

GENOTYPING OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* FROM PATIENTS WITH SUSPECT INFECTION CDAD (*CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ASSOCIATED DISEASE)

Ďudáková E.¹, Gálová Z.¹, Melter O.²

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

²Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic

E-mail: lubica.dudakova@centrum.sk

ABSTRACT

Clostridium difficile is a gram-positive anaerobic, spore-forming rod. During its vegetative growth it produces toxins, which can cause infection commonly manifested as mild-to-moderate diarrhoea. These diseases often start as nosocomial infections connected with antibiotic therapy, which is the key factor that alters the colonic flora and supports colonisation by *Clostridium difficile*. The phenomenon of nosocomial infections by *Clostridium difficile* has been described in horses, as well in humans. Firstly, the toxin production in faecal samples was tested by EIA method. Further, the DNA was isolated using CHELEX by Rupnik (<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>) and then the presence of *ctdB* gene was monitored to confirm the production of binary toxin. Subsequently, the typization of toxins based on RFLP method (*restriction* fragment length polymorphisms) was used. The Rupnik's protocol (<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>) was used for evaluation of polymorphism of the restriction fragments as well. Then, the ribotypes of analysed strains were set by comparison of the obtained profiles and collection strains, and by the Bidet's ribotypisation method (Bidet, 1999)

Thirty-five samples of DNA were tested for the presence of binary toxin. Binary toxin was detected in 9 strains (25.7%), remaining 26 (74.3%) of the samples showed negative result in this testing. From the 35 tested samples 3 strains (8.6%) belonged to the toxinotype I, 4 strains (11.4%) to the toxinotype II, 11 strains (31.4%) to the toxinotype VIII, 5 strains (14.3%) to the toxinotype X, and 4 strains (11.4%) to the toxinotype XI. Only in 1 strain (2.9%) the toxinotype XIV was detected and 1 strain (2.9%) showed the presence of the toxinotype XII. The presence of the toxinotype III was not confirmed. This method was not successful in typisation of 6 strains (17.1%). By ribotypisation the occurrence of ribotypes was confirmed as follows: 033 – 1 strain (2.9%), 036 – 5 strains (14.3%), 047 – 11 strains (31.4%), 070 – 1 strain (2.9%), 102 – 3 strains (8.6%), 103 – 4 strains (11.4%) and 111 – 1 strain (2.9%). Hypervirulent ribotypes 027 and 078 were not detected.

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

ÚVOD

Bakteriálny kmeň *Clostridium difficile* bol po prvýkrát izolovaný Hallom a O'Toolom v roku 1935 zo stolice 40 % vyšetovaných novorodencov a o 2 roky neskôr bol nájdený Snyderom v stolici 15 % detí do jedného roku veku. Vtedy bolo pokladané za nepatogénnu zložku bežnej črevnej mikroflóry a bolo pomenované ako *Bacillus difficilis*. Počas ďalších 40 rokov sa nepravidelne vyskytovali správy o jeho izoláciách a o tom, že táto baktéria môže spôsobovať ochorenia tráviacej sústavy. Od roku 1970 však začína pribúdať správ o prípadoch pseudomembranóznych kolitíd vzniknutých v súvislosti s antibiotickou terapiou. V roku 1971 dokázali Georges a Symonds, že v stolici osôb, u ktorých sa po aplikácii antibiotík vyvinula pseudomembranózna enterokolitída, je prítomný toxín neutralizovateľný sérom proti *Clostridium sordellii*. V roku 1978 Bartlett a i. a George a i. izolovali pri tomto ochorení *C. difficile* a zistili, že produkuje toxín neutralizovateľný sérom proti toxínu *C. sordellii*. V ďalšom roku tento toxín uvedení autori purifikovali a stanovili jeho základné vlastnosti (Závadová, 1986).

Od tejto doby sa poznatky o *Clostridium difficile* značne rozšírili, o čom svedčí v súčasnosti jeho dobrá diagnostikácia (Voth, Ballard, 2005). *C. difficile* patrí medzi stredne striktné anaeróbné klostrídiá. Vďaka modernej kultivačnej technike a používaniu selektívnych kultivačných médií na jeho izoláciu zo stolice, v ktorých je cefoxitín a cykloserín inhibítorom sprievodnej flóry, sa kultivuje s menšími problémami v porovnaní s minulosťou. Kolónie sú okrúhle, pretože tyčinky sú málo pohyblivé, priemer kolónií je až 5 mm. Je vysoko citlivý na vankomycín, ale na rozdiel od ostatných klostridií je rezistentný na cefoxitín a väčšina kmeňov tiež na klindamycín (Bednář, 1996).

Hlavnými nežiaducimi faktormi pôsobenia *C. difficile* v organizme sú toxíny a to konkrétne toxín A, toxín B, binárny toxín a tzv. „motility-altering factor“ stimulujúci sťahy hladkej svaloviny čreva, ktoré poškodzujú sliznicu čreva. Uvedené toxíny spôsobujú vyplavenie prozápalových slizničných cytokínov, ktoré v sliznici hrubého čreva vedú k vzniku ložísk s intenzívnou exsudáciou. Tieto ložiská sa striedajú s ostrovčekmi intaktnej sliznice. Makroskopicky vyzerajú ložiská postihnutej sliznice ako šedo žlté pseudomembrány, čo je dané prítomnosťou plakov zložených zo zápalových buniek a bunkového detritu z poškodených krypt (Joyce, 2003).

Toxíny A a B sú produkované počas vegetatívneho rastu. Ich tvorba nie je na rozdiel od botulotoxínov a tetanotoxínu spojená so sporuláciou buniek. Iba jedna bunka *Clostridium difficile* zo sto produkuje oba druhy toxínov (Sylyers, 1994). Bunky črevnej sliznice sú zničené len vtedy, ak sú prítomné zároveň obidva druhy toxínov. Toxín A zničí povrchové štruktúry buniek črevnej sliznice a zároveň potlačí prípadný preventívny účinok PMN (polymorfonukleárne bunky), čím umožní molekulám toxínu B úspešne zaútočiť na bunky črevného epitelu. Toxín B zabíja bunky črevného epitelu len vtedy, ak sú porušené jej povrchové štruktúry a bunky sú postihnuté disfunkciou transportu vody. Na črevnej sliznici vznikajú rozsiahle ulcerácie - nekrotické útvary, pseudomembrány – konglomeráty zničených buniek črevného epitelu, uhynutých PMN, fibrínu a mucínu v tvare laločnate zdurených, žltó zafarbených krúst, ktoré je možné pomerne ľahko endoskopicky detekovať (Voth, Ballard, 2005).

Gény toxínov A (*tcdA*) a B (*tcdB*) sú časťou tzv. lokusu patogenity (*pathogenity locus* -

PaLoc), ktorý je veľký 19,6 kb. Pri netoxinogénnych kmeňoch je PaLoc nahradený úsekom dlhým 115 báz (Rupnik, 1998). Okrem *tcdA* a *tcdB* sa na PaLoc nachádzajú tri doplnujúce otvorené čítacie rámce (ORF – *open reading frames*) a to *tcdD*, *tcdE* a *tcdC*, a ORF pre inzerčné sekvencie (*cdu-2*, *cdu-2'*, *cdd-2*, *cdd-3* a *cdd-4*). Sekvenčné a transkripčné analýzy dokázali, že TcdD (produkt génu *tcdD*) a TcdC (produkt génu *tcdC*) plnia úlohu pozitívnych a negatívnych regulátorov expície *tcdA* a *tcdB* (Spigaglia, Mastrantonio, 2002).

Gény *tcdB* a *tcdA* majú podobnú veľkosť (7 a 8 kb) a obidva obsahujú repetitívne sekvencie na 3 konci (Rupnik et al, 1998). Eichel-Streiber et al. (1992) dokázali vysoký stupeň homológie medzi týmito dvomi génmi. Obidva štrukturálne gény majú tri domény korešpondujúce s tromi funkčnými doménami toxínov. C-terminálna opakujúca sa oblasť slúži ako receptor pre väzobné oblasti, centrálna časť je potrebná pre translokáciu a N-terminálna doména má katalytickú funkciu (Eichel-Streiber et al., 1996).

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

Binárny toxín produkuje len asi 8 % kmeňov. Väčšina kmeňov má gény pre toxíny veľmi podobné referenčnému kmeňu VPI 10463 a binárny toxín neprodukujú. Toxinotyp VIII, zahŕňajúci izoláty A-B+, je jediným kmeňom spomedzi variantných kmeňov, ktorý neprodukuje binárny toxín. Binárny toxín môže byť produkovaný kmeňmi, ktoré nemajú gény *tcdA* a *tcdB* (toxinotyp XI), preto je detekcia binárneho toxínu v niektorých prípadoch netoxinogénnych kmeňov u symptomatických pacientov vysvetlením virulencie týchto kmeňov.

Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt hypervirulentných kmeňov *Clostridium difficile* v nemocničnom prostredí ČR pomocou moderných metód molekulárnej biológie, pričom sa aplikovali tri metódy a to toxinotypizácia, detekcia binárneho toxínu a ribotypizácia.

MATERIÁL A METODIKA

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

Pri genotypizácii *C. difficile* sme z narastenej kultúry izolovali DNA použitím CHELEX-u podľa Rupnik (<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>). Následne sme detekovali prítomnosť génu *ctdB*, ktorým sme potvrdzovali produkciu binárneho toxínu. Používali sme Taq-Purple DNA

polymerázu PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o.“. Pre amplifikáciu úseku sme používali primery s označením cdtBpos a cdtBrev. Nukleotidová sekvencia primeru cdtBpos je 5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-3' a sekvencia primeru cdtBrev je 5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGTC -3'. Používali sme nasledovný program pre PCR: počiatočná denaturácia – 94 °C, 3 min, následne 35 cyklov programom 94 °C počas 15 s, 55 °C počas 30 s, 72 °C počas 60 s a záverečný proces pri 72 °C počas 7 min. Hľadaný fragment mal dĺžku 510 bp.

Na určenie toxintypu sme využívali toxintypizáciu založenú na metóde RFLP podľa Rupnik et al (1997). Na odlišovanie kmeňov sme použili rozdiely v lokalizácii reštrikčných miest na amplikóne. Jednotlivé štiepené vzory boli zaradené do toxintypov.

Na prípravu PCR produktov sme používali Taq-Purple DNA polymerázu PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o.“. Pre amplifikáciu úseku A3 sme používali primery s označením A3C a A4N. Nukleotidová sekvencia primeru A3C je 5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG-3' a primeru A4N 5'-TTATCAAACATATATTTAGCCATATATC-3'. Pre amplifikáciu úseku B1 sme používali primery s označením B1C a B2N. Poradie nukleotidov primeru B1C je 5'-AGAAAATTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3' a sekvencia primeru B2N je 5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'. Používali sme nasledovný program pre PCR: počiatočná denaturácia – 94 °C, 4 min, následne 35 cyklov programom 94 °C počas 45 s, 55 °C počas 45 s, 72 °C počas 3 s a záverečný proces pri 72 °C počas 5 min. Po vizualizácii v agarózovom géli a overení, že vzniká len jeden fragment, sme následne amplikóny štiepili použitím enzýmov *EcoRI* (fragment A3), *AccI* a *HincII* (fragment B1).

Tab.1. Typy RFLP vzorov B1-PCR a A3-PCR fragmentov a zodpovedajúci toxintyp a ribotyp

Toxintyp	Typ štiepenia B1	Typ štiepenia A3	Produkcia toxínov	Ribotyp
0	1	1	A+B+CDT-	001, 002, 004...
I	1	4	A+B+CDT-	003, 012, 102
II	1	3	A+B+CDT-	103
III	4	2	A+B+CDT+	027, 034, 075, 080
IV	2	2	A+B+CDT+	023, 058, 059, 063
V	3	8	A+B+CDT+	066, 078
V-like	3	8	A-B+CDT+	
VI	3	5	A+B+CDT+	045, 063, 066
VII	3	6	A+B+CDT+	063
VIII	5	7	A-B+CDT-	017, 047
IX	5	2	A+B+CDT+	019
X	5	NEG	A-B+CDT+	036
XIa	NEG	5	A-B-CDT+	033
XIb	NEG	8	A-B-CDT+	033
XII	6	1	A+B+CDT-	056
XIII	1	9	A+B+CDT-	070
XIV	7	2	A+B+CDT+	111
XV	7	2	A+B+CDT+	122

Na ribotypizáciu kmeňov sme využívali protokol Bidet (1999). Na prípravu PCR produktov sme používali Taq-Purple DNA polymerázu PCR Master Mix (2x) od „Top-Bio s.r.o.“

Pre amplifikáciu úseku sme používali primery s označením bidet-16S a bidet-23S. Nukleotidová sekvencia primeru bidet-16S je 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCT-3' a primeru bidet-23S je 5'-CCCTGCACCTTAATAACTTGACC -3'. Používali sme nasledovný program pre PCR: počiatková denaturácia – 94 °C, 5 min, následne 35 cyklov programom 94 °C počas 60 s, 60 °C počas 30 s, 72 °C počas 60 s a záverečný proces pri 72 °C počas 10 min. Vzniknuté elektroforetické profily sme na základe porovnania so zbierkovými kmeňmi zaraďovali do ribotypov. Na základe prítomnosti prúžkov sme následne vyhodnocovali príbuznosť kmeňov a zostrojili sme dendrogram.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ochorenia vyvolané kmeňom *Clostridium difficile* sa stali vysoko aktuálne nielen v humánnej, ale aj vo veterinárnej medicíne. Už dlho sú v Nemecku a v Spojených štátoch amerických známe enterokolitídy žriebät a mladých koní sporadicky sa vyskytujúce u jedincov s anamnézou terapeutickú aplikáciu určitých antibiotík. Okrem toho bol u koní, podobne ako u človeka, popísaný fenomén nozokomiálnych nákaz *C. difficile*. Z veterinárneho hľadiska sú však najzávažnejšie epizócie (epidémie zvierat) novonarodených prasiatok popisované v poslednom období v chovoch prasiat v USA, na rozdiel od situácie v Európe, kde sa doposiaľ v etiológii uplatňovali predovšetkým patogénne izoláty *E. coli* a *Clostridium perfringens* typu A. V posledných piatich rokoch však veľa amerických autorov považuje toxínogénne izoláty *C. difficile* za hlavnú príčinu nezvládnuteľných neonatálnych hnačiek prasiatok vo veľkokapacitných farmách s niekoľkými tisíckami prasníc – matiek (Geric, B. et al., 2004).

Možnému prenosu tohto patogénu zo zvierat na človeka sa venovala malá pozornosť. O'Neill et al. (1993) nedokázali pomocou reštrikčných analýz príbuznosť medzi kmeňmi získanými od zvierat a izolátmi pochádzajúcimi od ľudí, avšak podotýkajú, že môže stále existovať riziko prenosu infekcie *C. difficile* z domestikovaných zvierat na ľudí.

Z kmeňov vyskytujúcich sa u ľudí, sú najnebezpečnejšie ribotypy 027 a 078, ktorých výskyt v nemocničných zariadeniach je vo svete podrobne monitorovaný. Pre nemocničné zariadenia ako aj veľkokapacitné chovy zvierat je tiež potrebné detekovať ich výskyt a sledovať prípadný epidemiologický výskyt daného patogénu. Ako vhodné metódy na detekciu *C. difficile* sa využívajú toxinotypizácia, ribotypizácia a pulzná elektroforéza.

V humánnej ako aj veterinárnej medicíne je veľmi dôležitá rýchla a správna diagnostika ochorenia. Vychádzajúc z uvedeného konštatovania, sme na detekciu hypervirulentných kmeňov v našich pokusoch navrhli čo možno najkratší algoritmus detekcie. Prvým krokom je detekcia binárneho toxínu. Keďže ho produkuje len 8 % kmeňov (okrem iných aj sledované ribotypy 027 a 078), je dobrým selekčným znakom. V prípade pozitívneho výsledku, je druhým krokom ribotypizácia a porovnanie elektroforetického profilu so zbierkovými kmeňmi 027 a 078. V prípade nepreukazných výsledkov, ako aj pre epidemiologické štúdie je možné ďalej aplikovať toxinotypizáciu, ktorá je najobtiažnejšou a časovo najviac náročnou metódou, preto je menej vhodná na rutinnú diagnostiku.

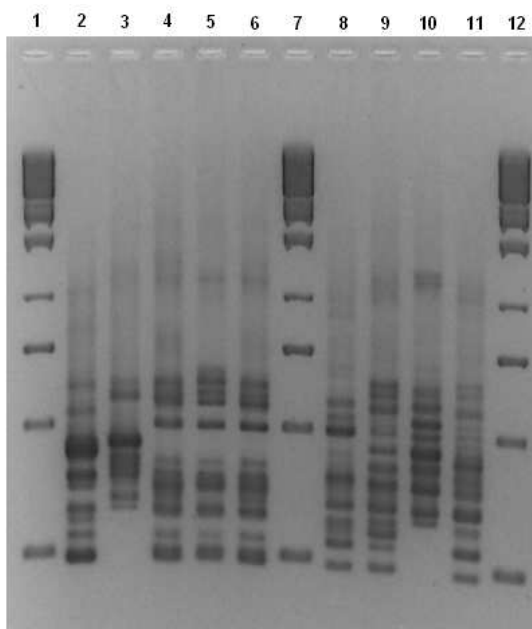
Na detekciu prítomnosti génov pre binárny toxín sme testovali 35 vzoriek DNA. Binárny toxín bol detekovaný pri 9 kmeňoch (25,7 %) a zvyšných 26 (74,3 %) vzoriek malo negatívny výsledok

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

Pre ďalšie detekovanie kmeňa metódou toxinotypizácie bolo zaradených 35 vzoriek DNA. Do toxinotypu I boli zaradené tri kmene (8,6 %), do toxinotypu II 4 kmene (11,4 %) a do toxinotypu VIII 11 kmeňov (31,4 %). Päť kmeňov (14,3 %) bolo detegovaných ako toxinotyp X a 4 toxinotyp XI (11,4 %). Len po 1 kmeni (2,9 %) sme zaradili do toxinotypov XIV a XIII a nebol detegovaný výskyt toxinotypu III, kam zaraďujeme ribotyp 027. Z našich výsledkov vyplýva, že aplikovanou metódou sme zistili výskyt 7 rôznych toxinotypov.

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

Obr.1. Ribotypizácia



Legenda:

- 1, 7, 12 – marker, 1 kb,
- 2 – ribotyp 047,
- 3 – ribotyp 036,
- 4 – ribotyp 070,
- 5 – ribotyp 102,
- 6 – ribotyp 103,
- 8 – ribotyp 033,
- 9 – ribotyp 111,
- 10 – ribotyp 078,
- 11 – ribotyp 027

Ribotypizácia je metóda založená na analýze polymorfizmu v oblasti rRNA operónu. Existuje vysoká variabilita medzi baktériami v pozícii a intenzite rRNA prúžkov, čo sa využíva na ich

klasifikáciu a identifikáciu. Ribotypizácia je teda zvlášť vhodná na účely molekulárnej epidemiológie (Sack et al, 2004). Gurtler (1993) popísal modifikácie v konvenčnej ribotypizácii, ktoré spočívajú vo využití PCR na amplifikáciu oblasti medzi génmi pre 16S a 23S rRNA. Na analýzu medzigénovej oblasti sa amplifikuje zodpovedajúci úsek DNA za pomoci presne definovaných primerov. Táto medzigénová oblasť vykazuje vysoký stupeň heterogenity, na rozdiel od génov pre rRNA, ktoré sú evolučne vysoko konzervované a nemenné. Rovnako bolo dokázané, že v genóme *C. difficile* sa nachádza 10 kópií génov pre rRNA a variabilita v medzigénovej oblasti bola dokázaná nielen medzi odlišnými kmeňmi, ale aj medzi rôznymi kópiami rRNA operónu na tom istom chromozóme (Gurtler, 1993). Z našich výsledkov vyplýva, že ribotypizáciou sa potvrdil výskyt ribotypov 033 – 1 kmeň (2,9 %), 036 - 5 kmeňov (14,3 %), 047 – 11 kmeňov (31,4 %), 070 – 1 kmeň (2,9 %), 102 – 3 kmene (8,6 %), 103 – 4 kmene (11,4 %), 111 – 1 kmeň (2,9 %), pričom nebol potvrdený výskyt hypervirulentných ribotypov 027 a 078. Našou metodikou sa nepodarilo typizovať 6 kmeňov (18,1 %), ktoré vykazovali pri amplifikácii negatívne výsledky.

Tab.2. Podrobné výsledky typizácie kmeňov.

Kmeň	A3	Typ reštrikcie A3	B1	Typ reštrikcie B1	Toxinotyp	Binárny toxín	Ribotyp
K 1	+	7	+	5	VIII	-	047
K 2	+	7	+	5	VIII	-	047
K 3	-	-	+	5	X	+	036
K 4	-	-	+	5	X	+	036
K 5	-	-	+	5	X	+	036
K 7	+	9	+	1	XIII	-	070
K 8	+	7	+	5	VIII	-	047
K 9	+	4	+	1	I	-	102
K 10	+	3	+	1	II	-	103
K 11	+	3	+	1	II	-	103
K 12	+	5	-	-	XI	+	033
K 17	+	3	+	1	II	-	103
K 18	+	3	-	1	II	-	103
K 19	+	4	+	1	I	-	102
K 21	+	2	+	7	XIV	-	111
K 30	+	7	+	5	VIII	-	047
K 42	+	7	+	5	VIII	-	047
K 44	+	7	+	5	VIII	-	047
K 67	+	5	-	-	XI	+	033
K 71	+	7	+	5	VIII	-	047
K 72	-	-	+	5	X	+	036
K 73	+	7	+	5	VIII	-	047
K 78	+	5	-	-	XI	+	033
K 80	-	-	+	5	X	+	036
K 83	+	7	+	5	VIII	-	047
K 60	+	7	+	5	VIII	-	047
Příbram	+	5	-	-	XI	+	033
K ČB	+	7	+	5	VIII	-	047
K G	+	4	+	1	I	-	102

Najčastejším ribotypom v Európe je 027, existujú však veľké lokálne rozdiely. V Poľsku napríklad prevláda typ 017, v Maďarsku 014, vo Veľkej Británii bol častý typ 001, avšak v poslednej

dobe vystupuje do popredia typ 002 (Džupová, 2008). Od roku 2003 stúpa podľa Terhes (2009) výskyt ochorení CDAD a taktiež sa zvyšuje výskyt ribotypu 027, ktorý spôsobil epidémiu v Severnej Amerike, Anglicku, Holandsku, Belgicku a Francúzsku. Jeho výskyt bol nedávno potvrdený napríklad i v Rakúsku, Írsku, Nemecku a Švajčiarsku (Kuijper, 2007, Fenner, 2008).

ZÁVER

Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt hypervirulentných kmeňov *Clostridium difficile* v nemocničnom prostredí ČR pomocou moderných metód molekulárnej biológie, pričom sa aplikovali tri metódy a to toxinotypizácia, detekcia binárneho toxínu a ribotypizácia.

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

LITERATÚRA

- Bednář M.; et al. (1999): *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1999. 558 s
- Bidet P., Barbut F., Lalande V., Burghoffer B., Petit J., (1999): Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, Vol 175, p. 261-266, ISSN 0378-1097
- Eichel-Streiber C.; Boquet P., Sauerborn M., Thelestam, (1996): Large clostridial cytotoxins- a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins, In: *Trends in Microbiology*, 1996, Vol. 4, No. 10, s. 375-382, ISSN 0966-842X
- Eichel-Streiber C.; Laufenberg-Feldmann R.; Sartingen S.; Schulze J.; Sauerborn M.; (1992): Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B, In: *Molecular and general genetics*, 1992, Vol. 233, No. 1-2, s. 260-268, ISSN 0026-8925
- Fenner L, Widmer AF, Strandén A et al. First cluster of clindamycin-resistant *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 514–515.
- Geric, B. et al (2004): Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital, In: *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53, p. 887-894

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

Joyce A. M, Burns D. L., (2003): Rekurentní klostridiová pseudomembranózní kolitida, In : Medicína po promoci, Ročník 4, č. 4/červenec–srpen, 2003, s 15-19.

Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, N. Iwai, H. Nakamura, T. Yamamoto, K. Suzuki, S. M. Kim, Y. Chong, and E. B. Wasito. 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36:2178–2182.

Kuijper EJ, Coignard B, Brazier J et al. Update of *Clostridium difficile* associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro Surveill 2007; 12: pii=714

O'Neill G, Adams J., Bowman R., Riley T., (1993): A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. In: Epidemiology and Infection, Vol. 111: p. 257–264, ISSN 1469-4409.

Perelle S., Gilbert M., Bourlioux P., Corthier G., Popoff R. (1997): Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196, In: Infection and Immunity, Vol. 65, No. 4, p. 1402-1407, ISSN 0019-9567

Rupnik M., Braun V., Soehn F., Janc M., Hofstetter M., Laufenberg-Feldman, R., Eichel-Streiber C., (1997): Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. In: FEMS Microbiology Letters, Vol. 148, s. 197-202.

Rupnik M., *Clostridium difficile* Toxinotypes, dostupné na <http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/>.

Rupnik M., Avesani V., Janc M., Eichel-Streiber C.; Delmée M., (1998): A Novel Toxinotyping Scheme and Correlation of Toxinotypes with Serogroups of *Clostridium difficile* Isolates, In: Journal of Clinical Microbiology, 1998, Vol. 36, No.8, s. 2240-2247, ISSN: 0095-1137

Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique A.K., (2004). Cholera, In: Lancet, 2004, Vol. 363, Issue 9404, p. 223-233, ISSN 0096-0233.

Saylers, A., Whitt, D., (1994): Bacterial pathogenesis, ASM Press, Washington, D.C, 1994, p. 282-289, ISBN 1-55581-094-2

Spigaglia P., Mastrantonio P., (2002). Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of the toxin production (*TcdC*) among *Clostridium difficile* clinical isolates, In: Journal of Clinical Microbiology, 2002, Vol. 40, No. 9, p. 3470-3475, ISSN 0095-1137

Štěpán J., et al., (2004): Molecular diagnostics of clinically important staphylococci (Review). In: Folia microbiologica, Praha, Mikrobiologický ústav Praha AV ČR. ISSN 0015-5632, 2004, Vol. 49, No. 4, s. 353-386

Voth E. D., Ballard D. J.,(2005): *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease, In: Clinical Microbiology Reviews, 2005, Vol.: 18, No. 2, s. 247-263, ISSN: 0893-8512

Závadová M. (1986): *Anaerobní bakterie a anaerobní infekce*. Praha : Avicenum, 1986.