SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

2118313

Genotypizácia kmeňov *Clostridium difficile* od pacientov so suspektnou infekciou CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease)

2010

Bc. Ľubica Ďuďáková

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Genotypizácia kmeňov *Clostridium difficile* od pacientov so suspektnou infekciou CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease)

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	4.2.1 biológia
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Vedúca diplomovej práce:	prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.
Konzultant diplomovej práce:	MUDr. Oto Melter, PhD.

Nitra 2010

Bc. Ľubica ĎUĎÁKOVÁ

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Ľubica Ďuďáková vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému "Genotypizácia kmeňov *Clostridium difficile* od pacientov so suspektnou infekciou CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease)" vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

Nitra 12. 4. 2010

Bc. Ľubica Ďuďáková

Poďakovanie

Dovoľujem si vysloviť poďakovanie MUDr. Otakarovi Nyčovi, PhD., MUDr. Otovi Melterovi, PhD., MUDr. Jane Matějkovej, Ing. Danielovi Codlovi, PhD. a prof. RNDr. Zdenke Gálovej, CSc. za odborné vedenie a pomoc, ktorú mi poskytli pri vypracovaní diplomovej práce.

Abstrakt

Clostridium difficile je grampozitívna sporulujúca anaeróbna palička, ktorá sa vyskytuje v čreve u približne 5 % dospelých, u detí a kojencov je výskyt *Clostridium difficile* vyšší. Produkuje toxíny, ktoré sú schopné spôsobiť ľahké hnačkové ochorenie, ale môžu vyvolať až život ohrozujúcu pseudomembranóznu enterokolitídu. Tieto ochorenia často vznikajú ako nozokomiálne infekcie v súvislosti s podávaním antibiotík, ktoré eliminujú fyziologickú črevnú flóru a tým sa rezistentný *Clostridium difficile* ľahko premnoží.

Toxíny A a B produkované niektorými kmeňmi *C. difficile* sa uvoľňujú rozpadom buniek. Toxín A je enterotoxín, ktorý poškodzuje bunky črevného epitelu a spôsobuje hromadenie tekutín v čreve, čo vedie k vzniku vodnatých hnačiek. Toxín B je cytotoxín a spôsobuje nekrózu napadnutého tkaniva. Ku vzniku pseudomembranóznej enterokolititídy dochádza účinkom oboch toxínov. Laboratórna diagnostika sa opiera o dôkaz toxínov v črevnom obsahu metódami EIA (enzymatická imunoanalýza).

Cieľom práce bolo zaviesť metódy na detekciu a analýzu kmeňov vyskytujúcich sa u pacientov. Z kmeňov vyskytujúcich sa u pacientov, sú najnebezpečnejšie ribotypy 027 a 078. Na ich detekciu sa využívajú techniky molekulárnej biológie, ako toxinotypizácia, detekcia binárneho toxínu, ribotypizácia a pulzná elektroforéza.

Na prítomnosť génov pre binárny toxín sme testovali 35 vzoriek DNA, pričom binárny toxín bol detekovaný pri 9 kmeňoch (25,7 %) a zvyšných 26 (74,3 %) vzoriek malo negatívny výsledok tohto testovania. Do toxinotypu I boli zaradené tri kmene (8,6 %), do toxinotypu II 4 kmene (11,4 %) a do toxinotypu VIII 11 kmeňov (31,4 %). Päť kmeňov (14,3 %) bolo detekovaných ako toxinotyp X a 4 toxinotyp XI (11,4 %). Len po 1 kmeni (2,9 %) sme zaradili do toxinotypov XIV a XIII a nebol detekovaný výskyt toxinotypu III, kam zaraďujeme ribotyp 027. Pomocou našej metodiky sa nepodarilo otypovať 6 kmeňov (17,1 %). Ribotypizáciou sa potvrdil výskyt ribotypov 033 – 1 kmeň (2,9 %), 036 - 5 kmeňov (14,3 %), 047 – 11 kmeňov (31,4 %), 070 – 1 kmeň (2,9 %), 102 – 3 kmene (8,6 %), 103 – 4 kmene (11,4 %) a 111 – 1 kmeň (2,9 %), pričom nebol potvrdený výskyt hypervirulentných ribotypov 027 a 078.

Kľúčové slová: *Clostridium difficile*, nozokomiálna nákaza, toxíny, ribotypizácia, toxinotypizácia, kultivácia

Abstract

Clostridium difficile is a gram-positive anaerobic, spore-forming rod. During its vegetative growth it produces toxins, which can cause infection commonly manifested as mild-to-moderate diarrhoea. These diseases often start as nosocomial infections connected with antibiotic therapy, which is the key factor that alters the colonic flora and supports colonisation by *Clostridium difficile.* The phenomenon of nosocomial infections by *Clostridium difficile* has been described in horses, as well in humans.

Firstly, the toxin production in faecal samples was tested by EIA method. Further, the DNA was isolated using CHELEX by Rupnik (http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/) and then the presence of *ctd*B gene was monitored to confirm the production of binary toxin. Subsequently, the typization of toxins based on RFLP method (restriction fragment length polymorphisms) was used. The Rupnik‘s protocol (http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/) was used for evaluation of polymorphism of the restriction fragments as well. Then, the ribotypes of analysed strains were set by comparison of the obtained profiles and collection strains, and by the Bidet’s ribotypisation method (Bidet, 1999).

Thirty-five samples of DNA were tested for the presence of binary toxin. Binary toxin was detected in 9 strains (25.7%), remaining 26 (74.3%) of the samples showed negative result in this testing. From the 35 tested samples 3 strains (8.6%) belonged to the toxinotype I, 4 strains (11.4) to the toxinotype II, 11 strains (31.4%) to the toxinotype VIII, 5 strains (14.3%) to the toxinotype X, and 4 strains (11.4%) to the toxinotype XI. Only in 1 strain (2.9 %) the toxinotype XIV was detected and 1 strain (2.9%) showed the presence of the toxinotype XII. The presence of the toxinotype III was not confirmed. This method was not successful in typisation of 6 strains (17.1%).

By ribotypisation the occurrence of ribotypes was confirmed as follows: 033 – 1 strain (2.9%), 036 - 5 strains (14.3%), 047 – 11 strains (31.4%), 070 – 1 strain (2.9%), 102 – 3 strains (8.6%), 103 – 4 strains (11.4%) and 111 – 1 strain (2.9%). Hypervirulent ribotypes 027 and 078 were not detected.

Key words: *Clostridium difficile*, nosocomial infection, toxins, ribotypization, toxinotypization

Obsah

Zoznam skratiek a značiek..... 9

Úvod..... 10

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky..... 11

1.1 Taxonómia rodu *Clostridium*..... 11

1.1.1 Morfológia rodu *Clostridium*..... 12

1.1.2 Morfológia *Clostridium difficile*..... 14

1.2 Fenotypová charakteristika *C. difficile*..... 15

1.2.1 Kultivácia …..... 16

1.2.2 Fyziologické vlastnosti …..... 19

1.2.3 Biochemická identifikácia..... 19

1.2.4 Toxíny a ich detekcia..... 21

1.2.5 Antibiotická rezistencia..... 23

1.3 Molekulárno-biologické metódy genotypovej charakteristiky..... 24

1.3.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)..... 25

1.3.1.1 Identifikácia *C. difficile* pomocou amplifikačných metód. 26

1.3.2 Metódy typizácie..... 26

1.3.2.1 RFLP..... 27

1.3.2.2 Toxinotypizácia..... 27

1.3.2.3 Ribotypizácia a príbuznosť kmeňov..... 32

1.3.2.4 PFGE……..…….... 34

1.3.2.5 Real-time PCR..... 37

1.4 Výskyt..... 38

2 Cieľ práce..... 40

3 Materiál a metódy..... 41

3.1 Kultivácia..... 41

3.2 Identifikácia..... 41

3.2.1 Biochemická identifikácia..... 41

3.3 Dôkaz toxínov..... 43

3.4 Testovanie citlivosti na antibiotiká..... 43

3.4.1 Stanovenie MIC pomocou E-testu..... 43

3.4.2 Stanovenie citlivosti testom ATB Ana..... 43

3.5 Izolácia DNA..... 44

3.6 Toxinotypizácia....44
3.7 Detekcia binárneho toxínu....46
3.8 Ribotypizácia a príbuznosť analyzovaných kmeňov....47
3.9 PFGE....47
3.10 Real-time PCR pomocou „Xpert™ *C. difficile*“….....48
4 Výsledky práce a diskusia....50
5 Návrh na využitie výsledkov....57
6 Záver....58
Zoznam použitej literatúry....59
Príloha....67

Zoznam skratiek a značiek

AP-PCR	- Arbitrarily Primed PCR
BHI	- Brain Heart Infusion broth
bp	- párov báz
CCEY	- agar, *Clostridium difficile* cefoxitin cycloserine egg-yolk agar
CDAD	- *Clostridium difficile* Associated Disease
CNS	- centrálny nervový systém
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
dNTP	- deoxyribonukleotidtrifosfáty
EIA	- enzymatická imunoanalýza
ELFA	- Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA	- enzymatická imunoanalýza
IFA	- imunofluorescencia
IGS	- intergenic spacer region
MIC	- minimálna inhibičná koncentrácia
PaLoc	- pathogenity locus
PCR	- polymerázova reťazová reakcia
PFGE	- pulzná gélová elektroforéza
PMN	- polymorfonukleárne bunky
RAPD	- Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	- dĺžkový polymorfizmus restrikčných fragmentov
RNA	- ribonukleová kyselina
VL	- *viande-levure*, z francúzštiny – obsahuje mäsovo-kvasničný extrakt

ÚVOD

Mikroorganizmy sprevádzajú ľudstvo od nepamäti, pričom niektoré z nich prinášajú človeku osoh produktami svojho metabolizmu, iné sú patogénmi spôsobujúcimi ochorenia rôznej závažnosti.

Clostridium difficile bolo prvý krát izolované Hallom a O`Toolom (1935) zo stolíc 40% vyšetrovaných novorodencov a o 2 roky neskôr bolo nájdené Snydrom (1937) v stolici 15% detí do jednoho roku života. Vtedy bolo pokladané za nepatogénnu zložku bežnej črevnej mikroflóry a bolo pomenované ako *Bacillus difficilis*. Počas dalších 40 rokov sa nepravidelne vyskytovali správy o jeho izoláciách a o tom, že táto baktéria môže spôsobovať ochorenia tráviacej sústavy. Od roku 1970 však začína pribúdať správ o prípadoch pseudomembranóznych kolitíd vzniknutých v súvislosti s antibiotickou terapiou. V roku 1971 preukázali Georges a Symonds, že v stolici osôb, u ktorých sa po aplikácii antibiotík vyvinula pseudomembranózna enterokolitída, je prítomný toxín neutralizovateľný sérom proti *Clostridium sordellii*. V roku 1978 Barlett a i. a George a i. izolovali pri tomto ochorení *C. difficile* a dokázali, že produkuje toxín neutralizovateľný sérom proti toxínu *C. sordellii*. V ďalšom roku tento toxín uvedení autori purifikovali a stanovili jeho základné vlastnosti (ZÁVADOVÁ, 1986).

Odvtedy sa poznatky o tejto baktérii už značne rozšírili, takže teraz je jej diagnostika relatívne dobre prepracovaná (VOTH, BALLARD, 2005).

Hlavnými nežiaducimi faktormi pôsobenia *C. difficile* v organizme sú teda toxíny**.** Je to toxín A, toxín B, binárny toxín a tzv „motility-altering factor“ stimulujúci sťahy hladkej svaloviny čreva, ktoré poškodzujú sliznicu čreva.

1 PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1 Taxonómia rodu *Clostridium*

Podľa taxonomického členenia patrí rod *Clostridium* do:

- doména *Bacteria*
- kmeň *Firmicutes*
- trieda *Clostridia*
- rad *Clostridiales*
- čeľaď *Clostridiacea*e

Rod *Clostridium* zahŕňa viac ako 60 druhov grampozitívnych anaeróbnych sporulujúcich tyčiniek (HRDINA, 2004; SEDLÁČEK, 2007). Pre človeka majú význam ako producenti hospodársky významných metabolitov (napr. ocot alebo rôzne enzýmy), len niektoré druhy sú schopné vyvolať infekčné ochorenie u ľudí alebo zvierat, prostredníctvom exotoxínov proteínovej povahy (BEDNÁŘ, 1999).

Viacero druhov tvoria saprofyty významné najmä pri rozklade rastlinných a živočíšnych zvyškov. Patogénne druhy produkujú toxíny, z ktorých sú niektoré extrémne účinné. Klostrídiá sú v prírode rozšírené v pôde a môžu sa vyskytovať v črevnom trakte ľudí a zvierat (ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, 2007).

Klostrídiové infekcie sú:

- **exogénne** (spóry klostrídií sa dostávajú do tkanív pri úrazoch alebo strelných poraneniach; spóry alebo toxín sa dostávajú do organizmu s potravou),
- alebo ide o infekcie **endogénne** (sú prítomné v bakteriálnej flóre hrubého čreva, príp. žlčníka alebo vagíny), zvláštnym prípadom je autoinfekcia pri operáciách (nozokomiálne nákazy) (VOTAVA, 2000).

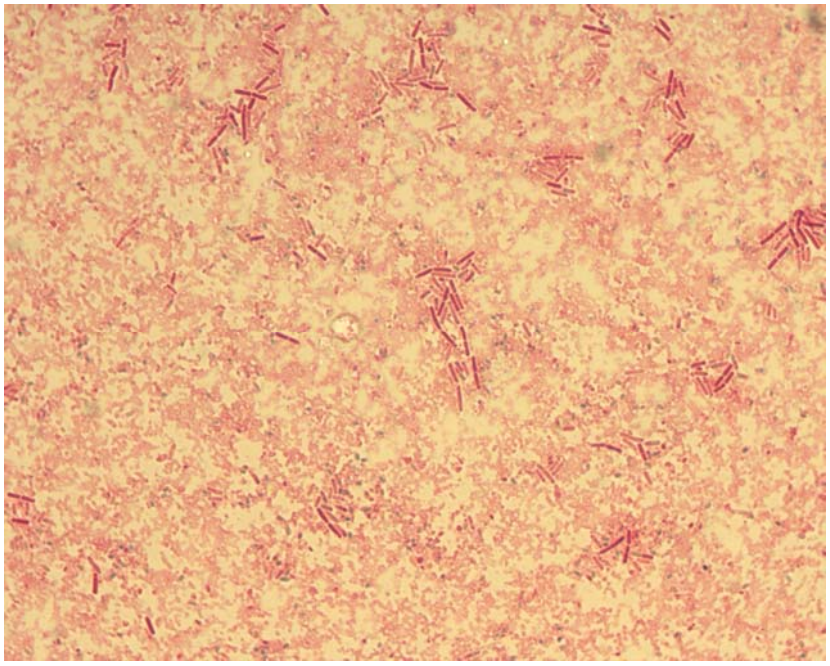
Klostrídiá vyvolávajú v ľuďoch 3 druhy ochorení:

1. neurointoxikácie (***C. tetani*** **a** ***C. botulinum***)
2. nekrotizujúce toxikoinfekcie mäkkých tkanív a brušných orgánov obsahujúcich svalovinu (histotoxické klostrídiá ***C. perfringens*****,** ***C. septicum***)
3. chorobné procesy v čreve - nekrotizujúca enterokolitída, enterotoxémia, pseudomebranózna enterokolitída a hnačky (***C. perfringens*****,** ***C. difficile***) (VOTAVA, 2000).

1.1.1 Morfológia rodu *Clostridium*

Vegetatívne formy klostridií predstavujú rôzne dlhé a široké paličky, väčšinou rovné a ich usporiadanie je charakteristické pre jednotlivé druhy (SEDLÁČEK, 2007). Väčšinou sú vďaka peritrichálne uloženým bičíkom pohyblivé. Ich charakteristickou vlastnosťou je tvorba oválnych či guľatých endospór. Podľa umiestenia spóry v bunke sa rozlišujú baktérie so spórami centrálnymi, subterminálnymi a terminálnymi. Pri väčšine druhov spóry vydúvajú bunku, ale v niektorých prípadoch tomu tak byť nemusí (VOTAVA, 2003).

Spóry sú kľudovým štádiom baktérie, obvykle majú veľmi silné steny, odolné voči fyzikálnym a chemickým vplyvom. Vo forme spór prežívajú klostrídiá nepriaznivé podmienky po veľmi dlhú dobu (KRAMÁŘ, 2007).



Obr. 1: Vegetatívne bunky a spóry *C. difficile*, kultivácia na Schaedlerovom agare, 72 h, farbenie podľa Wirtz Conclina (foto autorka práce)

Clostridium perfringens

Patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce klostrídiá v klinickom materiáli. Je to pochopiteľné vzhľadom na skutočnosť, že uvedený druh je bežnou súčasťou ľudskej anaeróbnej črevnej mikroflóry. Morfologicky sa vôbec nelíši od ostatných príslušníkov rodu, charakteristická je absencia spór baktérií prítomných v klinickom materiáli (VOTAVA, 2000).

Clostridium perfringens tvorí nepohyblivé tyčinky väčšinou hrubé viac ako 1 mm, krátke 2-4 mm alebo dlhé (viac ako 10 mm), niekedy opuzdrené polysacharidovým puzdrom. Spóry sú oválne, subterminálne a vydúvajú tyčinku, sú termorezistentné (KOMINSKY, 2007).

Kultivácia *C. perfringens* je veľmi ľahká, pretože rastie dobre na VL-agare (z francúzštiny „*viande-levure*“, obsahuje mäsovo-kvasničný extrakt), ale i na obyčajnom krvnom agare. Charakteristické je vytváranie **dvojitej hemolýzy** okolo narastených kolónií. Priemer kolónií zväčša nepresahuje 5 mm.

C. perfringens vykazuje toxickú aktivitu, predstavovanú produkciou **lecitinázy**. Toxín sa dá dobre dokázať na žĺtkovom agare, kde sa polovica média prevrství antisérom proti určitému typu toxínu. V súčastnosti je známych 6 typov lecitinázy označovaných A – F. *C. perfringens* typu A patrí medzi najviac obávaných pôvodcov gastroincestinálnych infekcií, pretože ním produkovaný toxín má povahu enterotoxínu (VOTAVA, 2000).

Histotoxické klostrídiá

Vyvolávajú klostrídiovú myonekrózu a plynatú sneť. Okrem *C. perfringens* ako hlavného agensu (zodpovedá za asi 80% všetkých plynatých snetí) možu takýto klinický obraz spôsobiť aj iné druhy klostrídií, hlavne ***C. novyi*** a ***C. septicum***. Príležitostne sa môžu uplatniť tiež ***C. histolyticum***, ***C. sordellii*** a niektoré ďalšie druhy *(*www.lfhk.cuni.cz).

Clostridium botulinum

Je grampozitívna baktéria, v tvare tyčinky a je schopná vytvárať spóry. Pre svoj rast uprednostňuje anaeróbne prostredie. Je vo forme spór bežne rozšírená v prírode – v pôde, bahne, vode, na koreňovej a inej zelenine. Okrem toho sa nachádza aj v tráviacom systéme zvierat, odkiaľ môže byť vylučovaná do prostredia. Prenos klostrídií na potraviny sa môže uskutočniť z nedbalosti pracovníkov pri výrobe, pri skladovaní, pri príprave stravy, z neodbornosti a podceňovania dodržiavania predpísaných technologických postupov (SOBEL, 2005).

Spóry *C. botulinum* sú termorezistenté, odolajú aj 2 hodinovému varu. Baktérie *Clostridium botulinum* sú schopné množenia v širokej škále potravín, ak majú optimálne podmienky (t. j. nedostatok kyslíka, keďže sú to anaeróbne baktérie a vhodná teplota). Nie sú schopné množenia v niektorých kyslých druhoch ovocia pre nízke pH

(<4,5). Zo spór vyklíčia jeho vegetatívne formy a začnú v konzerve alebo v kontaminovanej potravine produkovať toxín botulín. Toxíny *C. botulinum* sú citlivé na teplo, k ich inaktivácii dochádza zahriatím na teplotu 80°C po dobu 10 minút alebo iným ekvivalentným spôsobom. V súčastnosti rozoznávame 7 typov botulotoxínov (A, B, C, D, E, F, G). V humánnej medicíne figurujú najčastejšie typy A, B, E a F (VOTAVA, 2000).

Clostridium tetani

Je štíhla G+ pohyblivá palička, ktorá vytvára okrúhle terminálne uložené spóry výrazne odolné voči teplu a žiareniu. *C. tetani* je súčasťou normálnej črevnej flóry cicavcov obzvlášť koní, môže sa vyskytovať aj v črevnom trakte niektorých ľudí. Spóry sa prostredníctvom výkalov (hnoja) dostávajú do pôdy. Človek sa infikuje zanesením klostrídií do hlbokých rán, alebo do rán, ktorých tkanivo nie je dostatočne vyživované (dekubity, vredy predkolenia pri ochorení žíl), celkom výnimočne sa popisujú nozokomiálne infekcie pri chirurgických zákrokoch.

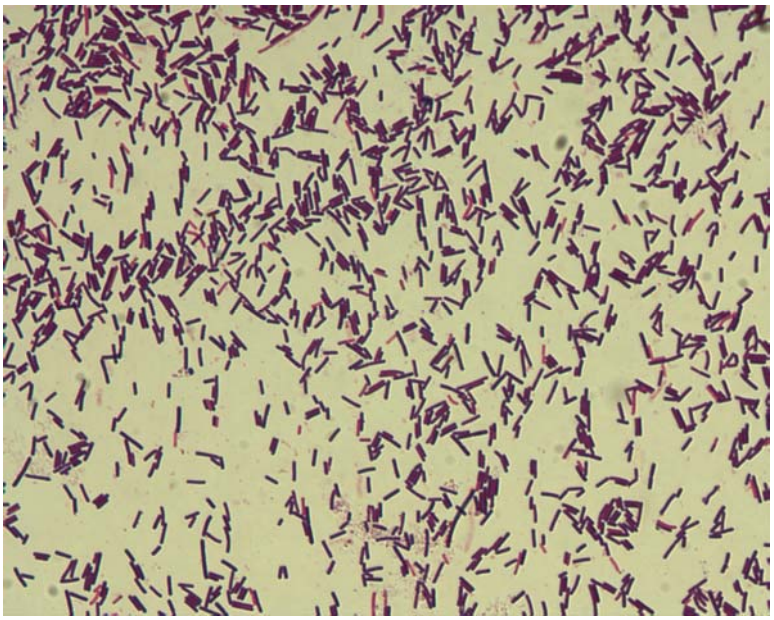
Mikróby, ktoré sa v rane množia, tvoria tetanotoxín, ktorý sa z rany vstrebáva do krvi a lymfy, dostáva sa k nervovým a k motorickým neurónom CNS, kde blokuje normálnu inhibíciu motorických neurónov, výsledkom čoho je spastická paralýza, tonické a klonické kŕče. Inkubačná doba tetanu je veľmi rôzna a závisí najmä od stupňa toxinogénosti kmeňa; obvykle trvá asi 1 týždeň, kratšia znamená zhoršenú prognózu. Prekonanie ochorenia nezanecháva trvalú imunitu. Rozvinutý tetanus sa obvykle diagnostikuje na základe klinického obrazu pacienta (www.lfhk.cuni.cz).

1.1.2 Morfológia *Clostridium difficile*

C. difficile je ubikvitne sa vyskytujúci mikroorganizmus, jeho spóry sú dosť odolné a preto sa môžu šíriť po oddeleniach nemocníc na ďalších pacientov. To je jedným z hlavných dôvodov, prečo *C. difficile* patrí medzi významných pôvodcov nemocničných nákaz (VOTAVA, 2000).

Paličky *C. difficile* sa vyskytujú v 2 formách:

- ako štíhle, G+, rovné tyčinky s cylindrickými, tyčinku málo vydúvajúcimi spórami, s rozmermi asi 0,6 × 4-6 μm,
- ako robustné tyčinky, s rozmermi asi 1,2-1,6 × 6-16 μm tvoriace subterminálne spóry.



Obr. 2: *Clostridium difficile* po 24 hodinovej kultivácii na Schaedlerovom agare, farbenie podľa Grama (foto autorka práce)

Majú sklon k autolýze, ktorá v niektorých bunkách postihuje najprv polárne sporangium, po čom spóra vyzerá ako terminálna. V črevách *C. difficile* sporuluje výdatne, *in vitro* je sporulácia nižšia, ale možno ju zvýšiť prídavkom žlčových solí a žĺtka. Spóry sú málo termorezistentné. Teplo poškodzuje ich lytický germinačný enzým. Keď ho nahradíme lyzozýmom, poškodené spóry vyklíčia.

Vegetatívne bunky *C. difficile* majú 2 antigény spoločné s *C. sordellii*. Membránový glukoproteínový antigén je druhovo špecifický (BEDNÁŘ, 1999).

1.2 Fenotypová charakteristika *C. difficile*

Existuje viacero spôsobov klasifikácie baktérií. Spočiatku sa klasifikovali predovšetkým podľa vzhľadu (fenotypu). Fenotypová diagnostika a identifikácia vychádza z morfologických, fyziologických a biochemických vlastností (SCHARFEN, 2007).

Medzi fenotypové znaky využívané na identifikáciu baktérií zaraďujeme:

1. morfológiu buniek – tvar, veľkosť, vzájomné usporiadanie, pohyblivosť, farbenie podľa Grama, tvorbu puzdra, tvorbu spór, umiestnenie bičíkov a pod,
2. kultivačné vlastnosti – morfológiu kolónií na agarovom médiu, charakter rastu v tekutom médiu,

3. fyziologické vlastnosti – vzťah k voľnému kyslíku, typ metabolizmu glukózy, teplotné optimum pre rast, citlivosť na antibiotiká a pod.,
4. biochemickú aktivitu – hodnotí sa produkcia enzýmov priamo (kataláza, oxidáza, ureáza, koaguláza, beta-galaktozidáza) alebo nepriamo dôkazom produktov enzymatického štiepenia (skúška na indol, sírovodík), využívanie anorganického uhlíka (citrát), redukcia dusičnanov, hydrolýza škrobu, želatíny,
5. antigénna štruktúra – bakteriálne bunky sú zložené z mnohých rôznych antigénov. Pre praktické použitie je možné určovať prítomnosť týchto antigénov (špecifické povrchové proteíny alebo lipopolysacharidy) sérologickými metódami (JANDOVÁ, KOTOUČKOVÁ, 1996).

1.2.1 Kultivácia

Ako pevné kultivačné médiá sa pre *C. difficile* používajú Schaedlerov agar/bujón, VL agar, alebo žĺtkový agar. Kultivácia prebieha bez prístupu kyslíka pri 37°C (VOTAVA, 2000).

Tabuľka 1: Zloženie Schaedlerovho agaru

Zložka	**mg. dm^{-3}**
Tryptofánový sojový bujón	10,0
Peptón	5,0
Kvasničný extrakt	5,0
Glukóza	5,0
Cysteín HCl	0,4
Hemín	0,01
Tris pufor	0,75
Agar	13,5
pH = 7,6 ± 0,2, t = 25°C	

ZDROJ: Oxoid Limited (výrobca)

Schaedlerov agar s ovčou krvou je vysoko výživné médium, ktoré bolo účelovo vyvinuté pre rast výhradných anaeróbov, ako sú napr. laktobacily, streptokoky, klostrídiá a *Bacteroides*. S prídavkom vitamínu K1 a hemínu sa stáva základom pre niekoľko selektívnych médií. Výživné látky v Schaedlerovom agare zaisťujú tri peptóny. Zdrojom energie je glukóza. Tris tlmivý roztok je obsiahnutý preto, aby v priebehu fermentácie glukózy nedošlo k extrémnemu zníženiu pH. Kvasničný výťažok je bohatým zdrojom vitamínov. Hemín a ovčia krv dodávajú hém, ktorý anaeróby potrebujú, a ďalšie látky podporujúce rast. Dnes sa toto médium široko

používa ako základné, vysoko výživné médium pre izoláciu striktných anaeróbov (www.ita-intertact.com, www.oxoid.com).

Obr. 3: Schaedlerov agar, *Clostridium difficile*, 48 hodinová kultivácia (foto autorka práce)

VL agar (z francúzštiny „*viande-levure*" – obsahuje mäsovo-kvasnicový extrakt) vo svojom zložení má bohaté nutričné zložky; mäsový extrakt, enzymatický kazeínový hydrolyzát. L - cysteín a kvasničný autolyzát poskytujú potrebný aminodusík, rastový uhlík pre metabolizmus baktérií. Kvasničný autolyzát je súčasne zdrojom vitamínov skupiny B. Chlorid sodný vytvára osmotické prostredie. Glukóza je fermentovateľným cukrom a zdrojom energie (www.imuna.sk).

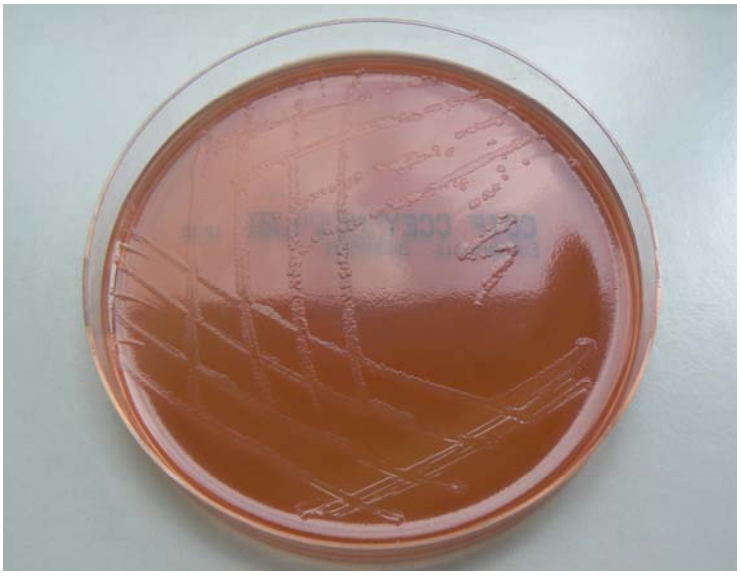
Tabuľka 2: Zloženie VL agaru

Zložka	**mg. dm^{-3}**
Enzymatický kazeínový hydrolyzát	10,0 g
Kvasničný autolyzát	5,0 g
Hovädzí odvar koncentrovaný (sušina)	2,0 g
L - cysteín hydrochlorid	0,4 g
Chlorid sodný	5,0 g
Glukóza	2,0 g
Agar	17,6 g
pH = 6,7 - 7,1	

ZDROJ: www.imuna.sk (výrobca)

Priamy dôkaz *C. difficile* je relatívne ťažký (z latinského *difficilis* – obtiažny). Napriek tomu, že existujú selektívne pôdy pre jeho zachytenie, bývajú pokusy o jeho

izoláciu vzhľadom na to, že ide o baktériu vyžadujúcu prísne anaeróbne prostredie, často neúspešné. Jednou z komerčne vyrábaných selektívnych diagnostických pôd je CCEY agar (*Clostridium difficile* cefoxitin cycloserine egg-yolk agar), v ktorej prídavok antibiotík D-cykloserínu a cefoxitínu inhibujú sprievodnú mikroflóru (www.hpa-standardmethods.org.uk).



Detail kolónie

Obr. 4: Kolónie od pacienta s CDAD na CCEY agare (foto autorka práce)

Z tekutých kultivačných médií možno spomenúť napríklad **BHI – Brain Heart Infusion broth**. Rast *C. difficile* sa v tomto médiu prejavuje formou difúzneho zákalu a jemného sedimentu. Pred samotnou kultiváciou je však potrebné zbaviť ho kyslíka povarením (www.oxoid.com).

Tabuľka 3: Zloženie BHI bujónu používaného na kultiváciu *C. difficile*

Zložka	**mg. dm^{-3}**
Sušina z teľacieho mozgu	12,5
Sušina z hovädzieho srdca	5,0
Peptón	10,0
Glukóza	2,0
Chlorid sodný	5,0
Fosforečnan sodný	2,5
pH = 7,4 ± 0,2, t = 25°C	

ZDROJ: Oxoid Limited (výrobca)

Kultivácia *C. difficile* je obtiažna z viacerých dôvodov:

1. striktne anaeróbna baktéria – devitalizácia mikroorganizmov v priebehu transportu do laboratória,
2. pohyblivá baktéria – na agare sa môže plaziť a tvoriť zmiešanú kultúru s inými klostrídiami, alebo črevnými baktériami.

Viaceré laboratóriá preto len dokazujú toxín vo vyšetrovanom materiáli, ktorým býva zväčša stolica, alebo črevné výplachy. Na dôkaz toxínov *C. difficile* sa používajú komerčne vyrábané vyšetrovacie súpravy založené na princípe latexovej aglutinácie prípadne metóda ELISA – enzymatická imunoanalýza (VOTAVA, 2000).

1.2.2 Fyziologické vlastnosti

Veľa druhov klostrídií patrí medzi tzv. **aerotolerantné anaeróby**. To znamená, že sú schopné rásť za prítomnosti až 10% molekulárneho kyslíka v atmosfére. Platí to hlavne pre druhy *C. canis*, *C. histolyticum*, *C. perfringens* a *C. tertium* (VOTAVA, 2000).

C. difficile patrí medzi stredne striktne anaeróbne klostrídiá. Vďaka modernej kultivačnej technike a používaniu selektívnych pôd na jeho izoláciu zo stolice, v ktorých je cefoxitín a cykloserín inhibítorom sprievodnej flóry, sa kultivuje s menšími problémami ako v minulosti. Kolónie sú okrúhle, pretože tyčinky sú málo pohyblivé, priemer kolónií je až 5 mm. Krvný ani žĺtkový agar nemenia. *C. difficile* kvasí veľa sacharidov, z bielkovín hydrolyzuje iba želatínu najskôr za 48 hodín. Je vysoko citlivý na vankomycín, ale na rozdiel od ostatných klostrídií je rezistentný na cefoxitín a väčšina kmeňov tiež na klindamycín (BEDNÁŘ, 1996).

1.2.3 Biochemická identifikácia

Ako identifikačné biochemické znaky slúžia tie vlastnosti, ktoré sú ľahko zistitelné a pomerne stále. To znamená, že výskyt mutantov, ktorí stratili túto vlastnosť, je pomerne vzácny. Napriek tomu sa však títo mutanti vyskytujú a ich percento výskytu stúpa v súvislosti so vzrastajúcim znečistením životného prostredia. Preto sa dnes prechádza od identifikačných kľúčov, ktoré uvádzali len pozitívne či negatívne reakcie, k tabuľkám, v ktorých je uvedené percento kmeňov daného druhu, pri ktorých je test pozitívny (JANDOVÁ, KOTOUČKOVÁ, 1996).

Princípom biochemických identifikačných testov je kultivácia baktérií v tekutých pôdach s prídavkom substrátu a sledovanie schopnosti baktérií príslušnej biochemickej premeny (napr. fermentácia cukrov s následnou zmenou pH produkciou kyseliny, zmenou farby média rozkladom definovaného chromogénneho substrátu, a pod.). Biochemické mikrotesty určené na identifikáciu klinicky významných bakterií sú vyrábané komerčne (ROMPRÉ, 2002).

Konfirmačné testy

Pre bližšie taxonomické zaradenie bakterií vykultivovaných na selektívnych médiách je potrebné urobiť tzv. konfirmačné (potvrzujúce) testy. Tieto testy sú na báze biochemických, imunologických a chemotaxonomických metód (ROMPRÉ, 2002).

Identifikácia biochemickými testami - v súčasnej dobe patria medzi najčastejšie používané konfirmačné techniky. Využíva sa stanovenie ľahko detekovateľných a stálych biochemických vlastností. Na rýchlu identifikáciu baktérií boli vyvinuté diagnostické súpravy (mikrotesty). Súpravy sú tvorené mikrotitračnými doštičkami, ktorých jamky obsahujú dehydrované kultivačné média (ROMPRÉ, 2002).

Identifikácia imunologickými metódami - je založená na identifikácii bakteriálnych antigénov pomocou špecifických protilátok. Imunologické metódy umožňujú detekciu antigénov čeľade, rodov, druhov či sérovarov. Svoje miesto v mikrobiológii majú napríklad latexová aglutinácia, enzymatická imunoanalýza (ELISA), priama a nepriama imunofluores-cencia (IFA). Ich výhodou je rýchlosť, jednoduchosť a citlivosť. Obmedzením týchto metód je špecifickosť a koncentrácia protilátky, koncentrácia antigénu a typ reakčného roztoku. Naviac môže dochádzať ku skríženým reakciám (ROMPRÉ, 2002).

Identifikácia chemotaxonomickými metódami – je založená na štúdiu chemického zloženia bunkovej steny, ktoré je možné použiť na typizáciu baktérií. Z používaných metód možno uviest analýzu profilov proteínov a mastných kyselín (ROMPRÉ, 2002).

Dôkaz produkcie katalázy

Tento enzým je vlastný aeróbnym a fakultatívne anaeróbnym baktériám, ktoré sú vybavené cytochrómovým systémom. Hlavný význam tohto enzýmu spočíva v zneško-dňovaní peroxidu vodíka, ktorý je pre baktérie toxický. Ten vzniká pri niektorých biochemických procesoch. Kataláza rozkladá H_2O_2 na vodu a kyslík (JANDOVÁ, KOTOUČKOVÁ, 1996).

1.2.4 Toxíny a ich detekcia

O antibiotikách je známe, že kvantitatívnym a kvalitatívnym narušením črevnej mikroflóry umožňujú kolonizáciu a proliferáciu *Clostridium difficile*, a to hlavne u hospitalizovaných pacientov. Kombinácia nozokomiálnej expozície *Clostridium difficile* a oslabenia alebo straty fyziologicky sa vyskytujúcich protektívnych komenzálov vedie ku kolonizácii sliznice. S proliferáciou baktérií dochádza k tvorbe a sekrécii toxínov A a B, ktoré sú zodpovedné za vznik zápalovej ulcerácie črevnej sliznice.

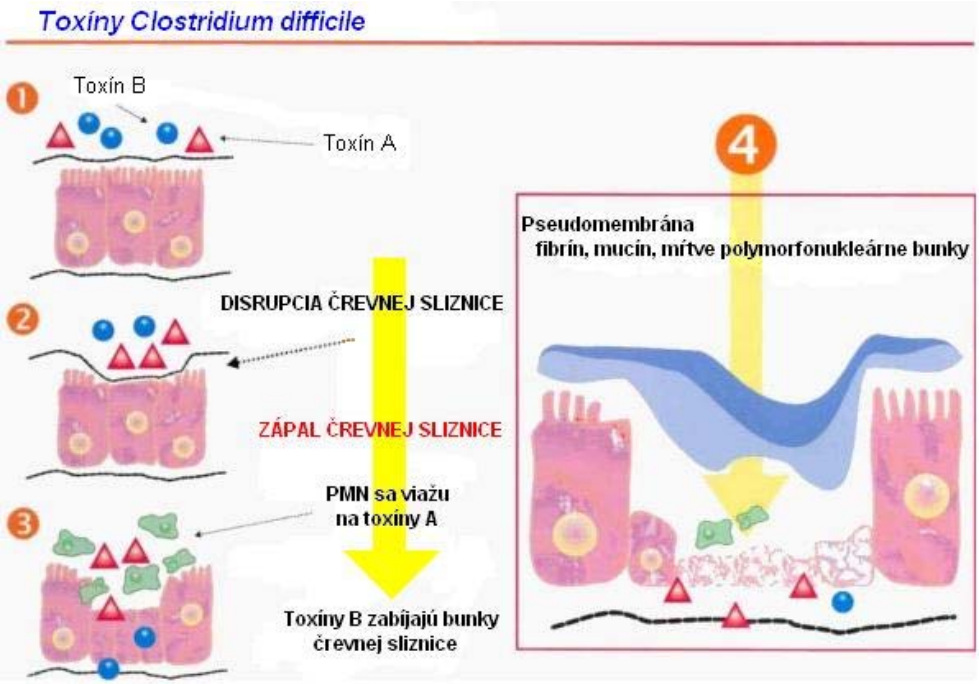
Obidva toxíny sú klasickými exotoxínmi. Ich aktivizácia teda nie je viazaná na expresiu signálnej sekvencie nukleotidov bunkovej DNA a tiež nie je zapríčinená mechanizmami enzymatickej proteolýzy v hostiteľskom makroorganizme (SALYERS, 1994).

Toxín A je enterotoxín, ktorý u zvierat vyvoláva akútnu zápalovú odpoveď. Jeho molekulová hmotnosť je 308 kDa. Toxín A vyvoláva kumuláciu tekutín v črevnom epiteli hostiteľa. Neakumuluje sa voda, ako je to napríklad v prípade cholerického toxínu, ale ide o akumuláciu viskóznej tekutiny krvného pôvodu. Toxín A teda nevyvoláva na rozdiel od cholerického toxínu alebo iných bakteriálnych enterotoxínov totálnu dysfunkciu iónových púmp, iba zapríčiňuje dysfunkciu buniek črevného epitelu, ktoré nemôžu následne z dôvodu veľkého množstva viskóznej tekutiny v bunkách optimálne zabezpečovať kontrolu pohybu vody. Toxín A je pravdepodobnou príčinou hnačiek, ktoré sú prvým symptómom pseudomebranóznej enterokolitídy (www.zuova.cz).

Toxín B je cytotoxín, ktorého enterotoxický efekt nebol u zvierat preukázaný, avšak v nedávnej dobe bol objavený jeho patogenetický význam u človeka.

Toxín B nevykazuje enterotoxickú aktivitu. Zabíja však bunky v tkanivových kultúrach a bunky črevného epitelu. Je asi 100–1000x toxickejší ako toxín A (www.zuova.cz).

Uvedené toxíny spôsobujú vyplavenie prozápalových slizničných cytokinínov, ktoré v sliznici hrubého čreva vedú ku vzniku ložísk s intenzivnou exsudáciou. Tieto ložiská sa striedajú s ostrovčekmi intaktnej sliznice. Makroskopicky vyzerajú ložiská postihnutej sliznice ako šedožlté pseudomembrány, čo je dané prítomnosťou plakov zložených zo zápalových buniek a bunkového detritu z poškodených krýpt (JOYCE, 2003).



Obr. 5: Pôsobenie toxínov *C. difficile*

Vysvetlivky: PMN – polymorfonukleárne bunky ZDROJ: www.zuova.cz

Toxíny A a B sú produkované počas vegetatívneho rastu. Ich tvorba nie je na rozdiel od botulotoxínov a tetanotoxínu spojená so sporuláciou buniek. Iba jedna bunka *Clostridium difficile* zo sto produkuje oba druhy toxínov (SALYERS, 1994).

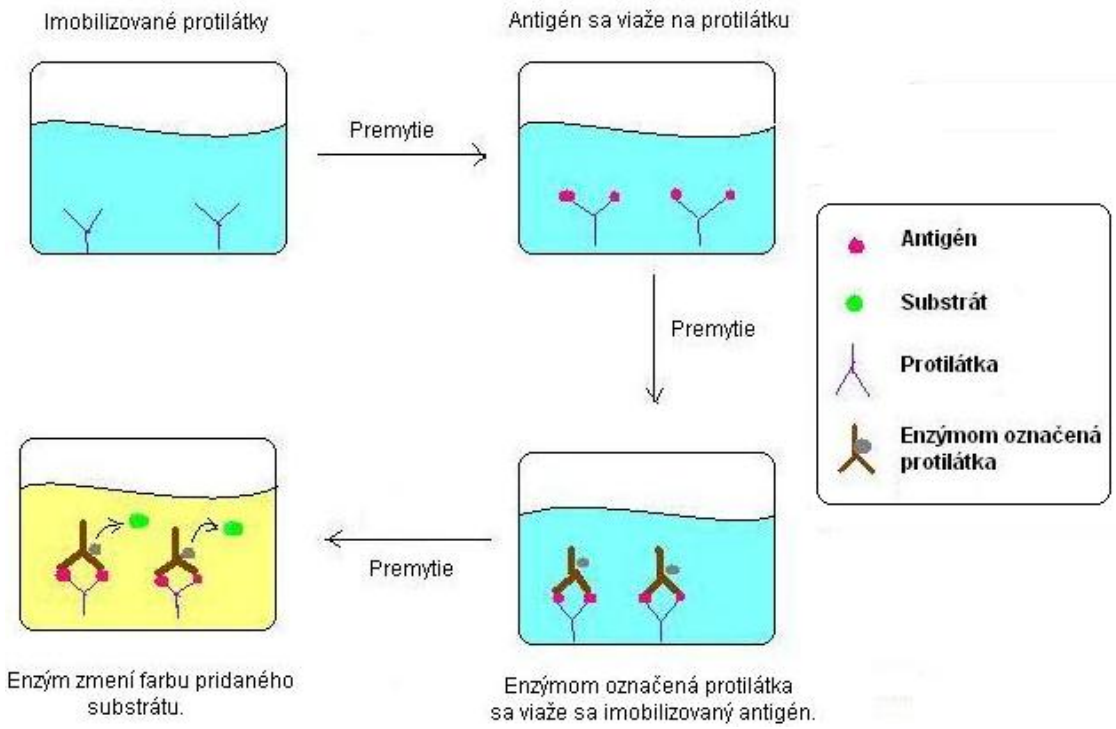
Toxín A sa vyznačuje výraznou chemotaxiou k polymorfonukleárnym bunkám (PMN) a je teda zodpovedný za zápalovú reakciu buniek črevného epitelu, ktorá je prvým symptómom rozvíjajúcej sa pseudomebranóznej enterokolitídy. Toxín A je toxický pre väčšinu buniek imunitného systému, pretože vyvoláva disrupciu cytoskeletálnych komponentov. Toxín B je nezvyčajne malá molekula bielkovinového charakteru (SALYERS, 1994).

Bunky črevnej sliznice sú zničené len vtedy, ak sú prítomné zároveň oba druhy toxínov. Toxín A zničí povrchové štruktúry buniek črevnej sliznice a zároveň potlačí prípadný preventívny účinok PMN. Tým umožní molekulám toxínu B úspešne zaútočiť na bunky črevného epitelu. Toxín B zabíja bunky črevného epitelu len vtedy, ak sú porušené jej povrchové štruktúry a bunky sú postihnuté dysfunkciou transportu vody. Na črevnej sliznici vznikajú rozsiahle ulcerácie - nekrotické útvary, pseudomembrány – konglomeráty zničených buniek črevného epitelu, uhynutých PMN, fibrínu a mucínu v tvare laločnate zdurených, žlto zafarbených krúst, ktoré je možné pomerne ľahko endoskopicky detekovať (VOTH, BALLARD, 2005).

Detekcia toxínov

V rutinnej diagnostike je najrozšírenejšou metódou detekcia toxínov vo vzorke stolice metódou ELISA, respektíve ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

V prípadoch s pozitívnou kultiváciou a negatívnym výsledkom vyšetrenia toxínu priamo z izolovaných kolónií pomocou ELISA metódy, je správne spraviť PCR detekciu génu pre toxín. Veľká časť vykultivovaných kmeňov s negatívnym dôkazom toxínu metódou ELISA bola takto následne určená ako toxín pozitívna (DŽUPOVÁ, 2008).



Obr. 6: Princíp metódy ELISA ZDROJ**:** www.en.wikibooks.org

Najčastejšie využívané usporiadanie enzýmovej imunoanalýzy na pevnej fáze (ELISA) pre stanovenie patogénov je priamy nekompetitívny (tzv. „sendvičový“) formát. V prvom kroku sa na pevnú fázu imobilizujú protilátky. Potom sa pridá antigén, ktorý interaguje s naviazanými protilátkami. Po odstránení nenaviazaných zložiek nasleduje aplikácia protilátky označenej enzýmom (najčastejšie peroxidáza, alkalická fosfatáza, β-galaktozidáza a glukóza-oxidáza). Na detekciu sa využíva enzýmová reakcia, kedy sa bezfarebný substrát mení na farebný (www.biomikro.vscht.cz).

1.2.5 Antibiotická rezistencia

Rezistencia na antibiotiká vzniká vplyvom výsledku génovej mutácie alebo expresiou exogénneho genetického materiálu. Rezistenciu baktérií na antibiotiká

rozdeľujeme na prirodzenú a získanú. Spotreba antibiotík v humánnej a veterinárnej praxi má za následok nárast rezistencie. Vzťah mezi spotrebou a rezistenciou nie je lineárny.

Selekciu rezistencie a vznik rezistencie ovplyvňuje celý rad faktorov zo strany makroorganizmu, mikroorganizmu a lieku. Medzi ne patria: génové mutácie vplyvom vonkajšieho prostredia, mobilné genetické nosiče, klonálna diseminácia, lokálna antibiotická politika, prítomnosť antibiotických prehľadov a smerníc, úhrada antibiotík a ich dostupnosť a samozrejme dostupnosť zdravotníckej starostlivosti. K prevencii rezistencie napomáha podanie dostatočnej dávky antibiotika, naopak dlhšie pretrvávajúce subinhibičné koncentrácie antibiotika rezistenciu neselektujú (JARČUŠKA, LIPTÁKOVÁ, 2004).

Nové epidemické kmene *C. difficile* sa vo všeobecnosti vyznačujú nižšou citlivosťou k antibiotikám. Zvyčajnou vlastnosťou nových kmeňov je rezistencia na fluórochinolóny. Pri mnohých kmeňoch dochádza k postupnému znižovaniu citlivosti na metronidazol, čo sa dá ľahko preukázať rastúcou hodnotou MIC. Na rozdiel od izolátov z období pred rokom 2001 sú epidemické kmene *C. difficile* často citlivé na klindamycín a pritom rezistentné na erytromycín. Súčasná rezistencia na klindamycín a erytromycín, viazaná na prítomnosť génu *erm*B, bola zistená vo Švajčiarsku, Francúzsku a Írsku. Naopak citlivosť k obom antibiotikám bola hlásená z Nemecka a Dánska. Vo všetkých spomenutých krajinách sa výskyt *C. difficile* systematicky monitoruje, aj keď metodika nie je doteraz ujednotená (DŽUPOVÁ a BENEŠ, 2008).

1.3 Molekulárno-biologické metódy genotypovej charakteristiky

Genotypizačné metódy sú vo všeobecnosti považované za pokrok v porovnaní s fenotypovými (BRAZIER, 1998) a to z niekoľkých dôvodov:

- menšia časová náročnosť – vo väčšine prípadov nie je potrebná kultivácia,
- vyššia citlivosť - detekcia i jednej molekuly DNA,
- špecifickosť - založená na detekcii skupinovo-, rodovo-, druhovo-, poddruhovo-špecifických sekvencí DNA či RNA, ktoré sú v čase nemenné a nie sú ovplyvňované podmienkami okolitého prostredia.

Vďaka vysokej rozlišovacej schopnosti boli viaceré z nich zavedené i do typizácie *Clostridium difficile*. Medzi najčastejšie používané metódy patria

toxinotypizácia a ribotypizácia, ktorých základom je PCR, a makrorestrikčná analýza pulznou elektroforézou (BRAZIER, 1998).

1.3.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Základom pre rozvoj molekulárno-biologických metód bolo vyvinutie metódy PCR v 80. rokoch 20. storočia. V priebehu krátkej doby sa PCR stala najpoužívanejšou amplifikačnou metódou. Jej aplikáce sú známe z mnohých odvetví a v posledných rokoch sa začína využívať i v environmentálnej mikrobiológii. Patrí medzi základné techniky používané na identifikáciu druhov, prípadne kmeňov.

Princípom je opakujúca sa enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov DNA, ku ktorej dochádza po pripojení dvoch primerov viažúcich sa na protiľahlé reťazce DNA tak, že ich 3´OH-konce smerujú oproti sebe. Ako primery sa obvykle používajú oligonukleotidy s dĺžkou okolo 20 párov báz (bp), ktoré sú komplementárne ku koncom amplifikovaného úseku. Pre priebeh amplifikácie musí PCR zmes okrem templátovej DNA a primerov obsahovať deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP) a termostabilnú DNA polymerázu, ktorá katalyzuje vlastnú syntézu nových reťazcov (RUMLOVÁ et al., 2003).

Postup PCR spočíva v opakovaní troch krokov:

- denaturácie, pri ktorej dochádza k rozpleteniu reťazcov templátovej DNA (teplota 92-96°C),
- anelácie, kedy dochádza k pripojeniu primerov k rozpleteným reťazcom DNA (anelačná teplota závisí od štruktúry primerov),
- extenzie (= polymerácia), kedy dochádza k predlžovaniu nových reťazcov (teplota 72 °C).

PCR obvykle prebieha počas 30–40 cyklov, v priebehu ktorých sa geometricky zvyšuje počet cieľových sekvencií DNA (RUMLOVÁ et al., 2003).

Detekcia PCR produktov

Metódy detekcie amplifikovaných úsekov majú rôznou citlivosť. Najjednoduchšou, ale súčasne málo citlivou metódou, je elektroforéza v agarózovom géli. Princípom tejto metódy je sfarbenie amplikónov rozdelených podľa ich relatívnej molekulovej hmotnosti a veľkosti náboja fluorescenčným farbivom. Najčastejšie sa používa etídiumbromid, ktorý interkaluje medzi nukleotidy DNA. K vizualizácii

zafarbených amplikónov dochádza pomocou UV transiluminátora (RUMLOVÁ et al., 2003).

1.3.1.1 Identifikácia *Clostridium difficile* pomocou amplifikačných metód

Pomocou metódy PCR je možné získať veľké množstvo kópií špecifického úseku DNA, čím je možné detekovať rôzne patogénne organizmy. WREN et al. (1990) sa pokúsili detekovať *Clostridium difficile* pomocou repetetívnych sekvencií nachádzajúcich sa v oblasti génu pre toxín A. Ich metóda síce dokázala odlíšiť toxinogénne kmene *C. difficile* od netoxinogénnych, ale nedokázala odlíšiť DNA *Clostridium sordellii*.

KATO et al. (1991) uvádzajú, že sa im s použitím iných primerov z repetetívnych a nerepetetívnych oblastí génu pre toxín A podarilo odlíšiť toxinogénne a netoxinogénne druhy *C. difficile*. Naviac v práci demonštrujú negatívne výsledky amplifikácie pri použití DNA *Clostridium sordellii* a iných druhov klostrídií.

Identifikáciou kmeňov *C. difficile* s rôznou produkciou toxínov sa zaoberal KATO et al. (1998). Pomocou dvoch sád primerov z nerepetetívnych oblastí pre gény toxínov A a B a jednej sady z repetetívnej oblasti pre gén A, sa im úspešne podarilo rozlíšiť druhy s produkciou toxínov A+B+, A-B+ a A-B-.

1.3.2 Metódy typizácie

V rámci epidemiologických a fylogenetických štúdií je mnohokrát nedostačujúca detekcia bakteriálneho druhu, ale je dôležité odlíšiť jednotlivé kmene. Na tento účel boli vyvinuté rôzne genotypové metódy. Genotypové metódy môžeme rozlíšiť na priame a nepriame. Priame metody zahŕňajú sekvenovanie a jeho modifikácie, naproti tomu nepriame metódy nevyžadujú stanovenie DNA sekvencie. Ich podstatou je sledovanie polymorfizmu určitého genotypového znaku (markeru). Ako marker možno použiť gén, negénovú oblasť (intergenic region), mobilný element, alebo restrikčné miesto. Výsledkom je fingerprint charakterizujúci daný kmeň (ŠTĚPÁN et al., 2004).

Z typizačných metód možno spomenúť pulznú gélovú elektroforézu (PFGE), ktorá sa využíva najčastejšie, náhodnú amplifikáciu polymorfných úsekov DNA, multilokusovú sekvenčnú typizáciu, ribotypizáciu, analýzu plazmidov či sekvenovanie (TENOVER et al., 1994).

1.3.2.1 RFLP - polymorfizmus restrikčných fragmentov

Restrikčná analýza DNA je metódou charakterizácie DNA pomocou jej štiepenia restrikčnými endonukleázami na fragmenty. Identifikácia a analýza produktov štiepenia sa robí pomocou elektroforetického delenia. Je známe veľké množstvo bakteriálnych restrikčných endonukleáz (asi 1 500). Líšia sa od seba tým, že rozpoznávajú rôzne dlhé sekvencie nukleotidov (4, 6, 8) a štiepia DNA na rôzne dlhé fragmenty podľa individuálneho poradia báz a podľa rozpoznanej sekvencie. Za daných podmienok vzniká reprodukovateľný počet restrikčných fragmentov s určitou opäť reprodukovateľnou dĺžkou. Počet i dĺžka fragmentov je pre daného jedinca špecifická (PRŮŠA, 1997).

Niektoré restrikčné endonukleázy sú citlivé na metyláciu DNA. V niektorých prípadoch metylácia adenínu a cytozínu inhibujú štiepenie, v iných je metylácia pre štiepenie nevyhnutná. Odlíšenie rôznych DNA sa robí na základe polymorfizmu dĺžky štiepnych úsekov. Tento polymorfizmus vzniká na základe prítomnosti alebo neprítomnosti rozpoznávaných a štiepnych miest (PRŮŠA, 1997).

Všeobecne je platné, že restrikčné endonukleázy, ktoré rozpoznávajú kratšiu sekvenciu, štiepia DNA častejšie na menšie úseky, zatiaľ čo restrikčné endonukleázy rozpoznávajúce dlhšie sekvencie štiepia menej často a na dlhšie fragmenty.

Pri neúplnom (parciálnom) štiepení DNA vplyvom nevhodných reakčných podmienok vznikajú dlhšie úseky (napríklad veľký obsah bielkovín, nevhodná teplota, nedostatočný čas). Hviezdičkové štiepenie (tzv. „star“ aktivita enzýmu) je spôsobené nešpecifickým štiepením mimo rozpoznávané miesta. Vzniká tak mnoho krátkych úsekov. Tento analyticky nepriaznivý stav môže byť spôsobený napríklad nadbytkom glycerolu v reakcii. Preto nie je možné zvyšovať koncentráciu restrikčného enzýmu v reakcii zvyšovaním použitého objemu, ale použitím rovnakého objemu enzýmu zo zásoby s vyššou koncentráciou (www.lf2.cuni.cz).

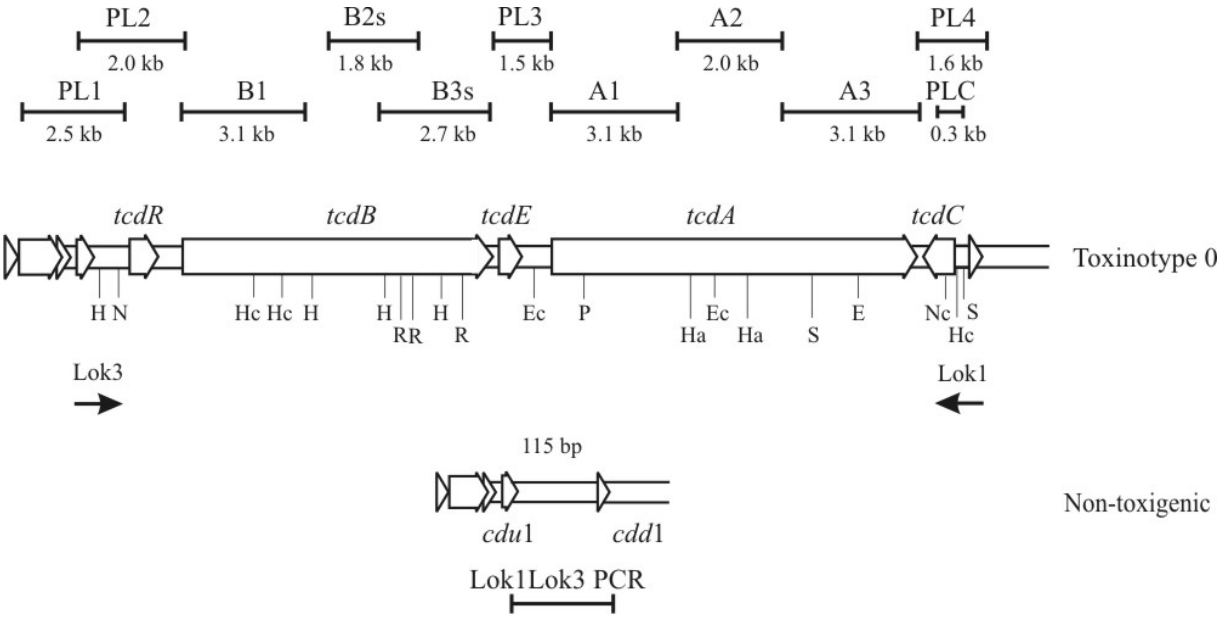
1.3.2.2 Toxinotypizácia

Clostridium difficile je pôvodcom pseudomembranóznej kolitídy a najčastejšou príčinou nozokomiálnych hnačiek po antibiotickej liečbe. Toxíny A a B sú faktormi virulencie a patria medzi veľké klostridiálne cytotoxíny. Oba narúšajú aktínovú zložku bunkovej steny (SPIGAGLIA et al., 2002).

Molekulárne analýzy toxínov *C. difficile* začali okolo roku 1990. Prvé pokusy boli zamerané na klonovanie fragmentov toxínov a pokračovali sekvenovaním oboch génov toxínov (DOVE et al. 1990; EICHEL-STREIBER, SAUERBORN, 1990), pokračovali definovaním úsekov DNA, ktoré kódujú toxíny (HAMMOND, JOHNSON, 1995; BRAUN et al., 1996) a štúdiom regulácie týchto génov (MONCRIEF et al., 1997; MANI, DUPUY, 2001).

Gény toxínov A (*tcdA*) a B *(tcdB*) sú časťou tzv. lokusu patogenity (*pathogenity locus* - PaLoc), ktorý je veľký 19,6 kb. Pri netoxinogénnych kmeňoch je PaLoc nahradený úsekom dlhým 115 báz (RUPNIK et al., 1998).

Okrem *tcdA* a *tcdB* sa na PaLoc nachádzajú tri doplňujúce otvorené čítacie rámce (ORF – *open reading frames*) a to *tcdD*, *tcdE* a *tcdC*, a ORF pre inzerčné sekvencie (*cdu*-2, *cdu*-2´, *cdd*-2, *cdd*-3 a *cdd*-4). Sekvenčné a transkripčné analýzy dokázali, že TcdD (produkt génu *tcdD*) a TcdC (produkt génu *tcdC*) plnia úlohu pozitívnych a negatívnych regulátorov expresie *tcdA* a *tcdB* (SPIGAGLIA et al., 2002).

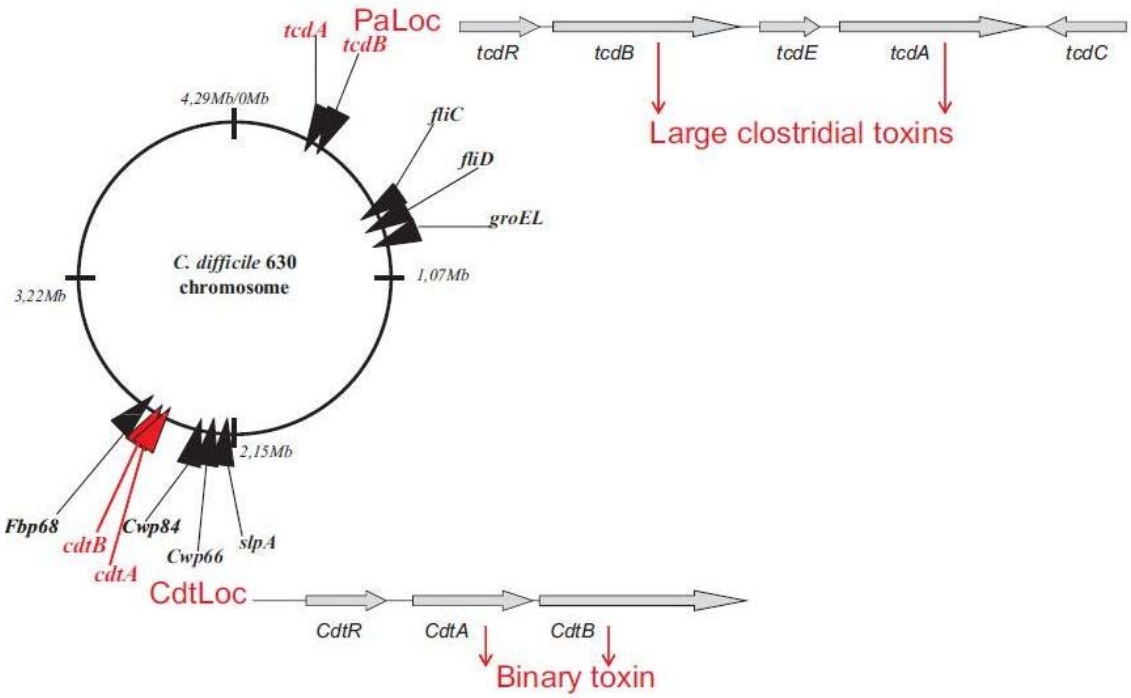


Obr. 7: Schéma PaLoc Toxinotyp 0 a netoxinogénneho kmeňa ZDROJ: www.mf.uni-mb.si

Gény *tcd*B a *tcd*A majú podobnú veľkosť (7 a 8 kb) a oba obsahujú repetetívne sekvencie na 3´konci (RUPNIK et al., 1998). EICHEL-STREIBER et al. (1992) dokázali vysoký stupeň homológie medzi týmito dvoma génmi. Oba štrukturálne gény majú tri domény korešpondujúce s troma funkčnými doménami toxínov. C-terminálna opakujúca sa oblasť slúži ako receptor pre väzobné oblasti, centrálna časť je potrebná pre translokáciu a N-terminálna doména má katalytickú funkciu (EICHEL-STREIBER et al., 1996).

Ako prídavný toxin k toxínom TcdA a TcdB, ktoré patria do skupiny veľkých klostridiálnych toxínov (LCT – *large clostridial toxins*), produkujú kmene *C. difficile* tiež tretí toxín, označovaný ako „binárny toxín“ – *cdt*, ktorý patrí do skupiny klostridiálnych binárnych toxínov (PERELLE et al., 1997). Bolo dokázané, že len kmene, ktoré majú zmeny v génoch toxínov *tcd*A a *tcd*B v porovnaní s referenčným kmeňom VPI 10463 (variantné kmene) produkujú binárny toxín (STUBBS et al., 2000). Bol popísaný len jediný kmeň podobajúci sa na kmeň VPI 10463 pozitívny na produkciu binárneho toxínu (SPIGAGLIA, MASTRANTONIO, 2002).

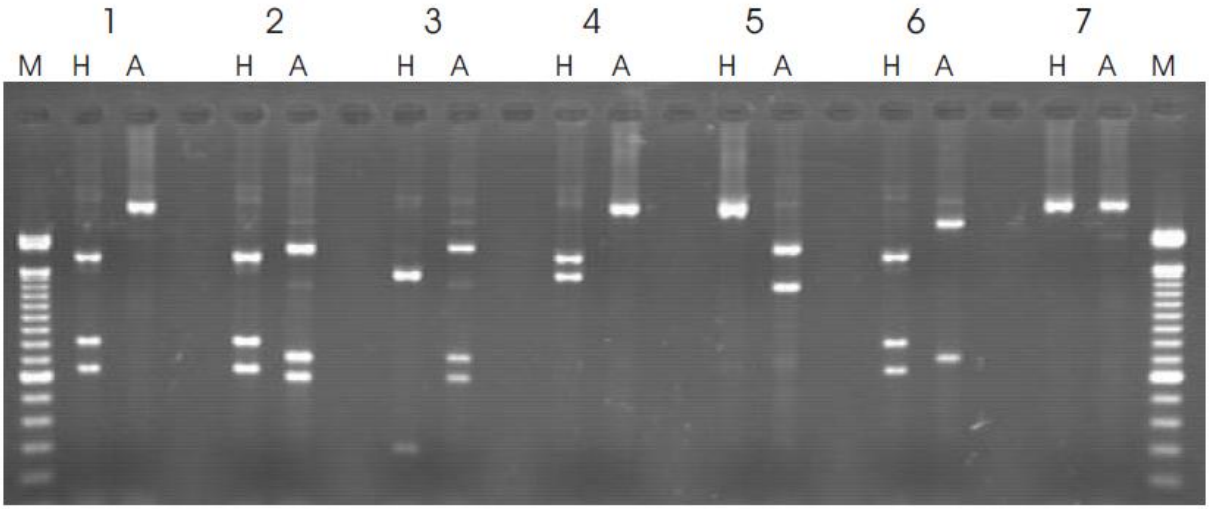
Binárny toxín produkuje len asi 8% kmeňov, a to toxinotypy III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XIV, XV, XVI a XVII. Väčšina kmeňov (toxinotypy I, II, XII a XIII) má gény pre toxíny veľmi podobné referenčnému kmeňu VPI 10463 a binárny toxín neprodukujú. Toxinotyp VIII, zahŕňajúci izoláty A-B+, je jediným kmeňom spomedzi variantých kmeňov, ktorý neprodukuje binárny toxín.



Obr. 8: Faktory virulencie *C. difficile* ZDROJ: DENÉVE et al., 2009

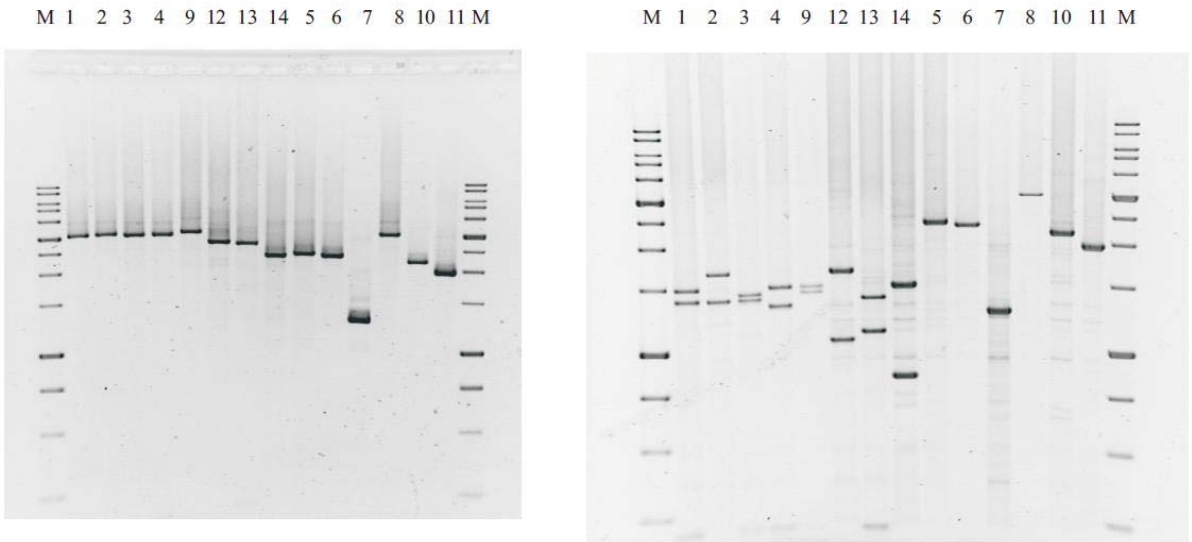
Binárny toxín môže byť produkovaný kmeňmi, ktoré nemajú gény *tcd*A a *tcd*B (toxinotyp XI), preto je detekcia binárneho toxínu v niektorých prípadoch netoxinogénnych kmeňov u symptomatických pacientov vysvetlením virulencie týchto kmeňov. Binárny toxín je kódovaný dvoma génmi, *cdt*A pre katalytickú jednotku a *cdt*B pre väzobnú jednotku. Oba toxíny súčasne môžu byť detekované v multiplexovej PCR (STUBBS et al., 2000).

Väčšina epidemiologických štúdií zameraných na *C. difficile* používala svoj vlastný typizačný systém (RUPNIK et al., 1998). RUPNIK et al. (1997) sa vo svojej práci zamerali na PCR protokol pre amplifikáciu celej sekvencie génov pre toxíny *C. difficile*. Na odlišovanie kmeňov použili rozdiely v lokalizácii restrikčných miest na amplikóne. Na základe získaných informácií boli jednotlivé štiepne vzory zaradené do toxinotypov. Na obrázku 9 a 10 sú zobrazené jednotlivé štiepne vzory fragmentov A3 a B1 a v tabuľke 4 je uvedený kľúč na zaraďovanie do toxinotypov a ribotypov.



Obr. 9: Štiepne vzory pre fragment B1-PCR ZDROJ: www.mf.uni-mb.si

Vysvetlivky: M – dĺžkový marker, H – fragment B1-PCR štiepený *Hinc*II, A – fragment B1-PCR štiepený *Acc*I, 1-7 – typ restrikcie,



Obr.10: Fragment A3-PCR neštiepený a štiepne vzory po restrikcii *Eco*RI

Vysvetlivky: M – dĺžkový marker, 1-14 – označenie vznikajúceho produktu a štiepneho vzoru ZDROJ: www.mf.uni-mb.si

Tab. 4: Typy RFLP vzorov B1-PCR a A3-PCR fragmentov a zodpovedajúci toxinotyp a ribotyp

Toxinotyp	Typ štiepenia B1	Typ štiepenia A3	Produkcia toxínov	Ribotyp
0	1	1	A+B+CDT-	001, 002, 004…
I	1	4	A+B+CDT-	003, 012, 102
II	1	3	A+B+CDT-	103
III	4	2	A+B+CDT+	027, 034, 075, 080
IV	2	2	A+B+CDT+	023, 058, 059, 063
V	3	8	A+B+CDT+	066, 078
V-like	3	8	A-B+CDT+	
VI	3	5	A+B+CDT+	045, 063, 066
VII	3	6	A+B+CDT+	063
VIII	5	7	A-B+CDT-	017, 047
IX	5	2	A+B+CDT+	019
X	5	NEG	A-B+CDT+	036
XIa	NEG	5	A-B-CDT+	033
XIb	NEG	8	A-B-CDT+	033
XII	6	1	A+B+CDT-	056
XIII	1	9	A+B+CDT-	070
XIV	7	2	A+B+CDT+	111
XV	7	2	A+B+CDT+	122
XVI	3	10	A-B+CDT+	
XVII	5	NEG	A-B+CDT+	
XVIII	1	11	A+B+CDT-	
XIX	1	5	A+B+CDT-	
XX	1	6	A+B+CDT-	
XXI	5	1	A+B+CDT-	
XXII	4	1	A+B+CDT+	
XXIII	5	2	A+B+CDT+	
XXIV	1	1	A+B+CDT+	
XXV	4	12	A+B+CDT+	
XXVI	3	10	A+B+CDT-	
XXVII	1	14	A+B+CDT-	

ZDROJ: www.mf.uni-mb.si

1.3.2.3 Ribotypizácia a príbuznosť kmeňov

Využitie typizačných metód založených na princípe PCR bolo popísané pri veľkom počte organizmov. Najčastejšie sú tieto metódy založené na využití jedného náhodného páru primerov a nízko špecifickej teploty annelingu pre dosiahnutie tvorby prúžkov. Tieto metódy známe ako RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) alebo AP-PCR (*Arbitrarily primed* PCR) vykazujú vysokú rozlišovaciu schopnosť. Avšak pri použití nastávajú problémy s reprodukovateľnosťou výsledkov. Čiastočne je to výsledok používania rôznych druhov termocyklerov či mierne zmenených podmienok v rôznych laboratóriách (BERG et al., 1994).

Ideálny typizačný systém teda umožňuje reprodukovateľnosť výsledkov v rôznych labotatóriách. Na prekonanie problémov spojených s náhodnou väzbou primerov je teda potrebné využiť polymorfizmus špecifických génov s použitím vysoko špecifických primerov a presnej teploty anelácie. Gény rRNA umožňujú svojim usporiadaním v genóme využiteľné miesto pre tieto štúdie. V genóme sa nachádzajú vo viacerých kópiách a analýzu usporiadania prúžkov je možné využiť na typizovanie druhov (O´NEILL et al., 1996).

Konvenčná ribotypizácia je založená na izolácii DNA z kolónie baktérií a následnom štiepení tejto DNA restriktázami. Následne sa poštiepená DNA prenáša na membránu, kde sa fixuje. Potom prebieha hybridizácia s próbami značenými enzýmom, ktoré sa naväzujú na základe komplementarity. Po pridaní substrátu dôjde na základe jeho štiepenia enzýmom k farebnej zmene špecifických fragmentov. Uloženie a intenzita prúžkov vytvoria ribotyp (www.cepacia.wz.cz)

GURTLER (1993) popísal modifikácie v konvenčnej ribotypizácii. Tie spočívali vo využití PCR na amplifikáciu oblasti medzi génmi pre 16S a 23S rRNA. Na analýzu medzigénovej oblasti sa amplifikuje zodpovedajúci úsek DNA za pomoci presne definovaných primerov. Táto medzigénová oblasť vykazuje vysoký stupeň heterogenity, na rozdiel od génov pre rRNA, ktoré sú evolučne vysoko konzervované a nemenné.

Rovnako bolo dokázané, že v genóme *C. difficile* sa nachádza 10 kópií génov pre rRNA a variácie v medzigénovej oblasti boli dokázané nielen medzi odlišnými kmeňmi, ale i medzi rôznymi kópiami rRNA operónu na tom istom chromozóme (GURTLER, 1993).

Ribotypizácia je teda metóda založená na analýze polymorfizmu v oblasti rRNA operónu. Existuje vysoká variabilita medzi baktériami v pozícii a intenzite rRNA

prúžkov, čo sa využíva na ich klasifikáciu a identifikáciu. Ribotypizácia je teda zvlášť vhodná na účely molekulárnej epidemiológie (SACK et al., 2004).

Vzhľadom na to, že táto technika má vysoké rozlíšenie, reprodukovateľnosť a môže byť vykonaná relatívne ľahko a rýchlo, môže sa využívať na tvorbu referenčných knižníc a využívať sa na porovnania medzi laboratóriami (BRAZIER, 2001).

Príbuznosť kmeňov

Najčastejšie sa vzájomná podobnosť a príbuznosť medzi organizmami graficky vyjadruje pomocou stromového grafu – dendrogramu.

Modely molekulárnej evolúcie sa využívajú pri konštrukcii dendrogramov dvojakým spôsobom. Je možné na základe rozsiahlych súborov dát vypočítať príslušné parametre modelov a tieto parametre potom používať univerzálne i na iné súbory dát. Tento prístup v súčasnosti prevažuje pri analýze bielkovín, kedy ako zdroj univerzálnych parametrov slúžia napríklad **Dayhoffové matice** frekvencií jednotlivých typov aminokyselinových zámen odvodené na základe analýzy veľkého počtu bielkovín pochádzajúcich od vzájomne si blízko príbuzných druhov.

Druhý prístup, používaný v súčasnosti predovšetkým pri analýze DNA, spočíva v tom, že parametre príslušného modelu sa stanovujú **v priebehu vlastnej analýzy** práve na základe analyzovaných dát. Táto možnosť je v prípade dostatočného množstva dát pochopiteľne presnejšia, pre menšie dátové súbory však môže byť zaťažená značnou chybou.

V praxi je však možné oba súbory kombinovať. Pri vytváraní dendrogramov na základe sekvencie bielkovín sa väčšinou používajú nielen Dayhoffové matice, ale výpočet sa minimálne opiera i o reálne frekvencie výskytu jednotlivých aminokyselín v analyzovaných bielkovinách a väčšinou sa dokonca robí i korekcia na variabilitu substitučných rýchlostí v jednotlivých pozíciách aminokyselinového reťazca. V prípade analýzy génov pre ribozomálne RNA, zase programy môžu brať do úvahy i sekundárnu štruktúru príslušnej rRNA.

V prípade dištančných metód sa daný model v priebehu výpočtu použije iba jeden krát a to na samom začiatku, kedy sa jednorazovo vytvorí na základe znakových dát matice vzdialeností medzi jednotlivými OTU (*operational taxonomic unit* – operačno taxonomická jednotka - druh alebo skupina druhov vytvárajúca jednu vetvu na fenograme či kladograme). V prípade znakových metód sa dané modely (vrátane

odhadu ich parametrov) uplatňujú opakovane takže výpočtová náročnosť v týchto prípadoch narastá.

Dendrogram vyjadrujúci podobnosť organizmov nazývame **fenetický strom – fenogram**. Naproti tomu dendrogram vyjadrujúci vzájomnú príbuznosť porovnávaných organizmov, t. j. poradie ich odvetvovania od spoločného predka, nazývame **fylogenetický strom – fylogram**. V prípade, že študujeme príbuznosť a poradie odvetvovania jednotlivých linií v rámci jedného druhu (tokogenézu) hovoríme často o **genealogickom strome** (www.natur.cuni.cz).

1.3.2.4 PFGE - Makrorestrikčná analýza pulznou elektroforézou

Základom molekulárnej biológie je manipulácia s DNA a jej analýza. Technika rozdeľovania zmesy DNA na fragmenty rozličnej dĺžky pomocou elektroforézy bola úspešne zavedená v 70. rokoch minulého storočia (JOPPA et al., 1992).

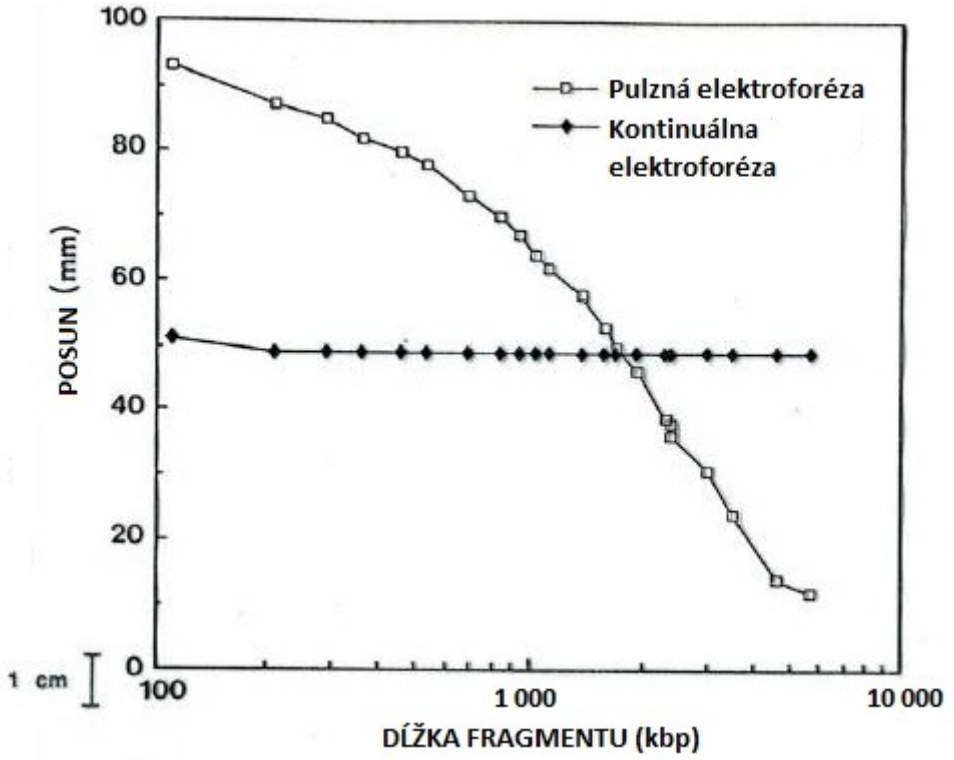
Pri konvenčnej gélovej elektroforéze sa molekuly DNA pohybujú priamočiaro a plynule od katódy k anóde a rýchlosť pohybu je priamoúmerná ich veľkosti.

V roku 1984, SCHWARTZ a CANTOR popísali pulznú elektroforézu (PFGE - pulsed field gel electrophoresis), predstavujúcu nový spôsob separácie DNA. PFGE umožnila deliť extrémne dlhé úseky DNA bez nutnosti štiepiť ich. Zvýšila hornú hranicu veľkostného limitu separácie DNA z 30-50 kb pri použití postupu klasickej elektroforézy na viac ako 10 Mb, čo umožnilo jej využitie v nových metodikách. Výsledkom je zavedenie PFGE do rutinných postupov. S využitím tejto techniky je teda možné analyzovať malý počet veľkých fragmentov DNA, namiesto klonovania veľkého počtu malých fragmentov DNA.

Základným rozdielom medzi klasickou elektroforézou a PFGE je pohyb DNA pôsobením elektrického poľa. V priebehu klasickej (kontinuálnej) elektroforézy sa fragmenty s veľkosťou medzi 30 a 50 kb pohybujú rovnakou rýchlosťou. To je možné pozorovať na géli ako jeden veľký difúzny prúžok. Ak je však DNA nútená zmeniť smer v priebehu elektroforézy, rôzne veľké fragmenty v oblasti tohto difúzneho prúžku sa začnú oddeľovať jeden od druhého (JOPPA et al., 1992).

S každým preorientovaním elektrického poľa sa teda menšie fragmenty DNA začnú pohybovať novým smerom rýchlejšie ako väčšie fragmenty. Vďaka tomu väčšie fragmenty DNA zaostávajú, čo umožňuje ich oddelenie od menších fragmentov (GUNDERSON, CHU, 1991).

Napriek tomu, že existuje mnoho typov prístrojového vybavenia pre PFGE, možno ich rozdeliť do dvoch kategórií. Najjednoduchšie vybavenie bolo navrhnuté pre FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis). FIGE pracuje na základe periodicky sa meniacej polarity elektród v priebehu elektroforézy. To spôsobuje, že DNA sa pohybuje určitý čas opačným smerom (JOPPA et al., 1992).



Obr. 11: Porovnanie rozlišovacej schopnosti kontinuálnej elektroforézy a pulznej elektroforézy ZDROJ: www.orion.chemi.muni.cz

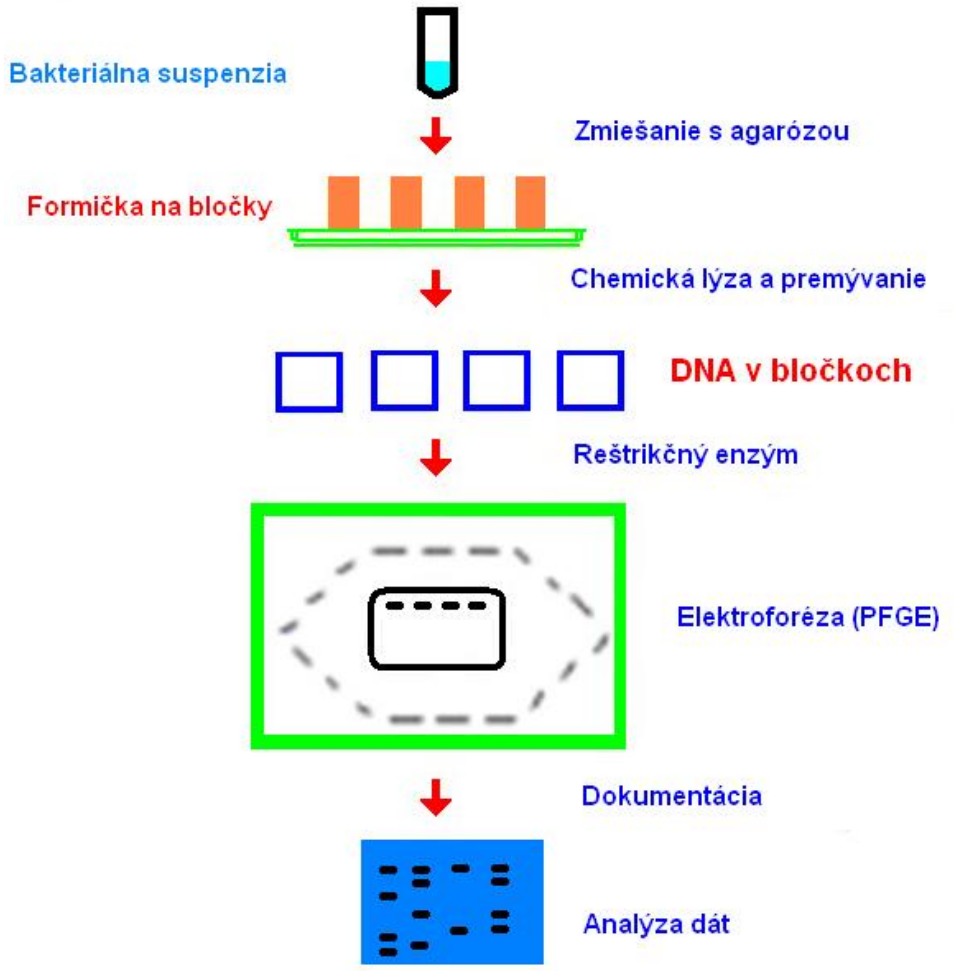
Do druhej kategórie patria prístroje, ktoré reorientujú DNA o určitý uhol, spravidla medzi 96 a 120°, čo spôsobí, že sa DNA pohybuje stále vpred v „cik-cakovitom“ smere. Pre fragmenty podobnej veľkosti to za optimálnych podmienok znamená rýchlejšiu separáciu a ich lepšie oddelenie (JOPPA et al., 1992).

V ideálnom prípade sa DNA oddeľuje v rovných líniách čo uľahčuje porovnávanie vzoriek. Pôvodné systémy využívajúce pulznú elektroforézu, využívali nehomogénne elektrické pole, čo vychylovalo vzorky z rovných línií a sťažovalo ich porovnávanie (SCHWARTZ, CANTOR, 1984). Najjednoduchší spôsob ako dosiahnuť rovné línie je využitie metódy FIGE, ktorá využíva paralelné usporiadanie elektród, čo zaručuje homogénne elektrické pole.

Na zvýšenie separačnej schopnosti a rozlíšenia veľkých fragmentov DNA je potrebná reorientácia uhla elektród. Využíva sa uhol medzi 96° a 140°, najčastejšie

120°. Menší uhol (pod 100°) zvyšuje pohyblivosť DNA bez ovplyvnenia rozlíšenia (JOPPA et al., 1992).

Pri PFGE je teda gél vystavený elektrickému poľu, ktorého smer sa pod určitým uhlom v časových intervaloch periodicky mení. Aby sa molekuly DNA mohli pohybovať v smere zmeneného elektrického poľa, musia najskôr zmeniť svoju orientáciu. Tento proces sa nazýva reorientácia a čas potrebný na jej uskutočnenie sa označuje ako reorientačný čas. Väčšie molekuly DNA potrebujú na svoju reorientáciu viac času, než menšie molekuly a ich výsledný priamočiary pohyb je preto pomalší. Medzi rozhodujúce parametre pri PFGE teda patrí okrem napätia, teploty a koncentrácie elektroforetického pufru, ktoré sú významné i pri použití konvenčnej elektroforézy, naviac aj pulzný čas. Ten je možné udržiavať v priebehu separácie buď na konštantnej úrovni alebo ho spojite prípadne nespojite meniť (zvyšovať). Tým je možné regulovať veľkosť molekúl, ktoré sa za daných podmienok ešte pohybujú, pretože ich reorientačný čas je nižší ako doba pulzu (ŠMARDA et al., 2008).



Obr. 12: Schéma prípravy PFGE ZDROJ : ŠMARDA et al., 2008

Technika pulznej elektroforézy sa využíva na separáciu intaktných molekúl DNA (napr. chromozómov baktérií alebo kvasiniek) alebo restrikčných fragmentov s veľkosťou desiatok kilobáz až niekoľko megabáz. Molekuly DNA, ktoré sa majú analyzovať PFGE, nie je možné izolovať štandardnými metódami, pri ktorých dochádza k ich poškodeniu. Na izoláciu sa používa špeciálny postup, ktorý zahŕňa kultiváciu buniek do presne stanovenej hustoty a ich zmiešanie s roztavenou agarózou s nízkym bodom topenia (tzv. *low melting agarose*). Suspenzia buniek sa následne prenesie do malej formičky, alebo sa kvapká na podložné sklíčko. Lýza buniek a deproteinizácia DNA potom prebieha v takto pripravených agarózových bločkoch, kde je DNA chránená pred nešpecifickou fragmentáciou strižnými silami pri pipetovaní. Po deproteinizácii je potrebné bločky niekoľkokrát premyť od proteinázy, aby nedošlo k degradácii restrikčných enzýmov a proteinázu je tiež potrebné nevratne inhibovať. Pri restrikčnom štiepení umožňuje agaróza dobrú difúziu enzýmov k DNA a agarózové bločky s naštiepenou DNA sa môžu priamo nanášať do jamiek v géli (ŠMARDA et al, 2008).

1.3.2.5 Real-time PCR

Jedným z problémov klasickej PCR je, že nie je spoľahlivá korelácia medzi počiatočným množstvom templátu a konečným množstvom produktu PCR pri pevnom počte cyklov. Ako spoľahlivejší sa javí vzťah medzi množstvom templátu a počtom amplifikačných cyklov potrebných na vytvorenie detekovateľného množstva produktu. Teoreticky by bolo možné zostaviť rôzne amplifikačné reakcie, zastaviť ich po rôznom počte cyklov a analyzovať, ktoré reakcie poskytli detekovateľný produkt. Tento postup by však bol pracný a nákladný. Situácia by sa však zjednodušila, ak by existoval spôsob ako detekovať prítomnosť produktu bez toho, aby bolo potrebné amplifikačnú reakciu zastaviť. Práve to je základom PCR v reálnom čase (ŠMARDA et al., 2008).

Na uskutočnenie PCR v reálnom čase je potrebné mať spôsob ako zistiť prítomnosť produktu reakcie v okamihu jeho vzniku, a nie až po zastavení reakcie a vizualizácii v agarózovom géli. Najjednoduchším spôsobom, ako tento problém vyriešiť, je pridanie takého farbiva do PCR zmesi, ktoré je schopné fluoreskovať po naviazaní na dvojreťazcovú DNA. Tento prístup má však slabiny spočívajúce v tvorbe falošných signálov, akonáhle sa farbivo naviaže na chybný produkt reakcie. Vyššiu špecifickosť je možné dosiahnuť použitím sond, ktoré sa viažu len na špecifický produkt (ŠMARDA et al., 2008).

1.4 Výskyt

Rizikové faktory pre rozvoj CDAD u ľudí zahŕňajú liečbu antibiotikami, vek (viac ako 65 rokov), chemoterapiu, dlhotrvajúcu hospitalizáciu a problémy s trávením. Potenciálne riziko prenosu *C. difficile* zo zvierat na ľudí zvyšuje i blízky kontakt medzi zvieratami a ľuďmi. V domácnostiach v USA sa chová približne 132,4 mil. psov a mačiek a je viac ako 5 mil. domestikovaných koní (ARROYO et al., 2005).

Najčastejší ribotyp v Európe je 027, existujú však veľké lokálne rozdiely. V Poľsku napríklad prevláda typ 017, v Maďarsku 014, vo Veľkej Británii bol častý typ 001, avšak v poslednej dobe vystupuje do popredia typ 002 (DŽUPOVÁ, BENEŠ, 2008).

Hypervirulentný kmeň

Clostridium difficile je najčastejšou infekčnou príčinou nozokomiálne vyvolaných hnačiek v rozvinutých krajinách. V posledných rokoch sa rapídne zvýšil výskyt CDAD (*C. difficile*-associated disease) v Severnej Amerike a Európe, čo viedlo k objaveniu epidemického kmeňa označovaného ako NAP1 (North American Pulsed-field Gel Electrophoresis Type 1). Výskyt tohto epidemického kmeňa sa dával do súvislosti so správami o zvyšujúcich sa problémoch s CDAD a infekciou v populácii, ktorá bola v minulosti považovaná za nízko rizikovú (NERANDZIC, DONSKEY, 2009).

Od objavenia nového hypervirulentného kmeňa *C. difficile* BI/NAP/027 v roku 2003 už prebehlo mnoho epidémií v Severnej Amerike a Európe. Ribotyp 027 bol prvýkrát izolovaný v roku 1988 vo Francúzsku. Ako pôvodca nozokomiálnych epidémií CDAD (*Clostridium difficile* associated disease) so závažným priebehom a vysokou úmrtnosťou bol identifikovaný práve v roku 2003 (DŽUPOVÁ, BENEŠ, 2008).

Tento kmeň sa po prvýkrát objavil v Pittsburghu, USA, v rokoch 2002-2003. Jeho výskyt bol široko medializovaný a dostal názov „superbug“.

Označenie kmeňa NAP/027 vyplýva z identifikačných mikrobiologických metód: pomocou ribotypizácie bol kmeň charakterizovaný ako ribotyp 027, na základe pulznej gélovej elektroforézy ako NAP1 (North American Pulsovar Type 1). Pomocou PCR-REA (Restriction Endonuclease Analysis) sú kmene 027/NAP1 zaraďované do skupiny BI (DŽUPOVÁ, BENEŠ, 2008).

Kmene BI/NAP/027 obsahujú mutáciu v pozícii 117 na TcdC géne, ktorý kóduje proteín C. Proteín pôsobí supresívne na gény pre toxíny A a B. Mutácia vyradí tento gén

z funcie. Kmene produkujú 16-krát viac toxínu A a 23-krát viac toxínu B. Kmeň 027 produkuje naviac tzv. binary toxín (odtiaľ označenie BI/NAP/027), ktorého patogenita doteraz nebola jasne preukázaná. Tieto faktory virulencie nie sú unikátne pre BI/NAP/027, vyskytujú sa aj pri iných ribotypoch, napr. 078 (DŽUPOVÁ, BENEŠ, 2008).

Výskyt vo veterinárnej medicíne

Ochorenia vyvolané *Clostridium difficile* sa stali vysoko aktuálne nielen v humánnej, ale aj vo veterinárnej medicíne. Už dlho sú v Nemecku a v Spojených štátoch amerických známe enterokolitídy žriebät a mladých koní sporadicky sa vyskytujúce u jedincov s anamnézou terapeutickej aplikácie určitých antibiotík. Okrem toho bol pri koňoch, podobne ako u človeka, popísaný fenomén nozokomiálnych nákaz *C. difficile.* Z veterinárneho hľadiska sú však najzávažnejšie epizoócie (epidémie zvierat) novonarodených prasiatok popisované v poslednom období v chovoch prasiat v USA, na rozdiel od situáce v Európe, kde sa doposiaľ v etiológii uplatňovali predovšetkým patogénne izoláty *E. coli* a *Clostridium perfringens* typu A.

Podľa dostupných literárnych zdrojov bola neonatálna infekcia prasiatok toxinogénnymi kmeňmi *C. difficile* v Európe zaznamenaná len sporadicky. V posledných piatich rokoch však veľa amerických autorov považuje toxinogénne izoláty *C. difficile* za hlavnú príčinu nezvládnuteľných neonatálnych hnačiek prasiatok vo veľkokapacitných farmách s niekoľkými tisíckami prasníc – matiek (MASAŘÍKOVÁ, SMOLA, 2007).

Mnohé štúdie potvrdili výskyt živočíšnych rezervoárov *C. difficile,* a bola zistená vysoká rozmanitosť druhov hostiteľských organizmov. Viaceré štúdie sa zameriavali na možný zoonotický prenos, ani jedna však nepodala presvedčivý dôkaz (BRAZIER, 1998).

Napriek izoláciám *C. difficile* z rôznych druhov domácich zvierat a náznakom, že zvieratá chované v domácnosti môžu byť potenciálnym zdrojom nákaz u človeka (BORRIELLO et al., 1983), prebiehal len veľmi malý výskum možného prenosu medzi druhmi. O´NEILL et al.(1993) nedokázali pomocou restrikčných analýz príbuznosť medzi kmeňmi získanými od zvierat a izolátmi pochádzajúcimi od ľudí. Avšak podotýkajú, že môže stále existovať riziko prenosu infekcie *C. difficile* z domestikovaných zvierat na ľudí.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo:

1. Zavedenie genotypových metód na identifikáciu a polyfázovú charakterizáciu kmeňov *Clostridium difficile* od pacientov s infekciou CDAD.
2. S využitím ribotypizácie, toxínovej typizácie a makrorestrikčnej analýzy charakterizovať klinické kmene získané od pacientov s CDAD. Získané restrikčné profily porovnať s profilmi zbierkových kmeňov *C. difficile*.

Pre dosiahnutie stanoveného cieľa bolo potrebné analýzu kmeňov rozdeliť do niekoľkých čiastkových etáp:

1. Detekcia toxínov vo vzorkách stolice.
2. Kultivácia vzoriek na selektívnej živnej pôde.
3. Identifikácia kmeňov pomocou biochemických testov.
4. Testovanie antibiotickej rezistencie.
5. Uchovávanie zbierky kmeňov zmrazením pre neskoršie testovanie.
6. Vyočkovanie zmrazených kmeňov a ich kultivácia.
7. Izolácia DNA a jej analýza pomocou detekcie binárneho toxínu, ribotypizácie, toxínovej typizácie a makrorestrikčnej analýzy.
8. Porovnanie získaných profilov s profilmi zbierkových kmeňov.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Kultivácia

Analyzované kmene *C. difficile* pochádzali zo zbierky 2. LF Karlovej univerzity v Prahe ČR a FN Motol v Prahe ČR. Referenčné kmene získala inštitúcia z Leidenu (Univerzitné medicínske centrum, Holandsko). Klinické kmene, s výnimkou dvoch, pochádzajú od pacientov, ktorí boli diagnostikovaní vo FN Motol.

Kmene boli uchovávané pri -80°C. Po vyočkovaní sa však nejavili tieto kmene ako vitálne, preto sme skúšali iné spôsoby zmrazovania. Jedným zo spôsobov bola kultivácia *C. difficile* v BHI bujóne (Brain Heart Infusion broth) a následne rozmiešanie rovnakého objemu kultúry v BHI bujóne s glycerolom. Inou metódou bolo suspendovanie kultúry narastenej na Schaedlerovom agare v Eppendorfovej skúmavke so zmesou glycerolu a živnej pôdy zmiešaných v pomere 1:1.

Po vyočkovaní zo zmrazenej kultúry boli kmene *C. difficile* kultivované v anaeróbnom prostredí anaerostatu, pri teplote 37°C po dobu 48-72 hodín. Kultivácia prebiehala na Schaedlerovom agare, prípadne na CCYE agare. Na Schaedlerovom agare vykazovali kultúry intenzívnejší rast.

3.2 Identifikácia

Identifikáciu sme robili po 48-72 hodinovej kultivácii. Využívali sme farbenie podľa Grama, kultiváciu na CCEY, kontrolné vyočkovanie pre aeróbnu kultiváciu a katalázový test na dôkaz anaeróbnosti vykultivovaných baktérií. Katalázu testujeme ponorením kľučky s bakteriálnou kultúrou do 3% H_2O_2. Prítomnosť bubliniek svedčí o odbúravaní H_2O_2 a teda prítomnosti katalázy.

3.2.1 Biochemická identifikácia

Všetky klinické kmene boli kultivované na CCEY, aby sa potlačila sprievodná fekálna mikroflóra. Po 72 hodinách sa kultúra preočkovala na Schaedlerov agar, kde sa pomnožila. Následne sa identifikovala pomocou anaerotestu.

Na identifikáciu kmeňov sme používali test „MICRO-LA-TEST“ (PLIVA-Lachema), s označením ANAEROtest 23. V jednotlivých testovacích jamkách boli testované biochemické znaky:

URE – rozklad urey
BGL – prítomnosť β-glukozidáz
MLZ – fermentácia melezitózy
ESL – hydrolýza eskulínu
SOR – fermentácia sorbitolu
XYL – fermentácia xylózy
TRE – fermentácia trehalózy
MLT – fermentácia maltózy
RAF – fermentácia rafinózy
SUC – fermentácia sukrózy
IND – produkcia indolu z tryptofánu
NAG – produkcia N-acetyl-β-D-glukozaminidázy
LAC – fermentácia laktózy
RHA – fermentácia ramnózy
ARA – fermentácia arabinózy
GAL – fermentácia galaktózy
MAN – fermentácia manitolu
FRU – fermentácia fruktózy
CEL – fermentácia celobiózy
SAL – fermentácia salicínu
GLU – fermentácia glukózy
MNS – fermentácia manózy
NIT – redukcia nitrátov

Tab. 5: Rozloženie biochemických znakov pri testovaní anaerotestom

	Riadok 1	Riadok 2	Riadok 3
A	URE	BGL	kontrola
B	MLZ	NAG	SOR
C	LAC	RHA	ARA
D	GAL	MAN	XYL
E	FRU	TRE	CEL
F	MLT	SAL	RAF
G	GLU	SUC	MNS
H	IND	NIT	ESL

	Riadok 1	Riadok 2	Riadok 3
A	-	-	-
B	- (+)	-	-
C	-	-	-
D	-	+	-
E	+	-	-
F	-	- (+)	-
G	+	-	+
H	-	-	+

Vysvetivky:

+ pozitívna reakcia - negatívna reakcia

(+) zväčša pozitívna reakcia

(-) zväčša negatívna reakcia

Obr. 13 : Pozitívny anaerotest

Na základe farebných zmien v testovacích jamkách, sme testovanému kmeňu priradili číselný kód, ktorý sme následne vyhľadali v číselníku. Zhoda s biochemickými znakmi charakteristickými pre *C. difficile* sa teda následne prejavila v identifikácii daného druhu baktérie.

3.3 Dôkaz toxínov

Všetky klinické kmene boli testované na prítomnosť toxínov *C. difficile*. Na testovanie sme použili test RIDASCREEN® od firmy „R-Biopharm“. Tento test sa využíva na *in vitro* imunologickú analýzu. Umožňuje kvalitatívne stanoviť prítomnosť toxínov A a B *C. difficile* vo vzorkách stolice. Pri referenčných kmeňoch sa prítomnosť toxínov nestanovovala.

3.4 Testovanie citlivosti na antibiotiká

Na overenie citlivosti klinických kmeňov na antibiotiká sme použili test na stanovenie MIC pomocou E-testu, na overenie citlivosti na metronidazolu tiež súpravu ATB Ana. Obe metódy sme použili na testovanie všetkých kmeňov (podľa interných predpisov nemocnice).

3.4.1 Stanovenie MIC pomocou E-testu

Suspenziou *C. difficile* (stupeň 1 podľa McFarlanda) sme inokulovali Wilkins-Chalgren agar a nechali stát 15 minút na pracovnom stole. Potom sme na povrch aplikovali stripy s vankomycínom a metronidazolom (firma BIOVERDON) a misku sme inkubovali v anaeróbnej atmosfére (BARBUT et al., 1999). Po 24 hodinách sme odčítali na stupnici prúžku inhibičné zóny.

3.4.2 Stanovenie citlivosti testom ATB Ana

Súpravu ATB Ana (firma bioMérieux) je možné použiť iba na testovanie citlivosti na metronidazol, vankomycín nie je v ponuke výrobcu. Metóda je semikvantitatívna, vo výsledku je zaznamenaná citlivosť, stredná citlivosť, alebo rezistencia testovaného kmeňa. Je možné tiež sledovať hodnotu MIC.

Hraničné hodnoty MIC pre metronidazol i vankomycín sú 4 $mg.dm^{-3}$. Hodnoty MIC, ktoré boli menšie alebo rovné 4 $mg.dm^{-3}$ označujú kmeň ako citlivý na dané

antibiotiká, hodnoty MIC väčšie ako 4 $mg.dm^{-3}$ ako kmeň rezistentný (ASPEVALL et al., 2006).

3.5 Izolácia DNA

Na izoláciu sme využívali protokol od RUPNIK (http://www.mf.uni-mb.si). Postup spočíval v nasledovných krokoch:

- kultivácia baktérií na agarovej platni, prípadne v BHI bujóne po dobu 48-72 hodín,
- suspendovanie CHELEX-100 (0,25 g) v 5 ml vody a vortexovať,
- alikvotne rozdeliť po 0,2 ml suspenzie chelexu do Eppendorfových skúmaviek,
- odobrať 1 µl kľučkou z kultúry, suspendovať v chelexovej suspenzii a vortexovať,

  - pri kultivácii v BHI bujóne sme odoberali 1 ml z bujónu a odstreďovali pri maximálnej rýchlosti 10 minút. Získanú zrazeninu sme následne suspendovali v chelexovej suspenzii,
- inkubovať v termobloku pri 98°C počas 12 minút,
- odstreďovať pri maximálnej rýchlosti 10 minút,
- preniesť 70 µl supernatantu do čistej skúmavky,
- vzorky uchovávať v mrazničke.

3.6 Toxinotypizácia

Na prípravu jednej vzorky PCR produktu s celkovým objemom 25 µl sme použili:

- 12,5 µl Taq-Purple DNA Polymerázy PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o.“
- 9,5 µl PCR vody
- 0,75 µl primeru s koncentráciou 10 pmol
- 1,5 µl DNA.

Pre amplifikáciu úseku A3 sme používali primery s označením A3C a A4N. Nukleotidová sekvencia primeru A3C je 5'-TATTGATAGCACCTGATTTAT ATACAAG-3' a primeru A4N 5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3'.

Pre amplifikáciu úseku B1 sme používali primery s označením B1C a B2N. Poradie nukleotidov primeru B1C je 5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGA AA-3' a sekvencia primeru B2N je 5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'.

Používali sme nasledovný program pre PCR:

▪ Počiatočná denaturácia	94°C	4min 0sec
▪ 35 cyklov s krokmi	94°C	0min 45sec
	55°C	0min 45sec
	72°C	3min 0sec
▪ Záverečný krok	72°C	5min 0sec

Po prebehnutí PCR programu sme elektroforeticky overovali, či vzniká len jeden fragment v požadovanej dĺžke, čo bolo potrebné pre ďalší postup. Vizualizácia prebiehala v 1% agarózovom géli, pri napätí 100 V približne 50 minút. Po skončení elektroforézy sme gél farbili 10 minút v roztoku etídium bromidu (2,5 µl/25 ml 0,5xTBE). Po farbení sme gél odfarbovali 10 minút vo vodnom kúpeli. Následne sa na transluminátore UV vyhodnotil výsledok. V prípade, že vznikal len jeden fragment s požadovanou dĺžkou (viď obr. 10), pokračovali sme štiepením fragmentu.

Fragment A3 sme štiepili použitím restriktázy *Eco*RI od firmy „Fermentas“ s aktivitou 10 U/µl. Na štiepenie sme používali zmes s celkovým objemom 40 µl a s nasledovným zložením:

- 24 µl PCR vody
- 4 µl *Eco*RI tlmivý roztok od firmy „Fermentas“
- 2 µl *Eco*RI
- 10 µl amplikónu.

Štiepenie prebiehalo vo vodnom kúpeli pri 37°C počas 3 hodín. Vzniknuté fragmenty sme následne elektroforeticky vizualizovali v 1% agarózovom géli pri napätí 100 V asi 50 minút. Po ukončení elektroforézy sme gél farbili v roztoku etídium bromidu (2,5 µl/25 ml 0,5xTBE) počas 10 minút. Po farbení sme gél odfarbovali 10 minút vo vodnom kúpeli. Následne sa na transluminátore UV vyhodnotil výsledok.

Fragment B1 sme štiepili v dvoch rozdielnych krokoch, a to s použitím restriktázy *Acc*I (10 U/µl) alebo *Hinc*II (10 U/µl) obe od firmy „Fermentas“. Na štiepenie sme používali zmes s celkovým objemom 40 µl a s nasledovným zložením:

- 24 µl PCR vody
- 4 µl Tango tlmivý roztok od firmy „Fermentas“
- 2 µl *Acc*I / *Hinc*II
- 10 µl amplikónu.

Štiepenie prebiehalo pri 37°C počas 12 hodín. Vzniknuté fragmenty sme následne elektroforeticky vizualizovali v 1% agarózovom géli pri napätí 100 V asi 50 minút. Po ukončení elektroforézy sme gél farbili v roztoku etídium bromidu (2,5 µl/25 ml 0,5xTBE) počas 10 minút. Po farbení sme gél odfarbovali 10 minút vo vodnom kúpeli. Následne sa na transluminátore UV vyhodnotil výsledok.

Po získaní restrikčných fragmentov sme ich profily porovnávali s profilmi referenčných kmeňov a na základe zhodnosti (podobnosti) sme ich zaraďovali k jednotlivým toxinotypom.

3.7 Detekcia binárneho toxínu

Na prípravu jednej vzorky PCR produktu s celkovým objemom 25 µl sme použili:

- 12,5 µl Taq-Purple DNA Polymerázy PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o.“
- 10,5 µl PCR vody
- 0,5 µl primeru s koncentráciou 10 pmol
- 1,0 µl DNA

Pre amplifikáciu úseku sme používali primery s označením cdtBpos a cdtBrev. Nukleotidová sekvencia primeru cdtBpos je 5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-3' a sekvencia primeru cdtBrev je 5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC -3'.

Používali sme nasledovný program pre PCR:

▪ Počiatočná denaturácia	94°C	3min 0sec
▪ 35 cyklov s krokmi	94°C	0min 15sec
	55°C	0min 30sec
	72°C	1min 0sec
▪ Záverečný krok	72°C	7min 0sec

Po prebehnutí PCR programu sme elektroforeticky overovali vznik produktu. Vizualizácia prebiehala v 1% agarózovom géli, pri napätí 100 V približne 30 minút. Po skončení elektroforézy sme gél farbili 10 minút v roztoku etídium bromidu (2,5 µl/25 ml 0,5xTBE). Po farbení sme gél odfarbovali 10 minút vo vodnom kúpeli. Následne sa na transluminátore UV vyhodnotil výsledok. Hľadaný fragment mal mať dĺžku 510 bp.

3.8 Ribotypizácia a príbuznosť analyzovaných kmeňov

Na prípravu jednej vzorky PCR produktu s celkovým objemom 30 µl sme použili:

- 12,5 µl Taq-Purple DNA Polymerázy PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o."
- 12,1 µl PCR vody
- 0,125 µl primeru s koncentráciou 100 pmol
- 5 µl DNA

Pre amplifikáciu úseku sme používali primery s označením bidet-16S a bidet-23S. Nukleotidová sekvencia primeru bidet-16S je 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3' a primeru bidet-23S je 5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC -3'.

Používali sme nasledovný program pre PCR:

▪ Počiatočná denaturácia	94°C	5min 0sec
▪ 35 cyklov s krokmi	94°C	1min 0sec
	60°C	0min 30sec
	72°C	1min 0sec
▪ Záverečný krok	72°C	10min 0sec

Po prebehnutí PCR programu sme elektroforeticky overovali vznik produktu. Vizualizácia prebiehala v 1,5 % agarózovom géli, pri napätí 170 V približne 3 hodiny. Po skončení elektroforézy sme gél farbili 30 minút v roztoku etídium bromidu (2,5 µl/25 ml 0,5xTBE). Po farbení sme gél odfarbovali 30 (60) minút vo vodnom kúpeli. Následne sa na transluminátore UV vyhodnotil výsledok.

Po vyhodnotení PCR ribotypizácie sme skonštruovali dendrogram kmeňov *C. difficile* pomocou metódy neväžených priemerov (UPGMA). Kritériom podobnosti bola percentuálna nezhoda v znakoch (prítomnosť prúžku v danej polohe). Použili sme program Statistica 4.5 (StatSoft).

3.9 PFGE

Postup pri PFGE zahŕňal nasledovné kroky:

1. Zmrazený kmeň sme vyočkovali na BHI agar a kultivovali sme ho 48 hodín (z typickej kolónie sme urobili farbenie podľa Grama a katalázový test) a následne sme vyočkovali jednu kolóniu do BHI bujónu (4,5 ml).

2. Skúmavku s inokulovaným bujónom sme umiestnili na trepačku a kultivovali sme 24 hodín v anaeróbnej atmosfére pri 37°C. Kultiváciu sme nepredlžovali, hrozila degradácia DNA.
3. Agarózu s nízkym bodom topenia (1%) sme rozvarili a umiestnili do skúmavky a do vodného kúpeľa s teplotou 50°C.
4. Bujón s inkubovanými bunkami sme odstreďovali (3 000 otáčok / 15 minút) a odstránili sme supernatant.
5. Sediment sme následne resuspendovali v 200 µl tlmivého roztoku a chladili na ľade.
6. Do novej skúmavky chladenej ľadom sme odobrali 100 µl resuspendovaného inokula.
7. Pridali sme 8 µl lyzačnej zmesy (lyzozým 25 $mg.ml^{-1}$, lyzostafín 2 $mg.ml^{-1}$).
8. Skúmavku sme vložili do vodného kúpeľa a pridali sme 200 µl agarózy vytemperovanej na 50°C.
9. Pripravili sme bločky.
10. Bločky sme vložili do skúmavky s 500 µl lyzačného tlmivého roztoku a 20 µl lyzačného roztoku a kultivovali sme ich 1 hodinu pri 37°C.
11. Niekoľkokrát sme ich premyli premývacím tlmivým roztokom.
12. Pridali sme 20µl proteinázy K (600 U / ml) v tlmivom roztoku pre proteinázu K a inkubovali pri 56°C cez noc.
13. Disk s lyzovanými bunkami bol štiepený restrikčnou endonukleázou *Sma*I (20 U). Štiepenie prebiehalo pri 25°C a skúmavka bola umiestnená vo vodnom kúpeli.
14. Gél s 1% koncentráciou bol pripravený v 0,5 x TBE tlmivom roztoku.
15. Disky s naštiepenou DNA sme vložili do jamiek a jamky ešte vyplnili agarózou, aby sme ich fixovali.
16. Samotná PFGE prebiehala pre prepínacom intervale 5 – 35 sekúnd po dobu 20 hodín, napätí 6V / cm, uhle 120° a teplote 14°C v purfi 0,5 x TBE.
17. Gél sme farbili etídium bromidom a dokumentovali použitím UV svetla.

3.10 Real-time PCR pomocou „Xpert™ *C. difficile*“

Na Real-time PCR sme využívali prístroj „Xpert™ *C. difficile*“, ktorý využíva detekciu amplifikácie génov pre toxín B (*tcd*B), binárny toxín (*cdt*) a gén *tcd*C (a

deléciu v tomto géne). Je tiež schopný odlíšiť prítomnosť hypervirulentého kmeňa s ribotypom 027.

Samotné testovanie pozostávalo vo vortexovaní vzorky stolice v reakčnom roztoku po dobu 10 sekúnd. Následne sa do zásobníka, do jamky s označením „S“ (sample – vzorka) prepipetoval celý obsah tuby s vortexovanou vzorkou. Do jamiek s označením 1 a 2 sa vyprázdnili tuby s reagenciami s rovnakým označením a spustil sa samotný test.

4 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUSIA

Cieľom práce bola fenotypová a genotypová charakteristika kmeňov *C. difficile* pochádzajúcich zo zbierky 2. LF Karlovej univerzity a FN Motol (ČR). Pre naplnenie cieľa bolo potrebných niekoľko krokov.

Prvým krokom bola kultivácia vzoriek. K dispozícii sme mali 85 klinických kmeňov *C. difficile*, pochádzajúcich zo vzoriek stolice. Klinické kmene, s výnimkou dvoch, pochádzajú od pacientov, ktorí boli diagnostikovaní vo FN Motol.

Po zmrazení sa znížila životaschopnosť kmeňov. Z 85 vzoriek sme boli schopní vykultivovať len 33 kmeňov (38,8%), čo mohlo byť spôsobené vysokou náročnosťou kultivácie tohto druhu a vysokou kontamináciou vzoriek. Z narastenej biomasy bola izolovaná DNA.

Všetky vzorky stolice, odkiaľ boli izolované analyzované kmene, boli vyšetrené na prítomnosť toxínov metódou ELISA. Pri všetkých kmeňoch bola potvrdená prítomnosť toxínov, pričom sme nerozlišovali prítomnosť jednotlivých toxínov.

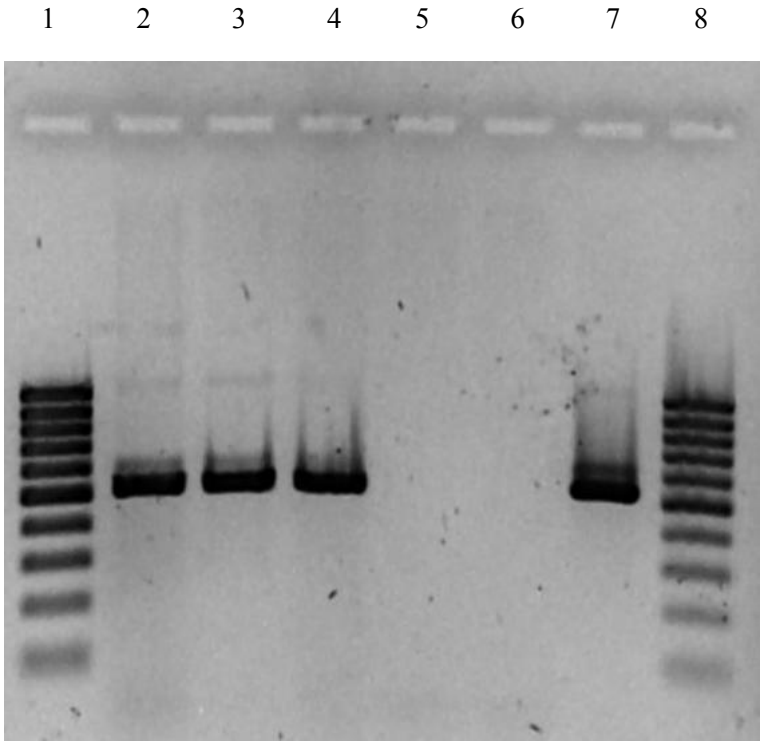
Po narastení na živnej pôde sme kmene testovali farbením podľa Grama, Wirzt Conklina, aeróbnou kultiváciou, testom na katalázu a anaerotestom. Pri všetkých kmeňoch sa potvrdila príslušnosť k druhu *C. difficile*.

Pri testovaní sme hodnotili citlivosť kmeňov na prítomnosť vankomycínu a metronidazolu. Na metronidazol a vankomycín boli citlivé všetky kmene.

Autori HOOKMAN a BARKIN (2009) v svojej práci popisujú celosvetový nárast počtu kmeňov rezistentných na metronidazol, čo v našej práci nebolo potvrdené.

Na prítomnosť génov pre binárny toxín sme testovali 35 vzoriek DNA. Binárny toxín bol detekovaný pri 9 kmeňoch (25,7 %) a zvyšných 26 (74,3 %) vzoriek malo negatívny výsledok tohto testovania.

Percento nami detekovaných kmeňov pozitívnych na prítomnosť binárneho toxínu je vyššie ako uvádza napríklad SPIGAGLIA a MASTRANTONIO (2002), ktorí detekovali tento toxín u 13,7% kmeňov. GERIC et al. (2004) tiež uvádzajú nižšie percento výskytu, len u 9 (5,2 %) zo 153 testovaných kmeňov bol potvrdený gén *tcd*C pre binárny toxín.



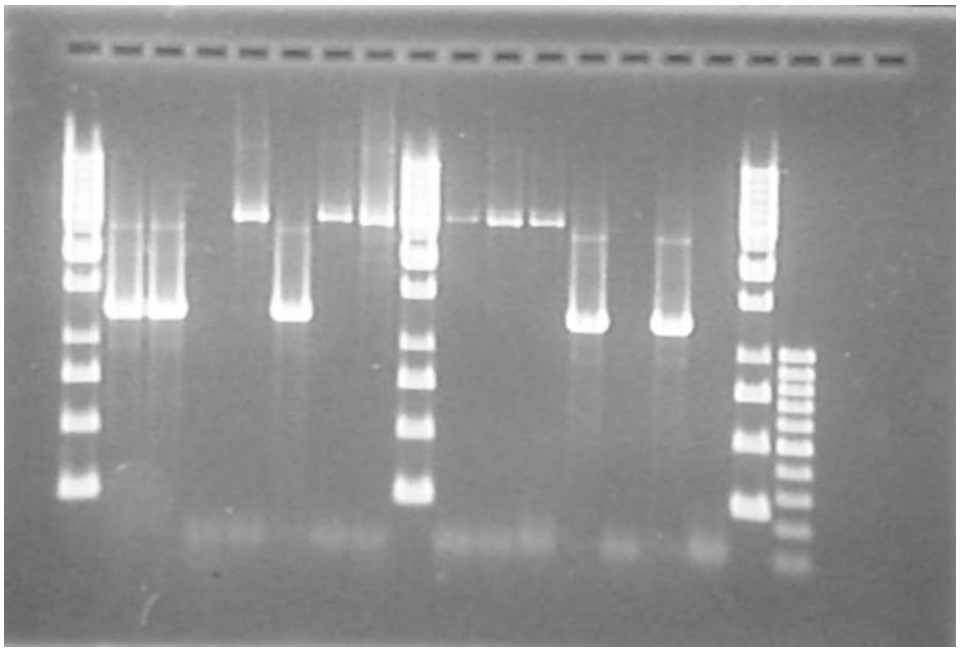
Obr. 14: Detekcia binárneho toxínu

Vysvetlivky: 1, 8 – dĺžkový marker, 100 bp, 2, 3, 4 – pozitívne vzorky, 5 – negatívna vzorka , 6 – negatívna kontrola, 7 – pozitívna kontrola

Do toxinotypizácie bolo zaradených 35 vzoriek DNA. Do toxinotypu I patrili tri kmene (8,6 %). Do toxinotypu II patrili 4 kmene (11,4 %). Do toxinotypu VIII patrilo 11 kmeňov (31,4 %). Päť kmeňov (14,3 %) bolo zaradených do toxinotypu X a 4 do toxinotypu XI (11,4 %). Do toxinotypov XIV a XIII sme zaradili po jednom kmeni (2,9 %). Nebol potvrdený výskyt toxinotypu III. Pomocou našej metodiky sa nepodarilo otypovať 6 kmeňov (17,1 %).

RUPNIK et al. (1998) potvrdzujú naše výsledky, kedy vo svojich výskumoch zistili taktiež najvyšší výskyt toxinotypu VIII (51,2%) a detekovali spolu 11 rôznych toxinotypov. KATO et al. (1998) poukazujú na rozšírenie variantných kmeňov s negatívnou produkciou toxínu A, pričom ich štúdia poukazuje na 12% výskyt, čo predstavuje nárast oproti 3% výskytu publikovanému skôr v práci RUPNIK et al. (1997). Naším testovaním bolo potvrdené, že 5 kmeňov (14,3%) neprodukuje toxín A.

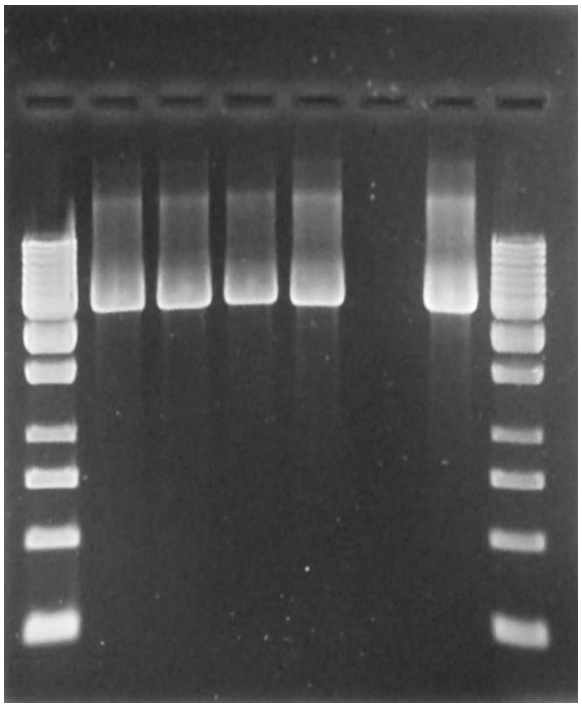
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Obr. 15: Amplifikácia fragmentu A3

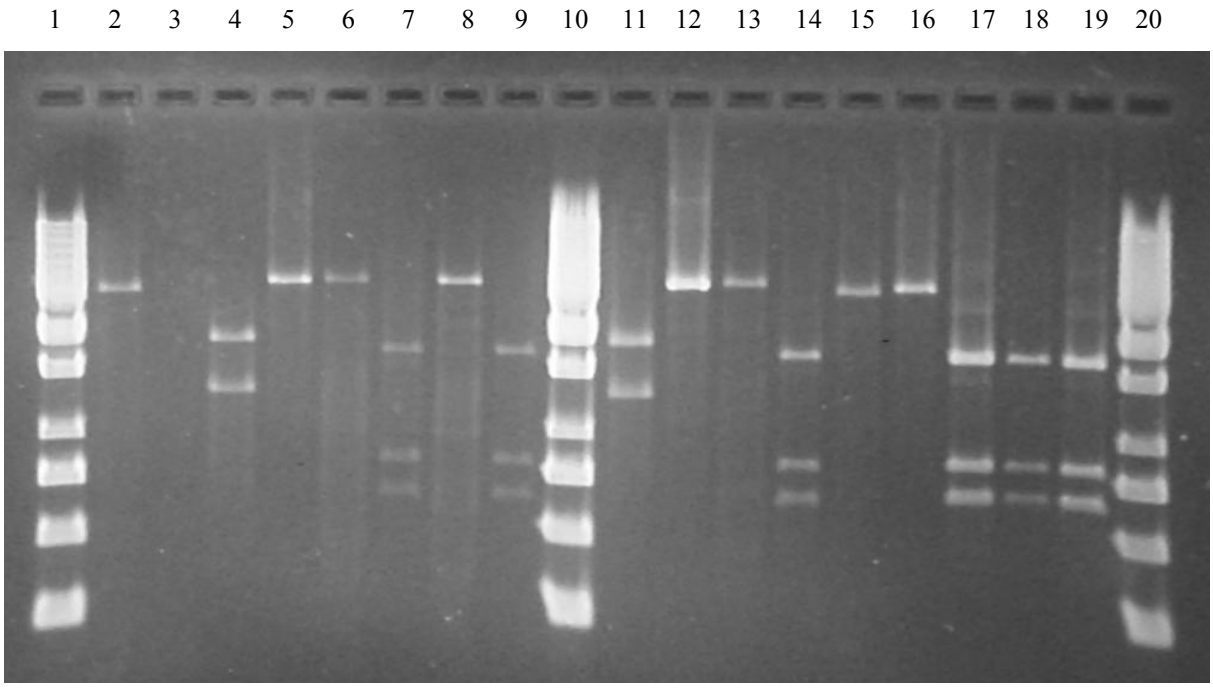
Vysvetlivky: 1, 9, 17 – dĺžkový marker, 1 kb, 18 – dĺžkový marker 100 bp, 4, 14, 16 – negatívne vzorky

1 2 3 4 5 6 7 8



Obr. 16: Amplifikácia fragmentu B1

Vysvetlivky: 1, 8 – dĺžkový marker, 100 bp, 2, 3, 4, 5 – pozitívne vzorky, 6 – negatívna kontrola, 7 – pozitívna kontrola



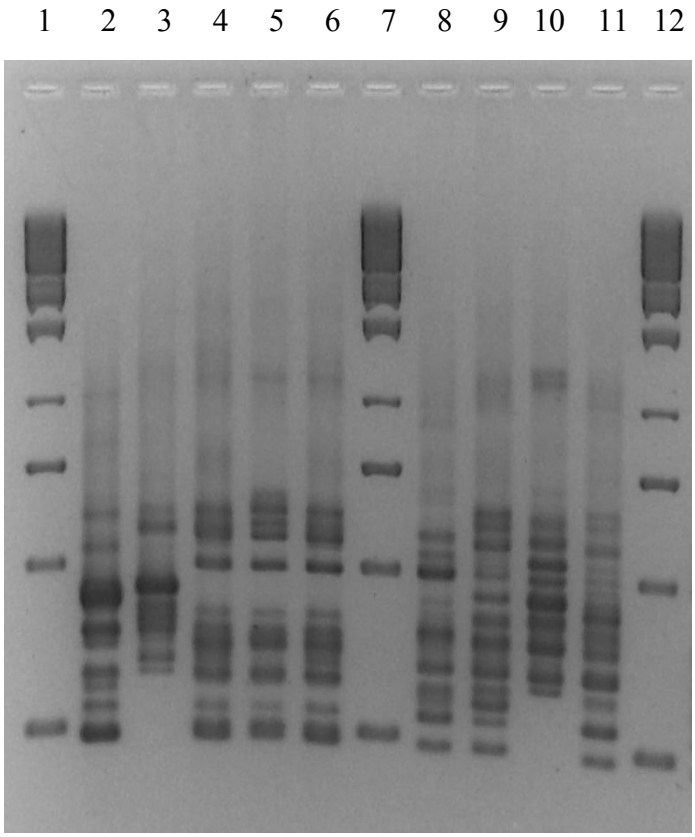
Obr. 17: Štiepenie fragmentu B1

Vysvetlivky: 1, 10, 20 – dĺžkový marker, 1 kb

Ribotypizáciou sa potvrdil výskyt ribotypov 033 – 1 kmeň (2,9 %), 036 - 5 kmeňov (14,3 %), 047 – 11 kmeňov (31,4 %), 070 – 1 kmeň (2,9 %), 102 – 3 kmene (8,6 %), 103 – 4 kmene (11,4 %) a 111 – 1 kmeň (2,9 %). Nebol potvrdený výskyt hypervirulentných ribotypov 027 a 078.

Najčastejším ribotypom v Európe je 027, existujú však veľké lokálne rozdiely. V Poľsku napríklad prevláda typ 017, v Maďarsku 014, vo Veľkej Británii bol častý typ 001, avšak v poslednej dobe vystupuje do popredia typ 002 (DŽUPOVÁ, BENEŠ, 2008). Od roku 2003 stúpa podľa TERHES et al. (2009) výskyt ochorení CDAD a taktiež sa zvyšuje výskyt ribotypu 027, ktorý spôsobil epidémie v Severnej Amerike, Anglicku, Holandsku, Belgicku a Francúzsku. Jeho výskyt bol nedávno potvrdený napríklad i v Rakúsku, Írsku, Nemecku a Švajčiarsku (KUIJPER et al., 2007, FENNER et al., 2008).

Výsledky ribotypizácie sme využili na zostrojenie dendrogramu. Na základe dendrogramu je možné určiť príbuznosť klastru s ribotypmi 070, 102 a 103, ktoré preukázali najvyššiu zhodu. Tento výsledok potvrdila i práca RUPNIK et al. (2001).



Vysvetlivky:

1, 7, 12 – dĺžkový marker, 1 kb,

2 – ribotyp 047,

3 – ribotyp 036,

4 – ribotyp 070,

5 – ribotyp 102,

6 – ribotyp 103,

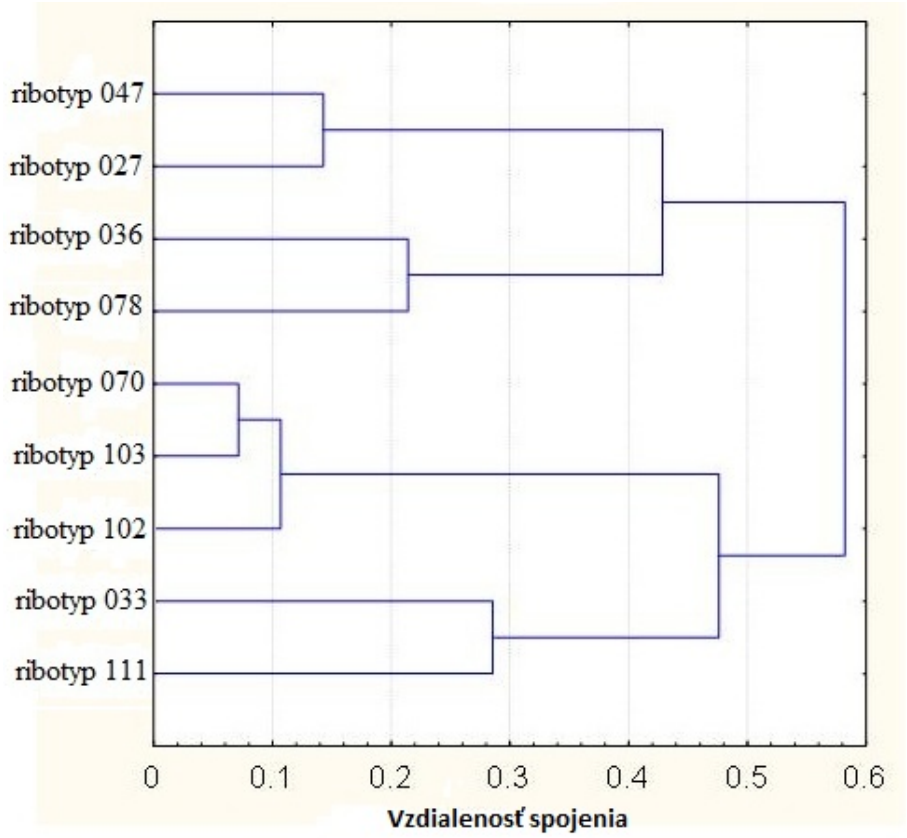
8 – ribotyp 033,

9 – ribotyp 111,

10 – ribotyp 078,

11 – ribotyp 027

Obr. 18: Ribotypizácia



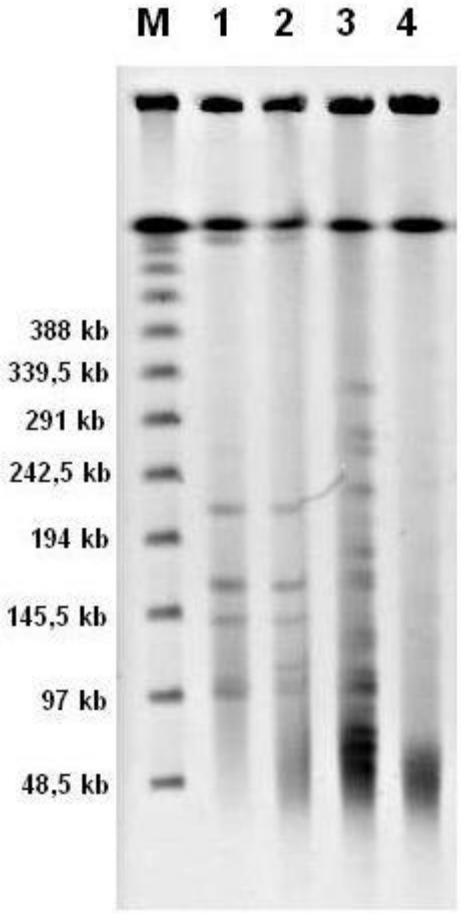
Obr. 19: Dendrogram

Metódou Real-time PCR bolo testovaných 10 vzoriek stolice. Vzorky nebolo nutné kultivovať. Všetky vzorky boli pozitívne na výskyt *C. difficile.* Prítomnosť ribotypu 027 sa nepotvrdila ani v jednom prípade. Vzorky boli súbežne testované detekciou binárneho toxínu, ako aj ribotypizáciou. Obe metódy potvrdili, že nejde o ribotyp 027.

6 kmeňov (18,1%) sa nepodarilo našou metodikou typizovať a vykazovali pri amplifikácii negatívne výsledky. Podrobné výsledky typizácie sú uvedené v tabuľke 5. Zoznam referenčných kmeňov uvádza tabuľka 7 v prílohe.

Tab. 6: Výsledky typizácie kmeňov *C. difficile*

Ribotyp	**Štiepenie fragmentu A3**	**Štiepenie fragmentu B1**	**Toxinotyp**	**Binárny toxín**	**Počet kmeňov**
033	5	-	XI	+	4
036	-	5	X	+	5
047	7	5	VIII	-	11
070	9	1	XIII	-	1
102	4	1	I	-	3
103	3	1	II	-	4
111	2	7	XIV	-	1



Obr. 20: Makrorestrikčná analýza pulznou elektroforézou

Vysvetlivky: M – dĺžkový marker

1, 2, 3, 4 - vzorky

Vzorka 1 a 2 mali rovnaký toxinotyp i ribotyp. Na základe makrorestrikčného profilu možno rozlíšiť dva pulzotypy. Nejde teda o rovnaký kmeň. Vzorka 3 bola zrejme kontaminovaná, profil je úplne odlišný od predošlých dvoch. Vzorka 4 len veľmi ťažko lyzovala.

Celkovo možno konštatovať, že nami vybrané metodiky pre fenotypovú a genotypovú charakteristiku *C. difficile* boli úspešne zavedené do praxe. Spoľahlivosť daných metód bola overená viacnásobným porovnávaním výsledkov medzi jednotlivými analýzami, ako aj porovnaniami s referenčnými kmeňmi.

5 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Zavedené genotypové analýzy budú využívané na:

1. štúdium klonálnej príslušnosti kmeňov *Clostridium difficile*,
2. mapovanie výskytu jednotlivých klonálnych linií *C. difficile* na jednotlivých oddeleniach nemocnice,
3. detekcia výskytu hypervirulentých kmeňov *C. difficile*,
4. výsledky sa tiež použijú ako podklad pre protiepidemiologické opatrenia.

6 ZÁVER

Cieľom našej práce bola fenotypová a genotypová charakteristika kmeňov *C. difficile* pochádzajúcich zo zbierky 2. LF Karlovej univerzity a FN Motol (ČR).

Zo získaných výsledkov možno urobiť nasledovné závery:

1. *C. difficile* je možné spoľahlivo detekovať na základe fenotypových charakteristík,
2. bol potvrdený výskyt toxinogénnych druhov *C. difficile*,
3. nebol zistený výskyt kmeňov rezistentných na antibiotiká vankomycín a metronidazol,
4. do praxe boli úspešne zavedené genotypizačné metódy,
5. nebol detekovaný nebezpečný toxinotyp III,
6. neboli detekované nebezpečné ribotypy 027 a 078.

Zoznam použitej literatúry

AROYO, L. G., KRUTH, S. A., WILLEY, B., STAEMPFLI, H., LOW, D., SCOTT, J., 2005. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources, In: Journal of Medical Microbiology, vol. 54, 2005, p.163–166, ISSN 1473-5644

ASPEVALL, O., LUNDBERG, A., BURMAN, L. G., AKERLUND, T., SVENUNGSSON, B., 2006. Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* and its relation to PCR ribotypes in a Swedish university hospital. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 50, 2006, no. 5, p. 1890-1892, ISSN 1098-6596

BARBUT, F., DECRE, D., BURGHOFFER, B., LESAGE, D., DELISLE, F., LALANDE, V., DELMEE, M., AVESANI, V., SANO, N., COUDERT, C., PETIT, J. C., 1999. Antimicrobial susceptibilities and serogroups of clinical strains of *Clostridium difficile* isolated in France in 1991 and 1997. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 43, 1999, no. 11, p. 2607-2611, ISSN 1098-6596

BEDNÁŘ, M., et al. 1999. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha : Marvil, 1999. 558 s.

BERG, D.E., AKOPYANTS, N.S., KERSULYTE, D. 1994. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. In: Methods in Molecular and Cellular Biology, vol. 5, 1994, p. 13–24, ISSN 0898-7750.

BORRIELLO, S., HONOUR, P.,TURNER, T., BARCLAY, F., 1983. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection, In: Journal of Clinical Pathology, vol. 36, 1983, p. 84-87, ISSN 0021-9746

BRAUN, V. et al., 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*, In: Gene, vol. 182, 1996, no. 1, p. 29-38, ISSN 0378-1119

BRAZIER, J. S., 2001. Typing of *Clostridium difficile*. In: Clinical Microbiology and Infection, vol. 7, 2001, p. 428–431, ISSN 1469-4409.

BRAZIER, J.S., 1998. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*, In: Journal of Antimicrobioal Chemotherapy, vol. 41, 1998, Suppl. C, p. 47-57, ISSN 0305-7453

DENÉVE, C., JANOIR, C., POILANE, I., FANTINATO, C., COLLINGON, A., 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis, In: International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 33, 2009, no. 1, p. 24-28, ISSN 0924-8579

DOVE, C. H., et al., 1990. Molecular Characterization of the *Clostridium difficile* Toxin A Gene, In: Infection and Imunity, vol. 58, 1990, no. 2, p. 480-488, ISSN 0019-9567

DŽUPOVÁ, O., BENEŠ J., 2008. *Clostridium difficile* a klostridiová kolitida: co je nového? In: Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, vol. 14, 2008, no. 3, s. 115-117

EICHEL-STREIBER, C., SAUERBORN, M., 1990. *Clostridium difficile* toxin A carries a C-terminal repetetive structure homologous to the carbohydrate binding region of streptococcal glycosyltransferases. In: Gene, vol. 96,1990, no. 2, p. 107-113. ISSN 0378-1119

EICHEL-STREIBER, C.; BOQUET, P., SAUERBORN, M., THELESTAM, M., 1996. Large clostridial cytotoxins- a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins, In: Trends in Microbiology, vol. 4, 1996, no. 10, p. 375-382, ISSN 0966-842X

EICHEL-STREIBER, C.; LAUFENBERG-FELDMANN, R.; SARTINGEN, S.; SCHULZE, J.; SAUERBORN, M.; 1992. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B, In: Molecular and general genetics, vol. 233, 1992, no. 1-2, p. 260-268, ISSN 0026-8925

FENNER, L, WIDMER, A. F., STRANDEN, A. et al. 2008. First cluster of clindamycinresistant *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Switzerland. In: Clinical Microbiology and Infectology, vol. 14, 2008, p. 514–515, ISSN 1218-1293

GERIC, B., RUPNIK, M., GERDING, D. N., GRABNAR, M., JOHNSON, S. 2004. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital, In: Journal of Medical Microbiology, vol.53, 2004, p. 887-894, ISSN 0022-2615

GUNDERSON, K., CHU, G., 1991. Pulsed-Field Electrophoresis of Megabase-Sized DNA. In: Molecular and cellular biology, vol. 11, 1991, no. 6, p. 3348-3354, ISSN 1098-5549

GURTLER, V. 1993. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. In: Journal of General Microbiology, vol. 139, 1993, p. 3089–3097, ISSN 0022-1287.

HALL, I. C., O'TOOLE, E. 1935. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. In: American journal of diseases of children, vol. 49, 1935, p. 390–402, ISSN 0096-8994

HAMMOND, G. A., JOHNSON, J. L., 1995. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463, In: Microbial pathogenesis, vol. 19, 1995, no. 2, p. 203-213, ISSN 0882-4010.

HRDINA, V. et al. 2004. Přírodní jedy a toxiny. Praha : Galén, 2004. 302 s. ISBN 80-7262-256-0.

JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L., 1996. Praktikum z mikrobiologie, Brno : Vydavatelství MU, 1996. 67 s., ISBN 80-210-1374-5.

JARČUŠKA, P., LIPTÁKOVÁ A., 2004. Rezistencia antibiotík a ich spotreba, In: *Via practica*, vol. 4, 2004, s. 211-214, ISSN 1336-4790

JOPPA, B., LI, S., COLE, S., GELLAGHER, S., 1992. Pulsed Field Electrophoresis for Separation of Large DNA. In: Probe, vol. 2, 1992, dostupné na http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html

JOYCE, A. M, BURNS, D. L., 2003. Rekurentní klostridiová pseudomembranózní kolitida, In : Medicína po promoci, roč. 4, 2003, č. 4/červenec–srpen, 2003, s. 15-19.

KATO, H., KATO, N., WATANABE, K., IWAI, N., NAKAMURA, H., YAMAMOTO, T., SUZUKI, K., KIM, S. M., CHONG, Y., WASITO, E. B., 1998. Identification of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* by PCR, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, 1998, no. 8, p. 2178–2182, ISSN 0095-1137

KATO, N. et al., 1991, Identification of Toxigenic *Clostridium difficile* by the Polymerase Chain Reaction, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 29, 1991, no. 1, p. 33-37, ISSN 0095-1137

KOMINSKY, L. S. et al., 2007. Clostridium perfringens Enterotoxin as a Novel-Targeted Therapeutic for Brain Metastasis, In: Cancer research, vol. 67, 2007, no.17, p. 7977 – 7982 ISSN 1538-7445

KRAMÁŘ, R., 2007, Lékařská mikrobiologie. 1. vydanie. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007. 72 s. ISBN 978-80-7394-021-8

KUIJPER, E. J., COINGNARD, B., BRAZIER, J., et al., 2007. Update of *Clostridium difficile* – Associated Disease due to PCR ribotype 027 in Europe. In: Eurosurveillance, vol. 12, 2007, no. 6, p. 163-166, ISSN 1560-7917

MANI, N., DUPUY, B., 2001, Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor, In: PNAS, vol. 98, 2001, no. 10, p. 5844-5849, ISSN 1091-6490

MASAŘÍKOVÁ, M., SMOLA, J. 2007. Clostridium difficile–associated disease u prasat. In Zprávy CEM [online]. 2007, roč. 16, č. 10-11, s. 489 [cit. 2009-08-25]. Praha : Státní zdravotní ústav, 12. prosinec 2007. Dostupné na internete: http://http://www.szu.cz/tema/prevence/clostridium-difficile-associated-disease-u-prasat

MONCRIEF, J. S., et al., 1997. Positive Regulation of *Clostridium difficile* Toxins, In: Infection and Imunity, vol. 65, 1997, no.3, s. 1105–1108, ISSN 0019-9567

NERANDZIC, M. M., DONSKEY, J. C., 2009. Effective and Reduced-Cost Modified Selective Medium for Isolation of *Clostridium difficile*, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 47, 2009, no. 2, p. 397–400, ISSN 0095-1137

O´NEILL, G. L., OGUNSOLA, F. T., BRAZIER, J. S., DUERDEN, B. I., 1996. Modification of a PCR Ribotyping Method for Application as a Routine Typing Scheme for *Clostridium difficile*, In: Anaerobe, vol. 2, 1996, p. 205-209, ISSN 1075-9964

O'NEILL, G., ADAMS, J., BOWMAN, R., RILEY, T., 1993. A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. In: Epidemiology and Infection, vol. 111, 1993, p. 257–264, ISSN 1469-4409.

PERELLE, S**.,** GILBERT, M., BOURLIOUX, P., CORTHIER, G., POPOFF, R. 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196, In: Infection and Immunity, vol. 65, 1997, no. 4, p. 1402-1407, ISSN 0019-9567

PRŮŠA, R., 1997. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. Vydala 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s r.o., Praha, 1997, s. 47, ISBN 80-238-0940-7

ROMPRÉ, A. et al., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches, In: Journal of Microbiological Methods, vol. 49, 2002, no.1, p. 31-54, ISSN 0167-7012

RUMLOVÁ, M., et al., 2003. Základní metody genového inženýrství, Centrum integrované genomiky, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha : VŠCHT 2003, 54 s., ISBN 80-86313-12-3

RUPNIK, M., AVESANI, V., JANC, M., EICHEL-STREIBER, C.; DELMÉE, M., 1998. A Novel Toxinotyping Scheme and Correlation of Toxinotypes with Serogroups of *Clostridium difficile* Isolates, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, 1998, no. 8, p. 2240-2247, ISSN 0095-1137

RUPNIK, M., BRAUN, V., SOEHN, F., JANC, M., HOFSTETTER, M., LAUFENBERG-FELDMAN, R., EICHEL-STREIBER C., 1997. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. In: FEMS Microbiology Letters, vol. 148, 1997, p. 197-202.

RUPNIK, M., BRAZIER, J. S., DUERDEN, B. I., GRABNAR, M., STUBBS, S., 2001. Comparison od toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strain and description of novel toxinotypes. In: Microbiology, vol. 147, 2001, p. 439-447, ISSN 1465-2080

RUPNIK, M. 2007. *Clostridium difficile* Toxinotypes. Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru [online]. Maribor : Univerza v Mariboru, 15-Nov-2007 22:10. [cit. 2003-01-10], dostupné na: <">http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>.

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. 2007. Klostridia, klostridium, *Clostridium*. From Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník [online]. Praha : VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-07-02], dostupné na: <”>http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=K004>.

SACK, D.A., SACK, R.B., NAIR, G.B., SIDDIQUE, A.K., 2004. Cholera, In: Lancet, vol. 363, 2004, Issue 9404, p. 223-233, ISSN 0096-0233.

SAYLERS, A., WHITT, D., 1994. Bacterial pathogenesis, ASM Press, Washington, D.C, 1994, p. 282-289, ISNB 1-55581-094-2

SEDLÁČEK, I. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

SCHARFEN, J., 2007. Nokardie – smrtící krásky. In: Živa, vol. 2, 2007, dostupné na http://media.rozhlas.cz/_binary/00545986.pdf

SCHWARTZ, D.C., CANTOR, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, In: Cell, vol. 37, 1984, no. 1, s. 67-75, ISSN 0092-8674

SNYDER, M. L., 1937. Further studies on *Bacillus difficilis*. In: The Journal of Infectious Deseases, vol. 60, 1937, p. 223-231, ISSN 1651-1980

SOBEL, J., 2005. Botulism, In: Clinical Infectious Diseases, vol. 41, 2005, (15 October), p. 1167-1173, ISSN 1537-6591.

SPIGAGLIA, P., et al., 2002. Molecular Analysis od the Pathogenicity Locus and Polymorphism in the Putative Negative Regulator of Toxin Production (TcdC) among *Clostridium difficile* Clinical Isolates, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 40, 2002, no. 9, Septeember 2002, p. 3470-3475, ISSN: 0095-1137

SPIGAGLIA, P., MASTRATONIO, P., 2002. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of the toxin production (*Tcd*C) among *Clostridium difficile* clinical isolates, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 40, 2002, no. 9, p. 3470-3475, ISSN 0095-1137

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*, In: FEMS Microbioogy Letters*,* vol. 186, 2000, p. 307-312, ISSN 1574-6968

SUDOR, J., NOVOTNY, M., 1995. The mobility minima in pulsed-field capillary electrophoresis of large DNA, In: Nucleic Acids Research, vol. 23, 2005, no. 13, p. 2538-2543, ISSN 1362-4962

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2008. Metod molekulární biologie, Brno : Masarykova univerzita, 2008, 188 s., ISBN 978-80-210-3841-7

ŠTĚPÁN, J., et al., 2004. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci (Review). In: Folia microbiologica, vol. 49, 2004, no. 4, p. 353-386, ISSN 0015-5632

TENOVER, F. C., et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 32, 1994, no. 2, s. 407-415, ISSN 0095-1137

TERHES, G., URBÁN, E., SÓKI, J., SZIKRA, L., KONKOLY-THENGE, M., VOLLAIN, M., NAGY, E., 2009. Assessment of changes in the epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from diarrheal patients in Hungary. In: Anaerobe, vol. 15, 2009, no. 6, p. 237-240, ISSN 1075-9964.

VOTAVA, M. a i., 2000. Lékařská mikrobiologie II . – přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii, Brno : Masarykova univerzita, 2000, s. 179-181 ISBN 80-210-2272-8,

VOTAVA, M.; et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

VOTH, E. D., BALLARD, D. J., 2005. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disase, In: Clinical Microbiology Reviews, vol. 18, 2005, no. 2, p. 247-263, ISSN 0893-8512

WREN, B.W. et al., 1990. Identification of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains by Using a Toxin A Gene-Specific Probe, In: Journal of Clinical Microbiology, vol. 28, 1990, no. 8, p. 1808-1812, ISSN 0095-1137

ZÁVADOVÁ, M. 1986. Anaerobní bakterie a anaerobní infekce. Praha : Avicenum, 1986. 212 s.

Internetové zdroje:

1. http://www.hpl.sk/index.php?go=vysetrenia 02.07.2009
2. http://www.zuova.cz/informace/nrlpab15.php 03.07.2009
3. http://www.imuna.sk/sk/produkt.php?b=2&c=91 07.07.2009
4. http://www.ita-intertact.com/blob.php?produkty_soubory=71 25.08.2009
5. http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/ 26.08.2009
6. http://www.ucalgary.ca/~ngk/carbo/cdiff.html 27.08.2009
7. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0225&org=133&c=UK&lang=EN 28.08.2009
8. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0497&c=UK&lang=EN 28.08.2009
9. http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig18_4.jpg 28.08.2009

10. http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm 28.08.2009
11. http://jmm.sgmjournals.org/cgi/reprint/54/2/113.pdf 28.08.2009
12. http://www.zuova.cz/informace/pic/nrlpab15a.jpg 01.09.2008
13. http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html 01.09.2008
14. http://en.wikibooks.org/wiki/File:Indirect_ELISA_chem114a.jpg 03.09.2009
15. http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/images/PaLoc%20PCR%20in%20nontox.jpg 03.09.2009
16. http://cepacia.wz.cz/burkholderia/molekular.html 08.09.2009
17. http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/images/Figure%201.pdf 08.09.2009
18. http://www.mf.uni-b.si/mikro/tox/images/Table%203%20_12%2011%2007_.pdf 08.09.2009
19. http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/prednasky/Elektrofor%C3%A9za%20nukleov%C3%BDch%20kyselin.pdf 10.09.2009
20. www.natur.cuni.cz/~flegr/dokumenty/moltaxon.rtf 16.09.2009
21. http://www.cdc.gov/PULSENET/images/pfge_process.gif 16.09.2009
22. www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/ppt/anaeroby.ppt 08.02.2010

PRÍLOHA

Tab. 7: Zbierkové (referenčné) kmene *C. difficile*

Kmeň	A3	Typ restrikcie A3	B1	Typ restrikcie B1	Toxinotyp	Binárny toxín	Ribotyp
S 1	+	1	+	1	0	-	001
S 2	+	1	+	1	0	-	002
S 3	+	4	+	1	I	-	003
S 4	+	1	+	1	0	-	014
S 5	+	1	+	1	0	-	015
S 6	+	7	+	5	VIII	-	017
S 7	+	4	+	1	I	-	012
S 8	+	1	+	1	0	-	020
S 9	+	2	+	2	IV	+	023
S 10	+	2	+	4	III	+	027
S 11	+	1	+	1	0	-	029
S 12	+	1	+	1	0	-	046
S 13	+	1	+	1	0	-	053
S 14	+	1	+	6	XII	-	056
S 15	+	9	+	1	XIII	-	070
S 16	+	2	+	4	III	+	075
S 17	+	1	+	1	0	-	077
S 18	+	8	+	3	V	+	078
S 19	+	1	+	1	0	-	081
S 20							095
S 21	+	1	+	1	0	-	087
S 22	+	1	+	1	0	-	106
S 23							117
S 24							126
S 25							131