



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

Jan Horvat

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE IZ REČNIH
SEDIMENTOV**

Magistrsko delo

Maribor, julij 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

Jan Horvat

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE IZ REČNIH
SEDIMENTOV**

Magistrsko delo

Maribor, julij 2020

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IZ REČNIH SEDIMENTOV

Magistrsko delo

Študent: Jan Horvat
Študijski program: Univerzitetni študijski program
Biologija in ekologija z naravovarstvom
Mentorica: doc. dr. Sandra Janežič
Somentor: Aleksander Kocuvan
Lektorica: Mateja Rokavec, prof.
Creative Commons BY-NC-ND

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Maji Rupnik za priložnost, da sem lahko opravljal magistrsko nalogo na oddelku za Mikrobiološke raziskave Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano. Iskrena zahvala mentorici doc. dr. Sandri Janežič in somentorju Aleksandru Kocuvan za strokovne nasvete tekom raziskovalnega dela in za pomoč pri pisanju magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi ostali ekipi v laboratoriju za prijetno in sproščeno delovno okolje, v veliko veselje mi je bilo sodelovati z vami.

Zahvaljujem se Rebeki, da je verjela vame in me spodbujala pri pisanju naloge.

Iz srca se zahvaljujem svoji družini, staršema, Heleni in Zoranu, da sta mi stala ob strani in me podpirala skozi celoten študij.

Izolacija in karakterizacija bakterije *Clostridium difficile* iz rečnih sedimentov

Ključne besede: *Clostridioides difficile*, okoljski vzorci, PCR-ribotipizacija, toksinotipizacija

UDK:

Povzetek

Po Gramu pozitivna anaerobna bakterija *Clostridioides (Clostridium) difficile* je pogosta povzročiteljica bolnišničnih črevesnih okužb. V zadnjih letih se povečuje število okužb v domačem okolju pri populaciji, ki je bila v preteklosti prepoznana po nizkem tveganju za okužbo. Bakterija tvori odporne endospore, ki ji omogočajo preživetje zunaj gostitelja. Okolje predstavlja enega od možnih rezervoarjev *C. difficile*. Namen naše naloge je bil raziskati pogostnost bakterije *C. difficile* v rečnem sedimentu. Vzorčeno je bilo na treh lokacijah vzdolž reke Drave v jesenskem in zimskem letnem času. Skupno je bilo nabranih 6 vzorcev v duplikatih, prisotnost spor bakterije *C. difficile* je bila dokazana na vseh lokacijah in v vseh vzorcih. Iz vseh vzorcev je bilo osamljenih 335 izolatov *C. difficile*, ki so bili z metodo PCR-ribotipizacije uvrščeni v 26 različnih PCR-ribotipov. Prevladujoča PCR-ribotipa sta bila 001/072 (29,9 %) in 014/020 (15,5 %), ki sta oba toksigena in sta pogosto povzročitelja okužb pri hospitaliziranih bolnikih v bližnji bolnišnici ter v Sloveniji in v svetu nasploh. Skupno je zgolj 8 PCR-ribotipov pripadalo netoksigenim izolatom, kar predstavlja 30,8 % vseh izolatov. Naši rezultati kažejo, da je rečni sediment bogat rezervoar endospor *C. difficile* in zaradi visokega deleža toksigenih sevov lahko predstavlja vir okužbe z bakterijo *C. difficile*.

Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from river sediment

Keywords: *Clostridioides difficile*, environmental samples, PCR-ribotyping, toxinotyping

UDC:

Abstract

Gram-positive anaerobic bacterium Clostridioides (Clostridium) difficile is a common cause of nosocomial intestinal infections. In recent years, the number of community-acquired Clostridium difficile infection has been increasing, in a population that has been identified in the past for its low risk of infection. The bacterium forms resistant endospores that allow it to survive outside the host. The purpose of our task was to investigate the frequency of C. difficile in river sediment. We sampled at three locations along the river Drava in the autumn and winter seasons. A total of 6 samples were collected in duplicates, and the presence of C. difficile spores was demonstrated at all locations and in all samples. From all samples, 335 C. difficile isolates, which were classified into 26 different PCR ribotypes by the PCR-ribotyping method, were determined. The predominant PCR-ribotypes were 001/072 (29.9%) and 014/020 (15.5%), both of which are toxigenic and often cause infections in hospitalized patients in a nearby hospital, in Slovenia, as well as in the world in general. In total, only 8 PCR ribotypes belonged to non-toxigenic isolates, representing 30.8% of all isolates. Our results indicate that river sediment is a rich reservoir of C. difficile endospores and, due to the high proportion of toxic strains, may be a source of C. difficile infection.

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA DELA

Priloga 6 – IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA DELA

UNIVERZA V MARIBORU
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
(ime članice UM)

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE ZAKLJUČNEGA DELA

Ime in priimek študent-a/-ke: Jan Horvat

Študijski program: BIOLOGIJA IN EKOLOGIJA Z NARAVOVARSTVOM

Naslov zaključnega dela: Izolacija in karakterizacija bakterije Clostridium difficile iz rečnih sedimentov

Mentor: Sandra Janežič

Somentor: Aleksander Kocuvan

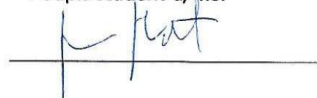
Podpisan-i/-a študent/-ka Jan Horvat

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentor-ja/-ice oz. somentor-ja/-ice;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM.

Uveljavljam permissivnejšo obliko licence Creative Commons: _____ (navedite obliko)

Datum in kraj: Maribor, 25.07.2020

Podpis študent-a/-ke:



KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 Namen raziskovalnega dela	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Bakterija <i>Clostridium difficile</i>	3
2.2 Okužbe povezane s <i>C. difficile</i>	4
2.3 Dejavniki tveganja okužbe s <i>C. difficile</i>	6
2.4 Dejavniki virulence	7
2.5 Tipizacijske metode	9
2.5.1 PCR-ribotipizacija	10
2.5.2 Toksinotipizacija	10
2.6 Epidemiologija	11
2.6.1 Okužbe v bolnišničnem okolju	11
2.6.2 Okužbe v domačem okolju	11
2.6.3 <i>C. difficile</i> pri živalih	12
2.6.4 <i>C. difficile</i> v hrani	13
2.6.5 <i>C. difficile</i> v okolju	13
2.6.6 <i>C. difficile</i> v rekah in sedimentih	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 Materiali	15
3.1.1 Laboratorijska oprema in pribor	15
3.1.2 Gojišča	16
3.1.3 Priprava pufrov in ostalih raztopin	17
3.2 Metode	20
3.2.1 Vzorčenje	21
3.2.2 Bogatitev in osamitev kultur <i>C. difficile</i>	22
3.2.3 Izolacija <i>C. difficile</i>	22
3.2.4 Osamitev DNA	23
3.2.5 Karakterizacija izolatov	23

3.2.5.1	Presejalna metoda PCR ribotipizacije - pomnoževanje medgenske regije 16S in 23S rRNA.....	24
3.2.5.2	Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR	25
3.2.5.3	PCR-ribotipizacija predstavnikov pridobljenih iz presejalne metode PCR	25
3.2.6	Toksinotipizacija	26
3.2.6.1	Multipla verižna reakcija s polimerazo za preverjanje prisotnosti gena za binarni toksin BtB in cdd3	27
3.2.6.2	Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje fragmentov A3 in B1.....	28
3.2.6.3	Restrikcija produktov PCR.....	30
3.2.6.4	Netoksigeni sevi.....	31
3.2.7	Shranjevanje izolatov <i>C. difficile</i>	32
4	REZULTATI	34
4.1	Izolacija <i>C. difficile</i> iz vzorcev sedimenta	34
4.2	Karakterizacija izolatov <i>C. difficile</i>	37
4.3	Genotipi in njihova razširjenost v Sloveniji	40
5	RAZPRAVA.....	42
5.1	Primerjava PCR-ribotipov po lokacijah vzorčenja	44
5.2	Diverziteteta ribotipov pri ljudeh in v okolju	45
5.3	Primerjava časov vzorčenja.....	46
5.4	Primerjava metod	47
6	SKLEPI.....	49
7	POVZETEK.....	50
VIRI IN LITERATURA.....		52
PRILOGA		61
	Priloga A: Dendrogram podobnosti profilov referenčnih sevov pridobljenih z metodo PCR-ribotipizacije, osamljenih iz vzorcev rečnih sedimentov.	61

KAZALO GRAFOV

Graf 4.1: Število izolatov <i>C. difficile</i> glede na lokacijo vzorčenja z združenimi podatki duplikatov A in B.....	36
Graf 4.2: Skupno število izolatov <i>C. difficile</i> glede na postopek obdelave.	36
Graf 4.3: Število izolatov <i>C. difficile</i> glede na postopek obdelave in lokacijo vzorčenja, pri čemer smo združili podatke iz obeh centrifugirk (A in B).....	37
Graf 4.4: Delež pojavljanja izolatov posameznih PCR-ribotipov. Deleži so izračunani glede na celotno število izolatov (n=335).	38

KAZALO SLIK

Slika 2.1: Shematski prikaz poteka okužbe s CDI.	6
Slika 2.2: Patogeni lokus (PaLoc) s štirimi različnimi reprezentativnimi toksinotipi.	9
Slika 3.1: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela.....	20

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1: Dejavniki tveganja za okužbo s <i>C. difficile</i>	7
Preglednica 3.1: Laboratorijska oprema, uporabljena pri naši raziskavi.	15
Preglednica 3.2: Laboratorijski pribor, uporabljen pri naši raziskavi.	16
Preglednica 3.3: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakcijah PCR.	19
Preglednica 3.4: Prikaz vzorčnih mest, datuma vzorčenja in oznake vzorcev.	21
Preglednica 3.5: Sestava reakcijske mešanice za PCR-ribotipizacijo.....	24
Preglednica 3.6: Program PCR za ribotipizacijo.....	25
Preglednica 3.7: Sestava reakcijske mešanice za PCR za pomnoževanje gena <i>cdd3</i> in <i>cdtB</i>	27
Preglednica 3.8: Program PCR za pomnoževanje gena <i>cdd3</i> in <i>cdtB</i>	28
Preglednica 3.9: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri pomnoževanju fragmentov A3 in B1.	29

Preglednica 3.10: Program PCR pri pomnoževanju fragmentov A3.	29
Preglednica 3.11: Program PCR pri pomnoževanju fragmentov B1.	30
Preglednica 3.12: Mešanica za encimsko restrikcijo fragmenta A3 z encimom EcoRI in fragmenta B1 z encimoma HincII in Accl.....	31
Preglednica 3.13: Sestava reakcijske mešanice PCR za dokazovanje netoksigenih sevov.	32
Preglednica 3.14: Program PCR za pomnoževanje 115 bp dolgega zaporedja, ki nadomešča regijo PaLoc.....	32
Preglednica 4.1: Pregled izolatov <i>C. difficile</i> in ostalih prisotnih vrst po času in lokaciji vzorčenja, pri čemer smo združili podatke duplikata A in B.35	
Preglednica 4.2: Pregled PCR-ribotipov glede na vzorčno mesto, čas vzorčenja in postopek osamitve. V tabeli so prikazani združeni podatki iz obeh duplikatov pri posameznem vzorcu.	39
Preglednica 4.3: Pregled PCR-ribotiov in njihovo pojavljanje v Sloveniji.	41

Uporabljeni simboli in kratice

bp – bazni par

BHIST – bogatitveno gojišče BHI z dodanim L-cisteinom, kvasnim ekstraktom in natrijevem tauroholatom

BSA – goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)

CA-CDI – okužba s *C. difficile* v domačem okolju (angl. Community-acquired *Clostridium difficile* infection)

CDI – okužba s *C. difficile* (angl. *Clostridium difficile* infection)

CDT – binarni toksin bakterije *Clostridium difficile*

ChromTM ID *C. difficile* – komercialno kromogeno gojišče, selektivno in diferencialno za *C. difficile*

COH – komercialno gojišče Columbia s 5 % konjsko krvjo

dH₂O – destilirana voda

ddH₂O – bidestilirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)

dNTP – deoksinukleotid

EDTA – etilendiamintetraoacetna kislina

ISR – medgenski prostor med genoma za 16S in rRNK in 23S rRNK (angl. Intergenic spacer region)

kb – kilobaza

kDa – kilodalton

LCT – družina velikih klostridijskih toksinov (angl. Large clostridial toxins)

MALDI-TOF – ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo ter analiza časa potovanja molekul (angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer)

MLST – tipizacija zaporedij multiplih lokusov (angl. multilocus sequence typing)

PaLoc – toksinski lokus (angl. pathogenicity locus)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)

PFGE – pulzna gelska elektroforeza (angl. Pulsed-field gel electrophoresis)

rDNA – ribosomalna deoksiribonukleinska kislina (angl. ribosomal deoxyribonucleic acid)
RFLP – restrikcijski polimorfizem pomnoženih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)

rRNK – ribosomalna ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid)

TAE – tris-acetatni-EDTA pufer

TBE – tris-boratni-EDTA pufer

TcdA – toksin A bakterije *Clostridium difficile*

TcdB – toksin B bakterije *Clostridium difficile*

TMA – tetrametil amonij

UDK – Univerzalna decimalna klasifikacija

1 UVOD

Clostridioides (Clostridium) difficile je po Gramu pozitivna, striktno anaerobna in patogena bakterija, ki povzroča črevesne okužbe pri ljudeh in živalih. Ob porušenju normalne črevesne mikrobiote se *C. difficile* prekomerno namnoži. Toksini, ki jih bakterija proizvaja, povzročijo nastanek bolezni. Večinoma povzročajo drisko pri hospitaliziranih bolnikih, ki prejemajo antibiotično terapijo. Znaki okužbe se kažejo kot driska, ki lahko vodi do zapletov, kot so psevdomembranozni kolitis, predrtje stene debelega črevesja in sepsa. Bolezen se lahko konča tudi s smrtjo (Smits in sod., 2016).

Okužba s *C. difficile* (CDI; angl. *C. difficile* infection) je bila v preteklosti prepoznana predvsem kot bolnišnična okužba. V zadnjih letih opažamo porast števila okužb pri ljudeh v domačem okolju. Obolevajo tudi ljudje, ki predhodno niso bili hospitalizirani in niso prejeli antibiotikov vsaj 3 mesece pred okužbo. V nedavni študiji odkrivajo, da se 20–27 % CDI pojavi v izvenbolnišničnem okolju (Ofori in sod., 2018).

Glavni rezervoar bakterije je anaerobno črevesje ljudi in živali. Tvori endospore, ki so zelo odporne in ji pomagajo preživeti v zunanem, aerobnem okolju. Zaradi tega so spore bakterije vseprisotne. Spore lahko najdemo v prsti, vodi (sladki in slani), čistilnih napravah, gospodinjskih prahu, peskovnikih, na podplatih čevljev in na pasjih šapah ter hrani (mesu in zelenjavi) (Rodriguez Diaz in sod., 2018; Janezic in sod., 2018). V raziskavi v Kanadi so *C. difficile* izolirali tudi iz vzorcev rečnih sedimentov (Xu in sod., 2014).

1.1 Namen raziskovalnega dela

Podatki o razširjenosti bakterije *C. difficile* v sedimentih so zanekrat še skopi. Namen magistrske naloge je bil osamitev in karakterizacija bakterije *C. difficile* iz vzorcev rečnih sedimentov, vzorčenih v jesenskem in zimskem času, na treh različnih lokacijah. Rezultati bodo doprinesli k razumevanju in poznavanju razširjenosti in raznolikosti bakterije *C. difficile* v rečnem okolju.

Delovne hipoteze:

1. Pričakujemo, da bo bakterija *C. difficile* prisotna v vzorcih rečnega sedimenta v velikem deležu > 50 %.
2. Pričakujemo, da bomo v posameznem vzorcu našli različne PCR-ribotipe bakterije *C. difficile*.
3. Pričakujemo, da se bodo PCR-ribotipi razlikovali glede na čas in mesto vzorčenja.
4. Pričakujemo, da bodo nekateri PCR-ribotipi iz rečnega sedimenta enaki tistim, ki jih najdemo pri ljudeh in živalih v Sloveniji.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Bakterija *Clostridium difficile*

C. difficile je striktno anaerobna, po Gramu pozitivna, paličasta, sporogena bakterija. Bakterijo sta prvič opisala Hall in O'Toole leta 1935, poimenovala sta jo *Bacillus difficilis*. Odkrila sta jo med proučevanjem bakterijske sestave črevesja pri novorojenčkih. Prvotno ime, ki sta ga podala Hall in O'Toole, odraža težavnost pri izolaciji *C. difficile* v primerjavi z ostalimi anaerobnimi in fakultativno anaerobnimi bakterijskimi vrstami, prisotnimi v vzorcu fecesa. *C. difficile* ima počasno rast (generacijski čas je med 40 in 70 minut) in je striktno anaerobna. Raste tako v tekočih kot na trdnih gojiščih z optimalno rastjo med 30 in 37 °C. Hall in O'Toole sta ugotovila, da brezcelični supernatant tekočega gojišča s *C. difficile* izkazuje toksični učinek na testne živali, kar definira biološko aktivnost bakterijskih citotoksinov. Sprva je bakterija veljala kot del naravne črevesne mikrobiote, šele v sedemdesetih letih so *C. difficile* prvič povezali s psevdomembranoznim kolitisom, ki se je pojavil kot posledica antibiotične terapije (Daniels in Kufel, 2018; Mada in Alam, 2019).

Selektivna gojišča, s katerimi izoliramo *C. difficile* iz različnih mikrobno bogatih okolij (prst, blato ...), temeljijo na intrizični rezistenci *C. difficile* na antibiotika cefoksitin in cikloserin in sposobnosti *C. difficile*, da za vir ogljika uporabi fruktozo in manitol. Natrijev tauroholat je vitalen za uspešno germinacijo endospor in je esencialna komponenta v gojiščih. Ko je bakterija enkrat izolirana v čisti kulturi, jo lahko nadalje gojimo na kompleksnih gojiščih, kot je na primer krvni agar (Eckert in sod., 2012; Foster in Riley, 2012).

Posamezna celica te bakterije zraste v dolžino 3,0–16,9 µm, v širino pa 0,5–1,9 µm, ima značilno peritriho običkanost in tvori endospore, ki ležijo subterminalno. Kolonije *C. difficile* močno variirajo v velikosti. Maksimalno zrastejo v premeru od 12 do 15 mm,

kolonije fluorescirajo pod ultrazvočno svetlobo in imajo značilen vonj po konjskih iztrebkih (Burnham in Carroll, 2012; Curry, 2010).

Fenotipske lastnosti izvirajo iz sposobnosti organizma, da fermentira tirozin v p-krezol, fenolno substanco, zaradi katere ima ta vrsta znatno toleranco. Prav tako lahko na podlagi te molekule s pomočjo tekočinske kromatografije ločimo to vrsto od drugih iz rodu *Clostridium*. Za identifikacijo se najpogosteje uporablja metoda, ki je danes rutinska metoda za identifikacijo številnih bakterij – to je ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo ter analiza časa potovanja molekul (MALDI-TOF; angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer) (Passmore in sod., 2018, Smits in sod., 2016).

Bakterija *C. difficile* je bila nedavno premeščena v nov rod *Clostridioides*. Lawson in sodelavci so premestitev predlagali na podlagi filogenetskih analiz sekvenc 16S rRNA, vendar sta v veljavi še vedno obe imeni, tako *Clostridioides difficile* kot tudi *Clostridium difficile* (Lawson in sod., 2016).

2.2 Okužbe povezane s *C. difficile*

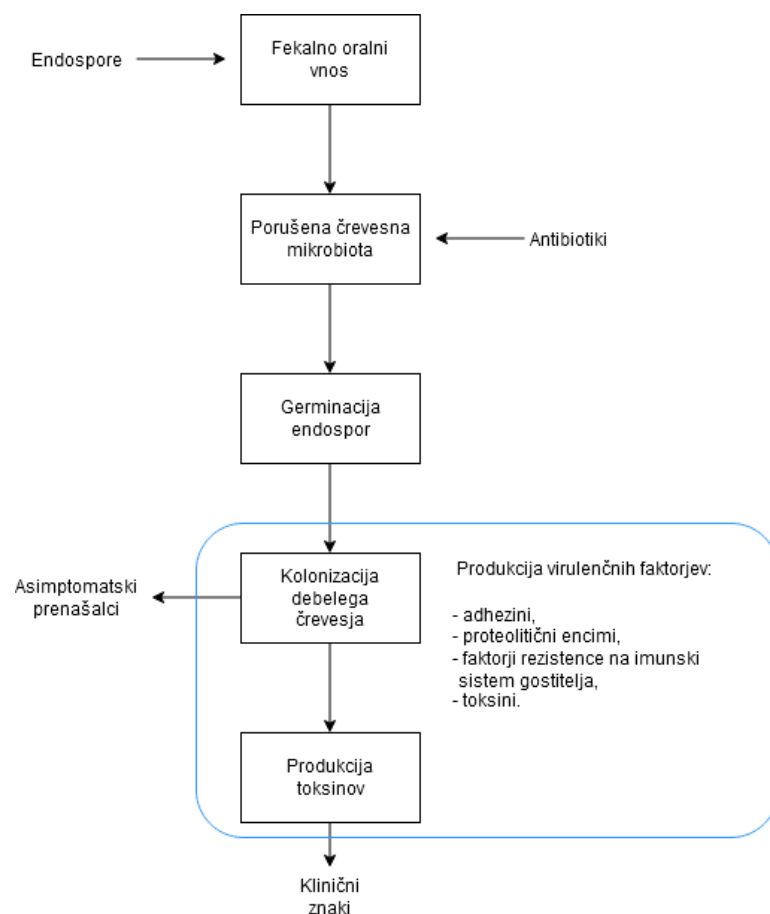
Okužba s *C. difficile* je prepoznana kot vodilni vzrok bolnišnične driske in vedno bolj povezana z izvenbolnišničnimi primeri driske in kolitisa. *C. difficile* se prenaša po fekalno oralni poti. Pri 1 do 3 % zdravih odraslih se *C. difficile* pojavlja v črevesju kot del normalne črevesne mikrobiote (Kuiper in sod., 2017; Kliegman in sod. 2007).

Spore *C. difficile* so dormantne celice, ki so zelo obstojne na okoljske dejavnike kot tudi na nekatera dezinfekcijska sredstva in številna antimikrobna sredstva. Spore bakteriji omogočijo preživetje v aerobnem okolju in v kislem okolju želodca. Ko spore bakterije *C. difficile* v črevesju ob anoksičnih pogojih germinirajo, tvorijo dva eksotoksina (toksin A in toksin B), ki delujeta citotoksično na epiteljske celice debelega črevesa. Uporaba antibiotikov je eden vodilnih dejavnikov tveganja za CDI, saj se poruši črevesna

mikrobiota, ki štiti pred kolonizacijo črevesja in to omogoči bakteriji *C. difficile* lažjo razrast, ko vstopi v črevesje gostitelja (Slika 2.1) (Mullish in Williams, 2018).

Zelo pomembno je, da ločimo med asimptomatsko kolonizacijo in simptomatsko CDI. Posamezne osebe, ki so kolonizirane z bakterijo, ne kažejo znakov okužbe, vendar so potencialni prenašalci bolezni zlasti v zdravstvenih okoljih. Simptomi se začnejo s preprosto iritacijo mukusa in vodeno drisko ter lahko vodijo do pseudomembranoznega kolitisa – gre za akutno vnetno bolezen debelega črevesja, kjer se formirajo plaki na stenah debelega črevesja. Plaki sestojijo iz levkocitov in imajo značilno rumenkasto barvo. Pseudomembranozni kolitis je pogosto ozdravljen, vendar lahko pride do zapletov, pogosto je potrebno kirurško posredovanje (Kazanowski in sod., 2013; Ofosu, 2016).

Med ostale simptome okužbe prištevamo višjo frekvenco izločanja blata do 10 × na dan, predvsem pri starejših pacientih pogosto pride do zapletov. Simptomi se lahko poslabšajo, nastopi lahko toksični megakolon ter perforacija črevesja, ki jo spremlja sepsa. Bolezen se v tem primeru lahko konča s smrtnim izidom (Ofosu, 2016).



Slika 2.1: Shematski prikaz poteka okužbe s CDI (prirejeno po Mada in Amam, 2019).

2.3 Dejavniki tveganja okužbe s *C. difficile*

Eden najpomembnejših dejavnikov tveganja za okužbo s *C. difficile* je antibiotična terapija, še posebej antibiotiki širokega spektra, ki porušijo sestavo črevesne mikrobiote, ki med drugim ščiti pred kolonizacijo s patogenimi bakterijami (Eze in sod., 2017; Guh in sod., 2017).

Bolezenska stanja, kot so peptična razjeda (ulkus) in gastroezofagealna refluksna bolezen, so povezana z želodčno kislino. Te bolezni se pretežno zdravijo z zaviralci protonske črpalke (PPI) in blokerji receptorja H2 (H2RAs). Meta-analiza je dokazala signifikantno povezavo med temi zdravili in okužbo s *C. difficile*. Pacienti, ki uporabljajo ta zdravila, imajo tako višjo možnost, da se okužijo s *C. difficile* (Tariq in sod., 2017).

Za okužbe s *C. difficile* so bolj dovzetni starejši od 65 let, razlog temu je najverjetneje oslabil imunski sistem, zmanjšana biodiverziteteta črevesnega mikrobioma in pogostejši obisk bolnišnic (Preglednica 2.1) (Mullish in Williams, 2018; Revolinski in Munoz-Price, 2018).

Preglednica 2.1: Dejavniki tveganja za okužbo s *C. difficile* (Mullish in Williams, 2018; Revolinski in Munoz-Price, 2018).

Antibiotično zdravljenje	Skoraj vsi antibiotiki povečajo dovzetnost za CDI. Cefalosporini, fluorokinoloni, klindamicin in določeni penicilini (amoksiklav), predstavljajo skupino antibiotikov z največjim tveganjem.
Zdravila, ki zavirajo nastajanje želodčne kisline	Zaviralci protonske črpalke (PPI) in zaviralci receptorjev H ₂ povečajo tveganje za CDI.
Starost	Verjetnost za okužbo se poveča za desetkrat pri starejših od 65 let v primerjavi z mlajšo populacijo.
Hospitalizacija	Nedavna hospitalizacija in hospitalizacija, ki je daljša od 7 dni, poveča tveganje za okužbo.
Imunosupresija	Hematološki in onkološki bolniki imajo visoko pojavnost CDI (6–33 %), posebej dovzetni za CDI so tudi pacienti s HIV (do 40 %).

2.4 Dejavniki virulence

Glavna dejavnika virulence bakterije *C. difficile* sta dva toksina; toksin A (TcdA, 308,0 kDa) in toksin B (TcdB, 269,6 kDa), ki pripadata družini velikih klostridijskih toksinov (LCT; angl. Large clostridial toxins) in delujeta enterotoksično in citotoksično. Toksina kodirata gena *tcdA* in *tcdB*, ki ležita na 19,6 kb regiji, poznani kot toksinski lokus (PaLoc; angl. Pathogenicity locus) (Janoir, 2016; Pruitt in Lacy, 2012).

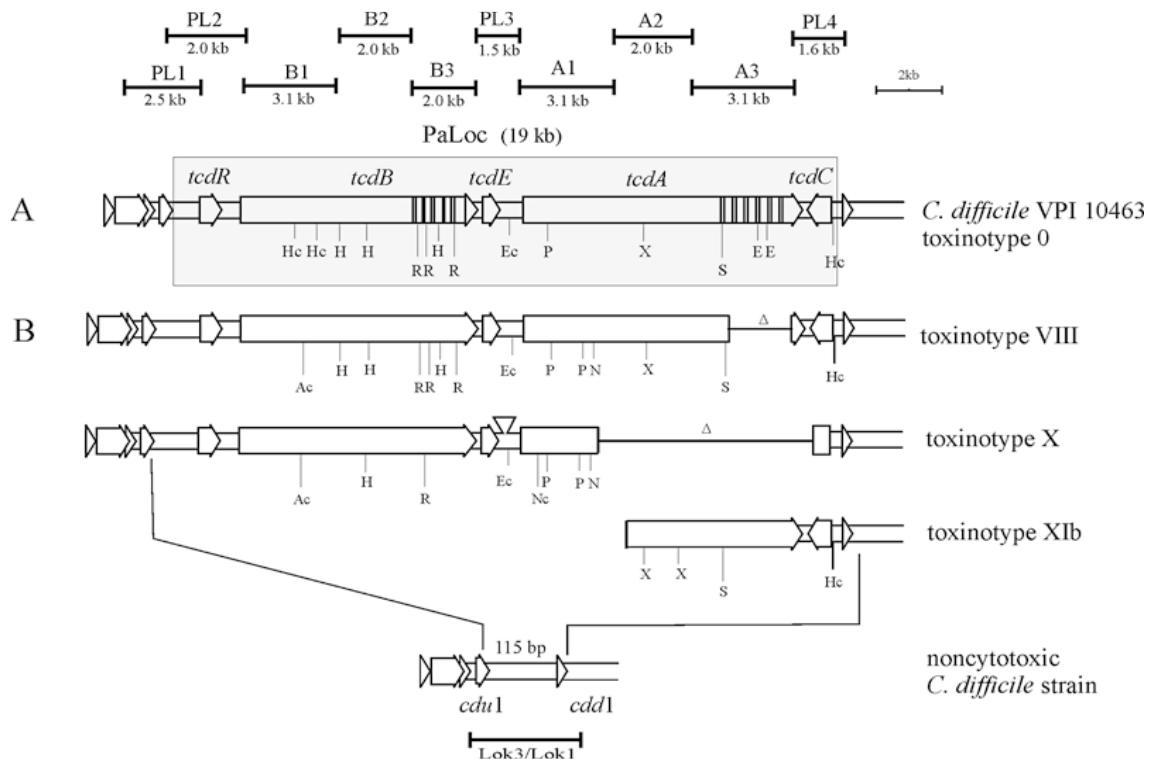
Toksin deluje s transferjem glukoze iz UDP-glukoze na številne gostiteljeve proteine, še posebej na Rho GTPazo družino proteinov. Rho GTPaze igrajo pomembno vlogo pri regulaciji dinamike aktinskih filamentov v citoskeletu celice. Kovalentna sprememba Rho

GTPaz, ki je posledica transferja glukoze, inaktivira te proteine, kar vodi v porušenje citoskeleta celice, izgube tesnih stikov med celicami in apoptoze celic. Toksini povzročajo tudi sproščanje različnih vnetnih mediatorjev iz epitelijskega črevesja, kot so makrofagi in mastociti. Ti citokinini vplivajo na senzorne in enterične nevrone in promovirajo dotok vnetnih celic, kar povzroča sekrecijo tekočine in vnetni odziv (Awad in sod., 2014; Di Bella in sod., 2016; Smits in sod., 2016).

Nekateri sevi *C. difficile* producirajo tretji toksin, binarni toksin CDT. Ta toksin je aktin-specifična ADP-riboziltransferaza, ki povzroča depolimerizacijo aktinskih filamentov v citoskeletu (McGovern in sod., 2017).

Produkcija binarnega toksina, skupaj s TcdA in TcdB je povezana z višjo smrtnostjo in višjo možnostjo za ponovne okužbe. V zadnjih desetih letih se je povišalo število sevov, ki so sposobni tvoriti binarni toksin, kar se prekriva z višjo incidenco in resnostjo okužb s *C. difficile* (McGovern in sod., 2017).

Seve *C. difficile*, ki nimajo toksinskega lokusa, prištevamo med netoksogene seve, ki ne povzročajo bolezni. Pri teh je toksinski lokus nadomeščen s 115-bp dolgo nekodirajočo sekvenco (Slika 2.2) (Rupnik, 2010).



Slika 2.2: Patogeni lokus (PaLoc) s štirimi različnimi reprezentativnimi toksinotipi (Rupnik, 2010).

2.5 Tipizacijske metode

S tipizacijskimi metodami določamo sorodnost izolatov (van Belkum in sod., 2007). Danes so v uporabi predvsem genotipske tipizacijske metode, s katerimi odkrivamo spremembe na nivoju bakterijskega genoma. Uporabljene metode so PCR-ribotipizacija, toksinotipizacija, pulzna gelska elektroforeza, tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST; angl. multilocus sequence typing) (Huber in sod., 2013).

Emele in sodelavci so kot alternativo pogosto uporabljeni PCR ribotipizaciji in tipizaciji zaporednih multiplih lokusov predstavili metodo proteotipizacije, ki deluje z uporabo MALDI-TOF, ki omogoča natančno razlikovanje sevov na podlagi specifičnih biomarkerjev. Ta metoda je natančna in poceni ter hitrejša od PCR-ribotipizacije, kar omogoča hitrejšo identifikacijo hipervirulentnih sevov, ki se v zadnjem desetletju razširjajo po svetu in povzročajo izbruhe (Emele in sod., 2019).

2.5.1 PCR-ribotipizacija

PCR-ribotipizacija nam omogoča razlikovanje sevov na podlagi analize medgenskega prostora med 16S in 23S rDNA. Metoda je relativno hitra, enostavna in ponovljiva. Do danes je znanih že več kot 800 različnih PCR-ribotipov. Pri PCR-ribotipizaciji z metodo PCR pomnožimo medgenski prostor (ISR; angl. Intergenic spacer region) z uporabo dveh začetnih oligonukleotidov. Prvi se veže na 3' konec gena za 16S rRNK, drugi pa na 5' konec gena za 23S rRNK. Variabilnost medgenskega prostora posreduje več kopij operona rRNK, prisotnih v genomu *C. difficile* in razlike v dolžini medgenske regije. S pomoževanjem teh regij dobimo vzorec fragmentov (200-700 bp), ki je edinstven in pripada specifičnemu PCR-ribotipu. Z ločitvijo pomnoženih medgenskih regij z uporabo gelske elektroforeze lahko na podlagi razlik v dolžinah fragmentov seve razvrstimo v različne PCR-ribotipe. Ribotipe označujemo z arabskimi številkami (001, 002, 003 ...) ali internimi oznakami, če izolatov referenčnih PCR ribotipov nimamo v laboratoriju (Janezic, 2014).

Janezic in sodelavci (2011) so predstavili metodo direktne PCR-ribotipizacije iz vzorcev blata, ki nam poda rezultate v nekaj urah v primerjavi s standardno PCR-ribotipizacijo, kjer so rezultati vidni po najmanj treh dneh. Opisali so nov par začetnih oligonukleotidov na podlagi sekvenc ISR 29 različnih PCR ribotipov. Ti začetni oligonukleotidi izkazujejo višjo specifičnost za *C. difficile* in so lahko uporabljeni za tipizacijo direktno iz vzorcev blata, s čimer se izognemo kultivaciji.

2.5.2 Toksinotipizacija

Toksinotipizacija temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo in polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov (PCR-RFLP; angl. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) toksinskega lokusa (PaLoc). Seve razdelimo v toksinotipe, pri čemer je toksinotip skupina sevov, ki ima identične spremembe v regiji, ki kodira toksin A in toksin B. Sevi, ki so podobni referenčnemu sevu, so definirani kot toksinotip 0. Sevi, ki se razlikujejo v genih *tcdA* in *tcdB*, so razvrščeni v 34 toksinotipov,

označenih z rimskimi številkami (I do XXXIV). Spremembe v toksinskih genih *tcdA* in *tcdB* so predvsem posledica delecij, ki so pogostejše v *tcdA* in točkovnih mutacij, ki so pogostejše v *tcdB* (Rupnik in Janezic, 2015).

Najbolj variabilna fragmenta sta B1 (del, ki kodira katalitično domeno Toksina B) in A3 (del, ki kodira vezavno domeno Toksina A), zato pri toksinotipizaciji pomnožujemo samo ta dva fragmenta. Pomnožek PCR nato še režemo z restrikcijskimi encimi. Dobljen profil fragmentov na gelu primerjamo z referenčnimi toksinotipi in tako izolat uvrstimo v toksinotip (Rupnik, 2010).

2.6 Epidemiologija

2.6.1 Okužbe v bolnišničnem okolju

Okužba s CDI predstavlja najpogostejšo čreveno bolnišnično okužbo. Raziskava Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) je v letih 2011 in 2012 ocenila, da vsako leto v Evropski uniji razvije bolnišnično okužbo s *C. difficile* približno 124 000 bolnikov. Pogoste so ponovitve okužb, pri 20–30 % bolnikih (ECDC, 2018; Smits in sod., 2016).

2.6.2 Okužbe v domačem okolju

Izraz okužba v domačem okolju s *C. difficile* (CA-CDI; angl. Community-acquired *Clostridium difficile* infection) uporabljamo, kadar se simptomi pri bolniku pojavijo po manj kot 48 urah od sprejema v bolnišnico ali pri posameznikih, ki niso bili 12 tednov predhodno hospitalizirani (Khanna in Gupta, 2014). Okužba s *C. difficile* v domačem okolju je bila prvič opisala leta 1984 pri pacientih, ki so prejeli antibiotike, vendar niso bili hospitalizirani (Stergachis in sod., 1984). V zadnjih letih se povečuje število okužb v domačem okolju. Pacienti s CA-CDI so v primerjavi z bolnišnično CDI mlajši; mediana starosti pri CA-CDI je 50 let, v primerjavi z 72 leti pri bolnišničnih okužbah. Raziskave iz Severne Amerike in Evrope ocenjujejo, da se 20–27 % vseh okužb s *C. difficile* pojavi v

domačem okolju. Približno 40 % vseh primerov CA-CDI, ki zahtevajo bolnišnično zdravljenje, je bilo povezanih s hipervirulentnima ribotimoma 027 in 078 (Ofori in sod., 2018; Khanna in Gupta, 2014).

2.6.3 *C. difficile* pri živalih

Prvi opis *C. difficile* pri živalih sega v leto 1960. Osamili so jo pri tjujnju vrste *Leptonychotes weddellii*, kjer so jo izolirali iz vsebine debelega črevesja (Levett, 1986). Od leta 1984 do 1987 so tri študije potrdile, da bakterija povzroča črevesne okužbe in drisko pri zajcih in konjih. Na podlagi tega so sklepali, da bi lahko bile domače živali vektor za prenos okužbe na ljudi. Nadaljnje študije so potrdile prisotnost *C. difficile* pri številnih sesalcih – pri rejnih, divjih, eksotičnih in domačih živalih, vendar večina izolatov ni bila citotoksičnih (Moono in sod., 2016).

Rodriguez in sodelavci (2013) so izpostavili, da hišni ljubljenci predstavljajo rezervoar bakterije *C. difficile*. Danes so psi in mačke pogosto del družine in imajo dostop do hiše, vključno s kuhinjo, jedilnico in posteljo. Prav tako imajo bližnje kontakte z ljubljenci otroci mlajši od 16 let, pri čemer si zgolj 2,9–4,4 % otrok po vsakem kontaktu z ljubljenci umije roke. Weese in sodelavci (2010) so odkrili, da ima 10 % psov bakterijo v črevesju, prav tako se je izkazalo, da je 31 % gospodinjstev kontaminiranih s spori *C. difficile*. V tem okolju imajo otroci, starejši in ljudje z oslabljenim imunskim sistemom višjo možnost za kolonizacijo in okužbo. Odkrili so tudi, da je 58 % terapevtskih psov, ki obiskujejo bolnišnice, koloniziranih s *C. difficile*. Tveganje za prenos okužbe s psa na pacienta je tako relativno visoko, saj imajo pogosto pacienti tesne stike s psi. Več raziskav je dokazalo, da so domače živali in ljudje pogosto okuženi z enakimi sevi, kar lahko nakazuje na zoonotski prenos (Rodriguez in sod., 2016).

Ribotip 014/020, ki je eden izmed najpogostejših povzročiteljev okužb v Evropi, je prisoten v črevesju številnih vrst sesalcev. Silva in sodelavci (2015) so potrdili ta sev pri psih, prašičih in konjih. Možnost zoonotičnega prenosa bakterije s prašičev na ljudi je potrdila tudi filogenetska raziskava, kjer so primerjali celotne genome prašičjih in

človeških sevov in dokazali, da so si sevi genetsko sorodni (Knight in sod, 2017).

Študija Pasquale in sodelavcev (2011) je potrdila prisotnost *C. difficile* tudi v morskem okolju. *C. difficile* so izolirali v 42,9 % vzorcev, v največji meri so bili izolati prisotni v lupinarjih in živalskem planktonu. Identificirali so šest PCR- ribotipov (003, 009, 005, 010, 056 in 066), večina izolatov je tvorila Toksin A in Toksin B.

2.6.4 *C. difficile* v hrani

Bakterija *C. difficile* je prisotna v črevesju rejnih živali, zato so študije že pred več kot 30 leti predvidevale, da lahko vir okužb predstavlja meso in mesni izdelki (Gurian in sod., 1982; Borriello in sod., 1983). Študija iz Kanade poroča, da je 12 % govedine in svinjine kontaminirane s *C. difficile*. Večina izolatov je bila toksigenih, pripadali pa so PCR ribotipom, ki se pojavljajo tudi pri ljudeh (Weese in sod., 2010). Hawken in sodelavci so vzorčili v prašičji klavnici in potrdili *C. difficile* v prostorih klavnice, kar nakazuje možnost navzkrižne kontaminacije (angl. Cross-contamination) (Hawken in sod., 2013). Možen je tudi prenos spor iz prebavnega trakta živali v mišičje (Rupnik in Songer, 2010).

C. difficile so zaznali tudi na neoprani surovi zelenjavi. Bakterijo so potrdili na kumarah, gobah, korenčku, krompirju in čebuli. Vzrok temu je bodisi kontaminacija preko živalskih iztrebkov ali povezava z okoljskimi sevi iz prsti (Al Saif in Brazier, 1996). Študija Tkalec in sodelavcev poroča o prisotnosti *C. difficile* na 18,2 % zelenjave, najpogosteje pa je bila bakterija prisotna na površini krompirja (28 %). Na površini zelenjave so skupno identificirali 25 različnih PCR-ribotipov, 10 ribotipov je bilo toksigenih. Najpogosteje se je pojavljal ribotip 014/020 (Tkalec in sod., 2018).

2.6.5 *C. difficile* v okolju

Glavni rezervoar bakterije predstavlja črevesje mladih ljudi in ostalih sesalcev, vendar bakterija lahko preživi tudi izven gostitelja. Preživetje v različnih okoljih ji omogoča tvorba obstojnih endospor. Problem predstavlja bolnišnično okolje, kjer kontaminirane

sobne površine in bolnišnična oprema predstavljajo pomembno vlogo pri prenosu *C. difficile* na paciente (Weber in sod., 2013).

Janezic in sodelavci (2016) so preučevali vzorce prsti in poplavne vode. Prisotnost *C. difficile* so potrdili pri 36,7 % vzorcev prsti in 14,4 % poplavnih vod. Okoljski izolati so izkazovali rezistenco na antibiotike, podobno kot sevi, izolirani iz črevesja ljudi in živali. Našli so 34 različnih PCR-ribotipov, več kot polovico jih lahko najdemo tudi pri ljudeh. Med drugim so potrdili tudi PCR-ribotip 014/020 in 010 (netoksigen).

V študiji iz Avstralije so *C. difficile* izolirali v 60,4 % vzorcev prsti, trave in peska v neposrednem okolju bolnišnic in v bolnišničnih parkih, 29,5 % vseh izolatov je bilo toksigenih. Najpogosteje sta bila zastopana ribotipa 014/020 (14,3 %) in 010 (13,4 %) (Perumalsamy in sod., 2019).

2.6.6 *C. difficile* v rekah in sedimentih

Raziskava Al Saif in Bazier je bila ena izmed prvih, ki je proučevala pojavnost *C. difficile* v okolju, *C. difficile* so potrdili v 87,5 % vzorcev rečne vode (Al Saif in Bazier, 1996). *C. difficile* so našli tudi v 17 od 25 testiranih slovenskih rek (Zidaric in sod., 2010). Več kot polovico ribotipov, ki se pojavljajo v rečni vodi, najdemo tudi pri ljudeh in živalih. To nakazuje, da so rečne vode potencialni vir okužb s *C. difficile*. Hargreaves in sodelavci (2013) so vzorčili sediment v estuarijih rek na različnih lokacijah, *C. difficile* pa so našli v 60 % vzorcev. Najpogostejšasta bila PCR-ribotipa 010 in 001.

Ker skoraj ni objav o prisotnosti spor bakterije *C. difficile* v rečnih sedimentih v Sloveniji in v svetu, je bil namen te magistrske naloge izolacija in karakterizacije bakterije *C. difficile* iz sedimentov reke Drave.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Laboratorijska oprema in pribor

V Preglednici 3.1 in 3.2 so predstavljeni laboratorijska oprema in pribor, ki smo ga uporabljali pri raziskovalnem delu v laboratoriju in na terenu.

Preglednica 3.1: Laboratorijska oprema, uporabljena pri naši raziskavi.

Oprema	Model/proizvajalec
Anaerobna komora	Whitley A35, Don Whitley Scientific Limited
Avtomatska pipeta, 0,5–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl	Eppendorf
Vodna kopel	WiseBath WB 11, Wisd
Laboratorijska tehnica	Kern ewb, Sysmatec
Ciklični termostat	T3000, Biometra
Komercialni set za identifikacijo	MALDI Biotyper, Bruker Daltonics
Magnetno mešalo Rotamix SHP-10	Tehnica
Centrifuga Mini spin plus	Eppendorf
Centrifuga Allegra 25R	Beckman Coulter
Komora za pripravo vzorcev za reakcijo PCR, Telstar Mini-V	BioStar
Digestorij	HeraSafe KSP
Biološka varnostna komora, MC 12-3	Iskra Pio
Mikrovalovna pečica	Privileg 8020E
Sonikator BS 14.2	BANDELIN electronic
Avtoklav	Kambič
Naprava za UV slikanje gela	Syngen
Zamrzovalniki (4 °C, -20 °C, -80 °C)	Različni proizvajalci
Inkubator	Binder
Naprava za elektroforezo	Bio-Rad, Biometra

Preglednica 3.2: Laboratorijski pribor, uporabljen pri naši raziskavi.

Laboratorijski pribor	Model/proizvajalec
Sterilne centrifugirke (50 ml)	Sarstedt
Lopatka za vzorčenje	Burkle GmbH
Plinski gorilnik	/
Steklovina (čaše, erlenmajerice, merilni valji)	Različni proizvajalci
Rokavice	Kimberly Clark
Kovinske žličke	/
Cepilne zanke	Golias
Nastavki za pipete	StarLab

3.1.2 Gojišča

Za gojenje bakterije *C. difficile* smo uporabili reducirano bogatitveno gojišče BHIST s polovičnim volumnom dH₂O, kot je zapisano v navodilih (2 × BHIST) ter dve komercialni gojišči CHROMID™ *C. difficile* (bioMerieux, Francija) in gojišče COH oziroma krvni agar (bioMerieux, Francija).

Koncentrirano selektivno bogatitveno gojišče BHIST s suplementom (2 × BHIST)

Za pripravo tekočega gojišča smo natehtali 18,5 g gojišča Brain heart infusion broth (Biolife), 2,5 g kvasnega ekstrakta (BD), 0,5 g L-cisteina (Merck) in 0,5 g natrijevega tauroholata (Roth). V čašo smo dodali še 200 ml dH₂O in sestavine dobro premešali. Raztopino smo nato prelili v merilni valj in dopolnili z dH₂O do 250 ml in gojišče avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo gojišču dodali suplement SR 0096E (*Clostridium difficile* selective supplement z 8 mg/l cefoksitina in 250 mg/l D-cikloserina, Oxoid), ki smo ga predhodno raztopili v 2 ml sterilne destilirane vode in gojišče hranili v hladilniku pri 4 °C.

Kromogeno, selektivno in diferencialno gojišče CHROMID™ *C. DIFFICILE*

Komercialno gojišče vsebuje tauroholat in ostale kromogene substrate, ki omogočajo izolacijo in identifikacijo bakterije *C. difficile*. Antibiotiki, prisotni v tem gojišču, zavirajo

rast večini po Gramu pozitivnih bakterij, kolonije *C. difficile* pa se na tem gojišču obarvajo črno. Proizvaja ga podjetje bioMérieux (Francija).

Gojišče COH (krvni agar)

Trdno komercialano gojišče s 5 % konjsko krvjo. Proizvaja ga podjetje bioMérieux.

3.1.3 Priprava pufrov in ostalih raztopin

Pufre in ostale raztopine smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali potrebne količine suhih snovi oziroma kemikalij in dodali polovico končnega volumna destilirane vode. Snovi smo povsem raztopili, prelili v merilni valj in z destilirano vodo dopolnili do končnega volumna. Kadar so bile potrebne meritve pH, smo to storili preden smo dolili destilirano vodo do končnega volumna.

1. PUFER TBE 5 ×

Baza tris (Roth)	54,0 g
Borova kislina (Sigma)	27,5 g
0,5 M EDTA (pH= 8,0)	20,0 ml
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml

Pufer TBE smo v založni koncentraciji (5 ×) hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. pred uporabo smo založni pufer redčili 10 × z destilirano vodo in tako pripravili delovno koncentracijo 0,5 × TBE.

2. PUFER 50 × TAE

Baza tris (Roth)	121,0 g
Ocetna kislina (Sigma)	51,1 g
0,5 M EDTA (pH= 8,0)	50,0 ml
dH ₂ O	dopolnimo do 500 ml pH med 7,5 in 8,0

Založno raztopino pufera TAE smo hranili v hladilniku (4 °C). Za uporabo smo založni pufer

redčili 50 × z destilirano vodo in tako pripravili delovno koncentracijo 1 × TAE.

3. 0,5 M EDTA; pH = 8

Za pripravo raztopine 0,5 M EDTA smo zatehtali 93,6 g EDTA in dopolnili s dH₂O do 500 ml. Z 10 M NaOH smo uravnali pH do 8,0, avtoklavirali in hranili na sobni temperaturi.

4. Delovna raztopina standardnega označevalca velikosti DNA

Za pripravo delovne raztopine markerja smo v 1,5 µl mikrocentrifugirko odpipetirali 10 µl založne raztopine 2-log DNA Ladder (0,1–10,0 kb) (New England Biolabs) ali 100 bp DNA Ladder (TriDye™ 100 bp DNA Ladder), 30 µl 6 × nanašalnega pufra in 60 µl ddH₂O. Delovno raztopino smo hranili v hladilniku (4 °C).

5. 5 % vodna raztopina »Chelex«

»Chelex-100 resin« (Bio-Rad)	0,25 g
dH ₂ O	5 ml

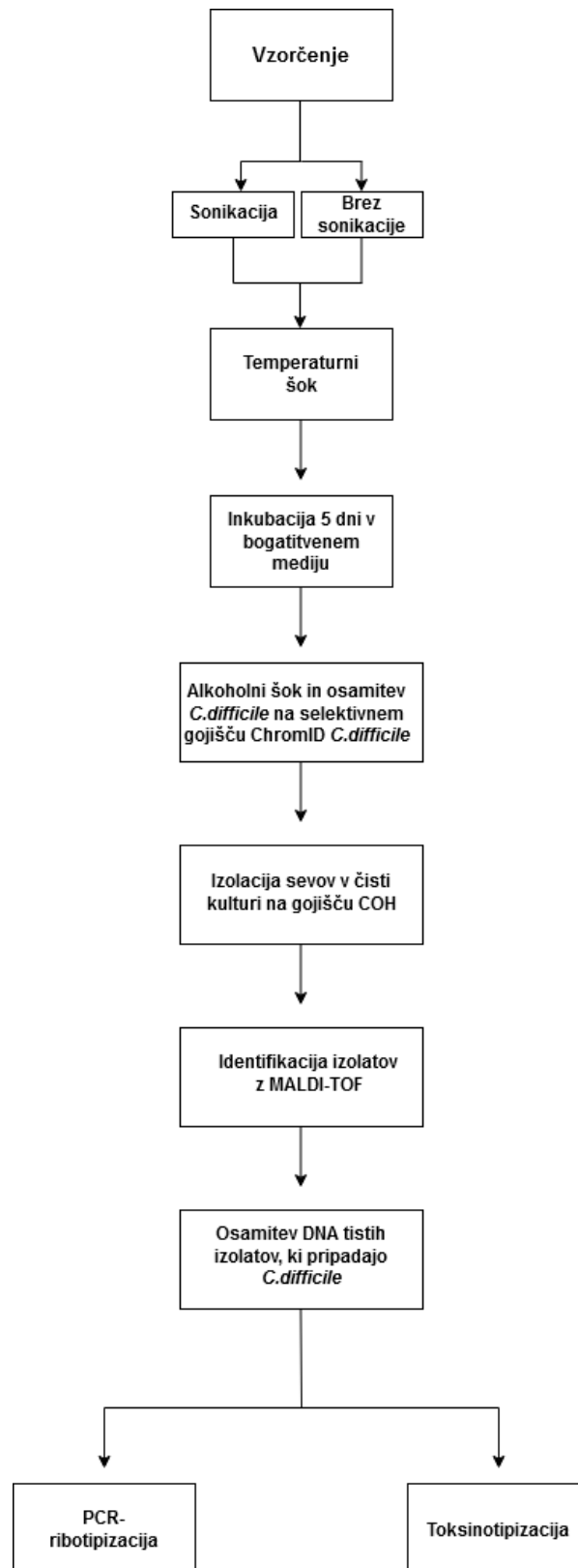
Raztopino »Chelex« smo hranili v hladilniku (4 °C) do največ 5 dni.

Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakcijah PCR

Preglednica 3.3: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakcijah PCR.

Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje ZO	Vir
16S Ribo	5'-GCTGGATCACCTCCTTCTAAG-3'	Janezic in sod., 2011
23S Ribo	5'-TGACCAGTTAAAAAGGTTTGATAGATT-3'	
Tim6 Struppi6	5' TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA-3' 5'-GGCTATTACACGTAATCCAGATA-3'	Braun in sod., 1996
cdtBpos	5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-3'	Stubbs in sod., 2000
cdtBrev	5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC-3'	
A3C	5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG-3'	Rupnik in sod., 1997
A4N	5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3'	
B1C	5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3'	Rupnik in sod., 1997
B2N	5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'	
Lok 3	5'-TTTACCAGAAAAAGTAGCTTTAA-3'	Braun in sod., 1996
Lok 1	5'-AAAATATACTGCACATCTGTATAC-3'	
RiboF	5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3'	Bidet in sod., 1999
RiboR	5'-CCCTGCACCCTTAATAACTGACC-3'	

3.2 Metode



Slika 3.1: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela.

3.2.1 Vzorčenje

Za vzorčno mesto smo si izbrali tri lokacije vzdolž reke Drave. Vzorčenje je potekalo v Koblerjevem zalivu, pri Starem mostu in pri klavnici Košaki v Melju. Vzorčili smo v jesenskem (26. 10. 2018) in zimskem (15. 2. 2019) letnem času. Najprej smo s čistimi lateks rokavicami z mesta vzorčenja odstranili kamenje in les, nato smo s sterilno plastično koničasto lopatico dolžine 150 mm pri vsakem vzorčnem mestu napolnili s sedimentom dve sterilni 50 ml centrifugirki (označeni z A in B; duplikata). Centrifugirki smo dobro zaprli, ju označili in vzorce do nadaljnje obdelave hranili v hladilniku pri 4 °C. Pri vsakem odvzemu novega vzorca smo uporabili novo rokavico, lopatko in 50 ml centrifugirko. Za transport vzorcev z mesta vzorčenja smo uporabili stiroporno škatlo. Vzorčna mesta, GPS lokacije in datumi vzorca so predstavljeni v Preglednici 3. 4.

Preglednica 3.4: Prikaz vzorčnih mest, datuma vzorčenja in oznake vzorcev.

Vzorčno mesto	Oznaka vzorčnega mesta	GPS lokacija vzorčnega mesta	Datum vzorčenja	Oznaka vzorčenja	Oznaka vzorca
Stari most	SM	46°33'22.6"N 15°38'44.8"E	26. 10. 2018	1	SM 1
Klavnica Košaki, Melje	KS	46°33'22.6"N 15°39'33.9"E	26. 10. 2018	1	KS 1
Koblerjev zaliv	KB	46°33'55.2"N 15°37'11.3"E	26. 10. 2018	1	KB 1
Stari most	SM	46°33'22.6"N 15°38'44.8"E	15. 2. 2019	2	SM 2
Klavnica Košaki, Melje	KS	46°33'22.6"N 15°39'33.9"E	15. 2. 2019	2	KS 2
Koblerjev zaliv	KB	46°33'55.2"N 15°37'11.3"E	15. 2. 2019	2	KB 2

3.2.2 Bogatitev in osamitev kultur *C. difficile*

V laboratoriju smo vse vzorce obdelali po dveh metodah – direktna metoda in metoda s sonikacijo. Po 2 × 25 g posameznega vzorca A in B smo zatehtali v dve 50 ml steklenički. V stekleničke smo aseptično dolili 20 ml sterilne dH₂O in jih dobro premešali. Pripravili smo tudi negativni kontroli (NK1 in NK2), tako da smo v prazno sterilno 50 ml centrifugirko dodali 20 ml sterilne dH₂O in ju obdelali po istem postopku kot vzorce. Vzorce označene s SA, SB in NK1 smo sonicirali (stresanje na stresalniku 30 s, 60 s ultrazvok pri 100 % moči, stresanje 30 s), vzorce označene z A, B in NK2 pa ne (Slika 3. 1).

V vroči kopeli smo pri vseh vzorcih napravili toplotni šok – 20 minut pri 70 °C. Po končani inkubaciji smo aseptično s sterilnim merilnim valjem vzorcem dodali 20 ml tekočega gojišča 2 × BHIST. Nato smo vzorce inkubirali 5–7 dni v anaerobni komori pri stalni temperaturi 37 °C. Anaerobno atmosfero je sestavljal plin dušik (80 %), vodik (10 %) in ogljikov dioksid (10 %). Po inkubaciji smo izvedli alkoholni šok. Bogatitveno kulturo smo premešali in počakali, da se večji delci posedejo, nato pa 500 µl vzorca brez usedline prenesli v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 500 µl absolutnega alkohola (vol : vol/1 : 1) ter premešali z obračanjem. Vzorec smo 30 minut inkubirali na sobni temperaturi ter ga nato centrifugirali 10 minut pri 10 000 obr/minuto. Po centrifugiranju smo odstranili večino (približno 800 µl) supernatanta, s preostankom pa resuspendirali pelet ter ga razdeljenega na dva dela nacepili s hokejko na dve sveži kromogeni gojišči ChromID™ *C. difficile*. Plošče smo inkubirali 2–3 dni v anaerobni komori pri stalni temperaturi 37 °C.

3.2.3 Izolacija *C. difficile*

Po inkubaciji smo iz vsakega kromogenega gojišča precepili na sveže gojišče COH 10 kolonij, ki so po morfologiji ustrezale *C. difficile*. V kolikor na katerem gojišču ni bilo mogoče precepiti 10 kolonij, smo jih toliko več precepili iz druge kromogene plošče. Skupno število precepljenih kolonij je bilo 20. Plošče COH smo inkubirali 2 dni v

anaerobnih pogojih pri temperaturi 37 °C. Identifikacijo precepljenih izolatov smo preverili s komercialnim sistemom za identifikacijo MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).

Na MALDI tarčno ploščico smo s cepilno zanko nanесли približno 1 µl 24-urne čiste kulture, jo enakomerno razmazali po območju, dodali 1 µl mravljične kisline ter posušili na zraku. Nato smo dodali še 1 µl matriksa, ponovno posušili in tako pripravljeno kartico vstavili v aparat (Bruker Daltonics). S programsko opremo MALDI Biotyper Real Time Classification wizard (Bruker Daltonics) smo identificirali bakterijske vrste.

Izolate, ki so bili potrjeni kot *C. difficile*, smo ponovno precepili na sveže gojišče COH in izolirali v čisti kulturi.

3.2.4 Osamitev DNA

Za osamitev DNA smo uporabili čisto kulturo *C. difficile* na gojišču COH, ki smo jo inkubirali 24 ur. DNA smo izolirali s 5 % vodno raztopino Chelex. V 1,5 ml mikrocentrifugirki smo odpipetirali 120 µl sveže pripravljene raztopine in v vsako dodali polno 1 µl cepilno zanko kulture. Mikrocentrifugirke s suspenzijo smo dobro premešali na mešalu in jih 10 minut inkubirali v termobloku pri 99 °C. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali 10 minut pri 12000 obr/minuto. V svežo 1,5 ml centrifugirko smo prenesli 76 µl supernatanta in ga do nadaljnje obdelave hranili v zamrzovalniku (-20 °C).

3.2.5 Karakterizacija izolatov

Izolate, ki smo jih pridobili iz vzorca sedimenta, smo karakterizirali s toksinotipizacijo in PCR-ribotipizacijo.

PCR-ribotipizacija

Izolatom smo pomnožili medgensko regijo med genoma za 16S in 23S rRNA, pri tem smo uporabili zečetne oligonukelotide in protokol, ki so ga opisali Janezic in sodelavci (2011). Zaradi velikega števila izolatov ter predvidevanja, da bo večina izolatov v enem vzorcu

klonalnih, smo najprej naredili presejalno PCR-ribotipizacijo. Na podlagi tega smo za vsak vzorec in posamezno metodo izbrali tiste izolate, ki so na presajalnih gelih imeli različne profile pomnoženih fragmentov, kar nakazuje na različne ribotipe. Tem izolatom smo določili PCR-ribotip na agaroznem gelu, ki nudi višjo resolucijo ločevanja fragmentov DNA. Pri tem smo uporabili enake primerje in protokol, pri potrditvi novih PCR-ribotipih pa še set primerjev, ki so jih opisali Bidet in sodelavci (1999).

3.2.5.1 Presejalna metoda PCR ribotipizacije - pomnoževanje medgenske regije 16S in 23S rRNA

Pomnoževanje medgenske regije 16S in 23S rRNA smo izvedli po protokolu Janezic in sodelavci (2011). V sterilni mikrocentrifugirki (1,5 ml) smo pripravili mešanico PCR, jo razporedili v 200 µl mikrocentrifugirke in dodali DNA. Reakcija PCR je potekala v cikličnem termostatu T3000 (Biometra). Sestava reakcijske mešanice za presejalno PCR-ribotipizacijo je zapisana v Preglednici 3.5, začetni oligonukleotidi so zapisani v Preglednici 3.3 in program PCR v Preglednici 3.6. Reakcijsko mešanico smo po pomnoževanju koncentrirali do končnega volumna 25 µl, s segrevanjem na 75 °C za 45 minut.

Preglednica 3.5: Sestava reakcijske mešanice za PCR-ribotipizacijo.

	50 µl (za eno reakcijsko mešanico)
dd H ₂ O	37 µl
10x pufer PCR ¹ (Roche)	5 µl
dNTP-ji (20 mM mešanica)	2 µl
16S Ribo (50 µmol/µl)	1 µl
23SRibo (50 µmol/µl)	1 µl
Taq DNA-polimeraza (Roche) (5U/µl)	0,25 µl
DNA	3 µl »Chelex DNA«

¹ Sestava 10 × pufra PCR: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂.

Preglednica 3.6: Program PCR za ribotipizacijo (Bidet in sod., 1999).

Temperatura	Čas	Število ciklov ²
95 °C	3 min	-
94 °C	1 min	30 ×
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	15 min	-

3.2.5.2 Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR

Produkte PCR smo dokazovali v 2 % agaroznem gelu. Pripravili smo ga tako, da smo v erlenmajerico zatehtali 1,8 g agaroze (Sigma) in dodali 90 ml puфра 0,5 × TBE. Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici 2 minuti. Vsebino smo ohladili ter prelili v elektroforezni nosilec z glavničkom. Ko se je gel strdil, smo previdno odstranili glavniček in gel prestavili v elektroforezno banjico, napolnjeno s puфrom 0,5 × TBE. V prvo vdolbinico smo nanegli 7 µl markerja delovne raztopine DNA lestvice 100 bp, v preostale luknjice smo vnesli 10 µl PCR produkta, ki smo ga predhodno pomešali s 4 µl nanašalnega puфра. Elektroforeza je tekla približno 2 uri pri stalni napetosti 100 V. Gel smo 10 minut barvali v raztopini etidijevega bromida v koncentraciji 0,2 µg/ml in nato še 10 minut razbarvali v destilirani vodi. Pobarvan gel smo slikali s sistemom GeneSys in sliko shranili v digitalni obliki.

3.2.5.3 PCR-ribotipizacija predstavnikov pridobljenih iz presejalne metode PCR

Predstavnikom, ki so na presajalnih gelih imeli različne profile pomnoženih fragmentov, smo določili PCR-ribotip na agaroznem gelu, ki nudi višjo resolucijo ločevanja fragmentov DNA. DNA smo pomnožili po enakem postopku kot pri poglavju 3.2.5.1.

² V enem ciklu poteče denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.

Ločevanje produktov PCR z gelsko elektroforezo

Po pomnoževanju medgenske regije smo produkte PCR nanegli na 3 % gel, ki omogoča višjo ločljivost pri analizi fragmentov. Gel smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico zatehtali 3 g agaroze (Cetrifed Low range ultra agarose, BioRad) in dolili 100 ml pufra 1 × TAE in približno 5 ml dH₂O. Dodali smo magnetek in pokrov ter raztopino segrevali v mikrovalovni pečici 4 minute. Med segrevanjem smo jo večkrat premešali na magnetnem mešalu. Raztopino smo nato na magnetnem mešalu ohlajali v vodni kopeli in jo dovolj ohlajeno prelili v elektroforezni nosilec z nameščenim glavničkom, nato pa počakali, da se strdi.

Nato smo previdno odstranili glavniček. V prvo, šesto, dvanajsto in zadnjo vdolbinico smo nanegli 10 µl standardnega označevalca velikosti DNA 100 bp (New England Biolabs). V preostale luknjice smo nanegli 20 µl produkta PCR, ki smo jih zmešali s 4 µl nanašalnega pufra. Elektroforeza je tekla 4 ure pri stalni napetosti 80 V. Po končani elektroforezi smo gel 15 minut barvali v raztopini etidijevega bromida in nato 15 minut razbarvali v destilirani vodi. Obarvan gel smo slikali in dokument shranili v digitalni obliki.

PCR-ribotipe smo določili s pomočjo programa BioNumerics (Applied Maths), ki primerja pridobljene fragmente DNA z že obstoječimi profili fragmentov v referenčni bazi. Naši izolati so dobili enako oznako kot referenčni PCR-ribotipi.

3.2.6 Toksinotipizacija

Toksinotipizacijo smo izvedli na enem predstavniku PCR-ribotipa za posamezni vzorec. Toksinotip posameznega seva smo določili tako, da smo pomnožili fragmente A3 in B1 toksinskega lokusa PaLoc. Fragmente A3 in B1 smo nato rezali z uporabo restrikcijskih encimov in na podlagi restrikcijskih vzorcev določili toksinotip.

3.2.6.1 Multipla verižna reakcija s polimerazo za preverjanje prisotnosti gena za binarni toksin BtB in cdd3

Za pripravo mešanice PCR smo uporabili sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko, v katero smo odpipetirali sestavine po vrstnem redu, kot je zapisan v Preglednici 3.7. PCR mešanico smo dobro premešali z mešalom in jo razdelili po 23 μ l v 200 μ l mikrocentrifugirke ter dodali ustrezno količino izolirane DNA. PCR je potekal v cikličnem termostatu T3000 (Biometra) po programu, zapisanem v Preglednici 3.8. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so zapisana v Preglednici 3.3.

Preglednica 3.7: Sestava reakcijske mešanice za PCR za pomnoževanje gena cdd3 in cdtB.

Sestavine	Volumen ene reakcijske mešanice 1 × 25 μl
ddH ₂ O	19 μ l
10 × pufer PCR (Roche) ³	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ l
dNTP (20 mM mešanica)	0,5 μ l
mešanica začetnih oligonukleotidov ⁴	0,25 μ l
Taq – DNA polimeraza	0,0625 μ l
DNA	2 μ l Chelex DNA ali 1,5 μ l kontrolnega seva

³ Sestava 10 × pufera PCR: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂, 0,01 % želatin.

⁴ Mešanica začetnih oligonukleotidov: Tim 6, Struppi 6, cdtBpos, cdtBrev. V 1,5 ml mikrocentrifugirko dodamo 10 μ l vsakega začetnega oligonukleotida v založni koncentraciji 100 μ M in dodamo 60 μ l ddH₂O.

Preglednica 3.8: Program PCR za pomnoževanje gena *cdd3* in *cdtB*.

Temperatura	Čas	Število ciklov ⁵
93 °C	3 min	-
93 °C	45 s	30
52 °C	1 min	
72 °C	1 min 20 s	
72 °C	10 min	-

3.2.6.2 Verižna reakcija s polimerazo za pomnoževanje fragmentov A3 in B1.

Mešanico za PCR smo pripravili tako, da smo v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko dodali sestavine reakcijske mešanice po vrstnem redu, kot je zapisan v Preglednici 3. 9. Mešanico smo dobro premešali na mešalu in jo razdelili v 200 µl mikrocentrifugirke ter dodali ustrezno količino DNA. PCR je potekal v cikličnem termostatu T3000 (Biometra). Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so zapisana v Preglednici 3. 3, program PCR pa v Preglednici 3. 10 in 3. 11.

⁵ Posamezen cikel predstavlja denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.

Preglednica 3.9: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri pomnoževanju fragmentov A3 in B1.

	Volumen reakcijske mešanice za A3 (25 µl)	Volumen reakcijske mešanice za B1 (25 µl)
ddH ₂ O	16 µl	18,5 µl
10 × pufer PCR (Roche) ⁶	2,5 µl	2,5 µl
TMA (10 ⁻³ M)	2,5 µl	-
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl	0,5 µl
dNTP-ji (20 mM mešanica)	1,0 µl	1,0 µl
P1 (10 pmol/µl) ⁷	0,25 µl	0,25 µl
P2 (10 pmol/µl) ⁷	0,25 µl	0,25 µl
Taq DNA-polimeraza (Roche) (5U/µl)	0,0625 µl	0,0625 µl
DNA	1,5 µl DNA "Chelex" ali 1,0 µl kontrolnega seva	1,5 µl DNA "Chelex" ali 1,0 µl kontrolnega seva

Preglednica 3.10: Program PCR pri pomnoževanju fragmentov A3.

Program PCR	Število ciklov ⁸	Stopnja	Temperatura	Čas
2step47 (A3)	-	Začetna denaturacija	93 °C	3 min
	35 ×	Denaturacija	93 °C	4 s
		Prileganje in podaljševanje	47 °C	8 min
		Končno podaljševanje	47 °C	10 min

⁶ Sestava 10× pufera PCR: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂.

⁷ Začetna oligonukleotida.

⁸ Posamezen cikel predstavlja denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.

Preglednica 3.11: Program PCR pri pomnoževanju fragmentov B1.

Program PCR	Število ciklov ⁹	Stopnja	Temperatura	Čas
2step57 (B1)	-	Začetna denaturacija	93 °C	3 min
	30 ×	Denaturacija	93 °C	4 s
		Prileganje in podaljševanje	57 °C	8 min
		Končno podaljševanje	57 °C	10 min

Prisotnost PCR produktov smo dokazovali z gelsko elektroforezo. Postopek, ki smo ga uporabili, je opisan v poglavju 3.2.5.2.. Pomnožene fragmente gena A3 in B1, katerih prisotnost smo dokazovali v 1 % agaroznem gelu, smo nadalje rezali z ustreznimi restrikcijskimi encimi.

3.2.6.3 Restrikcija produktov PCR

Pomnožene fragmente A3 in B1 smo rezali z ustreznimi restrikcijskimi encimi, ki so zapisani v Preglednici 3. 12. PCR-zmes za restrikcije smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirali sestavine, navedene v Preglednici 3. 12, jih premešali na mešalu ter jih v ustreznih količinah (5 µl mešanice za restrikcijo A3 ter 7 µl za B1) odpipetirali v nove 1,5 ml mikrocentrifugirke. Tako pripravljene mešanice smo dodali ustrezno količino produkta PCR. Mešanico smo nato inkubirali čez noč v inkubatorju pri temperaturi 37 °C

⁹ Posamezen cikel predstavlja denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.

Preglednica 3.12: Mešanica za encimsko restrikcijo fragmenta A3 z encimom EcoRI in fragmenta B1 z encimoma HincII in Accl.

	Restrikcija A3 (za 1 reakcijo)	Restrikcija B1 (za 1 reakcijo)	
Encim	<i>EcoRI</i>	<i>HincII</i>	<i>Accl</i>
ddH ₂ O	3 µl	5,5 µl	5,5 µl
pufer ¹⁰	2 µl	1,5 µl	1,5 µl
BSA	-	0,15 µl	-
Restrikcijski encim	0,2 µl	0,15 µl	0,15 µl
produkt PCR	15 µl	8 µl	8 µl

Fragmente smo dokazovali z gelsko elektroforezo. Postopek je opisan v poglavju 3.2.5.2.. Dobljene pomnožene restrikcijske vzorce fragmentov smo primerjali z referenčnimi toksinotipi in tako določili njihov toksinotip.

3.2.6.4 Netoksigeni sevi

Izolatom, pri katerih nismo dobili produktov pri pomnoževanju fragmentov A3 in B1, smo s PCR pomnožili 115 bp dolg odsek, ki nadomešča PaLoc regijo in tako potrdili, da gre res za netoksigene izolate. V 1,5 ml mikrocentrifugirki smo pripravili reakcijsko mešanico, jo dobro premešali na mešalu, porazdelili v 200 µl mikrocentrifugirke in ji dodali ustrezno količino DNA. Reakcija PCR je potekala v termostatu T3000 (Biometra). Sestava reakcijske mešanice je zapisana v Preglednici 3. 13, uporabljeni začetni oligonukleotidi v Preglednici 3. 3, program reakcije PCR je opisan v Preglednici 3. 14.

¹⁰ 10× *EcoRI* Reaction Buffer (New England Biolabs) za restrikcije *EcoRI*; NeBuffer 3 (New England Biolabs) za restrikcije *HincII*; NeBuffer 4 (New England Biolabs) za restrikcije *Accl*.

Preglednica 3.13: Sestava reakcijske mešanice PCR za dokazovanje netoksigenih sevov.

	Lok1/Lok3 25 μl (za 1 reakcijsko mešanico)
ddH ₂ O	18,5 μ l
10 \times pufer PCR1 (Roche) ¹¹	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μ l
dNTP-ji (20 mM mešanica)	0,5 μ l
P12Lok3 (10 pmol/ μ l)	0,25 μ l
P22Lok1 (10 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Taq DNA-polimeraza (Roche) (5U/ μ l)	0,0625 μ l
DNA	3 μ l »Chelex DNA« ali 1,5 μ l DNA kontrolnega seva

Preglednica 3.14: Program PCR za pomnoževanje 115 bp dolgega zaporedja, ki nadomešča regijo PaLoc.

Temperatura	Čas	Število ciklov¹²
93 °C	3 min	-
93 °C	45 s	30
52 °C	1 min	
72 °C	1 min 20 s	
72 °C	10 min	-

Prisotnost PCR produktov smo dokazovali z gelsko elektroforezo. Postopek je opisan v poglavju 3.2.5.2.

3.2.7 Shranjevanje izolatov *C. difficile*

Izolate, ki smo jim določili PCR-ribotip in toksinotip, smo shranili v zbirko sevov Oddelka za mikrobiološke raziskave na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano v

¹¹ Sestava 10 \times pufera PCR: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂.

¹² Posamezen cikel predstavlja denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje.

Mariboru. Izolate smo precepili na sveže gojišče COH. Po petih dneh anaerobne inkubacije smo s plošče s cepilno zanko pobrali kulturo in jo suspendirali v kriovialo s kroglicami in krioprotektantom (Microbank™, Pro-Lab Diagnostics). Krioviale smo premešali z obračanjem in odpipetirali 1 ml tekočine v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko. Krioviale smo shranili v zamrzovalniku pri -80 °C. Mikrocentrifugirke s tekočino smo centrifugirali 5 minut na 10 000 obratov/minuto. Supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali in prenesli na 4 sterilne koščke filter papirja ter jih posušili ob gorilniku. Posušene filter papirje smo zavili v folijo, ustrezno označili in shranili pri sobni temperaturi. Vsak izolat je pridobil svojo oznako ZZV, pod katero je shranjen v zbirki.

4 REZULTATI

Namen magistrske naloge je bila izolacija in karakterizacija bakterije *C. difficile* v vzorcih rečnega sedimenta. Vzorce smo pridobili na treh lokacijah vzdolž reke Drave v dveh letnih časih – jeseni in pozimi. Za osamitev bakterije smo uporabili dva različna postopka: s sonikacijo in brez sonikacije. Izolate *C. difficile* smo identificirali s sistemom MALDI Biotyper in jim določili PCR-ribotip in toksinotip.

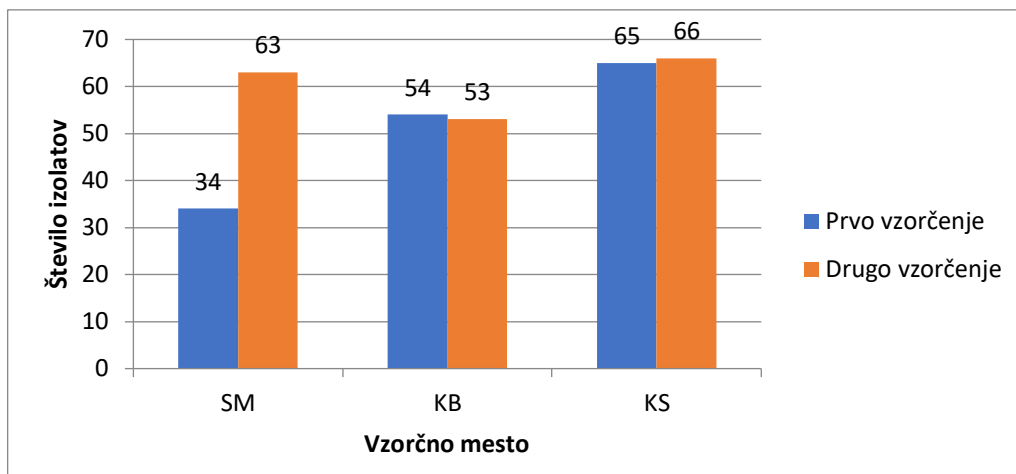
4.1 Izolacija *C. difficile* iz vzorcev sedimenta

Bakterijo *C. difficile* smo osamili iz vseh 6 vzorcev rečnega sedimenta. Skupno smo izolirali 454 izolatov bakterij (Preglednica 16), ki so bile na gojišču ChromID™ *C. difficile* morfološko podobne *C. difficile*. Vse izolate smo identificirali z MALDI-TOF, 335 izolatov (74 %) je pripadalo *C. difficile*. Vzorčenje je, z namenom pridobitve čim večjega števila izolatov, potekalo v duplikatih. Rezultate vzorčenja v duplikatih smo zaradi preglednosti združili in predstavili po posameznih vzorčnih lokacijah in času vzorčenja.

Preglednica 4.1: Pregled izolatov *C. difficile* in ostalih prisotnih vrst po času in lokaciji vzorčenja, pri čemer smo združili podatke duplikata A in B.

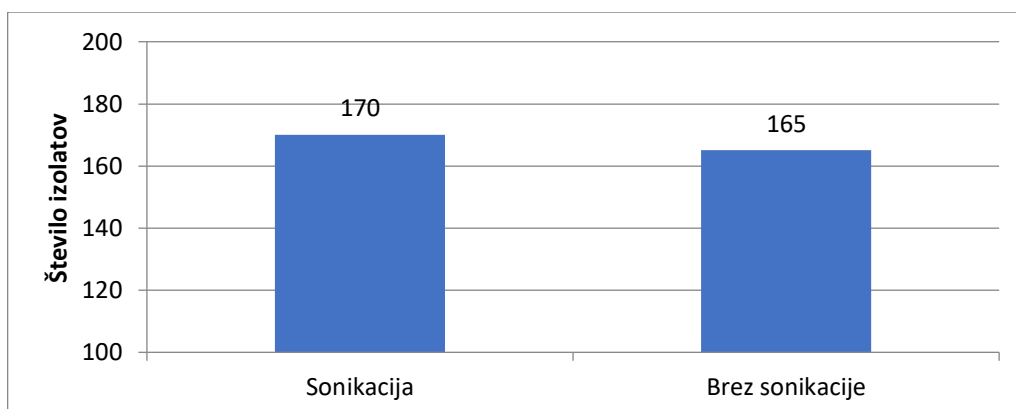
Datum vzorčenja	Lokacija vzorčenja	Število izolatov <i>C. difficile</i> - sonikacija	Število izolatov <i>C. difficile</i> - brez sonikacije	Ostale prisotne vrste
26. 10. 2018	Stari most	23	11	62 × <i>C. butyricum</i> ; 1 × <i>C. hathewayi</i> ; 1 × <i>C. clostridioforme</i>
26. 10. 2018	Koblerjev zaliv	28	26	23 × <i>C. butyricum</i> ; 1 × <i>C. clostridioforme</i> ; 1 × <i>C. citroniae</i>
26. 10. 2018	Klavnica Košaki, Melje	32	33	14 × <i>C. butyricum</i>
15. 2. 2019	Stari most	30	33	4 × <i>C. butyricum</i> ; 1 × <i>C. sporogenes</i>
15. 2. 2019	Koblerjev zaliv	22	31	2 × <i>C. butyricum</i> ; 1 × <i>B. cereus</i>
15. 2. 2019	Klavnica Košaki, Melje	35	31	6 × <i>C. butyricum</i>

Največ izolatov *C. difficile* smo pridobili na vzorčnem mestu Klavnica Košaki, Melje (Graf 4. 1), in sicer skupno 131; v vzorčnem mestu Koblerjev zaliv smo pridobili skupno 107 izolatov, najmanj izolatov smo uspeli izolirati iz vzorčnega mesta Stari most, in sicer 97. Ostalih 119 izolatov je pripadalo vrstam *C. butyricum* (111 izolatov, 24 %), *C. sporogenes* (5 izolatov, 1,1 %), po en izolat *C. citroniae*, *C. hathewayi* in *Bacillus cereus* (Preglednica 4. 1).

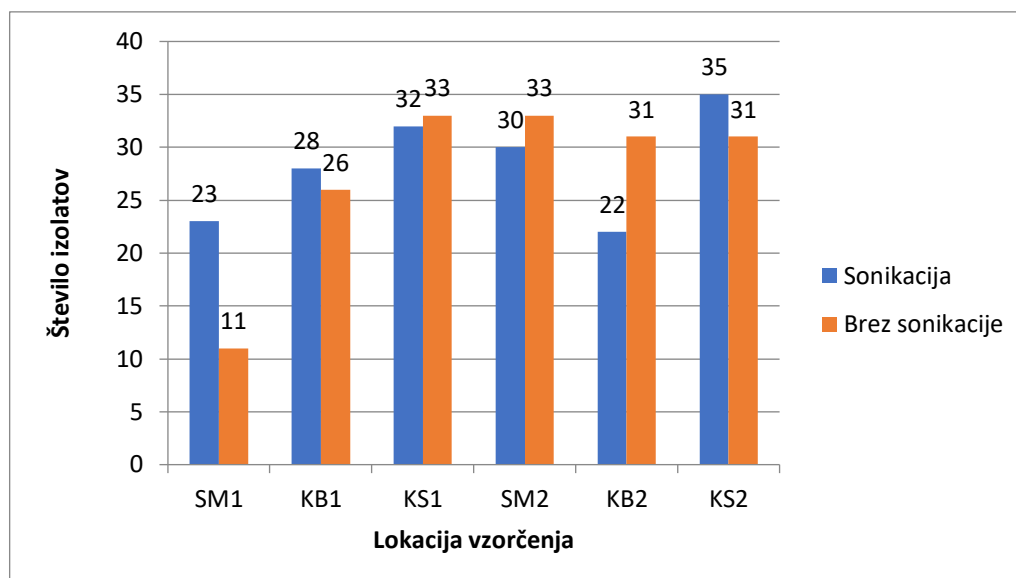


Graf 4.1: Število izolatov *C. difficile* glede na lokacijo vzorčenja z združenimi podatki duplikatov A in B.

Z namenom pridobitve čim večjega števila izolatov smo za izolacijo *C. difficile* posamezen vzorec sedimenta razdelili na dva enaka dela (25 g) in vsakega obdelali po različnem postopku obdelave, ki se je razlikoval samo v prvem koraku. Pri enem smo uporabili postopek sonikacije in pri drugem smo vzorec obdelali direktno. Vsi koraki naprej so enaki pri obeh postopkih. Skupno število izolatov glede na postopek obdelave je prikazano v Grafu 4. 2. Z uporabo sonikacije smo pridobili celokupno zgolj 5 izolatov več. Vpeljava dodatnega postopka sonikacije ni statistično značilno pripomogla k večjemu številu izoliranih izolatov (Student T test = 0,8406). Pri prvem vzorčenju pri vzorčnem mestu Stari most (SM1) smo z uporabo postopka sonikacije uspeli izolirati 67,6 % izolatov, medtem ko smo brez postopka sonikacije izolirali le 32,4 % izolatov (Graf 4. 3).



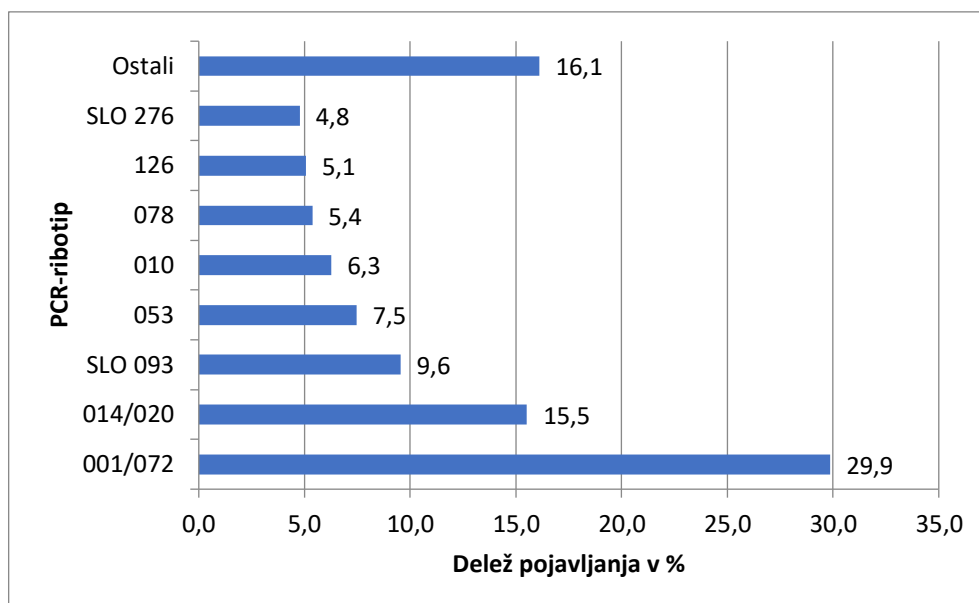
Graf 4.2: Skupno število izolatov *C. difficile* glede na postopek obdelave.



Graf 4.3: Število izolatov *C. difficile* glede na postopek obdelave in lokacijo vzorčenja, pri čemer smo združili podatke iz obeh centrifugirk (A in B).

4.2 Karakterizacija izolatov *C. difficile*

Izolate *C. difficile* smo nadalje okarakterizirali s PCR-ribotipizacijo in toksinotipizacijo. Vse izolate smo najprej tipizirali s presejalno PCR ribotipizacijo. Glede na rezultate presejalne PCR-ribotipizacije smo za izolate, ki so imeli enak PCR-ribotip v istem vzorcu, predpostavili, da so klonalnega izvora, zato smo pri vsakem vzorčnem mestu za nadaljnjo analizo izbrali po en reprezentativni izolat na posamezen vzorec (ločeno za postopek s sonikacijo in brez sonikacije ter duplikata A in B). Izbranim izolatom smo nato določili PCR ribotip in toksinotip. Izolate smo razvrstili v 26 različnih PCR-ribotipov, najpogosteje sta se pojavljata PCR-ribotipa 001/072 (29,9 %) in 014/020 (15,5 %) (Preglednica 4. 2, Graf 4. 4). PCR- ribotip 001/072 (toksinotip 0) se je pojavljal zgolj v jesenskem vzorčenju pri vseh vzorčnih mestih, na vzorčnem mestu Klavnica Košaki, Melje je bil prisoten kar pri 72,3 % vseh izolatov. Drugi prevladujoči PCR-ribotip je bil 014/020 (toksinotip 0), ki se je pojavil na vseh vzorčnih mestih razen na lokaciji Klavnica Košaki, Melje v jesenskem vzorčenju. Največ izolatov tega PCR ribotipa smo našli na vzorčnem mestu Klavnica Košaki, Melje v zimskem vzorčenju, kjer je bil prisoten pri 53,7 % vseh izolatov.



Graf 4.4: Delež pojavljanja izolatov posameznih PCR-ribotipov. Deleži so izračunani glede na celotno število izolatov (n=335).

Izolate s PCR-ribotipoma 001/072 in 014/020, ki sta bila najpogostejša v naši raziskavi, smo uspeli osamiti v obeh postopkih osamitve (sonikacija/brez sonikacije) (Preglednica 17). Nasprotno smo izolate s PCR-ribotipom 126, 033, 002, 045, 105, SLO 056, SLO 078, SLO 268, SLO 030 osamili samo v primeru, kadar smo pri postopku osamitve uporabili metodo sonikacije. Izolate s PCR-ribotipom 018, SLO 223, SLO 299, SLO 298, SLO 131, SLO 257 smo osamili samo, kadar nismo uporabili postopka sonikacije (Preglednica 4. 2).

Preglednica 4.2: Pregled PCR-ribotipov glede na vzorčno mesto, čas vzorčenja in postopek osamitve. V tabeli so prikazani združeni podatki iz obeh duplikatov pri posameznem vzorcu.

PCR-ribotip	Toksinotip	Število pozitivnih vzorcev	SM1		KB1		KS1		SM2		KB2		KS2	
			Sonikacija	Brez sonikacije	Sonikacija	Brez sonikacije	Sonikacija	Brez sonikacije	Sonikacija	Brez sonikacije	Sonikacija	Brez sonikacije	Sonikacija	Brez sonikacije
014/020	0	13	2	3			1		4	1	8	5	14	14
001/072	0	12	10	7	19	17	17	30						
053	tox -	5				3			11	11				
078	V	5	1	1	5	6						5		
SLO 093	0	4					1				8	11		12
010	tox -	4					1		10	10				
073 (CE)	0	4											5	5
126	V	3									6		11	
SLO 128	III	3	4	4										
SLO 276	0	2							5	11				
SLO 298	tox -	2										5		
SLO 300	tox -	2											2	1
SLO 056	VIII	1					6							
033	V	1					5							
SLO 057	tox -	1			4									
SLO 131	III	1										3		
002	0	1					1							
018	0	1										1		
045	V	1											1	
105	0	1	1											
SLO 030	tox -	1	1											
SLO 223	tox -	1						1						
SLO 299	0	1						1						
SLO 078	tox -	1					1							
SLO 257	0	1										1		
SLO 268	0	1											1	

4.3 Genotipi in njihova razširjenost v Sloveniji

Od skupno 26 različnih PCR-ribotipov je bilo 8 le-teh netoksigenih (30,8 %). Preostalih 18 PCR-ribotipom smo določili 4 različne toksinotipe (0, III, V in VIII). Najpogostejši toksinotip v raziskavi je bil toksinotip 0, kateremu je pripadalo 9 različnih PCR-ribotipov. Toksinotipu V so pripadali 4 različni PCR-ribotipi, določili smo še toksinotip III, ki je pripadal 2 različnima PCR-ribotipoma in toksinotip VIII z enim PCR-ribotipom (Preglednica 4. 3).

Za PCR-ribotipe, ki so se pojavljali v naši raziskavi, smo v zbirki na Oddelku za mikrobiološke raziskave Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano preverili tudi njihovo pojavnost v Sloveniji. Z ljudmi je bilo povezanih 20 različnih PCR ribotipov. 15 različnih PCR ribotipov so izolirali iz okoljskih vzorcev. Pri živalih so našli 10 različnih PCR-ribotipov. Najmanj (zgolj 5) različnih PCR-ribotipov so izolirali iz živil (Preglednica 4. 3).

PCR-ribotip 001/072, ki se je v naši raziskavi pojavil v največjem deležu, so v preteklosti uspeli izolirati iz ljudi, živali, okolja in živil.

Preglednica 4.3: Pregled PCR-ribotiov in njihovo pojavljanje v Sloveniji.

PCR- ribotip	Toksinotip	Število pozitivnih vzorcev/izolatov	Prisotnost pri ljudeh v Sloveniji	Prisotnost pri živalih v Sloveniji	Prisotnost v okolju v Sloveniji
014/020	0	13/52	+	+	+
001/072	0	12/100	+	+	+
053	tox -	5/25			
078	V	5/18	+	+	
SLO 093	0	4/32			
010	tox -	4/21	+	+	+
073 (CE)	0	4/10			
126	V	3/17	+		+
SLO 128	III	3/8			
SLO 276	0	2/16			
SLO 298	tox -	2/5			
SLO 300	tox -	2/3			
SLO 056	VIII	1/6			
033	V	1/5		+	
SLO 057	tox -	1/4			+
SLO 131	III	1/3			
002	0	1/1	+	+	+
018	0	1/1	+		+
045	V	1/1	+	+	
105	0	1/1			
SLO 030	tox -	1/1			
SLO 223	tox -	1/1			+
SLO 299	0	1/1			
SLO 078	tox -	1/1			
SLO 257	0	1/1			
SLO 268	0	1/1			

5 RAZPRAVA

Prva okužba s *C. difficile* v domačem okolju je bila opisana leta 1980, v zadnjih 10–20 letih se je število okužb v domačem okolju povišalo. Obolevajo populacije, ki so bili v preteklosti prepoznane po manjšem tveganju za okužbo. Nedavne raziskave ocenjujejo, da je 20–27 % vseh CDI v domačem okolju. Povišanje števila okužb s *C. difficile* v domačem okolju in možen prenos spor iz okolja in hrane je sprožilo veliko zanimanje za raziskavo možnih rezervoarjev *C. difficile* v izvenbolnišničnem okolju, med katere spada tudi slabo raziskan rečni sediment (Ofori in sod., 2018). Rečni sediment predstavljajo majhni delci organskega ali anorganskega izvora, ki jih raznaša voda. Izraz se pogosto nanaša na mineralne delce (glina, pesek, mulj), vendar med sediment prištevamo tudi dekompozirane organske in anorganske biogene snovi. Večina mineralnih delcev sedimenta je rezultat delovanja erozije in vremenskih pojavov. Rečni sediment zagotavlja pomemben habitat za organizme na vseh trofičnih nivojih (Wetzel, 2001; Dalu in sod., 2017; Drury in sod., 2013).

Na voljo je malo raziskav, kjer so *C. difficile* izolirali iz vzorcev rečnih sedimentov. *C. difficile* so v preteklih raziskavah izolirali iz bazenov, rečne vode, morske vode, jezerske vode, plaž, luž, pitne vode, odpadne vode in prsti (Al Saif in Brazier, 1996; Simango, 2006; Janezic in sod., 2012, Janezic in sod., 2016). Zidaric in sodelavci (2010) so prisotnost *C. difficile* potrdili pri 17 od 25 testiranih slovenskih rek (68,0 %) in skupno pri 60,9 % vzorcev rečne vode. Na podlagi zaključkov slednje raziskave smo domnevali, da bo bakterija *C. difficile* prisotna tudi v rečnem sedimentu.

V našem magistrskem delu smo izolirali *C. difficile* iz vzorcev rečnega sedimenta. Vzorčili smo na treh lokacijah vzdolž reke Drave v dveh letnih časih. Skupno smo testirali 6 vzorcev rečnega sedimenta. Endospore bakterije so bile prisotne na vseh vzorčnih mestih v obeh letnih časih. Iz pozitivnih vzorcev smo pridobili 335 izolatov *C. difficile*,

katere smo s PCR-ribotipizacijo razvrstili v 26 različnih PCR-ribotipov. Določeni PCR-ribotipi izmed potrjenih v rečnem sedimentu se pojavljajo tudi pri ljudeh (Preglednica 4.3).

V reke, ki tečejo skozi večja mesta, so pogosto speljani odtoki komunalnih odpadnih vod, industrijskih odplak in padavinskih odpadnih vod. Pogosto so tudi vir pitne in/ali industrijske vode v mestih. Urbane reke in sediment so heterogen ekosistem, na katerega imajo velik vpliv antropogeni dejavniki na kopnem. Odpadne vode iz naseljenih območij vsebujejo organske polutante in tako vplivajo na parametre rečne vode. Prav tako odpadne vode predstavljajo vir kontaminacije z mikroorganizmi (Duri in sod., 2013; Ruiz-González in sod., 2015). Wang in sodelavci (2018) so v raziskavi odkrili, da je diverziteteta mikroorganizmov v rečnem sedimentu signifikantno višja kot v pripadajočem vodnem vzorcu. Zaznali so tudi občutno višjo abundanco bakterij iz debla Firmicutes v vzorcu, ki je bil v neposredni bližini odtoka odpadnih vod. Slednje so potrdili tudi Romano in sod. (2012), ki so odkrili prisotnost toksigenih ribotipov *C. difficile* v vseh vzorcih odpadnih vod pred čiščenjem in v odplakah odpadnih vod, ki so bile očiščene v čistilnih napravah in so se stekale v reke. To nakazuje, da so endospore *C. difficile* prisotne v odpadnih vodah in so odporne na obdelavo odpadnih vod. V tej študiji so poročali o visokem deležu (85 %) toksigenih sevov. Enajst PCR-ribotipov odkritih v tej študiji, je bilo tudi izoliranih iz pacientov s simpomatskimi znaki CDI v bližnji bolnišnici. Raziskovalci so na podlagi rezultatov opozorili na možnost kontaminacije rek in rečnih sedimentov, kamor se stekajo očiščene odpadne vode, s *C. difficile* (Romano in sod., 2012).

Zidarič in sod (2010) so dokazali prisotnost *C. difficile* v 68 % slovenskih rek, pogosteje so bile spore pristone na tistih vzorčnih mestih, ki so bližje naseljenim območjem. Avtorji so odkrili podobnosti med sevi *C. difficile* izoliranih iz rečne vode in ljudi. Na podlagi odkritij te študije lahko sklepamo, da odpadne vode doprinesejo h kontaminaciji rek in rečnega sedimenta s *C. difficile*, kar pojasnjuje tudi visoko pogostnost *C. difficile* v naši

magistrski nalogi, saj so tudi naša vzorčna mesta bila v neposredni bližini poseljenih območij.

5.1 Primerjava PCR-ribotipov po lokacijah vzorčenja

V raziskavo smo vključili 3 različna mesta vzorčenja vzdolž reke Drave. Izbrali smo si vzorčno mesto Koblerjev zaliv, kjer je velik nanos muljastega sedimenta, ki je posledica zmanjšanega pretoka reke Drave. V bližini vzorčenja je bilo več gnezd rac mlakaric (*Anas platyrhynchos*). Vzorčili smo na lokaciji Starega mosta, kjer se zadržujejo večja populacija labodov grbcev (*Cygnus olor*). Lokacija košaki pa se nahaja v neposredni bližini klavnice goveda in prašičev, pri čemer so odplake speljane v reko Dravo.

Najvišjo pestrost PCR-ribotipov smo zaznali pri lokaciji Košaki v obeh letnih časih. V jesenskem vzorčenju je bilo na tem vzorčnem mestu 10, v zimskem pa 7 različnih PCR-ribotipov. Visoka pestrost PCR-ribotipov na tej lokaciji bi lahko bila posledica odplak iz bližnje klavnice, ki se iztekajo v reko Dravo.

Pri lokaciji Stari most je bilo potrjenih 9 različnih PCR-ribotipov. V drugem vzorčenju pozimi sta prevladovala PCR-ribotipa 010 in 053, oba netoksigena. V jesenskem vzorčenju je bil najpogostejši PCR-ribotip 001/072, edini PCR-ribotip, ki se je pojavil v obeh letnih časih, je bil 014/020. Na tej lokaciji se pogosto zadržujejo večje populacije labodov. V literaturi ni navedeno, ali je bakterija *C. difficile* prisotna v črevesju labodov in pri ostalih vodnih pticah. V slovenski raziskavi prisotnosti *C. difficile* niso potrdili pri divjih pticah selivkah (Bandelj in sod., 2011). Študije sicer poročajo, da je *C. difficile* prisotna pri rejni perutnini. Slovenska študija poroča, da je bilo 62,3 % vzorcev blata kokoši koloniziranih s *C. difficile*, pri čemer so zaznali 12 različnih PCR-ribotipov (Zidaric in sod., 2008). Bandelj in sodelavci (2013) so *C. difficile* potrdili pri 4 % vzorcih fecesa kmečkih lastovk, pri čemer je bilo 71 % vseh izolatov toksigenih. Potrdili so PCR-ribotip 078 (Bandelj in sod., 2013), ki se je pojavil tudi pri vzorčnem mestu Koblerjev zaliv v obeh letnih časih in v jesenskem vzorčenju pri lokaciji Stari most. Da bi lahko domnevali, da vir kontaminacije rečnega sedimenta s PCR-ribotipom 078 predstavljajo vodne ptice, bi

bilo potrebno podrobneje raziskati pojavnost *C. difficile* pri pticah.

5.2 Diverzitetna ribotipov pri ljudeh in v okolju

V naši magistrski nalogi smo osamili izolate s 26 različnimi PCR-ribotipi, 20 PCR-ribotipov (76,9 %) se pojavlja tudi pri ljudeh. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Zidarič in sod. (2010), ki so vzorčili rečno vodo v Sloveniji. Ugotovili so, da se več kot polovica PCR-ribotipov v njihovi raziskavi pojavlja tudi pri ljudeh in živalih.

Najpogostejši PCR-ribotip, ki se je pojavljal v naši raziskavi, je bil 001/072 (toksinotip 0); prisoten je bil na vseh treh lokacijah vzorčenih v jesenskem času, vendar ni bil najden pri zimskem vzorčenju. V Evropi je PCR-ribotip 001/072 v večini držav endemičen in eden izmed prevladujočih tipov pri ljudeh (Rupnik in sod., 2016; ECDC, 2018). Ta PCR-ribotip se pojavlja tudi v okolju in pri živalih. Potrdili so ga v prsti na živalski farmi, hlevskem gnoju in silaži (Bandelj in sod., 2016).

Drugi najpogostejši PCR-ribotip v naši raziskavi (15,8 %), 014/020 (toksinotip 0), je v Sloveniji in večih evropskih državah najpogostejši PCR-ribotip pri ljudeh (ECDC, 2018). Bandelj in sod. (2016) so ga potrdili na živalskih farmah pri izolatih iz hlevskega gnoja, prsti ter vzorcev vode, s katero napajajo živino. Ta ribotip so osamili iz vzorca morske vode, školjk, ljudi (Romano in sod., 2018) in iz mesnih proizvodov v Kanadi (Rodriguez-Palacios in sod., 2009).

PCR-ribotip z interno oznako SLO 093 je bil v naši raziskavi tretji najpogostejši PCR-ribotip, ki se je pojavil pri 32 izolatih (9,6 %). Našli smo ga v jesenskem in zimskem vzorčenju na lokaciji Klavnica Košaki, Melje in v zimskem vzorčenju na lokaciji Koblerjev zaliv. Ta PCR-ribotip so izolirali tudi v rečni vodi v slovenski raziskavi (Zidaric in sod., 2010), najden je bil tudi pri človeku.

PCR-ribotip 033 (toksinotip V) se je v naši raziskavi pojavil samo na vzorčnem mestu Košaki pri 5 izolatih *C. difficile*. Študije poročajo, da je ta ribotip pogost pri rejnih živalih

(McGovern in sod., 2017). Knight in sod. (2013) so raziskali pojavnost in genetsko diverziteto sevov *C. difficile* v klavnici. *C. difficile* so potrdili v 56 % vzorcih, med katerimi je bil ribotip 033 drugi najpogostejši. Do podobnih rezultatov so prišli Schneeberg in sod. (2013), ki so vzorčili feces teličkov v 603 farmah in PCR-ribotip 033 dokazali pri 57 % vseh izolatov *C. difficile*. Tudi študija iz Slovenije je potrdila PCR-ribotip 033 pri fekalnem vzorcu teličkov in konjev, vendar v manjšem deležu (Avberšek in sod., 2009).

Pri treh lokacijah vzorčenja (pri skupno 18 izolatih) se je v naši študiji pojavil PCR-ribotip 078 (toksinotip V). Ta je v številnih evropskih državah eden najpogostejši PCR-ribotipov, ki se pojavlja pri hospitaliziranih pacientih. CDI, kot posledica okužbe s tem ribotipom, se izkazuje v slabši klinični sliki. PCR-ribotip 078 so v preteklosti povezovali s prašičerejo, saj je ta ribotip dominanten v črevesju prašičev (Krutova in sod., 2018). Študija van Dorp (2017) na Nizozemskem ni odkrila, da je incidenca okužbe s *C. difficile* z ribotipom 078 povezana s prašičjimi farmami. V naši raziskavi se je PCR-ribotip 078 pojavil pri skupno 5,4 % vseh izolatov, kar nakazuje, da rečni sediment lahko predstavlja rezervoar tudi tega ribotipa.

5.3 Primerjava časov vzorčenja

Epidemiološke študije so dokumentirale sezonske variacije v frekvenci okužb s *C. difficile*, razlogi za nihanje okužb med sezonami pa ostajajo slabo raziskani. V severni hemisferi se incidenca CDI poveča med zimskimi meseci. To sovпада s povišanjem pojavnosti respiratornih okužb, zaradi česar se predpiše več antibiotikov. Znano je, da izpostavljenost antibiotikom poviša možnosti za okužbo s *C. difficile*, kar bi lahko pojasnilo povečanje okužb v zimskih mesecih. Najvišja poraba antibiotikov v Evropi je meseca januarja in februarja (Furuya-Kanamori in sod., 2015; Brown in sod., 2013). Rezultati študije Rodriguez in sod. (2019) nakazujejo višjo prisotnost *C. difficile* v vzorcih prsti zimskega vzorčenja. Raziskovalci so domnevali, da vir kontaminacije prsti z endosporami *C. difficile* predstavljajo ljudje in hišni ljubljenci, ki jih sprehajajo, kar pa ne sovпада z rezultati, saj so preučevana vzorčna mesta pogosteje obiskana v poletnih mesecih kot pa zimskih. Na podlagi rezultatov so raziskovalci sklepali, da glavni rezervoar

in mesto kontaminacije s *C. difficile* predstavlja prst, ljudje in živali pa pomagajo pri njenem razširjanju.

V naši raziskavi smo pojavnost *C. difficile* v rečnem sedimentu spremljali v jesenskem (oktober) in zimskem času (februar). V jesenskem vzorčenju smo uspeli osamiti 153 (45,7 %) izolatov *C. difficile*, v zimskem času pa 182 (54,3 %) izolatov. PCR- ribotip 001/072, ki se je pojavil pri najvišjem številu izolatov, se je pojavljal zgolj v jesenskem vzorčenju. Medtem se je 90,4 % izolatov, ki smo jim določili PCR-ribotip 014/020, pojavilo v zimskem vzorčenju – torej februarja. Pri ostalih PCR-ribotipih ni jasnih razlik med pojavnostjo po sezoni vzorčenja oziroma je število izolatov prenizko. PCR-ribotipa 014/020 in 001/072 sta oba toksigena in povzročata okužbe pri ljudeh. Naši rezultati nakazujejo, da ni mogoče sklepati o sezonski pojavnosti spor *C. difficile* v rečnem sedimentu, saj bi bilo potrebno spremljati *C. difficile* v rečnem sedimentu kontinuirano v vseh letnih časih in v daljšem obdobju.

5.4 Primerjava metod

Za pridobitev čim večjega števila izolatov smo za izolacijo *C. difficile* posamezen vzorec sedimenta razdelili na dva enaka dela (25 g) in vsakega obdelali po različnem postopku obdelave. Uporabili smo postopek z uporabo sonikacije in postopek brez uporabe sonikacije ter vzorce nato inkubirali in naprej obdelali po enakem postopku.

Edinstvena struktura spor *C. difficile* omogoča preživetje daljšega obdobja v neugodnem okolju izven gostitelja. Študije so dokazale, da je eksosporij pri *C. difficile* stabilna zunanja plast spore, ki je prisotna pri številnih kliničnih izolatih, kar nakazuje, da ima pomembno vlogo pri prenosu in obstoju spor. Adhezini na eksosporiju omogočajo obstojnost spor *C. difficile* na različnih površinah (Rupnik in sod.; 2009; Joshi in sod., 2012). Escobar-Cortés in sod., (2013) so dokazali, da sonikacija učinkovito odstrani večino eksosporija, s tem se poviša tudi sposobnost spor, da tvorijo kolonije (Escobar-Cortés in sod., 2013).

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali sonikacija pozitivno vpliva na število izoliranih

izolatov *C. difficile* in diverziteto PCR-ribotipov iz vzorca rečnega sedimenta. Od 335 izolatov *C. difficile* smo jih 170 (50,7 %) pridobili z začetnim postopkom sonikacije vzorca in 165 (49,3 %) takih, kjer smo ta postopek izpustili. Rezultati naše raziskave nakazujejo, da sonikacija ni doprinesla k bistveno višjemu številu izoliranih sevov. Lahko domnevamo, da je razlog podobnega števila pridobljenih sevov z različnima postopkoma ta, da eksosporij v mokrem vzorcu rečnega sedimenta nima funkcije pritrjevanja na površine s pomočjo adhezinov.

Po drugi strani pa je vključitev postopka sonikacije, z namenom pridobitve večje diverzitete PCR-ribotipov, smiselna. V naši raziskavi smo s postopkom sonikacije pridobili 6 različnih PCR-ribotipov, ki pa niso bili prisotni, kadar smo pri postopku osamitve izpustili sonikacijo. Kljub temu ni smiselno izpeljati postopkov osamitve zgolj s sonikacijo, saj smo v naši raziskavi osamili 7 različnih PCR-ribotipov, kadar smo sonikacijo izpustili. V ta namen v prihodnje priporočamo oba postopka osamitve – z uporabo sonikacije in brez.

6 SKLEPI

Vse delovne hipoteze, ki smo si jih zastavili na začetku magistrske naloge, smo potrdili.

1. Bakterija *C. difficile* je bila prisotna v vseh vzorcih rečnega sedimenta.
2. V rečnem sedimentu je visoka diverziteteta PCR-ribotipov, skupno smo našli 26 različnih PCR-ribotipov *C. difficile*.
3. Določeni PCR-ribotipi so se razlikovali glede na čas in mesto vzorčenja.
4. Nekateri PCR-ribotipi, ki smo jih osamili iz vzorcev rečnega sedimenta, se prekrivajo z ribotipi najdenimi pri ljudeh, živalih, okolju in živilih.

7 POVZETEK

C. difficile je po Gramu pozitivna, striktno anaerobna in patogena bakterija, ki povzroča črevesne okužbe pri ljudeh in živalih. Čeprav *C. difficile* še vedno najpogosteje povzroča okužbe pri ljudeh s klasičnimi dejavniki tveganja (starejši od 65 let, hospitalizirani bolniki in bolniki na antibiotični terapiji), v zadnjih letih opažamo porast števila okužb pri ljudeh v domačem okolju.

Rezervoar bolnišničnega okolja je zelo dobro raziskan, medtem ko so podatki o *C. difficile* v drugih okoljih še vedno precej skopi. Ker v zadnjih letih narašča število okužb v izvenbolnišničnem okolju, je pomembno, da poiščemo možne rezervoarje bakterije *C. difficile* v omenjenem okolju.

Namen našega magistrskega dela je bil določiti pogostost in raznolikost genotipov *C. difficile* v rečnem sedimentu. Vzorčili smo na treh lokacijah vzdolž reke Drave v dveh letnih časih – skupno smo imeli 6 vzorcev rečnega sedimenta. Posamezen vzorec smo razdelili na dva enaka dela. Pri enem delu smo uporabili postopek sonikacije, pri drugem pa smo sonikacijo izpustili in vse vzorce nadalje obdelali po enakem postopku. Sledila je inkubacija v bogatitvenem gojišču 2x BHIST. Po inkubaciji smo naredili temperaturni in alkoholni šok, nato pa smo osamili bakterijo na kromogeni plošči CHROM™ ID *C. difficile*. Na poraslih ploščah smo 20 kolonij, ki so morfološko spominjale na *C. difficile*, precepili na gojišče COH. Po potrditveni identifikaciji s komercialnim testom MALDI-TOF smo izolirali DNA izolatov *C. difficile* in jim določili PCR-ribotip ter toksinotip.

Bakterijo smo izolirali iz vseh vzorcev rečnega sedimenta. Skupno smo osamili 335 izolatov *C. difficile*, katerim smo določili 26 različnih PCR-ribotipov in jih uvrstili v 4 različne toksinotipe. 20 PCR-ribotipov (76,9 %) se pojavlja tudi pri ljudeh v Sloveniji. Prevladovala sta PCR-ribotipa 001/072 (29,9 %) in 014/020 (15,5 %), ki sta oba toksigena

in pripadata toksinotipu 0.

Vpeljava dodatnega postopka sonikacije ni bistveno pripomogla k višjemu številu izoliranih sevov, vendar se je šest PCR-ribotipov pojavljalo le v vzorcih, pri katerih smo uporabili postopek sonikacije. Ugotovili smo, da ni smiselno izpeljati postopkov osamitve zgolj s sonikacijo, saj smo v naši raziskavi osamili 7 različnih PCR-ribotipov, kadar smo sonikacijo izpustili.

V obeh vzorčnih časih smo uspeli osamiti podobno število izolatov. PCR-ribotip 001/072 se je pojavljal zgolj v jesenskem vzorčenju, medtem ko se je večina izolatov (90,4 %), ki smo jim določili PCR-ribotip 014/020, pojavilo v zimskem vzorčenju. Pri ostalih PCR-ribotipih ni jasnih razlik med pojavnostjo po sezoni vzorčenja oziroma je število izolatov prenizko.

Rezultati naše raziskave kažejo, da je bakterija *C. difficile* v velikem deležu prisotna v rečnem sedimentu reke Drave. V vzorcih rečnega sedimenta se pojavljajo genotipi, ki jih najdemo pri ljudeh v Sloveniji, zato sklepamo, da rečni sediment predstavlja možen rezervoar za okužbo s *C. difficile*. V prihodnje bi bilo smiselno primerjati rečni sediment, pridobljen ob neposeljenih območjih rek, saj bi tako lahko izključili možnost vnosa spor *C. difficile* iz odpadnih vod.

VIRI IN LITERATURA

- Al Saif, N. in Brazier, J. S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 4(52), 133–137.
- Avbersek, J., Janezic, S., Pate, M., Rupnik, M., Zidaric, V., Logar, K. in Ocepek, M. (2009). Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 15(6), 252–255.
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E. in Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, 5(5), 579–593.
- Bandelj, P., Trilar, T., Blagus, R., Ocepek, M., Rousseau, J., Weese, J. in Vengust, M. (2014). Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European Barn Swallows (*Hirundo rustica*) during migration. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 40.
- Bandelj, P., Trilar, T., Racnik, J., Zadavec, M., Pirs, T., Avbersek, J. in Vengust, M. (2011). Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 183–185.
- Bandelj, P., Blagus, R., Briski, F., Frlic, O., Vergles Rataj, A., Rupnik, M. in Vengust, M. (2016). Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms. *Veterinary Research*, 47, 1.
- Borriello, S. P., Honour, P. in Barclay, F. (1983). Foodborne transmission of *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 84(1), 201.
- Brown, K. A., Daneman, N., Arora, P., Moineddin, R. in Fisman, D. N. (2013). The co-seasonality of pneumonia and influenza with *Clostridium difficile* infection in the United States, 1993–2008. *American Journal of Epidemiology*, 178, 118–125.

- Burnham, C. D. in Carroll, K. C. (2013). Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: An Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 604–630.
- Curry, S. (2010). *Clostridium difficile*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 329–342.
- Daniels, L. M. in Kufel, W. D. (2018). Clinical review of *Clostridium difficile* infection: an update on treatment and prevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(16), 1759–1769.
- Dalu, T., Wasserman, R. J., Wu, Q., Froneman, W. P. in Weyl, O. L. F. (2017). River sediment metal and nutrient variations along an urban–agriculture gradient in an arid austral landscape: implications for environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3). 2842–2852.
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., di Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins*, 8(5), 134.
- Drury, B., Rosi-Marshall, E. in Kelly, J. J. (2013). Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1897–1905.
- ECDC. (2018). Annual epidemiological report for 2016: Healthcare-associated infections: *Clostridium difficile* infections. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Eckert, C., Burghoffer, B., Lalande, V. in Barbut, F. (2012). Evaluation of the Chromogenic Agar chromID *C. difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 1002–1004.
- Emele, M. F., Joppe, F. M., Riedel, T., Overmann, J., Rupnik, M., Cooper, P. in Zautner, A. E. (2019). Proteotyping of *Clostridioides difficile* as Alternate Typing Method to Ribotyping Is Able to Distinguish the Ribotypes RT027 and RT176 From Other Ribotypes. *Frontiers in Microbiology*, 10(10), 2087.

- Escobar-Cortés, K., Barra-Carrasco, J. in Paredes-Sabja, D. (2013). Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. *Journal of Microbiological Methods*, 93(1), 25–31.
- Foster, N. F. in Riley T. V. (2012). Improved recovery of *Clostridium difficile* spores with the incorporation of synthetic taurocholate in cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA). *Pathology*, 44(4), 354–356.
- Furuya-Kanamori, L., McKenzie, S. J., Yakob, L., Clark, J., Paterson, D. L., Riley, T. V. in Clements, A. C. (2015). *Clostridium difficile* Infection Seasonality: Patterns across Hemispheres and Continents – A Systematic Review. *PLOS ONE*, 16(10), 3.
- Guh, A. Y., Adkins, S. H., Li, Q., Bulens, S. N., Farley, M. M., Smith, Z. in McDonald, L. C. 2017. Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection in Adults: A Case-Control Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 26(4) 4.
- Gurian, L., Ward, T. T., Katon, R. M. (1982). Possible foodborne transmission in a case of pseudomembranous colitis due to *Clostridium difficile*: Influence of gastrointestinal secretion on *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology*, 83, 465–469
- Hargreaves, K. R., Colvin, H. V., Patel, K. V., Clokie, J. J. P. in Clokie, M. R. J. (2013). Genetically Diverse *Clostridium difficile* Strains Harboring Abundant Prophages in an Estuarine Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6236–6243.
- Hawken, P., Weese, J. S., Friendship, R. in Warriner, K. (2013). Longitudinal Study of *Clostridium difficile* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Pigs from Weaning through to the End of Processing. *Journal of Food Protection*, 7(64), 624–630.
- Janežic, S., Indra, A., Rattei, T., Weinmaier, T. in Rupnik, M. (2014). Recombination Drives Evolution of the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region. *PLOS ONE*, 15(9), 9.

- Janezic, S., Mlakar, S. in Rupnik, M. (2018). Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: Dog paws and shoes. *Zoonoses and Public Health*, 65(6), 669-674.
- Janezic, S., Ocepek, M., Zidaric, V. in Rupnik, M. (2012). *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiology*, 12(1), 48.
- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V. in Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *PLOS ONE*, 23(11), 11.
- Janezic, S. in Rupnik, M. (2015). Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Research in Microbiology*, 166(4), 353–360.
- Janezic, S., Strumbelj, I. in Rupnik, M. (2011). Use of Modified PCR Ribotyping for Direct Detection of *Clostridium difficile* Ribotypes in Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3024–3025.
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37, 13–24.
- Joshi, L. T., Phillips, D. S., Williams, C. F., Alyousef, A. in Baillie, L. (2012). The contribution of the spore to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7671–7679.
- Khanna, S. in Gupta, A. (2014). Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infection and Drug Resistance*, 17(7), 63–72.
- Kazanowski, M., Smolarek, S., Kinnarney, F. in Grzebieniak, Z. (2013). *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities—a systematic review. *Techniques in Coloproctology*, 18(3), 223–232.
- Kliegman, R., Behrman, R., Jenson, H. in Stanton, B. (2007). Nelson Textbook of Pediatrics. Filadelfija: Saunders.
- Knight, D. R., Squire, M. M., Collins, D. A. in Riley, T. V. (2017). Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans

- Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Frontiers in Microbiology*, 11(7), 2138.
- Knight, D. R., Thean, S., Putsathit, P., Fenwick, S. in Riley, T. V. (2013). Cross-Sectional Study Reveals High Prevalence of *Clostridium difficile* Non-PCR Ribotype 078 Strains in Australian Veal Calves at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2630–2635.
- Krutova, M., Zouharova, M., Matejkova, J., Tkadlec, J., Krejčí, J., Faldyna, M., Nyc O. in Bernardy, J. (2018). The Emergence of *Clostridium Difficile* PCR Ribotype 078 in Piglets in the Czech Republic Clusters With *Clostridium Difficile* PCR Ribotype 078 Isolates From Germany, Japan and Taiwan. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(7), 770–775.
- Kuiper, G. A., van Prehn, J., Ang, W., Kneepkens, F., van der Schoor, S. in de Meij, T. (2017). *Clostridium difficile* infections in young infants: Case presentations and literature review. *IDCases*, 24(10), 7–11.
- Levett, P. N. (1986). *Clostridium difficile* in habitats other than the human gastrointestinal tract. *Journal of Infection*, 12(3), 253–263.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrel, K. L. in Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99.
- Mada, P. K. in Alam, M. U. (2019). *Clostridium Difficile*. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- McGovern, A. M., Androga, G. O., Knight, D. R., Watson, M. W., Elliott, B., Foster, N. F. in Riley, T. V. (2017). Prevalence of binary toxin positive *Clostridium difficile* in diarrhoeal humans in the absence of epidemic ribotype 027. *PLOS ONE*, 8(12), 11.
- Moono, P., Foster, N. F., Hampson, D. J., Knight, D. R., Bloomfield, L. E. in Riley, T. V. (2016). *Clostridium difficile* Infection in Production Animals and Avian Species: A Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 647–655.

- Mullish, B. H. in Williams, H. R. (2018). *Clostridium difficile* infection and antibiotic-associated diarrhoea. *Clinical Medicine*, 18(3), 237–241.
- Ofori, E., Ramai, D., Dhawan, M., Mustafa, F., Gasperino, J. in Reddy, M. (2018). Community-acquired *Clostridium difficile*: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. *Journal of Hospital Infection*, 99(4), 436–442.
- Ofori, A. (2016). *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. *Annals of Gastroenterology*, 29(2), 147–154.
- Passmore, I. J., Letertre, M. P., Preston, M. D., Bianconi, I., Harrison, M. A., Nasher, F. in Dawson, L. F. (2018). Para-cresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLOS Pathogens*, 12(14), 9.
- Pasquale, V., Romano, V. J., Rupnik, M., Dumontet, S., Čižnár, I., Aliberti, F. in Krovacek, K. (2011). Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from shellfish and marine environments. *Folia Microbiologica*, 56(5), 431–437.
- Perumalsamy, S., Putsathit, P. in Riley, T. V. (2019). High prevalence of *Clostridium difficile* in soil, mulch and lawn samples from the grounds of Western Australian hospitals. *Anaerobe*, 60, 102065.
- Pruitt, R. N. in Lacy, D. B. (2012). Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 16(2), 28.
- Revolinski, S. L. in Munoz-Price, L. S. (2018). *Clostridium difficile* in Immunocompromised Hosts: A Review of Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 68(12), 2144–2153.
- Ruiz-González, C., Niño-García, J. P. in Giorgio, P. A. (2015). Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks. *Ecology Letters*, 18(11), 1198–1206.

- Rodriguez, C., Bouchafa, L., Soumillion, K., Ngyuvula, E., Taminiau, B., Van Broeck, J. in Daube, G. (2019). Seasonality of *Clostridium difficile* in the natural environment. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(6), 2440–2449.
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M. in Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*, 932, 65–92.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., Daignault, D., Janecko, N., Avery, B. P., Martin, H., Thomspson, A. D., McDonald, L. C., Limbago, B. in Weese, J. S. (2009). Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 802–805.
- Romano, V., Pasquale, V., Krovacek, K., Mauri, F., Demarta, A. in Dumontet, S. (2012). Toxigenic *Clostridium difficile* PCR Ribotypes from Wastewater Treatment Plants in Southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6643–6646.
- Romano, V., Pasquale, V., Lemee, L., El Meouche, I., Pestel-Caron, M., Capuano, F. in Dumontet, S. (2018). *Clostridioides difficile* in the environment, food, animals and humans in southern Italy: Occurrence and genetic relatedness. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 59, 41–46.
- Rupnik, M. (2010). Toxinotyping. *Methods in Molecular Biology*, 54(1), 13–18.
- Rupnik, M., Braun, V., Soehn, F., Janc, M., Hofstetter, M., Laufenberg-Feldmann, R. in von Eichel-Streiber, C. (1997). Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 148(2), 197–202.
- Rupnik, M., Glaser, S., Andlovic, A., Berce, I., Čretnik, T., Drinovec, B., Harlander, T., Orešič, N., Ravnik, M. in Štrumbelj, I. (2013). Diversity of *C. difficile* PCR ribotypes isolated from hospitalised patients in Slovenia during two-winter-month period. *Zdravniski Vestnik*, 82, 739–745.
- Rupnik, M. in Janezic, S. (2015). An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 13–18.

- Rupnik, M. in Songer, J. G. (2010). *Clostridium difficile*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 53–66.
- Rupnik, M., Tambic Andrasevic, A., Trajkovska Dokic, E., Matas, I., Jovanovic, M., Pasic, S. in Janezic, S. (2016). Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries. *Anaerobe*, 42, 142–144.
- Rupnik, M., Wilcox, M. H. in Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526–536.
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmooch, G., Grossmann, E. in Seyboldt, C. (2013). Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. *Journal of Medical Microbiology*, 62(8), 1190–1198.
- Silva, R. O. S., Rupnik, M., Diniz, A. N., Vilela, E. G. in Lobato, F. C. F. (2015). *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 8: 1062–1065.
- Simango, C. (2006). Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(12), 1146–1150.
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H. in Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(2), 16020.
- Stergachis, A, Perera, D. R., Schnell, M. M. in Jick, H. (1984). Antibiotic-associated colitis. *Western Journal of Medicine*, 140(2), 217–219.
- Tariq, R., Singh, S., Gupta, A., Pardi, D. S. in Khanna, S. (2017). Association of Gastric Acid Suppression With Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *JAMA Internal Medicine*, 177(6), 784.
- Tkalec, V., Janezic, S., Skok, B., Simoncic, T., Mesaric, S., Vrabec, T. in Rupnik, M. (2018). High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes compared to some other vegetables in Slovenia. *Food Microbiology*, 78, 194–200

- Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N. K. in Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3), 1–46.
- Van Dorp, S. M., de Greeff, S. C., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., Dekkers, O. M., Knetsch, C. W. in Kuijper, E. J. (2017). Ribotype 078 *Clostridium difficile* infection incidence in Dutch hospitals is not associated with provincial pig farming: Results from a national sentinel surveillance, 2009-2015. *PLOS ONE*, 29(12), 12.
- Wang, L., Zhang, J., Li, H., Yang, H., Peng, C., Peng, Z. in Lu, L. (2018). Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Science of The Total Environment*, 15(627), 600–612.
- Weese, J. S., Reid-Smith, R. J. in Avery, B. P., Rousseau J. (2010). Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 75(15), 5009–5011.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems* (3rd ed.). San Diego, CA: Gulf professional publishing
- Xu, C., Weese, J. S., Flemming, C., Odumeru, J. in Warriner, K. (2014). Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 891–904.
- Zidaric, V., Beigot, S., Lapajne, S. in Rupnik, M. (2010). The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. *Anaerobe*, 16(4), 371–375.
- Zidaric, V., Zemljic, M., Janezic, S., Kocuvan, A. in Rupnik, M. (2008). *High diversity of Clostridium difficile genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. Anaerobe*, 14(6), 325–327.

PRILOGA

Priloga A: Dendrogram podobnosti profilov referenčnih sevov pridobljenih z metodo PCR-ribotipizacije, osamljenih iz vzorcev rečnih sedimentov.

