

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Anna Malinová

Výskyt a molekulární typizace kmenů *Clostridium difficile* v České republice

Incidence and molecular typing of *Clostridium difficile* strains in the Czech Republic

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Alena Jirásková, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Aleny Jiráskové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.8.2012

.....

Anna Malinová

Práce vznikla v rámci grantového projektu KJB500200901 „Výskyt a typizace patogenních kmenů *Clostridium difficile* v České Republice“ poskytnutého Grantovou agenturou Akademie věd České republiky.

Děkuji především RNDr. Aleně Jiráskové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas. Dále děkuji MUDr. Renatě Čermákové, MUDr. Věře Palečkové, MUDr. Blance Sýkorové a RNDr. Jiřímu Malinovi, CSc. za poskytnutí kmenů *C. difficile*. V neposlední řadě děkuji vedení a kolektivu Laboratoře pro výzkum nemoci jater a metabolismu hemu (ÚLBLD 1. LF UK) a Laboratoře buněčné signalizace (MBÚ AVČR) za vytvoření přátelského pracovního prostředí a všestrannou pomoc. Nemalý dík patří mým blízkým za jejich podporu.

ABSTRAKT

Clostridium difficile je významným původcem nemocničních střevních infekcí. Souhrnně jsou onemocnění způsobená *C. difficile* označována jako CDAD (*Clostridium difficile* associated disease) a v posledním desetiletí je pozorován celosvětový nárůst jejich výskytu a závažnosti. Přesto jsou údaje o výskytu CDAD v České republice značně omezené. Hlavním cílem této práce bylo pomocí metod PCR toxinotypizace, PCR ribotypizace a MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) charakterizovat kmeny *C. difficile*, které byly izolovány od pacientů s gastrointestinální symptomatologií hospitalizovaných ve 4 pražských zdravotnických zařízeních v letech 2008 – 2011. Mezi 273 izoláty *C. difficile* jsme identifikovali 8 toxinotypů (0, III, IV, V, VI, VIII, IX a XXIII) a 63 ribotypů. Nejčastějšími byly ribotypy 596 (23,4 %), 017 (13,9 %) a 176 (7 %). Z hlediska zastoupení ribotypů se situace v České republice nejvíce podobá situaci v Polsku. Pomocí metody MLVA jsme kmeny patřící do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 a ribotypů 596 a 596/1 zařadili do 5 a 4 klonálních skupin, žádná ze skupin ovšem neměla dominantní zastoupení v některé z nemocnic. *C. difficile* je také významný zvířecí patogen, proto jsme provedli studii, jejímž cílem bylo izolovat *C. difficile* ze stolice selat na náhodně vybrané farmě. *C. difficile* se nám podařilo izolovat z 19 vzorků ze 30 (63,3 %), všechny kmeny jsme zařadili do toxinotypu 0, ribotypu AI-12.

Klíčová slova: CDAD, *Clostridium difficile*, epidemiologie, MLVA, nemocniční nákaza, PaLoc, PCR ribotypizace, PCR toxinotypizace, TcdA, TcdB

ABSTRACT

Clostridium difficile is a major cause of infectious diarrhea in hospitalized patients. *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD) is of gaining importance now due to its increasing incidence and severity. However, little is known about the *C. difficile* infections in the Czech Republic. The aim of the study was to characterize *C. difficile* strains recently isolated (2008 to 2011) from patients hospitalized with gastrointestinal disease in four Prague health care institutions using molecular typing methods; PCR toxinotyping, PCR ribotyping and MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis). Among 273 *C. difficile* strains, we identified 8 toxinotypes (0, III, IV, V, VI, VIII, IX a XXIII) and 63 ribotypes, of which ribotypes 596 (23,4 % patient), 017 (13,9 %) and 176 (7 %) were the most frequent. According to PCR ribotyping, the situation in the Czech Republic is the most similar to the situation in Poland. Within ribotypes 017, 017/1 and 017/2 and ribotypes 596 and 596/1, 5 and 4 distinct clusters were identified by MLVA, none of which was institution-specific. Additionally, pathogenic *C.difficile* were isolated from piglet faeces (63,3 %) in a single piglet farm, evaluating the role of *C. difficile* as an emerging animal pathogen. All piglet isolates belonged to the toxinotype 0 and the ribotype AI-12.

Key words: CDAD, *Clostridium difficile*, epidemiology, MLVA, nosocomial infection, PaLoc, PCR ribotyping, PCR toxinotyping, TcdA, TcdB

OBSAH

ABSTRAKT	4
OBSAH	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	11
2 PŘEHLED LITERATURY	12
2.1 <i>Clostridium difficile</i>	12
2.1.1 Výskyt	12
2.1.2 Faktory virulence	13
2.1.2.1 Velké klostridiové toxiny	13
2.1.2.2 Binární toxin	15
2.1.2.3 Další virulentní faktory	16
2.2 Diagnostika	17
2.2.1 Kultivace patogenních kmenů	17
2.2.2 Cytotoxický test	17
2.2.3 Imunologické metody	17
2.2.4 Molekulární metody	18
2.3 CDAD	20
2.3.1 Rizikové faktory	20
2.3.1.1 Komunitní infekce	20
2.3.1.2 Antibiotická rezistence	21
2.3.2 Imunitní odpověď	22
2.3.3 Klinický obraz	22
2.3.4 Léčba	23
2.4 Molekulární typizace	24
2.4.1 Toxinotypizace	25
2.4.2 Ribotypizace	29
2.4.2.1 MLVA	30
2.5 Epidemiologie	32
2.5.1 Svět	32
2.5.2 Evropa	33
2.5.2.1 Česká republika	35
2.5.2.2 Výskyt <i>C. difficile</i> u zvířat	36
3 MATERIÁL A METODY	37
3.1 Materiál	37
3.1.1 Bakteriální kmeny	37
3.1.1.1 Typové kmeny <i>C. difficile</i>	37
3.1.1.2 Kmeny <i>C. difficile</i> izolované z pacientů	37
3.1.1.3 Kmeny <i>C. difficile</i> izolované z prasat	38
3.1.2 Média pro kultivaci <i>C. difficile</i>	38
3.1.2.1 Kultivace kmenů <i>C. difficile</i> izolovaných z pacientů	38
3.1.2.2 Kultivace kmenů <i>C. difficile</i> izolovaných z prasat	39
3.1.3 Pufry a roztoky	39

3.1.4	Enzymy	39
3.1.5	Komerční soupravy a standardy	40
3.1.6	Chemikálie a ostatní použité materiály	40
3.1.6.1	Kapilární gelová elektroforéza (sekvenátor Beckman CEQ 8000)	41
3.1.7	Oligonukleotidy pro PCR	41
3.1.7.1	Fluorescenčně značené oligonukleotidy	42
3.1.8	Přístroje	42
3.1.9	Počítačová analýza	42
3.2	Metody	43
3.2.1	Kultivace kmenů <i>C. difficile</i> izolovaných ze stolice pacientů	43
3.2.2	Izolace a kultivace kmenů <i>C. difficile</i> ze stolice selat	43
3.2.3	Izolace DNA	44
3.2.4	Imunochromatografické stanovení toxinů A a B	44
3.2.5	Polymerázová řetězová reakce – PCR	44
3.2.5.1	Detekce částí genů <i>cdd3</i> , <i>tcdC</i> a úseku <i>Lok3/Lok1</i>	45
3.2.5.2	PCR toxinotypizace	47
3.2.5.3	Detekce binárního toxinu	48
3.2.5.4	PCR Ribotypizace	48
3.2.5.5	PCR MLVA	49
3.2.6	Štěpení fragmentů A3 a B1 restrikčními endonukleázami	49
3.2.7	Agarózová gelová elektroforéza	50
3.2.8	Kapilární gelová elektroforéza	50
3.2.8.1	Kapilární gelová elektroforéza - ribotypizace	50
3.2.8.2	Kapilární gelová elektroforéza - MLVA	51
3.2.9	Shluková analýza MLVA	51
3.2.10	Příprava produktů DNA na sekvenaci	52
4	VÝSLEDKY	53
4.1	Výskyt <i>C. difficile</i>	53
4.2	diagnostika <i>C. difficile</i> na klinických pracovištích	54
4.3	Molekulární diagnostika <i>C. difficile</i>	55
4.4	Toxinotypizace	56
4.5	Detekce Binárního toxinu	59
4.6	Ribotypizace	60
4.7	MLVA	71
4.8	Výskyt <i>C. difficile</i> u prasat	75
5	DISKUZE	79
5.1	Výskyt <i>C. difficile</i>	79
5.2	Diagnostika <i>C. difficile</i>	81
5.2.1	Shrnutí	82
5.3	Patogenita izolovaných kmenů <i>C. difficile</i>	83
5.4	Toxinotypizace	84
5.5	Binární toxin	85
5.6	Ribotypizace	86
5.6.1	Ribotypy 017, 017/1 a 017/2	86
5.6.2	Ribotypy 027, 176 a 036	87
5.6.3	Ribotypy 014 a 020	88

5.6.4	Nepatogenní ribotypy	88
5.6.5	Shrnutí	89
5.7	MLVA	90
5.8	Výskyt <i>C. difficile</i> u prasat	92
6	SOUHRN	94
7	SEZNAM LITERATURY	96

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

027/NAP1/B1	PCR ribotype 027, PFGE type NAP1, REA type B1	PCR ribotyp 027, PFGE typ NAP1, REA typ B1
A-B+	toxin A negative, toxin B positive strain	kmen neprodukující toxin A a produkující toxin B
AFLP	amplified fragment length polymorphism	polymorfizmus délek amplifikovaných fragmentů
AP-PCR	arbitrary primed polymerase chain reaction	
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> -associated disease	onemocnění způsobená <i>Clostridium difficile</i>
CDT	<i>Clostridium difficile</i> binary toxin	binární toxin <i>Clostridium difficile</i>
CDTa		katalytická podjednotka binárního toxinu
CDTb		vazebná a transportní podjednotka binárního toxinu
CdtLoc		lokus kódující binární toxin
EIA	enzyme immunoassay	
GDH	glutamate dehydrogenase	glutamát dehydrogenáza
FNB		fakultní nemocnice Na Bulovce
FTN		fakultní Thomayerova nemocnice
ISR	intergenic spacer region	intergenová oblast DNA
MLST	multilocus sequence typing	
MLVA	multilocus variable number tandem repeat analysis	
NAAT	nucleic acid amplification testing	
PaLoc	pathogenicity locus	lokus patogenicity
PB		poliklinika Barrandov

PFGE	pulsed field gel electrophoresis	pulzní gelová elektroforéza
PMC	pseudomembranous colitis	pseudomembranózní kolitida
PPIs	proton-pump inhibitors	inhibitory protonové pumpy
RE	restriction enzymes	restrikční enzymy
REA	endonuclease restriction analysis	
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délek restrikčních fragmentů
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction	
<i>slp</i> AST	surface layer protein A gene sequence typing	
SLS	sample loading solution	
TcdA	toxin A <i>Clostridium difficile</i>	toxin A <i>Clostridium difficile</i>
TcdB	toxin B <i>Clostridium difficile</i>	toxin B <i>Clostridium difficile</i>
TcdC		negativní regulátor produkce toxinů
TcdR		pozitivní regulátor produkce toxinů
TRST	tandem repeat sequence typing	
VFN		Všeobecná fakultní nemocnice

1 ÚVOD

C. difficile patří mezi klinicky významné grampozitivní bakterie. Roku 1978 bylo *C. difficile* identifikováno jako původce různě závažných gastrointestinální onemocnění. Souhrnně jsou tato onemocnění označována jako CDAD (*Clostridium difficile*-associated disease) a mezi jejich hlavní projevy patří průjemy a kolitidy, v závažných případech se u pacientů může vyvinout až život ohrožující pseudomembranózní kolitida (PMC) (GEORGE *et al.* 1978; LARSON *et al.* 1978).

Infekční choroby se objevují a následně šíří po celém světě a je nutné jejich šíření sledovat a snažit se mu předcházet. Epidemiologická data ukazují, že problematika infekcí způsobených *C. difficile* je v poslední době velmi aktuální. Vzárostající výskyt CDAD, šíření vysoce virulentních kmenů a stoupající rezistence patogenních kmenů *C. difficile* k běžně podávaným antibiotikům svědčí o nezbytnosti monitorovat šíření těchto infekcí a typizovat patogenní kmeny, které je vyvolávají. V České republice nebyla problematika epidemiologie CDAD a identifikace patogenních kmenů doposud adekvátně řešena, ojedinělé práce se zabývají diagnostikou a výskytem CDAD (ZEMANOVÁ *et al.* 2003, POLÍVKOVÁ *et al.* 2010, VOJTILOVÁ *et al.* 2011).

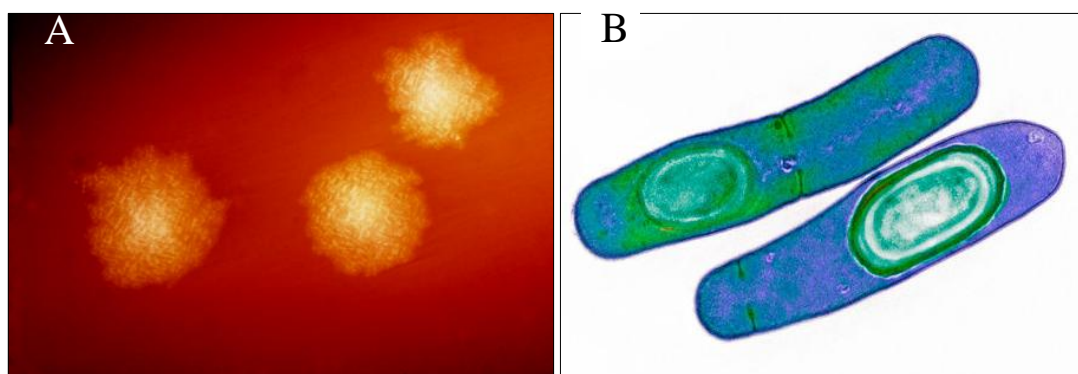
Cílem projektu, jehož součástí je i zpracování této diplomové práce, je přinést nové informace týkající se epidemiologie CDAD v České republice a pomocí metod molekulární typizace charakterizovat kmeny *C. difficile*, které byly izolovány z pacientů ve 4 pražských zdravotnických zařízeních v letech 2008 – 2011. Molekulární typizací je možno zjistit genetickou variabilitu kmenů *C. difficile* způsobujících CDAD a z četnosti jednotlivých typů můžeme usuzovat na šíření kmenů v rámci jednotlivých zdravotnických zařízení a jejich klinik a oddělení. Tato data by následně měla přispět k zavedení preventivních opatření s přímým dopadem na zdraví pacientů. Významným přínosem tohoto projektu by mělo být vytvoření sbírky typových kmenů.

C. difficile je také významný zvířecí patogen, dalším z našich cílů proto bylo provedení pilotní studie zaměřené na výskyt *C. difficile* u selat v České republice.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

C. difficile je obligátně anaerobní sporulující bakterie tyčinkovitého tvaru, která byla poprvé izolována v roce 1935 ze stolice dítěte. Název “*difficile*” (lat. *difficilis*, obtížný) byl zvolen kvůli obtížné kultivaci, která souvisí především s pomalým růstem této bakterie (HALL a O'TOOLE 1935). Díky používání selektivních médií obohacených o inhibitory růstu ostatní přítomné flóry, cefoxitin a cykloserin, byly tyto problémy již překonány (GEORGE *et al.* 1979). Při růstu na pevných kultivačních médiích jsou kolonie *C. difficile* šedobílé, ploché s nerovnými okraji a je pro ně typický zápach připomínající koňský hnůj (Obr. 1).



Obr. 1: *C. difficile* A) Kolonie *C. difficile* po 48 h růstu na krevním agaru. B) *C. difficile* zobrazeno pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Oválné útvary uvnitř bakterií jsou vznikající endospory. Převzato z <http://www.sciencephoto.com>.

2.1.1 VÝSKYT

C. difficile kolonizuje zažívací trakt živočichů a člověka, ale běžně se vyskytuje i v půdě, slaných a sladkých vodách a v nemocničním prostředí (AL SAIF *et al.* 1996). Bakterie byla také nalezena v mase hospodářských zvířat i mořských měkkýšů, na zelenině a v planktonu (SONGER *et al.* 2009, PASQUALE *et al.* 2011, BAKRI *et al.* 2009).

C. difficile se asymptomaticky vyskytuje v gastrointestinálním traktu u 3-5 % dospělé populace (VISCIDI *et al.* 1981, MIYAJIMA *et al.* 2011), pravděpodobnost asymptomatické kolonizace se zvyšuje při hospitalizaci (MCFARLAND *et al.* 1989) a při pobytech v léčebnách pro dlouhodobě nemocné (RIGGS *et al.* 2007). U dětí dochází

ke kolonizaci zažívacího traktu *C. difficile* krátce po narození. Během prvního roku života je tato bakterie přítomna u velké části dětské populace, obzvláště vysoká míra kolonizace (až 90 %) je spojena s prodlouženou hospitalizací novorozenců (STARK *et al.* 1982). Mnohé kmeny izolované ze stolice dětí jsou toxigenní, přesto k rozvoji infekce dochází jen ve výjimečných případech (LARSON *et al.* 1982). Důvodem nízkého výskytu CDAD u novorozenců by mohl být menší počet toxinových receptorů ve střevním traktu, což bylo prokázáno u novorozených králíků (EGLOW *et al.* 1992). Další možné vysvětlení asymptomatického výskytu *C. difficile* u dětí může souviset s výrazným nárůstem protilátek proti toxinům A a B během prvních dvou let života (VISCIDI *et al.* 1983). K rozvoji CDAD dochází u dětí většinou pouze v případě, je-li přítomna jiná komorbidita (CASTAGNOLA *et al.* 2009).

2.1.2 FAKTORY VIRULENCE

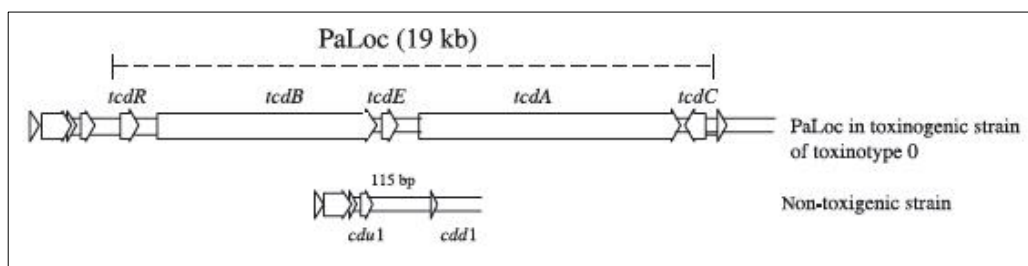
K patogenicitě *C. difficile* přispívá řada virulentních faktorů, nejvýznamnějšími jsou exotoxiny TcdA a TcdB, které narušují střevní sliznici a způsobují průjemová onemocnění (SULLIVAN *et al.* 1982). Některé kmeny *C. difficile* produkují navíc ještě tzv. binární toxin (CDT), jehož role v patogenezi onemocnění není ještě zcela objasněna (POPOFF *et al.* 1988).

2.1.2.1 Velké klostridiové toxiny

Toxiny A (308 kDa) a B (269,6 kDa) jsou vzhledem k své molekulové hmotnosti řazeny spolu s letálním toxinem *Clostridium sordellii* a toxinem α *Clostridium novyi* mezi velké klostridiové toxiny, jejichž působení spočívá v modifikaci malých GTP-vázajících proteinů (JUST a GERHARD 2004).

Geny kódující toxiny A a B (*tcdA* a *tcdB*) jsou spolu s geny *tcdR*, *tcdC* a *tcdE* součástí lokusu označovaného jako PaLoc (Pathogenicity locus) (Obr. 2). Tento lokus o velikosti přibližně 19,6 kb je přítomen u všech patogenních kmenů, nepatogenní kmeny mají tuto oblast nahrazenou nekódující sekvencí o velikosti 115 bp (BRAUN *et al.* 1996). Gen *tcdE* kóduje protein podobný bakteriofágovému proteinu holinu a podílí se na vytvoření póru, kterým jsou toxiny A a B uvolňovány ven z buňky (TAN *et al.* 2001). Produktem genu *tcdR* je alternativní faktor σ RNA polymerázy, který pozitivně reguluje transkripci genů *tcdA* a *tcdB*, a jeho exprese je zvýšena během stacionární fáze (MANI a DUPUY 2001). V exponenciální fázi je naopak exprimován gen *tcdC*, jehož produkt destabilizuje TcdR a je tak negativním regulátorem produkce toxinů

(MATAMOUROS *et al.* 2007). Exprese toxinových genů *tcdA* a *tcdB* je regulována i geny lokalizovanými mimo PaLoc, například genem *CodY* (DINEEN *et al.* 2007). Produkt tohoto genu se v přítomnosti dostatečného množství živin (vybraných aminokyselin a GTP) váže do promotoru genu *tcdR*, brání tak jeho transkripci, a tím negativně reguluje vznik toxinů.

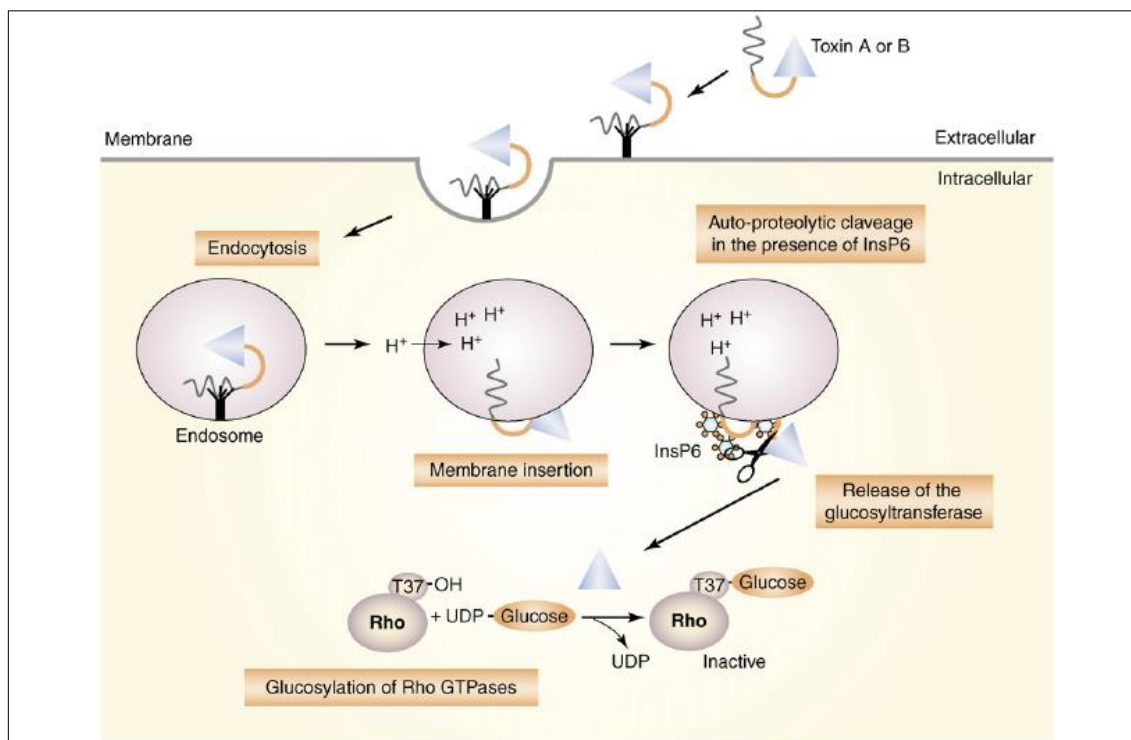


Obr. 2: Lokus PaLoc. Schéma lokusu PaLoc, který kóduje toxiny A a B (*tcdA* a *tcdB*) a pomocné a regulační geny *tcdR*, *tcdE* a *tcdC*. U kmenů, které toxiny neprodukují, je tato oblast nahrazena nekódující sekvencí o velikosti 115 bp. Převzato z KUIJPER *et al.* (2006).

Toxiny A a B jsou vysoce sekvenčně i strukturně podobné (PRUITT *et al.* 2010). Jsou to velké monomerní glucosyltransferázy složené ze 4 domén: (A) N-terminální katalytické domény, (B) C-terminální vazebné domény, (C) proteázové domény a (D) hydrofóbní domény (JANK a AKTORIES 2008). Toxin je endocytován po navázání domény 'B' na specifické receptory na povrchu buňky (FRISCH *et al.* 2003). Po následném snížení pH v endosomu a vytvoření póru doménou 'D' dochází k translokaci části toxinu do cytoplazmy (BARTH *et al.* 2001). V cytoplazmě je pomocí autoproteolytické aktivity domény 'C' odštěpena doména 'A' (EGERER *et al.* 2007, REINEKE *et al.* 2007). Doména 'A' katalyzuje glykosylaci GTP-vázajících proteinů rodiny Ras (Rho, Rac a Cdc42), které se podílí na řadě signálních procesů v buňce, zvláště na regulaci aktinového cytoskeletu (Obr. 3). Glykosylace proteinů rodiny Ras způsobí depolymeraci aktinových filament, narušení cytoskeletu a řady signálních drah, popřípadě až buněčnou smrt (JUST *et al.* 1995a,b). TcdA navíc stimuluje produkci cytokinů a aktivitu neutrofilů a makrofágů a přispívá tak k vzniku zánětu (HE *et al.* 2002, KELLY *et al.* 1994).

Toxin A je enterotoxin, poškozuje buňky střevního epitelu a způsobuje kumulaci tekutin ve střevě, což má za následek vznik průjmů. Toxin B je cytotoxin, který poškozuje buňky nespecificky a způsobuje nekrózu tkáně. Většina patogenních kmenů produkuje oba toxiny. Dříve byla hlavní role v rozvoji onemocnění připisována toxinu

A, ale zvýšení výskytu patogenních kmenů produkujících pouze toxin B (tzv. A⁻/B⁺) ukazuje na to, že toxin A není pro virulenci esenciální (ALFA *et al.* 2000). Současná studie KUEHNE *et al.* (2010) tvrdí, že oba toxiny mohou způsobovat onemocnění nezávisle.

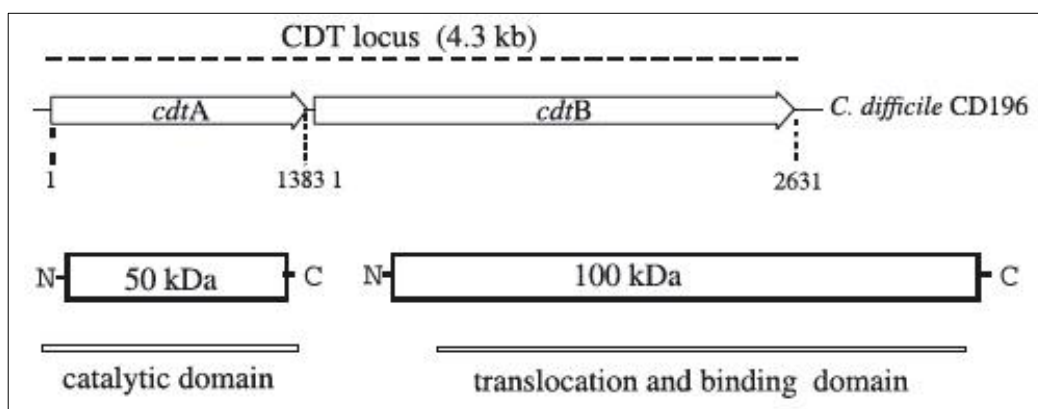


Obr. 3: Mechanismus vstupu toxinů A a B do buňky a jejich působení na GTP-vázající proteiny. Převzato z JANK a AKTORIES (2008).

2.1.2.2 Binární toxin

Binární toxin je kódován v tzv. Cdt lokusu (CdtLoc) (Obr. 4) a v současnosti ho produkuje až 23 % izolovaných patogenních kmenů (BAUER *et al.* 2011). Kmeny, které CDT neprodukují, mají na místě CdtLoc konzervovanou sekvenci o velikosti 68 bp (CARTER *et al.* 2007). CDT se skládá ze dvou samostatných podjednotek, CDTa (48 kDa) a CDTb (74 kDa) (Obr. 4). Podjednotka CDTb zprostředkovává vazbu na povrchové receptory a transport CDTa do buňky. Podjednotka CDTa katalyzuje ADP-ribosylaci G-aktinu v cytoplazmě, což brání jeho polymeraci, způsobuje narušení cytoskeletu a může vést až k smrti buňky (PERELLE *et al.* 1997). V lokusu CdtLoc se dále nachází gen *cdtR*, který kóduje pozitivní regulátor produkce binárního toxinu (CARTER *et al.* 2007). Role binárního toxinu v patogenezi CDAD nebyla doposud zcela objasněna. *In vitro* byla prokázána jeho toxicita na linii buněk Vero (SUNDRIYAL *et al.* 2010), ale u křečků kolonizovaných kmeny *C. difficile* A⁻/B⁻/CDT⁺

k rozvoji onemocnění nedošlo (GERIC *et al.* 2006). Na povrchu buněk napadených kmeny A⁻B⁻/CDT⁺ se tvoří dynamické výrůstky, jejichž vznik souvisí s depolymerací mikrofilament. Tyto výrůstky zvyšují přilnavost bakterií k povrchu buněk a usnadňují tak kolonizaci zažívacího traktu (SCHWAN *et al.* 2009). Toxin CDT je produkován některými vysoce virulentními kmeny *C. difficile* a mohl by přispívat k zvýšení jejich virulence (CARROLL a BARTLETT 2011).



Obr. 4: Lokus CdtLoc. Schéma lokusu CdtLoc, který kóduje geny pro binární toxin (*cdtA* a *cdtB*) a regulační gen *cdtR*. Pod CdtLoc jsou schématicky znázorněny 2 proteiny binárního toxinu, CDTa (katalytická funkce) a CDTb (vazebná a translokační funkce). Převzato z KUIJPER *et al.* (2006).

2.1.2.3 Další virulentní faktory

Produkce toxinů není jediným faktorem přispívajícím k virulenci *C. difficile*. Kolonizace hostitele je důležitý krok v patogenezi CDAD a existuje celá řada faktorů účastnících se adheze bakterie k střevní sliznici. Byla pozorována zvýšená exprese povrchových adhezínů po podání ampicilinu a clindamycinu (DENEVE *et al.* 2008). Bakterie mají na svém povrchu kompaktní proteinovou vrstvu, označovanou jako vrstva S. Tato vrstva obsahuje dva druhy proteinů orientovaných vně buňky, které jsou kódovány genem *slpA* (surface layer protein A). Vrstva S slouží zejména k ochraně před vnějšími vlivy a zároveň pomáhá uchycení bakterie k povrchu buněk a stimuluje imunitní odpověď hostitele (CALABI *et al.* 2001). Dalšími faktory virulence jsou bičičky (TASTEYRE *et al.* 2001) a proteolytické enzymy, např. proteáza Cwp84 (JANOIR *et al.* 2007), které se podílí na průniku bakterie vrstvou hlenu na povrchu sliznice. U některých epidemických kmenů byla prokázána vyšší míra sporulace, což by mohlo mít pozitivní vliv na jejich šíření (AKERLUND *et al.* 2008).

2.2 DIAGNOSTIKA

Přesná a rychlá laboratorní diagnostika CDAD je klíčová pro včasnou terapii, která může zabránit progresi onemocnění a snížit mortalitu, je také nezbytná pro zavedení opatření bránících dalšímu šíření nákazy. Proto byla vyvinuta řada diagnostických metod.

2.2.1 KULTIVACE PATOGENNÍCH KMENŮ

Nejcitlivější metodou, se kterou jsou porovnávány ostatní diagnostické metody, je kultivace patogenních kmenů (Tab. 1). Kmeny *C. difficile* jsou izolovány ze stolice pomocí selektivních médií a následně jsou testovány na přítomnost toxinů (BOWMAN *et al.* 1988). Úspěšnost izolace lze zvýšit pomocí alkoholového nebo teplotního šoku (MARLER *et al.* 1992). Kultivační vyšetření stolice je metoda časově velmi náročná a navzdory své citlivosti se v klinické praxi příliš nepoužívá. Izolace patogenních kmenů ze stolice je doporučována především z důvodů následné molekulární typizace a testování citlivosti kmenů k antibiotikům (DELMEÉ 2001).

2.2.2 CYTOTOXICKÝ TEST

Za zlatý standard v diagnostice *C. difficile* byl tradičně považován cytotoxický test. Tato metoda spočívá v přidání filtrovaného vzorku stolice ke tkáňové kultuře a sledování cytopatologického efektu toxinů na buňky. Přítomnost toxinů *C. difficile* je potvrzena, pokud dojde k zakulacení buněk vlivem narušení buněčného cytoskeletu a následné neutralizaci tohoto efektu pomocí specifických protilátek proti daným toxinům (CHANG *et al.* 1979). Kvůli časové a technické náročnosti je tento postup využíván spíše na specializovaných pracovištích, pro experimentální účely. Srovnávací studie STAMPER *et al.* (2009) navíc poukazuje na nižší senzitivitu této diagnostické metody oproti moderním metodám založeným na PCR (polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce) a zpochybňuje její roli jakožto referenční metody (Tab. 1).

2.2.3 IMUNOLOGICKÉ METODY

Imunologické metody jsou v současnosti v klinických laboratořích nejpoužívanějšími technikami v diagnostice CDAD. Komerčně jsou dostupné

imunochromatografické a imunoenzymatické (EIA) testovací soupravy, které pomocí specifických protilátek s navázanou reportérovou molekulou detekují buď jeden (A) nebo oba toxiny (A i B) ve vzorku stolice (LYERLY *et al.* 1985). Vzhledem k zvýšenému výskytu A⁻/B⁺ kmenů je doporučeno používat testy umožňující detekci obou toxinů současně (ALFA *et al.* 2000). Oblíbené jsou především imunoenzymatické testy, které jsou rychlé, jednoduché a snadno se interpretují. V poslední době ale přibývá studií, které poukazují na nízkou citlivost této diagnostiky. PLANCHE *et al.* (2008) porovnali 28 studií vyhodnocujících běžně používané imunoenzymatické soupravy a došli k závěru, že žádná z nich neposkytuje 100% spolehlivost v detekci toxinů *C. difficile* (Tab. 1).

Imunologicky lze prokázat také přítomnost glutamát dehydrogenázy (GDH), enzymu, který je ve velké míře konstitutivně produkován všemi kmeny *C. difficile* (LYERLY *et al.* 1991). Tato metoda je jednoduchá a má vysokou sensitivitu, a tudíž velmi málo falešně negativních výsledků (SHETTY *et al.* 2011) (Tab. 1). GDH produkují i nepatogenní kmeny, proto je potřeba v případě pozitivního výsledku potvrdit přítomnost toxinů jinou metodou, nejčastěji pomocí imunoenzymatického testu (BARBUT *et al.* 2000). Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční lékařství (ESCMID) v současnosti doporučuje tuto dvoukrokovou strategii pro diagnostiku CDAD (CROBACH *et al.* 2009). Kvůli nižší senzitivitě souprav detekujících toxiny je v případě výsledku pozitivního pro GDH a negativního pro toxiny vhodné ověřit přítomnost patogenního kmene ještě třetím přístupem, nejčastěji kultivací spojenou s následnou molekulární diagnostikou (QUINN *et al.* 2010). Na českém trhu je nyní dostupná souprava na principu EIA, která ve stolici prokazuje souběžně GDH a toxiny A a B (*C. difficile* Quik Chek Complete, TechLab).

2.2.4 MOLEKULÁRNÍ METODY

Molekulární diagnostika pomocí metod založených na amplifikaci vybraných úseků chromozomální DNA *C. difficile* přímo ze vzorku stolice (NAAT – Nucleic Acid Amplification Testing) se v současné době rychle rozvíjí a začíná v klinických laboratořích nahrazovat ostatní diagnostické metody (VAN DEN BERG *et al.* 2006). V nabídce některých firem se objevují integrované soupravy RT-PCR (real-time PCR), které jsou nejen velmi jednoduché a rychlé, ale vykazují i velmi vysokou sensitivitu a specifitu (STAMPER *et al.* 2009) (Tab. 1). Systém GeneXpert PCR (Cepheid),

dostupný v České republice, detekuje geny kódující toxin B, binární toxin a také delecí nukleotidu v pozici 117 v genu *tcdC*, která je charakteristická pro hypervirulentní kmeny označované na základě molekulární typizace jako 027/NAP1/B1 (PCR ribotyp 027, PFGE typ NAP1, REA typ B1). FORGETTA *et al.* (2011) provedli srovnávací genomovou analýzu 14 různých kmenů *C. difficile* a identifikovali několik dalších vysoce konzervovaných genů, jejichž amplifikace pomocí PCR by mohla sloužit k detekci *C. difficile*, popřípadě pouze kmenů spojených se závažnými formami CDAD.

Citlivost diagnostických metod pravděpodobně rovněž závisí na typu studovaného kmene (TENOVER *et al.* 2010). Pokud byly citlivosti diagnostických metod určeny na základě porovnání s přímou kultivací, měly např. metody NAAT a GDH-EIA podobnou citlivost (91 %) pro detekci kmenů ribotypu 027, zatímco pro kmeny jiných ribotypů (blíže nespecifikovaných) se jejich citlivost výrazně lišila (NAAT 92 %, GDH-EIA 70 %) (TENOVER *et al.* 2010). Obdobné výsledky byly dosaženy i při testování metod EIA detekujících toxin A a B. Tato pozorování by mohla vysvětlovat široké rozmezí citlivostí jednotlivých metod (TENOVER *et al.* 2010) (Tab. 1).

Diagnostická metoda	Senzitivita (%)	Specifita (%)
Cytotoxický test	67-86	97-100
EIA detekující toxiny	31-99	84-100
EIA detekující GDH	71-100	76-98
Molekulární metody	77-100	94-100

Tab. 1: Diagnostika CDAD. Přehled používaných diagnostických metod a jejich citlivostí, založený na základě publikovaných studií. Diagnostické metody jsou porovnávány s kultivací patogenních kmenů. Senzitivita je definována jako pravděpodobnost, že pacient je opravdu kolonizován *C. difficile*, když je test pozitivní. Specifita je definována jako pravděpodobnost, že pacient není kolonizován *C. difficile*, když je test negativní. Převzato z CARROLL a BARTLETT (2011).

2.3 CDAD

2.3.1 RIZIKOVÉ FAKTORY

Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj CDAD je užívání širokospektrých antibiotik, která naruší normální střevní mikroflóru a usnadní kolonizaci zažívacího traktu patogenními kmeny *C. difficile* rezistentními k tomuto antibiotiku. Příčinou CDAD může být i oslabení imunity u pacientů s imunosupresivní léčbou nebo s poruchou imunitního systému, u pacientů po operaci střev a u pacientů trpících komplikující komorbiditou (BAUER *et al.* 2011). Se sníženou imunitou souvisí i vyšší výskyt CDAD u starších osob, dle současné studie BAUER *et al.* (2011) bylo 63 % pacientů starších 65 let. Zvýšené riziko CDAD může rovněž souviset s podáváním určitých léků, např. inhibitory protonové pumpy (PPIs, proton-pump inhibitors) užívané k modulaci pH žaludku pravděpodobně prostřednictvím zvýšeného pH usnadňují kolonizaci zažívacího traktu *C. difficile* (LEONARD *et al.* 2007). Doposud byly infekce způsobené *C. difficile* spojovány především s vysoce kontaminovaným nemocničním prostředím, při přijetí do nemocnice bylo kolonizováno pouze 7 % pacientů, zatímco 21 % pacientů získalo *C. difficile* až během nemocničního pobytu (MCFARLAND *et al.* 1989).

2.3.1.1 Komunitní infekce

Poslední dobou vzrůstá význam tzv. komunitních infekcí, které nejsou spojovány s předchozí hospitalizací a často ani s antibiotickou léčbou. Dlouhodobá studie KHANNA *et al.* (2012) připisuje komunitní původ 41 % případů CDAD. Na rozdíl od pacientů, kteří se nakazili v nemocničním prostředí, byli tito pacienti mladší (věkový medián 50 let vs. 72 let), častěji se jednalo o ženy (76 % vs. 60 %), méně se u nich vyskytovaly závažné formy CDAD (20 % vs. 31 %) a byl zaznamenán nižší počet pacientů s předchozí antibiotickou léčbou (78 % vs. 94 %). Ve studii WILCOX *et al.* (2008) bylo zpětně zjištěno, že antibiotika nebyla podávána minimálně měsíc před detekcí *C. difficile* téměř u poloviny případů CDAD, třetina pacientů nebyla vystavena ani antibiotikům ani nemocničnímu prostředí. U komunitních infekcí tedy hrají roli i jiné rizikové faktory a CDAD ohrožuje také mladé lidi a děti (KHANNA *et al.* 2012, WILCOX *et al.* 2008).

Zdrojem spor *C. difficile* u komunitních infekcí mohou být např. kolonizovaní jedinci opouštějící nemocnici, děti, domácí a hospodářská zvířata nebo zásoby potravin

a pitné vody. Kontakt s dětmi mladšími 2 let jako signifikantní rizikový faktor pro rozvoj CDAD by mohl vysvětlovat i vyšší incidenci tohoto onemocnění u žen (WILCOX *et al.* 2008). Ze stolice a masa domácích a hospodářská zvířat byly sice izolovány patogenní kmeny, které způsobují onemocnění u člověka, ale přímý přenos nebyl zatím prokázán a je možné, že podobnost lidských a zvířecích izolátů je dána společným zdrojem infekce v prostředí (NORMAN *et al.* 2011).

2.3.1.2 Antibiotická rezistence

Antibiotika nepodporují vznik infekcí *C. difficile* pouze narušením běžné střevní mikroflóry, ale také ovlivněním exprese virulentních faktorů. Např. léky první volby v léčbě CDAD, metronidazol a vankomycin, v subinhibičních koncentracích indukují produkci toxinů A a B (GERBER *et al.* 2008). Fluorochinolony kromě zvýšení produkce toxinů stimulují *in vitro* také germinaci spor a růst vegetativních forem bakterií (SAXTON *et al.* 2009).

Rezistence může vzniknout prakticky ke kterémukoliv antibiotiku. V minulosti byly s CDAD spojovány především kmeny rezistentní ke klindamycinu a cefalosporinům, ARONSSON *et al.* (1985) pozorovali až 70krát vyšší riziko vzniku CDAD spojené s těmito antibiotiky v porovnání s penicilinem. V současné době se pro vznik CDAD zdají být nejrizikovější fluorochinolony, ke kterým jsou rezistentní kmeny hypervirulentního ribotypu 027 (LOO *et al.* 2005, MCDONALD *et al.* 2005). Mezi riziková antibiotika patří také tetracyklin, erytromycin, rifampicin, bacitracin, karbapenamy a mnohá další (JOHN a BRAZIER 2005, HUANG *et al.* 2009a). Antibiotiky první volby pro léčbu CDAD zůstávají vankomycin a metronidazol. Byly izolovány kmeny se slabou rezistencí k vankomycinu, ale toto antibiotikum se při perorálním podání téměř nevstřebává a ve střevě dosahuje mnohonásobně vyšších koncentrací, než jsou zjištěné minimální inhibiční koncentrace izolovaných rezistentních kmenů (PELAEZ *et al.* 2002). Potenciální klinický význam by mohla mít snížená citlivost k metronidazolu, jenž na rozdíl od vankomycinu do střev proniká pouze ve slabé koncentraci (BAINES *et al.* 2008). Izolovány kmeny se sníženou citlivostí vůči vankomycinu a metronidazolu zatím nebyly prokázány jako klinicky významné a antibiotická léčba je většinou účinná (PELAEZ *et al.* 2002).

Omezením používání rizikových antibiotik je možné významně snížit riziko vzniku CDAD a šíření nozokomiálních epidemí (MCNULTY *et al.* 1997).

2.3.2 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Odpověď imunitního systému na kolonizaci patogenními kmeny *C. difficile* je částečně zodpovědná za rozdíly v závažnosti a průběhu onemocnění. Protilátky proti toxinům *C. difficile* jsou běžně přítomny v séru zdravých jedinců. Produkce protilátek je pravděpodobně stimulována v dětství, kdy je asymptomaticky kolonizována většina novorozenců, a jejich hladina je udržována během celého života díky náhodným kontaktům s *C. difficile* nebo s příbuznými druhy bakterií (VISCIDI *et al.* 1983). Doposud ale nebyly nalezeny důkazy potvrzující, že by přítomnost protilátek hrála roli v ochraně před kolonizací *C. difficile*. Nicméně pacienti se zvýšenou hladinou protilátek proti toxinům A a B se v případě kolonizace spíše stanou asymptomatickými nosiči, zatímco pacienti, kteří mají hladinu protilátek nízkou, mají mnohem větší riziko rozvoje CDAD (KYNE *et al.* 2000). Tomuto trendu odpovídá i zjištění, že symptomatictí pacienti, kteří dříve zahájí imunitní odpověď, mají menší pravděpodobnost relapsu onemocnění (KYNE *et al.* 2001). Nespecifická imunita, na rozdíl od adaptivní, je v případě CDAD kontraproduktivní a zhoršuje zranění vyvolaná toxiny. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že podání protizánětlivých látek spolu s antibiotiky může u vážných forem onemocnění zmírnit poškození střev (ANTON *et al.* 2004).

Poznatky získané o imunitní odpovědi organismu na *C. difficile* mohou být využity v praxi například při identifikaci pacientů s větším rizikem rozvoje CDAD a relapsů nemoci.

2.3.3 KLINICKÝ OBRAZ

Pro rozvoj CDAD je klíčové narušení běžné střevní mikroflóry a následná kolonizace zažívacího traktu kmeny *C. difficile* produkujícími toxiny. Onemocnění nabývá mírných i život ohrožujících forem a mezi jeho hlavní projevy patří průjemy, bolesti břicha, nadýmání, snížená chuť k jídlu, horečka, hypoalbuminémie a leukocytóza. U pacientů s PMC jsou při endoskopickém vyšetření patrná zánětlivá ložiska pokrytá fibrinovou membránou. U nejtěžších forem CDAD může dojít k vzniku tzv. megakolonu, kdy ochrnutí hladkého svalstva střevní stěny způsobí extrémní rozšíření tlustého střeva, což může mít za následek až jeho protržení a smrt pacienta (BARTLETT 2002). Dalším problémem CDAD je častý výskyt relapsů onemocnění, způsobený buď původním kmenem nebo reinfekcí kmenem jiným. Dle nejnovější celoevropské studie BAUER *et al.* (2011) se relaps vyskytl u 16 % pacientů do tří

měsíců po odeznění onemocnění a infekce *C. difficile* měla podíl na smrti 9 % pacientů s diagnostikovanou CDAD.

2.3.4 LÉČBA

Prvním krokem při léčbě CDAD je ukončení podávání antibiotik, která ve většině případů onemocnění vyvolala. Standardně následuje nasazení antibiotik metronidazolu nebo vankomycinu, vůči kterým je většina kmenů *C. difficile* citlivá. Účinek těchto antibiotik je srovnatelný u pacientů s mírnou až střední formou CDAD, při léčbě závažných případů se vankomycin jeví jako účinnější (ZAR *et al.* 2007). Problémem zůstávají relapsy, proto jsou hledány další neantibiotické přístupy v léčbě CDAD. Nadějným přístupem by mohlo být podávání monoklonálních protilátek proti toxinům A a B (LOWY *et al.* 2010) nebo jiných látek schopných efektivně vázat toxiny, například proteinu tolevameru (BRAUNLIN *et al.* 2004), popřípadě aktivní imunizace vakcinací (ABOUDOLA *et al.* 2003). Obnovení narušené střevní mikroflóry je možné podpořit podáváním probiotik nebo vysoce úspěšnou metodou tzv. fekálního transplantátu, kdy je pacientovi do střeva vložena homogenizovaná dárcovská stolice (AAS *et al.* 2003). Jedna z možností prevence, která byla prozatím úspěšně vyzkoušena na zvířatech, je kolonizace pacienta netoxigenním kmenem *C. difficile*, jehož přítomnost v zažívacím traktu může před toxigenními kmeny chránit (MERRIGAN *et al.* 2009). V kritických případech, kdy žádné jiné léčebné postupy nezabírají, je prováděna částečná nebo úplná kolektomie (LAMONTAGNE *et al.* 2007).

Pro zvládnutí epidemií a relapsů CDAD v nemocnicích je klíčové dodržování hygienických opatření. *C. difficile* je totiž schopno tvorby vysoce odolných endospor, které dlouhodobě přetrvávají v prostředí a jsou zdrojem šíření nozokomiálních infekcí. Důležitá je především řádná hygiena rukou, izolace pacientů s CDAD a desinfekce zdravotnického materiálu a okolí pacientů (VRTIS 2008). Situaci komplikují kmeny rezistentní k běžně používaným desinfekcím, nejúčinnější jsou desinfekce na bázi chlóru a peroxylenu (DAWSON *et al.* 2011).

2.4 MOLEKULÁRNÍ TYPIZACE

Se vzrůstajícím výskytem a závažností CDAD roste i význam epidemiologie *C. difficile*. Důležitým nástrojem uplatňujícím se při epidemiologických studiích je typizace patogenních kmenů. Termínem typizace je obvykle označována diferenciací druhů na nižší taxony a používá se pro sledování šíření kmenů, které způsobují infekce (VAN BELKUM *et al.* 2007). Typizační metody mohou být rozděleny podle znaku, který je detekován, na metody fenotypové a genotypové.

Metody založené na fenotypových znacích se pro typizaci *C. difficile* používaly spíše v minulosti. Patřily mezi ně například sérotypizace (DELMÉE *et al.* 1985), elektroforéza rozpustných proteinů buňky v polyakrylamidovém gelu (WÜST *et al.* 1982), pyrolýza buněk a následná hmotnostní spektrometrie (CARTMILL *et al.* 1992) nebo rozlišení kmenů podle rozdílné citlivosti k vybraným antibiotikům (WÜST *et al.* 1982).

V poslední dekádě došlo k velkému rozmachu molekulárně-genetických metod, které rozlišují jednotlivé kmeny na základě jejich genetické variability. Díky své vyšší rozlišovací schopnosti přinesla molekulární typizace přesnější pohled na epidemiologii mnoha bakteriálních druhů a v některých případech zcela nahradila fenotypizační metody (VAN BELKUM *et al.* 2007).

Jedním z možných přístupů je studium celkové chromozomální DNA její specifickou restrikcí a porovnáním polymorfizmů restrikčních fragmentů (RFLP). Při metodě REA (restriction endonuclease analysis) je chromozom štěpen na větší počet kratších fragmentů (KUIJPER *et al.* 1987). Metoda PFGE (pulsed field gel electrophoresis) naopak používá řídce štěpicí endonukleázu a bakteriální DNA štěpí na několik větších úseků. Separace dlouhých fragmentů je docílena pomalým dělením v polyakrylamidovém gelu v elektrickém poli, které periodicky mění směr (KRISTJÁNSSON *et al.* 1994).

Nejpoužívanější typizační metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Toxinotypizace spojuje amplifikaci variabilních oblastí lokusu PaLoc pomocí PCR a elektroforetickou analýzu amplifikovaných fragmentů DNA štěpených specifickými endonukleázami (RFLP) (RUPNIK *et al.* 1998). Jednou z nejpoužívanějších typizačních metod, především v Evropě, je PCR ribotypizace. Principem této metody je amplifikace polymorfních sekvencí, které se nacházejí mezi konzervovanými geny kódujícími 16S a 23S rRNA, a jejich následná elektroforetická

separace (GÜERTLER *et al.* 1993). Moderní technikou s velkou rozlišovací schopností je MLVA (MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis), metoda založená na analýze několika tandemových repetitivních sekvencí v genomu (KEIM *et al.* 2000). Mezi starší typizační metody naopak patří AP-PCR (arbitrary primed PCR) a RAPD (random amplified polymorphic DNA), které pomocí nespecifických oligonukleotidů amplifikují série různě dlouhých fragmentů (MCMILLIN a MULDROW 1992, WILKS a TABAQCHALI 1994). Alternativní metodou je AFLP (amplified fragment length polymorphism), kdy je nejprve štěpen celý bakteriální genom a pomocí specifických adaptérů jsou selektivně amplifikovány některé fragmenty (KLAASSEN *et al.* 2002).

Nejnovější metody molekulární typizace využívají možnosti sekvenace. MLST (multilocus sequence typing) charakterizuje kmeny podle sekvence částí několika tzv. housekeepingových genů (LEMEE *et al.* 2004), u *slpA*ST (surface layer protein A gene sequence typing) je sledována variabilita v sekvenci genu kódujícího protein SlpA (KARJALAINEN *et al.* 2002) a metoda TRST porovnává sekvence vysoce variabilních repetitivních úseků (ZAIß *et al.* 2009).

Pro typizaci *C. difficile* je k dispozici celá řada metod, problémem zůstává srovnávání výsledků dosažených jednotlivými metodami a často velmi komplikovaná výměna dat mezi laboratořemi. Doposud neexistuje univerzální schéma typizace. Pro účely našeho projektu jsme zvolili v Evropě nejběžněji používané metody toxinotypizaci a ribotypizaci a metodu s vysokou rozlišovací schopností, MLVA.

2.4.1 TOXINOTYPIZACE

C. difficile vykazuje značnou variabilitu v lokusu PaLoc, který kóduje dva hlavní virulentní faktory, toxin A a B. Skupiny kmenů se stejnými variantami oblasti PaLoc byly definovány jako jednotlivé toxinotypy. Je nepravděpodobné, že by kmeny s identickým souborem mutací vznikly nezávisle, proto je předpokládáno, že všechny izoláty jednoho toxinotypu sdílí společného předka (RUPNIK *et al.* 2008). K detekci toxinotypů slouží metoda zvaná toxinotypizace (RUPNIK *et al.* 1998). V současnosti je známo 31 různých toxinotypů a jejich počet je průběžně aktualizován (<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>).

Pro účely toxinotypizace byl lokus PaLoc rozdělen na deset překrývajících se úseků, které je možno amplifikovat pomocí PCR (Obr. 5). Šest z nich leží v oblasti genů kódující toxiny A (A1-3) a B (B1-3) a čtyři pokrývají ostatní geny v oblasti PaLoc a

intergenové segmenty (PL1-4). Nejvariabilnější úseky jsou 3'-konec genu *tcdA* (A3) a 5'-konec genu *tcdB* (B1) (Obr. 5). K určení toxinotypu proto ve většině případů stačí amplifikace těchto úseků, jejich následné štěpení pomocí enzymů *EcoRI* (A3) a *HincII+AccI* (B1) a porovnání vzniklých fragmentů DNA. Doposud bylo identifikováno 7 různých restrikčních profilů fragmentu B1 a 11 fragmentu A3. Pouze v několika případech je RFLP oblastí A3 a B1 stejný u dvou různých toxinotypů a k jejich rozlišení musí být amplifikován další z úseků PaLoc. K analýze všech deseti fragmentů se přistupuje v případě, že je identifikován nový toxinotyp (RUPNIK *et al.* 1998).

Změny v oblasti PaLoc zahrnují inserce, delece a bodové mutace. V genu *tcdA* se nachází úsek repetitivních sekvencí, ve kterém může relativně snadno dojít k nehomologní rekombinaci, a tím k inserci nebo deleci (EICHEL-STREIBER *et al.* 1992). Toxinotypy XIV (Obr. 5), XVII, XXII a XXIII mají v genu *tcdA* vložen mobilní genetický element ISTRon (2 kb), který ale produkci toxinu A nenarušuje, protože je před translací vystřížen z mRNA (BRAUN *et al.* 2000). V genu *tcdB* se oproti *tcdA* mnohem častěji vyskytují bodové mutace, 95 % substitučních mutací se nachází v katalytické oblasti toxinu (EICHEL-STREIBER *et al.* 1995), která je součástí fragmentu B1 analyzovaného při toxinotypizaci. Další variabilní oblastí lokusu PaLoc je gen *tcdC* (CURRY *et al.* 2007). Pro některé toxinotypy jsou charakteristické i změny v intergenových oblastech PaLoc, například pro toxinotyp X je typická inserce (1,1 kb) mezi geny *tcdA* a *tcdE* (Obr. 5) (SOEHN *et al.* 1998). Unikátním je toxinotyp XI, jehož lokus PaLoc je výrazně zkrácen na 5'konci a kóduje pouze část genu *tcdA* a gen *tcdC* (Obr. 5) (RUPNIK *et al.* 2001).

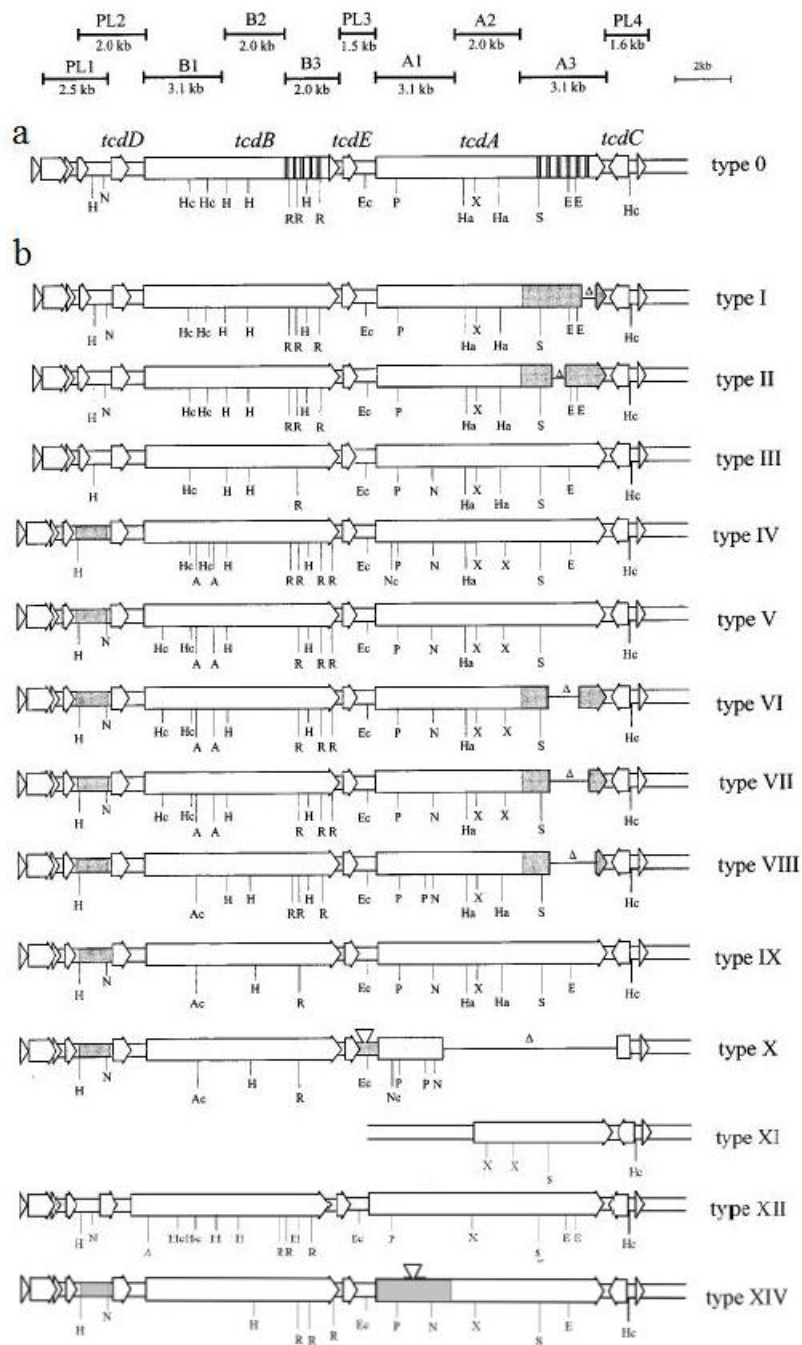
Při toxinotypizaci je porovnáván lokus PaLoc s referenčním kmenem VPI 10463 (toxinotyp 0), u něž byla tato oblast poprvé sekvenována (RUPNIK *et al.* 1998). Toxinotypy, které se od referenčního kmene významně liší, můžeme podle míry této změny rozdělit na minoritní a majoritní. Minoritní toxinotypy se oproti referenčnímu kmeni liší pouze v jednom z šesti úseků, na které jsou při toxinotypizaci rozděleny geny pro toxiny A (A1-3) a B (B1-3). Většina minoritních toxinotypů byla identifikována pouze u jednoho izolátu. Majoritní toxinotypy mají pozměněnou většinu fragmentů a u některých z nich jsou známy až tisíce kmenů (RUPNIK *et al.* 2008).

V současnosti je obvykle spolu s toxinotypem uváděna i přítomnost genů kódujících binární toxin (CDT), který některé patogenní kmeny *C. difficile* produkují spolu s toxiny A a B. Toxinotyp 0 a minoritní toxinotypy mají zpravidla fenotyp A⁺/B⁺/CDT⁻. Výjimkou je toxinotyp XXIV, který má geny *tcdA* a *tcdB* identické

s toxinotypem 0, ale produkuje CDT (STARE *et al.* 2007). Většina majoritních toxinotypů produkuje všechny 3 toxiny ($A^+/B^+/CDT^+$) (STUBBS *et al.* 2000). V současnosti je známo 5 majoritních toxinotypů s fenotypem $A^-/B^+/CDT^+$ (X, XVI, XVII, XXX, XXXI) a jeden s fenotypem $A^-/B^+/CDT^-$ (VIII). Kmeny s fenotypem A^- buď geny toxinu A vůbec neexprimují nebo toxin A vzniká pouze ve zkrácené nefunkční formě (SOEHN *et al.* 1998; EICHEL-STREIBER *et al.* 1999). Kmeny $A^-/B^-/CDT^+$ (např. toxinotyp XI) produkuje pouze binární toxin, který ale sám CDAD nevyvolává (GERIC *et al.* 2006). MACCANNELL *et al.* (2006a) objevili kmeny $A^+/B^-/CDT^+$, které byly na základě toxinotypizace zařazeny do toxinotypu IX ($A^+/B^+/CDT^+$), ale produkovaný toxin B nebyl funkční.

Toxiny A a B jednotlivých toxinotypů se mohou výrazně lišit. Nejvýraznější rozdíly jsou pozorovány v jejich katalytických doménách, což významně ovlivňuje substrátovou specifitu a následný cytopatologický efekt obou toxinů (SOEHN *et al.* 1998). Mutace ve vazebné a translokační doméně mohou způsobovat změny ve schopnosti toxinů se vázat na buňku a proniknout dovnitř (RUPNIK *et al.* 2008). Změny ve velikosti toxinů způsobené delecemi nebo insercemi mohou být příčinou rozdílné reaktivity těchto proteinů s protilátkami (LYERLY *et al.* 1992). Některé z těchto změn výrazně zvyšují virulenci daných kmenů. Například TcdB toxinotypu X vykazuje na myším modelu výrazně nižší letální dávku (6 ng/g) než TcdB referenčního kmene toxinotypu 0 (50 ng/g) (LYERLY *et al.* 1992).

Některé toxinotypy mají hypervirulentní potenciál, v současnosti způsobují celosvětové problémy toxinotyp VIII a III (RUPNIK *et al.* 2008).



Obr. 5: Schématické znázornění lokusu PaLoc některých toxinotypů. (a) PaLoc toxinotypu 0: Nad toxinotypem 0 je znázorněno schématické rozdělení lokusu PaLoc při PCR, při toxinotypizaci jsou amplifikovány fragmenty A3 a B1. Na příkladu toxinotypu 0 jsou znázorněny 3'-koncové repetitivní sekvence charakteristické pro oba toxiny. **(b) PaLoc toxinotypů I-XII, XIV:** Šedivé oblasti znázorňují rozdíly v délce úseků v porovnání s toxinotypem 0 (delece a inserce). Písmena pod jednotlivými toxinotypy znázorňují místa štěpení enzymy: A (*AccI*), E (*EcoRI*), Ec (*EcoRV*), H (*HindIII*), Hc (*HincII*), N (*NsiI*), Nc (*NcoI*), P (*PstI*), R (*RsaI*), S (*SpeI*). Převzato z RUPNIK *et al.* (1998).

2.4.2 RIBOTYPIZACE

V chromozomální DNA jednotlivých kmenů *C. difficile* je přítomen různý počet operonů kódujících ribozomální rRNA. V každém operonu se nachází vysoce konzervované geny kódující 16S a 23S podjednotky rRNA, které jsou odděleny různě dlouhým sekvenčně variabilním úsekem, tzv. mezerníkem (ISR-intergenic spacer region) (NEEFS *et al.* 1990). Ribotypizace je metoda založená na rozdílech v počtu a délkách těchto ISR, popřípadě na variabilitě jejich sekvence (GÜERTLER *et al.* 1993).

Mechanismus stojící za rozdíly v délkách ISR není ještě zcela pochopen. INDRA *et al.* (2010) sekvenací ISR u 47 kmenů *C. difficile* odhalili organizovanou strukturu těchto oblastí, skládající se z 2-5 přímých repetitivních sekvencí o délce 9 bazí oddělených sekvencemi dlouhými 33 nebo 53 bp. Některé dlouhé ISR měly navíc mezi 5' koncem ISR a první přímou repetitivní sekvencí vložený úsek o velikosti 172 bp, jehož součástí byl gen kódující tRNA^{Ala} (73 bp). Délka ISR tedy závisí na počtu těchto komponent a variabilita pravděpodobně vznikla díky sklouznutí polymerázy při replikaci a homologní rekombinaci mezi dvěma nebo v rámci jednoho chromozomu (INDRA *et al.* 2010).

Základem ribotypizace je amplifikace všech ISR rRNA operonů přítomných v genomu daného kmene s použitím oligonukleotidů, které nasedají na 3' a 5' konce genů kódujících 16S a 23S rRNA. Následuje elektroforetická separace vzniklých fragmentů DNA (GÜERTLER *et al.* 1993). Nevýhodou tohoto přístupu je nízká rozlišovací schopnost horizontální gelové elektroforézy, obzvláště u velkých fragmentů DNA. Na základě sekvenace byly navrženy nové oligonukleotidy nasedající blíže ISR, čímž došlo ke zkrácení amplifikovaných fragmentů a snazší interpretaci výsledků (BIDET *et al.* 1999).

Dalším problémem PCR ribotypizace založené na horizontální gelové elektroforéze je nedostatek standardizovaných sbírek typových kmenů. Získané výsledky lze tudíž jen velmi těžko porovnávat mezi různými laboratořemi, což vede ke vzniku nejednotné nomenklatury. INDRA *et al.* (2008) proto modifikovali PCR ribotypizaci, k separaci ISR použili kapilární gelovou elektroforézu, která dokáže mezi fragmenty DNA rozlišit rozdíly i jednoho nukleotidu. Mezerníkové sekvence byly amplifikovány pomocí oligonukleotidů navržených v práci BIDET *et al.* (1999), přičemž jeden z oligonukleotidů byl fluorescenčně značen. Produkty PCR byly následně děleny na automatizovaném kapilárním DNA sekvenátoru. Nový protokol je ve srovnání s elektroforézou na agarózovém gelu nejen přesnější, ale navíc generuje

počítačová data, která lze snáze porovnávat (INDRA *et al.* 2008). Byla vytvořena internetová databáze ribotypů generovaných pomocí kapilární gelové elektroforézy (<http://webribo.ages.at>), která pomáhá uživatelům s identifikací známých ribotypů, popřípadě jim umožňuje vkládat ribotypy nové.

Výrazné zrychlení procesu ribotypizace nabízí nová technika, která umožňuje detekci ribotypů přímo ve vzorku stolice (JANEŽIČ *et al.* 2011). Odpadá tak krok kultivace bakterií a izolace chromozomální DNA.

2.4.2.1 MLVA

MLVA vykazuje v porovnání s předchozími metodami mnohem vyšší rozlišovací schopnosti a byla použita pro epidemiologické studie u mnohých bakteriálních druhů (KEIM *et al.* 2000). Tato metoda byla aplikována také na studium šíření nozokomiálních infekcí *C. difficile* (MARSH *et al.* 2006). Základem metody je rozlišení kmenů podle rozdílů v počtu tandemových repetic v několika definovaných lokusech v genomu (KEIM *et al.* 2000).

MARSH *et al.* (2006) identifikovali v genomu *C. difficile* sedm lokusů, které splňovaly základní požadavky MLVA, obsahovaly velký počet krátkých repetic a byly dostatečně variabilní: CDR4 (6 bp/repetice), CDR5 (8 bp/repetice), CDR9 (8 bp/repetice), CDR48 (7 bp/repetice), CDR49 (7 bp/repetice), CDR59 (11 bp/repetice) a CDR60 (17 bp/repetice). Po amplifikaci těchto lokusů pomocí PCR byl sekvenací zjištěn počet repetic. VAN DEN BERG *et al.* (2007) upravili tuto metodu výběrem lokusů s kratšími tandemovými repeticemi (A6_{cd}, B7_{cd}, C6_{cd}, E7_{cd}, F3_{cd}, G8_{cd} a H9_{cd}; číslem je označen počet nukleotidů v repetici) a pro analýzu fragmentů PCR zvolili kapilární gelovou elektroforézu místo sekvenace. Lokusy A6_{cd}, B7_{cd}, E7_{cd} a G8_{cd} byly identické s dříve popsány lokusy CDR4, CDR49, CDR 48 a CDR9. MLVA dle VAN DEN BERG *et al.* (2007) je vhodná v případech, kdy nestačí rozlišovací schopnost ribotypizace. Při nemocničních epidemiích dokáže rozlišit, zda jsou kmeny jednoho ribotypu blízké příbuzné či nikoliv (FAWLEY a WILCOX 2011).

V současné práci MANZOOR *et al.* (2011) navrhli autoři zvýšení počtu zkoumaných lokusů na 15, což zlepšilo schopnost metody rozpoznávat příbuzné klastry a umožnilo to i přesné rozpoznání ribotypů pouze na základě MLVA, což se sedmi lokusy nebylo možné. Další variantou je MLVA s deseti (MLVA10) a čtyřmi (MLVA4) lokusy tandemových repetic. Lokusy MLVA10 vykazují spíše nižší alelickou diverzitu a tento typ MLVA generuje skupiny vysoce podobné s ribotypy (shoda 98 %). MLVA4

má lokusy velmi variabilní a je vhodná pro detekci rychlých evolučních změn. Pro epidemiologické studie je užitečná kombinace obou variant (WEI *et al.* 2011).

2.5 EPIDEMIOLOGIE

V posledním desetiletí jsou celosvětově pozorovány změny v epidemiologii CDAD, roste především výskyt nemoci, ale i její závažnost a mortalita pacientů (DALLAL *et al.* 2002). V nemocnici v kanadském Quebecu vzrostl mezi lety 1991 a 2003 výskyt CDAD více než 4krát, významně se zvýšil i podíl závažných případů onemocnění (ze 7,1 % na 18,2 %) a úmrtí pacientů do 30 dnů po stanovení diagnózy (ze 4,7 % na 13,8 %) (PÉPIN *et al.* 2004). Zvýšený výskyt CDAD je přičítán především kmenům ribotypu 027 rezistentním k fluorochinolonům (LOO *et al.* 2005, MCDONALD *et al.* 2005).

Ribotyp 027 byl poprvé izolován roku 1988 ve Francii (označen jako CD196), avšak byl citlivý k fluorochinolonům (POPOFF *et al.* 1988), podobně jako další kmeny charakterizované před rokem 2001. Usuzuje se, že získání fluorochinolonové rezistence vedlo k zvýšení hypervirulentního potenciálu současných kmenů ribotypu 027 a k jejich celosvětovému rozšíření (MCDONALD *et al.* 2005). Poměrně nedávno se objevily kmeny ribotypu 027, které navíc získali rezistenci ke klindamycinu (DRUDY *et al.* 2008).

Izoláty současného hypervirulentního ribotypu 027 i historického izolátu CD196 mají v genu *tcdC* delece o velikosti 18 bp (pozice 330-347) a 1bp (pozice 117) (STABLER *et al.* 2009). Na tvorbu negativního regulátoru produkce toxinů má vliv především jednonukleotidová delece v pozici 117, která vede k předčasnému ukončení transkripce a vzniku nefunkčního TcdC (MACCANNELL *et al.* 2006b). U hypervirulentního i historického ribotypu 027 vykazuje značnou variabilitu také sekvence genu pro toxin B, obzvláště pro jeho katalytickou doménu. Tyto změny v oblasti PaLoc zřejmě významně přispívají ke zvýšené produkci toxinů a k jejich vyšší aktivitě (STABLER *et al.* 2009). Dále je pro kmeny ribotypu 027 typická přítomnost genu pro binární toxin (WARNY *et al.* 2005).

2.5.1 SVĚT

Změny v epidemiologii CDAD byly poprvé zaznamenány v roce 2000 v nemocnici v americkém Pittsburghu (DALLAL *et al.* 2002), od té doby bylo *C. difficile* ribotypu 027 detekováno již ve všech kanadských provinciích a ve většině států USA (O'CONNOR *et al.* 2009).

O epidemiologii CDAD mimo Evropu a Severní Ameriku toho není mnoho známo, ale přenos kmenů *C. difficile* mezi kontinenty je v dnešní době vlivem cestování relativně snadný. Prvním zaznamenaným případem CDAD vyvolaným ribotypem 027 v Austrálii byla žena, která se navrátila z cesty do USA (RILEY *et al.* 2009). Ribotyp 027 byl detekován také v Japonsku, ale kmen byl citlivý k fluorochinolonům a podobal se spíše méně virulentním historickým formám tohoto ribotypu (KATO *et al.* 2007). V Japonsku byl sledován výskyt CDAD v letech 2000 až 2004, výrazné změny v klinických projevech CDAD ale zaznamenány nebyly. Zajímavý byl především vysoký výskyt A⁻/B⁺ kmenů (33/148 izolátů, tj. 22 %), z čehož většina náležela ribotypu 017 (SAWABE *et al.* 2007). Rostoucí význam A⁻/B⁺ kmenů byl pozorován také v Jižní Koreji (SHIN *et al.* 2008) a Číně (HUANG *et al.* 2009b). V roce 2009 byly zaznamenány i první případy CDAD vyvolané ribotypem 027 v Koreji (TAE *et al.* 2009) a Hongkongu (CHENG *et al.* 2009). O výskytu CDAD v Africe a Jižní Americe je toho známo velmi málo, ojedinělá studie BALASSIANO *et al.* (2009) z Brazílie neprokázala přítomnost ribotypu 027, nicméně také uvádí vysoký výskyt A⁻/B⁺ kmenů ribotypu 017.

2.5.2 EVROPA

V Evropě se epidemiologií CDAD zabývá samostatná výzkumná skupina zvaná ESGCD (European Study Group on *Clostridium difficile*), která pracuje po záštitou Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční lékařství (ESCMID). První studie koordinovaná ESGCD zabývající se výskytem a typizací *C. difficile* byla uskutečněna v roce 2005 a bylo do ní zahrnuto 38 nemocnic ze 14 evropských zemí (BARBUT *et al.* 2007). Získaná data ukazují na velké rozdíly ve výskytu CDAD jak na mezinárodní, tak i národní úrovni, což může být způsobeno nízkým počtem zúčastněných zdravotnických zařízení a využitím odlišných přístupů v diagnostice CDAD. V evropských zemích byly nejčastěji detekovány ribotypy 001 (13 %) a 014 (9 %), ribotyp 002, 012, 017, 020 a 027 byl každý zastoupen u 6 % izolátů. Kmeny ribotypu 027 byly nalezeny v Irsku, Belgii a Nizozemsku a byly také spojovány se závažnějšími formami CDAD (BARBUT *et al.* 2007).

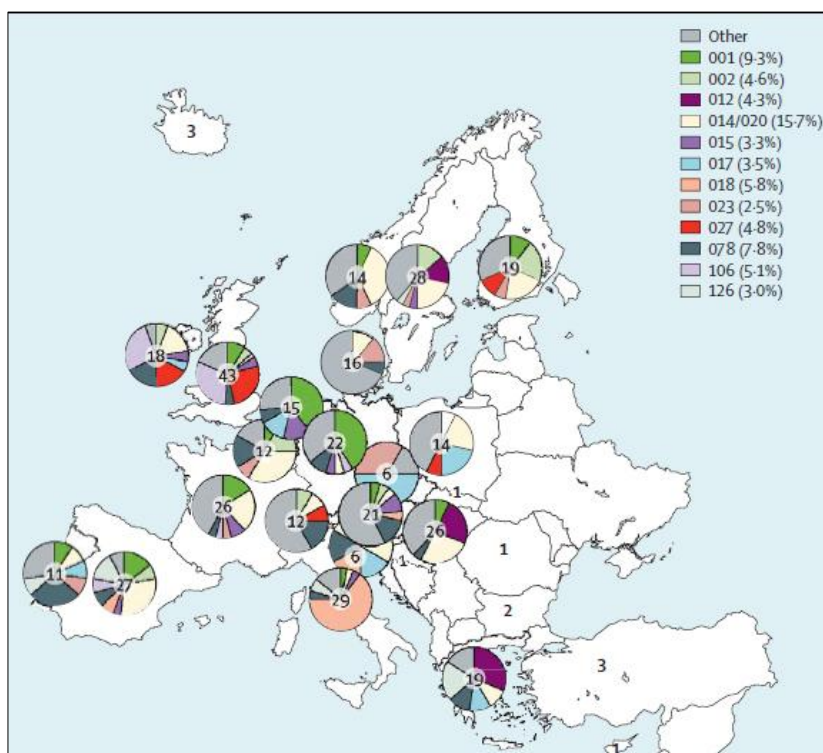
První epidemie CDAD způsobená ribotypem 027 v Evropě byla zaznamenána v Anglii mezi lety 2003-2004, přičemž 11 % nakažených pacientů zemřelo. Národní statistický úřad pro Anglii a Wales zaznamenal mezi lety 2004 a 2007 čtyřnásobný

nárůst úmrtí spojovaných s CDAD. V následujících letech (2006-2010) došlo dle Národního statistického úřadu ke snížení výskytu CDAD, což je spojováno s přísnějším sledováním těchto infekcí a větší kontrolou nad epidemiemi ribotypu 027 (<http://www.ons.gov.uk/ons/rel/subnational-health2/deaths-involving-clostridium-difficile/2006-to-2010/index.html>). Změny v zastoupení jednotlivých ribotypů v Anglii jsou patrné i z výsledků CDRN (*C. difficile* Ribotyping Network). Zatímco v letech 2007-2008 byl ribotyp 027 příčinou 55,3 % všech zaznamenaných případů CDAD, o dva roky později byl sice stále nejběžnějším detekovaným ribotypem, ale jeho zastoupení výrazně kleslo (22,1 %). Podobně klesající tendence měl během tohoto období i výskyt druhého nejčastějšího ribotypu 106 (ze 13 % na 7,3 %), který se mimo Anglii vyskytuje zřídka (http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1296681523205).

Krátce po nalezení ribotypu 027 v Anglii byly potvrzeny epidemie způsobené tímto ribotypem i v Nizozemsku (VAN STEENBERGEN *et al.* 2005) a Belgii (JOSEPH *et al.* 2005). Podobně jako v Anglii je zde nyní ribotyp 027 na ústupu, dle HENSGENS *et al.* (2009) klesl mezi lety 2005 a 2009 výskyt tohoto ribotypu v Nizozemsku z 16 % na 3 %. V roce 2007 byl ribotyp 027 izolován již v 10 evropských státech, mimo Velkou Británii, Belgii a Nizozemsko propukly nozokomiální epidemie tohoto ribotypu i v Irsku, Lucembursku a ve Francii, ojedinělý výskyt byl dále zaznamenán v Polsku, Rakousku, Švýcarsku a Dánsku (KUIJPER *et al.* 2007). O rok později byl ribotyp 027 nalezen již v 16 evropských státech, přibýly epidemie ve Švýcarsku, Německu a Finsku, neepidemický výskyt byl dále zaznamenán ve Švédsku, Norsku, Maďarsku a Španělsku (KUIJPER *et al.* 2008).

Současným stavem CDAD v Evropě se zabývá studie BAUER *et al.* (2011), která sleduje výskyt *C. difficile* v nemocnicích ve 34 evropských státech. I v této studii se vyskytly limitace obdobné práci BARBUT *et al.* 2007, nerovnoměrné zastoupení zdravotnických zařízení v jednotlivých státech a využití odlišných přístupů v diagnostice CDAD. Získaná data nelze brát jako plně reprezentativní pro jednotlivé státy, avšak z celkového pohledu je zřejmý posun v zastoupení nejběžnějších ribotypů oproti prvotní práci BARBUT *et al.* (2007). Na prvních místech zůstávají ribotypy 001 (pokles ze 13 na 10 %) a 014/020 (nárůst z 15 na 16 %), vzrostl význam ribotypů 078 (8 %) a 018 (6 %). Výskyt ribotypu 027 mírně klesl, z 6 na 5 %. Na regionální úrovni je výrazná přítomnost ribotypu 106 ve Velké Británii a Irsku a ribotypu 018 v Itálii (Obr. 6). Z hlediska toxinotypizace je nejčastější toxinotyp 0 (65 %), A/B⁺ kmeny tvoří pouze

3 %. Ze studie BAUER *et al.* (2011) také vyplývá, že většina pacientů splňovala hlavní rizikové faktory, tj. věk nad 65 let (63 % pacientů), vážné komorbidity (44 % pacientů) a téměř u všech infekcí CDAD předcházela antibiotická léčba (nejčastěji cefalosporiny a fluorochinolony). U 16 % pacientů se vyskytl relaps a 8,8 % pacientů na následky CDAD a přidružených nemocí zemřelo.



Obr. 6: Geografická distribuce ribotypů *C. difficile* v Evropě. Výšečové grafy znázorňují rozdělení nejběžnějších ribotypů v jednotlivých státech, číslo uprostřed grafu udává počet analyzovaných kmenů. Byly zahrnuty pouze státy, ve kterých bylo typováno víc než 5 izolátů. Převzato z BAUER *et al.* (2011).

2.5.2.1 Česká republika

V České republice jsou údaje o výskytu CDAD značně omezené a jedná se především o klinická data. V roce 2003 byla publikována práce zabývající se sledováním výskytu CDAD v okresní nemocni ve Frýdku-Místku (ZEMANOVÁ *et al.*, 2003), roku 2010 vyšla retrospektivní studie případů CDAD mezi lety 2008 a 2010 v pražské fakultní nemocnici Na Bulovce (POLÍVKOVÁ *et al.* 2010). Mezi roky 2007-2010 analyzovali případy CDAD na Klinice infekčních chorob v Brně (VOJTILOVÁ *et al.* 2011). Studie potvrzují nárůst případů CDAD, i když ne tak dramatický jako je popisováno v Severní Americe a západní Evropě. K molekulární typizaci byly odeslány pouze 4 vzorky z Brna a byly určeny jako ribotyp 176 (VOJTILOVÁ *et al.* 2011).

Přítomnost ribotypu 176 v České republice a v Polsku popisuje také současná práce NYČ *et al.* (2011). Analýza ribotypu 176 poukazuje na podobnost s ribotypem 027, oba ribotypy se vyznačují přítomností genu pro binární toxin a delecí nukleotidu na pozici 117 v genu *tcdC* (NYČ *et al.* 2011). Zbývající české práce se zabývají především diagnostikou a léčbou CDAD. V práci VÁGNEROVÁ *et al.* (2009) se zabývali problematikou infekcí CDAD u předčasně narozených dětí. V celoevropské studii BRAUN *et al.* (2011) bylo typováno 6 náhodných vzorků *C. difficile* z České republiky, 3 byly zařazeny do ribotypu 017 a 2 do ribotypu 023.

2.5.2.2 Výskyt *C. difficile* u zvířat

C. difficile kolonizuje také zažívací trakt zvířat a stejně jako u lidí může být přítomno jako komenzál nebo jako patogen způsobující onemocnění trávicího traktu. Výskyt *C. difficile* u zvířat není pouze problémem medicíny veterinární, ale i humánní, zvířata by mohla sloužit také jako rezervoár tohoto patogenu pro člověka. *C. difficile* je často izolováno ze stolice selat a telat a dále z mnoha dalších zvířat jako jsou psi, kočky, koně, pštrosi, sloni nebo drůbež (FREEMAN *et al.* 2010). V České republice není o výskytu *C. difficile* u hospodářských zvířat mnoho známo, na dvou farmách byly zaznamenány hromadné průjmy novorozených selat vyvolané touto bakterií (MASAŘÍKOVÁ *et al.* 2007). Molekulární typizace zvířecích kmenů odhalila nižší diverzitu ribotypů oproti lidským izolátům, obzvláště u prasat a hovězího dobytka. Dle pozorování KEEL *et al.* (2007) se u 94 % kravských a 83 % prasečích izolátů vyskytoval ribotyp 078. Výrazné zastoupení tohoto ribotypu u zvířat potvrdily i další studie (DEBAST *et al.* 2009), ve Slovinsku byl detekován velmi podobný ribotyp 066 (PIRS *et al.* 2008). Dle BAUER *et al.* (2011) je ribotyp 078 v Evropě třetím nejčastějším i u lidí. RODRIGUEZ-PALACIOS *et al.* (2006) také prokázali překryv ribotypů izolovaných z lidí a zvířat. Při analýze 31 kmenů izolovaných ze zvířat bylo nalezeno 8 rozdílných ribotypů, z čehož 7 bylo dříve identifikováno i u lidí. Mezi zvířecími izoláty byly nalezeny i ribotypy 017 a 027, které jsou spojovány s epidemiemi CDAD (RODRIGUEZ-PALACIOS *et al.* 2006). Přímý přenos *C. difficile* ze zvířat na člověka nebyl nicméně zatím jednoznačně prokázán (NORMAN *et al.* 2011).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY

3.1.1.1 Typové kmeny *C. difficile*

K PCR toxinotypizaci jsme použili typové kmeny toxinotypů 0 (VPI 10463), IIIb, VI a VIII, které byly získány od prof. Rupnik z Lékařské fakulty Univerzity v Mariboru ve Slovinsku.

3.1.1.2 Kmeny *C. difficile* izolované z pacientů

Zkoumané kmeny *C. difficile* byly izolovány v letech 2008-2011 ve Všeobecné fakultní nemocnici (VFN), v letech 2009-2011 na poliklinice Barrandov (PB) a od roku 2010 byla uzavřena spolupráce i s fakultní nemocnicí Na Bulovce (FNB) a fakultní Thomayerovou nemocnicí (FTN). Izolované kmeny jsme převzali a uchovávali ve formě sporových suspenzí.

3.1.1.2.1 Diagnostika *C. difficile* na klinických pracovištích

Ve FTN byly v letech 2010-2011 k diagnostice *C. difficile* používány dva typy komerčních souprav, Rapid *C. difficile* TOX A & B (DiaMondial) a *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab). Obě tyto diagnostické soupravy detekují toxiny A a B na základě jejich interakce se specifickými protilátkami. *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab) detekuje také glutamát dehydrogenázu (GDH), enzym produkovaný všemi kmeny *C. difficile*. K molekulární typizaci jsme obdrželi všechny kmeny, které se podařilo kultivovat na selektivních půdách, bez ohledu na výsledek diagnostického testu.

Ve FNB byla v roce 2010 používána diagnostická souprava VIDAS *Clostridium difficile* A & B (bioMérieux), která detekuje přítomnost toxinů ve stolici, a k molekulární typizaci nám byly zaslány pouze pozitivní kmeny. V roce 2011 byl ve FNB primárně používán test *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab) a pozitivní výsledky byly potvrzeny testem VIDAS *Clostridium difficile* A & B (bioMérieux). K molekulární typizaci jsme obdrželi všechny kmeny, u kterých byla detekována přítomnost GDH.

Ve VFN byla po oba sledované roky (2008-2009) užívána diagnostická souprava XPECT *Clostridium difficile* Toxin A/B Test (Oxoid). K molekulární typizaci nám byly zaslány pouze pozitivní kmeny.

Na PB byla diagnostika *C. difficile* založena pouze na kultivačním vyšetření stolice.

3.1.1.2.2 Věk a pohlaví pacientů

Věkový průměr pacientů, kteří byli testováni na přítomnost *C. difficile* ve stolici, se ve sledovaných zdravotnických zařízeních výrazně lišil: FTN (34 let), FNB (63 let), VFN (58 let) a PB (2 roky). Celkem bylo 71 kmenů (26,2 %) izolováno ze stolice dětí do 2 let a 200 kmenů (73,8 %) ze stolice pacientů starších 2 let. Průměrný věk pacientů starších 2 let byl 62 let.

V rámci naší studie bylo *C. difficile* izolováno ze 120 mužů (44,3 %) a 151 žen (55,7 %).

3.1.1.3 Kmeny *C. difficile* izolované z prasat

Vzorky *C. difficile* pocházející z prasat byly izolovány na prasečí farmě ve středních Čechách. Celkem jsme vyšetřili 30 rektálních výtěrů selat z 15 vrhů, z každého vrhu byla vybrána dvě selata.

3.1.2 MÉDIA PRO KULTIVACI *C. DIFFICILE*

Ke kultivaci *C. difficile* byla použita komerčně dostupná selektivní média (Oxoid, bioMérieux) (kapitola 3.1.2.1). Součástí médií jsou peptony a fruktóza, které poskytují nezbytné zdroje dusíku a uhlíku, a dále fosfáty, které udržují pH. Selektivní média obsahují antibiotika D-cykloserin a cefoxitin, která inhibují růst většiny přidružených bakterií, včetně ostatních zástupců rodu *Clostridium*. Ke kultivaci kmenů *C. difficile* izolovaných z prasat bylo použito jak komerčně dostupné selektivní médium (bioMérieux), tak tekuté selektivní médium připravené dle ZIDARIC *et al.* (2008) (kapitola 3.1.2.2).

3.1.2.1 Kultivace kmenů *C. difficile* izolovaných z pacientů

Brazierovo selektivní médium pro *C. difficile*

C. difficile selektivní médium

Výrobce

Oxoid

bioMérieux

3.1.2.2 Kultivace kmenů *C. difficile* izolovaných z prasat

Transportní médium Amies	Copan
<i>C. difficile</i> selektivní médium	bioMérieux

Tekuté selektivní médium pro *C. difficile* (připraveno dle ZIDARIC *et al.* (2008)):

Pepton	40 (g/l)
Hydrogenfosforečnan sodný	5 (g/l)
Fosforečnan draselný	1 (g/l)
Síran hořečnatý	0,1 (g/l)
Chlorid sodný	2 (g/l)
Fruktóza	6 (g/l)
Agar	15 (g/l)
D-cykloserin	250 (mg/l)
Cefoxitin	8 (mg/l)
Taurocholát sodný	10 (g/l)
Destilovaná voda	1 l

3.1.3 PUFRY A ROZTOKY

Izolace chromozomální DNA:

Fyziologický roztok	0,9% NaCl
TET roztok	20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton

Agarózová gelová elektroforéza:

Pufir TBE 5x	450 mM Tris, 450 mM kyselina trihydrogenboritá, 10 mM EDTA
	Pracovní roztok pro elektroforesu - 0,5x.

3.1.4 ENZYMY

Výrobce

DNA polymerázy:

Pfu DNA polymeráza (2,5 U/μl)	Fermentas
Taq DNA polymeraza (5 U/μl)	Fermentas

Restrikční enzymy:

<i>EcoRI</i> (10 U/μl)	Fermentas
<i>HincII</i> (10 U/μl)	Fermentas
<i>XmiI</i> (<i>AccI</i>) (10 U/μl)	Fermentas

*Nco*I (10 U/ μ l) Fermentas

3.1.5 KOMERČNÍ SOUPRAVY A STANDARDY

Výrobce

Izolace chromozomální DNA:

QIAamp DNA Mini Kit Qiagen

Extrakce DNA z gelu:

MinElute Gel Extraction Kit Qiagen

Detekce toxinů A/B:

Xpect *Clostridium difficile* toxin A/B test Oxoid

Standardy pro agarózovou gelovou elektroforézu:

Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder Fermentas

Gene RulerTM 50 bp DNA Ladder Fermentas

Standard pro kapilární gelovou elektroforézu:

DNA Size Standard Kit 600bp Beckman Coulter

3.1.6 CHEMIKÁLIE A OSTATNÍ POUŽITÉ MATERIÁLY

VÝROBCE

Agaróza AppliChem

Anaerostat Oxoid

dNTPs mix Fermentas

GelRed Biotium

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) Sigma Aldrich

Kyselina trihydrogenboritá Lachema

Loading dye solution Fermentas

Octan sodný Penta

Taurocholát sodný Sigma Aldrich

Tetramethylammonium chlorid (TMA) Sigma Aldrich

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Penta

Triton X100 Sigma

Vyvíječ anaerobního prostředí Anaerogen Oxoid

Ostatní chemikálie pro analytické účely

3.1.6.1 Kapilární gelová elektroforéza (sekvenátor Beckman CEQ 8000)

DNA Size Standard Kit 600bp	Beckman Coulter
Gel do kapilární elektroforézy	Beckman Coulter
GenomeLab separační pufr	Beckman Coulter
Genomelab sada kapilár	Beckman Coulter
Minerální olej	Beckman Coulter
Sample Loading Solution (SLS)	Beckman Coulter

3.1.7 OLIGONUKLEOTIDY PRO PCR

Název	Sekvence 5'-3'	Amplifikovaný gen / metoda	Výrobce
Tim6	TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA	<i>cdd3</i>	Generi Biotech
Struppi6	GGCTATTACACGTAATCCAGATA	<i>cdd3</i>	Generi Biotech
Tim2	GCACCTCATC'ACCATCTTCAA	<i>tcdC</i>	Generi Biotech
Struppi2	TGAAGACCATGAGGAGGTCAT	<i>tcdC</i>	Generi Biotech
Btb ⁺	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	<i>cdtB</i>	Generi Biotech
Btb ⁻	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC	<i>cdtB</i>	Generi Biotech
C1	TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCC	<i>tcdC</i>	Metabion Intern.
C2	TCTAATAAAAAGGGAGATTGTATTATG	<i>tcdC</i>	Metabion Intern.
Lok3	TTTACCAGAAAAAGTAGCTTTAA	Tox	Generi Biotech
Lok1	AAAATATACTGCACATCTGTATAC	Tox	Generi Biotech
B1C	AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA	Tox	Sigma Aldrich
B2N	CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG	Tox	Sigma Aldrich
A1C	GGAGGTTTTTATGTCTTTAATATCTAAAGA	Tox	Sigma Aldrich
A2N	CCCTCTGTTATTGTAGGTAGTACATTTA	Tox	Sigma Aldrich
A3C	TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG	Tox	Sigma Aldrich
A4N	TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC	Tox	Sigma Aldrich
Ribo16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	Ribo	Sigma Aldrich
Ribo23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	Ribo	Sigma Aldrich
A6cdF	TTAATTGAGGGAGAATGTTAAA	MLVA	Sigma Aldrich
A6cdR	AAATACTTTTCCCACTTTCATAA	MLVA	Sigma Aldrich
B7cdF	CTTAATACTAAACTAACTCTAACCCAGTAA	MLVA	Sigma Aldrich
B7cdR	TTATATTTTATGGGCATGTTAAA	MLVA	Sigma Aldrich
C6cdF	GTTTAGAATCTACAGCATTATTTGA	MLVA	Sigma Aldrich
C6cdR	ATTGGAATTGAATGTAACAAAA	MLVA	Sigma Aldrich
E7cdF	TGGAGCTATGGAAATTGATAA	MLVA	Sigma Aldrich
E7cdR	CAAATACATCTTGCATTAATTCTT	MLVA	Sigma Aldrich
F3cdF	TTTTTGAAACTGAACCAACATA	MLVA	Sigma Aldrich
F3cdR	ACAAAAGACTGTGCAAATATACTAA	MLVA	Sigma Aldrich
G8cdF	TGTATGAAGCAAGCTTTTTTATT	MLVA	Sigma Aldrich
G8cdR	AATCCAGCAATCTAATAATCCA	MLVA	Sigma Aldrich
H9cdF	GTTTTGAGGAAACAAACCTAT	MLVA	Sigma Aldrich
H9cdR	GATGAGGAAATAGAAGAGTTCAA	MLVA	Sigma Aldrich

Tab. 2: Oligonukleotidy používané pro PCR. Ve 3. sloupci jsou uvedeny geny, jejichž části jsou s použitím daných oligonukleotidů amplifikovány, popřípadě metody, při kterých byly oligonukleotidy použity (Tox = amplifikace variabilních úseků genů *tcdA* a *tcdB* při toxinotypizaci, Ribo = amplifikace mezerníkové oblasti 16S-23S rRNA při ribotypizaci, MLVA = amplifikace tandemových repetitivních úseků A6cd, B7cd, C6cd, E7cd, F3cd, G8cd a H9cd).

3.1.7.1 Fluorescenčně značené oligonukleotidy

Název	Fluorescenční značení	Metoda	Sekvenátor	Výrobce
Ribo16S	D4	Ribo	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
	FAM	Ribo	ABI PRISM 3130xl	Sigma Aldrich
A6cdF	D2	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
B7cdF	D4	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
C6cdF	D2	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
E7cdF	D3	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
F3cdF	D4	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
G8cdF	D2	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich
H9cdF	D3	MLVA	Beckman CEQ 8000	Sigma Aldrich

Tab. 3: Fluorescenčně značené oligonukleotidy používané pro PCR. Ve 3. sloupci jsou uvedeny metody, při kterých byly oligonukleotidy použity (Ribo = amplifikace mezerkové oblasti 16S-23S rRNA při ribotypizaci, MLVA = amplifikace tandemových repetitiv A6cd, B7cd, C6cd, E7cd, F3cd, G8cd a H9cd).

3.1.8 PŘÍSTROJE

VÝROBCE, ZEMĚ VÝROBY

Kapilární sekvenátor (ABI PRISM 3130xl)

Applied Biosystems, USA

Kapilární sekvenátor (Beckman CEQ 8000)

Beckman Coulter, USA

Termocykler GenePro

Bioer, Čína

Termocykler Techne TC-512

Techne, USA

UV transiluminator (Reprostar 3)

Camag, Švýcarsko

3.1.9 POČÍTAČOVÁ ANALÝZA

VÝROBCE

Fragmentační analýza – kapilární gelová elektroforéza

CEQ 8000 Genetic Analysis System

Beckman Coulter

Ribotypizace

<http://webribo.ages.at> – aplikace WEBRIBO

Shluková analýza – MLVA

BioNumerics 6.6

Applied Maths, Belgie

Sekvenace

Sequence Scanner Software v1.0

Applied Biosystems

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - informace o genomové sekvenci *C. difficile*

3.2 METODY

3.2.1 KULTIVACE KMENŮ *C. DIFFICILE* IZOLOVANÝCH ZE STOLICE PACIENTŮ

Na selektivní půdy (Oxoid, bioMérieux) jsme očkovali 5-10 µl sporové suspenze *C. difficile*. Kultivace probíhala v anaerostatu (AnaeroJar, Oxoid) při 37°C, anaerobní prostředí bylo zajištěno pomocí vyvíječe anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid). Izoláty jsme předběžně identifikovali na základě morfologie kolonií a typického zápachu. Pro sporulaci jsme bakterie kultivovali 4-5 dní na selektivních plotnách, následně jsme buňky resuspendovali ve 400 µl destilované vody a uchovávali při 4°C. Vzorky určené pro izolaci chromozomální DNA byly inkubovány 24-48 hodin, promyty 400 µl fyziologického roztoku a centrifugovány (10 min, 5000 x g, při pokojové teplotě). Z buněk byla následně izolována chromozomální DNA nebo byly uchovány při -20°C k dalšímu zpracování.

3.2.2 IZOLACE A KULTIVACE KMENŮ *C. DIFFICILE* ZE STOLICE SELAT

Nejprve byl proveden rektální výtěr u selat ve věku 12-23 dnů, která pocházela z 15 vrhů. Testována byla vždy dvě selata z vrhu a vrhy zahrnovaly jak zvířata s průjmem (2 vrhy) tak bez průjmu (13 vrhů). Na projektu jsme spolupracovali s RNDr. Janou Goldovou, Ph.D., která prováděla rektální výtěry selat a podílela se na izolaci *C. difficile* ze vzorků. Uvedená data jsou použita s jejím svolením.

Odběrové vatové tampóny na plastové tyčince jsme uchovávali v transportním médiu Amies a vzorky jsme kultivovali do 6 hodin po odběru. Kultivace probíhala v anaerostatu (AnaeroJar, Oxoid) při 37°C, anaerobní prostředí bylo zajištěno pomocí vyvíječe anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid). Zvolili jsme dva alternativní způsoby kultivace *C. difficile*. Jednou z metod byl přímý stěr materiálu z odběrového tampónu na selektivní půdu s cefoxitinem a cykloserinem (CLO, bioMérieux) a anaerobní kultivace po dobu 48 hodin. Druhým způsobem byla obohacovací metoda dle ZIDARIC *et al.* (2008). Při tomto postupu byl tampón nejprve 7 dní anaerobně inkubován v tekutém médiu obsahujícím cefoxitin, D-cykloserin, fruktózu a taurocholát sodný, který jsme přidali pro usnadnění germinace spor (ZIDARIC *et al.* 2008). Pro zvýšení záchyty *C. difficile* jsme dále použili tzv. metodu alkoholového šoku, při které jsme 2 ml kultury smíchali s 2 ml ethanolu, po 1 hodině jsme vzorek centrifugovali

(5min, 10000 x g, při pokojové teplotě) a vyseli na selektivní půdu (CLO, bioMérieux). Následovaly 3 dny anaerobní kultivace. U vzorků určených pro izolaci chromozomální DNA jsme postupovali stejně jako u vzorků od lidských pacientů (viz. kapitola 3.2.1).

3.2.3 IZOLACE DNA

Genomová DNA byla z bakterií izolována pomocí komerčně dostupné soupravy QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

3.2.4 IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ TOXINŮ A A B

V případě vzorků izolovaných ze stolice selat jsme přítomnost toxinů A a B prokazovali pomocí komerčního imunochromatografického testu (XPECT *Clostridium difficile* Toxin A/B Test, Oxoid) následujícím způsobem:

Nejprve jsme vzorek rozpustili v 0,5 ml dilučního pufru. K 100 µl vzniklé suspenze jsme přidali 5 kapek konjugačního činidla 1 obsahujícího mikročástice značené pigmenty s navázanými protilátkami proti toxinům A a B a dále 5 kapek konjugačního činidla 2 s protilátkami biotinylovanými. Po promíchání jsme 200 µl směsi nanесли na testovací destičku, kterou jsme nechali 20 minut vyvíjet při pokojové teplotě. Na membráně testu je pruh s imobilizovaným streptavidinem, který váže biotinylované protilátky. Pokud je na tyto protilátky navázán imunokomplex toxinu a mikročástice značené pigmentem, vznikne viditelný pruh značící přítomnost toxinů. Kontrolní pruh na membráně obsahuje sekundární protilátky proti kozím protilátkám, biotinylované protilátky proti toxinu A se tedy naváží i bez přítomnosti toxinů. Tento pruh slouží ke kontrole funkčnosti testu.

3.2.5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE – PCR

PCR umožňuje mnohonásobně amplifikovat specifickou sekvenci DNA i z jejího nepatrného počátečního množství. Na okrajích úseku DNA, který chceme amplifikovat, jsou na základě znalosti sekvence navrženy dva oligonukleotidy, které slouží jako počátky pro *in vitro* syntézu daného úseku DNA pomocí DNA polymerázy. Celá reakce spočívá v mnohonásobném opakování tří základních kroků, denaturace, hybridizace oligonukleotidů a elongace. V první fázi jsou od sebe řetězce DNA odděleny působením vyšší teploty (denaturace), následuje snížení teploty a nasedání přidaných oligonukleotidů na komplementární sekvenci DNA (hybridizace oligonukleotidů), ve

třetím kroku je za přítomnosti DNA-dependentní DNA polymerázy a deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) syntetizován příslušný úsek DNA (elongace). Celá metoda je založena na využití termostabilní DNA polymerázy, která nepodléhá denaturaci při vyšších teplotách a může tedy podstoupit větší počet třífázových cyklů za sebou. Pro správný průběh reakce a zabránění vzniku nespecifických produktů je klíčové optimalizovat koncentrace komponent reakční směsi a zvolit vhodnou teplotu hybridizace oligonukleotidů.

3.2.5.1 Detekce částí genů *cdd3*, *tcdC* a úseku *Lok3/Lok1*

Pro potvrzení, že vzorek obsahuje DNA druhu *C. difficile*, jsme amplifikovali gen *cdd3* u všech zkoumaných vzorků. Tento gen je lokalizován v blízkosti místa inserce lokusu PaLoc a vyskytuje se u patogenních i nepatogenních kmenů *C. difficile* (BRAUN *et al.* 1996).

Molekulární diagnostika *C. difficile* dále spočívala v amplifikaci části genu *tcdC* přítomného u všech kmenů s lokusem PaLoc za použití oligonukleotidů Tim6 a Struppi6. V případě sekvenace genu *tcdC* jsme použili oligonukleotidy C1 a C2, pomocí kterých jsme amplifikovali celý gen. U kmenů, u kterých nebyla část genu *tcdC* detekována, jsme provedli PCR s oligonukleotidy Lok3 a Lok1. Tyto oligonukleotidy nasedají na sekvence DNA obklopující PaLoc. Specifický PCR produkt vznikne u kmenů, kterým tento lokus chybí, v opačném případě je oblast pro amplifikaci příliš dlouhá (BRAUN *et al.* 1996). K PCR s oligonukleotidy Lok3 a Lok1 jsme zpětně přistoupili také u kmenů, u kterých jsme nebyli schopni stanovit toxinotyp nebo jsme u nich detekovali ribotyp asociovaný s nepatogenními kmeny

*Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci genu *cdd3*:*

Složení reakční směsi <i>cdd3</i>	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	35,875	1	94	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	94	45''
MgCl ₂ (25 mM)	5	3	52	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	72	1'
Tim6 (10 pmol/µl)	1	5	72	10'
Struppi6 (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 30 x		
Taq (5U/µl)	0,125			
Množství přidané DNA	1			

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci části genu tcdC:

Složení reakční směsi část <i>tcdC</i>	Množství (50 µl/reakce)	Krok		Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	35,875	1	Počáteční denaturace	94	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	Denaturace	94	45''
MgCl ₂ (25 mM)	5	3	Hybridizace oligonukleotidů	52	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	Elongace	72	1'
Tim2 (10 pmol/µl)	1	5	Finální elongace	72	10'
Struppi2 (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 30 x			
Taq (5U/µl)	0,125				
Množství přidané DNA	1				

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci celého genu tcdC:

Složení reakční směsi celý <i>tcdC</i>	Množství (50 µl/reakce)	Krok		Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	37,8	1	Počáteční denaturace	95	5'
10 x pufr Taq KCl	3	2	Denaturace	95	1'
MgCl ₂ (25 mM)	5	3	Hybridizace oligonukleotidů	52	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	Elongace	72	1'
C1 (10 pmol/µl)	1	5	Finální elongace	72	10'
C2 (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 35 x			
Taq (5U/µl)	0,2				
Množství přidané DNA	1				

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci oblasti Lok3/Lok1:

Složení reakční směsi <i>Lok3/I</i>	Množství (50 µl/reakce)	Krok		Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	35,875	1	Počáteční denaturace	94	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	Denaturace	94	45''
MgCl ₂ (25 mM)	5	3	Hybridizace oligonukleotidů	52	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	Elongace	72	1'
Lok3 (10 pmol/µl)	1	5	Finální elongace	72	10'
Lok1 (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 30 x			
Taq (5U/µl)	0,125				
Množství přidané DNA	1				

3.2.5.2 PCR toxinotypizace

Toxinotypizace spočívá v amplifikaci variabilních úseků A3 a B1 v genech kódujících toxiny A a B. V případě nejednoznačných výsledků jsme dodatečně amplifikovali i úsek A1 genu *tcdA* (RUPNIK *et al.* 1997).

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci fragmentu A3 genu tcdA:

Složení reakční směsi A3	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	27,84	1	93	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	47	8'
MgCl ₂ (25 mM)	4			
TMA (1mM)	5			
dNTP (10 mM mix)	1	3	72	3''
A4N (10 pmol/µl)	1	4	47	10'
A3C (10 pmol/µl)	1			
Taq (5U/µl)	0,16	Kroky 2-3 opakovány 35 x		
Množství přidané DNA	5			

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci fragmentu B1 genu tcdB:

Složení reakční směsi B1	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	34,84	1	93	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	47	8'
MgCl ₂ (25 mM)	4			
dNTP (10 mM mix)	1			
A4N (10 pmol/µl)	1	3	72	3''
A3C (10 pmol/µl)	1	4	47	10'
Taq (5U/µl)	0,16			
Množství přidané DNA	3	Kroky 2-3 opakovány 30 x		

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci fragmentů A1 genu tcdA:

Složení reakční směsi A1 a A2	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	34,8	1	93	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	56	8'
MgCl ₂ (25 mM)	4			
dNTP (10 mM mix)	1			
A2N (10 pmol/µl)	1	3	72	3''
A1C (10 pmol/µl)	1	4	56	10'
Taq (5U/µl)	0,2			
Množství přidané DNA	3	Kroky 2-3 opakovány 30 x		

3.2.5.3 Detekce binárního toxinu

Binární toxin je kódován geny *cdtA* a *cdtB* v oblasti nazývané CdtLoc. Všechny známé kmeny *C. difficile* nesoucí CdtLoc kódují oba tyto geny, proto se k detekci binárního toxinu amplifikuje pouze část genu *cdtB* (STUBBS *et al.* 2000).

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci fragmentu genu cdtB:

Složení reakční směsi <i>cdtB</i>	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas	
H ₂ O	35,875	1	Počáteční denaturace	94	5'
10 x pufr Taq (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	Denaturace	94	45''
MgCl ₂ (25 mM)	5	3	Hybridizace oligonukleotidů	52	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	Elongace	72	1'
Btb+ (10 pmol/µl)	1	5	Finální elongace	72	10'
Btb- (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 30 x			
Taq (5U/µl)	0,125				
Množství přidané DNA	1				

3.2.5.4 PCR Ribotypizace

Variabilitu kmenů jsme dále sledovali pomocí PCR ribotypizace (BIDET *et al.* 1999). V případě analýzy ribotypů pomocí kapilární gelové elektroforózy byla k PCR amplifikaci použita DNA polymeráza *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*), která na rozdíl od polymerázy *Taq* (*Thermus aquaticus*) nevytváří na 3'konci DNA adeninové přesahy, a dále oligonukleotidy Ribo23S a fluorescenčně značené oligonukleotidy Ribo16S (D4 nebo FAM) ředěné s neznačenými v poměru 1:2.

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci 16S-23S mezerníkové oblasti:

Složení reakční směsi RiboPfu	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas	
H ₂ O	32	1	Počáteční denaturace	95	5'
10 x pufr Pfu (NH ₄) ₂ SO ₄	5	2	Denaturace	95	1'
Mg SO ₄ (25 mM)	3	3	Hybridizace oligonukleotidů	57	1'
dNTP (10 mM mix)	1	4	Elongace	72	8'
Ribo16S (50 pmol/µl)	1	5	Finální elongace	72	10'
Ribo23S (50 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 33 x			
Pfu (2,5U/µl)	1				
Množství přidané DNA	3				

3.2.5.5 PCR MLVA

Metoda MLVA je založena na amplifikaci 7 tandemových repetic v genomu *C. difficile*: A6cd, B7cd, C6cd, E7cd, F3cd, G8cd a H9cd. Pro následnou analýzu na kapilární gelové elektroforóze byl jeden z oligonukleotidů použitý v PCR reakci vždy fluorescenčně značen a ředěn s příslušným neznačeným oligonukleotidem v následujícím poměru:

Oligonukleotid (značení)	A6cdF (D2)	B7cdF (D4)	C6cdF (D2)	E7cdF (D3)	F3cdF (D4)	G8cdF (D2)	H9cdF (D3)
Značené	1	1	1	1	1	1	1
Neznačené	0	2	0	2	1	4	4

Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci tandemových repetic A-H:

Složení reakční směsi MLVA	Množství (50 µl/reakce)	Krok	Teplota (°C)	Čas
H ₂ O	33,75	1	95	5'
10 x pufr Taq KCl	5	2	94	30''
Mg Cl ₂ (25 mM)	6	3	51	30''
dNTP (10 mM mix)	1	4	72	2'
Oligonukleotid F (10 pmol/µl)	1	5	72	10'
Oligonukleotid R (10 pmol/µl)	1	Kroky 2-4 opakovány 35 x		
Taq (5U/µl)	0,25			
Množství přidané DNA	2			

3.2.6 ŠTĚPENÍ FRAGMENTŮ A3 A B1 RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI

Restrikční endonukleázy (RE) jsou enzymy rozeznávající specifické sekvence dvouřetězcové DNA (dsDNA), které štěpí v obou vláknech za vzniku fragmentů s přesně definovanými konci.

Amplifikované fragmenty A3 a B1 jsme štěpili pomocí enzymů *EcoRI* (A3) a *HincII* a *AccI* (B1) (RUPNIK *et al.* 1997). Při štěpení fragmentu A3 jsme 5 µl reakční směsi (4 µl H₂O + 1 µl pufru R + 0,2 µl *EcoRI*) přidali k 15 µl produktu PCR. Fragment B1 jsme štěpili pomocí dvou RE ve dvou oddělených reakcích, u obou reakcí jsme 10 µl reakční směsi (8 µl H₂O + 2 µl pufru Tango / pufr B + 0,2 µl *HincII* / *AccI*) přidali k 15 µl produktu PCR. Takto připravené směsi jsme nechali štěpit přes noc při 37°C.

3.2.7 AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Agarózová gelová elektroforéza je běžně používaná separační metoda, která dělí makromolekuly na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost pohybu dělených molekul závisí na jejich molekulové hmotnosti a konformaci, na koncentraci gelu, použitém napětí a na složení elektroforetického pufru. Velikost fragmentů je odvozena srovnáním se současně separovaným standardem.

Produkty PCR, popřípadě jejich štěpené fragmenty, jsme analyzovali pomocí horizontální agarózové elektroforézy s pufrem TBE. Používali jsme 1-3% agarózový gel, do kterého jsme přidávali barvu GelRed (10000x), která nám umožnila detekci DNA fragmentů v UV světle. Vzorky DNA (5-10 μ l) jsme nanášeli spolu s nanášecím pufrem (6x Loading Dye Solution) v poměru 1:6. Součástí tohoto pufru jsou barviva bromfenolová modř a xylen-cyanol FF, které pomáhají sledovat rychlost migrace DNA v gelu, dále glycerol zajišťující klesnutí vzorku na dno jamky a chelatační činidlo EDTA. Separace DNA fragmentů probíhala při napětí 5 V/cm². Výsledky separace DNA jsme vizualizovali pomocí UV transiluminátoru a vyfotili pro archivaci.

U toxinotypizace jsme podle fotografie agarózového gelu (1%) přiřadili vzorkům jednotlivé toxinotypy na základě srovnání s toxinotypy vzorovými (<http://www.mf.uni-mb.si/tox/>). U ribotypizace a MLVA sloužila agarózová gelová elektroforéza jako kontrola před kapilární gelovou elektroforézou.

3.2.8 KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

V kapilární gelové elektroforéze se separace provádí v kapiláře naplněné gelem a makromolekuly se, podobně jako u běžné horizontální gelové elektroforézy, dělí podle své molekulové hmotnosti. Detektor postupně zaznamenává průchod jednotlivých fluorescenčně značených fragmentů a standardu kapilárou a přiřazuje jim určité velikosti. Dokáže mezi jednotlivými fragmenty rozlišit rozdíly i jednoho nukleotidu. Pro analýzu PCR ribotypizace jsme využili kapilární DNA sekvenátory CEQ 8000 (Beckman Coulter) a ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems), pro analýzu MLVA pouze sekvenátor CEQ 8000 (Beckman Coulter).

3.2.8.1 Kapilární gelová elektroforéza - ribotypizace

V případě analýzy pomocí sekvenátoru CEQ 8000 jsme v mikrotitrační destičce smíchali 40 μ l SLS a 0,5 μ l standardu (DNA Size Standard Kit 600BP). SLS (Beckman

Coulter) je deionizovaný formamid, který působí jako denaturační činidlo. Produkt PCR jsme ředili s vodou v poměru 1:14 a 0,5 µl vzorku jsme přidali k roztoku standardu v SLS. Po promíchání jsme vzorek překryli kapkou minerálního oleje. Takto připravené vzorky jsme separovali pomocí kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 s osmi kapilárami o délce 50 cm, podmínky separace byly následující: denaturace vzorků před elektroforézou - 90°C, 120 s; nanesení vzorku do kapiláry – 2 kV, 30 s; parametry separace – 4,8 kV, 60 min, teplota kapiláry 50°C (program Frag-4). Generovaná data jsme vyhodnotili pomocí programu CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

Analýza pomocí sekvenátoru ABI PRISM 3130xl byla provedena ve Středisku sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. K separaci ribotypů byly použity kapiláry dlouhé 50 cm s polymerem POP-7 (Applied Biosystems) a standard Liz1200 (Applied Biosystems).

Pomocí internetové aplikace WEBRIBO (<http://webribo.ages.at>) jsme jednotlivým ribotypům přiřadili mezinárodní označení.

3.2.8.2 Kapilární gelová elektroforéza - MLVA

K analýze MLVA jsme použili sekvenátor CEQ 8000, postup separace byl obdobný jako v kapitole 3.2.8.1, s tím rozdílem, že jsme více fragmentů PCR označených různými fluorescenčními značkami spojili do jedné reakce. Konkrétně jsme společně separovali amplikony A6 a B7, C6 a E7, a F3, G8 a H9. Ředění produktů PCR při této kombinaci bylo následující: (1) 13 µl H₂O + 6 µl A6 + 1 µl B7; (2) 10 µl H₂O + 6 µl C6 + 1 µl E7; (3) 19 µl H₂O + 2 µl F3 + 1 µl G8 + 1 µl H9.

U referenčních kmenů toxinotypů IIIb a VIII jsme počet tandemových repetic ve sledovaných lokusech stanovili sekvenováním příslušných fragmentů DNA. U zbylých kmenů byly počty tandemových repetic vypočítány na základě velikosti příslušných fragmentů DNA.

3.2.9 SHLUKOVÁ ANALÝZA MLVA

Shluková analýza je statistická metoda třídící objekty do skupin (shluků) tak, aby si objekty náležící do stejné skupiny byly na základě zadaných znaků podobnější než objekty z různých skupin (HILL a LEWICKI 2007). Počty repetic v jednotlivých lokusech jsme zadali do programu BioNumerics (Applied Maths) a provedli jsme shlukovou analýzu dle BROUKHANSKI *et al.* (2011). Ke kvantitativnímu vyjádření

podobnosti jsme použili Manhattanskou metriku. Hierarchické shlukování bylo provedeno na základě Wardovy metody (HILL a LEWICKI 2007). Za klonální jsme považovali takové skupiny, jejichž podobnost byla nejméně 95 % (BROUKHANSKI *et al.* 2011).

3.2.10 PŘÍPRAVA PRODUKTŮ DNA NA SEKVENACI

Pro účely sekvenace jsme fragmenty DNA separované v agarózovém gelu izolovali pomocí komerční soupravy MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) podle pokynů od výrobce. Sekvenace byla provedena pomocí sekvenátoru ABI PRISM 3130xl ve Středisku sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Získaná data jsme analyzovali pomocí programu Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). V případě genu *tcdC* jsme sekvence porovnávali s osekvenovaným genomem *C. difficile* kmene VPI 10463, v případě lokusů A6cd, B7cd, C6cd, E7cd, F3cd, G8cd a H9cd s genomem kmenu *C. difficile* 630 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4 VÝSLEDKY

4.1 VÝSKYT *C. DIFFICILE*

V letech 2008-2011 jsme sledovali výskyt CDAD ve Všeobecné fakultní nemocnici (VFN), v letech 2009-2011 na poliklinice Barrandov (PB) a v letech 2010-2011 také ve fakultní Thomayerově nemocnici (FTN) a fakultní nemocnici Na Bulovce (FNB). Celkem jsme za mezi lety 2008 a 2011 obdrželi k analýze 313 bakteriálních kmenů, z toho 38 kmenů pocházelo z VFN, 142 z FTN, 116 z FNB a 17 z PB (Tab. 4).

Z 313 bakteriálních sporových suspenzí jsme celkem izolovali 291 kmenů *C. difficile*, což jsme prokázali amplifikací druhově specifického genu *cdd3* pomocí PCR (BRAUN *et al.* 1996). Devatenáct kmenů se nám nepodařilo oživit. U 3 vzorků se nám opakovaně gen *cdd3* amplifikovat nepodařilo, pravděpodobně se tudíž o *C. difficile* nejednalo a vzorky byly z dalších analýz vyřazeny (Tab. 4). Dvacet vzorků pocházelo od pacientů, kteří byly na přítomnost *C. difficile* ve stolici testovány opakovaně v průběhu 2-41 dní po prvním testování.

	VFN	FTN	FNB	PB	Celkem
Počet obdržených kmenů	38	142	116	17	313
Počet kmenů <i>C. difficile</i>	36	140	102	13	291
Počet kmenů bez detekovaných genů <i>C. difficile</i>	1	1	0	1	3
Počet neoživených kmenů	1	1	14	3	19

Tab. 4: Počty kmenů obdržených k analýze z jednotlivých nemocnic.

4.2 DIAGNOSTIKA *C. DIFFICILE* NA KLINICKÝCH PRACOVIŠTÍCH

Ve FTN byly v letech 2010-2011 k diagnostice *C. difficile* používány komerční soupravy Rapid *C. difficile* TOX A & B (DiaMondial) a *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab). Výsledky těchto testů nebyly známy u 52 kmenů. Pouze u 1 z kultivovaných kmenů nebyla ve stolici detekována přítomnost GDH ani toxinů (Tab. 5).

Ve FNB byla v roce 2010 používána diagnostická souprava VIDAS *Clostridium difficile* A & B (bioMérieux), v roce 2011 byly používány testy *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab) a VIDAS *Clostridium difficile* A & B (bioMérieux). K molekulární typizaci jsme obdrželi všechny kmeny, u kterých byla detekována přítomnost GDH (Tab. 5). Výsledky diagnostických testů nebyly známy u 8 kmenů.

Údaje o výsledcích diagnostických testů z VFN nejsou dostupné. Na PB byla diagnostika *C. difficile* založena pouze na kultivačním vyšetření stolice.

Nemocnice	FTN		FNB	
	Rapid <i>C. difficile</i> TOX A & B	<i>C. difficile</i> Quik Chek Complete	2010	2011
Vidas <i>C. difficile</i> A & B			Vidas <i>C. difficile</i> A & B + <i>C. difficile</i> Quik Chek Complete	
Tox+	16	-	37	-
Tox-	23	-	0	-
GDH+Tox+	-	14	-	37
GDH+Tox-	-	34	-	20
GDH-Tox-	-	1	-	0

Tab. 5: Diagnostika *C. difficile* ve FTN a FNB. Tox+ = toxiny byly detekovány, Tox- = toxiny nebyly detekovány, GDH+ = glutamát dehydrogenáza byla detekována, GDH- = glutamát dehydrogenáza nebyla detekována.

4.3 MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA *C. DIFFICILE*

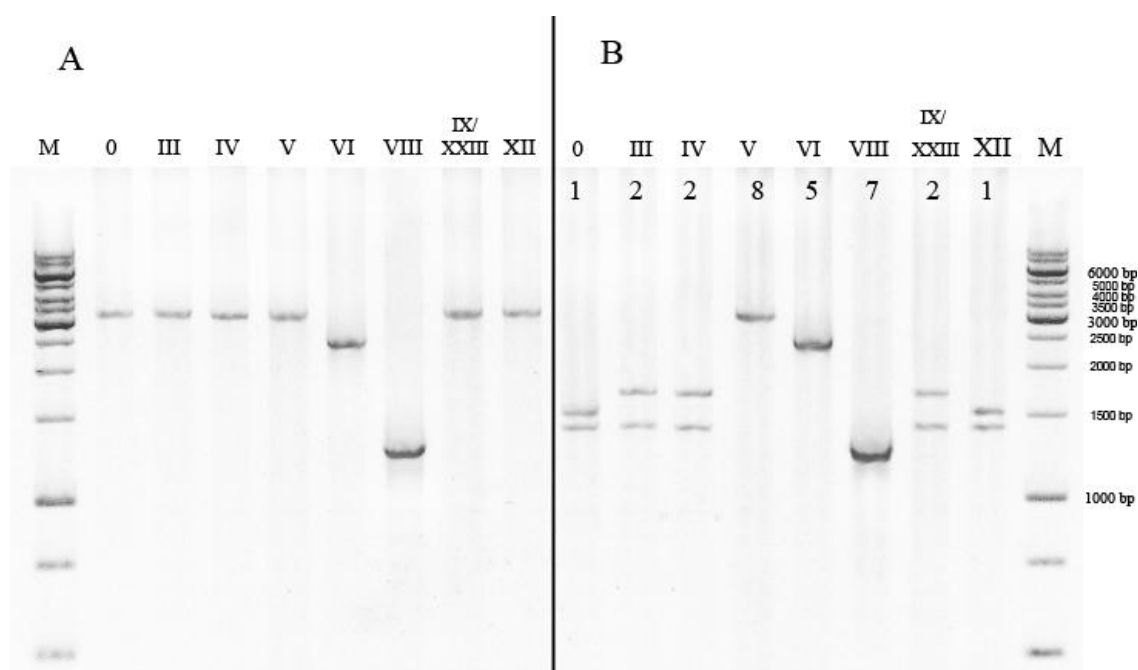
Z 291 analyzovaných kmenů *C. difficile* jsme u 192 (66 %) amplifikovali část genu *tcdC*, amplifikace úseku Lok3/Lok1 nebyla u těchto kmenů provedena. U zbylých 99 kmenů (34 %) se úsek Lok3/Lok1 amplifikovat podařilo. U 41 kmenů jsme pomocí PCR amplifikovali jak úsek Lok3/Lok1, tak i část některého z genů *tcdC*, nebo *tcdA* a *tcdB* (amplifikovány při toxinotypizaci). U 3 kmenů jsme detekovali úsek Lok3/Lok1 i části všech tří genů (*tcdC*, *tcdA* a *tcdB*) typických pro oblast PaLoc. (Tab. 6).

Gen <i>tcdC</i>	Geny pro toxiny	Lok3/Lok1 pozitivní	Lok3/Lok1 netestováno
<i>tcdC+</i>	Tox++	3	192
	Tox+-	9	0
	Tox--	9	0
<i>tcdC-</i>	Tox++	2	0
	Tox+-	18	0
	Tox--	58	0
Celkem (%)		99 (34)	192 (66)

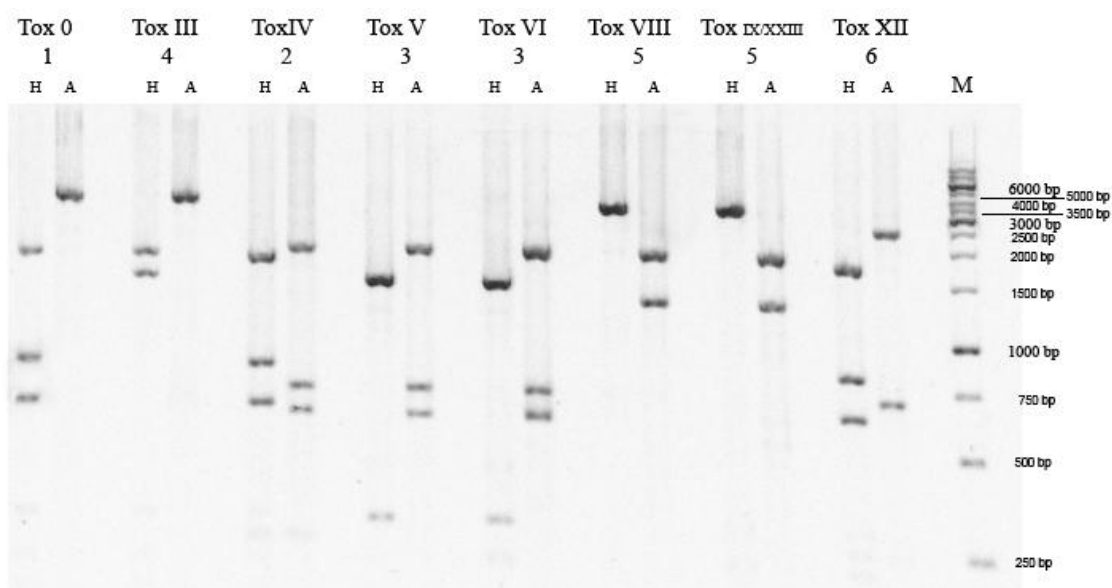
Tab. 6: Amplifikace částí lokusu PaLoc a úseku Lok3/Lok1. V tabulce jsou uvedeny výsledky amplifikace částí genů *tcdC*, genů pro toxiny a úseku Lok3/Lok1 pomocí PCR. V případě genů pro toxiny bylo rozlišeno, zda se podařilo amplifikovat části obou genů (Tox++), pouze jednoho genu (Tox+-) nebo ani jednoho z genů (Tox--).

4.4 TOXINOTYPIZACE

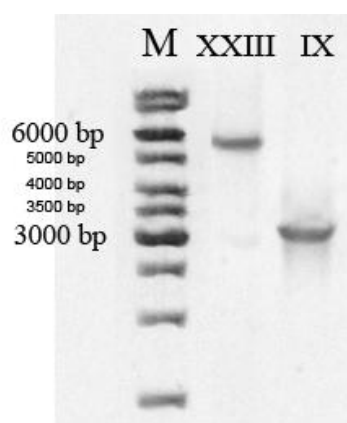
Pomocí toxinotypizace jsme sledovali variabilitu v genech kódujících toxiny A a B (RUPNIK *et al.* 1998). Amplifikované fragmenty A3 (Obr. 7) a B1 (Obr. 8) genů *tcdA* a *tcdB* jsme štěpili enzymy *EcoRI* (A3), *HincII* a *AccI* (B1) a na základě rozdílů délek štěpených fragmentů jsme vzorkům přiřadili toxinotypy (Tab. 7). Pro rozlišení toxinotypů IX a XXIII, které mají shodné restriční profily fragmentů A3 a B1, jsme amplifikovali také fragment A1 genu *tcdA*. Toxinotyp XXIII má fragment A1 delší díky inzerci mobilního genetického elementu ISTRonu o velikosti 2 kb (BRAUN *et al.* 2000) (Obr. 9).



Obr. 7: Toxinotypizace – A3. A) Amplifikované fragmenty A3 před restrikcí, B) restriční profily fragmentů A3 u 9 detekovaných toxinotypů. Fragmenty byly štěpeny enzymem *EcoRI*. Řecké číslice reprezentují jednotlivé toxinotypy, arabské číslice typy restričních profilů. Identifikovali jsme 5 restričních profilů fragmentu A3. M = DNA standard 1 kb.



Obr. 8: Toxinotypizace – B1. Restrikční profily fragmentu B1 u 9 detekovaných toxinotypů. Fragменты B1 byly štěpeny enzymy *HincII* (H) a *AccI* (A). Řecké číslice reprezentují jednotlivé toxinotypy, arabské číslice typy restrikčních profilů. Identifikovali jsme 6 restrikčních profilů. M = DNA standard 1 kb.



Obr. 9: Srovnání fragmentu A1 u toxinotypů XXIII a IX. Toxinotyp XXIII má fragment A1 delší díky přítomnosti mobilního genetického elementu ISTRonu.

Toxinotyp	Produkce toxinů	Typ A3	Typ B1	Poznámka
0	A ⁺ B ⁺	1	1	
III	A ⁺ B ⁺	2	4	
IV	A ⁺ B ⁺	2	2	
V	A ⁺ B ⁺	8	3	
VI	A ⁺ B ⁺	5	3	
VIII	A ⁺ B ⁺	7	5	
IX	A ⁺ B ⁺	2	5	Kratší fragment A1 než XXIII
XXIII	A ⁺ B ⁺	2	5	Delší fragment A1 než IX

Tab. 7: Produkce toxinů a typy restrikčních profilů fragmentů A3 a B1 charakteristické pro jednotlivé toxinotypy.

Toxinotyp nebyl stanoven u 99 kmenů, u kterých se podařilo amplifikovat úsek Lok3/Lok1. Zbylých 192 kmenů *C. difficile* jsme zařadili do 8 různých toxinotypů: 0, III, IV, V, VI, VIII, IX, a XXIII (Tab. 8). Aby nedocházelo k duplicitě dat, bylo z následující analýzy toxinotypů zpětně vyřazeno 18 kmenů, které byly opakovaně izolovány z jednoho pacienta a shodovaly se v toxinotypu i ribotypu. Po vyřazení duplicit byl toxinotyp přiřazen 180 kmenům. Nejběžnějším toxinotypem byl toxinotyp 0, který byl detekován u 93 ze 180 izolátů (51,7 %). Druhým nejběžnějším toxinotypem detekovaným u 57 izolátů (31,7 %) byl toxinotyp VIII, pro který je charakteristická zkrácená forma genu *tcdA*, jejíž exprese nevede k tvorbě funkčního toxinu (tzv. A⁻/B⁺ kmeny). Ve VFN reprezentoval tento toxinotyp 50 % kmenů, u kterých byly toxinotypy stanoveny. U 20 ze 180 kmenů (11,1 %) byl detekován toxinotyp III. Zbylé toxinotypy byly zastoupeny v menší míře (2-3 kmeny), v případě toxinotypu XXIII se jednalo pouze o jeden kmen. Největší variabilita toxinotypů jsme zaznamenali ve FNB (Tab. 8).

Toxinotyp	Zdravotnické zařízení (%)				
	VFN	FTN	FNB	PB	Celkem
0	14 (38,9)	32 (25,6)	47 (47,6)	-	93 (34,1)
III	3 (8,3)	4 (3,2)	13 (13,1)	-	20 (7,3)
IV	-	1 (0,8)	2 (2,0)	-	3 (1,1)
V	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
VI	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
VIII	17 (47,2)	20 (16,0)	20 (20,2)	-	57 (20,9)
IX	-	1 (0,8)	1 (1,0)	-	2 (0,7)
XXIII	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
Nezařazené kmeny	2 (5,6)	67 (53,6)	11 (11,1)	13 (100)	93 (34,1)

Tab. 8: Zastoupení toxinotypů v jednotlivých zdravotnických zařízeních. V závorce je uvedeno poměrné zastoupení toxinotypů v procentech.

4.5 DETEKCE BINÁRNÍHO TOXINU

Pomocí PCR jsme sledovali, zda izolované kmeny nesou část genu *cdtB* kódujícího vazebnou a transportní podjednotku binárního toxinu (STUBBS *et al.* 2000). Tento fragment binárního toxinu se podařilo amplifikovat u 30 ze 180 kmenů, u kterých byly stanoveny toxinotypy (16,7 %). Jednalo se o všechny kmeny patřící do toxinotypů III, IV, V, VI, IX a XXIII.

4.6 RIBOTYPIZACE

Ribotypizace je založena na elektroforetické separaci amplifikovaných polymorfních sekvencí, které se nacházejí mezi konzervovanými geny kódujícími 16S a 23S rRNA (BIDET *et al.* 1999). Mezerníkové 16S-23S sekvence jsme separovali pomocí kapilární gelové elektroforézy (INDRA *et al.* 2008).

Pro analýzu pomocí kapilární gelové elektroforézy jsme měli k dispozici dva sekvenátory, CEQ 8000 (Beckman Coulter) a ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Nejprve jsme se zaměřili na srovnání dat generovaných oběma sekvenátory. Naměřené velikosti fragmentů DNA stejných vzorků se navzájem lišily a tyto rozdíly se projevily i při srovnání našich dat s daty uloženými v databázi WEBRIBO generovanými sekvenátorem ABI 310 (Applied Biosystems). Největší rozdíl (4,4 bp) mezi sekvenátorem CEQ 8000 a ABI 310 jsme zaznamenali u fragmentu o velikosti 486,3 bp (ribotyp 014/8), nejmenší rozdíl (0,1 bp) byl u fragmentů o velikosti 233,6 bp (ribotyp 017/1) a 327,1 bp (ribotyp 414). Při porovnání dat generovaných sekvenátorem ABI PRISM 3130xl a ABI 310 byl největší rozdíl (8,3 bp) zjištěn u fragmentů o velikosti 482,5 bp (ribotyp 014/8) a 543,5 (ribotyp 014/8), nejmenší rozdíl byl 2,6 bp u fragmentu o velikosti 367,4 bp (ribotyp 414). Pomocí automatického kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 jsme u všech porovnávaných ribotypů zaznamenali menší odchylky od dat získaných sekvenátorem ABI 310, proto jsme tento sekvenátor zvolili pro analýzu všech zkoumaných vzorků *C. difficile* (Tab. 9).

Velikosti detekovaných fragmentů se pohybovaly v rozmezí 225,5 – 667,2 kb. Pomocí internetové aplikace WEBRIBO (<http://webribo.ages.at>) bylo jednotlivým vzorkům přiřazeno mezinárodní označení. V případě identifikace nového ribotypu byl výsledek potvrzen autorem aplikace WEBRIBO, Alexanderem Indrou (AGES, Vídeň, Rakousko). Pokud je za číslem ribotypu uvedena arabská číslice, jedná se o mezinárodní označení, které značí velkou podobnost daného ribotypu s původním ribotypem (např. 596 a 596/1). Pokud je za číslem ribotypu uvedena římská číslice, jsou si tyto ribotypy podobné, ale odvozenému ribotypu nebylo doposud přiřazeno mezinárodní označení (např. 596 a 596/I).

A

Ribotyp 414					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 - ABI 3130xl
327,1	323,7	327,0	+0,1	-3,3	+3,4
371,5	367,4	370,0	+1,5	-2,6	+4,1
446,1	441,8	445,0	+1,1	-3,2	+4,3
552,0	545,2	550,0	+2,0	-4,8	+6,8

B

Ribotyp 002/2					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 - ABI 3130xl
285,2	282,1	286,9	-1,7	-4,8	+3,1
287,4	283,6	288,6	-1,2	-5,0	+3,8
327,1	324,2	328,9	-1,8	-4,7	+2,9
329,4	326,3	331,2	-1,8	-4,9	+3,1
447,8	443,8	450,0	-2,2	-6,2	+4,0
488,7	483,8	488,5	+0,2	-4,7	+4,9
546,6	541,4	546,8	-0,2	-5,4	+5,2
551,7	545,6	551,9	-0,2	-6,3	+6,1

C

Ribotyp 014/8					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 - ABI PRISM 3130xl
235,1	231,2	234,6	+0,5	-3,4	+3,9
237,2	233,2	236,6	+0,6	-3,4	+4,0
267,7	263,6	268,2	-0,5	-4,6	+4,1
306,9	303,6	308,3	-1,4	-4,7	+3,3
327,0	324,4	328,8	-1,8	-4,4	+2,6
486,3	482,5	490,7	-4,4	-8,3	+3,8
527,6	523,5	529,4	-1,8	-5,9	+4,1
549,8	543,5	551,8	-2,0	-8,3	+6,3

D

Ribotyp 017					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 - ABI PRISM 3130xl
234,6	230,1	233,7	+0,9	-3,6	+4,5
267,3	263,3	268,1	-0,8	-4,8	+4,5
308,5	305,1	310,1	-1,6	-5,0	+3,4
365,0	363,4	368,1	-3,1	-4,7	+1,6
425,9	421,7	426,6	-0,7	-4,9	+4,2
428,1	423,9	428,5	-0,4	-4,6	+4,2
547,3	542,8	549,1	-1,8	-6,3	+4,5

E

Ribotyp 017/1					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 – ABI PRISM 3130xl
233,6	230,1	233,7	-0,1	-3,6	+3,5
267,0	263,4	268,1	-1,1	-4,7	+3,6
308,8	305,3	310,1	-1,3	-4,8	+3,5
366,4	363,5	368,1	-1,7	-4,6	+2,9
425,6	421,8	426,6	-1,0	-4,8	+3,8
428,0	424,0	428,5	-0,5	-4,5	+4,0

F

Ribotyp 027					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 – ABI PRISM 3130xl
234,7	231,2	234,5	+0,2	-3,3	+3,5
267,3	263,6	268,3	-1,0	-4,7	+3,7
326,5	323,9	328,8	-2,3	-4,9	+2,6
328,7	326,0	330,9	-2,2	-4,9	+2,7
364,2	362,4	367,3	-3,1	-4,9	+1,8
426,1	422,9	427,1	-1,0	-4,2	+3,2
448,3	443,9	449,5	-1,2	-5,6	+4,4
549,0	543,5	549,5	-0,5	-6,0	+5,5

G

Ribotyp 087					
CEQ 8000	ABI PRISM 3130xl	ABI 310	CEQ 8000 - ABI 310	ABI PRISM 3130xl - ABI 310	CEQ 8000 – ABI PRISM 3130xl
234,5	231,3	234,7	-0,2	-3,4	+3,2
267,3	263,6	268,5	-1,2	-4,9	+3,7
304,8	302,0	306,2	-1,4	-4,2	+2,8
326,9	323,7	328,4	-1,5	-4,7	+3,2
386,0	384,5	388,0	-2,0	-3,5	+1,5
408,9	404,9	410,4	-1,5	-5,5	+4,0
489,8	484,7	490,6	-0,8	-5,9	+5,1
548,7	544,1	549,5	-0,8	-5,4	+4,6

Tab. 9 A-G: Srovnání dat generovaných automatickými kapilárními sekvenátory CEQ 8000 (Beckman Coulter), ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) a ABI 310 (Applied Biosystems). V 1., 2. a 3. sloupci jsou uvedeny délky fragmentů (bp) získané pomocí těchto sekvenátorů. Ve 4. a 5. sloupci jsou vypočítány rozdíly dat, která jsme získali v rámci naší studie (CEQ 8000, respektive ABI PRISM 3130xl) s daty uloženými v databázi WEBRIBO (ABI 310). V 6. sloupci jsou vypočítány rozdíly dat, která jsme získali pomocí sekvenátorů CEQ 8000 a ABI PRISM 3130xl. Data získaná automatickým kapilárním sekvenátorem CEQ 8000 se ve všech případech více shodovala s daty získanými sekvenátorem ABI 310.

Mezi analyzovanými kmeny jsme identifikovali 63 různých ribotypů. Mezinárodní označení bylo přiřazeno 43 ribotypům, 4 ribotypům bylo přiřazeno naše interní označení založené na podobnosti s ribotypem z databáze WEBRIBO a zbylých 16 ribotypů bylo unikátních. Metoda ribotypizace výborně korelovala s metodou toxinotypizace, všechny kmeny daných ribotypů jsme zařadili do stejných toxinotypů. Zastoupení ribotypu v jednotlivých zdravotnických zařízeních je shrnuto v tabulce Tab. 10. Nejvíce kmenů bylo izolováno v letech 2010 a 2011 ve FNB a FTN, proto je v tabulce Tab. 11 uvedeno zastoupení ribotypů v těchto nemocnicích v jednotlivých letech. Aby nedocházelo k duplicitě dat, bylo z následující analýzy ribotypů zpětně vyřazeno 18 kmenů, které byly opakovaně izolovány z jednoho pacienta a shodovaly se v toxinotypu i ribotypu. U 2 pacientů byly při opakovaném testování nalezeny kmeny, které se na základě molekulární typizace lišily. Oba tyto pacienti pocházeli z FNB, na přítomnost *C. difficile* ve stolici byli opakovaně testováni v prvním případě po 27 dnech, ve druhém již po 2 dnech. Po vyřazení duplicit byl ribotyp přiřazen 273 kmenům.

Ribotyp (toxinotyp)	Zdravotnické zařízení (%)				
	VFN	FTN	FNB	PB	Celkem
001(0)	-	3 (2,4)	3 (3,0)	-	6 (2,2)
001/4 (0)	1 (2,8)	-	-	-	1 (0,4)
002/2 (0)	3 (8,2)	4 (3,2)	4 (4,0)	-	11 (4,0)
003 (0)	-	2 (1,6)	1 (1,0)	-	3 (1,1)
005 (0)	1 (2,8)	2 (1,6)	1 (1,0)	-	4 (1,5)
010 (-)	-	4 (3,2)	1 (1,0)	1 (7,7)	6 (2,2)
012 (0)	3 (8,2)	1 (0,8)	-	-	4 (1,5)
014/0 (0)	1 (2,8)	7 (5,6)	4 (4,0)	-	12 (4,4)
014/5 (0)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
014/8 (0)	1 (2,8)	-	-	-	1 (0,4)
014/9 (0)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
017 (VIII)	8 (22,2)	12 (9,6)	18 (18,2)	-	38 (13,9)
017/1 (VIII)	9 (25,0)	7 (5,6)	2 (2,0)	-	18 (6,6)
017/2 (VIII)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
018 (0)	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
020 (0)	1 (2,8)	2 (1,6)	2 (2,0)	-	5 (1,8)
023 (IV)	-	1 (0,8)	2 (2,0)	-	3 (1,1)
029 (0)	1 (2,8)	2 (1,6)	4 (4,0)	-	7 (2,6)
031/I (-)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
036/2 (IX)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)

049/1 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
053 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
070 (0)	-	1 (0,8)	2 (2,0)	-	3 (1,1)
076 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
076/2 (0)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
078 (V)	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
081 (0)	-	-	4 (4,0)	-	4 (1,5)
087/1 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
087/I (0)	-	1 (0,8)	1 (1,0)	-	2 (0,7)
176 (III)	2 (5,6)	4 (3,2)	13 (13,1)	-	19 (7,0)
413 (VI)	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
433 (-)	-	2 (1,6)	-	-	2 (0,7)
441 (III)	1 (2,8)	-	-	-	1 (0,4)
500 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
538 (0)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
561 (XXIII)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
596 (-)	2 (5,6)	47 (37,6)	5 (5,1)	10 (76,9)	64 (23,4)
596/1 (-)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
596/I (-)	-	4 (3,2)	-	-	4 (1,5)
561 (IX)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
624 (0)	1 (2,8)	-	-	-	1 (0,4)
625 (0)	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,4)
626 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,4)
AI-12 (0)	1 (2,8)	-	2 (2,0)	-	3 (1,1)
AI-9-I (0)	-	-	2 (2,0)	-	2 (0,7)
AI-34 (-)	-	1 (0,8)	1 (1,0)	-	2 (0,7)
AI-61 (-)	-	5 (4,0)	2 (2,0)	1 (7,7)	8 (2,9)
Unikátní ribotypy	-	5 (4,0)	10 (10,6)	1 (7,7)	16 (5,3)
Celkem	36	125	99	13	273

Tab. 10: Zastoupení ribotypů v jednotlivých zdravotnických zařízeních. V závorce je uvedeno poměrné zastoupení ribotypů v procentech.

Ribotyp (toxinotyp)	FTN (%)		FNB (%)	
	2010	2011	2010	2011
001(0)	3 (5,8)	-	1 (2,7)	2 (3,2)
002/2 (0)	-	4 (5,5)	1 (2,7)	3 (4,8)
003 (0)	-	2 (2,7)	-	1 (1,6)
005 (0)	1 (1,9)	1 (1,4)	1 (2,7)	-
010 (0)	-	4 (5,5)	-	1 (1,6)
012 (0)	-	1 (1,4)	-	-
014/0 (0)	3 (5,8)	4 (5,5)	1 (2,7)	3 (4,8)

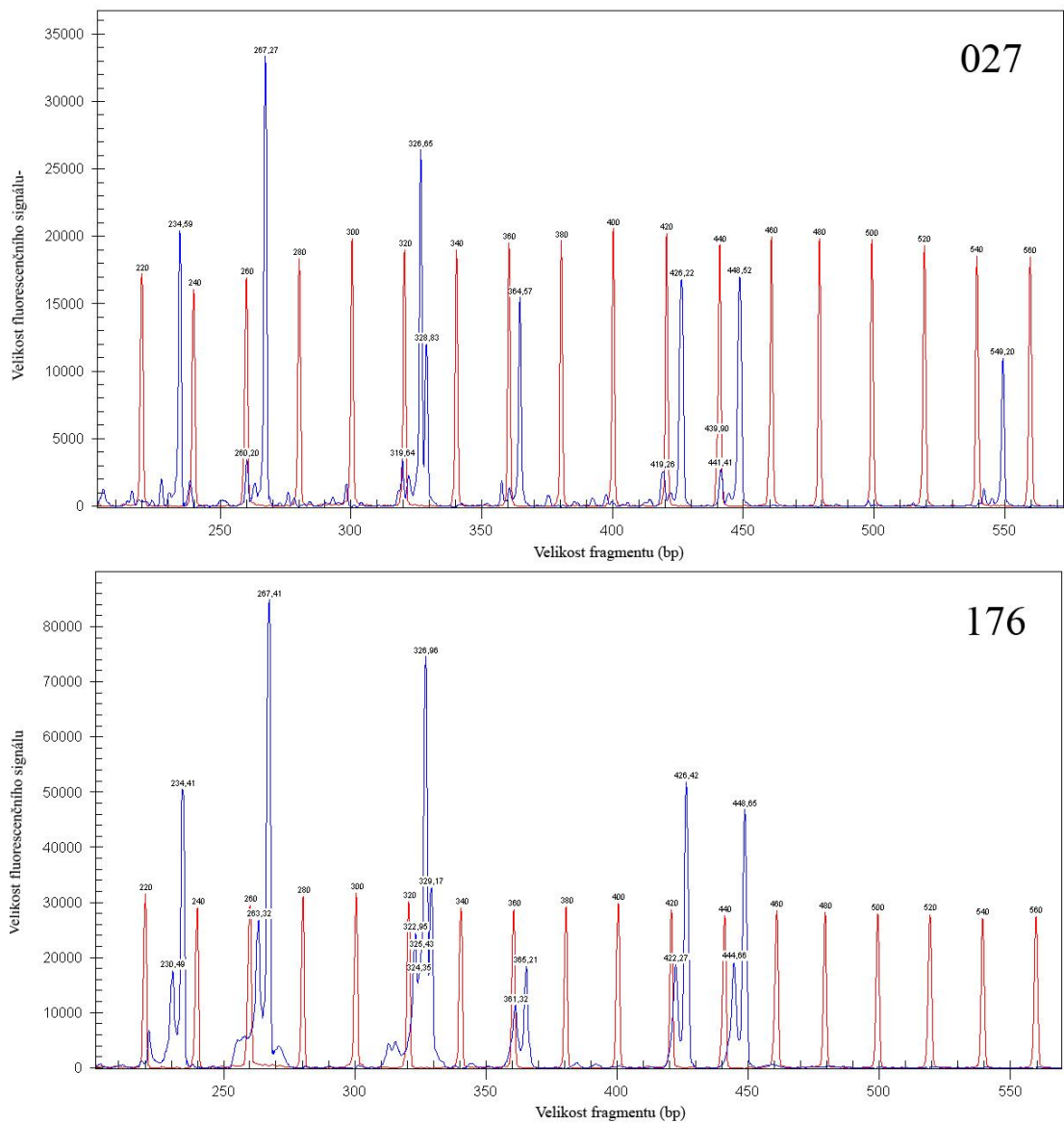
014/5 (0)	-	1 (1,4)	-	-
014/9 (0)	1 (1,9)	-	-	-
017 (VIII)	10 (19,2)	2 (2,7)	12 (32,5)	6 (9,7)
017/1 (VIII)	2 (3,8)	5 (6,8)	2 (5,4)	-
017/2 (VIII)	1 (1,9)	-	-	-
018 (0)	-	-	2 (5,4)	-
020 (0)	-	2 (2,7)	-	2 (3,2)
023 (IV)	-	1 (1,4)	1 (2,7)	1 (1,6)
029 (0)	-	2 (2,7)	1 (2,7)	3 (4,8)
031/I (-)	-	-	-	1 (1,6)
036/2 (IX)	1 (1,9)	-	-	-
049/1 (0)	-	-	-	1 (1,6)
053 (0)	-	-	1 (2,7)	-
070 (0)	-	1 (1,4)	2 (5,4)	-
076 (0)	-	-	-	1 (1,6)
076/2 (0)	1 (1,9)	-	-	-
078 (V)	-	-	-	2 (3,2)
081 (0)	-	-	2 (5,4)	2 (3,2)
087/1 (0)	-	-	1 (2,7)	-
087/I (0)	-	1 (1,4)	-	1 (1,6)
176 (III)	-	4 (5,5)	1 (2,7)	12 (19,4)
413 (VI)	-	-	2 (5,4)	-
433 (-)	-	2 (2,7)	-	-
464 (XII)	-	-	-	-
500 (0)	-	-	-	1 (1,6)
538 (0)	-	1 (1,4)	-	-
561 (XXIII)	-	-	1 (2,7)	-
596 (-)	21 (40,6)	26 (35,6)	1 (2,7)	4 (6,5)
596/1 (-)	1 (1,9)	-	-	-
596/I (-)	-	4 (5,5)	-	-
561 (IX)	-	-	1 (2,7)	-
625 (0)	1 (1,9)	-	-	-
626 (0)	-	-	1 (2,7)	-
AI-12 (0)	-	-	-	2 (3,2)
AI-9-I (0)	-	-	1 (2,7)	1 (1,6)
AI-34 (-)	1 (1,9)	-	-	1 (1,6)
AI-61 (-)	3 (5,8)	2 (2,7)	-	2 (3,2)
Unikátní ribotypy	2 (3,8)	3 (4,1)	1 (2,7)	9 (14,8)
Celkem	52	73	37	62

Tab. 11: Zastoupení ribotypů ve FTN a FNB v letech 2010 a 2011. V závorce je uvedeno poměrné zastoupení ribotypů v procentech.

Ve všech třech pražských fakultních nemocnicích tvořily významnou skupinu kmeny toxinotypu VIII (A⁺/B⁻) zahrnující ribotypy 017 (13,9 %), 017/1 (6,6 %) a 017/2 (0,4 %). Ve VFN byly ribotypy 017 a 017,1 detekovány téměř u poloviny izolovaných kmenů *C. difficile* (47,2 %) (Tab. 10). Ve FTN a FNB byl vyšší výskyt ribotypů patřících do toxinotypu VIII pozorován v roce 2010 (24,9 % respektive 37,8 %), v roce 2011 zastoupení těchto ribotypů kleslo (9,6 % respektive 9,7 %) (Tab. 11). Ve světě hojně rozšířený hypervirulentní ribotyp 027 se nám ani v jedné z nemocnic prokázat nepodařilo. Ve VFN, FTN i FNB jsme detekovali ribotyp 176 (Tab. 10), který je typu 027 velmi podobný. Ribotypy 027 i 176 se proti referenčnímu kmeni VPI 10463 vyznačují shodnými delecemi v regulačním genu *tcdC*, konkrétně delecí 18 nukleotidů na pozicích 330-347 a delecí jednoho nukleotidu na pozici 117, což jsme potvrdili sekvenací (Obr. 10). Oba ribotypy jsou si podobné i na základě PCR ribotypizace, ribotypu 176 chybí oproti 027 pouze jediný fragment (Obr. 11). V roce 2011 byl ribotyp 176 ve FNB nejčastějším ribotypem, vyskytoval se u 19,4 % kmenů (Tab. 11).

Ribotyp027	ATGTTTTCTAAAAAAATGAGGGTAACGAATTTAGTAATGAAAGAAAAGGAAGCTCTAAG	60
Ribotyp176	ATGTTTTCTAAAAAAATGAGGGTAACGAATTTAGTAATGAAAGAAAAGGAAGCTCTAAG	60
VPI10463	ATGTTTTCTAAAAAAATGAGGGTAACGAATTTAGTAATGAAAGAAAAGGAAGCTCTAAG *****	60
Ribotyp027	AAAATAATTAATTCCTTTAAGAGCACAAAGGATATTGCTCTACTGGCATTATTTT	GGT 119
Ribotyp176	AAAATAATTAATTCCTTTAAGAGCACAAAGGATATTGCTCTACTGGCATTATTTT	GGT 119
VPI10463	AAAATAATTAATTCCTTTAAGAGCACAAAGGATATTGCTCTACTGGCATTATTTT *****	GGC 120
Ribotyp027	GTGTTTTTTGGCAATATATCCTCACCAGCTTGTCTGAAGACCATGAGGAGTCAATTTCT	179
Ribotyp176	GTGTTTTTTGGCAATATATCCTCACCAGCTTGTCTGAAGACCATGAGGAGTCAATTTCT	179
VPI10463	GTGTTTTTTGGCAATATATCCTCACCAGCTTGTCTGAAGACCATGAGGAGTCAATTTCT *****	180
Ribotyp027	AATCAAACATCAGTTATAGATTCTCAAAAAACAGAAATAGAACTTTAAATAGCAAATG	239
Ribotyp176	AATCAAACATCAGTTATAGATTCTCAAAAAACAGAAATAGAACTTTAAATAGCAAATG	239
VPI10463	AACCAAACATCAGTTATAGATTCTCAAAAAACAGAAATAGAACTTTAAATAGCAAATG ** *****	240
Ribotyp027	TCTGATGCTGAACCATGGTTCAAAAATGAAAGACGACGAAAAGAAAGCTATTGAAGCTGAA	299
Ribotyp176	TCTGATGCTGAACCATGGTTCAAAAATGAAAGACGACGAAAAGAAAGCTATTGAAGCTGAA	299
VPI10463	TCTGATGCTGAACCATGGTTCAAAAATGAAAGACGACGAAAAGAAAGCTATTGAAGCTGAA *****	300
Ribotyp027	AATCAACGTAAGCTGAAGAAGCTAAAAA	GGCTGAAGAACAA 341
Ribotyp176	AATCAACGTAAGCTGAAGAAGCTAAAAA	GGCTGAAGAACAA 341
VPI10463	AATCAACGTAAGCTGAAGAAGCTAAAAAAGCTGAAGAAGCTAAAAA *****	GGCTGAAGAACAA 360
Ribotyp027	CGTAAAAAAGAAGAAGAAGAGAAGAAAGGATATGATACTGGTATTACTTATGACCAATTA	401
Ribotyp176	CGTAAAAAAGAAGAAGAAGAGAAGAAAGGATATGATACTGGTATTACTTATGACCAATTA	401
VPI10463	CGCAAAAAAGAAGAAGAGGAGAAGAAAGGATATGATACTGGTATTACTTATGACCAATTA ** *****	420
Ribotyp027	GCTAGAACACCTGATGATTATAAGTACAAAAAGGTAAAAATTTGAAGGTAAGGTTATTCAA	461
Ribotyp176	GCTAGAACACCTGATGATTATAAGTACAAAAAGGTAAAAATTTGAAGGTAAGGTTATTCAA	461
VPI10463	GCTAGAACACCTGATGATTATAAGTACAAAAAGGTAAAAATTTGAAGGTAAGGTTATTCAA *****	480
Ribotyp027	GTTATTGAAGATGGTGTGATGAGGTGCAAAATAAGATTAGCTGTGTCTGGAAATTATGATAAG	521
Ribotyp176	GTTATTGAAGATGGTGTGATGAGGTGCAAAATAAGATTAGCTGTGTCTGGAAATTATGATAAG	521
VPI10463	GTTATTGAAGATGGTGTGATGAGGTGCAAAATAAGATTAGCTGTGTCTGGAAATTATGATAAG *****	540
Ribotyp027	GTCGTAATGTAGTTATAAAAAATCAATAACTCCTTCAAGAGTGTAGAGGATGATTAC	581
Ribotyp176	GTCGTAATGTAGTTATAAAAAATCAATAACTCCTTCAAGAGTGTAGAGGATGATTAC	581
VPI10463	GTTGTACTATGTAGTTATAAAAAATCAATAACTCCTTCAAGAGTGTAGAGGATGATTAC ** *****	600
Ribotyp027	ATAACTATAAGAGGTATAAGTGCTGGAACATAAATTATGAATCAACTATGGGTGGAAAA	641
Ribotyp176	ATAACTATAAGAGGTATAAGTGCTGGAACATAAATTATGAATCAACTATGGGTGGAAAA	641
VPI10463	ATAACTATAAGAGGTATAAGTGCTGGAACATAAATTATGAATCAACTATGGGTGGAAAT *****	660
Ribotyp027	ATAACCATACCAGGGATAGCTGTAGAGAAATTAATTAA	680
Ribotyp176	ATAACCATACCAGGGATAGCTGTAGAGAAATTAATTAA	680
VPI10463	ATAACTATACCAGGGATAGCTGTAGAGAAATTAATTAA **** *****	699

Obr. 10: Srovnání sekvencí genu *tdcC* u kmenů ribotypů 027, 176 a VPI 10463. Ribotyp 176 je reprezentován kmenem Bul5557, ribotyp 027 je reprezentován typovým kmenem toxinotypu IIIb, sekvence referenčního kmene VPI 10463 pochází z databáze: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Červeně jsou označeny delece charakteristické pro ribotyp 027 a 176.



Obr. 11: Srovnání chromatogramů ribotypů 027 a 176. Ribotyp 176 je reprezentován kmenem Bul5557, ribotyp 027 je reprezentován typovým kmenem toxinotypu IIIb. DNA fragmenty jsou zobrazeny modře (ribotyp 027: 234.59, 267.27, 326.65, 328.83, 364.57, 426.22, 448.52, 549,20; ribotyp 176: 234.41, 267.41, 326.96, 329.17, 365.21, 426.42, 448.65), DNA standard červeně. Ribotypu 176 chybí oproti 027 fragment o velikosti 549,20 bp.

Významný je také ribotyp 596, který se vyskytoval u 23,4 % analyzovaných kmenů *C. difficile* (Tab. 10). U těchto kmenů jsme pomocí PCR amplifikovali úsek Lok3/Lok1, který je charakteristický pro nepatogenní kmeny. Fragment Lok3/Lok1 jsme dále amplifikovali u všech kmenů patřících do ribotypů 010, 031/I, 433, 596/1, 596/I, AI-34, AI-61 a do 5 unikátních ribotypů. Z těchto ribotypů jsou ribotypy 596, 010 a 031 v databázi WEBRIBO vedeny jako nepatogenní, u ostatních není informace o patogenitě známa.

Výrazné rozdíly v zastoupení ribotypů jsme pozorovali mezi kmeny izolovanými z pacientů mladších a starších 2 let. Zatímco u 95,8 % dětí do 2 let jsme detekovali kmeny, u kterých se podařilo amplifikovat úsek Lok3/Lok1 a nebyl stanoven toxinotyp, u pacientů starších 2 let činily tyto kmeny pouze 12,4 %. Ve většině epidemiologických studií jsou typizovány kmeny izolované z pacientů starších 2 let. Abychom mohli data porovnávat, zaměřili jsme se na zastoupení ribotypů v této věkové skupině. Z pacientů starších 2 let byly nejčastěji izolovány ribotypy 017 a 017/1 (27,2 %), 176 (9,4 %), 002/2 (5,4 %) a skupina podobných ribotypů 014/0, 014/5, 014/8, 014/9 a 020 (9,4 %) (Tab. 12).

Ribotyp (toxinotyp)	Zdravotnické zařízení (%)				
	VFN	FTN	FNB	PB	Celkem
001(0)	-	3 (4,1)	3 (3,1)	-	6 (3,0)
001/4 (0)	1 (2,9)	-	-	-	1 (0,5)
002/2 (0)	3 (8,4)	4 (5,9)	4 (4,1)	-	11 (5,4)
003 (0)	-	2 (2,9)	1 (1,0)	-	3 (1,5)
005 (0)	1 (2,9)	2 (2,9)	1 (1,0)	-	4 (2,0)
010 (-)	-	4 (5,9)	1 (1,0)	-	5 (2,5)
012 (0)	3 (8,4)	-	-	-	3 (1,5)
014/0 (0)	1 (2,9)	7 (10,3)	3 (3,1)	-	11 (5,4)
014/5 (0)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
014/8 (0)	1 (2,9)	-	-	-	1 (0,5)
014/9 (0)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
017 (VIII)	8 (22,9)	11 (16,2)	18 (18,6)	-	37 (18,3)
017/1 (VIII)	9 (25,7)	7 (10,3)	2 (2,1)	-	18 (8,9)
017/2 (VIII)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
018 (0)	-	-	2 (2,1)	-	2 (1,0)
020 (0)	1 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,1)	-	5 (2,5)
023 (IV)	-	1 (1,5)	2 (2,1)	-	3 (1,5)
029 (0)	1 (2,9)	2 (2,9)	4 (4,1)	-	7 (3,5)
031/I (-)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)

036/2 (IX)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
049/1 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
053 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
070 (0)	-	1 (1,5)	2 (2,1)	-	3 (1,5)
076 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
076/2 (0)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
078 (V)	-	-	2 (2,1)	-	2 (1,0)
081 (0)	-	-	4 (4,1)	-	4 (2,0)
087/1 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
087/I (0)	-	1 (1,5)	1 (1,0)	-	2 (1,0)
176 (III)	2 (5,6)	4 (5,9)	13 (13,4)	-	19 (9,4)
413 (VI)	-	-	2 (2,1)	-	2 (1,0)
433 (-)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
441 (III)	1 (2,9)	-	-	-	1 (0,5)
500 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
538 (0)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
561 (XXIII)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
596 (-)	1 (2,9)	2 (2,9)	5 (5,2)	1 (50)	9 (4,5)
596/I (-)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
561 (IX)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
624 (0)	1 (2,9)	-	-	-	1 (0,5)
625 (0)	-	1 (1,5)	-	-	1 (0,5)
626 (0)	-	-	1 (1,0)	-	1 (0,5)
AI-12 (0)	1 (2,9)	-	2 (2,1)	-	3 (1,5)
AI-9-I (0)	-	-	2 (2,1)	-	2 (1,0)
AI-34 (-)	-	1 (1,5)	1 (1,0)	-	2 (1,0)
AI-61 (-)	-	1 (1,5)	1 (1,0)	-	2 (1,0)
Unikátní ribotypy	-	4 (5,9)	10 (10,4)	1 (50)	15 (7,1)
Celkem	35	68	97	2	202

Tab. 12: Zastoupení ribotypů izolovaných z pacientů starších 2 let v jednotlivých zdravotnických zařízeních.

4.7 MLVA

Metoda je založena na amplifikaci 7 tandemových repetic v genomu *C. difficile*: A6cd, B7cd, C6cd, E7cd, F3cd, G8cd a H9cd a jejich následné fragmentační analýze na kapilárním sekvenátoru (VAN DEN BERG *et al.* 2007). Pomocí metody MLVA jsme typizovali kmeny izolované v letech 2008-2010, které patřily do skupin dvou nejvíce rozšířených ribotypů 017, 017/1 a 017/2 a 596 a 596/1. Typizace byla úspěšně dokončena u 41 z 44 kmenů patřících do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 a u 24 z 35 kmenů patřících do ribotypů 596 a 596/1. U zbylých kmenů se nám nepodařilo stanovit počty repetic ve všech sledovaných lokusech.

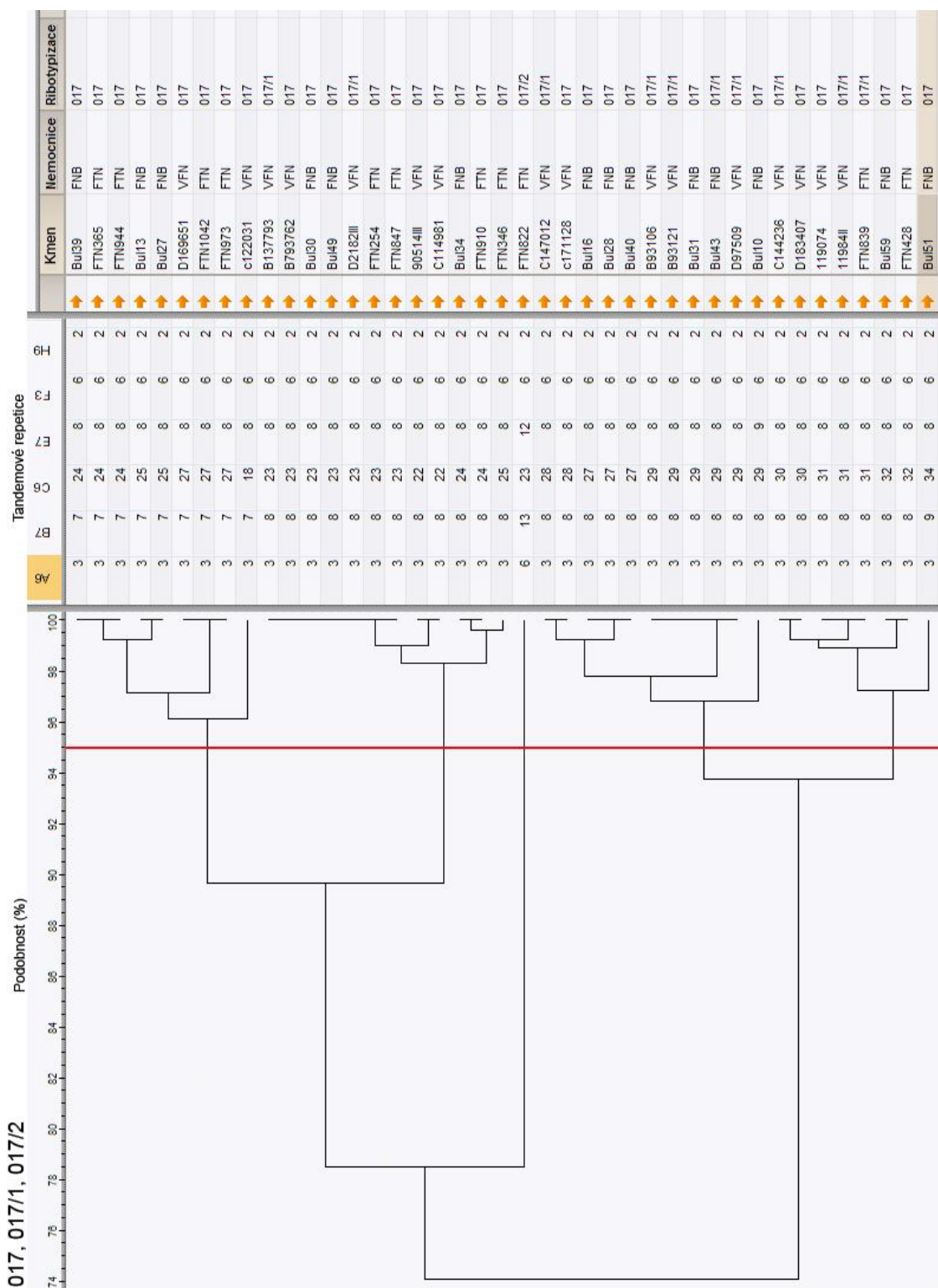
U obou skupin kmenů vykazovala největší variabilitu repetice C6cd, která se vyskytovala u izolátů patřících do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 ve 12 různých alelách a u izolátů patřících do ribotypů 596 a 596/1 v 7 alelách. U kmenů patřících do ribotypů 596 a 596/1 byla variabilita vyšší také u repetice A6cd (6 alel). Naopak variabilita repetic F3cd, G8cd a H9cd byla u obou skupin nízká, v případě repetice H9cd byl počet kopií (2) shodný u všech analyzovaných izolátů (Tab. 13). U všech kmenů patřících do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 byl fragment nesoucí repetice G8cd větší než maximální rozlišovací schopnost kapilárního sekvenátoru (640 bp). Přesný počet kopií repetice G8cd nebyl pro tyto kmeny stanoven, jednalo se o více než 63 opakování. Z tohoto důvodu byl lokus G8cd u kmenů ribotypů 017, 017/1 a 017/2 vyřazen z následné shlukové analýzy.

Tandemová repetice	Počet kopií		
	Ribo. 017, 017/1, 017/2	Ribo. 596 a 596/1	Celkem (= počet alel)
A6cd	3, 6	25, 26, 27, 28, 29, 30	3-30 (8)
B7cd	7, 8, 9, 13	10, 11, 12, 13	7-13 (7)
C6cd	18, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34	25, 26, 27, 28, 29, 30, 34	18-34 (13)
E7cd	8, 9, 12	2, 5	2-12 (5)
F3cd	6	5	5-6 (2)
G8cd	>63	8	8, >63
H9cd	2	2	2 (1)

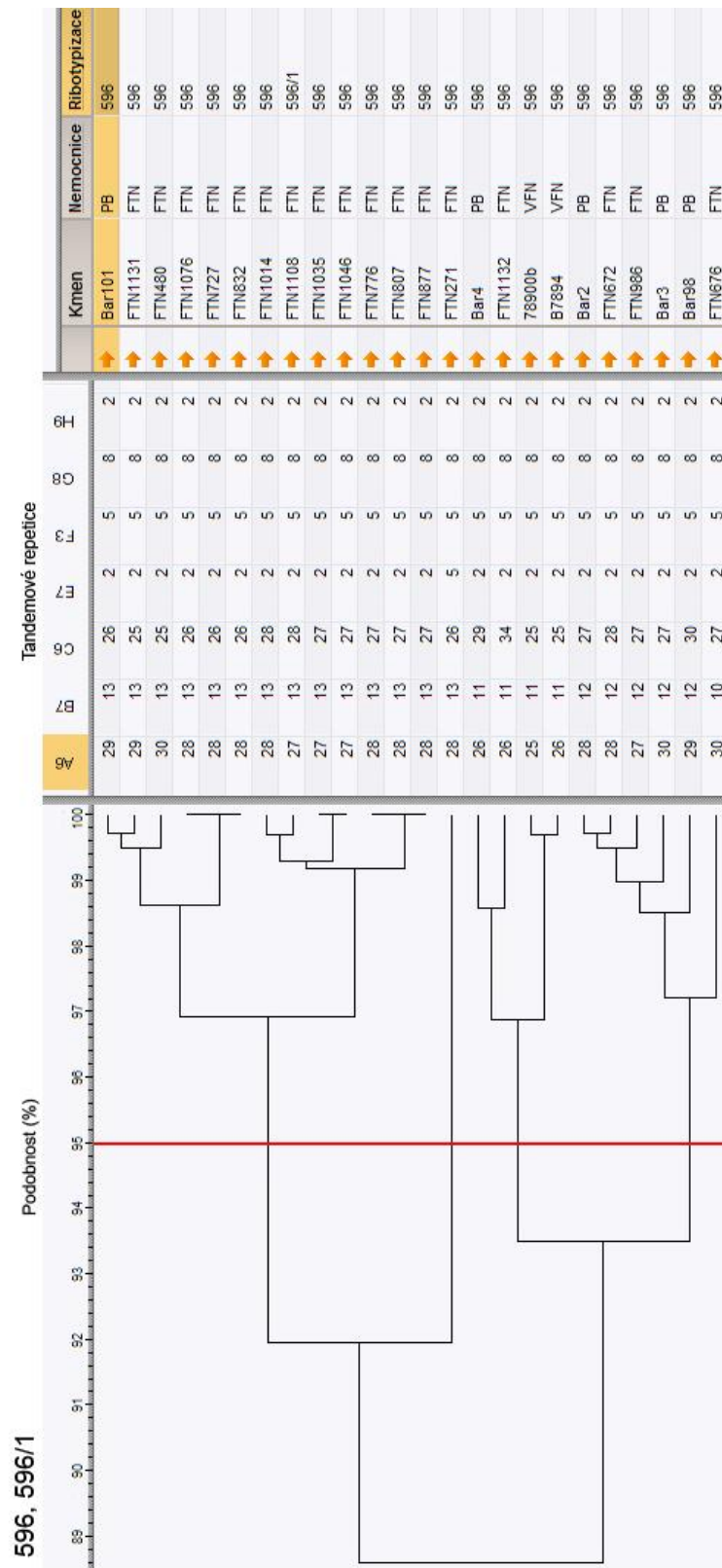
Tab. 13: MLVA. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé alely reprezentující počty kopií tandemových repetic ve sledovaných lokusech pro dvě typizované skupiny ribotypů (017, 017/1, 017/2 a 596, 596/1).

Počty repetic v jednotlivých lokusech jsme zadali do programu BioNumerics (Applied Maths) a provedli jsme shlukovou analýzu. Pro vytvoření dendrogramu jsme použili Manhattanskou metriku a Wardovu metodu hierarchického shlukování (BROUKHANSKI *et al.* 2011). V 5 případech jsme zaznamenali šíření kmenů se

shodným profilem rámci jednotlivých klinik a oddělení (kmeny Bul13, Bul27, kmeny Bul16, Bul28, Bul40 a kmeny Bul31, Bul43 - Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí, FNB; kmeny FTN365, FTN944 - Pneumologická klinika, FTN; kmeny B93106, B93121 – II. Interní klinika, VFN). Shodné profily MLVA jsme ale našli také u kmenů izolovaných na různých klinikách či v různých nemocnicích (Obr. 12, Obr. 13). Za klonální jsme považovali takové skupiny, jejichž podobnost byla podle Manhattanské metriky nejméně 95 % (BROUKHANSKI *et al.* 2011). Na základě typizace pomocí MLVA jsme u kmenů patřících do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 identifikovali 5 klonálních skupin, u kmenů patřících do ribotypů 596 a 596/1 jsme identifikovali 4 klonální skupiny. Kmeny ribotypů 596 a 596/1 byly ve sledovaných lokusech více homogenní než kmeny ribotypů 017, 017/1 a 017/2 (podobnost 88 %, respektive 74 %). Ribotypy 017 a 017/1 (Obr. 12) ani ribotypy 596 a 596/1 (Obr. 13) se pomocí MLVA od sebe odlišit nepodařilo.



Obr. 12: Dendrogramy ribotypů 017, 017/1 a 017/2 založený na MLVA typizaci. Červená čára značí hranici podobnosti odlišující klonální kmene (95 %).

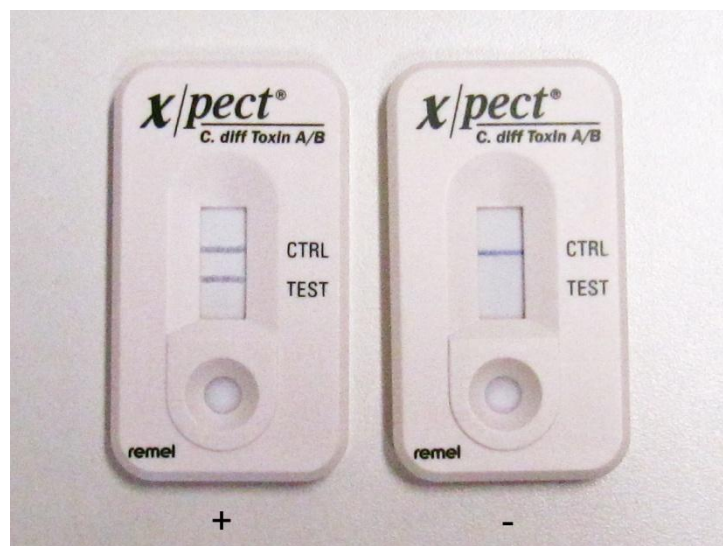


Obr. 13: Dendrogramy ribotypů 017, 017/1 a 017/2 založený na MLVA typizaci. Červená čára značí hranici podobnosti odlišující klonální kmene (95 %).

4.8 VÝSKYT *C. DIFFICILE* U PRASAT

C. difficile patří mezi bakterie patogenní pro člověka i zvířata. Tato bakterie je pokládána za hlavní příčinu neonatálních průjmů selat (SONGER a ANDERSON 2006). Proto jsme provedli pilotní studii, jejímž cílem bylo izolovat *C. difficile* ze stolice selat na náhodně vybrané farmě ve středních Čechách a následně provést molekulární typizaci izolovaných kmenů (GOLDOVÁ *et al.* 2012).

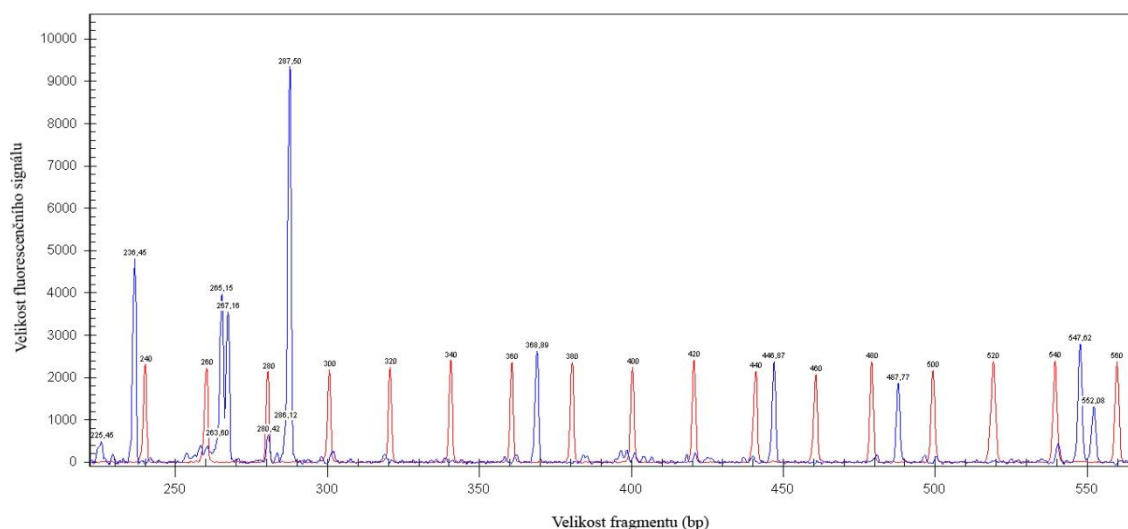
Celkem jsme vyšetřili 30 rektálních výtěrů selat z 15 vrhů, z každého vrhu byla vybrána dvě selata. *C. difficile* jsme izolovali z 19 (63,3 %) vzorků, přičemž kolonizováno bylo 80 % vrhů. Pouze 2 selata z 19 nakažených (10,5 %) trpěla průjmem, u zbylých zvířat (89,5 %) se příznaky CDAD neprojevovaly, byla tedy kolonizována asymptomaticky (Tab. 14). Účinnost izolace *C. difficile* se výrazně lišila u obou zvolených kultivačních metod. Zatímco pomocí přímé kultivace stěru z odběrového tampónu na selektivní půdě jsme *C. difficile* izolovali pouze ze 4 vzorků z 30 (13,3 %), při použití obohacovací metody dle ZIDARIC *et al.* (2008) činil záchyt 56,7 % (17/30). Přesto dva vzorky pozitivní při přímé kultivaci byly negativní při použití obohacovací metody (Tab. 14). Toxiny jsme pomocí komerčního imunochromatografického testu detekovali u všech 19 izolovaných kmenů (Obr. 14). Amplifikační částí genu *cdd3* jsme potvrdili, že se jedná o kmeny *C. difficile*, u všech vzorků se podařilo amplifikovat také částí genu *tcdC* (BRAUN *et al.* 1996). Variabilní úseky genů *tcdA* a *tcdB* jsme následně pomocí PCR amplifikovali při toxinotypizaci (RUPNIK *et al.* 1997) a všechny izoláty jsme shodně zařadili do toxinotypu 0 (tzv. A⁺/B⁺ kmeny). Pomocí specifické PCR se nám ani u jednoho z kmenů nepodařilo amplifikovat fragment genu *cdtB* kódujícího podjednotku binárního toxinu (STUBBS *et al.* 2000). Shodný byl také ribotyp všech kmenů a v internetové aplikaci WEBRIBO (<http://webribo.ages.at>) mu bylo přiřazeno označení AI-12 (Obr. 15).



Obr. 14: Imunochromatografické testy detekující toxiny A a B (XPECT *Clostridium difficile* Toxin A/B Test, Oxoid). Toxiny jsme detekovali u všech 19 kmenů izolovaných ze stolice selat (levý test) a nebyly detekovány pouze u negativní kontroly (pravý test).

Číslo vrhu	Počet izol. kmenů	Selata kolonizovaná <i>C. diff.</i>		Detekce toxinů	Průjem
		Přímá kultivace	Obohacovací metoda		
1	1	A	-	+	-
2	1	-	A	+	+
3	2	-	A+B	+	-
4	2	A	A+B	+	+
5	2	A	A+B	+	-
6	2	A	B	+	-
7	0	-	-	-	-
8	1	-	A	+	-
9	2	-	A+B	+	-
10	1	-	B	+	-
11	2	-	A+B	+	-
12	1	-	A	+	-
13	0	-	-	-	-
14	0	-	-	-	-
15	2	-	A+B	+	-
Celkem	19	4	17	12	2

Tab. 14: Izolace *C. difficile* ze selat. Celkem jsme vyšetřili selata z 15 vrhů, z každého vrhu byla vybrána dvě selata označena jako A a B.



Obr. 15: Chromatogram ribotypu AI-12 *C. difficile*. Fragменты DNA (236.45, 265.15, 267.16, 287.5, 368.89, 446.87, 487.77, 547.62 a 552.08 bp) jsou zobrazeny modře, DNA standard červeně.

Ribotyp AI-12 jsme porovnali se 17 ribotypy, které byly také nalezeny u prasat (KEEL *et al.* 2007, AVBERSEK *et al.* 2009, KEESSEN *et al.* 2011) a jsou uloženy v databázi WEBRIBO. Ribotyp AI-12 má specifické složení fragmentů, které jsou při ribotypizaci amplifikovány, a není podobný žádnému z prasečích izolátů (Tab. 15, A-C). Nejpodobnější jsou ribotypy 005 a 015, které se s ribotypem AI-12 shodují ve 4 z 9 fragmentů DNA. Naopak s ribotypy 045, 066, 078 a 126 se ribotyp AI-12 shoduje pouze v jediném fragmentu, ve všech případech se jedná o fragment o velikosti 447-448 bp (Tab. 15, A-C).

A

<i>AI-12</i>	<i>001</i>	<i>005</i>	<i>014</i>	<i>023</i>	<i>029</i>	<i>078</i>
236,45	222,63	267,19	234,91	234,31	263,12	306,32
265,15	230,36	287,44	236,96	267,23	267,17	326,93
267,16	234,47	306,79	267,30	287,31	322,11	329,42
287,50	261,04	326,77	306,71	326,85	326,13	371,70
368,89	265,14	328,84	308,77	329,13	385,45	373,87
446,87	327,01	428,28	326,35	386,09	428,48	416,41
487,77	486,82	447,26	485,51	430,87	486,33	446,01
547,62	492,40	487,03	486,97	487,19	548,94	490,76
552,08	545,51	492,71	527,50			
	549,59	545,36	549,17			
	551,53					

B

<i>AI-12</i>	<i>002</i>	<i>015</i>	<i>019</i>	<i>026</i>	<i>033</i>	<i>045</i>
236,45	286,90	233,77	234,90	268,67	268,38	308,48
265,15	288,83	234,77	328,83	288,72	331,14	333,35
267,16	327,11	268,78	368,57	328,81	333,45	373,06
287,50	328,22	327,13	449,35	428,48	372,96	375,40
368,89	329,59	328,89	487,68	488,31	375,40	446,62
446,87	449,51	447,79	549,68	549,51	447,28	
487,77	450,58	488,25			449,52	
547,62	490,17	493,24				
552,08	547,08	546,98				
	551,91					

C

<i>AI-12</i>	<i>050</i>	<i>054</i>	<i>062</i>	<i>066</i>	<i>126</i>
236,45	235,47	266,42	233,65	312,79	308,58
265,15	288,85	268,27	234,80	328,95	328,86
267,16	291,04	328,79	327,05	331,37	331,29
287,50	328,87	330,88	328,85	348,21	372,69
368,89	427,78	370,82	447,56	375,00	375,00
446,87	450,00	388,06	488,28	412,44	447,43
487,77	546,82	427,12	493,16	447,24	491,28
547,62		429,28	546,41		
552,08		448,01	549,69		
		554,97			

Tab. 15: Porovnání ribotypu AI-12 s dalšími ribotypy identifikovanými u prasat. V tabulce A je porovnání ribotypu AI-12 s ribotypy, které byly zastoupené mezi kmeny, které jsme v rámci naší studie izolovali z pacientů. V tabulkách B a C je porovnání ribotypu AI-12 s ostatními ribotypy uloženými v databázi WEBRIBO. Čísla ve sloupcích reprezentují velikosti jednotlivých fragmentů (bp) daného ribotypu. Stejnými barvami jsou označeny fragmenty, které si vzájemně odpovídají.

5 DISKUZE

V posledních několika letech je pozorován celosvětový nárůst onemocnění způsobených *C. difficile*. Hlavním cílem našeho projektu bylo stanovit výskyt CDAD v několika pražských zdravotnických zařízeních a pomocí molekulárně-biologických metod identifikovat kmeny způsobující toto onemocnění.

5.1 VÝSKYT *C. DIFFICILE*

Po dobu trvání projektu jsme celkem izolovali 291 kmenů *C. difficile*, 18 vzorků (15 – FTN, 3 – FNB) bylo vyřazeno z analýzy molekulární typizace, protože se jednalo o kmeny, které byly opakovaně izolovány z jednoho pacienta a shodovaly se v toxinotypu i ribotypu.

Nejvíce kmenů (125) pocházelo z FTN. V roce 2010 se jednalo o 52 kmenů a v roce 2011 o 73 kmenů *C. difficile*. V roce 2010 jsme kmeny začali odebírat až v březnu, což může být příčinou nižšího záchyty *C. difficile* ve srovnání s rokem 2011.

Ve FNB bylo v roce 2010 do analýzy zahrnuto 37 kmenů *C. difficile*, v roce 2011 vzrostl počet analyzovaných kmenů o 68 % na 62 kmenů. První analyzované vzorky pocházely již z ledna 2010, zkrácené období sběru proto patrně není důvodem zvýšeného záchyty *C. difficile* mezi lety 2010-11. Dalším z důvodů může být změna diagnostiky CDAD, která proběhla ve sledovaném období. V roce 2010 byly kultivovány pouze vzorky, u kterých byly pomocí testu VIDAS *C. difficile* A & B (bioMérieux) detekovány toxiny. V roce 2011 se k diagnostice začaly používat testy *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab) detekující toxiny A a B současně s GDH. K molekulární typizaci jsme tak navíc obdrželi kmeny, u kterých nebyly detekovány toxiny, ale pouze GDH. Další možnou příčinou vyššího záchyty *C. difficile* v roce 2011 může být rozšíření hypervirulentních kmenů patřících do ribotypu 176. V roce 2010 byl ve FNB izolován pouze 1 kmen tohoto ribotypu, v roce 2011 vzrostl počet izolovaných kmenů ribotypu 176 na 12.

Ve VFN a na PB nebyl záchyt kmenů *C. difficile* mezi lety 2008 – 2011 kontinuální vlivem technických problémů a personálních změn ve vedení laboratoří.

U 19 pacientů (14 – FTN, 5 – FNB) bylo v průběhu 2-41 dní po prvním testování provedeno opakované testování na přítomnost *C. difficile* ve stolici. U 17 pacientů jsme u obou analyzovaných vzorků identifikovali shodné toxinotypy i ribotypy. Až 56 %

případů relapsů CDAD je přičítáno infekci jiným kmenem (WILCOX *et al.* 1998). V naší studii se o odlišné izoláty jednalo pouze u 2 pacientů z FNB, z čehož můžeme usuzovat, že ve sledovaných zdravotnických zařízeních dochází k reinfekci pacienta jiným kmenem *C. difficile* výjimečně. Z dat, která máme k dispozici, přesto nelze přesně určit, zda opakované testování bylo prováděno z důvodu potvrzení předchozí diagnózy nebo podezření na relaps onemocnění. Z VFN a PB nám nebyly vzorky pocházející od stejných pacientů dodávány.

5.2 DIAGNOSTIKA *C. DIFFICILE*

Rychlá a přesná diagnostika infekce *C. difficile* je klíčová pro úspěšnou léčbu pacienta a kontrolu šíření infekce. Na základně informací získaných z FTN a FNB jsme provedli srovnání komerčních testů, které byly v těchto nemocnicích použity k diagnostice *C. difficile*, s našimi výsledky amplifikace částí genů lokusu PaLoc pomocí PCR.

V případě imunochromatografických testů Rapid *C. difficile* TOX A & B (DiaMondial) používaných ve FTN převážně v roce 2010 se 51,3 % výsledků diagnostických testů shodovalo s výsledky PCR. Deset testů vyšlo jako pozitivních u kmenů, u kterých se podařilo amplifikovat všechny části genů *tcdC*, *tcdA* a *tcdB*, a v 10 případech nebyly detekovány ani geny pro toxiny ani samotné toxiny. U 6 kmenů (15,4 %) se nepodařilo amplifikovat části genů *tcdC*, *tcdA* a *tcdB*, a přesto vyšly testy slabě pozitivní. U těchto kmenů jsme navíc detekovali ribotypy charakteristické pro nepatogenní kmeny, a proto považujeme výsledky těchto diagnostických testů za falešně pozitivní. Nejednoznačné výsledky imunochromatografických testů ztěžující jejich interpretaci jsou známy i z literatury (CHMELÁŘOVÁ a ŠKAPOVÁ, 2010). Naproti tomu u 10 kmenů (25,6 %) vyšly testy na detekci toxinů negativní při současném stanovení toxinotypu. Tyto výsledky považujeme za falešně negativní. Vysoký počet falešně negativních i pozitivních výsledků svědčí o nízké spolehlivosti testů Rapid *C. difficile* TOX A & B (DiaMondial).

Od konce roku 2010 se ve FTN používaly duální imunoenzymatické testy *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab). GDH se podařilo prokázat u 48 z 49 kultivovaných kmenů *C. difficile* (98 %), což potvrzuje již dříve popsanou vysokou citlivost detekce tohoto enzymu (SHETTY *et al.* 2011). Celkem jsme zaznamenali 12 kmenů, u kterých byly detekovány jak fragmenty genů kódující toxiny A a B tak toxiny samotné, a 19 kmenů, u kterých příslušné geny ani toxiny detekovány nebyly (63,3 % kmenů). U 6 vzorků (12,2 %) toxiny detekovány nebyly, ačkoliv jsme pomocí PCR amplifikovali části genů *tcdC*, *tcdA* i *tcdB* a kmenům jsme přiřadili toxinotyp. Výsledky těchto testů počítáme jako falešně negativní. Ve dvou případech vyšly testy *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab) pouze slabě pozitivní, oba kmeny pocházeli z ribotypů asociovaných s nepatogenními kmeny. Tyto výsledky počítáme jako falešně pozitivní. Velký počet falešně negativních výsledků těchto diagnostických testů byl zaznamenán také ve FNB v roce 2011 (22,8 %). Testy *C. difficile* Quik Chek Complete (TechLab)

jsou spolehlivé v případě shodného výsledku detekce GDH i toxinů (QUINN *et al.* 2010), což potvrzují i naše výsledky. Senzitivita testů byla ve FTN 87,8 % a ve FNB 77,2 %, což jsou podobné nebo vyšší hodnoty než 78,3 % udávaných ve studii QUINN *et al.* (2010). Na rozdíl od QUINN *et al.* (2010) jsme získali minimálně dva výsledky falešně pozitivní a v jednom případě vyšla falešně negativní jak detekce toxinů tak i GDH.

5.2.1 SHRNUÍ

Srovnání výsledků diagnostických testů s výsledky amplifikace částí genů lokusu PaLoc pomocí PCR poukazuje na nízkou spolehlivost imunochromatografických a imunoenzymatických metod pro detekci toxinů *C. difficile*, což je v souladu s daty známými z literatury (PLANCHE *et al.* 2008). Testy založené na obou metodách vykazovaly velký počet falešně negativních výsledků, u imunochromatografických metod byly časté také falešně pozitivní výsledky. Naopak testy detekující GDH dosahovaly 98-100 % senzitivity.

Z těchto údajů je také zřejmá nejednotnost v diagnostice CDAD v jednotlivých zdravotnických zařízeních, způsob diagnostiky se často měnil i v průběhu jednoho roku. Naše analýza by se tak mohla stát vhodným podkladem ke změně a sjednocení diagnostiky CDAD v České republice.

5.3 PATOGENITA IZOLOVANÝCH KMENŮ *C. DIFFICILE*

Z 273 kmenů *C. difficile* zahrnutých do analýzy jsme u 180 (65,9 %) amplifikovali část genů *tcdC*, *tcdA* a *tcdB*. U těchto kmenů jsme rovněž detekovali ribotypy charakteristické pro patogenní kmeny a ve většině případů, kde jsou známy výsledky diagnostických testů, se podařilo detekovat i toxiny *C. difficile* ve stolici. Těchto 180 kmenů proto považujeme za patogenní (Tab. 16).

U zbylých 93 kmenů jsme pomocí PCR detekovali úsek Lok3/Lok1, což naznačuje, že by měl být lokus PaLoc nahrazen nekódující sekvencí o velikosti 115 bp. Překvapivě jsme u 39 kmenů amplifikovali jak úsek Lok3/Lok1, tak část alespoň některého z genů *tcdC*, *tcdA* nebo *tcdB*. U 3 kmenů jsme amplifikovali části všech tří genů typických pro oblast PaLoc. Přítomnost fragmentů genů *tcdA* nebo *tcdB* v genomu *C. difficile* neznamená, že jsou toxiny těmito kmeny opravdu produkovány. U 22 z těchto 39 vzorků nebyly toxiny *C. difficile* ve stolici pacientů detekovány. Výsledky dalších 4 testů byly vyhodnoceny jako falešně pozitivní. Toxiny byly detekovány pouze u 2 kmenů izolovaných ve FNB. U zbylých kmenů nebyly výsledky diagnostických testů k dispozici. Všechny 39 kmenů bylo navíc zařazeno do ribotypů, které byly doposud identifikovány pouze mezi nepatogenními kmeny, stejně jako ostatní kmeny s amplifikovaným úsekem Lok3/Lok1 (<http://webribo.ages.at>). Proto jsme všech 93 kmenů s amplifikovaným úsekem Lok3/Lok1 považovali za nepatogenní (Tab. 16). Výskyt netoxigenních kmenů, u kterých byly detekovány alespoň části toxinových genů, není ojedinělý (MATHIS *et al.* 1999, RUPNIK *et al.* 2001). Přesto této problematice u pacientů s gastrointestinální symptomatologií není věnována dostatečná pozornost a bude předmětem dalšího výzkumu.

Zdravotnické zařízení	Počet patogenních kmenů (%)	Počet nepatogenních kmenů (%)	Celkový počet kmenů <i>C. difficile</i>
VFN	34 (94,4)	2 (5,6)	36
FTN	58 (46,4)	67 (53,6)	125
FNB	88 (88,9)	11 (11,1)	99
PB	0	13 (100)	13
Celkem	180 (65,9)	93 (34,1)	273

Tab. 16: Patogenita analyzovaných kmenů *C. difficile*. V tabulce jsou porovnána zastoupení patogenních a nepatogenních kmenů *C. difficile* v jednotlivých zdravotnických zařízeních.

5.4 TOXINOTYPIZACE

Toxinotypizace je metoda s malým rozlišovacím potenciálem, ale i přesto poskytuje důležité informace týkající se variability oblasti PaLoc. V naší studii jsme celkem identifikovali 8 toxinotypů. U 7 toxinotypů se oblast PaLoc významně lišila od referenčního kmene VPI 10463 toxinotypu 0, u něhož byla oblast PaLoc poprvé sekvenována (RUPNIK *et al.* 1998). Jedná se o tzv. kmeny variantní. Všechny variantní toxinotypy jsme detekovali jako tzv. majoritní, které se od toxinotypu 0 liší ve více fragmentech obou toxinových genů (RUPNIK *et al.* 2008). Jednalo se o toxinotypy III, IV, V, VI, VIII, IX a XXIII.

Více než polovinu kmenů (51,7 %) jsme zařadili do toxinotypu 0, což je nejběžnější toxinotyp (65 %) detekovaný v celoevropské studii (BAUER *et al.* 2011). Zastoupení variantních kmenů v naší studii (48,3 %) je tedy vyšší, než je evropský průměr (35 %) (BAUER *et al.* 2011). Dominantní byly především toxinotypy VIII a III, které jsou v současnosti rozšířeny celosvětově a jsou spojovány s epidemiemi a závažnějšími formami CDAD (RUPNIK *et al.* 2008).

Do toxinotypu VIII jsme zařadili 57 kmenů, což je 31,7 % ze všech izolovaných patogenních kmenů. Jedná se tedy o druhý nejčastější toxinotyp v naší studii. Kmeny tohoto toxinotypu jsou důležité z klinického hlediska, protože produkují jen toxin B a při použití diagnostických metod založených pouze na detekci toxinu A tak mohou unikat záchytu. V minulosti byla taková diagnostika v České republice běžná (ZEMANOVÁ *et al.* 2003, CHMELARŮVÁ a ŠKAPOVÁ, 2010), což by mohlo vysvětlovat vysoké zastoupení A⁻/B⁺ kmenů.

Mezi jednotlivými nemocnicemi jsme pozorovali rozdíly ve variabilitě toxinotypů. Ve VFN jsme detekovali pouze tři nejběžnější toxinotypy (0, III a VIII), zatímco ve FTN 5 toxinotypů (0, III, IV, VIII a IX) a ve FNB všech 8 toxinotypů. Tyto rozdíly byly patrně dány větším počtem izolovaných patogenních kmenů ve FTN a FNB, a tudíž větší šancí detekovat i méně početné variantní toxinotypy. Ve FNB souvisí vysoká variabilita kmenů *C. difficile* s přítomností největší pražské kliniky infekčních nemocí (Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí).

5.5 BINÁRNÍ TOXIN

Většina variantních toxinotypů *C. difficile* produkuje také binární toxin CDT, aktin-specifickou ADP-ribosyltransferázu. Tento toxin je kódován v lokusu CdtLoc, část genu *cdtB* jsme detekovali u 16,7 % (30) patogenních kmenů. Jednalo se o kmeny patřící do variantních toxinotypů III (ribotyp 176), IV (023), V (078), VI (413, 413/I, 552), IX (036/2) a XXIII (561). V rámci Evropy je jeho zastoupení obdobné, 17,2-23 % patogenních izolátů (BARBUT *et al.* 2007, BAUER *et al.* 2011).

5.6 RIBOTYPIZACE

Ribotypizace poskytuje dostatečnou rozlišovací schopnost pro epidemiologické studie dlouhodobějšího charakteru (GÜERTLER *et al.* 1993). V naší studii jsme prováděli PCR ribotypizaci založenou na fragmentační analýze (INDRA *et al.* 2008) pomocí sekvenátorů CEQ 8000 (Beckman Coulter) a ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Překvapivě jsme zaznamenali rozdíly ve velikostech shodných fragmentů DNA (až 7 bp) naměřených pomocí použitých sekvenátorů. Tyto rozdíly se projevíly i při srovnání s daty uloženými v databázi WEBRIBO generovanými sekvenátorem ABI 310 (Applied Biosystems). Rozdílné velikosti shodných fragmentů DNA naměřené pomocí sekvenátorů CEQ 8000 a ABI PRISM 3130xl byly zaznamenány i při MLVA enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* O157 (HYYTIA-TREES *et al.* 2010) a jsou připisovány odlišnému složení gelů, fluorescenčních značek a standardů DNA použitých při separaci. Pro analýzu vzorků jsme zvolili sekvenátor CEQ 8000, protože data získaná tímto přístrojem se více shodovala s daty uloženými v databázi WEBRIBO. Rozdíly dat generovaných použitým sekvenátorem a sekvenátorem ABI 310 byly finálně korigovány pomocí algoritmu aplikace WEBRIBO.

Mezi analyzovanými kmeny jsme identifikovali 63 různých ribotypů, z toho 49 ribotypů jsme označili jako patogenní a 13 ribotypů jako nepatogenní. Nejpočetnější byl nepatogenní ribotyp 596 (23,4 %) a dále ribotypy 017 a 017/1 (20,5 %) a 176 (7 %). Největší variabilita ribotypů byla pozorována ve FNB, kde jsme detekovali 42 z celkových 63 ribotypů. Tato variabilita kmenů *C. difficile* ve FNB pravděpodobně souvisí s přítomností největší pražské kliniky infekčních nemocí. Z pacientů starších 2 let byly nejčastěji izolovány ribotypy 017 a 017/1 (27,2 %), 176 (9,4 %), 002/2 (5,4 %) a ribotypy patřící do podskupin ribotypu 014 (014/0, 014/5, 014/8, 014/9 a 020) (9,4 %).

5.6.1 RIBOTYPY 017, 017/1 A 017/2

Ribotyp 017, 017/1 a 017/2 patří do epidemické linie *C. difficile*, která se od ostatních oddělila před několika milióny let (GRIFFITHS *et al.* 2010). Tyto ribotypy jsou si velmi podobné, ribotypu 017/1 chybí oproti ribotypu 017 nejdelší mezerníková sekvence, ribotyp 017/2 má naopak jednu mezerníkovou sekvenci navíc. Všechny kmeny těchto ribotypů patří do toxintypu VIII, kvůli delecí v genu *tcdA* neprodukuje funkční toxin A (A⁻/B⁺ kmeny) a nemají gen pro binární toxin.

C. difficile patřící do hypervirulentního ribotypu 017 je rozšířeno celosvětově, jeho vyšší výskyt je popisován především v Asii (HUANG *et al.* 2009b, KIM *et al.* 2010). V roce 2005 patřilo do ribotypu 017 přibližně 6 % evropských kmenů, v některých nemocnicích v Polsku a Irsku však dosahoval výskyt až 80 % (BARBUT *et al.* 2007). V roce 2008 klesl průměrný výskyt v Evropě na 4 %, ale kmeny tohoto ribotypu byly zaznamenány opět v Polsku a také v České republice (BAUER *et al.* 2011). Epidemie v polských nemocnicích byly evidovány již v dřívějších letech, v období 2002-2003 byl ribotyp 017 ve varšavské fakultní nemocnici detekován u 45,5 % izolovaných kmenů, v následujících dvou letech u 43,6 % kmenů (PITUCH *et al.* 2006, PITUCH *et al.* 2010). Podobně vysoké zastoupení ribotypu 017 a jeho podtypů u pacientů starších 2 let jsme zaznamenali v letech 2008-2009 ve VFN (48,6 %) a v roce 2010 ve FTN (48,1 %) a FNB (37,8 %). Na základě těchto dat usuzujeme, že měl výskyt ribotypu 017 a jeho podtypů ve sledovaných nemocnicích epidemický charakter. V roce 2011 došlo ve FTN i FNB k výraznému poklesu výskytu těchto ribotypů, ve FTN na 17,1 % a ve FNB pouze na 10 %. Je možné, že došlo k jejich nahrazení jinými virulentními ribotypy. Ve FNB jsme v roce 2011 pozorovali především významný nárůst výskytu ribotypu 176. Ve FTN v roce 2011 žádný z patogenních ribotypů výrazně nepřevládal, nicméně se zvýšila celková variabilita kmenů (z 21 na 31 izolovaných ribotypů). K postupnému úbytku A⁻/B⁺ kmenů by mohl přispívat i současný způsob diagnostiky CDAD. Ve sledovaných zařízeních se používají soupravy detekující oba toxiny, tudíž tyto kmeny neunikají záchytu jako dříve a jsou pravděpodobně z nemocničního prostředí postupně eliminovány.

5.6.2 RIBOTYPY 027, 176 A 036

Obávaný epidemický ribotyp 027 jsme v rámci naší studie nenalezli, detekovali jsme ale blízký příbuzný ribotyp 176 (GRIFFITHS *et al.* 2010). Do stejné vývojové linie patří také ribotyp 036/2 (GRIFFITHS *et al.* 2010), který jsme v roce 2010 izolovali ze stolice jednoho pacienta z FTN.

V celoevropském měřítku není ribotyp 176 příliš rozšířený, ve studii BAUER *et al.* (2011) byl izolován pouze v jednom případě (země není specifikována). Sporadický výskyt tohoto ribotypu byl rovněž zaznamenán v USA (VALIENTE *et al.* 2012) a dle databáze WEBRIBO i v Portugalsku a Německu (<http://webribo.ages.at>). Jiná situace je ve střední Evropě, v České republice a sousedním Polsku bylo zaznamenáno několik

nozokomiálních epidemií vyvolaných kmeny ribotypu 176 (NYČ *et al.* 2011). Výrazný nárůst výskytu tohoto ribotypu jsme pozorovali také v naší studii. Ve FNB vzrostl počet pacientů starších 2 let nakažených ribotypem 176 z 2,7 % v roce 2010 na 20 % v roce 2011, a tento ribotyp tak získal ve FNB dominantní zastoupení. Nárůst výskytu ribotypu 176 byl pozorován také ve FTN, v roce 2010 zde nebyl izolován žádný kmen tohoto ribotypu, zatímco v roce 2011 byly detekovány 4 kmeny (9,8 %). Ribotyp 176 byl detekován již v roce 2009 také ve VFN, což ukazuje, že se nejedná o ribotyp rozšířený pouze lokálně. Kmenům ribotypu 176 by měla být věnována zvýšená pozornost, protože mohou mít obdobný hypervirulentní potenciál jako kmeny ribotypu 027 (VALIENTE *et al.* 2012).

5.6.3 RIBOTYPY 014 A 020

Ribotypy 014 a 020 patří v Evropě k nejrozšířenějším ribotypům. Ribotyp 020 je ribotypu 014 velmi podobný (<http://webribo.ages.at>), proto je spolu s podtypy ribotypu 014 řazen do jedné skupiny. Kmeny těchto ribotypů patří do toxinotypu 0, produkují toxiny A i B a nemají geny kódující binární toxin.

V roce 2008 bylo do těchto ribotypů zařazeno 16 % kmenů testovaných v rámci celoevropské studie, jednalo se o nejběžněji detekované ribotypy a zástupci byly nalezeni v 19 z 34 států (BAUER *et al.* 2011). V databázi WEBRIBO čítají tyto ribotypy dohromady 731 vzorků a jsou tak nejpočetnější skupinou (<http://webribo.ages.at>). Podobné zastoupení ribotypu 014 a jeho podtypů, jako je celoevropský průměr, jsme pozorovali ve FTN (13,3 %). Celkově byly kmeny této skupiny ribotypů detekovány v naší studii méně, než je v Evropě běžné, což je pravděpodobně způsobeno rozšířením jiných dominantních ribotypů, především 017, 017/1 a 176.

5.6.4 NEPATOGENNÍ RIBOTYPY

Celkem jsme identifikovali 13 ribotypů asociovaných s nepatogenními kmeny: 010, 031/I, 433, 596, 596/1, 596/I, AI-34, AI-61 a 5 unikátních ribotypů. Ribotyp 596 s podtypy 596/1 a 596/I byl nejčastěji detekovaným ribotypem v naší studii. V databázi WEBRIBO jsou uloženy vzorky tohoto ribotypu pocházející mimo Českou republiku také z Rakouska, Německa a Singapuru (<http://webribo.ages.at>).

U 95,8 % dětí mladších 2 let jsme detekovali nepatogenní kmeny, u pacientů starších 2 let tvořily nepatogenní kmeny 12,4 %. Nepatogenní ribotypy byly ve velké

míře izolovány především ve FTN (53,6 %) a na PB (100 %), což bylo dáno právě velkým počtem dětských pacientů. Obdobně vysoké zastoupení nepatogenních kmenů (96,4 %) u dětí mladších 2 let bylo zaznamenáno i v Japonsku (KATO *et al.* 1994). Údaje o poměru mezi patogenními a nepatogenními kmeny izolovanými z dětských pacientů se ale v mnoha studiích začně liší (JANGI a LAMONT 2010), přesto je pro tuto věkovou skupinu charakteristická asymptomatická kolonizace *C. difficile* (až 90 %), bez ohledu na toxigenní stav izolovaného kmene. U starších 2 let bylo zastoupení nepatogenních kmenů v porovnání se studií BAUER *et al.* (2011) poměrně vysoké (12,4 % versus 2 %), ale ve starší evropské studii BARBUT *et al.* (2007) tvořily netoxigenní kmeny srovnatelných 13,9 %. Tato data jsou ovšem na národní a mezinárodní úrovni obtížně srovnatelná, protože podíl patogenních a nepatogenních kmenů závisí na metodě diagnostiky CDAD a výběru kmenů k molekulární typizaci. Nicméně výskyt nepatogenních kmenů u některých pacientů naznačuje, že průjmy jsou u nich vyvolány jinými patogeny.

5.6.5 SHRNUÍ

Na základě dostupných výsledků ribotypizace *C. difficile* se zdá, že v rámci Evropy je situace v České republice podobná situaci v Polsku, v obou zemích byl zaznamenán vysoký výskyt kmenů ribotypů 017 (a jeho podtypy) a několik nozokomiálních epidemií vyvolaných kmeny ribotypu 176. Mnoho ribotypů identifikovaných v naší studii bylo izolováno také v Rakousku, což je ale pravděpodobně dáno tím, že je databáze WEBRIBO založena především na rakouských vzorcích, a zřejmě to nemá podstatný epidemiologický význam. Vzhledem k velké migraci obyvatel by mohlo být zajímavé srovnání České republiky se Slovenskem. Obdobné epidemiologické studie zabývající se molekulární typizací kmenů *C. difficile* ovšem nebyly na Slovensku dosud provedeny. V Evropě nejrozšířenější ribotypy, 014 a 020, byly v naší studii izolovány v menší míře. Hypervirulentní ribotyp 027, který je spojován s nárůstem epidemií CDAD v Severní Americe a západní Evropě, nebyl v České republice zatím detekován.

5.7 MLVA

MLVA je metoda s vysokým rozlišovacím potenciálem, která se používá pro sledování šíření nozokomiálních infekcí *C. difficile*. Je to metoda vhodná především v případech, kdy nestačí rozlišovací schopnost ribotypizace (MARSH *et al.* 2006).

Pomocí metody MLVA jsme sledovali příbuznost kmenů patřící do dvou nejvíce zastoupených ribotypů (017 a 596) a jejich podtypů (017/1, 017/2 a 596/1). Základem metody je rozlišení kmenů podle rozdílů v počtu tandemových repetic v sedmi definovaných lokusech, A6_{cd}, B7_{cd}, C6_{cd}, E7_{cd}, F3_{cd}, G8_{cd} a H9_{cd} (VAN DEN BERG *et al.* 2007). U všech kmenů ribotypů 017, 017/1 a 017/2 přesahovala velikost fragmentu G8_{cd} 640 bp, což byla rozlišovací schopnost použitého kapilárního sekvenátoru, proto nebyl u těchto ribotypů lokus G8_{cd} zařazen do analýzy. Velký počet repetic v tomto lokusu u kmenů ribotypu 017 popisuje také práce VAN DEN BERG *et al.* (2007).

Ribotypy 017, 017/1 a 017/2 a ribotypy 596/1 a 596 jsou si tak podobné, že byly rozlišeny až poté, co byla k vyhodnocení výsledků ribotypizace použita kapilární gelová elektroforéza (INDRA *et al.*, 2008). Při typizaci pomocí MLVA se ribotypy 017 a 017/1 ani ribotypy 596 a 596/1 od sebe odlišit nepodařilo. Pouze kmen ribotypu 017/2 se s kmeny patřícími do ribotypů 017 a 017/1 shodoval jen v počtu repetic F3_{cd}, G8_{cd} a H9_{cd}, jejichž variabilita byla nízká, a byl zařazen do samostatné klonální skupiny. V práci MANZOOR *et al.* (2011) došli k podobnému závěru, že MLVA založená na 7 VNTR není dostačující k rozlišení všech ribotypů, a navrhli zvýšení počtu zkoumaných lokusů na 15. Nevýhodou této metody je její finanční náročnost, za vhodnější řešení proto považujeme provádět ribotypizaci pomocí kapilární elektroforézy (INDRA *et al.* 2008) a v případě závažnějších epidemií přistoupit na MLVA s 15 zkoumanými lokusy dle MANZOOR *et al.* (2011).

Shodné profily MLVA jsme zaznamenali jak v rámci jednotlivých klinik, tak i mezi různými klinikami a zdravotnickými zařízeními. Na žádné z klinik jsme nepozorovali větší počet kmenů se shodným profilem, vždy se jednalo nejvíce o 2-3 kmeny. Žádná z klonálních skupin, které jsme identifikovali pomocí shlukové analýzy, není vázána pouze na jedno zdravotnické zařízení (s výjimkou kmenů FTN676 a FTN271, které tvoří dvě samostatné klonální linie). FAWLEY a WILCOX (2011) pomocí MLVA prokázali, že 21 % kmenů nebylo příbuzných s hlavním epidemiologickým klastrem v dané nemocnici, ačkoliv sdíleli stejný ribotyp. V našem

případě jsme u kmenů ribotypů 017, 017/1 a 017/2 ani ribotypů 596 a 596/1 v žádné z nemocnic dominantní zastoupení některé z klonálních linií nepozorovali.

5.8 VÝSKYT *C. DIFFICILE* U PRASAT

Onemocnění vyvolaná *C. difficile* se stala vysoce aktuální nejen v humánní, ale i ve veterinární medicíně. Od počátku 21. století se *C. difficile* jeví jako hlavní příčina enterických onemocnění u novorozených selat (SONGER a ANDERSON 2006). V České republice byly hromadné průjmy novorozených selat vyvolané *C. difficile* zaznamenány na dvou farmách (MASAŘÍKOVÁ *et al.* 2007). Přítomnost *C. difficile* u novorozených selat jsme potvrdili i v naší studii. Toxigenní kmeny jsme izolovali z 63,3 % náhodně vybraných selat, přičemž kolonizováno bylo 80 % vrhů. Častý výskyt asymptomatických nosičů zpochybňuje roli *C. difficile* jako hlavního patogena zažívacího traktu u prasat (ALVAREZ-PEREZ *et al.* 2009). I v naší studii jsme zaznamenali vysokou frekvenci asymptomaticky kolonizovaných jedinců (84,2 %).

Izolaci *C. difficile* jsme prováděli pomocí přímé kultivace stěru z odběrového tampónu a obohacovací metody dle ZIDARIC *et al.* (2008). Počet kmenů izolovaných za použití obohacovací metody byl oproti přímé kultivaci více než čtyřnásobný, čímž bylo potvrzeno, že usnadnění germinace spor *C. difficile* pomocí kultivace s taurocholátem sodným (WILSON 1983) a následný alkoholový šok (MARLER *et al.* 1992) jsou důležitými kroky při izolaci této bakterie z výtěrového tampónu. Přítomnost dvou vzorků pozitivních při přímé kultivaci a negativních při použití obohacovací metody svědčí ale o tom, že ani pomocí obohacovací metody není míra izolace optimální a část kmenů tak může unikat záchytu.

Heterogenita ribotypů *C. difficile* na farmách chovajících prasata a skot je obvykle nízká v porovnání s heterogenitou pozorovanou v nemocnicích nebo u jiných zvířecích druhů (KEEL *et al.* 2007). Na dané prasečí farmě bývá často přítomen pouze jeden ribotyp, což je i případ naší studie. Všechny izoláty pocházely z jedné farmy a shodně jsme je zařadili do toxinotypu 0 (tzv. A⁺/B⁺/CDT⁻ kmeny) a ribotypu AI-12. Příčiny nižší variability *C. difficile* u prasat a skotu nejsou známy, jedním z možných vysvětlení je zvýšená citlivost těchto živočišných druhů vůči specifickým ribotypům. Ribotyp AI-12, identifikovaný v naší studii, nebyl zřejmě dosud z prasat izolován a není podobný žádnému z prasečích izolátů uložených v databázi WEBRIBO. Nejčastějším ribotypem izolovaným z prasat je typ 078 (KEEL *et al.* 2007, KEESSEN *et al.* 2011), který se s ribotypem identifikovaným u prasat v naší studii shoduje pouze v jediném fragmentu DNA.

Překryv ribotypů izolovaných z lidí a ze zvířat je velký. Ve studii RODRIGUEZ-PALACIOS *et al.* (2006) bylo u 31 zvířecích izolátů identifikováno 8 rozdílných ribotypů, z čehož 7 z těchto ribotypů bylo dříve spojováno s epidemiemi CDAD i u lidí. Ribotyp AI-12, který jsme v naší studii našli u selat, jsme detekovali i u jednoho pacienta z VFN a u dvou pacientů z FNB. Dle databáze WEBRIBO byl tento ribotyp identifikován také u pacientů z Rakouska. Mezi pacienty ve sledovaných zdravotnických zařízeních jsme dále identifikovali 6 ribotypů (001, 005, 014, 023, 029, 078), které byly dříve izolovány z prasat (KEEL *et al.* 2007, AVBERSEK *et al.* 2009, KEESSEN *et al.* 2011). Přímý přenos *C. difficile* ze zvířat na člověka nebyl ale zatím jednoznačně prokázán a podobnost kmenů izolovaných z lidí a ze zvířat může být dána společným zdrojem infekce v prostředí (NORMAN *et al.* 2011).

6 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce představují první ucelenější studii o výskytu a epidemiologii *C. difficile* v České republice. Hlavní výstupy práce můžeme shrnout do následujících bodů:

- V letech 2008–2011 bylo ve 4 pražských zdravotnických zařízeních celkem izolováno 273 unikátních kmenů *C. difficile*.
- Provedli jsme srovnání komerčních testů, které byly ve FTN a FNB použity k diagnostice *C. difficile*, s našimi výsledky amplifikace částí genů lokusu PaLoc pomocí PCR. Spolehlivost imunochromatografických a imunoenzymatických metod pro detekci toxinů *C. difficile* byla nízká, testy vykazovaly velký počet především falešně negativních, ale i falešně pozitivních výsledků. Naopak testy detekující GDH měly chybných výsledků málo.
- Z 273 kmenů zahrnutých do analýzy bylo 180 kmenů patogenních a 93 kmenů nepatogenních.
- Pomocí PCR toxinotypizace jsme patogenní kmeny zařadili do 8 toxinotypů (0, III, IV, V, VI, VIII, IX a XXIII), nejběžnějším byl toxinotyp 0 (51,7 %). Z klinického hlediska byly významné A⁻/B⁺ kmeny, které patřily do toxinotypu VIII (31,7 %).
- Pomocí PCR ribotypizace jsme mezi analyzovanými kmeny identifikovali 63 různých ribotypů, z toho 49 ribotypů jsme označili jako patogenní a 13 ribotypů jako nepatogenní. Největší zastoupení měl nepatogenní ribotyp 596 (23,4 %), který byl izolován především ze stolice dětí, a dále ribotypy 017 (13,9 %) a ribotyp 176 (7 %), který je velmi podobný hypervirulentnímu ribotypu 027. Kmeny všech detekovaných ribotypů se staly základem pro vytvoření sbírky typových kmenů *C. difficile*.
- Stejně jako v západní Evropě a Severní Americe se *C. difficile* stává problematickým nozokomiálním patogenem i v České republice. Hypervirulentní ribotyp 027 charakteristický pro obě výše zmíněné geografické oblasti nebyl v ČR doposud detekován. Z hlediska zastoupení

epidemických ribotypů 017 a 176 se situace v České republice nejvíce podobá situaci v sousedním Polsku.

- Pomocí metody MLVA jsme typizovali kmeny izolované v letech 2008-2010, které patřily do ribotypů 017, 017/1 a 017/2 a ribotypů 596 a 596/1. Shodné profily MLVA jsme našli u kmenů izolovaných jak v rámci jednotlivých klinik, tak na různých klinikách či v různých nemocnicích. Celkem jsme identifikovali 9 klonálních skupin (5 u ribotypů 017, 017/1 a 017/2; 4 u ribotypů 596 a 596/1), žádná z nich neměla dominantní zastoupení v některé z nemocnic.
- Vyšetřili jsme 30 rektálních výtěrů selat a *C. difficile* jsme izolovali z 19 vzorků (63,3 %). Všechny kmeny byly zařazeny do toxinotypu 0 a ribotypu AI-12. Do tohoto ribotypu patřily v naší studii i 3 lidské izoláty.

7 SEZNAM LITERATURY

- Aas, J., Gessert, C.E., Bakken, J.S.** (2003): Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin. Infect. Dis.* 36: 580-5.
- Aboudola, S., Kotloff, K.L., Kyne, L., Warny, M., Kelly, E.C., Sougioultzis, S., Giannasca, P.J., Monath, T.P., Kelly, C.P.** (2003): *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect. Immun.* 71: 1608-10.
- Akerlund, T., Persson, I., Unemo, M., Noren, T., Svenungsson, B., Wullt, M., Burman, L.G.** (2008): Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1530-33.
- Al Saif, N., Brazier, J.S.** (1996): The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J. Med. Microbiol.* 45: 133-7.
- Alfa, M.J., Kabani, A., Lyerly, D., Moncrief, S., Neville, L.M., Al-Barrak, A., Harding, G.K.H., Dyck, B., Olekson, K., Embil, J.M.** (2000): Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2706-14.
- Alvarez-Perez, S., Blanco, J.L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., Garcia, M.E.** (2009): Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet. Microbiol.* 137: 302-5.
- Anton, P.M., Gay, J., Mykoniatis, A., Pan, A., O'Brien, M., Brown, D., Karalis, K., Pothoulakis, C.** (2004): Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in *Clostridium difficile* toxin A-mediated intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8503-08.
- Aronsson, B., Möllby, R., Nord, C.E.** (1985): Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: epidemiological data from Sweden. *J. Infect. Dis.* 151: 476-81.
- Avbersek, J., Janezic, S., Pate, M., Rupnik, M., Zidaric, V., Logar, K., Vengust, M., Zemljic, M., Pirs, T., Ocepek, M.** (2009): Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe* 15: 252-5.
- Baines, S.D., O'Connor, R., Freeman, J., Fawley, W.N., Harmanus, Mastrantonio, P., Kuijper, E.J., Wilcox, M.H.** (2008): Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 1046-52.
- Bakri, M.M., Brown, D.J., Butcher, J.P., Sutherland, A.D.** (2009): *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 817-8.
- Balassiano, I.T., Miranda, K.R., Boente, R.F., Pauer, H., Oliveira, J.C., Santos-Filho, J., Amorim, E.L., Canine, G.A., Souza, C.F., Gomes, M.Z., Ferreira, M.E., Brazier, J.S., Domingues, R.M.** (2009): Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe* 15: 61-4.
- Barbut, F., Lalande, V., Daprey, G., Cohen, P., Marle, N., Burghoffer, B., Petit, J.C.** (2000): Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 481-4.

- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmée, P., Brazier, J., Kuijper, E., Poxton, I.** (2007): Prospective study of *Clostridium difficile*-associated disease in Europe with phenotypic and genotypic characterization of the isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 1048–57.
- Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., Aktories, K.** (2001): Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* Toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* 276: 10670–6.
- Bartlett, J.G.** (2002): Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 346: 334-9.
- Bauer, M.P., Notermans, D.W., van Benthem, B.H.B., Brazier, J.S., Wilcox, M.H., Rupnik, M., Monnet, D.L., van Dissel, J.T., Kuijper, E.J.** (2011): *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377: 63-73.
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., Petit, J.C.** (1999): Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 175: 261–6.
- Bowman, R.A., Riley, T.V.** (1988): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoeae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 476-84.
- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., von Eichel-Streiber, C.** (1996): Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene.* 181 : 29-38.
- Braun, V., Mehlig, M., Moos, M., Rupnik, M., Kalt, B., Mahony, D. E., von Eichel-Streiber, C.** (2000): A chimeric ribozyme in *Clostridium difficile* combines features of group I introns and insertion elements. *J. Mol. Microbiol.* 36: 1447–59.
- Braunlin, W., Xu, Q., Hook, P., Fitzpatrick, F., Klinger, J.D., Burrier, R., Kurtz, C.B.** (2004): Toxin binding of tolevamer, a polyanionic drug that protects against antibiotic-associated diarrhea. *Biophys J.* 87: 534-9.
- Broukhanski, G., Simor, A., Pillai, D.R.** (2011): Defining criteria to interpret multilocus variable number tandem repeat analysis to aid *Clostridium difficile* outbreak investigation. *J. Med. Microbiol.* 60: 1095–100.
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N.** (2001): Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.* 40: 1187-99.
- Carroll, K.C., Bartlett, J.G.** (2011): Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 501–21.
- Carter, G.P., Lyras, D., Allen, D.L., Mackin, K.E., Howarth, P.M., O'Connor, J.R., Rood, J.I.** (2007): Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J. Bacteriol.*, 189: 7290–301.
- Cartmill, T.D.I., Orr, K., Freeman, R., Sisson, P.R., Lightfoot, N.F.** (1992): Nosocomial infection with *Clostridium difficile* investigated by pyrolysis mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 37: 352–6.
- Castagnola, E., Battaglia, T., Bandettini, R., Caviglia, I., Baldelli, I., Nantron, M.** (2009): *Clostridium difficile*-associated disease in children with solid tumors. *Support Care Cancer* 17: 321-4.
- Crobach, M.J.T., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H., Kuijper, E.J.** (2009): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 1053–66.
- Curry, S.R., Marsh, J.W., Muto, C.A., O'Leary, M.M., Pasculle, A.W., Harrison, L.H.** (2007): *tcdC* genotypes associated with severe TcdC truncation in

an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 45: 215-221.

Dallal, R. M., Brian, G., Harbrecht, M.D., Boujoukas, A.J., Sirio, C.A., Farkas, L.M., Lee, K.K., Simmons, R.L. (2002): Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. Ann. Surg. 235: 363-372

Dawson, L.F., Valiente, E., Donahue, E.H., Birchenough, G., Wren, B.W. (2011): Hypervirulent *Clostridium difficile* PCR-Ribotypes Exhibit Resistance to Widely Used Disinfectants. PLoS ONE 6: e25754.

Debast, S.B., van Leengoed, L.A., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E.J., Bergwerff, A.A. (2009): *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. Environ. Microbiol. 11: 505–11.

Delmée, M. (2001): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin. Microbiol. Infect. 7: 411-6.

Delmée, M., Homel, M., Wauters, G. (1985): Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. J. Clin. Microbiol. 21: 323-7.

Deneve, C., Delomenie, C., Barc, M.C., Collignon, A., Janoir, C. (2008): Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. J. Med. Microbiol. 57: 732–38.

Dineen, S.S., Villapakkam, A.C., Nordman, J.T., Sonenshein, A.L. (2007): Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. Mol. Microbiol. 66: 206-19.

Drudy, D., Goorhuis, B., Bakker, D., Kyne, L., van den Berg, R., Fenelon, L., Fanning, S., Kuijper, E.J. (2008): Clindamycin-resistant clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, Europe. Emerg. Infect. Dis. 14: 1485–7.

Egerer, M., Giesemann, T., Jank, T., Satchell, K.J.F., Aktories, K. (2007): Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* Toxins A and B depends on cysteine protease activity. J. Biol. Chem. 282: 25314–21.

Eglow, R., Pothoulakis, C., Itzkowitz, S., Israel, E.J., O’Keane, C.J., Gong, D., Gao, N., Xu, Y.L., Walker, W.A., LaMont, J.T. (1992): Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in new born rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. J. Clin. Invest. 90: 822–9.

Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Shulze, J., Sauerborn, M. (1992): Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. Mol. Gen. Genet. 233: 260-268.

Eichel-Streiber, C., Meyer zu Heringdorf, D., Habermann, E., Sartingen, S. (1995): Closing in on the toxic domain through analysis of a variant *Clostridium difficile* cytotoxin. B. Mol. Microbiol. 17: 313–21.

Eichel-Streiber, C., Zec-Pirnat, I., Grabnar, M., Rupnik, M. (1999): A nonsense mutation abrogates production of a functional enterotoxin A in *Clostridium difficile* toxinotype VIII strains of serogroups F and X. FEMS Microbiol. Lett. 178: 163–168.

Fawley, W.N., Wilcox, M.H. (2011): An enhanced DNA fingerprinting service to investigate potential *Clostridium difficile* infection case clusters sharing the same PCR-ribotype. J. Clin. Microbiol. 49: 4333-7.

Forgetta, V., Oughton, M.T., Marquis, P., Brukner, I., Blanchette, R., Haub, K., Magrini, V., Mardis, E.R., Gerding, D.N., Loo, V.G., Miller, M.A., Mulvey, M.R., Rupnik, M., Dascal, A., Dewar, K. (2011): Fourteen-genome comparison

- identifies DNA markers for severe-disease-associated strains of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 49: 2230-8.
- Frisch, C., Gerhard, R., Aktories, K., Hofmann, F., Just, I.** (2003): The complete receptor-binding domain of *Clostridium difficile* Toxin A is required for endocytosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 706–11.
- Freeman, J., Bauer, M.P., Baines, S.D., Corver, J., Fawley, W.N., Goorhuis, B., Kuijper, E.J., Wilcox, M.H.** (2010): The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin. Microb. Rev. 23: 529–49.
- George, W.L., Sutter, V.L., Citron, D., Finegold, S.M.** (1979): Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 9: 214-19.
- George, W.L., Sutter, V.L., Goldstein, E.J., Ludwig, S.L., Finegold, S.M.** (1978): Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. Lancet 1, 15 (8068): 802-3.
- Gerber, M., Walch, C., Löffler, B., Tischendorf, K., Reischl, U., Ackermann, G.** (2008): Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. 57: 776-83.
- Geric, B., Carman, R.J., Rupnik, M., Genheimer, C.W., Sambol, S.P., Lyerly, D.M., Gerding, D.N., Johnson, S.** (2006): Binary toxin-producing large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J. Infect. Dis. 193: 1143–50.
- Goldová, J., Malinová, A., Indra, A., Vitek, L., Branny, P., Jirásková, A.** (2012): *Clostridium difficile* in piglets in the Czech Republic. Folia Microbiol. (Praha) 57: 159-61.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D.W., Rowena Fung, Golubchik, T., Harding, R.M., Jeffry, K.J.M., Jolley, K.A.** (2010): Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 48: 770–8.
- Guërtler, V.** (1993): Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. J. Gen. Microbiol. 139: 3089-97.
- Hall, I., O'Toole, E.** (1935): Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am. J. Dis. Child. 49 (2): 390-402.
- He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A.C., Pothoulakis, C., Lamont, J.T.** (2002): *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. Gastroenterology 122: 1048-57.
- Hensgens, M.P., Goorhuis, A., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Kuijper, E.J.** (2009): Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. Euro Surveill. 14 (45): 19402.
- Hill, T., Lewicki, P.** (2007): STATISTICS: Methods and Applications. StatSoft, Tulsa, OK.
- Huang, H., Fang, H., Weintraub, A., Nord, C.E.** (2009b): Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. Clin. Microbiol. Infect. 15:1170–3.
- Huang, H., Weintraub, A., Fang, H., Nord, C.E.** (2009a): Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. Int. J. Antimicrob. Agents 34: 516–22.
- Hyytia-Trees, E., Lafon, P., Vauterin, P., Ribot, E.M.** (2010): Multilaboratory Validation Study of Standardized Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Protocol for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: A Novel

- Approach to Normalize Fragment Size Data Between Capillary Electrophoresis Platforms. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 129–136.
- Chang, T.W., Lauermann, M., Bartlett, J.G.** (1979): Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* 140: 765–70.
- Cheng, V.C., Yam, W.C., Chan, J.F., To, K.K., Ho, P.L., Yuen, K.Y.** (2009): *Clostridium difficile* ribotype 027 arrives in Hong Kong. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34: 492–3.
- Chmelařová, E., Škapová, T.** (2010): Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile*. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 16: 86-9.
- Indra, A., Huhulescu, S., Schneeweis, M., Hasenberger, P., Kernbichler, S., Fiedler, A., Wewalka, G., Allerberger, F., Kuijper, E.J.** (2008): Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J. Med. Microbiol.* 57: 1377-82.
- Indra, I., Blaschitz, M., Kernbichler, S., Reischl, U., Wewalka, G., Allerberger, F.** (2010): Mechanisms behind variation in the *Clostridium difficile* 16S–23S rRNA intergenic spacer region. *J. Med. Microbiol.* 59, 1317–23.
- Janežič, S., Štrumbelj, I., Rupnik, M.** (2011): Use of modified PCR ribotyping for direct detection of *Clostridium difficile* ribotypes in stool samples.
- Jangi, S., Lamont, J.T.** (2010): Asymptomatic Colonization by *Clostridium difficile* in Infants: Implications for Disease in Later Life. *J. Ped. Gastroenterol. Nutri.* 51: 2-7.
- Jank, T., Aktories, K.** (2008): Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol.* 16: 222–229.
- Janoir, C., Péchiné, S., Grosdidier, C., Collignon, A.** (2007): Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile* is a cysteine protease with degrading activity on extra cellular matrix proteins. *J. Bacteriol.* 189: 7174–80.
- John, R., Brazier, J.S.** (2005): Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of *Clostridium difficile* commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK. *J. Hosp. Infect.* 61: 11-4.
- Joseph, R., Demeyer, D., Vanrenterghem, D., van den Berg, R., Kuijper, E.J., Delmee, M.** (2005): First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. *Euro Surveill.* 10: 2815.
- Just, I., Gerhard, R.** (2004): Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152: 23–47.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K.** (1995a): Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature.* 375 (6531): 500-3.
- Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K.** (1995b): The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 13932-6.
- Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M. C., Delmee, M., Collignon, A.** (2002): *Clostridium difficile* genotyping based on slpA variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2452-8.
- Kato, H., Ito, Y., Van den Berg, R.J., Kuijper, E.J., Arakawa, Y.** (2007): First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill.* 2007 12: 3110.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Ueno, K., Ushijima, H.** (1994): Application of Typing by Pulsed-Field Gel Electrophoresis to the Study of *Clostridium difficile* in a Neonatal Intensive Care Unit. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2067-70.

- Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, S., Songer, J.G.** (2007): Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1963–4.
- Keessen, E.C., van den Berkt, A.J., Haasjes, N.H., Hermanus, A.C., Kuijper, E.J., Lipman, L.J.A.** (2011): The relation between farm specific factors and prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs. *Vet. Microbiol.* 154: 130-4.
- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E.** (2000): Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182: 2928–36.
- Kelly, C.P., Becker, S., Linevsky, J.K., Joshi, M.A, O'Keane, J.C., Dickey, B.F., LaMont, J.T., Pothoulakis, C.** (1994): Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J. Clin. Investig.* 93: 1257-65.
- Khanna, S., Pardi, D.S., Aronson, S.L., Kammer, P.P. Orenstein, R., StSaver, J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R.** (2012): The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 107: 89–95.
- Kim, H., Jeong, S.H., Roh, K.H., Hong, S.G., Kim, J.W., Shin, M.G., Kim, M., Shin, H.B., Uh, Y., Lee, H., Lee, K.** (2010): Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. *Korean J. Lab. Med.* 30: 491–7.
- Klaassen, C.H., van Harenn, H.A., Horrevorts, A.M.** (2002): Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 40: 101-4.
- Kristjánsson, M., Samore, M.H., Gerding, D.N., DeGirolami, P.C., Bettin, K.M., Karchmer, A.W., Arbeit, R.D.** (1994): Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping and pulsedfield gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1963-9.
- Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A., Minton, N.P.** (2010): The role of Toxin A and Toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467: 711–3.
- Kuijper, E.J., Barbut, F., Brazier, J.S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T.** (2008): Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill.* 13 (7-9): 18942.
- Kuijper, E.J., Coignard, B., Brazier, J.S., Suetens, C., Drudy, D., Wiuff, C., Pituch, H., Reichert, P., Schneider, F., Widmer, A.F., Olsen, K.E., Allerberger, F., Notermans, D.W., Barbut, F., Delmée, M., Wilcox, M., Pearson, A., Patel, B., Brown, D.J., Frei, R., Akerlund, T., Poxton, I.R., Tüll, P.** (2007): Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* 12: 714.
- Kuijper, E.J., Coignard, B., Tüll, P.** (2006): Emergence of CDAD in Northern America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 6: 2–18.
- Kuijper, E.J., Oudbier, J.H., Stuijbergen, W.N.H.M., Jansz, A., Zanen, H.C.** (1987): Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 25: 751-3.
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P.** (2000): Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N. Engl. J. Med.* 342: 390-7.

- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P.** (2001): Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*. 357: 189-93.
- Lamontagne, F., Labbé, A.C., Haeck, O., Lesur, O., Lalancette, M., Patino, C., Leblanc, M., Laverdière, M., Pépin, J.** (2007): Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant *Clostridium difficile* colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain. *Ann. Surg.* 245: 267-72.
- Larson, H.E., Barclay, F.E., Honour, P., Hill, I.D.** (1982): Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J. Infect. Dis.* 146: 727-33.
- Larson, H.E., Price, A.B., Honour, P., Borriello, S.P.** (1978): *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1 (8073): 1063-6.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestrel-Carson, P., Lemeland, J.F., Pons, J.L.** (2004): Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2609–17.
- Leonard, J., Marshall, J.K., Moayyedi, P.** (2007): Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 2047–56.
- Loo, V. G., Poirier, L., Miller, M.A., Oughton, M., Libman, M.D., Michaud, S., Bourgault, A.M.** (2005): A predominantly clonal multiinstitutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.* 353: 2442–9.
- Lowy, I., Molrine, D.C., Leav, B.A., Blair, B.M., Baxter, R., Gerding, D.N., Nichol, G., Thomas, W.D., Leney, M., Sloan, S., Hay, C.A., Ambrosiano, D.M.** (2010): Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N. Engl. J. Med.* 362: 197–205.
- Lyerly, D.M., Barroso, L.A., Wilkins, T.D.** (1991): Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. *J Clin Microbiol.* 29: 2639-42.
- Lyerly, D.M., Barroso, L.A., Wilkins, T.D., Depitre, C., Corthier, G.** (1992): Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 60: 4633–9.
- Lyerly, D.M., Phelps, C.J., Wilkins, T.D.** (1985): Monoclonal and specific polyclonal antibodies for immunoassay of *Clostridium difficile* toxin A. *J. Clin. Microbiol.* 21: 12-14.
- MacCannell, D.R., Louie, T., Rupnik, M., Krulicki, W., Armstrong, G., Emery, J., Ward, L., Lye, T.** (2006a): Characterization of a novel, TcdB-deficient NAP1 variant strain of *Clostridium difficile*. 46th ICAAC Conference, San Francisco, September 2006.
- MacCannell, D.R., Louie, T.J., Gregson, D.B., Laverdiere, M., Labbe, A.C., Henwick, S.** (2006b): Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2147–52.
- Mani, N., Dupuy, B.** (2001): Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 5844-9.
- Manzoor, S.E., Tanner, H.E., Marriott, C.L., Brazier, J.S., Hardy, K.J., Platt, S., Hawkey, P.M.** (2011): Extended Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of *Clostridium difficile* Correlates Exactly with Ribotyping and Enables Identification of Hospital Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3523-30.

- Marler, L.M., Siders, J.A., Wolters, L.C., Pettigrew, Y., Skitt, B.L., Allen, S.D.** (1992): Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 30: 514–6.
- Marsh, J.W., O'Leary, M.M., Shutt, K.A., Pasculle, A.W., Johnson, S., Gerding, D.N., Muto, C.A., Harrison, L.H.** (2006): Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2558-66.
- Masaříková, M., Smola, J.** (2007): *Clostridium difficile* associated disease in czech piglets production. *Research in Pig Breeding* 1: 32-4.
- Matamouros, S., England, P., Dupuy, B.** (2007): *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol. Microbiol.* 64: 1274-88.
- Mathis, J.N., Pilkinton, L., McMillin, D.E.** (1999): Detection and transcription of toxin DNA in a nontoxigenic strain of *Clostridium difficile*. *Curr. Microbiol.* 38: 324-8.
- McDonald, L.C., Killgore, G.E., Thompson, A., Owens, R.C., Kazakova, S.V., Sambol, S.P., Johnson, S., Gerding, D.N.** (2005): An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 353: 2433–41.
- McFarland, L.V., Mulligan, M.E., Kwok, R.Y., Stamm, W.E.** (1989): Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* 26: 204-10.
- McMillin, D.E., Muldrow, L.L.** (1992): Typing of toxic strains of *Clostridium difficile* using DNA fingerprints generated with arbitrary polymerase chain reaction primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 92: 5-10.
- McNulty, C., Logan, M., Donald, I.P., Ennis, D., Taylor, D., Baldwin, R.N., Bannerjee, M., Cartwright, K.A.** (1997): Successful control of *Clostridium difficile* infection in an elderly care unit through use of a restrictive antibiotic policy. *J Antimicrob Chemother.* 40: 707-11.
- Merrigan, M.M., Sambol, S.P., Johnson, S., Gerding, D.N.** (2009): New approach to the management of *Clostridium difficile* infection: colonisation with non-toxigenic *C. difficile* during daily ampicillin or ceftriaxone administration. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33: 46-50.
- Miyajima, F., Roberts, P., Swale, A., Price, V., Jones, M., Horan, M., Beeching, N., Brazier, J., Parry, C., Pendleton, N., Pirmohamed, M.** (2011): Characterisation and Carriage Ratio of *Clostridium difficile* Strains Isolated from a Community-Dwelling Elderly Population in the United Kingdom. *PLoS ONE* 6(8): e22804.
- Neefs, J., van de Peer, M., Hendriks, Y., Wachter, D.E.** (1990): Compilation of small ribosomal sub-unit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 18: 2237-317.
- Norman, K.N., Scott, H.M., Harvey, B., Norby, B., Hume, M.E., Andrews, K.** (2011): Prevalence and Genotypic Characteristics of *Clostridium difficile* in a Closed and Integrated Human and Swine Population. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5755–60.
- Nyč, O., Bártová, M., Běbrová, E., Geigerová, L., Chmelařová, E., Ježek, P., Jirsa, R., Matějková, J.** (2008): Principy laboratorní diagnostiky *Clostridium difficile*. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* 17: 19-21.
- Nyč, O., Pituch, H., Matějková, J., Obuch-Woszczatynski, P., Kuijper, E.J.** (2011): *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *Lancet* 377: 63-73.
- O'Connor, J.R., Johnson, S., Gerding, D.N.** (2009): *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic B1/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* 136: 1913–24.

- Pasquale, V., Romano, V.J., Rupnik, M., Dumontet, S., Čižnár, I., Aliberti, F., Mauri, F., Saggiomo, V., Krovacek, K.** (2011): Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from shellfish and marine environments. *Folia Microbiol.* 56: 431-7.
- Peláez, T., Alcalá, L., Alonso, R., Rodríguez-Créixems, M., García-Lechuz, J.M., Bouza, E.** (2002): Reassessment of *Clostridium difficile* Susceptibility to Metronidazole and Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(6): 1647–50.
- Pépin, J., Valiquette, L., Alary, M.E., Villemure, P., Pelletier, A., Forget, K., Pépin, K., Chouinard, D.** (2004): *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Can. Med. Assoc. J.* 171: 466-72.
- Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G., Popoff, M.R.** (1997): Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect. Immun.* 65: 1402-7.
- Pirs, T, Ocepek, M., Rupnik, M.** (2008): Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *J. Med. Microbiol.* 57: 790–2.
- Pituch, H., Brazier, J.S., Obuch-Woszczatynski, P., Wultanska, D., Meisel-Mikolajczyk, F., Luczak, M.** (2006): Prevalence and association of PCR ribotypes of *Clostridium difficile* isolated from symptomatic patients from Warsaw with macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) type resistance. *J. Med. Microbiol.* 55: 207-13.
- Pituch, H., Obuch-Woszczatyński, P., Wultańska, D., Nurzyńska, G., Harmanus, C., Banaszkiwicz, A., Radzikowski, A., Łuczak, M., van Belkum, A., Kuijper, E.** (2010): Characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* strains isolated from adult patients with diarrhoea hospitalized in two university hospitals in Poland, 2004-2006. *J. Med. Microbiol.* 60: 1200-5.
- Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., Krishna, S.** (2008): Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 8: 777–84.
- Polívková, S., Sýkorová, B., Džupová, O., Reisingerová, M., Beneš, J.** (2010): Výskyt a charakter infekcí vyvolaných *Clostridium difficile* u pacientů s průjemovým onemocněním v pražské fakultní nemocnici. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lek.* 16: 206-10.
- Popoff, M., Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P.** (1988): Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase Produced by a *Clostridium difficile* Strain. *Infect. Immun.* 56: 2299-306.
- Pruitt, R.N., Chambers, M.G., Ng, K.K., Ohi, M.D., Lacy, D.B.** (2010): Structural organization of the functional domains of *Clostridium difficile* Toxins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 13467–72.
- Quinn, C.D., Sefers, S.E., Babiker, W., He, Y., Alcabasa, R., Stratton, CH.W., Carroll, K.C., Tan, Y.W.** (2010): C. Diff Quik Chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 48: 603–5.
- Reineke, J., Tenzer, S., Rupnik, M., Koschinski, A., Hasselmayer, O., Schrattenholz, A., Schild, H., von Eichel-Streiber, C.** (2007): Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 446: 415-9.
- Riggs, M.M., Sethi, A.K., Zabarsky, T.F., Eckstein, E.C., Jump, R.L.P., Donskey, C.J.** (2007): Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* among long-term care facility residents. *Clin. Infect. Dis.* 45: 992–8.

- Riley, T.V., Thean, S., Hool, G., Golledge, C.L.** (2009): First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med. J. Aust.* 190: 706–8.
- Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Peregrine, A.S., Trotz-Williams, L.A., Arroyo, L.G., Brazier, J.S., Weese, J.S.** (2006): *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1730–6.
- Rupnik, M.** (2008): Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 541–55.
- Rupnik, M., Avesani, V., Janc, M., Eichel-Streiber, C.v., Delmée, M.** (1998): A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2240-7.
- Rupnik, M., Braun, V., Soehn, F., Janc, M., Hofstetter, M., Laufenberg-Feldmann, R., Eichel-Streiber, C.** (1997): Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148: 197-202.
- Rupnik, M., Brazier, J.S., Duerden, B.I., Grabnar, M., Stubbs, S.L.** (2001): Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 147: 439-47.
- Sawabe, E., Kato, H., Osawa, K., Chida, T., Tojo, N., Arakawa, Y., Okamura, N.** (2007): Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 695–703.
- Saxton, K., Baines, S.D., Freeman, J., O'Connor, R., Wilcox, M.H.** (2009): Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 412–20.
- Shetty, N., Wren, M.W.D., Coen, P.G.** (2011): The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* 77: 1–6.
- Shin, B.M., Kuak, E.Y., Yoo, S.J., Shin, W.C., Yoo, H.M.** (2008): Emerging toxin A-B+ variant strain of *Clostridium difficile* responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60: 333–7.
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J., Aktories, K.** (2009): *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* 5: 1–14.
- Soehn, F., Wagenknecht-Wiesner, A., Leukel, P., Kohl, M., Weidmann, M., Eichel-Streiber, C., Braun, V.** (1998): Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864 - implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* 258: 222-32.
- Songer, J.G., Anderson, M.A.** (2006): *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12: 1–4.
- Songer, J.G., Trinh, H.T., Killgore, G.E., Thompson, A.D., McDonald, L.C., Limbago, B.M.** (2009): *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 819-821.
- Stabler, R.A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Cairns, M.D., Martin, M.J., Donahue, E.H., Riley, T.V., Songer, J.G., Kuijper, E.J., Dingle, K.E., Wren, B.W.** (2009) Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome. Biol.* 10: R102.

- Stamper, P.D., Alcabasa, A., Aird, D., Babiker, W., Wehrlin, J., Ikpeama, I., Carroll, K.C.** (2009): Comparison of a commercial realtime PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 47: 373–78.
- Stare, B.G., Delmée, M., Rupnik, M.** (2007): Variant forms of the binary toxin CDT lokus and *tcdC* gene in *Clostridium difficile* strains. *J. Med. Microbiol.* 56: 329-35.
- Stark, P.L., Lee, A., Parsonage, B.D.** (1982): Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: quantitative study. *Infect. Immun.* 35: 895-9.
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M.** (2000): Production of actin-specific ADPribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 307-12 .
- Sullivan, N.M., Pellett, S., Wilkins, T.D.** (1982): Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35: 1032-40.
- Sundriyal, A., Roberts, A.K., Ling, R., McGlashan, J., Shone, C.C., Acharya, K.R.** (2010): Expression, purification and cell cytotoxicity of actin-modifying binary toxin from *Clostridium difficile*. *Protein Expr. Purif.* 74: 42–8.
- Tae, C.H., Jung, S.A., Song, H.J., Kim, S.E., Choi, H.J., Lee, M., Hwang, Y., Kim, H., Lee, K.** (2009): The first case of antibiotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 24: 520–4.
- Tan, K.S., Wee, B.Y., Song, K.P.** (2001): Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 50: 613–9.
- Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., Karjalainen, T.** (2001): Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* 69: 7937-40.
- Tenover, F.C., Novak-Weekley, S., Woods, C.W., Peterson, L.R., Davis, T., Schreckenberger, P., Fang, F.C., Dascal, A., Gerding, D.N., Nomura, J.H., Goering, R.V., Akerlund, T., Weissfeld, A.S., Baron, E.J., Wong, E., Marlowe, E.M., Whitmore, J., Persing, D.H.** (2010): Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3719–24.
- Vágnerová, I., Kohnová, I., Saitz, J., Urbanová, K.** (2009): *Clostridium difficile* jako potenciální patogen u nezralých novorozenců. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lek.* 15: 22-5.
- Valiente, E., Dawson, L.F., Cairns, M.D., Stabler, R., Wren, B.W.** (2012): Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. *J. Med. Microbiol.* 61: 49–56.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J.** (2007): Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 3: 1–46.
- van den Berg, R.J., Kuijper, E.J., van Coppenraet, L.E., Claas, E.C.J.** (2006): Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 184–6.
- van den Berg, R.J., Schaap, I., Templeton, K.E., Klaassen, C.H., Kuijper, E.J.** (2007): Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1024-8.
- van Steenberg, J., Debast, S., van Kregten, E., van den Berg, R., Notermans, D., Kuijper, E.J.** (2005): Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype

- III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. Euro Surveill. 10: 2745.
- Viscidi, R., Laughon, B.E., Yolken, R., Bo-Linn, P., Moench, T., Ryder, R.W., Bartlett, J.G.** (1983): Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. J. Infect. Dis. 148: 93-100.
- Viscidi, R., Willey, S., Bartlett, J.G.** (1981): Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. Gastroenterology 81: 5-9.
- Vojtilová, L., Freiberggerová, M., Juránková, J., Husa, P., Polák, P., Kocourová, H.** (2011): Analýza souboru pacientů s onemocněním vyvolaným toxinem *Clostridium difficile* hospitalizovaných na Klinice infekčních chorob v Brně v letech 2007-2010. Klin. Mikrobiol. Inf. Lek. 17: 208-13.
- Vrtis, M.C.** (2008): *Clostridium difficile*: preventing epidemic outbreaks in home health. Home Healthc. Nurse 26: 563-69.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., McDonald, L.C.** (2005): Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 366: 1079-84.
- Wei, H.L., Kao, C.W., Wei, S.H., Tzen, J.T.C., Chiou, C.S.** (2011): Comparison of PCR ribotyping and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for improved detection of *Clostridium difficile*. BMC Microbiol. 11: 217.
- Wilcox, M.H., Fawley, W.N., Settle, C.D., Davidson, A.** (1998): Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection—relapse or reinfection? J. Hosp. Infect. 38: 93-100.
- Wilcox, M.H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C.D., Fawley, W.N.** (2008): A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. J. Antimicrob. Chemother. 62: 388 – 96.
- Wilks, M., Tabaqchali, S.** (1994): Typing of *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction with an arbitrary primer. J. Hosp. Infect. 28: 231-4.
- Wilson, K.H.** (1983): Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. J. Clin. Microbiol. 18: 1017-101.
- Wüst, J., Sullivan, N.M., Hardegger, U., Wilkins, T.D., Clin, J.** (1982): Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. Microbiol. 16: 1096-101.
- Zaiß, N.H., Rupnik, M., Kuijper, E.J., Harmanus, C., Michielsen, D., Janssens, K., Nubel, U.** (2009): Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. BMC Microbiol. 9: DOI: 10.1186/1471- 2180-9-6.
- Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M., Davis, M.B.** (2007): A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin. Infect. Dis. 45: 302-7.
- Zemanová, E., Urban, O., Chalupa, J., Mrózek, V., Taubová, V.** (2003): *Clostridium difficile* infection associated with pseudomembranous colitis in district hospitals. Vnitř. Lek. 49: 645-9.
- Zidaric, V., Zemljic, M., Janezic, S., Kocuvan, A., Rupnik, M.** (2008): High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. Anaerobe 14: 325-7.