

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Valerija ZIDARIČ

**OSAMITEV, KARAKTERIZACIJA IN POGOSTNOST
BAKTERIJE *Clostridium difficile* PRI ŽIVALIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Valerija ZIDARIČ

**OSAMITEV, KARAKTERIZACIJA IN POGOSTNOST BAKTERIJE
Clostridium difficile PRI ŽIVALIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND PREVALENCE OF
BACTERIUM *Clostridium difficile* IN ANIMALS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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 prof. dr. Katjo Seme.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentorica: prof. dr. Maja Rupnik

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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: prof. dr. Katja Seme

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Valerija Zidarič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.61/.62:616-078(043)=163.6
- KG *Clostridium difficile*/črevesne okužbe/poantibiotična driska/ zoonoze/perutnina/
telički/psi/mačke/osamitev *Clostridium difficile*/bogativno gojišče/D-cikloserin-
cefoksitin-/moksalaktam-norfloksacin-cistein hidroklorid/molekularne tehnike/
tipizacija/ PCR ribotipizacija/ toksinotipizacija
- AV ZIDARIČ, Valerija
- SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/RUPNIK, Maja (somentorica)/SEME, Katja
(recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2009
- IN OSAMITEV, KARAKTERIZACIJA IN POGOSTNOST BAKTERIJE *Clostridium
difficile* PRI ŽIVALIH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 77 str., 20 pregl., 7 sl., 113 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI *Clostridium difficile* je eden pomembnejših povzročiteljev bolnišničnih črevesnih okužb pri ljudeh. Zadnjih deset let bolezen postaja resnejša, število okužb s *C. difficile* narašča in bolezen se vse pogosteje pojavlja tudi v izvenbolnišničnem okolju. Za spremembe v epidemiologiji je več možnih vzrokov: selekcijski pritisk v okolju, pojav novih tipov v okolju in prenos patogenega mikroorganizma iz/v določene rezervoarje. Zaradi slednjega smo v diplomskem delu preučili pogostnost in tipe *C. difficile* pri domačih živalih (govedu in perutnini) in v manjšem obsegu še pri nekaterih domačih pticah in hišnih ljubljenceh v Podravski regiji ter jih primerjali s tipi najdenimi pri ljudeh. S primerjavo neposredne in bogativne gojitvene metode ter primerjavo dveh komercialnih dodatkov z D-cikloserinom in cefoksitinom (CC) in norfloksacinom, moksalaktamom in cistein hidrokloridom (CDMN), smo najprej optimizirali metodo osamitve *C. difficile*. Na manjši podskupini živalskih vzorcev smo določili tudi občutljivost komercialnega toksinskega ELISA-testa VIDAS CDAB. Naši rezultati so pokazali, da je z bogativno vzorca v bogativnem gojišču s cikloserinom in cefoksitinom delež osamitve v primerjavi z bogativno v bogativnem gojišču s CDMN in direktno gojitveno metodo višji. Občutljivost testa VIDAS CDAB pri živalskih vzorcih je nizka. *C. difficile* smo v visokem deležu iz vzorcev blata mladih živali: piščancev (6,7 % - 100 %), psičkov (50-75 %) in teličkov (11,9 %). *C. difficile* smo osamili tudi iz blata starejših kokoši, jerebic, vran, gosk in odraslih psov ter mačk. Med izolati so prevladovali izolati toksinotipa 0, delež variantnih toksinotipov je bil nizek. Skupno smo določili 17 PCR ribotipov. Pokazali smo, da se pri živalih in ljudeh pojavljajo isti tipi, kar kaže, da so živali lahko rezervoar *C. difficile* za ljudi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.61/.62:616-078(043)=163.6

CX *Clostridium difficile*/intestinal infections/postantibiotic diarrhoea/ zoonosis/
poultry/calves/cats/dogs/isolation/enrichment medium/D-cycloserine- cefoxitin/
moxalactam- norfloxacin- cysteine hydrochloride/molecular methods/typing/PCR
ribotyping/toxinotyping/

AU ZIDARIČ, Valerija

AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/RUPNIK, Maja (co-advisor)/SEME, Katja
(reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2009

TI ISOLATION, CHARACTERIZATION AND PREVALENCE OF BACTERIUM
Clostridium difficile IN ANIMALS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XII, 77 p., 20 tab., 7 fig., 113 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Clostridium difficile* is considered as one of the most important causes of health care- associated infections. In recent years the incidence, severity and number of community-acquired cases seem to be increasing. Changes in the epidemiology could be a consequence of changed selection pressure in the environment, the emergence of new types of organism and possible interspecies transmission from novel reservoirs. The aim of this work was therefore to determine the occurrence of *Clostridium difficile* in domestic animals (calves, poultry and other avian species) and household pets in Podravje region in Slovenia. Firstly, direct culture and enrichment method were compared for efficacy in the isolation of *Clostridium difficile* from animal samples. In enrichment step supplements containing cycloserine and cefoxitin (CC) and cysteine hydrochloride, norfloxacin and moxalactam (CDMN) were compared. On a small number of animal samples sensitivity of commercial toxin ELISA test VIDAS CDAB was evaluated. Our results show that enrichment with CC is superior to CDMN and to direct culture method. Sensitivity of the VIDAS CDAB test on animal samples is low. *C. difficile* was mainly found in young animals: chickens (6, 7 % - 100 %), dogs (50-75 %) and calves (11,9 %). *C. difficile* was also isolated also from faeces of older chickens, partridges, crow, geese and dogs and cats. The majority of isolates were toxinotype 0, the proportion of variant isolates was low. Altogether we have determined 17 different PCR ribotypes. We showed that an overlap between types found in both, humans and animals, is considerable. Our results suggest that animal reservoirs are possible source for *C. difficile* infection.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Clostridium difficile</i>	3
2.1.1 Mikrob	3
2.1.2 Zgodovinski pregled	3
2.2 PATOGENEZA.....	4
2.2.1. Bolezenski znaki, ki jih povzroča <i>C. difficile</i>	4
2.2.2. Dejavniki virulence pri bakteriji <i>C. difficile</i>	5
2.2.2.2. Ostali dejavniki virulence.....	7
2.2.1 Patogeneza.....	7
2.2.1.1 Zdravljenje CDI.....	8
2.3 EPIDEMIOLOGIJA	9
2.3.1 Epidemiologija <i>C. difficile</i> pri ljudeh.....	9
2.3.2 Epidemiologija <i>C. difficile</i> pri ljudeh v Sloveniji.....	10
2.3.3 Spremembe v epidemiologiji okužb s <i>C. difficile</i> pri ljudeh	10
2.3.4 Prenos	11
2.3.5 Dejavniki tveganja.....	12
2.3.6 Preprečevanje CDI	12
2.4 BAKTERIJA <i>C. difficile</i> PRI ŽIVALIH	13

2.4.1	Epidemiologija <i>C. difficile</i> pri živalih	13
2.4.1.1	Epidemiologija <i>C. difficile</i> pri živalih v Sloveniji.....	15
2.5	MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA <i>C. difficile</i>	16
2.6	OSAMITEV BAKTERIJE <i>C. difficile</i>	17
2.6.1	Vzorec	17
2.6.2	Osamitev bakterije	17
2.6.2.1	Razvoj selektivnih gojišč za izolacijo <i>Clostridium difficile</i>	18
2.6.2.2	Fizikalni in kemijski vplivi na germinacijo spor	19
2.6.3	Identifikacija	19
2.7	KARAKTERIZACIJA SEVOV <i>C. difficile</i>	19
2.7.1	Tipizacijske metode	19
2.7.1.1	Toksinotipizacija	20
2.7.1.2	PCR-ribotipizacija	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI	22
3.1.1	Gojišča	22
3.1.2	Brisi.....	23
3.1.3	Toksinski test	23
3.1.4	Priprava pufrov in drugih raztopin.....	23
3.2	METODE	25
3.2.1	Vzorčenje živali.....	25
3.2.2	Vzorec	28
3.2.2.1	Blato	28
3.2.2.2	Bris	28
3.2.3	Gojitev in osamitev	28
3.2.3.1	Optimizacija osamitve bakterije <i>C. difficile</i>	29
3.2.4	Dokaz toksinov	30
3.2.5	Identifikacija	31
3.2.6	Osamitev DNA	33
3.2.7	Karakterizacija izolatov.....	33

3.2.7.1	Toksinotipizacija	33
3.2.7.1.1	Verižna reakcija s polimerazo	34
3.2.7.1.2	Restrikcija pomnožkov PCR	34
3.2.7.1.3	Gelska elektroforeza pomnožkov PCR	35
3.2.7.2	PCR-ribotipizacija	35
3.2.7.2.1	Analiza rezultatov	37
3.2.7.2.2	Nomenklatura	37
3.2.7.2.3	Primerjava <i>C. difficile</i> PCR ribotipov živalskega in človeškega izvora	38
4	REZULTATI.....	39
4.1	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE.....	39
4.1.1	Primerjava neposredne in bogatitvene metode pri osamitvi <i>C. difficile</i> iz brisov	39
4.1.2	Primerjava dveh selektivnih suplementov pri bogatenju vzorca.....	39
4.1.3	Optimizacija alkoholnega šoka	40
4.2	NEPOSREDNI DOKAZ TOKSINOV S KOMERCIALNIM TOKSINSKIM TESTOM	40
4.3	REZULTATI OSAMITVE IN KARAKTERIZACIJE <i>C. difficile</i> IZ RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST.....	41
4.3.1	Perutnina	41
4.3.1.1	Velika farma	41
4.3.1.2	Kokoši iz manjših kmetij.....	44
4.3.2	Ostala perjad.....	46
4.3.3	Telički	47
4.3.4	Hišni ljubljenci.....	48
4.3.4.1	Psički	48
4.3.4.2	Bolni hišni ljubljenci	49
4.4	PRIMERJAVA <i>C. difficile</i> PCR-RIBOTIPOV ŽIVALSKEGA IN ČLOVEŠKEGA IZVORA.....	50
5	RAZPRAVA in sklepi	53
5.1	RAZPRAVA.....	53

5.1.1	Metode za izolacijo in detekcijo bakterije in toksinov <i>Clostridium difficile</i> pri živalih in ljudeh	53
5.1.2	Prisotnost <i>Clostridium difficile</i> pri različnih živalskih vrstah	55
5.1.3	Ujemanje genotipov <i>Clostridium difficile</i> pri živalih in ljudeh	58
5.2	SKLEPI.....	60
6	POVZETEK.....	61
7	VIRI	64
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Velika farma za vzrejo kokoši – eden od štirih zaprtih prostorov.	26
Slika 2: Potek optimizacije osamitve bakterije <i>C. difficile</i> iz živalskih vzorcev.....	30
Slika 3: Morfologija kolonij <i>C. difficile</i> na selektivni plošči CLO (bioMerieux).....	31
Slika 4: Toksinski lokus PaLoc (Rupnik, 2007a).....	34
Slika 5: Predstavniki <i>C. difficile</i> PCR-ribotipov, ki smo jih osamili na veliki farmi ob različnih vzorčenjih.	44
Slika 6: PCR-ribotipi <i>C. difficile</i> izolatov iz ptic.	47
Slika 7: <i>Clostridium difficile</i> PCR-ribotipi najdeni pri živalih.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled genotipov <i>C. difficile</i> pri živalih po objavah.....	15
Preglednica 2: Pregled vzorčenih živali in podatki o številu odvzetih vzorcev.....	27
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (ZO).....	32
Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za CD, A3 in B1 PCR.....	32
Preglednica 5: Pogoji pomnoževanja s PCR pri toksinotipizaciji, CD PCR in BTb PCR..	33
Preglednica 6: Sestava restriksijske mešanice za eno reakcijo restrikcije posameznih pomnoženih fragmentov.....	34
Preglednica 7: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.....	35
Preglednica 8: : Sestava reakcijske mešanice za PCR-ribotipizacijo po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999).	36
Preglednica 9: Program PCR za pomnoževanje medgenskega prostora med 16S in 23 S rDNA bakterije <i>C. difficile</i> (Bidet in sod., 1999).	36
Preglednica 10: Primerjava bogatitve živalskega vzorca blata v gojišču CDA z dvema različnima dodatkom CC in CDMN.	40
Preglednica 11: Neposredni dokaz toksinov A in/ali B s testom VIDAS CDAB v vzorcih blata.	41
Preglednica 12: Dokaz toksinov A in/ali B s testom VIDAS CDAB kulture <i>C. difficile</i> v bogatitvenem gojišču.....	41
Preglednica 13: Število in tipi izolatov <i>C. difficile</i> pri dveh populacijah kokoši iz velike farme.....	43
Preglednica 14: Število in tipi <i>C. difficile</i> pri kokoših iz manjših kmetij.....	45
Preglednica 15: Število in tipi <i>C. difficile</i> pri piščancih iz manjše kmetije.....	45
Preglednica 16: Število in tipi <i>C. difficile</i> izolatov pri ostalih domačih pticah.	46
Preglednica 17: Število in tipi <i>C. difficile</i> izolatov pri mladih psičkih.	48
Preglednica 18: Kolonizacija živali s <i>C. difficile</i> glede na starost gostitelja.....	49
Preglednica 19: Število in tipi <i>C. difficile</i> izolatov pri hišnih ljubljenceh z bolezenskimi znaki, ki so bili sprejeti v veterinarsko ambulanto	49
Preglednica 20: Primerjava človeških in živalskih <i>C. difficile</i> PCR-ribotipov in izvor živalskih sevov <i>C. difficile</i>	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP glukoza	adenozin difosfat glukoza
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)
CC	komercialni dodatek, ki vsebuje D-cikloserin in cefoksitin
CDA	bogatitveno gojišče za gojenje <i>Clostridium difficile</i> (angl. <i>C. difficile</i> agar base)
CDI	spekter bolezni, ki jih lahko pripišemo bakteriji <i>C. difficile</i> (angl. <i>Clostridium difficile</i> infection)
CDMN	komercialni dodatek, ki vsebuje cistein hidroklorid, norfloksacin in moksalaktam
CDT	binarni toksin, ki ga izdeluje <i>Clostridium difficile</i>
CLO	komercialno selektivno trdno gojišče za osamitev <i>C. difficile</i> (angl. <i>C. difficile</i> agar)
CROPs	homologe regije, ki jih najdemo na C-terminalnih koncih toksinov A in B (angl. Combined repetitive oligopeptides)
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
GDH	encim glutamat dehidrogenaza
ISR	medgenski prostor (angl. Intergenic spacer region)
kbp	kilo bazni par
LCT	veliki klostridijski toksini (angl. Large clostridial toxins)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	večgenska sekvenčna tipizacija (angl. Multilocus sequence typing)
MLVA	hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih

	ponovitev (angl. Multiple locus variable number tandem repeat analysis).
PaLoc	toksinski 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)
Ras	podružina majhnih GTP-az
REA	polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (angl. Restriction endonuclease analysis)
Rho	podružina majhnih GTP-az
SDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
UDP glukoza	uracil difosfat glukoza
V	Volt

1 UVOD

Clostridium difficile je pomemben povzročitelj črevesnih bolezni pri ljudeh in živalih. *C. difficile* se ob porušenju normalne črevesne flore prekomerno namnoži in toksini, ki jih bakterija proizvaja, povzročijo nastanek bolezni. Tako pri ljudeh kot pri živalih bakterija povzroča širok spekter bolezni, od asimptomatične okužbe do poantibiotske driske, enterokolitisa ter pseudomembranoznega kolitisa. Bolezen se lahko konča tudi s smrtjo.

Pri živalih je *C. difficile* dobro poznan kot patogen mikroorganizem pri konjih, povezujejo ga z driskami mladih teličkov, psov in mačk ter enteritisom mladih prašičkov, kjer povzroča velike ekonomske izgube. Bakterijo so osamili tudi iz blata perutnine, vendar ni znano ali so bile živali bolne.

Prisotnost *C. difficile* pri živalih kaže tudi na možnost, da so živali eden od novih možnih rezervoarjev za okužbo človeka. Zato je pomembno, da poznamo pogostnost in genotipe pri živalih v določenem geografskem okolju. Za Slovenijo imamo do sedaj podatke o pogostnosti in tipih *C. difficile* na prašičjih farmah ter deloma pri teličkih.

Tip *C. difficile* lahko določamo s številnimi fenotipskimi in genotipskimi tipizacijskimi metodami. Najbolj razširjene metode za genotipizacijo *C. difficile* so: pulzna gelska elektroforeza (PFGE; angl. Pulsed field gel electrophoresis), PCR-ribotipizacija in analiza restriksijskih fragmentov (REA; angl. Restriction endonuclease analysis). Za razlikovanje tipov lahko uporabimo tudi metodo toksinotipizacije.

Z živalmi so pogosto povezani variantni sevi *C. difficile*, ki imajo spremembe v genih za toksin A (TcdA) in toksin B (TcdB) ter proizvajajo tretji toksin, imenovan binarni toksin (CDT). Predstavljajo 20 % do 100 % vseh živalskih izolatov. Najbolj zastopan pri konjih, teličkih in prašičkih je toksinotip V (PCR-ribotip 066 ali 078). Raznolikost PCR-ribotipov živalskih izolatov je v primerjavi s človeškimi manjša. S PCR-ribotipizacijo so ugotovili, da so nekateri PCR-ribotipi človeških izolatov enaki PCR-ribotipom živalskih izolatov. Med njimi sta tudi PCR-ribotipa 017 in 027, ki sta pri ljudeh v zadnjih desetih letih povezana z resnimi izbruhi bolezni.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil optimizirati gojitveno metodo za osamitev bakterije *C. difficile* iz blata živali, ugotoviti pogostnost bakterije *C. difficile* pri teličkih, domači perjadi ter psih in mačkah v Sloveniji (Podravska regija), s tipizacijskima metodama PCR-ribotipizacije in toksinotipizacije ugotovili raznolikost tipov pri živalih in primerjati te tipe s tipi iz zbirke sevov Oddelka za raziskovalno dejavnost, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

Delovna hipoteza predvideva, da:

- je delež koloniziranih teličkov, perutnine in ostale domače perjadi, mačk ter psov v Sloveniji primerljiv z že objavljenimi podatki iz drugih držav
- se gojišča z različnimi selektivnimi antibiotiki (dodatkom, ki vsebuje norfloksacin, moksalaktam in cistein hidroklorid (CDMN) ali dodatkom, ki vsebuje D-cikloserin in cefoksitin(CC)) razlikujejo glede na uspešnost osamitve
- na posamezni farmi prevladuje en genotip *C. difficile*
- so nekateri genotipi *C. difficile* živalskega izvora identični tistim človeškega izvora

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Clostridium difficile*

2.1.1 Mikrob

C. difficile je obligatno anaerobna, paličasta, gibljiva, sporogena in po Gramu pozitivna bakterija. Ovalne endospore ležijo subterminalno (Hatheway, 1990). Peritriha običkanost celici, veliki 0,5 X 3-6 µm, omogoča gibanje. Pri nekaterih sevih lahko opazimo, da se dve do šest celic s konci stikajo. Genom *C. difficile* je velik približno 4,4 Mb, odvisno od seva (Sebahia in sod., 2006), in vsebuje nizki delež gvanina in citozina (Baverud, 2002).

Kolonije so na krvnem agarju sivkaste do belkaste, ploščate ali rahlo konveksne, okrogle ali rizoidne z motno do svetlečo površino. Značilen vonj kulture spominja na vonj konjskih iztrebkov. Optimalna temperatura za *in vitro* rast je med 30 °C in 37 °C. Po 48 do 72 urah inkubacije v primernih pogojih večina celic tvori spore (Baverud, 2002).

2.1.2 Zgodovinski pregled

Bakterijo *C. difficile* sta prva opisala avtorja Hall in O`Toole že leta 1935 kot del normalne črevesne mikrobne flore novorojenčkov. Zaradi zahtevne osamitve in preučevanja sta ga poimenovala *Bacillus difficilis* (Hall in O`Toole, 1935, cit. po Lysterly in sod., 1988). Ker je organizem po Gramu pozitivna anaerobna sporulirajoča palčka, so ga kasneje uvrstili v bakterijski rod *Clostridium* (Baverud, 2002). Zaradi sposobnosti določenih sevov, da proizvajajo toksine so predpostavili, da so učinki te bakterije na človeka v določenih pogojih lahko tudi patogeni (Hall in O Toole, 1935, cit. po Lysterly in sod., 1988).

Leta 1974 so potekale tri neodvisne raziskave, ki so bile ključne za razumevanje vloge *C. difficile* pri ljudeh. V eni od teh raziskav so Green in sodelavci v črevesju morskega prašička zdravljenega s penicilinom našli citotoksin (Green, 1974, cit. po Brazier, 1998). Tadesco in sodelavci so v tem času ugotovili, da antibiotično zdravljenje s klindamicinom pri ljudeh lahko vodi v razvoj pseudomembranoznega kolitisa (Tadesco in sod., 1974 cit. po Brazier, 1998). Istočasno je Hafiz s sodelavci preučeval *C. difficile* in njegovo

toksičnost (Hafiz in Oakley, 1976, cit. po Brazier, 1998). Vsa ta dognanja je Bartlett s skupino raziskovalcev leta 1977 združil in na modelu hrčka dokazal, da je *C. difficile* vzrok za pojav driske po antibiotičnem zdravljenju (Bartlett in sod., 1977, cit. po Brazier, 1998).

Prva poročanja o prisotnosti in osamitvi bakterije iz živalskih vzorcev so se pojavila že v začetku sedemdesetih letih (Baverud, 2002).

2.2 PATOGENEZA

2.2.1. Bolezenski znaki, ki jih povzroča *C. difficile*

C. difficile povzroča širok spekter bolezni, od asimptomatske okužbe do občasno smrtnega pseudomembranoznega kolitisa. Bolezen lahko poteka kot lažja vodena driska, kolitis s sluzavo ali krvavo drisko ali v hujšem primeru kot pseudomembranozni kolitis. Drisko lahko pri nekaterih bolnih spremlja vročina, levkocitoza, včasih pa tudi trebušne bolečine ali krči. Pojavi se lahko tudi omotičnost, hujšanje, hipoalbuminemija, krvavitev iz črevesa in dehidracija. Resne zaplete okužbe s *C. difficile* (CDI; angl. *Clostridium difficile* infection) predstavljajo vnetne poškodbe in tvorba pseudomembran v črevesu, vnetje in tanjšanje debelega črevesa, ki lahko vodi do predrtja črevesa (toksični megakolon), sepsa, šok in celo smrt (Bartlett, 1994). Izvenčrevesne okužbe s *C. difficile* so redke. Opisani so posamezni primeri bakteriemije, abscesa vranice in trebušne slinavke ter okužbe mehkih tkiv, urogenitalnega trakta, plevre in implantiranih protetičnih pripomočkov (Jacobs, 2001, Lyerly in sod., 1988). Driska povezana s *C. difficile* se pri 5-30 % zdravljenih bolnikov ponovi, vendar ne zaradi neuspelega zdravljenja, ampak v večini primerov kot ponovna okužba, kjer v 20-50 % ponovno bolezen povzročijo nove bakterije *C. difficile* (Johnson in Gerding, 1998; Rupnik in sod., 2009).

2.2.2. Dejavniki virulence pri bakteriji *C. difficile*

2.2.2.1. Toksini

Glavna dejavnika virulence bakterije *C. difficile* sta toksin A ali TcdA in toksin B ali TcdB. Določeni sevi lahko izdelujejo tudi binarni toksin CDT.

Sevi, ki proizvajajo vsaj enega od treh znanih toksinov so toksigeni sevi. Poznamo sedem vzorcev proizvodnje toksinov: A+B+CDT-, A+B+CDT+, A-B+CDT+, A-B+ CDT-, A+B-CDT+, A-B-CDT+ in A-B-CDT-. Netoksigeni sevi so sevi, ki ne proizvajajo nobenega od treh toksinov (Rupnik in sod., 2005), vendar običajno izraz toksigen in netoksigen uporabljamo le glede na produkcijo toksinov A in B.

TcdA in TcdB uvrščamo v skupino velikih klostridijskih toksinov (LCT; angl. Large clostridial toxins). V to skupino uvrščamo še tri druge klostridijske toksine, ki jih proizvajata *Clostridium sordelii* in *Clostridium novyi*. Toksini LCT so si po strukturi in delovanju podobni. So monoglikoziltransferaze in na človeško debelo črevo delujejo citotoksično in nekateri enterotoksično (Rupnik in Just, 2006). Toksini LCT so poimenovani na podlagi bakterijskega imena in določenega toksina, pri *C. difficile* Tcd po imenu bakterije *C. difficile* in TcdA in TcdB za toksina A in B (Rupnik in sod., 2005).

Toksina A in B sta eksotoksina, ki po velikosti spadata med največje bakterijske toksine. TcdA je 308 kDa velik enterotoksin. TcdB je citotoksin, velik 270 kDa. Oba toksina sta citotoksična in glikoziltransferazi, ki katalizirata prenos glukoznega ostanka iz UDP-glukoze na majhne GTPaze iz poddružin Rho in Ras. Signalizacija, ki je odvisna od GTPaz, se zaradi te modifikacije prekine, posledica je depolimerizacija aktina F in tako porušenje citoskeleta, zaokrožanje celic in celična smrt. (von Eichel-Streiber in sod., 1996; Rupnik in Just, 2006). V zgodnjih raziskavah so avtorji navajali, da toksina delujeta sinergistično, vendar naj bi toksin A imel pomembnejšo vlogo pri delovanju v črevesu, toksin B pa naj bi deloval tudi sistemsko (Lyerly in sod., 1985). Novejše študije, v katerih so primerjali divjji tip z mutantami brez toksina A ali brez toksina B pa kažejo, da je toksin B nujen dejavnik virulence (Lyras in sod., 2009).

Na nivoju aminokislinskega zaporedja sta si toksina podobna v 63 % in naj bi nastala s podvojitvijo gena. Sta enoverižni beljakovini, sestavljeni iz treh funkcionalnih enot. Encimska (katalitična domena) se nahaja na N-terminalnem delu, centralna hidrofobna domena omogoča prenos toksina čez evkariontsko celično membrano, domena na C-terminalnem delu beljakovine pa je odgovorna za vezavo toksina na gostiteljev celični receptor (von Eichel-Streiber in sod., 1996).

Na C terminalnih koncih toksinov lahko najdemo več homolognih regij, ki jih imenujemo »combined repetitive oligopeptides« (CROPs). Te ponovitve prepoznajo monoklonska in poliklonska protitelesa večine encimsko imunskih testov. Omenjene ponovitve so prav tako odgovorne za vezavo toksina na celični receptor (Lyerly in sod., 1988).

Toksin TcdA in TcdB sta zapisana na 19 kb dolgem toksinskem lokusu imenovanem PaLoc, ki se nahaja na bakterijskem kromosomu. Poleg zapisov *tcdA* in *tcdB* v regiji PaLoc najdemo še tri gene, in sicer *tcdC*, *tcdE* in *tcdR* (Braun in sod., 1996). Gen *tcdC* kodira negativni regulator prepisa genov *tcdA* in *tcdB* (Matamouros in sod., 2007), produkt gena *tcdR* je alternativni faktor sigma, ki pozitivno vpliva na izražanje prepisovanja obeh toksinskih genov (Dupuy in sod., 2006), *tcdE* pa kodira hidrofoben protein TcdE, ki naj bi omogočal sprostitvev toksina iz celice (Tan in sod., 2001). Netoksigeni sevi imajo PaLoc odsek zamenjan s 115 bp dolgim zaporedjem (Braun in sod., 1996).

Binarni toksin CDT ni soroden toksinoma TcdA in TcdB. Uvrščamo ga v skupino klostridijskih binarnih toksinov, ki so sestavljeni iz dveh proteinskih podenot, katalitične podenote imenovane CdtA, in vezavne podenote CdtB, ki se veže na gostiteljsko celico in nato prenese katalitično enoto v citosol. Za toksično delovanje toksina sta potrebni obe podenoti (Perelle in sod., 1997). Je ADP-riboziltransferaza, ki povzroča depolimerizacijo aktinskih filamentov (Popoff in sod., 1988). Sev, pri katerem so binarni toksin CDT prvič zaznali, je izviral iz pacienta s hudim pseudomembranoznim kolitisom (Popoff in sod., 1988), vendar vloga binarnega toksina CDT pri razvoju bolezni zaenkrat še ni popolnoma pojasnjena. *In vitro* ima na celice Vero citotoksičen učinek, prav tako enterotoksičen učinek na poskusnih kuncih. Vendar pa sevi divjega tipa, ki proizvajajo binarni toksin CDT, a ne toksinov TcdA ali TcdB, hrčke kolonizirajo, a ne povzročajo smrti (Gerič in sod., 2006). Učinka binarnega toksina CDT na črevesno steno živali kot so konji in telički

danes še ne poznamo (Kuijper in sod., 2006). Nukleotidno zaporedje regije, ki nosi zapis za binarni toksin CDT, najdemo na 4.3 kb dolgem toksinskem lokusu imenovanem CdtLoc, ki ga sestavljata gena *cdtA* in *cdtB* ter regulatorni gen *cdtR* (Carter in sod., 2007).

2.2.2.2. Ostali dejavniki virulence

K večji virulenci sevov prispevajo še beljakovine na bakterijski površini (Cwp66, SlpA), ki sodelujejo pri interakciji bakterije s črevesno sluznico (Karjalainen in sod., 2001; Waligora in sod., 2001). Površinske beljakovine lahko pri gostitelju povzročijo vnetje in nastanek protiteles (Pechine in sod., 2005). Med sevi so lahko različne, še posebej velja to za površinsko beljakovino A (SlpA). Spremembe tega proteina najdemo pri epidemičnem sevu BI/NAP1/027, kjer bi lahko vplivale na vezavo bakterije na človeške črevesne epitelne celice in tako prispevale k večji virulenci tega seva (Rupnik in sod., 2009).

Dejavniki virulence so tudi hidrolitični encimi (hialuronidaza, želatinaza, nevraminidaza in kolagenaza), ki lahko sproščajo hranilne snovi in sodelujejo pri razgradnji vezivnega tkiva (Wilson in Perini, 1988; Seddon in sod., 1990).

Nekateri sevi tvorijo tudi kapsulo, ki jih ščiti pred fagocitozo (Borriello, 1998).

Virulenca sevov je odvisna tudi od odpornosti bakterije proti antibiotikom, ker odpornost bakterije proti antibiotiku ki ga bolnik dobiva, tej omogoča, da črevo kolonizira že med zdravljenjem (George in sod., 1982, Lysterly in sod., 1988). Nekateri antibiotiki pa vplivajo tudi na povečano izražanje faktorjev, pomembnih pri kolonizaciji bakterije *C. difficile* (Deneve in sod., 2008).

2.2.1 Patogeneza

Gostitelja pred okužbo s *C. difficile* varuje normalna črevesna mikrobna flora, ker prepreči kolonizacijo bakterij *C. difficile* in namnoževanje že prisotnih spor v črevesu. Ko se poruši

ravnovesje v normalni črevesni mikrobnii flori, kar lahko povzročimo z antibiotičnim zdravljenjem, se *C. difficile* v črevesu namnoži.

Kot že omenjeno, lahko bolezenske znake povzročajo sevi, ki izdelujejo TcdA in/ali TcdB imenovani toksigeni sevi. Patogeni učinek sevov, ki izdelujejo samo toksin CDT, ne pa tudi toksinov TcdA in TcdB (sevi A-B-CDT+) pri človeku zaenkrat še ni dokazan (Rupnik, 2008).

Toksin A se veže na slabo karakteriziran receptor v črevesju na apikalni, zunanji strani črevesnega epitelija, nato z endocitozo vstopi v citoplazmo, kjer povzroči poškodbe citoskeleta in tesnih stikov epitelijjskih celic. Zaradi okvare tesnih stikov, celične smrti epitelijjskih celic ali proizvodjanja vnetnih mediatorjev, ki privabljajo nevtrofilce, se epitelijjska prepreka zrahlja. Okvara tesnih stikov med epitelijjskimi celicami toksinoma A in B nato omogoča vstop čez epitelij. TcdB se na celično membrano veže na bazolateralni strani epitelija. Oba toksina, TcdA in TcdB sta citotoksična in spodbudita sproščanje mediatorjev vnetja epitelijjskih celic, fagocitov in mastocitov, kar vodi v vnetje in kopičenje nevtrofilcev. Delovanje toksinov pri bolniku povzroči izločanje tekočine, vnetje in poškodbo črevesne sluznice, ki vodi k razvoju driske in pseudomembranoznega kolitisa (Pothoulakis, 2000).

2.2.1.1 Zdravljenje CDI

Prvi korak pri zdravljenju simptomatične okužbe s *C. difficile* je prekinitev antimikrobne terapije, saj je obnovitev normalne mikrobne flore najučinkovitejši pristop zdravljenja teh bolnikov (Rupnik in sod., 2009). Če ta ukrep ne zadostuje, bolnike s CDI zdravimo z metronidazolom ali vankomicinom. Za zdravljenje so zaradi primerljivega učinka z vankomicinom, cene in zaradi bojazni pred pojavom proti vankomicinu odpornih bakterij včasih raje priporočali metronidazol (McMaster-Baxter in Musher, 2007). Oba antibiotika pa vseeno vplivata tudi na črevesno floro, zato se po nekaj dneh ali tednih po končanem zdravljenju pri zdravljenih bolnikih driska lahko ponovno pojavi. Najbolj učinkovito zdravljenje takih bolnikov je zaviranje rasti *C. difficile* z dajanjem vankomicina vsak drugi ali tretji dan, ki zavira rast *C. difficile*, dokler se normalna mikrobna flora ne obnovi

(Rupnik in sod., 2009). Težke primere ponavljajočih okužb lahko uspešno zdravimo tudi »s fekalnimi transplantanti« (Rupnik in Kotnik Kevorkijan, 2009).

Za zdravljenje CDI danes razvijajo nove terapevtske učinkovine, kot so antibiotiki, ki ne poškodujejo normalne mikrobne flore, cepiva, učinkovine, ki nase vežejo toksine in pasivna protitelesa, vključno z monoklonskimi protitelesi usmerjenimi proti toksinom TcdA in TcdB (Babcock in sod., 2006, Rupnik in sod., 2009).

Tudi alternativno zdravljenje, kot so uporaba probiotikov in prebiotikov so lahko v številnih primerih uspešne. Probiotiki s kolonizacijo patogenim bakterijam preprečujejo s produkcijo inhibitornih substanc (organske kisline, vodikov peroksid, bakteriocini), s tekmovanjem za vezavna mesta, tekmovanjem za hranila, razgradnjo receptorjev za vezavo toksina in spodbujanje imunskega odziva (Rolfe, 2000). Na normalno črevesno floro pozitivno vplivajo tudi nekateri prebiotiki, kot nekateri oligosaharidi (fruktooligosaharidi, inulin, ...) (Hopkins in Macfarlane, 2003).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA

2.3.1 Epidemiologija *C. difficile* pri ljudeh

Bakterija *C. difficile* je eden izmed pomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. Z bakterijo *C. difficile* je koloniziranih od 16-35 % hospitaliziranih bolnikov (Kuijper in sod., 2006). Verjetnost okužbe pri bolnikih, ki bivajo v bolnišnicah narašča s časom bivanja v ustanovi in s trajanjem antibiotičnega zdravljenja. (Johnson in Gerding, 1998). Z bakterijo *C. difficile* je koloniziranih tudi 1-3 % zdravih odraslih ljudi, kjer je delež kolonizacije nekoliko višji pri bolnišničnem osebju in do 70 % zdravih novorojenčkov (Bartett, 1994). Dojenčki kljub visokim titrom toksina A in B v blatu ne zbolijo (Lyerly in sod., 1988).

Genotipi *C. difficile*, ki povzročajo izbruhe in pogosto težje oblike bolezni, se od države do države razlikujejo. V Avstriji naprimer prevladuje PCR-ribotip 053, na Madžarskem PCR-ribotip 014, v nekaterih drugih državah pa PCR-ribotip 078 (Terhes in sod., 2006, Rupnik in Kotnik Kevorkijan, 2009). V ZDA, Kanadi in severni Evropi izbruhe CDI povzroča nov

epidemičen sev, ki ga s PCR-ribotipizacijo uvrstimo v tip 027, s PFGE v tip NAP1 (angl. North America pulsotype 1), s tipizacijo REA v tip BI in toksinotipizacijo v toksinotip III (BI/NAP1/027). Sev ima povečano virulenco in/ali odpornost proti antibiotikom. Trenutno se po svetu širi tudi toksinotip VIII, ki ga prav tako povezujemo z izbruhi in/ali resnejšo obliko bolezni (Kuijper in sod., 2006).

2.3.2 Epidemiologija *C. difficile* pri ljudeh v Sloveniji

V Sloveniji število okužb s *C. difficile* pri ljudeh zaenkrat znatno ne narašča (Rupnik in Kotnik Kevorkijan, 2009). Opažajo pa, da rahlo narašča število laboratorijskih preiskav in le rahel porast števila *C. difficile* pozitivnih vzorcev. Po podatkih UKC Maribor je velik del okužb s *C. difficile* pridobljen doma, vendar je večina teh bolnikov predhodno bila v stiku z zdravstvenimi ustanovami, opaziti pa je tudi manjši porast srednje hudih in hudih potekov bolezni. O pojavu visokovirulentnega tipa III/BI/NAP1/027, ki je trenutno povezan z izbruhi v svetu, v Sloveniji do danes še niso poročali (Rupnik in Kotnik Kevorkijan, 2009), genotip 078 pa so zasledili le v nekaj primerih. V mariborski regiji so v obdobju od leta 2006 do 2008 med izolati prevladovali izolati *C. difficile* toksinotipa 0 (21 različnih PCR-ribotipov), v manjšem deležu med izolati najdemo toksinotip IV (SLO 013/023), toksinotip V (078), toksinotip XII (056 in SLO 058) in toksinotip XXI (SLO 021).

2.3.3 Spremembe v epidemiologiji okužb s *C. difficile* pri ljudeh

V zadnjem času v epidemiologiji okužb s *C. difficile* (CDI) prihaja do sprememb, saj pogostnost in resnost bolezni, povzročene s *C. difficile* narašča (McDonald in sod., 2006). Narašča tudi število izvenbolnišničnih okužb, bolezen se pojavlja pri mladih, zdravih osebah, ki niso bile izpostavljene dejavnikom tveganja (Chernak in sod., 2005). Te epidemiološke spremembe so lahko posledica selekcijskega pritiska v okolju, kot je trend spreminjanja vrst antibiotikov v bolnišničnih in izven-bolnišničnih okoljih ter pojav novih variantnih tipov, kot je BI/NAP1/027. Vzrok je lahko tudi vnos bakterije iz/v enega od več možnih rezervoarjev. Eden od teh možnih rezervoarjev so živali (Rupnik, 2007b).

Primerjave živalskih in človeških izolatov s PCR-ribotipizacijo so pokazale, da se nekateri *C. difficile* PCR-ribotipi osamljeni iz živali prekrivajo s PCR-ribotipi, ki so osamljeni iz ljudi (Arroyo in sod., 2005b; Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007).

Ena od sprememb v epidemiologiji je tudi naraščanje pogostnosti variantnih sevov.

Sevi s spremembami na PaLoc lokusu (variantni sevi *C. difficile*), ponavadi proizvajajo še tretji toksin, binarni toksin CDT (Rupnik, 2001). Prevalenca sevov s sposobnostjo tvorbe binarnega toksina CDT med človeškimi izolati je v preteklosti bila med 1,6 % - 10 %. Pri živalih je pogostnost takih izolatov pri konjih štela do 43 %, pri prašičkih do 83 % in pri govedu kar do 100 % (Rupnik, 2007b). Na prvi pogled je izgledalo, da ljudi in živali naseljujejo dokaj različni sevi *C. difficile*. V zadnjih letih pa se je odstotek človeških izolatov, ki proizvajajo binarni toksin CDT, povišal, po nekaterih podatkih iz Italije z 0 % na kar 45 % (Spigaglia in Manstrantonio, 2004). Ti sevi v izvenbolnišničnem okolju pogosto povzročijo resno bolezen (Terhes in sod., 2004). V bolnišnicah lahko delež CDT pozitivnih sevov preseže celo 50 %, kjer izbruhe pogosto povzroča sev BI/NAP1/027 ali kombinacija drugih CDT pozitivnih sevov (McEllistrem in sod., 2005).

2.3.4 Prenos

Ključni dejavnik za širjenje CDI je kontaminacija okolja s sporami *C. difficile*, saj lahko bakterijo izoliramo iz zemlje, vode, prebavil ljudi in živali, surove zelenjave,... (Al Saif in Brazier, 1996; Baverud in sod., 2002; Rodriguez-Palacios in sod., 2007). Eden od možnih virov okužbe s *C. difficile* je tudi meso, s katerim se bakterija posredno prenese iz živali na človeka. Po poročilih iz Severne Amerike lahko *C. difficile* izoliramo iz približno 20 % surovega mesa in ostalih mesnih proizvodov. Nekateri *C. difficile* PCR-ribotipe osamljene iz mesa lahko najdemo tudi psih, teličkih in tudi ljudeh (Rodriguez-Palacios in sod., 2007).

Bakterija je splošno razširjena zaradi zmožnosti tvorbe spor, ki so odporne proti vročini, izsuševanju in kisiku ter se zato v okolju dalj časa ohranijo. Spore *C. difficile* so odporne tudi proti velikemu številu komercialnih razkužil (Wilcox in Fawley, 2000). Uniči jih zadostna koncentracija razkužil na klorovi osnovi. Zaradi vprašljivega učinka večih

razkužil, prisotnosti zemlje in organskih snovi v hlevu, lahko v njem pričakujemo prisotnost endemičnih sevov (Rodriguez-Palacios in sod., 2006).

2.3.5 Dejavniki tveganja

Kot že omenjeno se CDI ponavadi razvije pri osebah s porušnim ravnotežjem v normalni črevesni flori po jemanju antibiotikov, kemoterapiji ali po kirurških posegih na področju prebavil. Z razvojem CDI lahko povežemo antibiotike kot so: klindamicin, cefalosporini in od nedavnega tudi nekateri fluorokinoloni kot so levofloksacin, moksifloksacin, gatifloksacin in ciprofloksacin. Uporaba fluorokinolonov je povezana s povečano incidenco *C. difficile* BI/NAP1/027 in ostalih sevov, ki so močno odporni proti fluorokinolonom. Veliko tveganje za razvoj CDI predstavlja tudi bivanje v bolnišnici, ker združuje izpostavljenost antibiotikom, okolje kontaminirano s sporami, slabo higieno rok bolnišničnega osebja in populacijo starejših bolnikov, saj je dejavnik tveganja za razvoj bolezni tudi starost nad 60 let (Rupnik in sod., 2009). Okužba s *C. difficile* se je začela vse bolj pojavljati pri ljudeh z nizkim tveganjem, kot so otroci ali nosečnice (Kim in sod., 2008; Roupheal in sod., 2008).

2.3.6 Preprečevanje CDI

Učinkovite metode preprečevanja CDI v bolnišnicah so osamitev bolnikov s CDI in zaščita bolnišničnega osebja z zaščitnimi oblačili in rokavicami. Alkoholna razkužila in geli ne uničijo *C. difficile* spor, zato je priporočljivo umivanje rok z vodo in milom.

Čiščenje okolja kontaminiranega s *C. difficile* predstavlja izziv. Pri čiščenju okolja z razkužili moramo paziti, da ne uporabljamo neprimernih koncentracij in vrst razkužil. Spore učinkovito uničujejo klorova razkužila, vendar so korozivna, imajo dražljiv vonj in dražijo kožo (Rupnik in sod., 2009).

2.4 BAKTERIJA *C. difficile* PRI ŽIVALIH

2.4.1 Epidemiologija *C. difficile* pri živalih

Bakterija *C. difficile* postaja vse bolj poznana in pomembna tudi pri živalih. *C. difficile* lahko osamimo iz večih živalskih vrst, tako zdravih kot bolnih (Weese in sod., 2001; Baverud, 2002; Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Songer in Anderson., 2006; Hammit in sod., 2007). V zadnjih študijah o *C. difficile* lahko zasledimo, da lahko bakterijo najdemo pri domačih živalih kot so perutnina, ovce (Al Saif in Brazier, 1996; Simango, 2006), prašiči (Songer in sod., 2000; Songer in Anderson, 2006), koze (Simango, 2006) in telički (Rodruigez-Palacios in sod., 2006).

Vloga *C. difficile* pri teličkih še ni jasna. Bakterijo in toksine, ki jih proizvaja lahko zaznamo pri teličkih z drisko in pri na videz zdravih teličkih (Rodruigez-Palacios in sod., 2006; Hammit in sod., 2007). V Kanadi so pri teličkih z in brez bolezenskih znakov našli osem različnih PCR-ribotipov (preglednica 1), štirje od teh so pripadali variantnim tipom: PCR-ribotipu 078 (toksinotip V), PCR-ribotipu 017 (toksinotip VIII), PCR-ribotipu 027 (toksinotip III) in PCR-ribotipu 033 (toksinotip XI) (Rodriguez-Palacios in sod., 2006).

O bakteriji *C. difficile* pri perjadi še ne vemo veliko. Po nekaterih poročanjih lahko spore *C. difficile* najdemo v puranjem mesu (37,5 %) (Songer in sod., 2009). Prvi obsežnejši raziskavi o bakteriji pri perutnini sta bili narejeni v Afriki (Simango, 2006; Simango in Mwakurudza, 2008).

Tusi vloga *C. difficile* pri psih še ni popolnoma jasna, saj lahko *C. difficile* toksina A in/ali B dokažemo tako v blatu psov z drisko kot blatu zdravih psov, pri slednjem sicer v nekoliko manjšem obsegu. Ker je po nekaterih poročilih *C. difficile* prisoten pri 0-40 % zdravih psov je bakterija pri psih za večino avtorjev nepomembna bakterija. Za razvoj CDI pri psih antibiotično zdravljenje ni vedno predpogoj (Weese in sod., 2001). Bakterijo pogosto osamimo tudi iz asimptomatskih mladih psičkov, po nekaterih poročanjih iz 46 % in 94 % psičkov starih do deset tednov in iz 42,9 % njihovih mater (Baverud, 2002). Domači ljubljenci so lahko nosilci toksigenih in netoksigenih sevov bakterije *C. difficile*,

prav tako jo je mogoče osamiti iz njihovega neposrednega okolja, kot so naprimer površine veterinarskih bolnišnic (Borriello in sod., 1983), kar kaže na možnost prenosa bakterije iz živali na človeka. Prenos *C. difficile* iz živali na človeka je še posebej mogoč v primerih, ko je hišnemu ljubljencu, ki je nosilec bakterije, izpostavljena populacija ljudi z visokim tveganjem. V Kanadi so naprimer iz psa, ki obiskuje bolnike v bolnišnicah, osamili *C. difficile* toksinotipa III in PCR-ribotipa 027 (Lefebvre in sod., 2009), ki je odgovoren za epidemije CDI pri ljudeh. Ta primer potrjuje domnevo, da bi živali lahko bile vektor pri prenosu bakterije v bolnišnici ali prenosu bakterije iz bolnišničnega okolja v skupnost.

Raznolikost izolatov najdenih pri živalih (30-50 PCR-ribotipov) je v primerjavi s človeškimi sevi *C. difficile*, kjer poznamo približno 190 različnih PCR-ribotipov, očitno manjša. Najbolj pogosti PCR-ribotipi človeških izolatov in najbolj pogosti PCR-ribotipi živalskih izolatov se razlikujejo. Nekatere PCR-ribotipe pa lahko najdemo pri obeh gostiteljih (Arroyo in sod., 2005b; Rodruiguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007; Goorhous in sod., 2008). Telečji in tudi prašičji izolati so manj raznoliki kot izolati izolirani iz psov, konjev in človeka (preglednica 1). Pri žrebičkih lahko naprimer med 20 izolati najdemo 10 različnih PCR-ribotipov (Keel in sod., 2007). Do danes so pri živalskih gostiteljih poročali o šestih toksinotipih: III, IV, V, VIII, XI in XII. Izgleda, da je toksinotip V še posebej prilagojen na živali, saj prevladuje pri treh različnih živalskih vrstah po vsem svetu (Rupnik, 2008). Toksinotip V PCR-ribotipa 078 prevladuje predvsem pri prašičih (Keel in sod., 2007; Debast in sod., 2009). Izolate toksinotipa V, pogosto najdemo tudi pri govedu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007) in konjih (Rupnik in Marks, 2009). Podatkov o tipih določenih s katero od molekularnih metod je pri ostalih živalskih vrstah malo.

Preglednica 1: Pregled genotipov *C. difficile* pri živalih po objavah.

vrsta živali	tip*	država	vir
telički	078, 002, 033	ZDA	Hammit in sod., 2007
telički	017, 078, 027, 014, 033, 077	Kanada	Rodriguez-Palacios in sod., 2006
telički	078, 002, 033	ZDA	Keel in sod., 2007
prašički	078, 126, 002, 033		
psički	009, 010, 015, 020, 077		
konji	001, 002, 009, 010, 012, 015, 020, 078, 137, 154		
prašički	0, V (066)	Slovenija	Pirš in sod., 2008
telički	XIa (033)		
prašički	V (078)	Nizozemska	Debast in sod., 2009

* tip je podan kot toksinotip (rimska številka) ali ribotip (arabska številka)

2.4.1.1 Epidemiologija *C. difficile* pri živalih v Sloveniji

Tako kot drugod po svetu, je tudi v Sloveniji raznolikost telečjih in prašičjih izolatov nizka (preglednica 1). Ponavadi na eni farmi najdemo le en PCR-ribotip (Pirš in sod., 2009).

V Sloveniji med prašičjimi izolati najdemo *C. difficile* toksinotipa 0 (31/133 izolatov) in toksinotipa V(102/133 izolatov), pri teličkih pa *C. difficile* toksinotipa XIa, PCR-ribotipa 033 (Pirš in sod., 2008). Ta tip so pri govedu našli tudi že v Kanadi in ZDA (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007). V nasprotju z ameriškimi poročanji pri naših prašičjih *C. difficile* izolatih toksinotipa V najdemo PCR-ribotip 066 in ne 078 (Pirš in sod., 2008).

2.5 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA *C. difficile*

Za postavitev diagnoze CDI pri bolnikih z ustreznimi kliničnimi znaki v tekočem blatu dokazujemo toksine ali toksinogeno bakterijo *C. difficile*. Teste, ki jih uporabljamo v diagnostiki CDI razdelimo v: teste za zaznavo molekul specifičnih za *C. difficile*, kot so glutamat dehidrogenaza (GDH), toksini, lahkohlapne maščobne kisline; v teste, kjer zaznavamo *C. difficile* gene (16S rRNA, toksinske gene) in gojitvene metode, kjer iz vzorca skušamo osamiti toksinogeno bakterijo (Delmee, 2001).

Za »zlati standard« diagnoze CDI je veljal citotoksični test na celičnih kulturah, vendar v rutinski diagnostiki ni več razširjen. *C. difficile* lahko dokažemo še z osamitvijo bakterije iz vzorca, ki mu sledi test citotoksičnosti, s katerim potrdimo sposobnost proizvodnje toksina ali toksinov dobljenega izolata (Rupnik in sod., 2009). Tako citotoksični test kot gojitvena metoda sta zelo specifična in občutljiva, njuna slabost pa je zamudnost, saj rezultate dobimo šele po 48 urah (Staneck in sod., 1996; Hurley in Nguyen, 2002). Pri testu citotoksičnosti se srečamo tudi s problemom vzdrževanja celičnih linij, saj je to zamudno in drago (Baverud, 2002).

Za dokaz toksinov TcdB in/ali TcdA v vzorcu blata so v uporabi številni komercialni encimsko imunski testi. So visoko specifični vendar manj občutljivi kot dokaz citotoksičnosti na celični kulturi. Testi so enostavni in 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 (Rupnik, 2008).

Toksine *C. difficile* so s hitrimi testi dokazovali tudi že v živalskih vzorcih blata (konjev, teličkov, psov, prašičkov), vendar občutljivosti in specifičnosti testa pri preiskavi tovrstnih vzorcev z izjemo psičkov v primerjavi s testom citotoksičnosti na celičnih kulturah do danes še ne poznamo (Baverud, 2002).

Občutljive in hitre metode s katerimi lahko dokažemo prisotnost bakterije v vzorcu so tudi molekularne metode. Omogočajo nam zaznavo gena, ki kodira toksin B, podajo nam lahko

podatke o prisotnosti binarnega toksina in markerja, ki ju ima hipervirulentni sev BI/NAP1/027.

Toksigene seve lahko nosijo tudi asimptomatski prenašalci, zato je pri testih, ki ne zaznavajo neposredne toksinske aktivnosti rezultate potrebno uskladiti s klinično sliko in rezultati zdravljenja bolnika (Rupnik in sod., 2009).

Za diagnostiko *C. difficile* je priporočljiva uporaba dvostopenjskega testiranja, kjer v prvem koraku uporabimo test z visoko občutljivostjo, kot je dokaz encima glutamat dehidrogenaze ali L-prolin aminopeptidaze, ki ju proizvaja večina *C. difficile* sevov. V drugem koraku uporabimo test z večjo specifičnostjo (Fedorko in Williams, 1997; Ticehurst in sod., 2006).

2.6 OSAMITEV BAKTERIJE *C. difficile*

2.6.1 Vzorec

Za osamitev bakterije *C. difficile* iz blata je priporočljiva uporaba svežega vzorca. Zaradi hitre sporulacije bakterije v blatu lahko vzorec več mesecev shranjujemo na 4 °C ali celo desetletje zamrznjenega na -70 °C. Vegetativne oblike organizma shranjevanja v aerobnih pogojih ne preživijo (Brazier in Boriello, 2000). Toksini so v vzorcih blata na temperaturi 4 °C stabilni vsaj 60 dni. V vzorcih blata, ki jih hranimo na sobni temperaturi pa hitro denaturirajo. V dveh dneh se titer toksinov v blatu hranjenem na sobni temperaturi lahko zmanjša kar 100 krat (Bowman in Riley, 1986).

2.6.2 Osamitev bakterije

V postopku osamitve *C. difficile* uporabljamo antibiotike, s katerimi zavremo rast normalne črevesne mikrobne flore. Priporočljiva je tudi uporaba alkoholnega (etanolnega) šoka, kjer selektivno izberemo *C. difficile* spore. Za osamitev *C. difficile* iz bolnikov s CDI uporaba bogatitve ni potrebna, vendar je uporabna metoda v okoljskih raziskavah.

2.6.2.1 Razvoj selektivnih gojišč za izolacijo *Clostridium difficile*

Clostridium difficile sta leta 1935 prva iz blata novorojenčkov osamila Hall in O` Toole in predlagala ime »difficile«, ker je organizem bilo zelo težko osamiti (Hall in O`Toole, 1935, cit. po Lysterly in sod., 1988). Hafiz in Oakley sta na podlagi opažanj, da je organizem neobčutljiv na krezol, ki ga med rastjo proizvaja, razvila selektivno gojišče, ki bi omogočalo osamitev *C. difficile*. Klostridijskemu mediju sta dodala 0,2 % fenol ali p-krezol (Hafiz in Oakley, 1976, cit. po Brazier, 1998). Kasneje je skupina raziskovalcev ugotovila, da to selektivno gojišče v primerjavi s krvnim gojiščem na rast *C. difficile* pravzaprav deluje zavirujoče (George in sod., 1979). Zato so za osamitev *C. difficile* predlagali uporabo hranljivega gojišča z dodatkom fruktoze in jačnega rumenjaka za diferenciacijo ter D-cikloserina in cefoksitina, ki omogočata selekcijo. D-cikloserin (500 mikro g/ml) in cefoksitin (16 mikrog/ml) zavirata rast večine bakterij iz družine *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus faecalis*, stafilokoke, nesporulirajoče po Gramu negativne bacile in vrste iz rodu *Clostridia*, ki jih lahko najdemo v blatu, z izjemo *C. difficile*. Zaradi visokih koncentracij teh selektivnih dodatkov nekaterih sevov *C. difficile* zaradi nizke minimalne inhibitorne koncentracije na tem gojišču ni bilo mogoče gojiti. Zato so k zmanjšanim koncentracijam D-cikloserina (125 mikrog/ml) in cefoksitina (4 mikrog/ml) v postopek osamitve vključili alkoholni šok, ki prav tako deluje selektivno (Levett, 1985). Če gojišče vsebuje 7 % konjske krvi, se to kaže v povečanem številu kolonij *C. difficile* na plošči. Kolonije so na teh ploščah v primerjavi s kolonijami na ploščah z jajčnim rumenjako večje (Phillips in Rogers, 1981). Alternativno lahko za osamitev *C. difficile* iz vzorcev blata namesto gojišča, ki vsebuje D-cikloserin in cefoksitin (CC) in uporabimo gojišče z isto osnovo, kjer namesto D-cikloserina in cefoksitina v gojišče dodamo moksalaktam, norfloksacin in cistein hidroklorid (CDMN). Cistein hidroklorid naj bi še povišal število zraslih kolonij *C. difficile* (v primerjavi z osamitvijo s CC zraste 20 % več sevov), moksalaktam in norfloksacin pa v primerjavi s CC zmanjšala število neželenih mikroorganizmov pri izolaciji za kar 30 %. Uporaba alkoholnega šoka pri osamitvi *C. difficile* s CDMN ni potrebna. (Aspinall in Hutchinson, 1992).

2.6.2.2 Fizikalni in kemijski vplivi na germinacijo spor

Na germinacijo spor vplivajo kemični in fizikalni dejavniki. Poznavanje teh dejavnikov je pri osamitvi *C. difficile* pomembno, saj se bakterija v okoljskih vzorcih nahaja v obliki spor. Germinacijo *C. difficile* spor spodbujajo kemične snovi, kot so žolčne soli (natrijev tauroholat, holat, deoksiholat) in lizocim, zato lahko z dodatkom teh povečamo občutljivost gojišča. Germinacijo spodbuja tudi tretiranje spor v raztopini natrijevega tauroholata pred gojenjem. Na germinacijo *C. difficile* spor vpliva še temperatura (povečanje temperature iz sobne temperature 20 °C na 37 °C) in pH, kjer je najbolj ugoden pH za germinacijo pri pH vrednosti med 6,32 in 7,53, kislo okolje pa ta proces močno zmanjša. Na povišanje germinacije v kombinaciji z žolčnimi solmi vpliva tudi glicin in nekatere druge aminokisljine, ki jih lahko najdemo v tioglikolatnem mediju. (Wheeldon in sod., 2008).

2.6.3 Identifikacija

C. difficile lahko prepoznamo po značilnih kolonijah na plošči in značilnem vonju po konjskem gnoju ter z barvanjem celic po Gramu. Kolonije po 48 urah rasti na neselektivnem krvnem agarju pod ultravijolično svetlobo dolge valovne dolžine svetijo. Za potrditev identifikacije lahko uporabimo tudi hitre teste, kot so dokaz L-prolin aminopeptidaze, test GDH z lateksno aglucinacijo, plinsko-tekočinska kromatografija z visokimi vrhovi isokaproične kisline in biokemijski testi (Baverud, 2002).

2.7 KARAKTERIZACIJA SEVOV *C. difficile*

2.7.1 Tipizacijske metode

Za razlikovanje med sevi *C. difficile* uporabljamo tipizacijske metode. Poznamo fenotipske in genotipske tipizacijske metode.

K fenotipskim metodam prištevamo serotipizacijo, ki je prva široko uporabljena tipizacijska metoda, in je deloma v uporabi še danes. Pokaže razlike v površinskih

antigenih, serološke skupine pa dobro korelirajo z toksigenimi/netoksigenimi sevi (Delmee in sod., 1986; Toma in sod., 1988). V to skupino metod prištevamo še denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE) (McKay in sod., 1989).

Z genotipskimi tipizacijskimi metodami odkrivamo spremembe na nivoju bakterijskega genoma. Sem uvrščamo metodo imenovano polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (REA) in pulzno gelsko elektroforezo (PFGE), kjer celotno DNA režemo z določenim encimom in razrezane fragmente analiziramo. PFGE med tipizacijskimi metodami velja za »zlati standard«. Obe metodi imata dobro sposobnost razlikovanja.

Tipizacijske metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA so verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (AP-PCR) (Bidet in sod., 2000) in polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP) (Vos in sod., 1995), toksinotipizacija (Rupnik, 2007a), PCR-ribotipizacija (Bidet in sod., 1999), MLVA (Marsh in sod., 2006).

Genotipske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja so alternativna metoda serotipizacije (PCR-RFLP), ki odraža variabilnost gena *slpA* za površinski antigen (Karjalainen in sod., 2002) in tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST) (Lemee in sod., 2005).

2.7.1.1 Toksinotipizacija

Toksinotipizacija je tipizacijska metoda osnovana na restrikcijskih polimorfizmih pomnoženih fragmentov (PCR-RFLP). Pri toksinotipizaciji z metodo PCR najprej pomnožimo najbolj variabilen del regije PaLoc (B1 in A3) in dobljene fragmente režemo z restrikcijskimi encimi *HincII/AccI* in *EcoRI*. Glede na kombinacijo restrikcijskega vzorca, ki odraža variabilnost regije PaLoc, seve razdelimo v skupine, ki jih imenujemo toksinotipi (Rupnik in sod., 1998). Izolate, ki imajo regijo PaLoc enako kot referenčni sev VPI 10463 uvrščamo v toksinotip 0 (nič). Izolate *C. difficile*, ki se od referenčnega seva VPI 10463 v regiji PaLoc razlikujejo, pa razdelimo v 29 različnih toksinotipov, ki so označeni z rimskimi številkami I – XXIX. V primeru še nepoznanega restrikcijskega vzorca fragmentov A3 in/ali B1 analiziramo celoten PaLoc in sev definiramo kot nov toksinotip. Toksinotipizacija se dobro ujema z molekularnimi metodami kot sta PCR ribotipizacija in PFGE (Rupnik in sod., 1998; Rupnik, 2001).

2.7.1.2 PCR-ribotipizacija

PCR-ribotipizacija je metoda, ki temelji na razlikovanju polimorfizma medgenskega prostora med 16S rDNA in 23S rDNA. 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 med obema genoma (ISR; angl. Intergenic spacer region). Regije ISR so pri *C. difficile* v dolžini in nukleotidnem zaporedju variabilne. S pomnožitvijo teh regij dobimo fragmente različnih velikosti, ki jih ločimo z gelsko elektroforezo. Na podlagi dobljenih vzorcev izolate razdelimo v skupine imenovane PCR-ribotipi (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999). Označujemo jih z arabskimi številkami od 001 do več kot 150 (Stubbs in sod., 1999). Metoda je hitra, enostavna, ponovljiva, ima dobro moč razlikovanja in je primerna za primerjavo sevov med laboratoriji, če vsi uporabljajo iste referenčne seve (Collier in sod., 1996; Rupnik, 2001).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča

Bogatitveno gojišče CDA

Pepton	40,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	5,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ X 7H ₂ O	0,2 g/L
Fruktoza	6,0 g/L
Natrijev klorid	2,0 g/L
dH ₂ O	
pH 7,4 ± 0,2	

Dodatek dodan po avtoklaviranju:

»C. difficile selective supplement« (CC),

SR0096 (Oxoid, Basingstoke,

Hampshire, Anglija)

cefoksitin 8,0 mg/L

D- cikloserin 250,0 mg/L

»Clostridium difficile moxalactam

norfloxacin selective supplement«

(CDMN), SR0173 (Oxoid, Basingstoke,

Hampshire, Anglija)

norfloksacin 12,0 mg/L

moksalaktam 32,0 mg/L

cistein hidroklorid 500,0 mg/L

Eno stekleničko suplementa v prahu, ki zadošča za 500 ml gojišča smo pred dodajanjem v gojišče raztopili v 2 mL dH₂O.

KA (Krvni agar)

Pepton	15,0 g/L
Jetrni ekstrakt	2,5 g/L
Kvasni ekstrakt	5,0 g/L
Natrijev klorid	5,0 g/L
Agar	13,0 g/L
Defibrinirana ovčja kri	5–7 %
dH ₂ O	
pH 7,4 ± 0,1	

CLO (Clostridium difficile agar)

Proizvajalec komercialnih selektivnih plošč je bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francija. Selektivna antibiotika v CLO ploščah sta D-cikloserin in cefoksitin.

3.1.2 Brisi

Stuart CLR ; MEUS S.R.L., Piove di Sacco, Italija

BD BBL Port-A-Cul ;BD Diagnostics, Loveton Circle Sparks, Maryland, ZDA

3.1.3 Toksinski test

CDAB VIDAS *C. difficile* Toxin A & B; bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francija

3.1.4 Priprava pufrov in drugih raztopin

Pufre in raztopine smo pripravili tako, da smo zatehtane suhe snovi prenesli v čašo v katero smo odmerili polovico končnega volumna destilirane vode. Snovi smo nato popolnoma raztopili in raztopino prelili v merilni valj ter dopolnili z destilirano vodo do ustreznega, končnega volumna. V primerih, kjer smo merili pH, smo to storili pred pripravo raztopine do končnega volumna ter ga na koncu še enkrat preverili.

Pufer TBE (5x)

Baza Tris (Sigma) 54 g
Borova kislina (Sigma) 27.5 g
0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml
Z dH₂O smo dopolnili do 1000 ml
Pufer TBE smo hranili pri temperaturi 4 °C ter ga pred uporabo 10 x redčili z destilirano vodo.

Z ddH₂O smo dopolnili do 500 ml

pH med 7.5 in 8.0

Pufer TAE smo hranili pri temperaturi 4 °C in pred uporabo 50 x redčili z destilirano vodo.

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA (Sigma) 93,6 g
dH₂O do 500 ml

Z 10 M NaOH smo pH uravnali na 8.0 in do uporabe hranili pri sobni temperaturi.

Pufer TAE (50x)

Baza Tris (Roth) 121.0 g
Acetat (Fluka) 50.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)

Fiziološka raztopina

NaCl 8,5 g
dopolnimo z dH₂O do 1000 ml.
Pripravljeno fiziološko raztopino smo
sterilizirali z avtoklaviranjem.

Nanašalni pufer

Bromfenol modro 25 µl
Saharoza 4,0 g
ddH₂O 10,0 ml

3.2 METODE

3.2.1 Vzorčenje živali

Živali smo vzorčili v Podravski regiji Republike Slovenije v času od meseca oktobra 2007 do decembra 2008. V vzorčenje smo vključili teličke iz 13 kmetij, starih od 4 dni do 12 tednov, kokoši od 1 dneva do 18 tednov starosti iz ene večje farme (slika 1), kjer vzrejajo kokoši za nadaljni razplod in je sestavljena iz štirih hlevov ter kokoši in piščance starosti enega do dveh let iz šestih manjših kmetij, pse in mačke z zgodovino antibiotičnega zdravljenja in drisko ali enteritisom ter nekatere vrste perjadi, stare več kot eno leto: 10 fazanov in 5 jerebic iz iste farme, 3 goske in 4 purane, 3 pave in eno prepelico, grlico in vrano iz različnih kmetij (preglednica 2).

Od vseh 40 vzorčenih teličkov, od katerih sta dva bila vzorčena dvakrat, smo 14 teličkom odvzeli rektalni bris, preostalim 28 teličkom pa blato, tako, da smo iz tal pobrali vidno svež vzorec fecesa ali (ob obisku veterinarja) z odvzemom intrarektalnim odvzemom blata iz telička. Devet od 42 teličkov je ob vzorčenju imelo znake driske, za enega o znakih bolezni nimamo podatkov, preostali telički pa niso imeli znakov driske.

Na veliki perutninski farmi smo skupno opravili štiri vzorčenja dveh različnih populacij kokoši. Prvo populacijo smo vzorčili samo enkrat, pri starosti 14 tednov. Druga je bila vzorčena trikrat. Prvič smo vzorčili en dan stare piščance (na začetku vzreje), nato smo to isto jato vzorčili še dvakrat (preglednica 2). En dan stare piščance iz velike farme smo vzorčili tako, da smo vzorce naključno odvzeli iz vidno umazanih notranjih podlog škatel za prevoz. Farmo z odraslimi kokošmi smo razdelili na šest kvadrantov in s tal vsakega kvadranta pobrali na izgled sveže vzorce blata. Podobno smo vzorčili odrasle kokoši manjših kmetij, le da smo vzorce na območju kmetije, kjer so se kokoši gibale, zbirali naključno. Kokoši med vzorčenjem niso imele nobenih očitnih znakov driske. Pogostnost pojavljanja *C. difficile* smo periodično spremljali tudi pri piščancih iz ene izmed manjših kmetij. Ti piščanci so pri prvih dveh vzorčenjih bivali v zaprtem prostoru, ločeni od zunanega okolja, kasneje pa so jih preselili v zunanje okolje.

Rektalne brise psov in mačk, ki so prejeli antibiotike in imeli drisko ali enteritis smo zbirali v sodelovanju z veterinarskimi ambulantami iz Podravske regije.



Slika 1: Velika farma za vzrejo kokoši – eden od štirih zaprtih prostorov.

Preglednica 2: Pregled vzorčenih živali in podatki o številu odvzetih vzorcev.

Vrsta živali	Skupina živalske vrste	Starost živali ob vzorčenju	Število vzorcev	Vzorčno mesto	
perutnina	1. populacija kokoši	14 tednov	8	velika farma	
		2. populacija kokoši	1 dan		8
			15 dni		24
	piščanci	18 tednov	22	kmetija A	
		1 dan	9		
		16 dni	10		
		56 dni	15		
	kokoši nesnice	81 dni	6	kmetije B, C, D, E, F	
		1-2 leti	37		
	fazan		> 1 leto	10	farma G
jrebica		> 1 leto	5	farma G	
puran		2-3 leta	4	kmetiji D	
pav		5 let	3	kmetija E	
goska		3-4 leta	3	kmetija D, E	
prepelica		4 mesece	1	kmetija E	
grlica		2 leti	1	kmetija E	
vrana		2,5 let	1	kmetija H	
teliček		4 dni-12 tednov	42	kmetije I-U	
pes	1. leglo	12 dni	4	dom 1	
		27 dni	4		
		42 dni	4		
	2. leglo	4 mesece	1	dom 2	
	z bolezenskimi znaki	4 mesece - 4 leta	7	veterinarska ambulanta 1	
mačka	z bolezenskimi znaki	3 in 12 let	2	veterinarska ambulanta 1	

3.2.2 Vzorec

3.2.2.1 Blato

Odvzeto blato smo v hladilni torbi pri temperaturi okrog 4° C prenesli v laboratorij in ga takoj obdelali ali do uporabe hranili na -20 ° C in ga nato obdelali v roku dveh ur po odmrznitvi. Vzorce smo razredčili z 1-2 ml fiziološke raztopine in 0,5 ml razredčenega vzorca prenesli v bogatitveno gojišče.

3.2.2.2 Bris

Odvzeti rektalni bris smo po vzorčenju prenesli v laboratorij pri temperaturi navedeni v proizvajalčevih navodilih. Bris smo obdelali takoj po prenosu v laboratorij.

3.2.3 Gojitev in osamitev

Najprej smo vzorec 5-7 dni bogatili v 5 ml tekočega bogatitvenega gojišča CDA z dodanim suplementom SR0096 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Anglija). Inkubacija je potekala v anaerobni atmosferi (80 % dušika, 10 % vodika in 10 % ogljikovega dioksida), ki smo jo vzpostavili s sistemi Generbox (Generbox anaer, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) pri temperaturi 37 °C.

Po inkubaciji smo 0,5 ml kulture prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko, dodali enak volumen absolutnega alkohola (1:1 v/v), mešanico nato pol ure inkubirali na sobni temperaturi in jo centrifugirali na 10.000 obratih/min (centrifuga Eppendorf Mini spin plus z rotorjem F-45-12-11, Westbury, New York, ZDA) 10 minut. Večino supernatanta (970 µl) smo odstranili, s preostankom pa resuspendirali usedlino. Usedlino smo nato cepili na selektivno ploščo CLO. Selektivne plošče smo 3 dni inkubirali v anaerobni atmosferi pri 37 °C. Eno ali več naključno izbranih kolonij, ki so morfološko ustrezale *C. difficile*, smo na krvnem agarju osamili v čisti kulturi in jih shranili pri temperaturi -80 C.

Kolonije, ki so na prvotni plošči ustrezale *C. difficile* smo do osamitve v čisti kulturi in karakterizacije imenovali izolati. Ko smo izolat opredelili, ga poimenovali z uradno

oznako Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor in shranili smo za osamljene bakterije *C. difficile* uporabljali izraz sev.

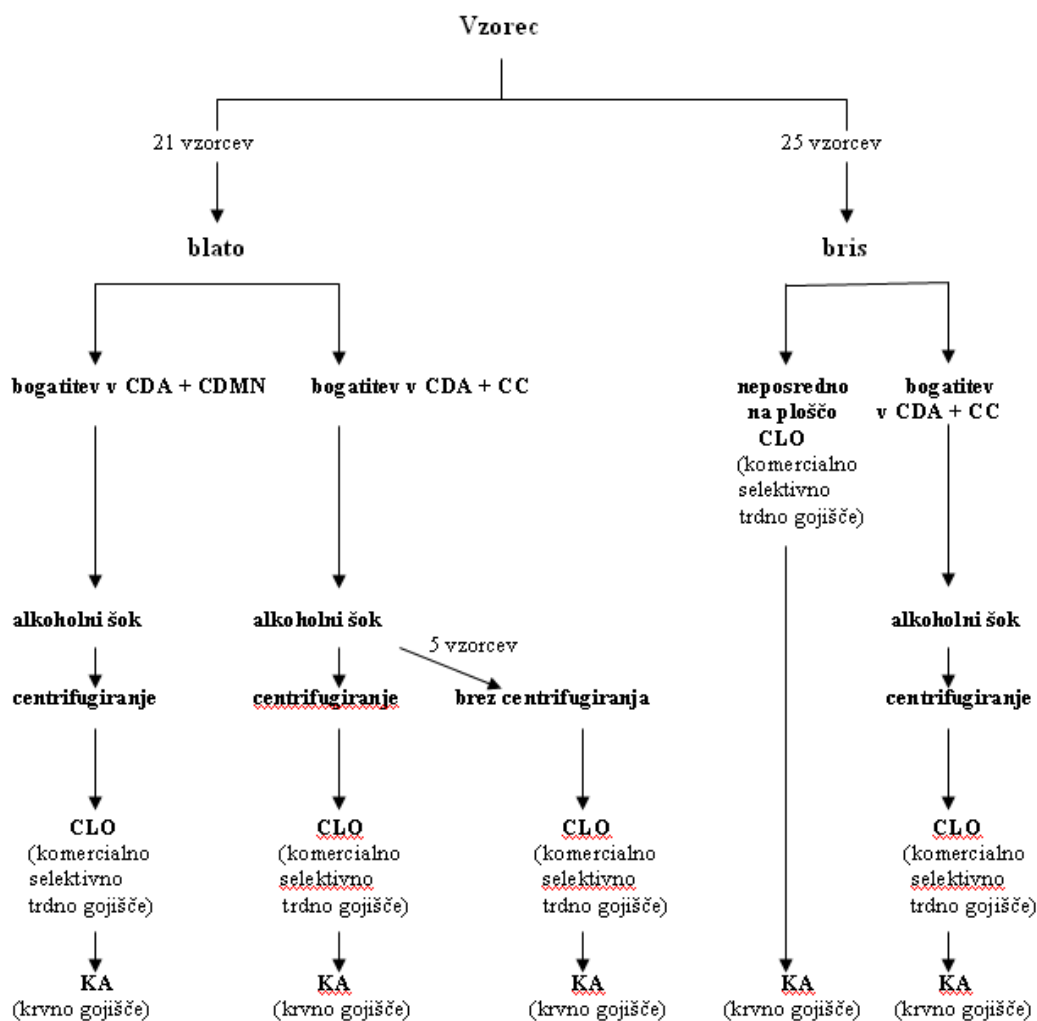
3.2.3.1 Optimizacija osamitve bakterije *C. difficile*

Na 11 vzorcih perutninskega blata in 10 vzorcih blata teličkov smo primerjali bogatitev v dveh gojiščih z dvema različnima selektivnima dodatkom, ki sta vsebovala D-cikloserin in cefoksitin (CC; angl. *C. difficile* selective supplement) in moksalaktam, norfloksacin in cistein hidroklorid (CDMN; angl. *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacin selective supplement) (slika 2).

Pri petih naključnih vzorcih teličkov smo testirali, če moramo mešanico alkohola in bogatitvene kulture po polurni inkubaciji centrifugirati. Zato smo na ploščah CLO primerjali razmaze 50 µl od 1000 µl necentrifugirane mešanice bogatitvene kulture in alkohola ter pelet te mešanice (slika 2).

Pri metodi osamitve bakterije iz brisa nas je zanimalo, če je neposredna nacepitev brisa na selektivno komercialno ploščo CLO dovolj občutljiva metoda za zaznavo bakterij, ki so na brisu. V ta namen smo sedem brisov Stuart in sedem brisov za anaerobe s katerimi smo vzorčili sedem teličkov nacepili direktno na ploščo CLO, nato pa bris inkubirali še v bogatitvenem gojišču s cefoksitinom in cikloserinom. Enako smo naredili z 11 brisi Stuart, s katerimi smo vzorčili psičke.

Po bogatitvi smo nadaljevali z dodajanjem alkohola h kulturi (1:1 v/v) in izolacijo končali po običajnem postopku (glej 3.2.3.), plošče z direktnim razmazom brisa pa pregledali (slika 2).



Slika 2: Potek optimizacije osamitve bakterije *C. difficile* iz živalskih vzorcev.

CDA: bogatitveno gojišče za *Clostridium difficile*; CDMN: komercialni dodatek, ki vsebuje moksalaktam, norfloksacin in cistein hidroklorid; CC: komercialni dodatek, ki vsebuje D-cikloserin in cefoksitin; CLO: komercialno trdno gojišče z D-cikloserinom in cefoksitinom.

3.2.4 Dokaz toksinov

C. difficile toksina A in/ali B smo dokazovali s komercialnim testom VIDAS *C. difficile* Toxin A & B (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francija), ki temelji na encimskoimunski metodi.

VIDAS *C. difficile* Toxin A & B je avtomatizirana metoda. Testiranje vključuje pripravo vzorca, pripravo supernatanta iz vzorca, prenos supernatanta v strip po proizvajalčevih navodilih, računalniških nastavitev in zagon VIDAS naprave. VIDAS napravo moramo vsakih 14 dni kalibrirati. Rezultat testiranja dobimo izpisan v manj kot dveh urah. Rezultat je podan kot pozitiven, negativen ali intermediaren, dobimo pa tudi podatek o kvantitativni vrednosti toksina v vzorcu. V primeru, da je rezultat testiranja intermediaren, moramo test ponoviti.

S toksinskim testom VIDAS smo analizirali 28 perutninskih in 8 telečjih vzorcev blata ter skupno 33 vzorcev bogatitvene kulture vzorcev fazanov (n = 10), jerebic (n = 5), perutnine (n = 17) in telička (n=1).

3.2.5 Identifikacija

Morfološko ustrezne kolonije (slika 3) smo diferencialno barvali po Gramu in jih mikroskopsko pregledali. S hitrim biokemijskim testom (PRO Discs, Remel, Lenexa, Kansas, ZDA), ki smo ga izvedli po proizvajalčevih navodilih, smo pri izolatih dokazovali tudi prisotnost L-prolin-aminopeptidaze. Identifikacijo smo potrdili še s pomnožitvijo dela gena *cdd3*, ki je značilen za *C. difficile* in nosi zapis za verjetni ABC transporter (Braun in sod., 1996). Fragment smo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi Tim6 in Struppi 6, kot so opisali Braun in sodelavci (1996) (preglednica 3).



Slika 3: Morfologija kolonij *C. difficile* na selektivni plošči CLO (bioMerieux).

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (ZO).

Produkt PCR	Program PCR	Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje ZO	Vir
CD ¹	BT	Tim6	5'-TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA-3'	Braun in sod., 1996
		Struppi 6	5'-GGCTATTACACGTAATCCAGATA-3'	
A3 ²	2step47	A4N	5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3'	Rupnik in sod., 1997a
		A3C	5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG-3'	
B1 ³	2step57	B1C	5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3'	Rupnik in sod., 1997a
		B2N	5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'	

¹ del gena *cdd3*, ki je značilen za *C. difficile*

² del gena *tcdA*, ki nosi zapis toksin A

³ del gena *tcdB*, ki nosi zapis za toksin B

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za CD, A3 in B1 PCR.

	CD ³ 100 µl (za dve reakcijski mešanici)	A3 ⁴ 100 µl (za dve reakcijski mešanici)	B1 ⁵ 100 µl (za dve reakcijski mešanici)
H ₂ O	74 µl	67 µl	77 µl
10x pufer PCR ¹	10 µl	10 µl	10 µl
TMA (10 ⁻³ M)	-	10 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	4 µl	2 µl	2 µl
dNTP-ji (20mM mešanica)	4 µl	4 µl	4 µl
P1 (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
P2 (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Taq DNA- polimeraza (5U/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
DNA	3-5 µl »Chelex DNA« ali 1,5 µl čiste DNA ²	3-5 µl »Chelex DNA« ali 1,5 µl čiste DNA ²	3-5 µl »Chelex DNA« ali 1,5 µl čiste DNA ²

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

² DNA izolirana z uporabo kompleta za izolacijo DNA.

³ del gena *cdd3*, ki je značilen za *C. difficile*

⁴ del gena *tcdA*, ki nosi zapis toksin A

⁵ del gena *tcdB*, ki nosi zapis za toksin B

Preglednica 5: Pogoji pomnoževanja s PCR pri toksinotipizaciji, CD PCR in BTb PCR.

Program PCR	Začetna denaturacija	denaturacija	Prileganje in podaljševanje	Končno podaljševanje	Št. ciklov*
BT	93 °C, 3 min	93 °C, 45s	52 °C, 1 min ; 72 °C, 1 min 20s	72 °C, 10 min	30
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.

Po protokolu (preglednica 4) smo v 1,5 ml mikrocentrifugirke zmešali reakcijsko mešanico za PCR v vrstnem redu, kot je podan v protokolu. Mešanico smo dobro premešali in po 46 µl odpipetirali v mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl ter dodali ustrezno količino DNA. PCR reakcija s programom BT (preglednica 5) je potekala v cikličnem termostatu T300 (Biometra, Göttingen, Nemčija).

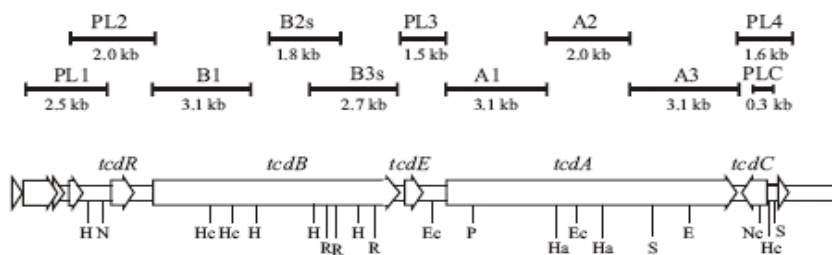
3.2.6 Osamitev DNA

Isolate smo nacepili na plošče krvnega agarja in inkubirali v anaerobni atmosferi pri 37 °C 1-2 dni. V 120 µl 5 % vodne raztopine »Chelex-100 Resin« smo z zanko dodali 1 µl enodnevne oziroma dvodnevne kulture. Suspenzijo smo premešali na mešalu, jo 10 minut inkubirali v vreli vodni kopeli nato centrifugirali pri 12.000 obratih/min (centrifuga Eppendorf Mini spin plus z rotorjem F-45-12-11, Westbury, New York, ZDA) in dobljeni supernatant odpipetirali v svežo mikrocentrifugirko. Grobi ekstrakt DNA smo pri temperaturi 4 °C hranili največ 5 dni. Dolgoročno smo ga hranili pri temperaturi – 20 °C.

3.2.7 Karakterizacija izolatov

3.2.7.1 Toksinotipizacija

Za določevanje toksinotipov smo pomnožili fragmenta A3 in B1 toksinskega lokusa imenovanega PaLoc (slika 4). Pomnoženi fragment A3 smo rezali z restrikcijskim encimom *EcoRI*, fragment B1 pa z restriktazama *HincII* in *AccI*. Dobljeni restrikcijski vzorec smo primerjali z že znanimi vzorci in določili toksinotip izolata (Rupnik, 2007a).



Slika 4: Toksinski lokus PaLoc (Rupnik, 2007a).

3.2.7.1.1 Verižna reakcija s polimerazo

Začetni oligonukleotidi, pogoji pomnoževanja in sestava reakcijske mešanice, ki smo jih uporabljali so navedeni v preglednicah 3 , 4 in 5. Priprava reakcijske mešanice je opisana pod točko 3.2.5.

3.2.7.1.2 Restrikcija pomnožkov PCR

Pomnožene fragmente smo rezali z ustreznimi restrikcijskimi encimi (preglednica 6). Restrikcijsko mešanico smo pripravili po protokolu podanem v preglednici 6. Tako pripravljeno mešanico smo preko noči inkubirali pri temperaturi 37 °C.

Preglednica 6: Sestava restrikcijske mešanice za eno reakcijo restrikcije posameznih pomnoženih fragmentov.

	A3 restrikcija	B1 restrikcija	
Restrikcijski encim ¹	<i>EcoRI</i>	<i>HincII</i>	<i>AccI</i>
H ₂ O	4 µl	8 µl	8µl
»NEBuffer« ¹	1 µl	2 µl	2 µl
BSA	-	0,2 µl	-
Encim	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Volumen restrikcijske mešanice	5 µl	10µl	10 µl
PCR pridelek	15 µl	10µl	10µl

¹ (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA)

3.2.7.1.3 Gelska elektroforeza pomnožkov PCR

Prisotnost pomnoženih fragmentov in njihovo velikost smo dokazovali v 1 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili s pufrom 0,5 x TBE. Elektroforeza je potekala 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. Sliko smo shranili v digitalni obliki z dokumentacijskim sistemom (Biometra).

3.2.7.2 PCR-ribotipizacija

Medgenski prostor med 16S in 23S rDNA smo pomnožili po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999).

V sterilni 1,5 ml mikrocentrifugirki smo najprej pripravili mešanico za PCR in jo v ustrezni količini razdelili v 200 µl mikrocentrifugirke ter dodali ustrezen volumen DNA.

Reakcija je potekala v cikličnem termostatu T3000 (Biometra, Göttingen, Nemčija).

Uporabljeni začetni oligonukleotidi, sestava reakcijskih mešanic in program PCR so opisani v preglednicah 7, 8 in 9.

Preglednica 7: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za PCR-ribotipizacijo.

Oznaka ZO ¹	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

¹začetni oligonukleotidi

Preglednica 8: : Sestava reakcijske mešanice za PCR-ribotipizacijo po protokolu, ki so ga opisali Bidet in sod. (1999).

	1 x 50 µl
dd H ₂ O	37,0 µl
10 x pufer PCR ¹	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 ² DNA 5 µl »Chelex« DNA

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

² DNA, izolirana z uporabo kompleta za izolacijo DNA

Preglednica 9: Program PCR za pomnoževanje medgenskega prostora med 16S in 23 S rDNA bakterije *C. difficile* (Bidet in sod., 1999).

temperatura	čas	število ciklov
94 °C	3 min	
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	35 x
72 °C	2 min	
72 °C	15 min	

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

Za ločevanje pomnožkov PCR smo pripravili 3-odstotni agarozni gel. Najprej smo zatehtali 3,0 g agaroze (Certified™ Low range Ultra Agarose, Bio-Rad, Hercules, Kalifornija) in v merilnem valju odmerili 100 ml hladnega pufera 1 x TAE. Rastopino smo 4 minute 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 vlili v plastični nosilec, vstavili glavniček in počakali približno 45 minut, da se strdi.

Gel smo skupaj z nosilcem prenesli v elektroforezno banjico (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija), odstranili glavniček in gel prelili s hladnim pufrom 1 x TAE. V vdolbinice gela smo vnesli 20 µl pomnožka PCR in 8 µl nanašalnega pufra. V prvo vdolbinico smo vnesli standardno DNA lestvico 100-bp (Biotools, Madrid, Španija). Standardno DNA lestvico smo potem vnesli še v vsako šesto vdolbinico. Elektroforeza je pri napetosti 80 V (2,5 V/cm) tekla 5 ur.

Po končani elektroforezi smo gel z DNA 10 minut barvali z raztopino etidijevga bromida v koncentraciji 0,2 µg/ml, nato pa 10 min razbarvali z destilirano vodo. Sliko smo shranili v digitalni obliki z dokumentacijskim sistemom (Biometra).

3.2.7.2.1 Analiza rezultatov

Vzorci fragmentov, ki smo jih dobili s PCR-ribotipizacijo smo analizirali z računalniškim programom BioNumerics (Applied Maths). Dobljene vzorce fragmentov smo preverili tudi 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 (Stubbs in sod., 1999).

3.2.7.2.2 Nomenklatura

PCR-ribotipe, ki smo jih določili pri živalih, smo označili s C1-C17. V primeru, da so PCR ribotipi najdeni pri živalih bili identični PCR-ribotipom v zbirki sevov Oddelka za raziskovalno dejavnost, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor so pridobili tudi njihovo oznako. PCR ribotipi v zbirki so poimenovani po standardni mednarodni Cardiff nomenklaturi (z arabskimi številkami) na podlagi referenčnega PCR-ribotipa (Stubbs in sod., 1999), ali po interni nomenklaturi (z besedo SLO in trimestno arabsko številko) v primeru, da se ne ujemajo z nobenim od referenčnih PCR-ribotipov.

3.2.7.2.3 Primerjava *C. difficile* PCR ribotipov živalskega in človeškega izvora

C. difficile PCR-ribotipe živalskega izvora smo z računalniškim sistemom BioNumerics (Applied Maths) primerjali s PCR ribotipi iz zbirke sevov *C. difficile* Oddelka za raziskovalno dejavnost, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Zbirka vključuje seve izolirane iz ljudi in različnih živali iz Slovenije in drugih držav sveta.

Primerjavo smo naredili tudi s PCR-ribotipi sevov, ki so jih rutinskem laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor osamili iz kliničnih vzorcev poslanih iz Podravske regije. Toksinotipizacijo in PCR-ribotipizacijo teh sevov so naredili na Oddelku za raziskovalno dejavnost.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE

4.1.1 Primerjava neposredne in bogativne metode pri osamitvi *C. difficile* iz brisov

V vzorcih blata teličkov *Clostridium difficile* nismo našli ne z neposredno metodo ne z bogativno metodo.

Bakterijo smo z bogativno metodo osamili iz 3 od 11 (27,3 %) brisov psov, od teh treh smo v enem (9,1 %) bakterijo zaznali tudi z neposredno metodo. Vzorec iz katerega smo bakterijo osamili z obema gojitvenima metodama je bil odvzet pri psički z drisko. Določitev kolonij, morfološko podobnih *C. difficile* so na direktno nacepljenih selektivnih ploščah CLO oteževale kolonije z drugimi morfološkimi lastnostmi. Število CFU, ki so bile podobne *C. difficile* kolonijam, je pri direktni nacepiti brisa znašalo približno 100. Bogatitev je podala nekoliko boljši rezultat, saj nam je na nekaterih ploščah poraslo celo več kot 300 CFU, ki so morfološko ustrezale *C. difficile*.

4.1.2 Primerjava dveh selektivnih suplementov pri bogatjenju vzorca

C. difficile smo z bogativno metodo vzorca blata v gojišču CDA s cikloserinom in cefoksitinom (dodatek CC) osamili iz 7 od 21-ih (33,3 %) vzorcev in iz 4 (19,0 %) vzorcev blata z bogatjenjem vzorca v CDA z dodanim norloksacinom, moksalaktamom in cistein hidrokloridom (CDMN). Bogatitev v gojišču CDA s cikloserinom in cefoksitinom je bila boljša tako pri telečjih kot pri perutninskih vzorcih z izolacijskim deležem 20,0 % in 45,5 %. Pri bogatitvi s CDMN smo *C. difficile* osamili pri 10,0 % vzorcev teličkov in pri 27,3 % perutninskih vzorcev. Iz 2 od 24-ih vzorcev smo *C. difficile* le z metodo bogatitve v gojišču CDA z dodanim CDMN suplementom, 6/24 vzorcev pa je bilo pozitivnih le v primeru bogatitve s cikloserinom in cefoksitinom (preglednica 10).

Preglednica 10: Primerjava bogatitve živalskega vzorca blata v gojišču CDA z dvema različnima dodatnoma CC in CDMN.

bogatitveno gojišče		število vzorcev blata		
CDMN ¹	CC ²	telički	perutnina	skupno število vzorcev
+	+	1	1	2
+	-	0	2	2
-	+	2	4	6
-	-	10	4	14

¹komercialni dodatek ki vsebuje moksalakta, norfloksacin in cistein hidroklorid

²komercialni dodatek ki vsebuje D-cikloserin in cefoksitin

4.1.3 Optimizacija alkoholnega šoka

Rezultati primerjave inkubacije centrifugirane in necentrifugirane mešanice bogatitvene kulture in etanola na ploščah CLO je pokazala, da je mešanico po alkoholnem šoku potrebno centrifugirati. Po tridnevni inkubaciji je na štirih od petih plošč CLO, kamor smo nanegli usedlino mešanice bogatitvene kulture in alkohola zrasla vsaj ena kolonija. Na ploščah CLO (n=5), kamor smo nanegli 50 µl necentrifugirane mešanice pa ni bilo rasti, saj je koncentracija spor v 50 µl necentrifugirane mešanice bila premajhna, da bi jih na ploščah CLO zaznali.

4.2 NEPOSREDNI DOKAZ TOKSINOV S KOMERCIALNIM TOKSINSKIM TESTOM

S toksinskim testom VIDAS CDAB smo testirali 26 naključno izbranih živalskih vzorcev. S testom smo toksin A in/ali B dokazali le v enem od 25 živalskih vzorcev blata, iz katerih smo osamili toksigene *C. difficile* izolate (preglednica 11).

Z VIDAS CDAB toksinskim testom smo testirali tudi 33 bogatitvenih kultur po 5 dneh inkubacije. Toksinov A in/ali B nismo uspeli dokazati pri nobeni od 4 *C. difficile* bogatitvenih kultur, kjer smo dokazali toksigeni sev *C. difficile* (preglednica 12).

Preglednica 11: Neposredni dokaz toksinov A in/ali B s testom VIDAS CDAB v vzorcih blata.

	VIDAS CDAB +	VIDAS CDAB -	skupaj
toksigena kultura +	1	24	25
toksigena kultura -	0	11	11
skupaj	1	35	36

Preglednica 12: Dokaz toksinov A in/ali B s testom VIDAS CDAB kulture *C. difficile* v bogatitvenem gojišču.

	VIDAS CDAB +	VIDAS CDAB -	skupaj
toksigena kultura +	0	4	4
toksigena kultura -	0	29	29
skupaj	0	33	33

4.3 REZULTATI OSAMITVE IN KARAKTERIZACIJE *C. difficile* IZ RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST

4.3.1 Perutnina

4.3.1.1 Velika farma

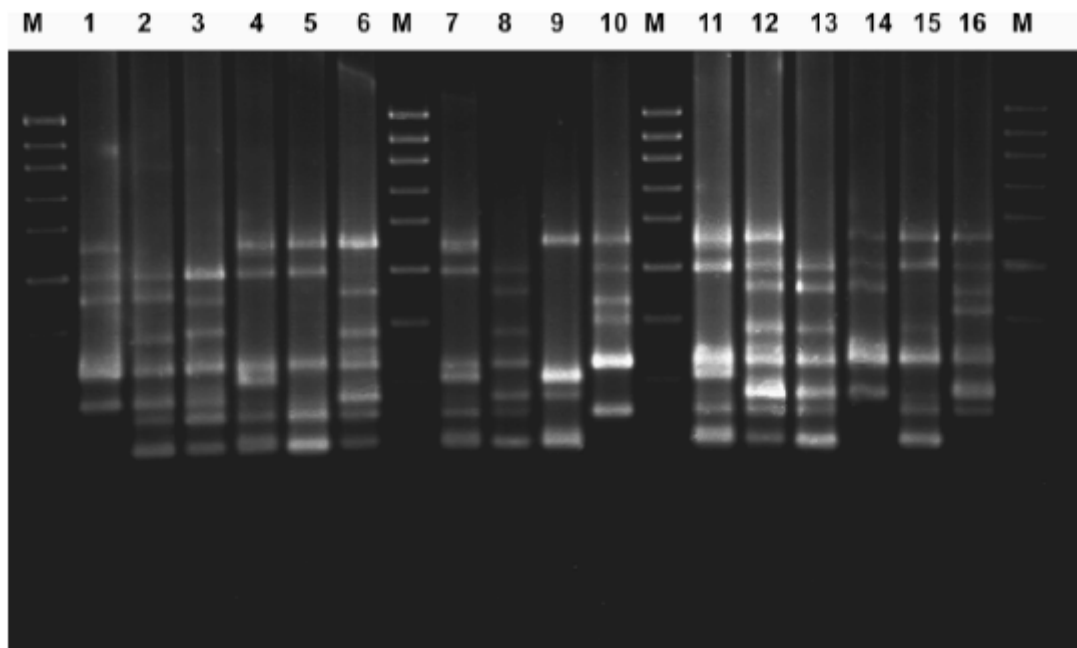
C. difficile smo z metodo bogatitve osamili iz 38 od 61 (63,2 %) vzorcev piščančjega blata zbranih ob štirih vzorčenjih na veliki farmi. Ker smo iz posameznega primarnega gojišča osamili več kot eno kolonijo, je skupno število izolatov *C. difficile* 44. Delež pozitivnih

vzorcev iz prvega vzorčenja, opravljenega pri starosti piščancev 14 tednov, je bil 71,4 % (preglednica 13). Iz osmih vzorcev blata druge jate piščancev, starih le en dan, ki smo jo vzorčili na dan prihoda na farmo, nam *C. difficile* ni uspelo izolirati. Ko smo isto jato vzorčili pri starosti 15 dni, je delež *C. difficile* pozitivnih vzorcev narastel iz 0 % na 100 %. Ob tretjem vzorčenju piščancev, sedaj starih 18 tednov, je ta delež padel na 40,9 % (preglednica 13, 18). Delež variantnih toksinotipov med izolati je bil nizek. Le 3 od 44 izolatov smo uvrstili v variantni toksinotip IV. Dva izolata sta bila netoksigena, ostali so pripadali toksinotipu 0 (preglednica 13).

Iz petih vzorcev blata smo osamili po 10 *C. difficile* kolonij iz vsakega. V treh od petih vzorcev smo našli več kot le en genotip *C. difficile*. Iz dveh posameznih vzorcev smo osamili *C. difficile* toksinotipa 0 in netoksigene seve, iz enega pa *C. difficile* toksinotipa 0 in toksinotipa IV. Na veliki farmi smo skupno zaznali 12 PCR-ribotipov (slika 5). V posameznem vzorčenju smo našli 4 do 9 PCR-ribotipov. Vsem trem vzorčenjem sta bila skupna le 2 PCR ribotipa, ostali so se med vzorčenji razlikovali. Med izolati so najpogostejši PCR-ribotipi bili C2 (SLO 026), C1 (SLO 008/002), C5 (SLO 004/014), saj smo vsakega od teh našli pri 8-12/44 izolatov, ostali PCR-ribotipi so med izolati imeli le enega do tri predstavnike.

Preglednica 13: Število in tipi izolatov *C. difficile* pri dveh populacijah kokoši iz velike farme.

populacija kokoši vzorčenja	populacija 1		populacija 2	
	1	2	3	4
starost živali ob vzorčenju	14 tednov	1 dan	15 dni	18 tednov
število vseh vzorcev	7	8	24	22
število pozitivnih vzorcev	5 (71,4%)	0 (0,0%)	24 (100,0%)	9 (40,9%)
število izolatov	7	0	27	10
PCR-ribotipi	C1 (SLO 008/002), / C2 (SLO 026), C11 (SLO 048), C10		C1 (SLO 008/002), C2 (SLO 026), C3, C4, C7 C5 (SLO 004/014), C6 (SLO 067), C8 (SLO 016), C9 (SLO 013/023)	C1 (SLO 008/002), C2 (SLO 026), C12 (SLO 145), C5 (SLO 004/014), C3, C4
toksinotipi	0 (7/7)	/	0 (23/27), IV(3/27), tox- (1/27)	0 (9/10), tox- (1/10)



Slika 5: Predstavniki *C. difficile* PCR-ribotipov, ki smo jih osamili na veliki farmi ob različnih vzorčenjih.

Proge 7-10: PCR-ribotipi *C. difficile* izolatov iz prvega vzorčenja (prva populacija kokoši); Proge 11-16: PCR-ribotipi *C. difficile* izolatov iz tretjega vzorčenja (drugo vzorčenje druge populacije kokoši); Proge 1-6: PCR-ribotipi *C. difficile* izolatov iz četrtega vzorčenja (tretje vzorčenje druge populacije kokoši). M: standardna DNA-lestvica 100bp (Biotools, Madrid, Španija).

4.3.1.2 Kokoši iz manjših kmetij

Iz vzorcev blata kokoši nesnic starejših od enega leta smo z metodo bogatitve *C. difficile* osamili iz 4 od 37 (10,8 %) vzorcev (preglednica 14, 18) in opredelili 4 izolate. Vsi štirje izolati so bili toksinotipa 0. Pri 2/ 4 izolatov smo našli PCR-ribotip C1 (SLO 008/002), ostala dva izolata sta bila PCR ribotipa C2 (SLO 026) in C5 (SLO 004/014) (preglednica 14).

Na eni izmed manjših kmetij smo piščance vzorčili več kot enkrat in v različnih časovnih razmikih. Ob prihodu 1 dan starih piščancev na kmetijo, bakterije *C. difficile* nismo našli. Podoben rezultat smo dobili tudi ob analizi vzorcev odvzetih pri piščancih starih 16 dni (preglednica 15). Živali so v tem obdobju bivale v zaprtem prostoru, ločene od zunanjega okolja. Približno 14 dni pred tretjim vzorčenjem so živali izpostavili zunanjemu okolju. *C.*

difficile smo iz vzorcev blata piščancev starih 56 dni osamili iz 1/15 (6,7 %) vzorcev. Pri zadnjem vzorčenju piščancev starih 81 dni smo *C. difficile* osamili iz 1/6 (16,7 %) vzorcev blata. Iz vsakega kultura pozitivnega vzorca smo osamili po dva izolata. Vsi štirje izolati so pripadali toksinotipu 0 in PCR-ribotipu C5 (SLO 004/014) (preglednica 15).

Preglednica 14: Število in tipi *C. difficile* pri kokoših iz manjših kmetij.

kokoši nesnice	
starost živali	1-2 leti
število kmetij	5
število zbranih vzorcev	37
število pozitivnih vzorcev	4 (10,8 %)
število izolatov	4
PCR-ribotipi	C1 (SLO 008/002), C2 (SLO 026), C5 (SLO 004/014)
toksinotipi	0 (4/4)

Preglednica 15: Število in tipi *C. difficile* pri piščancih iz manjše kmetije.

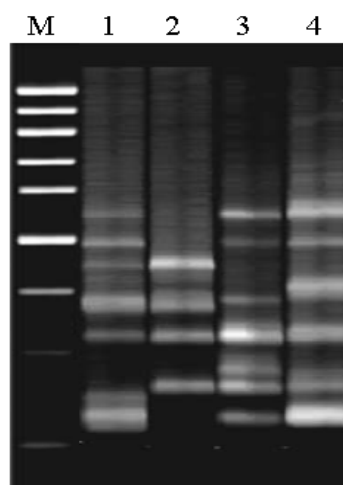
reja piščancev	znotraj		zunaj 17 dni	zunaj 42 dni
	1	2	3	4
starost živali ob vzorčenju	1 dan	16 dni	56 dni	81 dni
število vseh vzorcev	9	10	15	6
število pozitivnih vzorcev	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	1 (16,7%)
število izolatov	0	0	2	2
PCR-ribotipi	/	/	C5 (SLO 004/014)	C5 (SLO 004/014)
toksinotipi	/	/	0 (2/2)	0 (2/2)

4.3.2 Ostala perjad

C. difficile smo v manjšem obsegu iskali tudi pri ostalih pticah. Bakterijo smo z bogatitveno metodo osamili iz 2 od 5 (40,0 %) analiziranih vzorcev jerebic, ene gosi od treh (33,3 %) preučenih in iz edinega vzorca blata vrane. Bakterije nismo našli pri puranih, pavih, grlicah in fazanih. Izolata iz gosi in vrane sta pripadala toksinotipu 0 in bila različnih PCR-ribotipov, C17 in C14 (preglednica 16 in slika 6). *C. difficile* izolata, ki smo ju osamili iz jerebic sta pripadala toksinotipoma XIb in XII in PCR ribotipoma C15 (033) in C16 (056) (preglednica 16 in slika 6).

Preglednica 16: Število in tipi *C. difficile* izolatov pri ostalih domačih pticah.

vrsta ptice	grlica	fazan	jerebica	puran	pav	gos	vrana	prepelica
starost živali	2 leti	>1 leto	>1 leto	2-3 leta	5 let	3-4 leta	2,5 let	4 mesece
število kmetij	1	1	1	1	1	2	1	1
število zbranih vzorcev	1	10	5	4	3	3	1	1
število pozitivnih vzorcev	0	0	2 (40,0%)	0	0	1(33,3%)	1(100,0%)	0
število izolatov	0	0	2	0	0	1	1	0
PCR-ribotipi	/	/	C15(033), C16 (056)	/	/	C17	C14	/
toksinotipi	/	/	XIb (1/2), XII(1/2)	/	/	0 (1/1)	0 (1/1)	/



Slika 6: PCR-ribotipi *C. difficile* izolatov iz ptic.

Proga 1: *C. difficile* PCR-ribotip iz vrane; Progi 2,3: *C. difficile* PCR-ribotipa iz jerebic; Proga 4: *C. difficile* PCR-ribotip iz goske. M: standardna DNA-lestvica 100bp (Biotools, Madrid, Španija).

4.3.3 Telički

Skupno smo preiskali blato 40 teličkov, dva telička smo v razmiku vzorčenj približno dva tedna vzorčili dvakrat. Pri 42 vzorčenjih smo drisko opazili pri 10 teličkih, 31 teličkov ni kazalo bolezenskih znakov, za enega pa podatkov o zdravstvenem stanju nimamo. Povprečna starost vzorčenih teličkov je bila 32 dni. Najmlajši je bil star le 4 dni, najstarejši pa 84 dni. *C. difficile* smo z metodo izolacije z bogatitvijo osamili iz štirih od 40 (10,0 %) teličkov oziroma petih od 42 (11,9 %) vzorcev blata, saj sta vzorca enega od dvakrat vzorčenih teličkov bila *C. difficile* pozitivna v obeh primerih. *C. difficile* smo osamili iz teličkov starejših od deset dni in mlajših od 21 dni (preglednica 18). Od teh štirih *C. difficile* pozitivnih teličkov sta dva izvirala iz istega hleva, ostala dva pa iz dveh različnih hlevov. Dva od štirih pozitivnih teličkov nista imela driske, teliček, ki smo ga vzorčili dvakrat je drisko imel pri obeh vzorčenjih in za enega podatkov o zdravstvenem stanju nimamo. Skupno smo osamili 7 izolatov, iz 3 *C. difficile* pozitivnih vzorcev po en izolat *C. difficile*, in iz dveh vzorcev dva *C. difficile* izolata. Vsi izolati so bili toksinotipa 0 in PCR-ribotipomv C5 (SLO 004/014) (4/7 izolatov) ter C1 (SLO 008/002) (3/7 izolatov). Pri istem teličku smo pri dveh različnih vzorčenjih dva različna PCR ribotipa, in sicer, C5 (SLO 004/014) in C1 (SLO 008/002).

4.3.4 Hišni ljubljenci

4.3.4.1 Psički

Štiri mlade psičke iz prvega legla smo vzorčili trikrat vsakih 15 dni. *C. difficile* smo z metodo bogatitve uspeli osamiti le iz brisov odvzetih v prvih dveh vzorčenjih, iz 3 /4 psičkov starih 12 dni in iz 2/4 psičkov starih 27 dni. Pri psičkih starih 42 dni bakterije več nismo zaznali (preglednica 17, 18). Iz psička starega 4 mesece iz drugega legla *C. difficile* z isto metodo osamitve nismo uspeli osamiti (preglednica 17, 18). Pri prvem vzorčenju psičkov iz prvega legla smo osamili 11 izolatov in pri drugem vzorčenju istega legla 4. Vseh 15 izolatov je bilo netoksigenih in so pripadali PCR ribotipu C13 (SLO 010) (preglednica 17). Vsi psički so bili zdravi in v tem času niso prejeli antibiotikov.

Preglednica 17: Število in tipi *C. difficile* izolatov pri mladih psičkih.

psički	leglo 1			leglo 2
	1	2	3	1
starost živali ob vzorčenju	12 dni	27 dni	42 dni	4 mesece
število zbranih vzorcev	4	4	4	1
število pozitivnih vzorcev	3 (75,0%)	2 (50%)	0(0,0 %)	0 (0,0%)
število izolatov	11	4	0	0
PCR ribotipi	C13 (SLO 010)	C13(SLO 010)	/	/
toksintipi	tox- (11/11)	tox- (4/4)	/	/

Preglednica 18: Kolonizacija živali s *C. difficile* glede na starost gostitelja.

vrsta živali	število pozitivnih vzorcev glede na starost živali					
	1 dan	2-15 dni	16-27 dni	28-98 dni	99- 126 dni	126 dni- 2 leti
perutnina	0/0 (0,0%)	24/24 (100,0 %)	-	5/7 (71,4 %)	9/22 (40,9 %)	4/37 (10,8 %)
telički	-	3/14 (17,6 %)	1/8 (12,5 %)	0/20 (0,0 %)	-	-
psički	-	3 /4 (75,0 %)	2/4 (50,0 %)	0/4 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)	-

4.3.4.2 Bolni hišni ljubljenci

S pomočjo veterinarskih ambulant nam je uspelo zbrati 7 vzorcev psov s prebavnimi motnjami. *C. difficile* smo osamili iz 1/7 vzorcev. Vsi štirje izolati iz tega vzorca so bili toksinotipa 0 in PCR ribotipa C5 (SLO 004/014) (preglednica 19). *C. difficile* pozitivna psička je imela drisko, bila stara 5 mesecev, pred tem ni bila zdravljena z antibiotiki in je živela v zaprtem prostoru.

Od dveh prejetih brisov mačk z diagnosticirano drisko smo *C. difficile* našli le pri mačku starem 12 let, pred pol leta zdravljenim s cefovecinom. Iz vzorca smo osamili dva izolata. Oba sta pripadala toksinotipu 0 in PCR ribotipu C5 (SLO 004/014) (preglednica 19).

Preglednica 19: Število in tipi *C. difficile* izolatov pri hišnih ljubljencih z bolezenskimi znaki, ki so bili sprejeti v veterinarsko ambulanto

vrsta živali	psi	mačke
starost živali	4 mesece- 4 leta	3 in 12 let
število zbranih vzorcev	7	2
število pozitivnih vzorcev	1 (14,3%)	1 (50,0%)
število izolatov	4	2
PCR ribotipi	C5 (SLO 004/014)	C5 (SLO 004/014)
toksinotipi	0 (4/4)	0 (2/2)

4.4 PRIMERJAVA *C. difficile* PCR-RIBOTIPOV ŽIVALSKEGA IN ČLOVEŠKEGA IZVORA

V raziskavi smo pri različnih vrstah živali določili skupno 17 različnih *C. difficile* PCR ribotipov (slika 7). Od tega jih je 8 bilo identičnih človeškim PCR-ribotipom iz zbirke *C. difficile* sevov Oddelka za raziskovalno dejavnost, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor (preglednica 20), ki so jih v zadnjih štirih letih osamili v rutinskem laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Še trije živalski PCR-ribotipi so bili identični človeškim PCR-ribotipom osamljenim iz ljudi, vendar jih v Podravskem območju še nismo zasledili (preglednica 20). Eden od teh treh je izviral iz drugih delov Slovenije, ostala dva pa iz drugih držav.

C. difficile izolate PCR-ribotipa C1 (SLO 008/002) in C5 (SLO 004/014), ki ju lahko najdemo tudi pri človeku v našem območju smo našli pri več kot eni živalski vrsti (preglednica 20 in slika 7)

Preglednica 20: Primerjava človeških in živalskih *C. difficile* PCR-ribotipov in izvor živalskih sevov *C. difficile*.

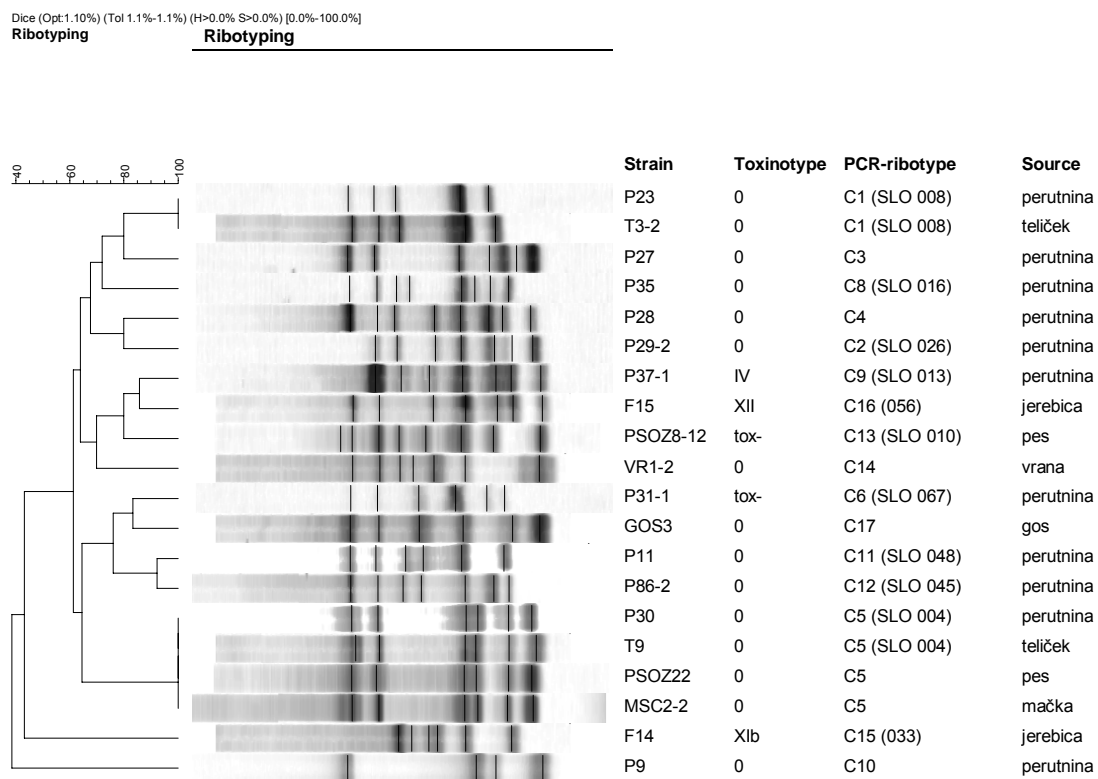
PCR ribotip najden pri živali	PCR ribotip določen v zbirki sevov (interna oznaka / standardna mednarodna nomenklatura)	Izvor seva	PCR ribotip prisoten pri živalih/izvor seva (objavljene študije)	PCR ribotip prisoten pri ljudeh v Podravski regiji	PCR ribotip prisoten pri ljudeh drugod v Sloveniji	PCR ribotip prisoten pri ljudeh (objavljene študije)
C1	SLO 008/002	perutnina, telički	da ² / teliček, konj, prašič	da	da	da ^{1,2}
C2	SLO 026	perutnina	n.z.	da	da	n.z.
C5	SLO 004/014	perutnina, telički, psi, mačke	da ³ / teliček	da	da	da ¹
C6	SLO 067	perutnina	n.z.	ne	ne	n.z.
C8	SLO 016	perutnina	n.z.	da	ne	n.z.
C9	SLO 013 / 023	perutnina	ne	da	ne	da ¹
C11	SLO 048	perutnina	n.z.	da	ne	n.z.
C12	SLO 045	perutnina	n.z.	ne	da	n.z.
C13	SLO 010	psički	n.z.	da	da	n.z.
C15	033	jerebica	da ^{2,3} / teliček, prašič	ne	ne	ne
C16	056	jerebica	ne	da	da	da ²

n.z.: podatek ni znan (zaradi manjkajoče mednarodne oznake PCR-ribotipa in s tem nemogoče primerjave PCR-ribotipov)

¹: Barbut in sod., 2007

²: Keel in sod., 2007

³: Rodriguez-Palacios in sod., 2006



Slika 7: *Clostridium difficile* PCR-ribotipi najdeni pri živalih.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo ugotavljali pogostnost bakterije *C. difficile* pri nekaterih domačih živalih in hišnih ljubljenceh v Sloveniji ter določili tipe, ki so s temi živalmi povezani. Za uspešno določitev pogostnosti smo najprej optimizirali metodo vzorčenja in osamitve bakterije iz samega vzorca.

5.1.1 Metode za izolacijo in detekcijo bakterije in toksinov *Clostridium difficile* pri živalih in ljudeh

Za uspešno osamitev *C. difficile* iz vzorca je pomembna uporaba primerne gojitvene metode. Zato smo v naši razskavi želeli ugotoviti, ali je direktna nacepitev živalskega blata na cefoksitin-cikloserin-fruktozno ploščo (CLO) dovolj občutljiva in selektivna metoda za osamitev *C. difficile*. Ugotovili smo, da bo delo s to gojitveno metodo zaradi rasti kontaminant in manjšega števila *C. difficile* kolonij v primerjavi z bogatitveno metodo s tekočim gojiščem z dodanim cefoksitinom in cikloserinom ter alkoholnim šokom te bogatitvene kulture težje. Prav tako je izolacijski delež v primeru bogatitve vzorca v primerjavi z direktno nacepitvijo vzorca bil višji (27,3 %), kar je skladno z že objavljenimi poročili pri osamitvi bakterije iz človeških vzorcev, kot so vaginalni brisi in vzorci blata (O' Farrell in sod., 1983; Arroyo in sod., 2005a). Z direktno metodo smo bakterijo osamili le v primeru bolne živali, kar potrjujejo poročila nekaterih avtorjev, da bogatitev v primeru aktivne bolezni ni potrebna. Bogatitvena metoda v selektivnem tekočem gojišču je priporočljiva pri okoljskih in epidemioloških raziskavah ter raziskavah asimptomatskih prenašalcev (Brazier, 1998). Bogatitev je prav tako primerna za osamitev *C. difficile* iz kliničnih vzorcev, kjer ne moremo zagotoviti ustreznih pogojev shranjevanja vzorcev kot sta čas in temperatura (Arroyo in sod., 2005a). V nekaterih okoljskih raziskavah pa lahko zasledimo, da z uporabo kontaktnih cikloserin-cefoksitin-fruktozna plošč pri osamitvi bakterije iz okolja dobimo boljše rezultate kot s tekočim gojiščem iste sestave (Clabots in sod., 1991).

V prihodnje smo pri vseh vrstah živali, razen pri psičkih z znaki bolezni podobni CDI, vzorce najprej bogatili. Po primerni inkubaciji vzorca v bogatitvenem gojišču (glej 3.2.3.1) smo s 500 µl kulture naredili alkoholni šok in mešanico bogatitvene kulture in etanola centrifugirali, da smo spore skoncentrirali. Brise psičkov, dobljenih iz veterinarskih ambulant smo cepili direktno na selektivno ploščo, vendar bris za tem še vseeno bogatili v primeru premajhne selekcije ali občutljivosti plošče pri določenem vzorcu.

Za optimizacijo bogatitvene metode smo preizkusili dva različna dodatka, ki sta na tržišču trenutno na voljo: »*C. difficile* selective supplement«, ki je mešanica D-cikloserina in cefoksitina (CC) ter dodatek, ki je mešanica moksalaktama, norfloksacina in cistein hidroklorida (CDMN). Bogatitev z D-cikloserinom in cefoksitinom in alkoholnim šokom se je v nasprotju z nekaterimi poročili, kjer so sicer delali s ploščami in ne bogatitvenim gojiščem ter kliničnimi vzorci (Aspinall in Hutchinson, 1992) z deležem izolacije 33,3 % izkazala za boljšo kot bogatitev s CDMN z deležem izolacije 19,0 %. Višji delež izolacije pri bogatenju vzorca s CC smo dosegli tako pri perutnini kot pri teličkih. V nadaljevanju smo zato pri osamitvi *C. difficile* iz živalskih vzorcev uporabljali tekoče gojišče z D-cikloserinom in cefoksitinom. Nižji izolacijski delež pri bogatenju s CDMN bi lahko pripisali prevelikim inhibitornim učinkom antibiotikov CDMN. Rasti izolatov, ki smo jih dobili le pri bogatenju s cikloserinom in cefoksitinom pa nismo preverili na gojišču s CDMN suplementom, zato te trditve ne moremo ovreči niti potrditi. Vzrok za dobljene rezultate bi lahko bil tudi v povečani rasti kontaminant iz perutninskih in telečjih vzorcev blata, saj se njuna normalna črevesna mikrobna flora razlikuje od človeške, na kateri je učinek izbranih antibiotikov preverjen (Aspinall in Hutchinson., 1992). Neučinkovito zaviranje rasti kontaminant bi lahko vodilo do neugodnih pogojev v gojišču za rast *C. difficile*. Pri dveh perutninskih vzorcih smo bakterijo osamili le v primeru bogatenja v gojišču z dodanim CDMN suplementom. Genotip teh izolatov je bil enak kot pri nekaterih izolatih, ki smo jih osamili z gojiščem s cikloserinom in cefoksitinom, zato bi ta tip *C. difficile* lahko teoretično osamili tudi v cikloserin-cefoksitin bogatitvenem gojišču. Možno je, da sta v tem primeru norfloksacin in moksalaktam v gojišču delovala bolj selektivno na ostalo mikrobno populacijo v vzorcih kot cikloserin in cefoksitin in tako preprečila prekomerno rast kontaminant.

Najbolj občutljivi (> 92 %) in specifični (>99 %) metodi pri postavljanju diagnoze CDAD pri ljudeh sta test citotoksičnosti, ki velja za zlati standard in dokaz toksigene kulture (Barbut in sod., 1993). V rutinskih laboratorijih so danes v uporabi številni komercialni ELISA-testi, vendar pa so v primerjavi s testom citotoksičnosti slabo občutljivi in slabo specifični (Barbut in sod., 1993; Shin in sod., 2009). Komercialni ELISA-testi pri mnogih živalskih vrstah še niso validirani. Ker je test citotoksičnosti drag in delovno zahteven ter dokaz toksigene kulture s testom citotoksičnosti primerljivo specifičen in občutljiv smo v naši raziskavi določevanja toksinov A in/ali B rezultate komercialnega ELISA-testa primerjali s toksigeno kulturo. Občutljivost VIDAS CDAB s katerim smo testirali preutninske in telečje vzorce blata in bogatitvene kulture teh vzorcev je bila v primerjavi z dokazom toksigene kulture nizka. Slabo občutljivost in specifičnost komercialnih ELISA-testov pri različnih živalskih vrstah kot so psi (Weese in sod., 2001; Chouicha in Marks, 2006) in telički (Rodríguez-Palacios in sod., 2006, Pirš in sod., 2008) opisujejo tudi številni drugi avtorji. Lažno pozitivnih rezultatov pri testiranju vzorcev z VIDAS CDAB sami nismo dobili. Encimsko imunski testi pa so se pokazali za uporabne pri diagnozi bolezni pri prašičkih (Songer in Anderson, 2006), uporabljajo pa jih tudi pri diagnostiki CDI pri konjih (Baverud, 2002).

5.1.2 Prisotnost *Clostridium difficile* pri različnih živalskih vrstah

V Sloveniji je o bakteriji *C. difficile* pri teličkih in hišnih ljubljenceh malo znanega. Do sedaj objavljeni podatki se nanašajo večinoma na prašičke in v manjšem obsegu na teličke (Pirš in sod., 2008). V diplomskem delu smo prvič v Sloveniji in Evropi preučevali tudi prisotnost bakterije pri perutnini.

Naši rezultati preučevanja psičkov, teličkov in perutnine kažejo na to, da *C. difficile* lahko pogosto najdemo pri mladih živalih. To opažajo tudi številni drugi avtorji (Perrin in sod., 1993; Buogo in sod., 1995; Rodríguez-Palacios in sod., 2006). Podobno velja tudi za prašiče (Songer in Anderson, 2006) in konje (Baverud, 2002).

Vloga *C. difficile* pri mnogih živalih, vključno s telički, mačkami in psi še ni popolnoma pojasnjena. Bakterijo lahko v podobnem deležu osamimo iz živali z in brez bolezenskih znakov (Perrin in sod., 1993; Buogo in sod., 1995; Rodriguez-Palacios in sod., 2006, Hammit in sod., 2007), s čemer se skladajo tudi naši rezultati.

Pri psih z in brez driske lahko bakterijo osamimo iz 0-40 % vzorcev, osamili pa so jo tudi že iz psov s kronično drisko. Psički, ki so stari manj kot 10 tednov so pogosto asimptomatski nosilci bakterije (Perrin in sod., 1993; Buogo in sod., 1995). Bakterijo smo pri mladih psičkih v visokem deležu osamili tudi mi. Psički so v času kolonizacije prav tako bili zdravi. Kolonizacijo psičkov smo nazadnje opazili pri starosti 3 tednov, nekoliko mlajših kot po nekaterih poročilih. S starostjo je hitro padala. *Clostridium difficile* pozitivna psička in maček, katerih vzorec smo dobili iz veterinarske ambulante sta imela drisko. Vzrok driske bi tukaj lahko bil toksigeni sev *C. difficile*, ki smo ga osamili iz vzorcev .

Piščanci in kokoši so med vzorčenjem izgledali zdravi, nekoliko mehkejšo sestavo blata smo opazili le v nekaj primerih. Glede na delež pozitivnih vzorcev blata piščancev iz velike farme ob različnih vzorčnih časih lahko sklepamo, da piščanci na farmo prispejo nekolonizirani s *C. difficile*, se kmalu po prihodu okužijo, nakar kolonizacija doseže vrh, saj smo že po 15 dneh bakterijo osamili iz vseh zbranih vzorcev. Delež koloniziranih piščancev začne hitro strmo padati (delež *C. difficile* pozitivnih vzorcev petnajst dni starih piščancev je iz 100,0 % po 16 tednih padel na 40,9 %). O naglem padcu kolonizacije s staranjem poročajo tudi pri teličkih (Rodriguez-Palacios in sod., 2006).

V primerjavi z deleži izolacije, o katerih poročajo iz Afrike (17,5 %- 29,0 %; Simango 2006; Simango in Mwakurudza, 2008), je naš delež izolacije iz perutninskih vzorcev blata na eni farmi bil veliko višji. Starosti vzorčenih živali, ki se je v našem primeru izkazala za pomemben vpliv na delež izolacije, avtor v afriški raziskavi ni navedel. Tako bi nižji delež osamitve lahko pripisali starosti kokoši ali pa neprimerni gojitveni metodi, saj v tej študiji raziskovalci niso uporabljali metode bogatitve ampak metodo direktne nacepitve, ki je na podlagi naših rezultatov manj občutljiva metoda. Delež *C. difficile* pozitivnih vzorcev kokoši iz manjših (domačih) kmetij je po njihovih poročanjih višji kot delež iz

komercialnih farm, kar je v nasprotju z našimi rezultati, saj je delež osamitve bakterije iz kokoši nesnic, vzorčenih na manjših kmetijah v primerjavi z veliko farmo bil veliko nižji. *C. difficile* pozitivne kokoši smo našli le na dveh od šestih kmetij. V afriški raziskavi za nižji izolacijski delež pri farmskih kokoših avtor za možen vzrok poda slabe higienske razmere v katerih domače kokoši živijo. V našem primeru bi visoko prevalenco *C. difficile* na veliki farmi lahko pripisali velikemu številu kokoši na eni farmi, kjer stelje med vzrejo ne menjajo in se tako okužene kokoši in njihovi iztrebki pomešajo med neokužene kokoši. Kokoši iz manjših kmetij so bile veliko starejše od farmskih kokoši, kar bi prav tako lahko prispevalo k nižjemu izolacijskemu deležu.

Periodično smo vzorčili tudi piščance na eni izmed manjših kmetij. Za razliko od farmskih kokoši, bakterije po 15 dneh iz vzorcev piščancev iz manjše kmetije nismo osamili. Vzrok za to bi lahko bil način vzreje, saj so piščance v tem času vzrejali v zaprtem prostoru in z zunanjim okoljem niso imeli neposrednega stika. Piščanci so bili *C. difficile* pozitivni šele pri starosti 56 dni in po tem, ko so jih izpostavili zunanjemu okolju. Delež pozitivnih vzorcev je s časom bivanja na prostem naraščal. Razen tega je bil vir enodnevnih piščancev pri farmi in majhni kmetiji različen.

Poleg kokoši je lahko nosilec bakterije *C. difficile* tudi druga perjad. Od pernatih vrst, ki smo jih preučevali smo bakterijo našli pri vrani, jerebicah in gosi. Nekateri poročajo o prisotnosti bakterije še pri pticah kot so race, goske (Borriello in sod., 1983) in noji (Frazier in sod., 1993), vendar je podatkov o bakteriji pri perjadi malo. Čeprav v tukaj opisanem vzorčenju v jati starejših fazanov bakterije nismo našli, smo jo nadaljevanju študij pri živalih bakterijo osamili pri fazanih starih manj kot 1 mesec, kar ponovno potrjuje hipotezo, da so zelo mladi osebki pogosto kolonizirani s *C. difficile*.

Delež pozitivnih vzorcev teličkov je v diplomskem delu nižji od kanadskih in ameriških (Rodríguez-Palacios, 2006; Hammit in sod., 2007), vendar pa višji od do sedaj objavljenih rezultatov v Sloveniji (Pirš in sod., 2008). Razlike med našimi rezultati in že objavljenimi v Sloveniji so najverjetneje nastale zaradi načina osamitve bakterije iz vzorca

Variantni toksinotipi so pri živalih pogosti, predstavljajo lahko kar 20-100 % izolatov (Rupnik in sod., 2003; Rupnik, 2008). Med temi variantnimi toksinotipi je najbolj pogost toksinotip V (PCR-ribotip 078 ali 066), ki ga v visokem deležu najdemo pri teličkih, prašičkih in konjih (Keel in sod., 2007; Pirš in sod., 2008; Rupnik in Marks, 2009). Presenetljivo je bil celoten delež variantnih toksinotipov pri živalih vključenih v naše delo nizek. Variantne toksinotipe smo določili le pri piščancih (IV) in jerebicah (XIb, XII). Toksinotip IV lahko najdemo pri konjih, pri prašičkih in govedu pa tega toksinotipa do sedaj še niso našli (Rupnik, 2009). Oba toksinotipa, ki smo ju našli pri jerebicah sta pri živalih že bila najdena. Toksinotip XI (PCR ribotip 033) so do sedaj našli pri prašičih in govedu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007). Med živalskimi izolati nismo zaznali niti enega izolata, ki bi pripadal toksinotipu V in PCR ribotipu 078.

Raznolikost sevov pri piščancih iz velike farme je bila veliko večja, kot v nekaterih raziskavah pri drugih domačih živalih. Na prašičji farmi lahko najdemo le en sev, v širšem geografskem območju pa lahko, npr. pri konjih najdemo 10-12 PCR-ribotipov (Arroyo in sod., 2005b; Keel in sod., 2007), ali prašičkih 2-4 PCR-ribotipov (Keel in sod., 2007; Pirš in sod., 2008). O 12 PCR-ribotipih na eni farmi, kot smo jih našli pri piščancih, še niso poročali. PCR-ribotipi so se med vzorčenji razlikovali, ponavljala sta se dva PCR-ribotipa C1 (SLO 008/002) in C2 (SLO 026), ki sta poleg C5 bila (SLO 004/014) ena najpogostejših tipov na farmi. Te PCR-ribotipe smo določili tudi pri kokoših iz manjših kmetij, bolni psički, bolnem mačku in teličkih.

Iz treh piščančjih vzorcev smo osamili dva različna tipa *C. difficile*. V dveh vzorcih smo istočasno določili toksinotip 0 in netoksigeni sev, v enem pa toksinotip 0 in variantni toksinotip IV. Izgleda, da določeno žival lahko istočasno kolonizira več kot en sev.

5.1.3 Ujemanje genotipov *Clostridium difficile* pri živalih in ljudeh

Epidemiologija CDI se je začela spreminjati. Eden od možnih vzrokov za te spremembe je vnos bakterije iz živalskega rezervoarja, zato se v zadnjem času veliko pozornosti posveča primerjavi izolatov živalskega in človeškega izvora.

S primerjavo živalskih in človeških izolatov *C. difficile* smo ugotovili, da je 8 živalskih PCR-ribotipov iz Podravskega območja prisotnih tudi pri ljudeh iz istega geografskega območja. V našem območju pri teličkih, perutnini in mačkah ter psih z bolezenskimi znaki CDI prevladuje PCR-ribotip C5 (SLO 004/014). V letih 2006, 2007 in 2008 je ta tip predstavljal več kot četrtino izolatov osamljenih iz kliničnih vzorcev, ki so izvirali iz istega geografskega področja kot je potekala naša raziskava. Ti rezultati nakazujejo, da med živalmi in ljudmi obstaja velika verjetnost prenosa *C. difficile*.

Ujemanje med sevi živalskega in človeškega izvora opažajo tudi v Ameriki in Kanadi (Arroyo in sod., 2005b; Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Keel in sod., 2007). V Kanadi so pri izolatih teličkov določili tipa 027 in 017, ki pri ljudeh po svetu povzročata epidemije (Rodriguez-Palacios in sod., 2006). PCR-ribotip 078, ki je v Ameriki pri govedu in prašičih prevladujoč tip so našli le pri enem od 23 zbranih človeških tipov. Vendar pa ta tip ni klinično nepomemben, saj se vse več pojavlja v Kanadi in na Nizozemskem (Debast in sod., 2009). PCR-ribotipa 017 in 078 sta prisotna tudi v surovem mesu (Songer in sod., 2009). Prisotnost tega tipa v hrani, pri prašičih, govedu in konjih ter vse večja prevalenca tega tipa pri ljudeh potrjuje predpostavko, da se bakterija *C. difficile* prenaša med živalmi in ljudmi.

Stanje v Sloveniji je glede *C. difficile* okužb načeloma stabilno, vendar tudi pri nas število postopno narašča. *C. difficile* se še vedno najpogosteje pojavlja pri starejših ljudeh, vendar ga danes pogosto izoliramo tudi iz skupine ljudi z nizkimi dejavniki tveganja: pri mlajših ljudeh in ljudeh brez predhodnega antibiotičnega zdravljenja ter bivanja v bolnišnici. Genotipi *C. difficile*, ki se pojavljajo pri naših živalih in bolnišnicah se prekrivajo in se razlikujejo od visokovirulentnih tipov, ki prevladujejo drugod po svetu.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov, zbranih v diplomski nalogi lahko zaključimo:

- izolacijski delež *Clostridium difficile* je z uporabo bogatitvenega gojišča s cikloserinom in cefoksitinom v primerjavi z isto osnovo in dodanim norfloksacinom, moksalaktamom ter cistein hidrokloridom višji
- občutljivost VIDAS CDAB testa pri živalskih vzorcih blata in bogatitveni kulturi je nizka, zato je ta encimskoimunski test za analizo živalskih vzorcev neprimeren
- v Sloveniji lahko *C. difficile* najdemo pri teličkih, perutnini, nekaterih pticah kot so jerebice, vrana in gos ter pri psih in mačkah
- *C. difficile* lahko pogosto osamimo iz mladih živali
- raznolikost genotipov pri piščancih je višja kot pri drugih živalskih vrstah
- določene *C. difficile* genotipe lahko srečamo pri večih različnih živalskih vrstah in ti so običajno prisotni tudi med človeškimi izolati
- pri živalih in ljudeh lahko najdemo identične *C. difficile* genotipe, kar kaže na možnost prenosa med tema dvema gostiteljema

6 POVZETEK

Clostridium difficile je eden izmed pomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. V zadnjem času pogostnost in resnost bolezni povzročene s *C. difficile* narašča. Narašča tudi število izvenbolnišničnih okužb, bolezen se pojavlja pri mladih, zdravih osebah, ki niso bile izpostavljene dejavnikom tveganja. Omenjene epidemiološke spremembe so lahko posledica selekcijskega pritiska v okolju in pojava novih variantnih tipov, kot je BI/NAP1/027. Vzrok za spremembe je lahko tudi vnos bakterije iz/v enega od novih rezervoarjev. Eden od možnih rezervoarjev za okužbo s *C. difficile* so živali, kjer bakterija postaja vse bolj pogosta in pomembna. Zato je važno, da poznamo pogostnost in genotipe *C. difficile* pri živalih v določenem geografskem okolju. Za Slovenijo imamo do sedaj podatke o *C. difficile* pri prašičih in deloma pri teličkih.

V diplomskem delu smo preučili pogostnost in tipe *C. difficile* pri govedu, nekaterih vrstah perjadi (fazani, jerebice, goske, vrane, prepelice, purani, grlice, pavi) in hišnih ljubljencev in v Podravski regiji ter jih nato primerjali s tipi najdenimi pri človeku. Prvič v Sloveniji in Evropi smo preučevali tudi prisotnost bakterije pri perutnini.

Ker je za uspešno osamitev *C. difficile* iz vzorca pomembna uporaba primerne gojitvene metode, smo s primerjavo direktne in bogatitvene gojitvene metode ter primerjavo dveh komercialnih suplementov, CC (cikloserin in cefoksitin) in CDMN (norfloksacin, moksalaktam in cistein hidroklorid), metodo osamitve *C. difficile* najprej optimizirali. Na manjši podskupini živalskih vzorcev smo določili tudi občutljivost komercialnega toksinskega ELISA-testa VIDAS CDAB, ki je namenjen testiranju kliničnih vzorcev.

Naši rezultati so pokazali, da je z bogatitvijo vzorca v bogatitvenem gojišču s cikloserinom in cefoksitinom delež osamitve v primerjavi z bogatitvijo v bogatitvenem gojišču s CDMN in neposredno gojitveno metodo višji. Z neposredno metodo smo bakterijo osamili le v primeru bolne živali, kar potrjuje poročila nekaterih avtorjev, da bogatitev v primeru aktivne bolezni ni potrebna.

Občutljivost VIDAS CDAB s katerim smo testirali vzorce blata perutnine in teličkov ter bogatitvene kulture naključno izbranih vzorcev je bila v primerjavi z dokazom toksigene kulture nizka. Slabo občutljivost in specifičnost komercialnih ELISA-testov pri različnih živalskih vrstah kot so psi in telički opisujejo tudi številni drugi avtorji. Lažno pozitivnih rezultatov pri testiranju vzorcev in bogatitvene kulture z VIDAS CDAB nismo dobili.

C. difficile smo v visokem deležu osamitve iz vzorcev blata mladih živali: piščancev (6,7 % - 100 %), psičkov (50-75 %) in teličkov (11,9 %). *C. difficile* smo osamili tudi iz blata starejših kokoši, jerebic, goske, vrane, in odraslega bolnega psa ter bolne mačke.

Po dosedanjih poročilih z živalmi pogosto povezujemo variantne seve *Clostridium difficile*, ki imajo spremembe v genih za toksin A (TcdA) in toksin B (TcdB) ter proizvajajo tretji toksin, imenovan binarni toksin (CDT). Predstavljajo lahko kar 20-100 % izolatov pri živalih. Med temi variantnimi toksinotipi je najbolj pogost toksinotip V (PCR-ribotip 078 ali 066). Presenetljivo je bil celoten delež variantnih toksinotipov pri živalih, vključenih v naše delo, nizek. Variantne toksinotipe smo določili le pri piščancih (IV) in jerebicah (XIb, XII). Med živalskimi izolati nismo zaznali niti enega izolata, ki bi pripadal toksinotipu V in PCR-ribotipu 078.

Raznolikost PCR-ribotipov živalskih izolatov je v primerjavi s človeškimi manjša. V diplomskem delu smo pri preučevanih živalih našli skupno 17 PCR-ribotipov. Raznolikost sevov pri piščancih iz velike farme v naši raziskavi je bila veliko večja (skupno 12 različnih PCR-ribotipov), kot v nekaterih raziskavah drugih domačih živali, kjer na eni farmi najdemo en PCR-ribotip. Najpogostejši PCR-ribotipi pri živalskih izolatih so bili C1 (SLO 008/002), C2 (SLO 026), C5 (SLO 004/014). Prevladovali so na veliki perutninski farmi, določili pa smo jih tudi pri kokoših iz manjših kmetij, bolni psički, bolnem mačku in teličkih.

S primerjavo živalskih in človeških izolatov *C. difficile* smo ugotovili, da je 8 živalskih PCR ribotipov iz Podravskega območja prisotnih tudi pri ljudeh iz istega geografskega območja, dodatni trije pa so identični izolatom najdenih pri ljudeh izven našega geografskega območja. V našem območju pri teličkih, perutnini in mačkah ter psih z

bolezenskimi znaki CDI prevladuje PCR-ribotip C5 (SLO 004/014) . V letih 2006, 2007 in 2008 je po podatkih Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor ta tip predstavljal več kot četrtno izolatov osamljenih iz kliničnih vzorcev, ki so izviralni iz istega geografskega področja kot je potekala naša raziskava. Ti rezultati nakazujejo, da verjetnost prenosa *C. difficile* iz živali na ljudi obstaja.

V Sloveniji se tipi *C. difficile*, ki se pojavljajo pri živalih in ljudeh prekrivajo in se razlikujejo od visokovirulentnih tipov, ki prevladujejo drugod po svetu.

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
- Arroyo L.G., Rousseau J., Willey B.M., Low D.E., Staempfli H., McGeer A., Weese S. 2005a. Use of selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5341-5343
- Arroyo L.G., Kruth S.A., Willey B.M., Staempfli H.R., Low D.E., Weese S.J. 2005b. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 163-166
- Aspinall S.T., Hutchinson D.N. 1992. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*, 45: 812-814
- 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., Kajzer C., Planas N., Petit J.C. 1993. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 4: 963-977
- Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L., Kasper D.L. 1977. Clindamycin associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *Journal of Infectious Diseases*, 136: 701-705. Cit. po: Brazier J.S. 1998. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 29-49

- 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
- Baverud V. 2002. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. *Veterinary Quarterly*, 24, 4: 203-219
- Bidet P., Barbut F., Lalande V., Burghoffer B., Petit J.C. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 2: 261-266
- Bidet P., Lalande V., Salauze B., Burghoffer B., Avesani V., Delmee M., Rossier A., Barbut F., Petitt J.C. 2000. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 7: 2484-2487
- Borriello S.P., 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
- Bowman R.A., Riley T.V. 1986. Isolation of *Clostridium difficile* from stored specimens and comparative susceptibility of various tissue culture cell lines to cytotoxin. *FEMS Microbiology Letters* 34, 1: 31-35
- Braun V., Hundsberger T., Leukel P., Sauerborn M., von Eichel-Streiber C. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*, 181, 1-2: 29-38
- Brazier J.S. 1998. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 29-49

- Brazier J.S., Borriello S.P. 2000. Microbiology, epidemiology and diagnosis of *C. difficile* infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 250: 1-33
- Buogo C., Burnens A.P., Perrin J., Nicolet J. 1995. Presence of *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile*, *C. perfringens* and *Salmonella* in some litters and in a kennel population of adult dogs. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 137, 5: 165-171
- Carter G.P., Lyras D., Allen D.L., Mackin K.E., Howarth P.M., O'Connor J.R., Rood J.I. 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, LytTR family response regulator. *Journal of Bacteriology*, 189, 20: 7290-7301
- 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. *Journal of the American Medical Association*, 295, 1: 25-27
- Chouicha N., Marks S.L. 2006. Evaluation of five immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile* –associated diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 2: 182-188
- Clabots C.R., Bettin K.M., Peterson L.R., Gerding D.N. 1991. Evaluation of cyclosein-cefoxitin-fructose agar and cycloserin-cefoxitin-fructose broth for recovery of *Clostridium difficile* from environmental sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1: 2633-2635
- 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

- Debast S.B., van Leengoed L.A.M.G., Goorhuis A., Harmanus C., Kuijper E.J., Bergwerff A.A. 2009. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental Microbiology*, 11, 2: 505-511
- 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
- Delmee M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 8: 411-416
- Deneve C., Janoir C., Delomenie C., Collignon A. 2008. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 6: 732-738
- 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
- Fedorko D.P., Williams E.C. 1997. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 5: 1258-1259

- Frazier K.S., Herron A.J., M. E. Hines II, Gaskin J.M., Altman N.H. 1993. Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 5: 623-625
- Gerič B., Carman R.J., Rupnik M., Genheimer C.W., Sambol S.P., Lyerly D.M., Gerding D.N., Johnson S. 2006. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. Journal of Infectious Diseases, 193, 8: 1143-1150
- George W.L., Sutter V.L., Citron D., Finegold S.M. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology, 9, 2: 214-219
- 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
- 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
- Goorhous A., Debast S.B., van Leengoed L.A., Harmanus C., Notermans D.W., Bergwerff A.A., Kuijper E.J. 2008. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? Journal of Clinical Microbiology, 46, 3: 1157
- Green R.H. 1974. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. Yale Journal of Biology and Medicine, 47:166–181. Cit. po: Brazier J.S. 1998. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41: 29-49

- Hafiz S.L., Oakley C.L. 1976. *Clostridium difficile*: Isolation and characteristics. Journal of Medical Microbiology, 9: 129-137. Cit. po: Brazier J.S. 1998. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41: 29-49
- Hall I.C., O'Toole E. 1935. Intestinal flora in newborn 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
- Hammit M.C., Bueschel D.M., Keel M.K., Glock R.D., Cuneo P., DeYoung D.W., Reggiardo C., Trinh H.T., Songer J.G. 2007. A possible role for *C. difficile* in the etiology of calf enteritis. Veterinary Microbiology, 127, 3-4: 343- 352
- Hatheway C.L. 1990. Toxigenic Clostridia. Clinical Microbiology Reviews, 3, 1: 66-98
- Hofmann F., Herrmann A., Habermann E., von Eichel Streiber C. 1995. Sequencing and analysis of the gene encoding the α -toxin of *Clostridium novyi* proves its homology to toxins A and B of *Clostridium difficile*. Molecular and General Genetics, 247: 670-679
- Hopkins M.J., Macfarlane G.T. 2003. Non digestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4: 1920-1927
- Hurley B.W., Nguyen C.C. 2002. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. Archives of Internal Medicine, 162, 19: 2177-2184
- Jacobs A. 2001. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. Medicine, 80, 2: 88-101
- Johnson S., Gerding D.N. 1998. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clinical Infectious Diseases, 26, 5: 1027-1034

- 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
- 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
- Kim J., Smathers P.P., Leckerman K.H., Coffin S., Zaoutis T. 2008. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *Pediatrics*, 122, 6: 1266-1270
- Kuijper E.J., Coignard B., Tüll P. 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 6: 2-18
- Lefebvre S.L., Weese J.S. 2009. Contamination of pet therapy dogs with MRSA and *Clostridium difficile*. *Journal of Hospital Infection*, 72, 3: 268-269
- 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
- Levett P.N. 1985. Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 2: 233-234

- Lyras D., O'Connor J.R., Howarth P.M., Sambol S.P., Carter G.P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D.N., Rood J.I. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458: 1176-1179
- Lyerly D., Saum K.E., MacDonald D.K., Wilkins T.D. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and Immunity*, 47, 2: 349-352
- 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
- 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
- Mayfield J.L., Leet T., Miller J., Mundy L.M. 2000. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 4: 995-1000
- McDonald L.C., Owings M., Jernigan D.B. 2006. Increasing rates of *Clostridium difficile* infection among patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 3: 409-415

- McEllistrem C.M., Carman R., Gerding D.N., Genheimer C.W., Zheng L. 2005. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 2: 265-272
- 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
- McMaster-Baxter N.L., Musher D.M. 2007. *Clostridium difficile*: Recent epidemiologic findings and advances in therapy. *Pharmacotherapy*, 27, 7: 1029-1039
- O' Farrell S., Wilks M., Nash J.Q., Tabaqchali S. 1983. A selective enrichment broth for the isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Pathology*, 37, 1: 98-99
- Pěchině S., Janoir C., Collignon A., 2005. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile* associated disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5018-5025
- Perelle S., Gilbert M., Bourlioux P.C., Popoff M.R. 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD 196. *Journal of Clinical Microbiology*, 65, 4: 1402-1407
- Perrin J., Cosmetatos I., Gallusser A., Burnens A.P., Nicolet J. 1993. Intestinal carriage of *Clostridium difficile* in neonate dogs. *Journal of Veterinary Medicine B*, 40, 3: 222-226
- Philips K.D., Rogers P.A. 1981. Rapid detection and presumptive identification of *Clostridium difficile* by p-cresol production on a selective medium. *Journal of Clinical Pathology*, 34, 6: 642-644
- Pirš T., Ocepek M., Rupnik M. 2008. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 6: 790-792

- 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
- Pothoulakis C. 2000. Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 915: 347-356
- Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Duffield T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese J.S. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 11: 1730-1736
- Rodriguez-Palacios A., Staempfli H., Duffield T., Weese J.S. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 3: 485-487
- Rolfe R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130, 2: 396-402
- Rouphael N. G., O'Donnell J.A., Bhatnagar J., Lewis F., Polgreen P.M., Beekmann S., Guarner J., Killgore G.E., Coffman B., Campbell J., Zaki S.R., McDonald L.C. 2008. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: An emerging threat to pregnant women. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 198, 6: 635e1-635e6
- 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., 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. 2001. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in routine laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 8: 417-420

- Rupnik M., Grabnar M., Gerič B. 2003. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*, 9, 6: 289-294
- 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. 3rd ed. Alouf J.E., Popoff M. (eds.). New York, Academic Press: 409 – 429
- Rupnik M. 2007a. *Clostridium difficile* toxinotypes. Maribor, Medicinska fakulteta.
<http://www.mf.uni-mb.si/Mikro/tox/> (3.sept.2009): 8 str.
- Rupnik M. 2007b. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 5: 457-459
- Rupnik M. 2008. Heterogeneity of large clostridial toxins: Importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 3: 541-555
- Rupnik M., Kotnik Kevorkijan B. 2009. *Clostridium difficile*: ali postaja pogostejši tudi v Sloveniji? *JAMA-SI*, 17, 3: 107-109
- Rupnik M. 2009. Variantni *C. difficile* toksinotipi pri živalih. Maribor, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor: osebni vir.
- Rupnik M., Marks S.L. 2009. *Clostridium difficile* pri konjih. Maribor, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor: osebni vir.

- Rupnik M., Wilcox M.H., Gerding D.N. 2009. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 7: 526-536, doi:10.1038/nrmicro2164
- Sebahia M., Wren B.W., Mullany P., Fairweather N.F., Minton N., Stabler R., Thomson N.R., Roberts A.P., Cerdeno-Tarraga A.M., Wang H., Holden T.T.G., Wright A., Churcher C., Qual M.A., Baker S., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Cronin A., Davis P., Dowd L., Fraser A., Feltwell T., Hance Z., Holroyd S., Jagels K., Moule S., Mungall K., Price C., Rabinowitsch E., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Unwin L., Whithead S., Dupuy B., Dougan G., Barrell B., Parkhill J. 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, 38, 7: 779-786
- 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
- Shin B.M., Yoo S.J., Oh H.J. 2009. Comparison of two enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29, 2: 122-126
- Simango C. 2006. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 12: 1146-1150
- Simango C., Mwakurudza S. 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 3: 268-270
- Songer J.G., Post K.W., Larson D.J., Jost B.H., Glock R.D. 2000. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Journal of Swine Health and Production*, 8, 4: 185-189

- Songer J.G., Anderson M.A. 2006. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 12, 1: 1-4
- Songer J.G., Trinh H.T., Thompson A.D., Killgore G.E., McDonald L.C., Limbago B.M. 2009. Isolation of *Clostridium difficile* in retail meat products, USA 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 5: 819-821
- Spigaglia P., Manstrantonio P. 2004. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 11: 1129-1136
- 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., 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 a construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2: 461-463.
- Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., Brazier J., Duerden B., Popoff M. 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 2: 307-312
- Tadesco F.J., Barton R.W., Alpers D.H. 1974. Clindamycin-associated colitis: A prospective study. *Annals of Internal Medicine*, 81:429-433. Cit. po: Brazier J.S. 1998. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 29-4
- 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

- Terhes G., Brazier J.S., Urban E., Soki J., Hamid K.A., Nagy E. 2004. Community-acquired *Clostridium difficile* diarrhea caused by binary toxin, toksin A and toxin B gene-positive isolates in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 9: 4316-4318
- Terhes G., Brazier J.S., Urban E., Soki J., Nagy E. 2006. Distribution of *C. difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 3: 279-282
- Ticehurst J.R., Aird D.Z., Dam L.M., Borek A.P., Hargrove J.T., Carroll K.C. 2006. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3: 1145-1149
- Toma S., Lesiak G., Magus M., Lo H. L., Delmee M. 1988. Serotyping of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 3: 426-428
- 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
- Weese J.S., Staempfli H.R., Prescott J.F., Kruth S.A., Greenwood S.J., Weese H.E. 2001. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 4: 374-378

Wheeldon L.J., Worthington T., Hilton A.C., Elliott T.S.J., Lambert P.A. 2008. Physical and chemical factors influencing the germination of *Clostridium difficile* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 6: 2223-2230

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

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

ZAHVALA

Posebej bi se rada zahvalila somentorici prof. dr. Maji Rupnik za nemalo odgovorjenih vprašanj, vso pomoč in odlično usmerjanje pri delu, predvsem pa za sproščeno in veselo delovno vzdušje.

Hvala prof. dr. Darji Žgur Bertok za mentorstvo in prof. dr. Katji Seme za pregled diplomske naloge in predloge.

Hvala Mateji za pomoč, prijaznost, potrpežljivost in vztrajnost. Hvala Sandri in Aleksandru za pomoč ko sem jo potrebovala in veliko navihanih trenutkov. Vsem v laboratoriju, hvala za obilo dobre volje.

Hvala Damirju, da verjame vame in mi stoji ob strani, ko to najbolj potrebujem. Hvala staršem in bratu za vso podporo pri šolanju.