

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Molekulární typizace patogenních kmenů *Clostridium difficile*
Molecular typing of *Clostridium difficile* pathogenic strains

Anna Malinová

školitel: RNDr. Alena Jirásková, Ph.D.

2009/2010

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně jen s použitím citované literatury.

V Praze dne 10.8.2010

.....

Anna Malinová

Děkuji Aleně Jiráskové za její čas a podporu při psaní.

Obsah

Obsah	2
Abstrakt	4
Úvod	5
<i>C. DIFFICILE</i> A CDAD	6
Kolonizace člověka <i>C. difficile</i> a rozvoj CDAD	6
Toxiny	6
Imunitní odpověď organismu na přítomnost <i>C. difficile</i>	8
Patogeneze a klinický obraz CDAD	9
Antibiotická rezistence	10
Diagnostika	11
Léčba CDAD	13
Epidemiologie	13
MOLEKULÁRNÍ TYPIZACE <i>C. difficile</i>	15
REA (restriction endonuclease analysis)	16
AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction)	17
Ribotypizace	18
PFGE (pulsed field gel electrophoresis)	19
Toxinotypizace	21
AFLP (amplified fragment length polymorphism)	24
SlpAST (surface layer protein A gene sequence typing)	25
MLST (multilocus sequence typing)	26
MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis)	27
TRST (tandem repeat sequence typing)	28
Srovnání metod molekulární typizace	29
Závěr	32
Seznam použité literatury	33

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+CDT-	toxin A and toxin B positive, binary toxin negative strain	kmen produkující toxin A a toxin B a neprodukující binární toxin
A-B+	toxin A negative, toxin B positive strain	kmen neprodukující toxin A a produkující toxin B
AFLP	amplified fragment length polymorphism	polymorfismus 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>
EIA	enzyme immunoassay	
ISR	intergenic spacer region	intergenová oblast DNA
MLST	multilocus sequence typing	
MLVA	multilocus variable number tandem repeat analysis	
PaLoc	Pathogenicity locus	lokus patogenicity
PFGE	pulsed field gel electrophoresis	pulzní gelová elektroforéza
PMC	pseudomembranous colitis	pseudomembranózní kolitida
REA	endonuclease restriction analysis	
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délek restričních fragmentů
slpAST	surface layer protein A gene sequence typing	
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>
TRST	tandem repeat sequence typing	

Abstrakt

Clostridium difficile je významný nozokomiální patogen, který patří mezi nejčastější průvodce průjmových onemocnění ve zdravotnických zařízeních. Souhrnně jsou onemocnění způsobená *C. difficile* označována jako CDAD (*Clostridium difficile* associated disease). Život ohrožující formou CDAD je pseudomembranózní kolitida. Vznik infekce často souvisí s předchozí antibiotickou léčbou, disponujícím faktorem pro rozvoj onemocnění je také vysoký věk. Od počátku 21. století vzrostl výskyt a závažnost infekcí způsobených *C. difficile*, což vedlo ke zvýšení zájmu klinických mikrobiologů o tuto problematiku. Se současnými epidemiemi CDAD je spojován především vysoce virulentní kmen rezistentní k fluorochinolovým antibiotikům označovaný jako 027/NAP1/B1. Při studiu šíření infekcí vyvolaných *C. difficile* je klíčová molekulární typizace patogenních kmenů. Záměrem této práce je shrnout problematiku CDAD, charakterizovat nejpoužívanější metody molekulární typizace *C. difficile*, zaměřit se na jejich výhody, nevýhody a porovnat je mezi sebou.

Abstract

Clostridium difficile is an important nosocomial pathogen and the most frequently diagnosed cause of hospital-acquired diarrhoea. The life-threatening form of this disease is pseudomembranous colitis. Disruption of the protective colonic flora by broad-spectrum antibiotics is the commonest predisposing factor to CDAD (*Clostridium difficile* associated disease). Another risk factor for the disease development is an increasing age. The topic of CDAD is of great importance now due to increasing incidence of CDAD involving a more severe course and higher mortality. This increased incidence is presumably associated with a new hypervirulent fluoroquinolone-resistant strain known as 027/NAP1/B1 based on molecular typing. Molecular typing of pathogenic strains of *C. difficile* is an important tool involved in epidemiological studies. The purpose of this thesis is to summarize current knowledge regarding CDAD and to characterize the most important molecular typing methods.

Klíčová slova: *Clostridium difficile*, CDAD, molekulární typizace, epidemiologie, pseudomembranózní kolitida, TcdA, TcdB, CDT, kmen 027/NAP1/B1

Key words: *Clostridium difficile*, CDAD, molecular typing, epidemiology, pseudomembranous colitis, TcdA, TcdB, CDT, strain 027/NAP1/B1

Úvod

C. difficile je anaerobní grampozitivní sporulující bakterie tyčinkovitého tvaru, která je přítomná v půdě a zažívacím traktu živočichů a člověka. *C. difficile* bylo poprvé izolováno v roce 1935 (Hall I. and O'Toole E., 1935). Roku 1978 se prokázalo, že je původcem střevních infekcí (George *et al.*, 1978; Larson *et al.*, 1978). V současné době je *C. difficile* považováno za nejčastější průvodce nozokomiálních střevních nákaz spojených s podáváním antibiotik (Pepin *et al.*, 2005). Onemocnění způsobená *C. difficile* nabývají mírných i život ohrožujících forem (Gerding, 1989). Zatímco lehčí průjemová onemocnění mohou být vyvolána i jinými agens, závažné formy nemoci, jako je pseudomembranózní kolitida (PMC), mají téměř vždy klostridiovou etiologii.

C. DIFFICILE A CDAD

Kolonizace člověka *C. difficile* a rozvoj CDAD

C. difficile patří k běžné mikroflóře střevního traktu člověka. Asymptomaticky se vyskytuje až u 90 % zdravých novorozenců, přítomnost s rostoucím věkem postupně klesá a po druhém roce života se již hodnoty výskytu blíží hodnotám v dospělé populaci (3 %) (Stark *et al.*, 1982). Pravděpodobnost kolonizace střevního traktu *C. difficile* se výrazně zvyšuje u starších a málo pohyblivých osob (až 80 % nemocných je starších 65 let) (Monaghan *et al.*, 2008). Nejvýznamnějším zdrojem nákazy je nemocniční prostředí. McFarland *et al.* (1989) pozorovali kolonizaci *C. difficile* u 21 % pacientů přijatých do nemocnice s negativním kultivačním nálezem, u 37 % z nich se v průběhu hospitalizace objevila průjmová onemocnění.

K rozvoji CDAD dochází při narušení rovnováhy přirozené střevní mikroflóry, nejčastěji vlivem užívání širokospektrálních antibiotik. Mnohé kmeny *C. difficile* jsou k běžným antibiotikům rezistentní. CDAD se může rovněž rozvinout i bez předchozí antimikrobiální terapie u pacientů s imunosupresivní léčbou, se sníženou střevní motilitou či po operaci střev (Rodemann, 2007). Typickými jsou i infekce u předčasně narozených dětí, jejichž imunitní systém není ještě zcela funkční (Vágnerová *et al.*, 2009). V posledních letech přibývá případů CDAD v populacích dříve zřídka ohrožovaných: u mladých lidí a dětí, kteří nepřišli do styku s nemocničním prostředím ani antibiotickou léčbou, nebo u těhotných žen (Chernakl, 2005). Potenciálním zdrojem těchto tzv. komunitních infekcí mohou být infikovaná domácí a hospodářská zvířata (Songer & Anderson, 2006).

Toxiny

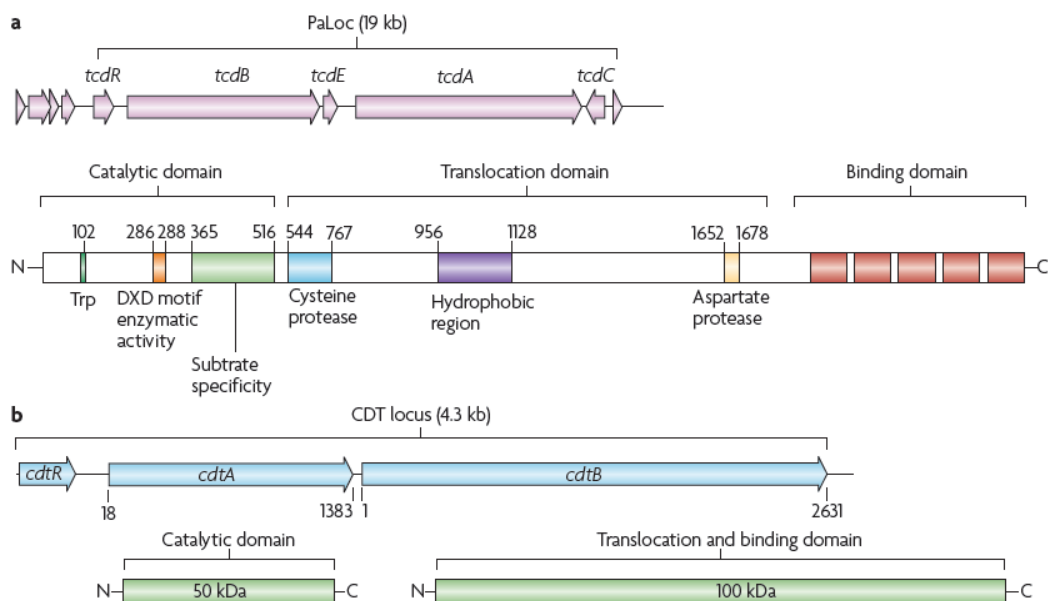
Patogenicita *C. difficile* vyplývá ze schopnosti některých kmenů tvořit velmi účinné toxiny. Existují ale i kmeny, které toxiny neprodukují a jejichž přítomnost v intestinálním traktu může organismus před toxinogenními kmeny chránit (Wilson & Sheagren, 1983).

Hlavní virulentní faktory produkované patogenními kmeny jsou exotoxiny TcdA a TcdB. Mechanismus jejich působení spočívá v glykosylaci malých GTP-vázajících proteinů, důležitých pro stavbu buněčného cytoskeletu. Tato nevratná inaktivace regulačních proteinů

vede k přerušení řady významných signalizačních drah a způsobí dezorganizaci aktinových filament a následné morfologické změny buněk (Just *et al.*, 1995). TcdA (308 kDa) působí na buňky střevní sliznice (enterotoxin) a vyvolává vodnaté nebo mírně hemorhagické průjmy. TcdB (270 kDa) poškozuje buňky nespecificky (cytotoxin) a způsobuje nekrózu tkáně. Většina patogenních kmenů produkuje toxiny oba. Dříve byla hlavní role v patogenezi onemocnění přisuzována toxinu TcdA, ale byly objeveny i kmeny TcdA-negativní (tzv. A-B+ kmeny) způsobující CDAD, což poukazuje na zásadní roli TcdB v rozvoji CDAD, nezávislou na TcdA (Alfa *et al.*, 2000).

Geny kódující TcdA a TcdB jsou lokalizovány v oblasti bakteriálního chromozomu označované jako PaLoc (Pathogenicity locus) (Obr. 1) (Braun *et al.*, 1996). Součástí tohoto lokusu (19,6 kb) jsou další tři geny - *tcdE*, *tcdR* a *tcdC*. Produktem genu *tcdE* je membránový protein, který svojí strukturou i funkcí připomíná bakteriofágové proteiny holiny a podílí se na uvolňování toxinů z buňky (Tan *et al.*, 2001). Gen *tcdR* kóduje alternativní faktor σ RNA polymerázy a aktivuje transkripci toxinových genů (Mani & Dupuy, 2001). *TcdC* naopak produkci toxinů tlumí (Matamouros *et al.*, 2007). Na regulaci syntézy toxinů A a B se podílí také řada dalších genů situovaných mimo PaLoc, jako negativní regulátor produkce toxinů například působí produkt genu *Cody* (Dineen *et al.*, 2007). DNA sekvence oblasti PaLoc je značně variabilní, čehož se využívá k molekulární typizaci patogenních kmenů *C. difficile* (toxintypizace). U nepatogenních kmenů je lokus PaLoc nahrazen nekódující sekvencí o velikosti 115 bp (Braun *et al.*, 1996).

Některé kmeny tvoří ještě tzv. binární toxin CDT, aktin-specifickou ADP-ribosyltransferázu, jejíž podíl v patogenezi onemocnění není zcela objasněn (Stubbs *et al.*, 2000). Binární toxin se skládá ze dvou proteinových podjednotek (CdtA - katalytická, CdtB - vazebná a transportní). Příslušný gen je spolu s regulačním genem *cdtR* lokalizován v lokusu CdtLoc (Obr. 1) (Perelle *et al.*, 1997).



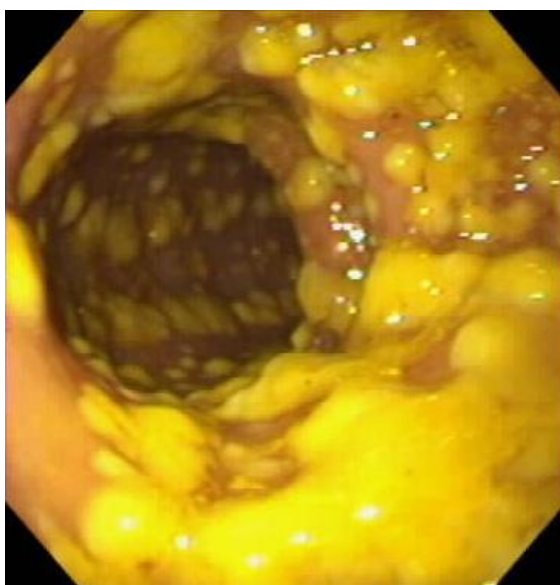
Obr. 1: Toxiny produkované *C. difficile* a schéma struktury lokusů PaLoc a CdtLoc. (A) PaLoc kóduje dva geny pro bakteriální toxiny, *tcdA* a *tcdB*, a tři regulační geny, *tcdR*, *tcdE* a *tcdC*. Pod lokusem PaLoc je schématicky znázorněn toxin TcdB (270 kDa) sestávající ze tří domén – katalytické, translokační a vazebné. **(B)** CdtLoc kóduje geny pro binární toxin, *cdtA* a *cdtB*, a regulační gen *cdtR*. Pod lokusem CdtLoc jsou schématicky znázorněny dva proteiny binárního toxinu, CdtA (katalytická funkce) a CdtB (funkce translokační a vazebná). Převzato z Rupnik *et al.* (2009).

Imunitní odpověď organismu na přítomnost *C. difficile*

Lidský imunitní systém je schopný proti klostridiovým toxinům vytvářet protilátky. Viscidi *et al.* (1983) odhalili přítomnost IgG protilátek proti TcdA u více než 64 % osob starších 2 let a proti TcdB u 66 % osob starších půl roku. Byla také pozorována signifikantně zvýšená hladiny těchto protilátek v séru osob, které prodělaly CDAD. Protilátky IgG pravděpodobně nezabrání kolonizaci *C. difficile*, ale jedinci se zvýšenou hladinou anti-TcdA protilátek IgG se spíše stanou asymptomatickými nosiči (Kyne *et al.*, 2000) a jsou chráněni proti relapsu (Kyne *et al.*, 2001). Vyšší incidence CDAD a mortalita u starších a předčasně narozených jedinců je způsobena omezenou funkčností jejich imunitního systému a sníženou schopností produkce anti-TcdA protilátek.

Patogeneze a klinický obraz CDAD

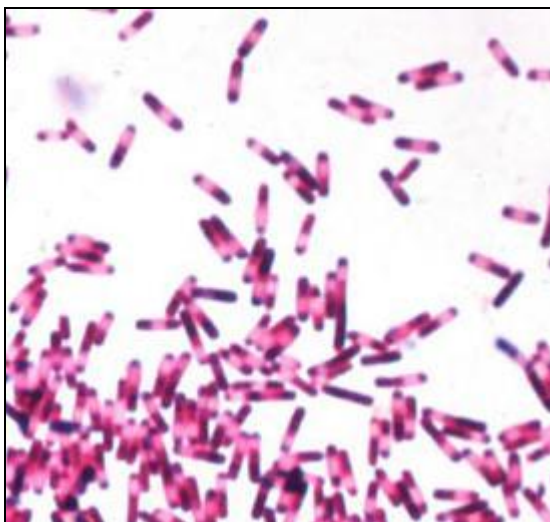
Typickými projevy CDAD bývají bolesti břicha, průjemy, meteorismus, snížená chuť k jídlu, hypoalbuminémie a leukocytóza. Může být přítomna i horečka. U PMC se na sliznici tračníku vytvoří difúzně roztroušená zánětlivá ložiska pokrytá fibrinovou pablánou, která jsou dobře pozorovatelná při endoskopickém vyšetření (Obr. 2). Peristaltika a motilita střev se postupně oslabuje, až dojde k neprůchodnosti střev. Při nejtěžší formě klostridiové kolitidy může vzniknout toxický megakolon, kdy v důsledku ochabnutí svalů střevní stěny dojde k extrémní dilataci kliček tlustého střeva a hrozí perforace tračníku (Bartlett, 2002). U 15-30 % pacientů dochází k opětovnému výskytu onemocnění do 8 týdnů po jejím odeznění. Relaps může být způsoben stejným kmenem, v 20–50 % případů se ale jedná o reinfekci kmenem jiným (Johnson *et al.*, 1989). Mortalita CDAD závisí na závažnosti infekce a v případě PMC může dosahovat až 30 % (Kuijper *et al.*, 2006).



Obr. 2: Pseudomembranózní kolitida (PMC). Toxiny *C. difficile* způsobují vyplavení cytokinů a vznik zánětlivých ložisek (o průměru 2-10 mm) ve střevní sliznici. Změny střeva jsou patrné při endoskopickém vyšetření - sliznice je pokryta žlutavou pablánou tvořenou poškozenými buňkami a leukocyty. Převzato z Yassin, S.F. (2009).

Významným faktorem v šíření *C. difficile* je sporulace (Obr. 3). Kolonizovaný jedinec vylučuje spory ve stolici a kontaminované povrchy se stávají hlavním zdrojem nákazy, spolu s přímým kontaktem s infikovaným a s přenosem spor na ruku zdravotního personálu.

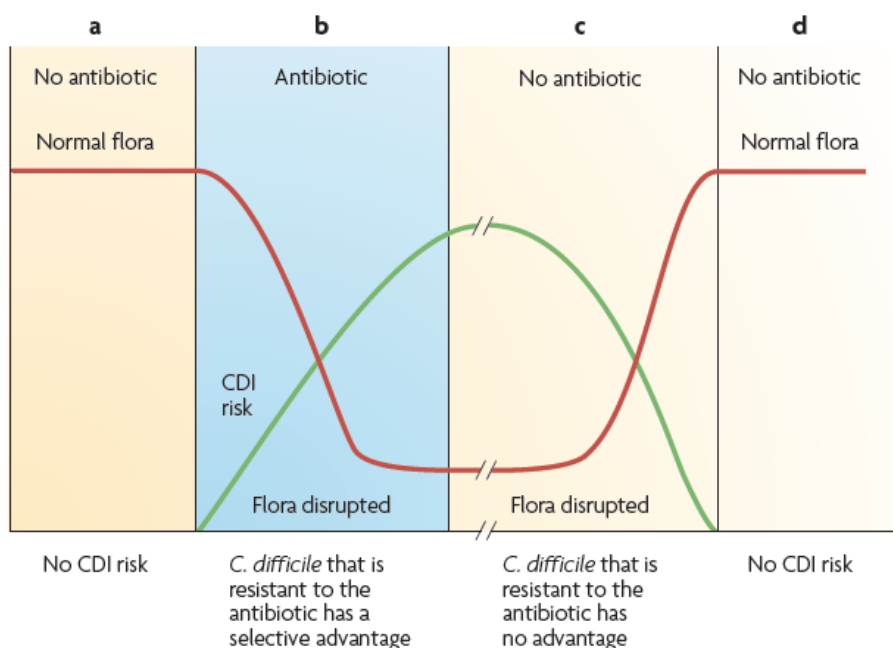
K zásadám prevence šíření *C. difficile* patří izolace pacientů s CDAD, používání rukavic zdravotním personálem (Johnson *et al.*, 1990) a řádná hygiena rukou.



Obr. 3: *C. difficile* s typickými endosporami subterminálního typu. Převzato z <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>.

Antibiotická rezistence

Rezistence *C. difficile* k některým druhům antibiotik umožňuje bakteriím osídlit zažívací trakt ve chvíli, kdy je běžná střevní mikroflóra antibiotiky potlačena (Obr. 4). Geny zodpovědné za rezistenci bakteriálních kmenů jsou lokalizovány na mobilních genetických elementech, které tvoří až 11 % genomu *C. difficile* (Sebahia *et al.*, 2006). Rezistence může vzniknout prakticky ke kterémukoliv antibiotiku. Dříve převládaly převážně infekce způsobené kmeny rezistentními ke klindamycinu (Johnson *et al.*, 1999), v současné době převládají epidemie vyvolané vysoce virulentním kmenem označovaným jako 027/NAP1/B1 (PCR ribotyp 027, PFGE typ NAP1, REA typ B1), který je rezistentní k fluorochinolovým antibiotikům (gatifloxacinu a moxifloxacinu) (Loo *et al.*, 2005). V evropských státech se objevily i hypervirulentní kmeny, které byly rezistentní jak vůči klindamycinu, tak i vůči fluorochinolům (Kuijper *et al.*, 2008). Mezi riziková antibiotika se dále řadí cefalosporiny, ampicilin, tetracyklin, erytromycin a mnohá další. Omezení používání těchto antibiotik je nejefektivnější metodou snížení rizik vzniku CDAD. Dle studie McNulty *et al.* (1997) vedlo omezení předepisování cefalosporinů (o 90 %) ke snížení výskytu CDAD více než o polovinu a k následné kontrole nozokomiální epidemie.



Obr. 4: Vliv antibiotik na střevní mikroflóru a s ním spojené riziko vzniku CDAD. Pacienti jsou k CDAD rezistentní, když jejich střevní mikroflóra není oslabena podáváním antibiotik (a). Po zahájení antibiotické léčby je běžná střevní mikroflóra narušena (červená křivka) a stoupá riziko infekce kmeny *C. difficile* rezistentními k podávaným antibiotikům (b). Po ukončení podávání antibiotik se střevní mikroflóra začíná pomalu obnovovat, čas potřebný na úplnou obnovu závisí na typu antibiotik (c). Obnověním původního bakteriálního společenstva se obnoví odolnost vůči CDAD (d). Převzato z Rupnik *et al.* (2009).

Diagnostika

Diagnostika CDAD je založena na detekci toxinů *C. difficile* nebo toxin-produkujících kmenů ve stolici. Alternativou laboratorních metod je endoskopické vyšetření tlustého střeva.

Toxiny mohou být detekovány pomocí imunologických metod (EIA - enzyme immunoassay) nebo metodami založenými na sledování jejich cytotoxického efektu. Další alternativou je molekulární diagnostika, kdy se pomocí PCR amplifikují geny kódující toxiny přímo ze stolice (Kato *et al.*, 1993).

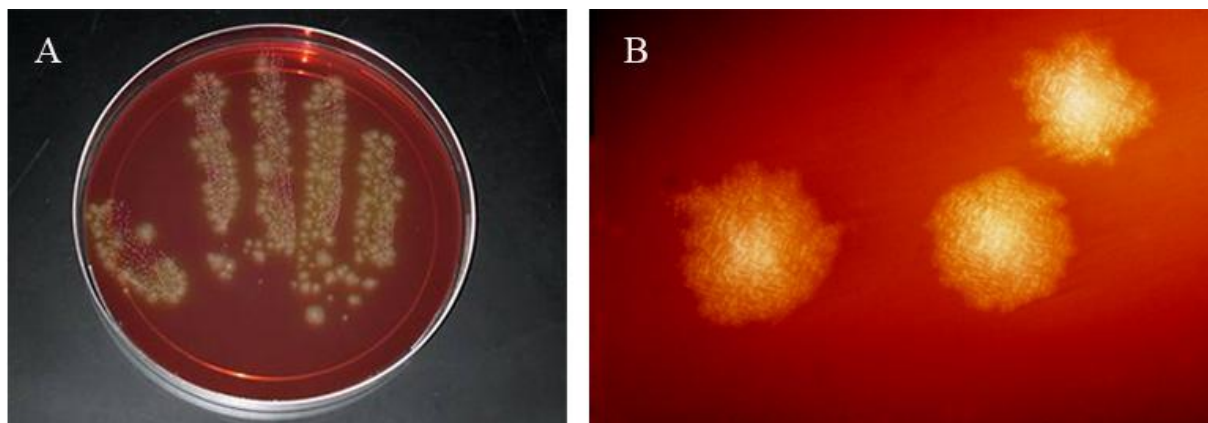
Cytotoxické testy spočívají v přidání filtrovaného vzorku stolice ke tkáňové kultuře a sledování cytopatologického efektu na buňky. K přípravě tkáňové kultury pro cytotoxické testy mohou být použity téměř všechny buněčné typy běžně používané v mikrobiologických laboratořích, nejčastější jsou tkáňové kultury z ledvinových epiteliálních buněk. Pokud jsou toxiny přítomny, dojde k narušení buněčného cytoskeletu a buňky se zakulatí. Přítomnost toxinů *C. difficile* je potvrzena jejich následnou neutralizací pomocí specifických protilátek

(Delmée *et al.*, 2001). Tato metoda je díky své vysoké citlivosti a specifitě považována za „zlatý standard“ v diagnostice CDAD, nicméně je časově náročná (Barbut *et al.*, 1993).

V klinické praxi se nejčastěji používají imunologické metody, kdy je diagnostika založena na vazbě specifických protilátek na toxiny TcdA a TcdB (Lyerly *et al.*, 1985). Na trhu je dostupných několik typů diagnostických souprav. Dříve byly používány především TcdA-detekující soupravy, ale vzhledem k výskytu A-/B+ kmenů jsou nyní upřednostňovány soupravy umožňující detekci obou toxinů současně (Alfa *et al.*, 2000). Výhodou imunologických metod je snadné a rychlé provedení, nicméně jejich citlivost a specifita je nižší než u výše zmíněného testu cytotoxicity (Barbut *et al.*, 1993).

Imunologicky lze prokázat také přítomnost glutamát dehydrogenázy (GDH) (Lyerly *et al.*, 1991), enzymu produkovaného *C. difficile*. Stanovení GDH je vhodné spíše jako orientační, protože GDH není druhově specifická. V případě pozitivního výsledku navazuje detekce toxinů nebo kultivace (Barbut *et al.*, 2000).

Nejcitlivější a nejspecifičtější metodou se ukázala být kultivace (Obr. 5) a následné testování izolovaných kmenů na přítomnost toxinů (Barbut *et al.*, 1993). Je to však metoda časově velmi náročná, v běžné diagnostice se nepoužívá. Izolace patogenních kmenů ze stolice je doporučována z důvodu následné molekulární typizace a testování citlivosti kmenů k antibiotikům (Delmée *et al.*, 2001).



Obr. 5: Kultivace *C. difficile*. A) Kolonie po 48 h růstu na krevním agaru. Kolonie jsou bělavé nebo šedobílé, ploché s nerovnými okraji a jsou charakteristické zápachem připomínajícím koňský hnůj (převzato z <http://www.msnbc.msn.com>). B) Detail kolonie (převzato z <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>).

Léčba CDAD

U mírně probíhajících forem CDAD je obvykle dostačující vysadit antibiotickou léčbu, která onemocnění vyvolala, popřípadě podpořit obnovení původní střevní mikroflóry podáním probiotik. Závažnější formy nemoci vyžadují antimikrobiální léčbu, používají se především vankomycin a metronidazol. Efektivita těchto dvou typů antibiotik je podobná při léčbě lehčích a středně závažných infekcí CDAD, u těžších forem se vankomycin ukázal být jako účinnější (ZAR *et al.*, 2007). Nicméně byly izolovány i kmeny *C. difficile*, které vykazovaly vůči vankomycinu a metronidazolu sníženou citlivost (Peláez *et al.*, 2002). U několika pacientů byla k léčbě závažné recidivující infekce úspěšně použita k obnovení normální bakteriální flóry metoda tzv. fekálního transplantátu (Aas *et al.*, 2003). Mezi další neantibiotické způsoby léčby patří například pasivní imunizace (Babcock *et al.*, 2006), vakcinace (Aboudola *et al.*, 2003) nebo podávání tolevameru (proteinu vázajícího klostridiální toxiny) (Braunlin *et al.*, 2004), ale tyto metody se zatím příliš neosvědčily. V kritických případech CDAD, kdy je pacient ohrožen na životě a léčba nezabírá, je prováděna částečná nebo celková kolektomie, chirurgické odstranění střeva (Lamontagne *et al.*, 2007).

Epidemiologie

Od počátku 21. století jsou 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 byl sledován výskyt CDAD mezi lety 1991 a 2003. V daném období došlo k nárůstu incidence nozokomiální nákazy více než 4×, mezi osobami staršími 65 let dokonce 8,5×. Významně se zvýšil i počet závažných případů (ze 7,1 % na 18,2 %) a úmrtí do 30 dnů od diagnózy (ze 4,7 % na 13,8 %). Hlavní zodpovědnost za nárůst výskytu CDAD v Kanadě nese již výše zmiňovaný kmen 027/NAP1/B1 charakteristický zvýšenou virulencí a rezistencí k flurochinolonům (Loo *et al.*, 2005). Podobný trend byl v posledních letech pozorován i ve Spojených státech amerických a mnoha evropských zemích a i zde byla zaznamenána přítomnost tohoto hypervirulentního kmene (Kuijper *et al.*, 2006). Kmen byl nalezen také v Japonsku, ale byl citlivý k fluorochinolům, jako kmeny ribotypu 027 izolované v USA před rokem 2001 (Kato *et al.*, 2007). Údaje o výskytu CDAD v České republice jsou značně omezené, výskyt kmene 027/NAP1/B1 nebyl dosud prokázán. Ojedinelá práce zabývající se sledováním výskytu CDAD v okresní nemocni Frýdku-Místku byla publikována v roce 2003 (Zemanová *et al.*, 2003).

Nový atypický kmen 027/NAP1/B1 je charakteristický získanou antibiotickou rezistencí k flurochinolonům a zvýšenou toxicitou. Zvýšená toxicita je přičítána bodové mutaci v pozici 117 a delecí (18 bp) v genu *tcdC*, který negativně reguluje produkci toxinů A a B, což způsobí jejich následnou nadprodukcí. TcdA je v porovnání s ostatními kmeny *C. difficile* produkován až 16× více, TcdB dokonce 23× (Warny *et al.*, 2005).

Zvyšující se výskyt a závažnost CDAD nejsou spojovány pouze s kmenem 027/NAP1/B1. Existují i další kmeny způsobující obdobné nozokomiální epidemie: ribotyp 017 (Drudy *et al.*, 2007), 001 (Borgmann *et al.*, 2008) nebo 078 (Goorhuis *et al.*, 2008). Na nárůstu CDAD se podílejí také kmeny A-B+ (Alfa *et al.*, 2000; Kuijper *et al.*, 2001), které při použití diagnostiky založené pouze na imunologické detekci toxinu A mohou unikát záchytu. Epidemie ribotypu 017 (A-B+) rezistentního k fluorochinonovým antibiotikům a ke klindamycinu, způsobila v Irsku čtyřnásobný nárůst incidence CDAD (Drudy *et al.*, 2007).

MOLEKULÁRNÍ TYPIZACE *C. difficile*

Výskyt nových vysoce virulentních kmenů *C. difficile* poukázal nejen na nezbytnost včasné diagnostiky a léčby CDAD, ale i na nutnost sledovat šíření těchto kmenů. Hlavním nástrojem epidemiologických studií *C. difficile* je typizace patogenních kmenů.

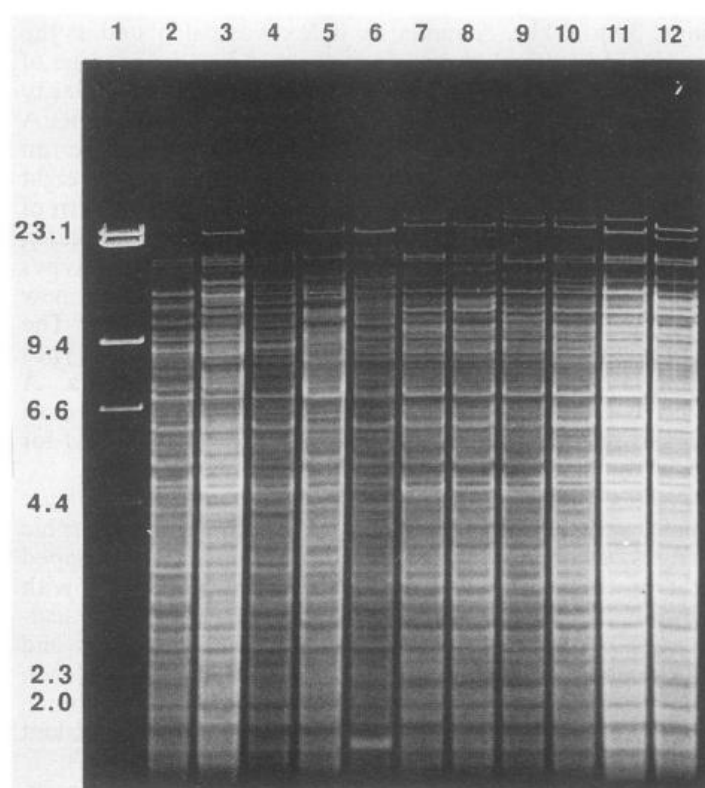
První typizační techniky byly založeny především na fenotypových charakteristikách kmenů. Izoláty se rozlišovaly nejčastěji na základě různé citlivosti k antibiotikům (Wüst *et al.*, 1982) a sérotypizací (Delmee *et al.*, 1985).

Molekulární typizace spočívá v rozlišení jednotlivých bakteriálních kmenů podle jejich genetické variability. V Evropě je hlavní používanou metodou PCR ribotypizace, při níž jsou amplifikovány variabilní sekvence DNA, které se nacházejí mezi vysoce konzervovanými geny kódujícími 16S a 23S rRNA. Na základě rozdílů v délce, sekvenci a počtu alel těchto variabilních oblastí jsou potom jednotlivé kmeny rozděleny do ribotypů (Guertler, 1993). V USA a Kanadě jsou patogenní kmeny charakterizovány pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE), při které je specifickou restrikcí endonukleázou celý bakteriální genom štěpen na několik kratších fragmentů a je analyzován jeho restrikcí profil (Kristjánsson *et al.*, 1994). Další z běžně používaných metod je toxinotypizace, založená na sledování variability uvnitř oblasti PaLoc, konkrétně se jedná o polymorfismus délek restrikcí fragmentů (PCR-RFLP) (Rupnik *et al.*, 1998). Novou metodou molekulární typizace s velkým rozlišovacím potenciálem je MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis), která je založena na analýze počtu tandemových repetitivních úseků v několika vysoce konzervovaných úsecích genomu (Marsh *et al.*, 2006). Další z metod, REA (endonuclease restriction analysis), se svým principem podobá PFGE, ale genom je v tomto případě štěpen na větší počet kratších fragmentů, což přináší mnohem vyšší rozlišovací schopnost, ale zároveň i obtížnou interpretaci (Kuijper *et al.*, 1987). Metody MLST (multilocus sequence typing) (Lemee *et al.*, 2004), *slp*AST (surface layer protein A gene sequence typing) (Karjalainen *et al.*, 2002) a TRST (tandem repeat sequence typing) (Zaiß *et al.*, 2009) jsou založeny na sekvenaci vybraných oblastí genomu. U MLST jde o sekvenační analýzu sedmi vysoce konzervovaných genů, u *slp*AST o sekvenaci variabilní oblasti genu kódující protein *slpA* a u TRST jsou porovnávány sekvence vysoce variabilních repetitivních úseků. Jednou ze starších metod molekulární typizace *C. difficile* je AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction) (McMillin & Muldrow, 1992), která pomocí krátkých nesespecifických primerů amplifikuje sérii různě dlouhých fragmentů. Alternativní metodou je AFLP (amplified fragment length

polymorphism), kdy restriční enzymy štěpí DNA, na konce některých fragmentů jsou ligovány specifické adaptéry, které následně umožní nasednutí PCR primerů a amplifikaci vybraných úseků (Klaassen *et al.*, 2002).

REA (restriction endonuclease analysis)

Typizace metodou REA je založena na štěpení genomu *C. difficile* enzymem *HincIII*, který štěpí DNA s mnohem větší frekvencí než tomu je u PFGE (Kuijper *et al.*, 1987). Výsledkem štěpení jsou stovky krátkých fragmentů o velikosti nepřesahující 30 kb (Obr. 6) (Kristjánsson *et al.*, 1994). K separaci jednotlivých fragmentů se používá standardní gelová elektroforéza.



Obr. 6: Příklad typizace *C. difficile* metodou REA. Bakteriální genom byl štěpen enzymem *HincIII*. Sloupce 2-7 reprezentují různé typy, sloupce 8-12 reprezentují podtypy jediného typu. Nalevo jsou uvedeny molekulové hmotnosti v kb. Restriční profily REA jsou velmi komplexní a vizuálně obtížně porovnatelné. Převzato z Clabots *et al.* (1993).

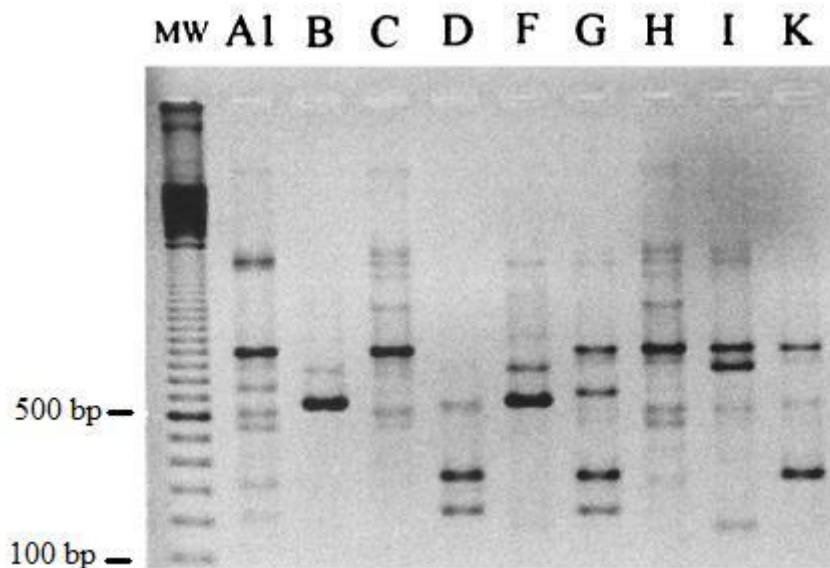
Restriční profil analyzovaného kmene je obtížné vyhodnotit vizuálním porovnáním, a proto se pro něj počítá tzv. index podobnosti (SI) (Clabots *et al.*, 1993). Na jeden elektroforetický gel jsou vedle sebe naneseny sledovaný vzorek a několik vzorových kmenů

s podobnými restričními profily. Následně jsou profily porovnávány po milimetrových segmentech (1-60 mm) a SI je vypočítán jako procento identických segmentů z 60 analyzovaných. Izolát je zařazen do podskupiny, pokud se od vzorového kmene neliší (SI = 100). Do nové skupiny je zařazen tehdy, pokud nemá s žádnou ze vzorových skupin SI větší než 90 (Clabots *et al.*, 1993). Skupiny REA jsou označovány velkými písmeny, podskupiny arabskými číslicemi. Tato metoda má vysokou rozlišovací schopnost a citlivost a je rychlá. Vzhledem k potřebě přímého porovnání vzorků na jednom gelu je mezilaboratorní výměna dat značně komplikovaná.

AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction)

Metoda AP-PCR používá k amplifikaci krátké primery (cca 10-20 nukleotidů) s náhodně zvolenou sekvencí a PCR s nízkou teplotou jejich nasednutí. Za těchto podmínek se primery váží nespecificky na mnoha místech jednovláknové DNA, což vede k amplifikaci série různě dlouhých fragmentů, které jsou následně rozděleny na agarózovém gelu (Obr. 7) (Williams *et al.*, 1990). McMillin & Muldrow (1992) prokázali vhodnost AP-PCR i pro typizaci *C. difficile*. Dvoustupňový model AP-PCR typizace nejprve pomocí PCR s použitím delších primerů (19 nukleotidů) rozdělí izoláty na hlavní typy a následnou PCR s kratšími primery (15 nukleotidů) rozliší v jejich rámci jednotlivé podtypy. Vyhodnocení gelu se provádí jak vizuálním posouzením, tak s použitím skenovacího denzitometru, což umožní odfiltrvat nespecifické pozadí (Tang *et al.*, 1995).

Hlavní výhodou AP-PCR typizace je její rychlost a jednoduchost. Dvoustupňová AP-PCR má srovnatelnou rozlišovací schopnost a reprodukovatelnost jako REA. Nevýhodou AP-PCR typizace je potřeba přímého porovnání typovaného vzorku s vzorovým kmenem na jednom gelu (Tang *et al.*, 1995).



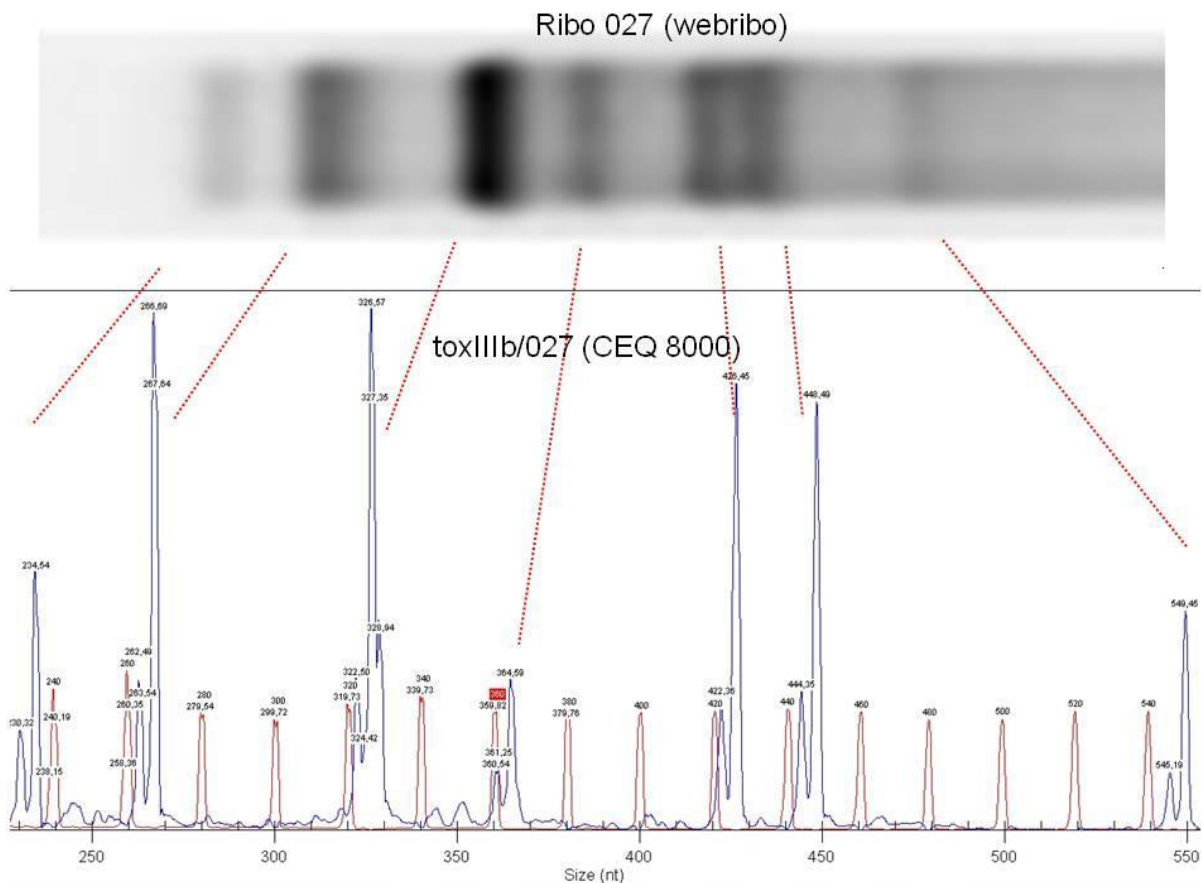
Obr. 7: AP-PCR typizace. Výsledky typizace devíti kmenů *C. difficile* (patřících do rozdílných séro skupin) získané pomocí AP-PCR s použitím primerů o délce 10 nukleotidů. MW: DNA standard. Převzato z Bidet *et al.* (2000).

Ribotypizace

Ribotypizace je metoda založená (1) na rozdílech v počtu alel rRNA operonů v genomu jednotlivých kmenů, (2) na rozdílných délkách a sekvencích polymorfních úseků těchto operonů, které se nachází mezi geny kódujícími 16S a 23S rRNA (ISR's – intergenic spacer regions). Použitím primerů, které nasedají na 3' a 5' konce genů kódujících 16S a 23S rRNA, se amplifikují různě dlouhé ISR's všech alel, které se na bakteriálním chromozomu nachází. Ty jsou následně elektroforeticky rozděleny (Obr. 8) (Guertler, 1993; Sadeghifard, *et al.*, 2006).

PCR ribotypizace založená na principu elektroforézy na agarózovém gelu je v současnosti nejpoužívanější metodou typizace v evropských laboratořích. Její značnou nevýhodou je nedostatek standardizovaných sbírek typových kmenů a obtížné porovnávání mezilaboratorních výsledků (Indra *et al.*, 2008). PCR ribotypizace využívající kapilární gelovou elektroforézu by mohla tyto nesnáze pomoci překonat. Tato metoda využívá, na rozdíl od metody klasické, fluorescenčně značené primery (5'- konec primeru 16S) a dokáže mezi jednotlivými fragmenty rozlišit rozdíly i jednoho nukleotidu (Obr. 8). Jednotlivé ribotypy odvozené z agarózové elektroforézy se pomocí kapilární elektroforézy rozdělí do několika podtypů (Indra *et al.*, 2008). Například rakouské ribotypy AI-9 a AI-23 byly

kapilární elektroforézou rozděleny do několika dílčích ribotypů, které byly na agarózovém gelu nerozlišitelné (Indra *et al.*, 2008). Byla vytvořena internetová databáze ribotypů generovaných pomocí kapilární gelové elektroforézy (<http://webribo.ages.at>), která sjednocuje získané informace a pomáhá uživatelům ribotypy identifikovat. V současnosti je v této databázi uloženo 573 ribotypů.



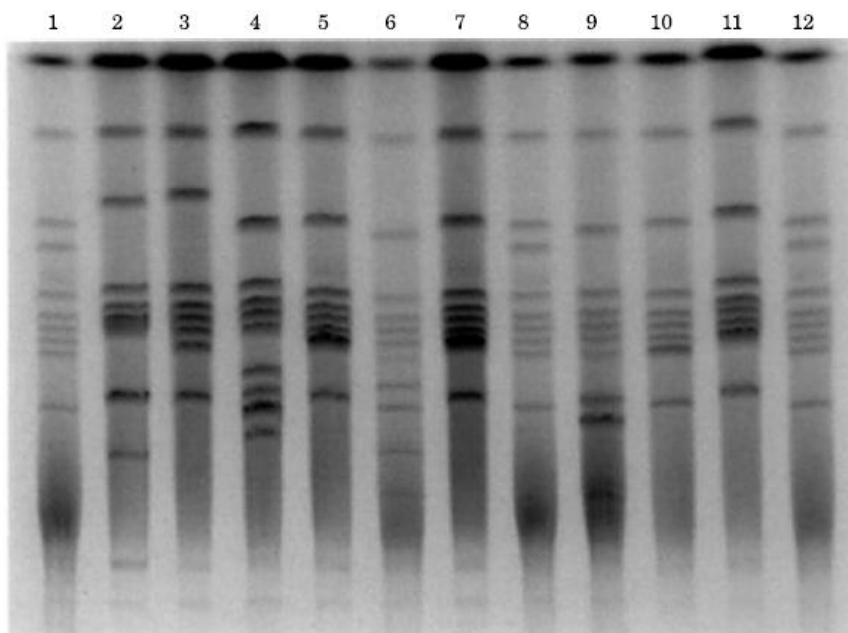
Obr. 8: PCR-ribotypizace *C. difficile* – ribotyp 027. Srovnání výsledku PCR-ribotypizace na gelové a kapilární gelové elektroforéze (CEQ 8000 Beckman Coulter). Červené čáry spojují odpovídající si fragmenty. Velikost fragmentů lze vyčíst na ose pod obrázkem. Výsledek gelové elektroforézy převzat z <http://webribo.ages.at>.

PFGE (pulsed field gel electrophoresis)

Při pulzní gelové elektroforéze je bakteriální suspenze imobilizována pomocí roztavené agarózy, následně je izolována DNA a celý bakteriální genom je štěpen vzácně štěpící restrikční endonukleázou za vzniku dlouhých DNA fragmentů (Maslow *et al.*, 1993). Např. endonukleáza *SmaI* naštěpí genom *C. difficile* (~4,3 Mb) na 9-11 fragmentů o velikosti

v rozmezí 285 kb až 2,2 Mb (Obr. 9) (Gal *et al.*, 2005). Fragmenty jsou následně pomalu děleny v polyakrylamidovém gelu v elektrickém poli, které periodicky mění směr. Velikost molekuly ovlivňuje nejen rychlost její migrace v gelu, ale i čas potřebný na přeorientování molekuly při změně elektrického pole. Tento typ elektroforézy umožní účinně separovat i velké molekuly, které by při standardní gelové elektroforéze migrovaly gelem spolu (Smith *et al.*, 1988). Při vyhodnocování restrikčních vzorců jsou potom izoláty lišící se v jednom nebo dvou fragmentech (vzniklých jedinou mutací) řazeny do různých podskupin, při větších rozdílech tvoří odlišné skupiny (Maslow *et al.*, 1993).

Metoda PFGE je díky své vysoké rozlišovací schopnosti a reprodukovatelnosti hojně využívaná pro typizaci řady bakterií, např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* a *Mycobacterium* (Maslow *et al.*, 1993). U některých kmenů *C. difficile*, zejména pak u PCR ribotypu 001, byla pozorována degradace genomové DNA a typizaci nešlo provést (Kristjánsson *et al.*, 1994; Bidet *et al.*, 2000). Vysokomolekulární DNA je vysoce citlivá k mechanickému poškození, během izolace je vystavena působení nukleáz a k degradaci dochází také při elektroforéze vlivem volných radikálů vznikajících v elektroforetickém pufru (Klaassen *et al.*, 2002). Gal *et al.* (2005) optimalizovali původní protokol přidáním thiomčoviny do pufru a tyto nesnáze tak odstranili. Nevýhodou metody zůstává její časová náročnost.



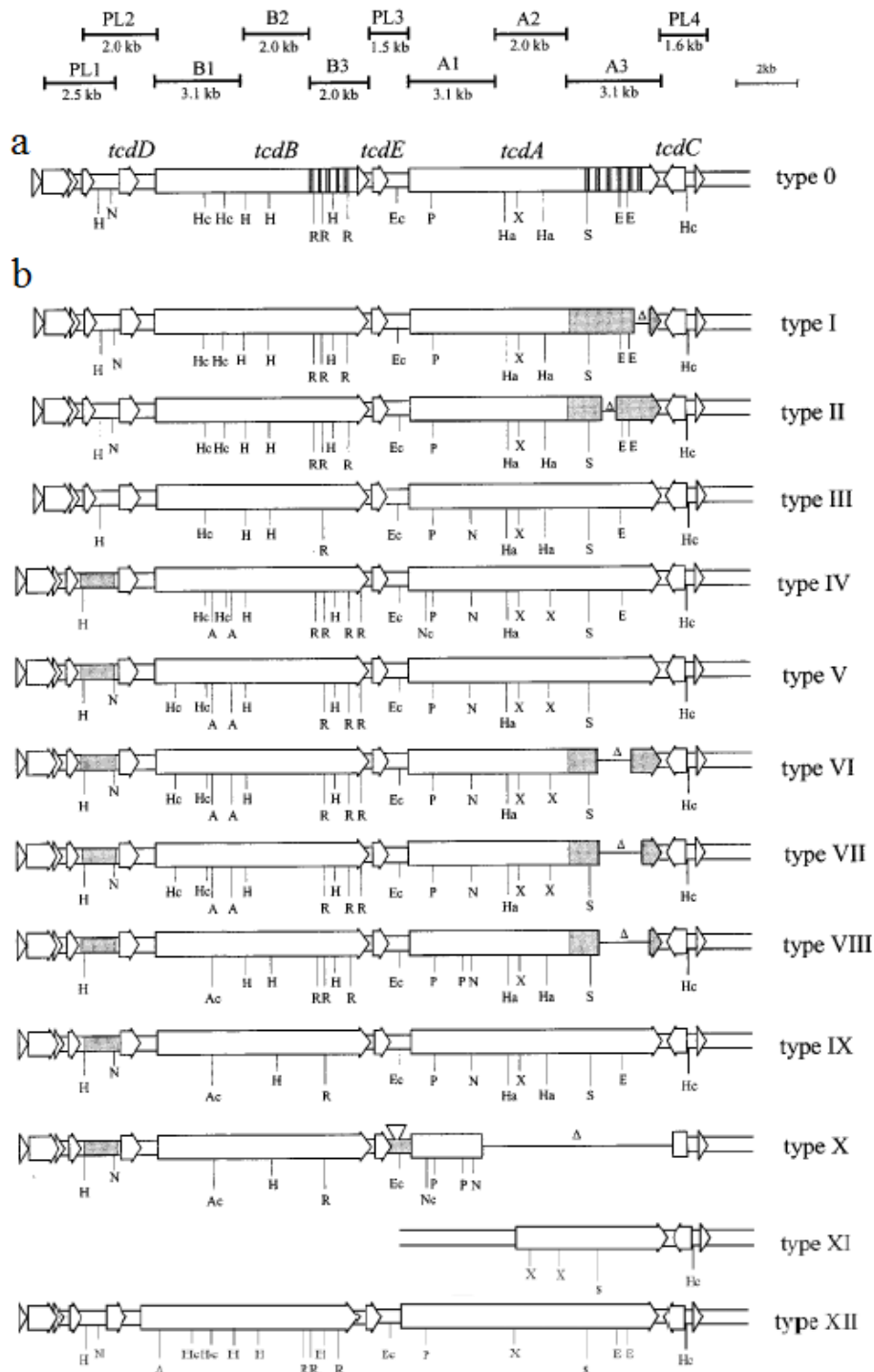
Obr. 9: PFGE. DNA dvanácti izolátů ribotypu 001 *C. difficile* byla štěpena endonukleázou *Sma*I a izoláty byly pomocí PFGE rozděleny do sedmi rozdílných typů. Převzato z Gal *et al.* (2005).

Toxinotypizace

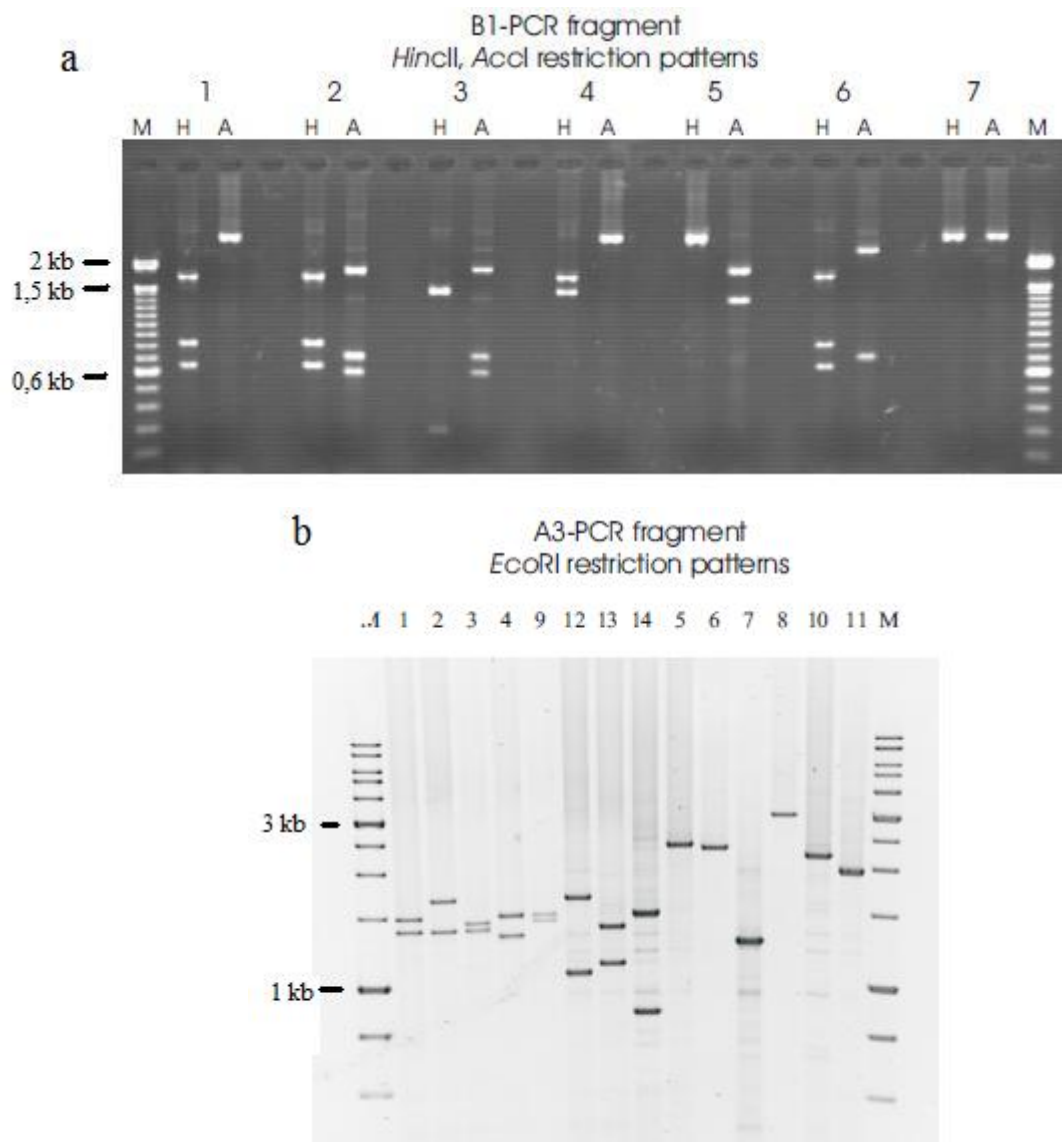
Toxinotypizace *C. difficile* je metoda založená na polymorfizmu délek restričních fragmentů (RFLP-PCR - restriction fragment length polymorphism PCR). Celý PaLoc (19,6 bp) je rozdělen na deset překrývajících se úseků (Obr. 10), které jsou pomocí PCR amplifikovány, a délka a restriční profily fragmentů jsou následně porovnány s referenčním kmenem VPI 10463 (toxinotyp 0) (Obr. 11) (Rupnik *et al.*, 1998).

Toxiny A i B patří společně s toxiny *C. sordellii* a *C. novyi* do skupiny velkých klostridiových cytotoxinů (LCTs – large clostridial toxins), pro které je charakteristická třídoménová struktura. Na N-konci aminokyselinového řetězce je katalytická doména, ve středu doména translokační a na C-konci doména vazebná (Eichel-Streiber *et al.*, 1996). Geny *tcdA* i *tcdB* jsou amplifikovány jako tři fragmenty odpovídající právě těmto doménám (A1-3, respektive B1-3) (Rupnik *et al.*, 1997). Další čtyři amplifikované fragmenty (PL1-4) pokrývají zbytek oblasti PaLoc (Rupnik *et al.*, 1998). V praxi se nyní používá modifikace této metody, při níž se místo deseti fragmentů amplifikují pouze dva nejvariabilnější, fragmenty A3 a B1. Fragment A3 odpovídá 3'-konci genu *tcdA*, B1 pokrývá 5'-konec genu *tcdB*. Tyto fragmenty jsou následně štěpeny pomocí enzymů *EcoRI* (A3) a *HincII/AccI* (B1). V současnosti je včetně referenčního toxinotypu 0 známo 25 různých toxinotypů (Obr. 10). K analýze všech deseti fragmentů se přistupuje pouze v případě objevu dosud neznámého restričního profilu fragmentů A3 a B1 (Rupnik *et al.*, 1998).

Mezi změny detekované v oblasti PaLoc patří inserce, delece a bodové mutace. Delece a inserce najdeme častěji v genu *tcdA* než v *tcdB* (Rupnik *et al.*, 1998), což je pravděpodobně zapříčiněno vysoce konzervovaným úsekem repetitivních sekvencí, ve kterém může dojít k nehomologní rekombinaci (Eichel-Streiber *et al.*, 1992). V genu *tcdB* repetitivní sekvence přítomny nejsou, proto k rekombinaci nedochází, bodové mutace jsou zde ale mnohem častější než v genu *tcdA* (Rupnik *et al.*, 1998). Změny charakteristické pro některé toxinotypy jsou i mimo sekvence kódující toxiny, například pro toxinotyp X je typická inserce úseku DNA o velikosti 1,1 kb mezi geny *tcdE* a *tcdA* (Song *et al.*, 1999). Značně variabilní je i sekvence genu *tcdC* (Curry *et al.*, 2007).



Obr. 10: 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: Šedivé oblasti znázorňují rozdíly v délce úseků v porovnání s toxinotypem 0 (delece a inserce). Písmena pod jednotlivými toxinotypy znázorňují místa štěpení enzymy: A (*Accl*), E (*EcoRI*), Ec (*EcoRV*), H (*HindIII*), Hc (*HincII*), N (*NsiI*), Nc (*NcoI*), P (*PstI*), R (*RsaI*), S (*SpeI*). Převzato z Rupnik *et al.* (1998).



Obr. 11: Restrikční profily fragmentů B1 a A3 používaných pro toxinotypizaci. (a) Pro fragment B1 štěpený enzymy *HincII* (H) a *AccI* (A) je známo 7 restrikčních profilů. **(b)** Pro fragment A3 štěpený enzymem *EcoRI* je známo 11 restrikčních profilů. Převzato z <http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>.

Větší mutace mají za následek změny ve vlastnostech jednoho nebo obou toxinů, případně jejich absenci. Toxiny jednotlivých toxinotypů se mohou od referenčního kmene lišit např. ve velikosti, substrátové specifitě, cytopatickém efektu a v reaktivitě s monoklonálními protilátkami. Některé toxinotypy mají hypervirulentní potenciál. Cytopatický efekt závisí na schopnosti toxinu rozpoznat malé GTPázy jako substrát. Mutace, které tuto substrátovou specifitu ovlivňují, byly popsány u toxinotypů VIII (Chaves-Olarte *et al.*, 1999), X (Soehn *et al.*, 1998) a XIV (Mehling *et al.*, 2001). Všechny tři toxinotypy na rozdíl od toxinotypu 0

rozpoznávají jako substrát GTPázy Rap, Ral a R-Ras a toxinotypy VIII a X naopak nemodifikují GTPázu Rho. Lysterly *et al.* (1992) studovali biologický efekt TcdB₈₈₆₄ (toxinotyp X) na myším modelu a zjistili, že letální dávka je u této varianty toxinu více než 8× nižší než u TcdB_{VIP10463}.

Referenční kmen (toxinotyp 0) stejně jako velká část ostatních toxinotypů produkuje toxiny TcdA a TcdB a neprodukuje binární toxin (fenotyp A+B+CDT-). Naproti tomu většina kmenů s výrazně pozměněnou oblastí PaLoc binární toxin produkuje (A+B+CDT+). Mezi kmeny A+B+CDT+ patří i virulentní kmen 027/NAP1/B1 (Stubbs *et al.*, 2000). Kmenům s fenotypem A-B-CDT+ může buď PaLoc zcela chybět (Geric *et al.*, 2003) nebo je zkrácený a nefunkční (toxinotyp XI). Toxinotypy A-B+ jsou v současnosti známy čtyři: VIII, X, XVI a XVII. Existují však i výjimky, například byly popsány dva kmeny odpovídající toxinotypu 0, které produkovaly i binární toxin (Spigaglia & Mastrantonio, 2002; Stare *et al.*, 2007), nebo kmeny toxinotypu 0 (Johnson *et al.*, 2003) a toxinotypu V (Geric *et al.*, 2003), které fenotypově odpovídaly kmenům A-B+.

Nejběžněji se vyskytují toxinotypy III, IV, V, VIII a XII, z nichž toxinotypy VIII a IIIb (známý jako kmeny 027/NAP1/B1) jsou v současnosti celosvětově rozšířené a způsobují nozokomiální epidemie CDAD (Kuijper *et al.*, 2006).

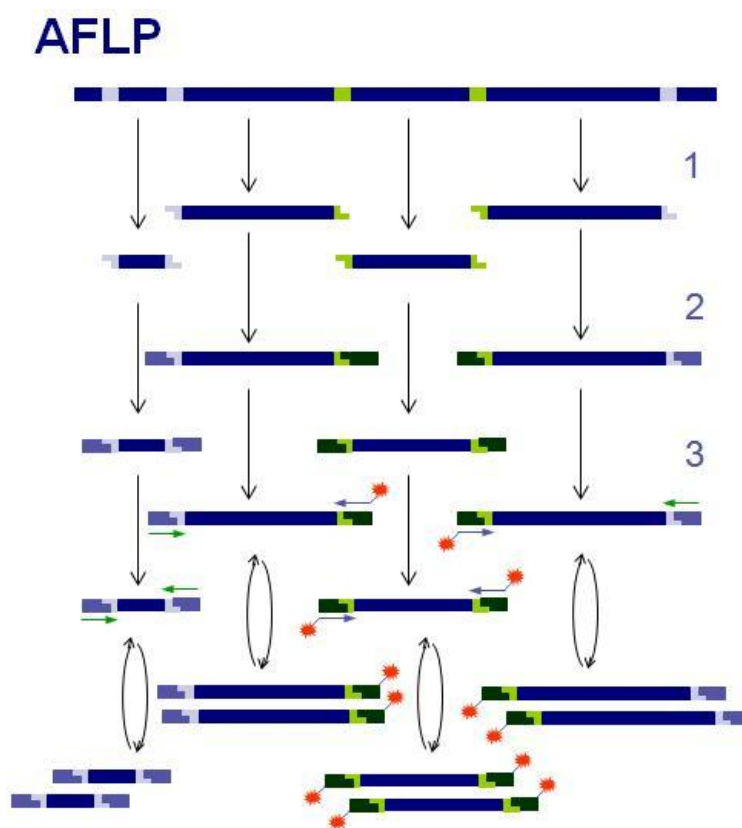
AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Metoda AFLP spočívá v selektivní amplifikaci fragmentů DNA vzniklých štěpením celého bakteriálního genomu (Obr. 12) (Vos *et al.*, 1995). DNA bakterie je štěpena dvěma restričními enzymy, při typizaci *C. difficile* se používají enzymy *EcoRI* a *MseI* (Klaassen *et al.*, 2002). Na konce všech restričních fragmentů jsou ligovány dvouřetězcové adaptéry. Následně je provedena PCR pomocí specifických primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptéru. Selektivita primerů je zajištěna několik nukleotidy lokalizovanými na jejich 3' konci, které musí být komplementární k DNA vláknu, aby PCR reakce proběhla. Amplifikované fragmenty jsou analyzovány pomocí gelové nebo kapilární elektroforézy (Obr. 13) (Vos *et al.*, 1995).

Touto metodou lze současně amplifikovat velký počet DNA fragmentů (50-100) bez předchozí znalosti jejich nukleotidové sekvence (Vos *et al.*, 1995). Velikosti fragmentů se pohybují mezi 50 a 500 bp (Klaassen *et al.*, 2002). Rozdíly ve velikosti fragmentů jsou dány

sekvenčními variacemi v místech, na které nasedají primery, a dále insercemi a delecemi v amplifikovaných fragmentech.

Metoda AFLP má podobnou rozlišovací schopnost jako PCR-ribotypizace (Berg *et al.*, 2004), je rychlá, snadná a velmi flexibilní. Standardizace techniky je nutná pro mezilaboratorní výměnu dat. Nevýhodou metody jsou vysoké finanční náklady spojené s počítačovou analýzou dat (Klaassen *et al.*, 2002).



Obr. 12: Schématické znázornění principu metody AFLP. (1) Štěpení chromozomální DNA (např. enzymy *EcoRI* a *MseI*). (2) Ligace DNA adaptérů. (3) PCR se specifickými primery, většinou fluorescenčně značenými. Převzato z <http://commons.wikimedia.org>.

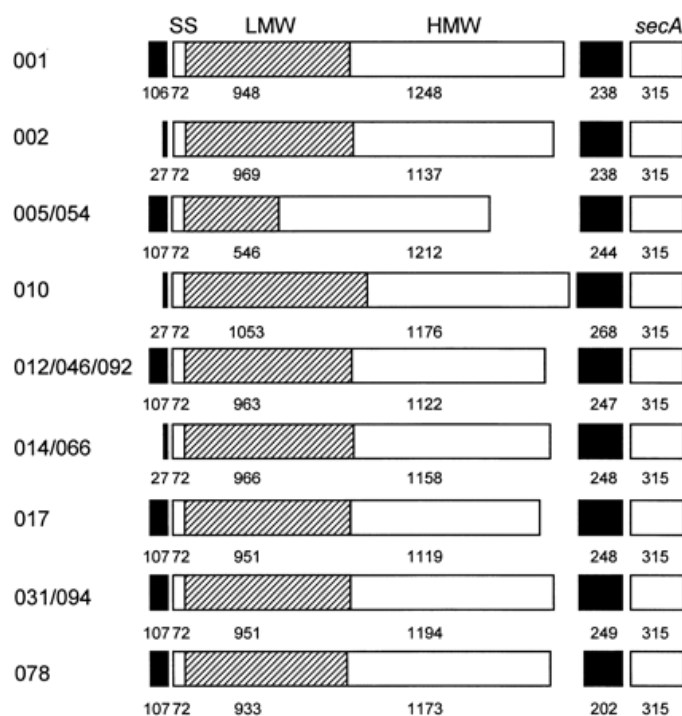
SlpAST (surface layer protein A gene sequence typing)

C. difficile má ve své buněčné stěně kompaktní proteinovou vrstvu, označovanou vrstva S, která obsahuje dva druhy proteinů orientovaných vně buňky. Jsou kódovány genem *slpA* (surface layer protein A) (Obr. 14) a vznikají z jednoho prekurzoru posttranslační úpravou. Protein o vyšší molekulové hmotnosti (42–48 kDa) je vysoce konzervovaný a vzniká z C-koncové domény prekurzoru. Protein vzniklý z N-koncové části prekurzoru (32-38 kDa)

vykazuje značnou sekvenční variabilitu a používá se k molekulární typizaci (Calabi *et al.*, 2001).

Amplifikací variabilní části genu *slpA* vznikne produkt o délce 0,5-1 kb (Karjalainen *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2005). Fragment je sekvenován, je z něj odvozen sled aminokyselin a je zařazen do skupiny. Podtypy lze rozlišit již od rozdílu jednoho nukleotidu (Kato *et al.*, 2005).

SlpAST je metoda dobře využitelná pro epidemiologické studie díky vysoké rozlišovací schopnosti a snadné reprodukovatelnosti dat. Velkou výhodou je možnost typizace přímo z klinických vzorků, bez nutnosti kultivace bakterií (Kato *et al.*, 2009).



Obr. 14: Typizace pomocí metody *SlpAST*. Schéma znázorňuje gen *slpA* a přilehlé sekvenční úseky u různých ribotypů *C. difficile*. Čísla uvedená pod jednotlivými lokusy vyjadřují délku úseku v nukleotidech. Otevřený čtecí rámec genu *slpA* obsahuje signální sekvenci (SS; 72 bp), lokus kódující peptid o nižší molekulové hmotnosti (LMW; 546-1053 bp) a lokus kódující peptid o vyšší molekulové (HMW; 1119-1248 bp). Fragменты všech ribotypů jsou zakončeny 315 bp dlouhým úsekem tvořeným 5' koncem následujícího čtecího rámce. Intergenové úseky jsou znázorněny černou barvou. Převzato z Eidhin *et al.* (2006).

MLST (multilocus sequence typing)

Metoda MLST byla vyvinuta ke studiu genetických vztahů a populační struktury u kmenů *C. difficile* izolovaných z různých hostitelů, geografických lokalit, PCR ribotypů a toxinotypů. MLST charakterizuje jednotlivé kmeny podle sekvence částí několika tzv.

housekeepingových genů. Nejčastěji je sekvenováno sedm intragenových fragmentů dlouhých 400–500 bp (Maiden *et al.*, 1998). Pro typizaci *C. difficile* bylo vybráno sedm lokusů: *aroE* (šikimát dehydrogenáza), *ddl* (D-alanin: D-alanin ligáza), *dutA* (dUTP pyrofosfatáza), *gmk* (guanylát kináza), *recA* rekombináza), *sodA* (superoxid dismutáza) a *tpi* (triózofofosfát izomeráza) (Lemee *et al.*, 2004). Po amplifikaci, purifikaci a sekvenaci fragmentů DNA jsou rozdílným sekvencím daného lokusu (alelám) přiřazena různá čísla a unikátní kombinace všech sedmi alel jsou označeny jako sekvenční typy (ST). Počítačově je porovnávána podobnost jednotlivých ST a je vygenerován fylogenetický dendrogram (Lemee *et al.*, 2004).

Počet alel jednoho lokusu se pohybuje mezi 5 (*dutA*) až 11 (*recA*). Většina polymorfizmů vznikla synonymní substitucí, což naznačuje slabý vliv selekce, a tudíž vhodnost pro studium populační genetiky (Lemee *et al.*, 2004). Získaná data ukazují, že *C. difficile* je druh s vysoce klonální strukturou populace; nové genotypy vznikají během evoluce převážně bodovými mutacemi a rekombinace hraje menší roli. Ve vybraných genech se mutace hromadí velmi pomalu, a proto je rozlišovací schopnost MLST nízká (Zaiß *et al.*, 2009).

Tato metoda je díky konzervovanosti sekvenovaných genů vhodná pro fylogenetickou analýzu a epidemiologické studie v delším časovém měřítku (Lemee *et al.*, 2004). Většina ST má celosvětové rozšíření, nebyla nalezena korelace mezi ST a místem původu, což je pro organizmy s klonální strukturou populace typické. Silná korelace byla pozorována mezi ST a toxinotypy (Lemee *et al.*, 2004). Výhodou metody založené na sekvenaci je jednoznačná interpretovatelnost výsledků a možnost sdílení dat mezi laboratořemi. Nevýhodou MLST metody je její finanční náročnost.

MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis)

MLVA je nová typizační metoda s vysokou rozlišovací schopností, která je založena na analýze tandemových repetitivních sekvencí v sedmi lokusech. V genomu *C. difficile* 630 bylo identifikováno 383 lokusů s repetitivními sekvencemi, z nichž většina nespĺňuje požadavky krátkých vysoce konzervovaných repetitivních úseků s velkým počtem opakování. Pro MLVA nejsou vhodné také lokusy, jejichž amplifikací vznikají nespecifické nebo příliš dlouhé produkty. Bylo nalezeno pouze sedm lokusů, které splňují tyto podmínky a jsou dostatečně variabilní a tudíž vhodné k typizaci *C. difficile*. Počty tandemových repetitivních sekvencí jsou v

těchto vybraných lokusech stabilní a do jedné podskupiny MLVA můžeme zařadit kmeny lišící se maximálně jednou repeticí (Marsh *et al.*, 2006).

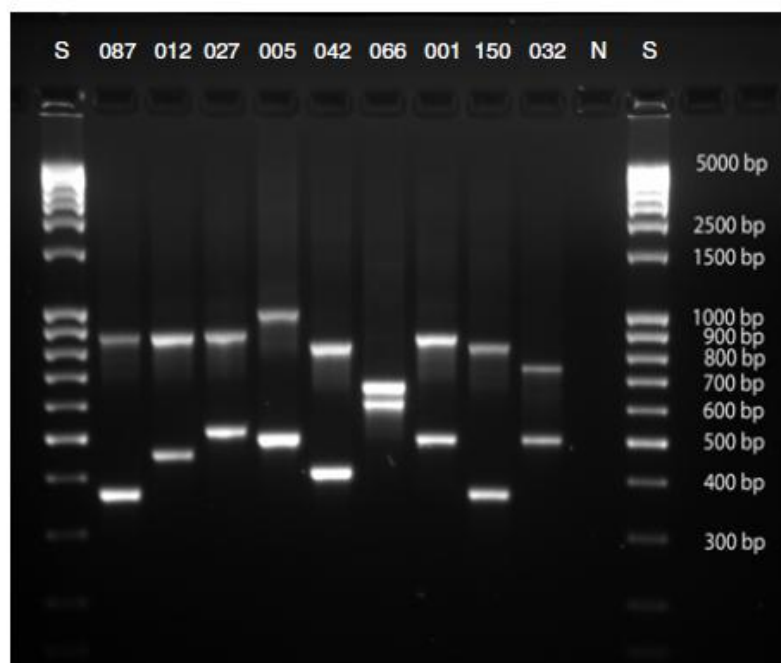
Berg *et al.* (2007) pro zjednodušení metody vybrali kratší tandemové repetice (2-9 bp): A6_{cd}, B7_{cd}, C6_{cd}, E7_{cd}, F3_{cd}, G8_{cd} a H9_{cd}. S použitím fluorescenčně značených primerů je tandemová repetice G8_{cd} amplifikována samostatnou PCR, zbylé repetice třemi duplexními PCR. Vzniklé fragmenty jsou automaticky analyzovány s pomocí kapilární elektroforézy.

MLVA běžně rozezná desítky různých podtypů v rámci jednoho ribotypu. Metoda byla užitá k typování 28 izolátů virulentního kmene 027/NAP1/B1 a rozlišila v nich 13 podtypů (Berg *et al.*, 2007). Berg *et al.* (2007) typovali s pomocí MLVA také kmeny A-B+ patřící do ribotypu 017, 29 kmenů bylo rozděleno do 8 skupin, které odpovídaly místu jejich původu. Metoda má tak vysokou rozlišovací schopnost, že je vhodná ke studiu šíření epidemických kmenů v rámci jedné nemocnice. K určení vzdálenějších fylogenetických příbuzností se používá kombinace MLVA a metody s více konzervovaným genetickým znakem (Zaiß *et al.*, 2009).

TRST (tandem repeat sequence typing)

TRST je metoda založena na polymorfizmech ve vysoce variabilních repetitivních úsecích „TR6“ a „TR10“. Lokus TR6 obsahuje repetice o délce 21 bp a je umístěn v otevřeném čtecím rámci CD0603 v genomu *C. difficile* 630, TR10 se nachází v nekódující oblasti a je složen z repetice dlouhých 22 bp. Obě repetitivní oblasti jsou současně amplifikovány pomocí duplexní PCR (Obr. 15), sekvenovány a testované kmeny jsou následně řazeny do skupin (Zaiß *et al.*, 2009).

Výsledky typizace pomocí TRST se shodují s výsledky PCR ribotypizace (Tab. 1). Metody mají podobnou rozlišovací schopnost, výhodou TRST je snadná přenositelnost dat (Zaiß *et al.*, 2009).



Obr. 15: TRST typizace. Výsledky amplifikace lokusů TR6 a TR10 pomocí duplexní PCR vzorků reprezentujících různé ribotypy (čísla ribotypů v řádku nad gelem). S = DNA standard 100 bp; N = negativní kontrola. Převzato ze Zaiß *et al.* (2009).

Metoda	Počet typovaných kmenů	Počet různých typů	Shoda s ribotypizací (%)
PCR ribotypizace	154	75	-
TRST	154	72	89,8
TR6 sekvenace	154	43	60,4
TR10 sekvenace	154	53	71,6

Tab. 1: Porovnání rozlišovací schopnosti a shody metod TRST a PCR-ribotypizace. Metoda TRST má podobnou rozlišovací schopnost jako PCR-ribotypizace, pokud jsou analyzovány dva lokusy (TR6 a TR10) současně. Metody vykazují také vysokou míru shody při typizaci (89,9 %). Převzato ze Zaiß *et al.* (2009).

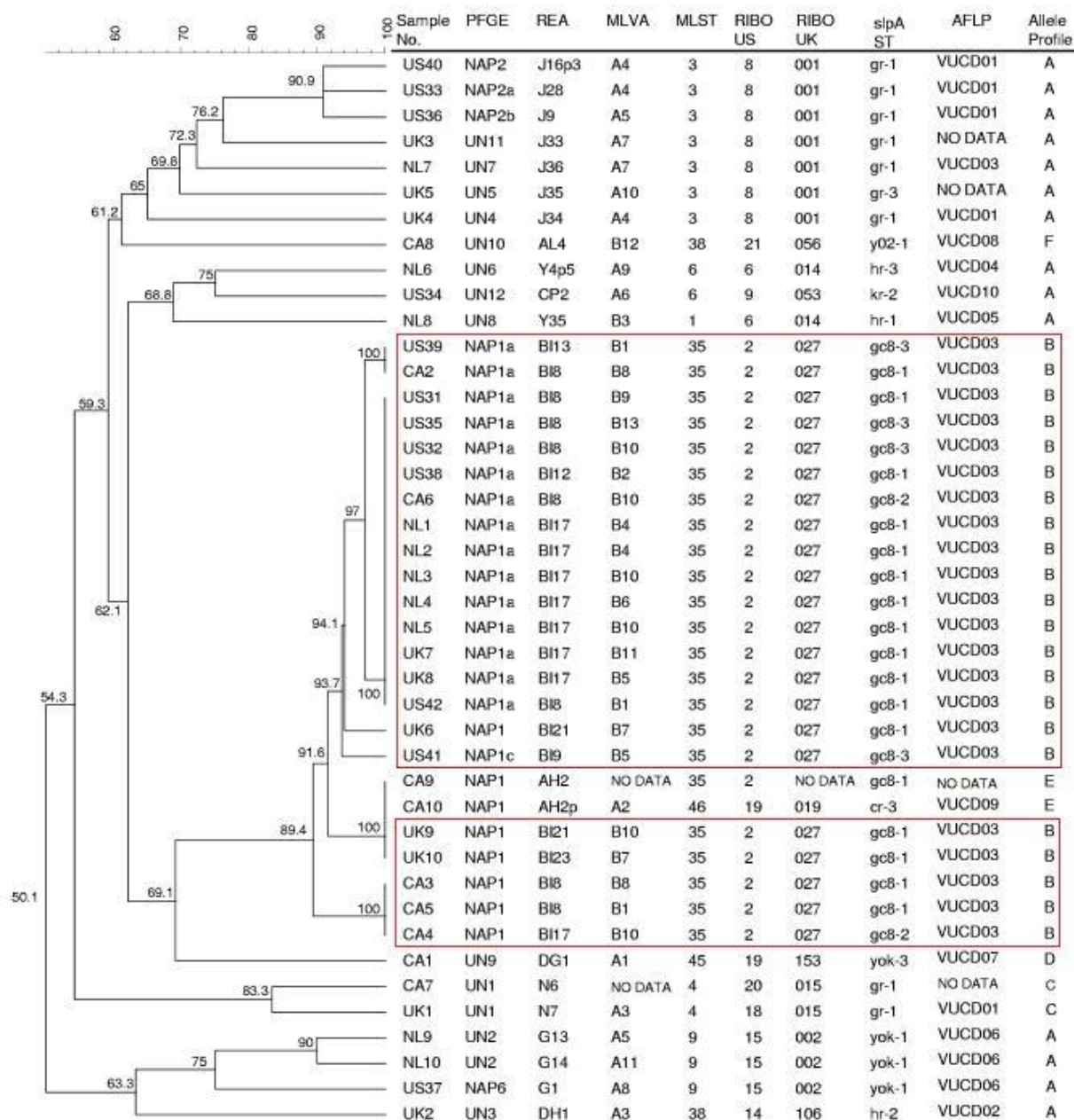
Srovnání metod molekulární typizace

Vhodnost metody pro molekulární typizaci závisí na její reprodukovatelnosti, rozlišovací schopnosti a univerzální použitelnosti, na možnostech mezilaboratorní výměny dat, na stabilitě zkoumaných genetických znaků a na korelaci identifikovaných skupin s rozšířením druhu (van Belkum *et al.*, 2007).

U metod molekulární typizace založených na porovnávání pohyblivosti DNA fragmentů v elektroforetických gelech je obtížná mezilaboratorní výměna dat. Některé techniky, například REA, jsou pracné a vyžadují přímé porovnání zkoumaných a typových vzorků na jednom gelu. Porovnávání dat získaných PFGE je snazší po standardizaci elektroforetických podmínek a s pomocí počítačové analýzy gelu, metoda je ale časově náročná. AFLP a PCR-ribotypizace jsou méně náročné a ve výsledcích vykazují velmi dobrou mezilaboratorní shodu. Velmi rychlou a časově nenáročnou metodou je AP-PCR typizace. Metody založené na porovnávání sekvencí určitých lokusů (MLST, TRST, *slpAST*) generují snadno přenositelná data. Metoda MLST je časově náročnější než TRST a *slpAST*, protože je sekvenováno větší množství lokusů.

Killgore *et al.* (2008) porovnávali sedm základních metod sloužících k typizaci *C. difficile* (REA, PFGE, PCR-ribotypizace, MLST, MLVA, AFLP a *slpAST*) (Obr. 16). Všechny metody byly schopny typizovat 100 % zkoumaných vzorků. Každý kmen v daném experimentálním uspořádání náležel do jednoho z šesti alelových typů (AP – allele profil, AP-A až AP-F), které byly definovány toxinotypem, přítomností či absencí genu kódujícího binární toxin a delecí v genu *tcdC*. Mezi typizačními metodami byla pozorována vysoká shoda, kmeny patřící do stejných AP byly zkoumanými metodami zařazeny do shodných skupin, výjimku tvořily pouze izoláty skupiny AP-A (toxinotyp 0, bez binárního toxinu a delece v *tcdC*). S ribotypizací velmi dobře korelují i metody toxinotypizace (Rupnik *et al.*, 2001) a TRST (Zaiß *et al.*, 2009).

Dle Killgore *et al.* (2008) vykazovaly metody MLVA, REA, *slpAST* a PFGE vyšší rozlišovací schopnosti a zařadily jednotlivé izoláty do podtypů, které ale nebyly mezi jednotlivými metodami vždy shodné (Tab. 3). Metody PCR-ribotypizace, MLST a AFLP měly rozlišovací schopnost nižší a rozlišily pouze základní typy (Tab. 3). Izoláty vysoce virulentního kmene 027/NAP1/B1, který v současné době způsobuje závažná onemocnění epidemického charakteru, byly definovány jako AP-B. Všechny metody zařadily AP-B izoláty do jedné skupiny, v některých případech rozdělené do dílčích podtypů. Pouze metody REA a MLVA od sebe rozlišily izoláty AP-B pocházející z Evropy a ze Severní Ameriky (Killgore *et al.*, 2008).



Obr. 16: Dendrogram generovaný na základě PFGE s přiřazenými výsledky ostatních typizačních metod - REA, MLVA, MLST, ribotypizace US (realizovaná ve Spojených státech), ribotypizace UK (realizovaná ve Velké Británii), *slpAST* a AFLP. Jednotlivé metody se velmi dobře shodují v rozdělování izolátů *C. difficile* do skupin. Červené obdelníky označují izoláty vysoce virulentního kmene 027/NAP1/B1. Všechny metody zařadily tyto izoláty do jedné skupiny. Převzato z Killgore *et al.* (2008).

Závěr

Problematika infekcí způsobených *C. difficile* je v poslední době velmi aktuální. Vzrůstající výskyt a závažnost CDAD, šíření vysoce virulentního kmene 027/NAP1/B1 a stoupající rezistence patogenních kmenů k běžně podávaným antibiotikům svědčí o nezbytnosti monitorovat výskyt infekcí způsobených *C. difficile* a typizovat patogenní kmeny. Pod záštitou Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční lékařství (ESCMID) byla vytvořena samostatná výzkumná skupina zvaná ESGCD (ESCMID Study Group on *Clostridium difficile*), která se snaží koordinovat činnost výzkumných a klinických laboratoří z celé Evropy. V České republice jsou údaje o výskytu CDAD značně omezené, proto naše pracovní skupina navázala roku 2007 spolupráci s výše zmíněnou organizací, sleduje výskyt CDAD v několika pražských nemocnicích, izolované kmeny typizuje pomocí molekulárních metod a stanovuje jejich citlivost k antibiotikům.

Existuje široká škála metod sloužících k typizaci *C. difficile*. Zpočátku byly typizační techniky založeny na fenotypových charakteristikách kmenů, postupně byly nahrazeny metodami sledujícími genotypové rozdíly. Výhodou molekulárních metod je větší stabilita genotypových znaků a vyšší rozlišovací schopnost. Pro časnou a rychlou detekci patogenních kmenů jsou používány metody jako REA, AP-PCR a PCR-ribotypizace a toxinotypizace. Pro epidemiologické studie dlouhodobějšího charakteru jsou vhodné metody MLST, AFLP, TRST a *slpAST*. Při vzniku závažných nozokomiálních epidemií a sledování šíření vysoce virulentních kmenů se uplatňuje metoda MLVA, charakteristická svojí vysokou rozlišovací schopností. Standardní metodou používanou především v Evropě zůstává PCR-ribotypizace. Ve Velké Británii byla založena knihovna ribotypů, se kterou je většina kmenů analyzovaných v evropských laboratořích porovnávána. V Severní Americe je hlavní metodou PFGE.

I přes obrovský rozvoj v oblasti molekulární typizace *C. difficile*, doposud neexistuje univerzální schéma, které by umožnilo rychlé srovnání a výměnu dat mezi klinickými laboratořemi. Nezbytné je rovněž zavedení citlivější a přesnější metody laboratorní diagnostiky *C. difficile*.

Seznam použité 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.
- 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.
- Aslam, S., Hamill, R.J., Musher, D.M.** (2005): Treatment of CDAD: old therapies and new strategies. Lancet Infect Dis. 5: 549-57.
- Babcock, G.J., Broering, T.J., Hernandez, H.J., Mandell, R.B., Donahue, K., Boatright, N., Stack, A.M., Lowy, I., Graziano, R., Molrine, D., Ambrosino, D.M., Thomas W.D.Jr.** (2006): Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. Infect Immun. 74: 6339-47.
- Barbut, F., Kajzer, C., Planas, N., Petit, J.C.** (1993): Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol. 31: 963-7.
- 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.
- Bartlett, J.G.** (2002): Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 31, 346 (5): 334-9.
- Berg, R.J. van den, 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 (3): 1024-8.
- Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmée, M., Rossier, A., Barbut, F., Petit, J.C.** (2000): Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 38: 2484-7.
- Borgmann, S., Kist, M., Jakobiak, T., Reil, M., Scholz, E., von Eichel-Streiber, C., Gruber, H., Brazier, J.S., Schulte, B.** (2008): Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. Euro Surveill. 13(49). pii: 19057.
- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., von Eichel-Streiber, C.** (1996): Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. Gene. 181 (1-2): 29-38.
- 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.
- 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.
- Carrico, J.A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F.R., de Lencastre, H., Almeida, J.S., Ramirez, M.** (2006): Illustration of a common framework for relating multiple typing

methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol. 44 (7): 2524-2532.

Clabots, C.R., Johnson, S., Bettin, K.M., Mathie, P.A., Mulligan, M.E., Schaberg, D.R., Peterson, L. R., Gerding, D.N. (1993): Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. J. Clin. Microbiol. 31: 1870-5.

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.

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

Delmee, M., Van Broeck, J., Simon, A., Janssens, M., Avesani, V. (2005): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a plea for culture. J Med Microbiol. 54(Pt 2): 187-91.

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., Harnedy, N., Fanning, S., Hannan, M., Kyne, L. (2007): Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. 28: 932-40.

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.

Fawley, W.N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S.D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R.C. Jr., Wilcox, M.H. (2007): Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 28: 920-25.

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.

Gerding, D.N. (1989): Disease associated with *Clostridium difficile* infection. Ann Intern Med. 110: 255-7.

Geric, B., Johnson, S., Gerding, D.N., Grabnar, M., Rupnik, M. (2003): Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. J Clin Microbiol. 41: 5227-32.

Goorhuis, A., Debast, B.S., van Leengoed, L.A.M.G., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A., Kuijper, E.J. (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin. Infect. Dis. 47: 1162–1170.

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.

Hunter, P.R., Gaston, M. A. (1988): Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26: 2465-6.

Chaves-Olarte, E., Low, P., Freer, E., Norlin, T., Weidmann, M., Eichel- Streiber, C. , Thelestam, M. (1999): A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. J Biol Chem. 274: 11046-52.

- Chernakl, E., Johnson, C.C., Weltman, A.** (2005): Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk - four states. *MMWR*. 54: 1201-5.
- Johnson, S., Gerding, D.N., Olson, M.M., Weiler, M.D., Hughes, R.A., Clabots, C.R., Peterson, L.R.** (1990): Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *Am. J. Med.* 88, 137-40.
- Johnson, S., Adelman, A., Clabots, C.R., Peterson, L.R., Gerding, D.N.** (1989): Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. *J. Infect. Dis.* 159: 340-3.
- Johnson, S., Samore, M.H., Farrow, K.A., Killgore, G.E., Tenover, F.C., Lyras, D., Rood, J.I., DeGirolami, P., Baltch, A.L., Rafferty, M.E., Pear, S.M., Gerding, D.N.** (1999): Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N. Engl. J. Med.* 341: 1645-51.
- Johnson, S., Sambol, S.P., Brazier, J.S., Delmee, M., Avesani, V., Merrigan, M.M., Gerding, D.N.** (2003): International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Clin Microbiol.* 41: 1543-7.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K.** (1995): 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.** (1995): The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 270 (23): 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: E070111.3.
- Kato, H., Kato, H., Nakamura, M., Iwashima, Y., Nakamura, A., Ueda, R.** (2009): Rapid analysis of *Clostridium difficile* strains recovered from hospitalized patients by using the *slpA* sequence typing system. *J Infect Chemother.* 15: 199-202.
- Kato, H., Yokoyama, T., Arakawa, Y.** (2005): Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J Med Microbiol.* 54: 167-71.
- Kato, N., Ou, C.Y., Kato, H., Bartley, S.L., Luo, C.C., Killgore, G.E., Ueno, K.** (1993): Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 167: 455-8.
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E.H., Savelkoul, P., Nicholson, B., van den Berg, R.J., Kato, H., Sambol, S.P., Zukowski, W., Woods, C., Limbago, B., Gerding, D.N., McDonald, L.C.** (2008): Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandemrepeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.* 46(2): 431-7.
- 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.

- Kuijper, E. J., Coignard, B., Tull, P.** (2006): Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 (Suppl. 6): 2-18.
- Kuijper, E. J., et al.** (2008): Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill.* 13 (7-9): 18942.
- Kuijper, E.J., de Weerd, J., Kato, H., Kato, N., van Dam, A.P., van der Vorm, E.R., Weel, J., van Rhee, C., Dankert, J.** (2001): Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (8): 528-34.
- Kuijper, E.J., Oudbier, J.H., Stuifbergen, W.N.H.M., Jansz, A., Zanen, H.C.** (1987): Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *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., Haec, 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., Price, A.B., Honour, P., Borriello, S.P.** (1978): *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet.* 1 (8073): 1063-6.
- 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.
- 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: 4633-4639.
- Lyerly, D.M., Krivan, H.C., Wilkins, T.D.** (1988): *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev.* 1 (1): 1-18.
- 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.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B.G.** (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3140-5.
- Mani, N., Dupuy, B.** (2001): Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 98 (10): 5844-9.
- 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 (7): 2558-66.
- Maslow, J.N., Slutsky, A.M., Arbeit, R.D.** (1993): Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J Clin Microbiol.* 563-572.
- Matamouros, S., England, P., Dupuy, B.** (2007): *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol. Microbiol.* 64 (5): 1274-88.

- McFarland, L.V.** (2008): Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 5 (1): 40-8.
- McFarland, L.V., Mulligan, M.E., Kwok, R.Y., Stamm, W.E.** (1989): Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med.* 26, 320 (4): 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.
- Mehlig, M., Moos, M., Braun, V., Kalt, B., Mahony, D.E., Eichel-Streiber, C.** (2001): Variant toxin B and a functional toxin A produced by *Clostridium difficile* C34. *FEMS Microbiol Lett.* 198: 171-6.
- Monaghan, T., Boswell, T., Mahida, Y.R.** (2008): Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. 57: 850-860.
- 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.
- Pepin, 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.
- Pépin, J., Valiquette, L., Cossette, B.** (2005): Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ.* 173 (9): 1037-42.
- 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.
- Rampling, A., Everett, W.G., Sills, O.A.** (1980): *Clostridium difficile* and chronic inflammatory bowel disease. *Lancet.* 29, 1 (8170): 714-5.
- Rodemann, J.F., Dubberke, E.R., Reske, K.A., Seo, da H., Stone, C.D.** (2007): Incidence of *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (3): 339-44.
- 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.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., Gerding, D.N.** (2009): *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology.* 7: 526-536.
- Sadeghifard, N., Gürtler, V., Beer, M., Seviour, R.J.** (2006): The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl Environ Microbiol.* 72 (11):7311-23.

- Sebahia, M., Wren, B., Mullany, P., Fairweather, N., Minton, N.** (2006): The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet.* 38 (7): 779-86.
- Smith, C.L., Klco, S.R., Cantor, C.R.** (1988): Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In K.E. Davies (ed.), *Genome analysis: a practical approach*. IRL Press: 41-72.
- 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.
- Song, K.P., Ow, S.E., Chang, S.Y., Bai, X.L.** (1999): Sequence analysis of a new open reading frame located in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864. *FEMS Microbiol Lett.* 180: 241-248.
- Songer, J.G., Anderson, M.A.** (2006): *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe.* 12 (1): 1-4.
- Spigaglia, P., Mastrantonio, P.** (2002): Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 40: 3470-5.
- Stare, B.G., Delmee, M., Rupnik, M.** (2007): Variant forms of the binary toxin CDT locus 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 (3): 895-9.
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M.** (2000): Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 307-312.
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M.** (2000): Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett.* 186: 307-12.
- 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: 613-19.
- Tang, Y.J., Houston, S.T., Gumerlock, P.H., Mulligan, M.E., Gerding, D.N., Johnson, S., Fekety, F.R., Silva, J.** (1995): Comparison of arbitrarily primed PCR with restriction endonuclease and immunoblot analyses for typing *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3169-73.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M.** (2007): Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 13(Suppl 3): 1-46.
- van der Berg, R.J., Claas, E.C., Oyib, D.H., Klaassen, C.H., Dijkshoorn, L., Brazier, J.S., Kuijper, E.J.** (2004): Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *J Clin Microbiol.* 42(3): 1035-41.
- 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.
- von Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M., Thelestam, M. (1996): Large clostridial cytotoxins-a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol.* 4: 375-82.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M.** (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-14.
- 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 (9491): 1079-84.
- Williams, G.K. J., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-4.
- Wilson, K.H., Sheagren, J.N.** (1983): Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis.* 147: 733-6.
- 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 (6): 1096-101.
- Yassin, S.F.** (2009): Pseudomembranous Colitis, Surgical Treatment. <http://www.emedicine.com>.
- 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 (6): 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: 302-307.