettingen
CH6230	IIIc-1	B-1	2	NZ	Chicago
3073	IIId	B-2	8	NZ	Nemčija, Goettingen
20135	VIII	017	14	F	Bruselj, Belgija
11731	VIII	017	14	F	Bruselj, Belgija
1470	VIII	<b>017</b>	14	F (tipski)	Bruselj, Belgija
20174	VIII	017	14	F	Bruselj, Belgija
8181	VIII	017	14	F	Bruselj, Belgija
6292	VIII	017	14	F	Bruselj, Belgija
2494/06	VIII	017	14	NZ	Nemčija, Goettingen
3013/06	VIII	017	16	NZ	Nemčija, Goettingen
6476/06	VIII	B-4	17	NZ	Nemčija, Goettingen
J9916	VIII	017	13	NZ	Japonska
GAI195601	VIII	017	13	NZ	Japonska
OG57	VIII	017	18	NZ	Japonska
R10541	VIII	<b>047</b>	13	NZ	ARU, Cardiff, VB
GAI195606	VIII	B-4	14	NZ	Japonska
6971	VIII	B-4	12	X	Bruselj, Belgija
13142	VIII	B-4	12	X	Bruselj, Belgija
18736	VIII	B-4	12	X	Bruselj, Belgija
SE866	V	<b>066</b>	9	NZ	Bruselj, Belgija
SE881	V	<b>066</b>	9	NZ	Bruselj, Belgija
CD56	V	066	10	NZ	Farma 1, SLO
CD58	V	066	10	NZ	Farma 1, SLO
CD62	V	066	10	NZ	Farma 1, SLO
CD66	V	066	10	NZ	Farma 2, SLO
CD83	V	066	10	NZ	Farma 2, SLO
CD92	V	066	10	NZ	Farma 2, SLO
R7605	V	<b>078</b>	11	NZ	NZ
233flor	V	<b>078</b>	ND	NZ	Kuvajt

NZ-ni znan

DN-ni določen