

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH KOMPLETOV ZA
OSAMITEV NUKLEINSKIH KISLIN BAKTERIJE
CLOSTRIDIODES DIFFICILE IZ MESA IN MESNIH
PRIPRAVKOV**

**COMPARISON OF NUCLEIC ACID EXTRACTION
KITS FOR THE DETECTION OF *CLOSTRIDIODES*
DIFFICILE IN MEAT AND MEAT PRODUCTS**

Katarina Pavlin

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 579.67:57.083:579.852.13:577.213:637.5(043.2)

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH KOMPLETOV ZA OSAMITEV
NUKLEINSKIH KISLIN BAKTERIJE *CLOSTRIDIODES*
DIFFICILE IZ MESA IN MESNIH PRIPRAVKOV**

**COMPARISON OF NUCLEIC ACID EXTRACTION KITS FOR
THE DETECTION OF *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* IN
MEAT AND MEAT PRODUCTS**

Katarina Pavlin

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad
za raziskovalno delo študentom, pod mentorstvom doc. dr. Urške Jamnikar
Ciglencečki, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete
Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2020

POVZETEK

Ključne besede: Mikrobiologija prehrane; *Clostridioides difficile*; bakterijska DNA – analize – kemija; meso – mikrobiologija; kompleti diagnostičnih reagentov; verižna reakcija s polimerazo v realnem času; primerjalna študija

V raziskavi smo primerjali učinkovitost treh komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA bakterije *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) v vzorcih mesa in mesnih pripravkih. Zaradi anaerobne narave se *C. difficile* v hrani nahaja predvsem v obliki spor. Plašč spor je zelo odporen in ga je težko lizirati, zato je sprostitev nukleinskih kislin iz spor omejena. Tudi prisotnost maščob in beljakovin v vzorcih mesa lahko negativno vpliva na osamitev DNA in na potek verižne reakcije s polimerazo (PCR). Z raziskavo smo želeli določiti najbolj učinkovito metodo osamitve DNA, da bi s tem izboljšali občutljivost dokazovanja *C. difficile*. V ta namen smo namnožili bakterije v vzorcih mesa, inokuliranih s *C. difficile*, s predhodno obogatitvijo s štiridnevno inkubacijo v gojišču cikloserin cefoksitin fruktozni bujon z dodatkom tauroholične kisline, D-cikloserina, cefoksitina in lizocima (TCCFB+L) pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Z namnožitvijo bakterij smo se izognili temu, da bi bile v vzorcih prisotne le spore. Za osamitev DNA bakterije *C. difficile* smo uporabili tri različne komercialne komplete reagentov: foodproof Sample Preparation kit II (Biotecon Diagnostics, Nemčija) (FP), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Nemčija) (HP) in DNA Isolation from Complex Samples (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija) (ICS). Raziskavo smo izvedli v dveh delih. V prvem delu smo uporabili vzorce mletega mesa, katere smo inokulirali s tremi različnimi sevi *C. difficile*, in sicer z vsakim sevom posebej ter pri treh različnih koncentracijah. V drugem delu raziskave smo uporabili vzorce različnih vrst mesa in mesnih pripravkov ter jih inokulirali z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*. V obeh delih raziskave je bil glede na rezultate metode PCR v realnem času s sondo TaqMan najučinkovitejši komercialni komplet reagentov ICS (pri osamitvi DNA z ICS smo v primerjavi s FP ugotovili v povprečju za 2,41 cikla, v primerjavi s HP pa za 3,8 cikla nižje vrednosti Ct). Manj učinkovit je bil FP (pri osamitvi DNA s FP smo v primerjavi s HP ugotovili v povprečju za 1,4 cikla nižje vrednosti Ct), najmanj pa HP. Z raziskavo smo ugotovili, da je za optimalno osamitev DNA *C. difficile* iz različnih vrst mesa in mesnih pripravkov priporočljivo kombinirati mehanske ter encimsko-kemijske postopke lize, skupaj s toplotno obdelavo vzorcev.

SUMMARY

Key-words: Food microbiology; *Clostridioides difficile*; DNA, bacterial – analysis – chemistry; meat – microbiology; reagent kits, diagnostic; real-time polymerase chain reaction; comparative study

In this study we compared the efficiency of three commercial extraction kits for the extraction of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) DNA in samples of meat and meat products. Due to its anaerobic nature, *C. difficile* is found in food mainly in the form of spores. The spore coating is highly resistant and difficult to lyse, therefore the release of nucleic acids from spores is limited. The presence of fats and proteins in meat samples may also have a negative effect on DNA extraction and on the course of quantitative polymerase chain reaction (qPCR). We wanted to determine the most efficient method for DNA extraction in order to improve the sensitivity of *C. difficile* detection. For this purpose we multiplied and incubated the bacteria in meat samples inoculated with *C. difficile* with a four day incubation in cycloserine cefoxitin fructose enrichment broth supplemented with taurocholic acid, D-cycloserine, cefoxitin and lysozyme (TCCFB+L) at 37 °C and under anaerobic conditions. With the enrichment of bacteria we eliminated the possibility that only spores would be present in the inoculated samples. We used three different commercial kits for the extraction of DNA from *C. difficile*: foodproof Sample Preparation kit II (Biotecon Diagnostics, Germany) (FP), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Germany) (HP) and DNA Isolation from Complex Samples (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenia) (ICS). The study was conducted in two parts. In the first part, we used minced meat samples and inoculated them with three different strains of *C. difficile*, that is with each strain separately and at three different concentrations. In the second part of the study, we used samples of different types of meats and meat products and inoculated them with a mixture of all three strains of *C. difficile*. In both parts of the study, according to the results of the quantitative PCR method with the TaqMan probe, the most effective commercial kit was ICS (the average Ct values determined after DNA extraction with ICS in comparison with FP were lower for 2,41 cycles and in comparison with HP for 3,8 cycles). Less effective was the commercial kit FP (the average Ct values determined after DNA extraction with FP in comparison with HP were lower for 1,4 cycles) and the least effective was HP. In this study, we found that for optimal extraction

of *C. difficile* DNA from different types of meat and meat products, it is necessary to combine mechanical and enzymatic-chemical lysis procedures, together with heat treatment of samples.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	3
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED LITERATURE	5
2.1 <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>	5
2.1.1 Toksini in drugi dejavniki virulence	6
2.1.2 Spore <i>C. difficile</i>	7
2.1.2.1 Sporulacija in germinacija oz. klitje spor	7
2.1.2.2 Odpornost spor	8
2.2 OKUŽBE PRI LJUDEH	8
2.2.1 Patogeneza	8
2.2.2 Bolnišnične in izvenbolnišnične okužbe s <i>C. difficile</i>	9
2.2.2.1 Okolje	11
2.2.2.2 Živali	12
2.2.2.3 Hrana	14
2.2.2.3.1 Meso	15
2.2.2.3.2 Morska hrana	16
2.2.2.3.3 Zelenjava	16
2.3 DIAGNOSTIKA	17
2.3.1 Klasične mikrobiološke preiskave	17
2.3.2 Molekularne preiskave	18
2.3.2.1 Osamitev nukleinskih kislin <i>C. difficile</i>	18
2.3.2.2 Dokazovanje prisotnosti DNA <i>C. difficile</i> z metodo qPCR	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 IZBIRA IN PRIPRAVA VZORCEV	22
3.2 OBOGATITEV VZORCEV	23
3.3 OSAMITEV DNA <i>C. DIFFICILE</i>	24
3.3.1 Osamitev DNA s kompletom reagentov foodproof Sample Preparation kit II	24
3.3.2 Osamitev DNA s kompletom reagentov High Pure PCR Template Preparation kit	25

3.3.3 Osamitev DNA s kompletom reagentov DNA Isolation from Complex Samples	25
3.4 DOKAZ DNA <i>C. DIFFICILE</i> Z METODO qPCR.....	26
4 REZULTATI	27
4.1 VZORCI MLETEGA MESA, INOKULIRANI S TREMI RAZLIČNIMI SEVI <i>C. DIFFICILE</i> PRI TREH RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH	27
4.1.1 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom <i>C. difficile</i> S1	27
4.1.2 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom <i>C. difficile</i> S2	28
4.1.3 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom <i>C. difficile</i> S3	30
4.1.4 Primerjava različnih kompletov reagentov za osamitev DNA pri testiranju vzorcev mletega mesa, inokuliranih z bakterijo <i>C. difficile</i>	31
4.2 VZORCI ZAČINJENEGA IN MARINIRANEGA MESA, INOKULIRANI Z MEŠANICO TREH RAZLIČNIH SEVOV <i>C. DIFFICILE</i>	34
5 RAZPRAVA	37
6 SKLEPI	41
7 POVZETEK	43
8 ZAHVALE	45
9 LITERATURA	46

KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s <i>C. difficile</i> S1, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.	27
Tabela 2: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s <i>C. difficile</i> S2, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.	29
Tabela 3: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s <i>C. difficile</i> S3, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.	30
Tabela 4: Primerjava rezultatov za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi sevi <i>C. difficile</i> pri treh različnih koncentracijah, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.....	33
Tabela 5: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov <i>C. difficile</i> , glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.	34
Tabela 6: Primerjava rezultatov za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov <i>C. difficile</i> , glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz prenosa <i>Clostridioides difficile</i> na ljudi z različnih možnih virov (okolje, stik z okuženimi ali koloniziranimi ljudmi ali živalmi in zaužitje kontaminirane hrane ali vode) (Brown in Wilson, 2018).....	11
Slika 2: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami <i>C. difficile</i> S1, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).....	28
Slika 3: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami <i>C. difficile</i> S2, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).....	29
Slika 4: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami <i>C. difficile</i> S3, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).....	31
Slika 5: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov <i>C. difficile</i> , iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).	35

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
anaBAP	anaerobni krvni agar (angl. anaerobic Blood Agar Plate)
ATP	adenozin trifosfat (angl. adenosine triphosphate)
BHI bujon	možgansko-srčni infuzijski bujon (angl. Brain Heart Infusion broth)
BHIT bujon	možgansko-srčni infuzijski bujon z 0,1 % tauroholatom (angl. Brain Heart Infusion broth with 0,1 % Taurocholate)
CCFA	cikloserin cefoksitin fruktozni agar (angl. Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar)
CCFA-ST	cikloserin cefoksitin fruktozni agar s tauroholatom (angl. Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar with Taurocholate)
CCMB-TAL	cikloserin cefoksitin manitol bujon s tauroholatom in lizocimom (angl. Cycloserine Cefoxitin Mannitol Broth with Taurocholate and Lysozyme)
CDMN bujon	<i>C. difficile</i> moksalaktam norfloksacin bujon (angl. <i>C. difficile</i> Moxalactam Norfloxacin broth)
CDMN+L	cikloserin cefoksitin fruktozni bujon z dodatkom tauroholične kisline, <i>C. difficile</i> moksalaktam norfloksacin (CDMN) bujona in lizocima (angl. Cycloserine Cefoxitin fructose broth supplemented with a taurocholic acid, <i>C. difficile</i> Moxalactam Norfloxacin (CDMN) selective supplement and lysozyme)
CDT	<i>C. difficile</i> transferaza (angl. <i>C. difficile</i> transferase) / binarni toksin
CFU	kolonijska enota (angl. colony forming unit)
CMM bujon	obogatitveni bujon (angl. Cooked Meat Medium broth)
Ct	cikel praga reakcije; točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule preide v eksponentialno rast in prečka linijo fluorescenčnega praga (angl. threshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FP	foodproof Sample Preparation kit II
g	sila G oz. gravitacijska sila (angl. G-force, gravitational force equivalent)
HP	High Pure PCR Template Preparation kit

ICS	DNA Isolation from Complex Samples
IPC	interna pozitivna kontrola (angl. internal positive control)
LMR	lizijski mikroreaktor
LSR	lipoproteinski receptor stimuliran ob lipolizi (angl. lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)
PaLoc	toksinski lokus ali lokus patogenosti (angl. pathogenicity locus)
PBS	fosfatni pufer z natrijevim kloridom (angl. phosphate-buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. quantitative/real-time polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
RT	PCR-ribotip
S1 / sev 1	sev ATCC 9689
S2 / sev 2	sev T7/MB, izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri teletu
S3 / sev 3	sev CD 400, izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri prašiču
TCCFB+L	cikloserin cefoksitin fruktozni bujon z dodatkom tauroholične kisline, D-cikloserina, cefoksitina in lizocima (angl. Cycloserine Cefoxitin Fructose Broth supplemented with taurocholic acid and lysozyme)
TcdA	<i>C. difficile</i> toksin A
TcdB	<i>C. difficile</i> toksin B
UNG	uracil-DNA N-glikozilaza
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. whole genome sequencing)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Clostridioides difficile oz. do nedavnega *Clostridium difficile* (*C. difficile*) je po Gramu pozitivna, običajno gibljiva, anaerobna in sporogena paličasta bakterija. Patogeni sevi izločajo toksine (Ezaki, 2009; Lawson in sod., 2016). *C. difficile* so prvič uspešno izolirali leta 1935 (Hall in O'Toole, 1935). Kljub temu je bilo šele leta 1977 dokazano, da lahko pri ljudeh in živalih povzroči diarejo in vodi do psevdomembranoznega kolitisa (Bartlett in sod., 1977; Bartlett in sod., 1978). V črevesju zdravih otrok in odraslih ljudi je *C. difficile* lahko prisotna v majhnem številu (Ozaki in sod., 2004; Rousseau in sod., 2012; Schaechter in sod., 2013), vendar do okužbe s *C. difficile* pride pogosteje pri dovzetnih posameznikih, saj normalna črevesna mikrobiota preprečuje klitje spor (Warriner in sod., 2017). Do nedavnega je veljalo, da so starejše osebe in hospitalizirani bolniki, ki so zdravljeni z antibiotiki, bolj dovzetni za okužbo s *C. difficile* (Loo in sod., 2011), vendar se zadnje čase čedalje bolj pogosto ugotavljajo izvenbolnišnične okužbe s *C. difficile*, ki lahko potekajo v hudi obliki, lahko se pojavijo tudi pri ljudeh z nizkim tveganjem obolenja ter brez predhodne uporabe antibiotikov (Anderson in sod., 2017). Ljudje se s *C. difficile* najpogosteje okužijo z neposrednim fekalno-oralnim prenosom s človeka na človeka ali preko s sporami kontaminiranega okolja (Martin in sod., 2016).

Čeprav je dokazano, da se PCR ribotipi (RT) izolirani pri ljudeh in živalih prekrivajo ter da je *C. difficile* prisotna v hrani (O'Neill in sod., 1993; Lemee in sod., 2004a; Arroyo in sod., 2005; Knight in sod., 2015; Knight in Riley, 2019), okužba ljudi preko hrane ali živali še ni bila dokazana (Hensgens in sod., 2012). Nekatere raziskave, v katerih so uporabili metodo sekvenciranja celotnega genoma (WGS, angl. whole-genome sequencing) za primerjavo sevov izoliranih pri ljudeh in živalih, so v zadnjih letih močno pripomogle k razumevanju zoonotskega potenciala nekaterih sevov *C. difficile* (Didelot in sod., 2012; Eyre in sod., 2013; Knetsch in sod., 2014). Veliko raziskovalcev je že ugotavljalo prisotnost *C. difficile* v svežem in procesiranem mesu, morski hrani in zelenjavi (Al Saif in Brazier, 1996; Rodriguez-Palacios in

sod., 2007; Bakri in sod., 2009; Rodriguez-Palacios in sod., 2009; Songer in sod., 2009; Von Abercron in sod., 2009; Weese in sod., 2009; Bouttier in sod., 2010; Hofer in sod., 2010; Jöbstl in sod., 2010; Metcalf in sod., 2010; Weese in sod., 2010b; de Boer in sod., 2011; Hensgens in sod., 2012; Pasquale in sod., 2012; Eckert in sod., 2013; Troiano in sod., 2015; Lim in sod., 2018; Tkalec in sod., 2019).

Glede na poročanja o prisotnosti *C. difficile* pri živalih in v mesu (Keel in sod., 2007; Rodriguez-Palacios in sod., 2007), obstaja možnost prenosa na ljudi preko hrane živalskega izvora (Rupnik, 2007). Podatki o stopnji kontaminiranosti mesa so zelo različni, v Evropi so ugotovili nizek odstotek pozitivnih vzorcev mesa (do 3 % vzorcev mesa) (Von Abercron in sod., 2009; Bouttier in sod., 2010; Hofer in sod., 2010; Jöbstl in sod., 2010; de Boer in sod., 2011; Ersöz in Coşansu, 2018), medtem ko je v ZDA in Kanadi odstotek pozitivnih vzorcev mesa višji, tudi do 44 % (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Rodriguez-Palacios in sod., 2009; Songer in sod., 2009; Weese in sod., 2009; Weese in sod., 2010b; ; Lund in Peck, 2015). Na splošno pa je število *C. difficile* v pozitivnih vzorcih mesa nizko (Hensgens in sod., 2012). Kljub nizkemu odstotku pozitivnih vzorcev mesa in nizkemu številu bakterij v vzorcih bi prenos okužbe s hrano lahko bil mogoč, predvsem zaradi visoke odpornosti spor na toplotno obdelavo ter druge neugodne fizikalne in kemijske dejavnike (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Gerding in sod., 2008; Weese in sod., 2010b).

Za dokaz nukleinskih kislin *C. difficile* se uporablja metoda PCR v realnem času (qPCR, angl. quantitative polymerase chain reaction) (Song in sod., 2018). Breme *C. difficile* v mesu je običajno nizko, prav tako se bakterija v vzorcih nahaja v obliki spor (Weese in sod., 2010b), zato je priporočljivo občutljivost dokazovanja s qPCR izboljšati s predhodno obogatitvijo vzorca in/ali uporabo najbolj učinkovite metode osamitve DNA (Houser in sod., 2010; Avberšek in sod., 2013). Zaradi visoke odpornosti spor *C. difficile* je sprostitve nukleinskih kislin omejena, kar znižuje učinkovitost postopkov za osamitev DNA (Miller in sod., 1999; Dauphin in sod., 2009). Poleg tega visoka vsebnost maščob in beljakovin ter druge sestavine hrane lahko negativno vplivajo na osamitev DNA (Basu in sod., 2013) in delujejo kot inhibitorji PCR (Rossen in sod., 1992; Bickley in sod., 1996; Quigley in sod., 2012). Na voljo so različni postopki za osamitev DNA, kot so liza celic z encimskimi ali kemičnimi učinkovinami, toplotno obdelavo ter mehanskim razbijanjem s kroglicami ali sonifikacijo (Nylund in sod., 2010).

Namen raziskave je bil določiti optimalen postopek osamitve DNA bakterije *C. difficile* iz mesa in mesnih pripravkov s primerjavo treh komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA, ki se med seboj razlikujejo predvsem v načinu lize celic. Podobne primerjave na vzorcih mesa in mesnih pripravkov do danes še niso bile izvedene. Druge raziskave so ugotavljale učinkovitost različnih komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA *C. difficile*, predvsem pri testiranju vzorcev iztrebkov živali. Glede na rezultate teh raziskav je za optimalno osamitev DNA *C. difficile* potrebno uporabiti tako mehanske (razbijanje s kroglicami), kot tudi encimsko-kemijske postopke lize celic (Anderberg in sod., 1995; Miller in sod., 1999; Dauphin in sod., 2009; Käser in sod., 2009; Freifeld in sod., 2012; Metcalf in Weese, 2012; Grzeškowiak in sod., 2016; Yoon in sod., 2016; Avberšek in sod., 2017).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V raziskavi smo primerjali učinkovitost treh komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA bakterije *C. difficile* iz obogatenih vzorcev mesa in mesnih pripravkov. Želeli smo določiti najbolj učinkovit postopek, da bi s tem izboljšali občutljivost dokazovanja *C. difficile* z metodo qPCR.

Raziskava v okviru Prešernove naloge je prva raziskava, kjer se primerja različne metode osamitve DNA bakterije *C. difficile* pri testiranju mesa in mesnih pripravkov, kontaminiranih z različnimi sevi *C. difficile* in različnim številom bakterij v vzorcih.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Hipoteza 1: Najbolj učinkovit komercialni komplet reagentov za osamitev DNA *C. difficile* iz obogatenih vzorcev mesa in mesnih pripravkov bo DNA Isolation from Complex Samples (ICS), kjer se liza celic izvaja z mehanskimi (razbitje s kroglicami) in encimsko-kemijskimi postopki ter toplotno obdelavo vzorca, manj učinkovit bo High Pure PCR Template Preparation kit (HP), saj poleg encimsko-kemijskih postopkov lize vključuje tudi pufer za odstranitev inhibitorjev, najmanj učinkovit pa bo foodproof Sample Preparation kit II (FP), kjer se za lizo celic uporabljajo le encimsko-kemijski postopki.

Hipoteza 2: Posamezni komercialni komplet reagentov za osamitev DNA (ICS, HP, FP) bo enako učinkovit za osamitev DNA različnih sevov *C. difficile*, ne glede na to, da pripadajo različnim PCR ribotipom in toksinotipom.

Hipoteza 3: Učinkovitost komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA (ICS, HP, FP) *C. difficile* se bo razlikovala med osamitvami iz vzorcev mesa ter vzorcev mesnih pripravkov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE*

Bakterijo *C. difficile* so prvič odkrili leta 1935 (Hall in O'Toole, 1935). Kljub uspešni izolaciji je bilo šele leta 1977 dokazano, da lahko povzroča diarejo in psevdomembranozni kolitis (Bartlett in sod., 1977; Bartlett in sod., 1978).

Do pred kratkim se je *Clostridioides difficile* imenovala *Clostridium difficile*, nato pa je bila uvrščena v nov rod *Clostridioides* gen. nov. in poimenovana *Clostridioides difficile* comb. nov. (Lawson in sod., 2016). Poimenovanje rodu *Clostridioides* gen. nov. nakazuje na podobnost teh organizmov tistim iz rodu *Clostridium* (latinska pripona *-oides*, iz grške pripone *-eides*, iz grškega samostalnika *eidos*, kar pomeni "to, kar se vidi, oblika, figura") (Lawson in sod., 2016). Glede na rezultate sekvenciranja gena 16S rRNA se rod *Clostridioides* uvršča v družino *Peptostreptococcaceae* (Ezaki, 2009; Lawson in sod., 2016) in skupino XI klostridijev, kot so leta 1994 definirali Collins in njegovi sodelavci (Collins in sod., 1994).

Clostridioides difficile comb. nov. je dobila ime po latinskem pridevniku "*difficile*" (pomeni težko, težavno), zaradi težav pri izolaciji (za rast so potrebni zahtevni pogoji) in preučevanju te bakterije (Schaechter in sod., 2013; Lawson in sod., 2016). Je po Gramu pozitivna, običajno gibljiva paličasta bakterija, nekateri sevi pa lahko oblikujejo verige po od dve do šest celic (Lawson in sod., 2016). Bakterija ima sposobnost fermentacije, je katalaza in oksidaza negativna, za rast pa potrebuje obogaten medij (Quinn in sod., 2011). Je striktni anaerob, saj nima encima superoksid dismutaza in katalaza, ki sta pomembna pri inaktivaciji toksičnih produktov, ki nastanejo med aerobnim metabolizmom (vodikov peroksid, superoksidni radikali). V prisotnosti kisika ali drugih zanje neugodnih razmer delajo spore (Schaechter in sod., 2013). Nekateri sevi imajo hialuronidaze, ekstracelične beta glukuronidaze, hondroitin sulfataze in kolagenaze (Lawson in sod., 2016).

2.1.1 Toksini in drugi dejavniki virulence

C. difficile ne vstopi v črevesno steno, temveč naseljuje lumen črevesja. Toksigeni sevi pri tem izločajo toksine, ki poškodujejo črevesni epitelij. *C. difficile* lahko izloča tri toksine, in sicer toksina A (TcdA) in B (TcdB) ter binarni toksin CDT (angl. *C. difficile* transferase) (Schaechter in sod., 2013; Gerding in sod., 2014).

Toksina A in B delujeta citotoksično ter povzročata povečanje propustnosti krvnih žil in krvavitve, medtem ko toksin A deluje tudi enterotoksično. Toksina pri uničevanju celic prebavnega trakta delujeta sinergistično (Surawicz in sod., 2013; Álvarez-Hernández in sod., 2018). Oba toksina sta encima, ki delujeta v citoplazmi gostiteljske celice, kjer spodbudita proces glukozilacije GTPaz iz družine Rho, kot so Rho, Rac in Cdc42. Glukozilacija inaktivira te regulatorne proteine, posledica je izguba normalne strukture citoskeleta, kar lahko vodi v celično smrt (Schaechter in sod., 2013). Pride do prekinitve integritete sluznice kolona, akutnega kolitisa in sekundarne diareje, v nekaterih primerih tudi do psevdomembranoznega kolitisa (Morishita in sod., 2004). Gena, ki kodirata toksina A (TcdA) in B (TcdB), sta del toksinskega lokusa (PaLoc) (Bloomfield in Riley, 2016).

Nekateri sevi *C. difficile* izločajo tudi tretji tip toksina, binarni toksin CDT. Binarni toksin je encim ADP-ribosiltransferaza, ki so ga pri *C. difficile* (sev CD196 oziroma RT 027) prvič odkrili in opisali leta 1988 (Popoff in sod., 1988). Sevi, ki izločajo tudi ta toksin, naj bi bili povezani z resnejšim potekom okužbe in višjo smrtnostjo (Gerding in sod., 2014). Pri okužbi s sevi, ki izločajo binarni toksin, je smrtnost v 30-ih dnevih po okužbi višja (31 % namesto 14 %) (Goldenberg in French, 2011). CDT toksin je sestavljen iz dveh delov, CDTa in CDTb. Del CDTb se veže na LSR površinski receptor enterocitov, kar sproži endocitozo CDT-LRS kompleksa. Del CDTa sproži depolimerizacijo aktinskih tubulov in s tem uničenje aktinski citoskeleta enterocita (Gerding in sod., 2014).

Drugi faktorji virulence različnih patogenih sevov *C. difficile* so povezani z adherenco na enterocite, sporulacijo v stresnih pogojih, tvorbo biofilmov, odpornostjo in prilagajanjem na obrambne mehanizme gostitelja in različne okoljske dejavnike (Janoir, 2016).

2.1.2 Spore *C. difficile*

2.1.2.1 Sporulacija in germinacija oz. klitje spor

Zaradi anaerobne narave se *C. difficile* prenaša predvsem v obliki spor. Znanje o biologiji spor *C. difficile* je v primerjavi z nekaterimi bolj proučevanimi sporogenimi vrstami, kot sta *Bacillus subtilis* in *Clostridium perfringens*, še vedno zelo skopo (Zhu in sod., 2018).

Signali oz. molekule, ki sprožijo sporulacijo *C. difficile*, še niso bili ugotovljeni. Glede na raziskave drugih sporogenih bakterij je verjetno, da so vpleteni okoljski signali, kot so pomanjkanje hranil, drugi neznani stresni dejavniki in zaznavanje celične gostote (kvoruma) (Higgins in Dworkin, 2012). Predvsem zaznavanje kvoruma ima verjetno pomembno vlogo pri sporulaciji *C. difficile*, čeprav mehanizem ni dobro poznan (Darkoh in sod., 2016). Kot pri drugih sporogenih bakterijah (npr. *B. subtilis*) je tudi sporulacija *C. difficile* sestavljena iz štirih morfogenetских stopenj. V prvi stopnji pride do nesimetrične delitve vegetativne celice, pri čemer nastane manjši predel in večja materinska celica. V drugi stopnji materinska celica zaobjame manjši predel, ki je zdaj že predspora, s procesom, podobnim fagocitozi. Posledično se predspora v celoti nahaja v citoplazmi materinske celice. V tretji stopnji se oblikujeta skorja in plašč spore, v četrti pa pride do lize materinske celice in v okolico se sprosti zrela spora. Pri nekaterih sevih *C. difficile* plašč obdaja še eksosporij, vendar ta ni vedno prisoten pri vseh sevih *C. difficile* (Edwards in McBride, 2014; Gil in sod., 2017).

Klitje spor predstavlja začetek okužbe s *C. difficile*. V črevesju klitje spodbudijo določene žolčne kisline, ki jih proizvaja gostitelj (npr. tauroholična kislina/derivati holne kisline), aminokisline (npr. glicin in alanin) (Sorg in Sonenshein, 2008), pomembno vlogo ima tudi kalcij (Ca^{2+}) (Kochan in sod., 2017). Nedavno so odkrili, da imata pomembno vlogo pri germinaciji spor *C. difficile* proteina GerG in GerS. Ugotovili so, da mutacije genov *gerG* in/ali *gerS*, vodijo v motnje pri germinaciji spor *C. difficile* (Fimlaid in sod., 2015; Donnelly in sod., 2017). Ker so GerG in GerS ugotovili le pri *C. difficile*, bi morda lahko s ciljanjem na te proteine razvili terapevtske metode, ki bi preprečile okužbo s *C. difficile* (Zhu in sod., 2018).

2.1.2.2 Odpornost spor

Spor ni mogoče uničiti z zamrzovanjem do -80°C , segrevanjem do 85°C , sušenjem, ultravijoličnim sevanjem, alkoholom ali večino dezinfekcijskih sredstev (Deng in sod., 2015). Sporocidno nanje delujejo uparjen vodikov peroksid in dezinfekcijska sredstva na podlagi klora. Detergenti, ki vsebujejo kvartarni amonij ali surfaktante, niso sporocidni in lahko celo spodbudijo sporulacijo nekaterih virulentnih sevov (Gerding in sod., 2008). Preživetje spor *C. difficile* v termično obdelanem mesu je dokaz njihove sposobnosti preživetja v stresnih okoljih (Deng in sod., 2015). Predvsem sevi RT 078 so zelo odporni proti vročini. Spore drugih sevov lahko preživijo kuhanje do 85°C za 10 minut, medtem ko spore seva RT 078 preživijo do 96°C za 10 minut (Rodriguez-Palacios in sod., 2016). Spore so tako odporne zaradi debelega plašča, ki jih obdaja, in je sestavljen iz večih lamel (Paredes-Sabja in sod., 2014).

2.2 OKUŽBE PRI LJUDEH

2.2.1 Patogeneza

C. difficile je v majhnem številu lahko normalno prisotna v črevesju zdravih otrok in odraslih ljudi (Ozaki in sod., 2004; Rousseau in sod., 2012; Schaechter in sod., 2013). Pri zdravih osebah želodčna kislina in komenzalna črevesna mikrobiota preprečujeta razvoj okužbe. Želodčna kislina (pH 1–2) lahko uniči zaužite vegetativne oblike *C. difficile*, vendar ne spor (Jump in sod., 2007). Bolezen se pojavi šele po izpostavitvi stimulusu, ki spodbudi germinacijo oz. vzklitje spor. Pred odkritjem antibiotikov je do tega prišlo predvsem po operacijah na črevesju, kasneje pa so bolezen povezovali z uporabo antibiotikov (Schaechter in sod., 2013).

Nastanek bolezni lahko izzove uporaba katerega koli antibiotika, najpogosteje pa cefalosporinov, ampicilina, linkomicina in klindamicina ter fluorokinolonov (Schaechter in sod., 2013). Znaki okužbe s *C. difficile* se običajno začnejo kmalu po uporabi antibiotikov, lahko pa celo do tri mesece kasneje (Almeida in sod., 2016). *C. difficile* je ponavadi že prisotna v črevesju, lahko pa pride do novega vnosa patogena v času antibiotične terapije. Med ali po antibiotični terapiji pride do klitja spor (Schaechter in sod., 2013). Število spor *C. difficile*, potrebnih za okužbo pri dovzetnih ljudeh ni znano, vendar je le-to verjetno nizko (100–1000 spor) (Warriner in sod., 2017).

Normalno v tankem črevesju bakterijske hidrolaze žolčnih soli dekonjugirajo konjugirane primarne žolčne kisline (tauroholat, glikoholat) (Winston in Theriot, 2016). Nastale nekonjugirane primarne žolčne kisline (holna in henodeoksiholna kislina) normalna mikrobiota kolona pretvori v sekundarne žolčne kisline (deoksiholna in litholna kislina) z bakterijskimi hidroksisteroid dehidrogenazami žolčnih kislin (Gérard, 2013). Sekundarne žolčne kisline inhibirajo klitje spor in rast *C. difficile* (Winston in Theriot, 2016), primarne žolčne kisline (predvsem tauroholat) pa klitje spodbudijo (Wheeldon in sod., 2011). Antibiotiki porušijo normalno črevesno mikrobioto, kar prepreči dekonjugacijo primarnih žolčnih kislin in posledično zmanjša nastajanje sekundarnih žolčnih kislin in poveča količino primarnih žolčnih kislin (Sun in Hirota, 2015). Spremenjeni pogoji tako omogočijo klitje spor *C. difficile*, preživijo pa predvsem na prisotne antibiotike odporni sevi *C. difficile* (Leffler in Lamont, 2015).

Vegetativna oblika *C. difficile* v črevesju hitro proliferira in izloča toksine. Ko količina toksinov doseže kritično koncentracijo, pride do nastanka simptomov (Schaechter in sod., 2013). Okužba s *C. difficile* pri ljudeh se lahko spreminja od asimptomatske kolonizacije prebavil do hude diareje (Ghose, 2013). Pride pa lahko tudi do hujših zapletov, kot so psevdomembranozni kolitis, toksični megakolon in sepsa (McDonald in sod., 2006). Tako simptomatski kot asimptomatski bolniki z iztrebki izločajo spore *C. difficile* v okolje (Rousseau in sod., 2012).

2.2.2 Bolnišnične in izvenbolnišnične okužbe s *C. difficile*

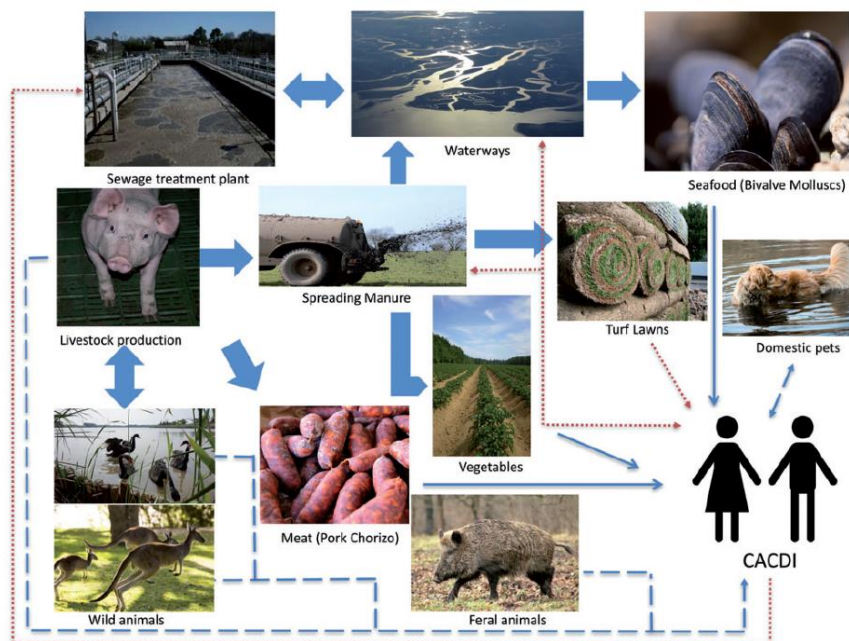
C. difficile je glavni povzročitelj diareje v bolnišnicah. Prenos okužbe poteka preko spor, ki jih je zelo težko odstraniti iz okolja. V domovih za starejše občane je od 20 % do 30 % prebivalcev asimptomatskih nosilcev *C. difficile* (Schaechter in sod., 2013). V bolnišnicah in domovih za starejše občane se spore prenašajo po fekalno-oralni poti, preko zdravstvenega osebja in negovalcev ter opreme (Gerding in sod., 2008).

Dejavnikov tveganja za okužbo ali ponavljajoče se okužbe s *C. difficile* je veliko. Najpogosteje so to uporaba antibiotikov, visoka starost (> 65 let), imunosupresivna stanja (kemoterapija), druga resna obolenja (bolezni ledvic), vnetna črevesna bolezen (Bignardi, 1998), s sporami kontaminirano bolnišnično okolje in večja dovzetnost gostiteljev (Kumar in sod., 2016).

Ker se osebe z visokim tveganjem za okužbo pogosto nahajajo v zdravstvenih ustanovah, je mnogo let veljalo, da gre pri okužbi s *C. difficile* primarno za bolnišnično okužbo. Zadnje čase pa se okužbe s *C. difficile* čedalje pogosteje pojavljajo tudi pri osebah, ki niso v stiku z zdravstvenimi ustanovami in niso izpostavljene dejavnikom tveganja (Khanna in sod., 2012).

Pojavnost izvenbolnišničnih okužb s *C. difficile* je občutno nižja, vendar kljub temu predstavlja eno četrtno vseh diagnosticiranih okužb s *C. difficile* (Norén in sod., 2004). Pri slabi tretjini bolnikov pride do okužbe brez predhodne uporabe antibiotikov vsaj 180 dni pred postavitvijo diagnoze (Collins in sod., 2017). V Veliki Britaniji (Oxfordshire) so z metodo WGS sekvencirali izolate pridobljene iz simptomatskih pacientov, pri katerih je bila potrjena bolnišnična ali izvenbolnišnična okužba s *C. difficile*. Ugotovili so, da v 45 % primerov okužba ni bila posledica prenosa z obolelih oseb, temveč verjetneje z asimptomatskih prenašalcev ali drugih nebolnišničnih okoljskih virov (Eyre in sod., 2013).

V raziskavi, ki so jo izvedli Otten in sodelavci (2010), so kot možne vire izvenbolnišničnih okužb navedli okolje, stik z okuženimi ali koloniziranimi ljudmi oz. živalmi ter hrano. Spore *C. difficile* se lahko prenašajo s fekalnimi odplakami iz živinorejskih objektov in gospodinjstev, tudi s tretirano gnojevko iz prašičerej, z meddržavnim transportom živine, uporabo tretirane odpadne vode za namakanje, s kompostiranjem, gnojenjem, blatom rečne delte oz. rečno usedlino, travnimi preprogami oz. rušo, kadavri koloniziranih prašičev, idr. (Warriner in sod., 2017) (Slika 1).



Slika 1: Prikaz prenosa *Clostridioides difficile* na ljudi z različnih možnih virov (okolje, stik z okuženimi ali koloniziranimi ljudmi ali živalmi in zaužitje kontaminirane hrane ali vode) (Brown in Wilson, 2018).

Figure 1: Demonstration of *Clostridioides difficile* transmission to humans from a variety of possible sources (environment, contact with infected or colonized humans or animals and ingestion of contaminated food or water) (Brown and Wilson, 2018).

2.2.2.1 Okolje

Ob ustrezni izbiri medija za obogatitev je možno *C. difficile* izolirati skoraj iz kjerkoli (Levett, 1986). Al Saif in Brazier (1996) sta v Južnem Walesu odkrila spore *C. difficile* v 21 % vzorcev zemlje, 88 % vzorcev vode iz rek, 50 % vzorcev vode iz morja, jezera ali plavalnih bazenov ter 5,5 % vode iz pipe. Skupno 85 % vseh izolatov je proizvajalo toksin A (Al Saif in Brazier, 1996). Leta 2010 so podobne rezultate objavili tudi v slovenski raziskavi. *C. difficile* so izolirali iz 68 % vzorcev vode iz rek ter odkrili kar 34 različnih RT *C. difficile*, več kot polovico odkritih RT je prisotnih tudi pri ljudeh in živalih (Zidarič in sod., 2010). Čeprav je absolutno število toksigenih bakterij *C. difficile* v vodi nizko, infekcijska doza ni poznana in posledično tudi ne vpliv okolja kot vira za okužbo s *C. difficile* pri ljudeh in živalih (Al Saif in Brazier, 1996).

V mestu Houston (ZDA) so preučevali prisotnost spor toksigenih sevov *C. difficile* v različnih okoljih. Ugotovili so, da so najbolj kontaminirani javni parki (24,6 %), zasebni domovi

(17,1 %), bolnišnice (16,5 %), trgovine (8,1 %), najmanj pa restavracije s hitro prehrano (6,5 %). V zasebnih domovih so bili najpogostejše kontaminirani podplati čevljev (39,7 %), prah na tleh (33,3 %) in površine v kopalnici (33,3 %). Iz raziskave je mogoče sklepati, da je vnos spor na podplatih čevljev pomemben vir kontaminacije zasebnih domov (Alam in sod., 2014).

2.2.2.2 Živali

Bakterija *C. difficile* je bila izolirana pri večini sesalcev (McBee, 1960; Dabard in sod., 1979). Najpogostejše so kolonizirane mlade živali (20 % teličkov in 90 % prašičkov) (Songer in sod., 2000). Pri živalih lahko okužba s *C. difficile* poteka različno, od blage do hude oblike, zelo pogosti so tudi asimptomatski prenašalci. Novorojene živali so pogostejše prizadete kot odrasle živali (Norman in sod., 2009).

Epidemiologija *C. difficile* pri rejnih živalih se je od začetka enaindvajsetega stoletja spremenila, saj je bila bakterija prej le redko odkrita (Al Saif in Brazier, 1996), kasneje pa so ugotovili, da lahko povzroča okužbe pri živalih. Bakterija *C. difficile* je pomemben povzročitelj bolezni tako pri odraslih konjih, kot pri žrebetih (Båverud in sod., 1997; Weese in sod., 2001). Do 44 % obolelih žrebet (Båverud in sod., 2003) in od 4,9 do 8,4 % obolelih odraslih konj (Medina-Torres in sod., 2011; Kecerova in sod., 2019) izloča *C. difficile*. Izločanje bakterij je pogostejše pri mladih konjih in zdravljenju z antibiotiki (Båverud in sod., 2003; Gustafsson in sod., 2004), lahko pa bakterije izločajo tudi zdrave živali (Weese in sod., 2001; Båverud in sod., 2003; Schoster in sod., 2015). Tudi pri prašičih je *C. difficile* pomemben patogen, predvsem za prašičke mlajše od desetih dni (Yaeger in sod., 2007; Arruda in sod., 2013). Visok odstotek mladih prašičev z iztrebki izloča *C. difficile*, s starostjo pa se odstotek pozitivnih prašičev znižuje. Prašički stari do 14 dni izločajo bakterije v 27 do 100 % (Alvarez-Perez in sod., 2009; Avbersek in sod., 2009; Norman in sod., 2009; Hopman in sod., 2011; Fry in sod., 2012; Alvarez-Perez in sod., 2013; Hawken in sod., 2013; Norén in sod., 2014; Stein in sod., 2017; Krutova in sod., 2018), medtem ko bakterije izloča le še do 4 % pitancev (Alvarez-Perez in sod., 2009; Hawken in sod., 2013; Cho in sod., 2015; Kim in sod., 2018). Kljub temu lahko bakterijo izloča tudi od 4 do 50 % svinj, kar je lahko posledica stresa med brejostjo in prasiatvijo (Norman in sod., 2009; Hopman in sod., 2011; Fry in sod., 2012; Norén in sod., 2014; Stein in sod., 2017; Kim in sod., 2018; Krutova in sod., 2018).

Različne raziskave so z metodo WGS dokazale, da ni mogoče razlikovati med humanimi in prašičjimi izolati *C. difficile* (Debast in sod., 2009; Keessen in sod., 2013; Knetsch in sod., 2014), kar predstavlja skrb zaradi možnosti zoonotskega prenosa ali prenosa *C. difficile* s hrano. Pri govedu ima *C. difficile* manjši pomen, dokazana pa je povezava med diarejo pri teletih in prisotnostjo *C. difficile* in njenih toksinov v iztrebkih (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Magistrali in sod., 2015). Tudi zdravo govedo lahko izloča *C. difficile*, pogosteje pa jo izločajo mlada teleta (Costa in sod., 2011; Knight in sod., 2013; Magistrali in sod., 2015; Bandelj in sod., 2016; Rodriguez in sod., 2017; Bandelj in sod., 2018). Pri ovcah in kozah je na tem področju malo raziskav, dokazano pa je, da majhen odstotek (od 2 do 9,5 %) zdravih ovc in koz izloča *C. difficile* (Romano in sod., 2012; Knight in Riley., 2013; Avberšek in sod., 2014).

Weese in sodelavci (2010a) so raziskovali stopnjo kolonizacije pri zdravih psih in mačkah ter dokazali prisotnost *C. difficile* pri 10 % psov in 21 % mačk. Najpogosteje so izolirali sev RT 001, ki je pogosto prisoten tudi pri ljudeh. Vsi toksigeni sevi izolirani iz iztrebkov psov in mačk v tej raziskavi so bili že ugotovljeni tudi pri ljudeh. V raziskavi, ki so jo izvedli Rabold in sodelavci (2018), so na prisotnost *C. difficile* testirali vzorce iztrebkov psov in mačk ter njihovih lastnikov. Prisotnost *C. difficile* so ugotovili le pri 3 % vzorcev iztrebkov psov in mačk ter 2,9 % vzorcev iztrebkov ljudi. Pri živalskih vzorcih so ugotovili osem, pri človeških pa dvanajst različnih PCR ribotipov bakterije, od katerih so bili trije PCR ribotipi prisotni tako pri živalih, kot pri ljudeh.

Čeprav se je vprašanje glede zoonotskega prenosa *C. difficile* pojavilo že pred več kot dvajsetimi leti in je bilo dokazano prekrivanje PCR ribotipov pri živalih in ljudeh, še vedno ni znano, ali res prihaja do prenosa bakterije z živali na ljudi in obratno (Hensgens in sod., 2012). V raziskavi, ki so jo izvedli Arroyo in sodelavci (2005) so dokazali, da se 25 % PCR ribotipov, izoliranih pri ljudeh, ujema s PCR ribotipi, ugotovljenimi pri živalih (pes, mačka, konj, tele). Podobne rezultate so opisali tudi Keel in sodelavci (2007). V različnih raziskavah so z metodama PCR ribotipizacija in/ali WGS ugotovili, da ni mogoče razlikovati med sevi *C. difficile* izoliranimi pri ljudeh in živalih, kar kaže na možnost zoonotskega prenosa (Hensgens in sod., 2012; Knetsch in sod., 2014; Rodriguez in sod., 2016; Knight in sod., 2017).

2.2.2.3 Hrana

Čeprav je bakterija *C. difficile* prisotna v hrani ter se PCR ribotipi izolirani pri ljudeh in iz hrane prekrivajo (O'Neill in sod., 1993; Lemee in sod., 2004a; Arroyo in sod., 2005), okužba preko hrane še ni bila neposredno dokazana (Hensgens in sod., 2012).

Germinacija bakterije *C. difficile* v hrani je redka, saj so za klitje spor potrebni striktno anaerobni pogoji (Paredes-Sabja in sod., 2008) ter prisotnost primarnih žolčnih kislin (predvsem tauroholat) skupaj z aminokislinami ali divalentnimi kationi (Kochan in sod., 2017; Shrestha in Sorg, 2018). Bakterija *C. difficile* je heterotrof in za produkcijo ATP molekul potrebuje črevesno fermentacijo organskih snovi, kot so aminokisline (glicin, histidin) (Wheeldon in sod., 2011).

Prisotnost *C. difficile* v svežem in procesiranem mesu, morski hrani in zelenjavi so proučevali že v mnogih raziskavah (Al Saif in Brazier, 1996; Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Bakri in sod., 2009; Rodriguez-Palacios in sod., 2009; Songer in sod., 2009; Von Abercron in sod., 2009; Weese in sod., 2009; Bouttier in sod., 2010; Hofer in sod., 2010; Jöbstl in sod., 2010; Metcalf in sod., 2010; Weese in sod., 2010b; de Boer in sod., 2011; Hensgens in sod., 2012; Pasquale in sod., 2012; Eckert in sod., 2013; Troiano in sod., 2015; Lim in sod., 2018; Tkalec in sod., 2019). Večina izolatov iz hrane je toksigenih in posledično potencialno patogenih, poleg tega so identični RT izolatov, ki so jih dokazali pri ljudeh (Marsh in sod., 2011). Bakterija *C. difficile* je lahko pogostejše prisotna pri določenih vrstah hrane, npr. v školjkah (Pasquale in sod., 2012) in organskem krompirju (Lim in sod., 2018), kjer so potrdili prisotnost v več kot 50 % pregledanih vzorcev (Tkalec in sod., 2019). V mleku in mlečnih pripravkih pa je bila *C. difficile* redko dokazana (Romano in sod., 2018).

V raziskavi, ki so jo izvedli Rodriguez-Palacios in sodelavci (2010), so proučevali vpliv temperature na preživetje spor *C. difficile* v živilih živalskega izvora. Vzorce so izpostavili temperaturi 71 °C za 120 minut, vendar so v vseh primerih po obdelavi z visoko temperaturo našli preživele spore. Opazili so logaritmično zmanjšanje preživelih spor v odvisnosti od časa. Občutljivost na temperaturo je bila po 30-ih in 60-ih minutah segrevanja močno spremenljiva, kar kaže na to, da so nekateri sevi bakterije veliko bolj odporni kot drugi. Ker je ponovno pogrevanje v domačih kuhinjah pogosto, so spore, katere so segrevali pri 71 °C za 30 minut, ponovno segreli na 85 °C. Po desetih minutah je preživelo le 10 % testiranih sevov, po 20-ih

minutah pa ni bilo preživelih sevov. Glede na raziskave vpliva toplote na druge sporogene bakterije (npr. *C. perfringens*) lahko sklepamo, da so tudi spore *C. difficile* v hrani (npr. mletem mesu) bolj odporne na toploto, saj jih ščiti debelina hrane in vsebnost maščob. Pomembnost kontaminirane hrane v epidemiologiji okužb s *C. difficile* ni poznana, vendar sposobnost preživetja spor pri priporočeni temperaturi kuhanja poveča pomembnost odkritja vloge hrane pri okužbi z bakterijo *C. difficile*.

2.2.2.3.1 Meso

Prisotnost *C. difficile* je bila pogosto ugotovljena pri rejnih in proizvodnih živalih (Keel in sod., 2007) ter v mesu iz maloprodaje (Rodriguez-Palacios in sod., 2007), kar kaže na možnost prenosa *C. difficile* preko hrane (Rupnik, 2007).

V Evropi so ugotovili nizek odstotek pozitivnih vzorcev mesa (do 3 %) (Von Abercron in sod., 2009; Bouttier in sod., 2010.; Hofer in sod., 2010; Jöbstl in sod., 2010; de Boer in sod., 2011; Ersöz in Coşansu, 2018; Tkalec in sod., 2020), medtem ko je odstotek pozitivnih vzorcev v ZDA in Kanadi veliko višji (do 44 %) (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Rodriguez-Palacios in sod., 2009; Songer in sod., 2009; Weese in sod., 2009; Weese in sod., 2010b; Lund in Peck, 2015). Glede na nekatere druge raziskave pa je na splošno prevalenca *C. difficile* v vzorcih mesa v Severni Ameriki nižja (2–20%) (Hensgens in sod., 2012). Število spor v pozitivnih vzorcih mesa je na splošno nizko (Hensgens in sod., 2012), le 20–240 spor/g govedine ali svinjine (Weese in sod., 2009) ter manj kot 100 CFU/g piščančjega mesa (Weese in sod., 2010b). Vendar kljub nizkemu odstotku pozitivnih vzorcev mesa in nizkemu številu spor v vzorcih je zaradi izjemne odpornosti spor na toplotno obdelavo in druge škodljive fizikalne in kemijske dejavnike (prisotnost kisika, radiacija, izsuševanje, alkohol, nizek pH, idr.) (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Gerding in sod., 2008) prenos okužbe s hrano še vedno možen (Weese in sod., 2010b).

Vir kontaminacije mesa še ni dobro poznan. Možno je, da pride do kontaminacije klavnih trupov s spori iz iztrebkov zaklanih živali, okolja, opreme ali od okuženih ljudi, ki rokujejo z mesom med predelavo (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Songer in sod., 2009; Tkalec in sod., 2020).

2.2.2.3.2 Morska hrana

Sedimenti rečnih delt, v katere se izlivajo reke, kontaminirane s komunalnimi odpadnimi vodami, vsebujejo spore *C. difficile* in so verjetno pomemben vir kontaminacije morske hrane. Organizmi, ki se prehranjujejo s filtriranjem vode, kot so ostrige, klapavice in ostale školjke, lahko bioakumulirajo različne živalske in človeške patogene (Troiano in sod., 2015).

Troiano in sodelavci (2015) so dokazali prisotnost *C. difficile* v 3,9 % vzorčenih školjk, Norman in sodelavci (2014) v 4,5 % vzorčenih lupinarjev in rib, Metcalf in sodelavci (2011) pa v 4,8 % vzorcev morske hrane in rib. V raziskavi, ki so jo izvedli Pasquale in sodelavci (2012), pa so dokazali prisotnost *C. difficile* v kar 49 % preiskovanih vzorcev školjk, od tega je bilo 58 % izolatov toksigenih.

2.2.2.3.3 Zelenjava

V raziskavi, ki so jo izvedli Tkalec in sodelavci (2019), so določili 18,2 % *C. difficile* pozitivnih vzorcev pri testirani surovi zelenjavi, kupljeni ali vzgojeni v Sloveniji. To predstavlja višji delež kot v drugih državah, kjer je dokazana razširjenost od 2,3 do 7,5 % (Al Saif in Brazier, 1996; Bakri in sod., 2009; Metcalf in sod., 2010; Eckert in sod., 2013). To je verjetno predvsem zaradi visokega deleža kontaminiranega krompirja (28 %) in višjega deleža kontaminirane listnate zelenjave (9,4 %), eden izmed razlogov pa bi lahko bila uporabljena metoda za osamitev DNA bakterije (Tkalec in sod., 2019). Na splošno je koreninska zelenjava (koreni, gomolji) pogostejše kontaminirana s *C. difficile* kot druge vrste zelenjave, zelo verjetno zaradi neposrednega stika s kontaminirano zemljo (Al Saif in Brazier, 1996; Metcalf in sod., 2010; Lim in sod., 2018; Tkalec in sod., 2019). Čeprav so možni različni viri kontaminacije zelenjave (gnojila, zemlja, voda, postopek predelave hrane, postopek trženja), prekrivanje PCR ribotipov izolatov iz zelenjave in zemlje (9 od 17) kaže, da je zemlja prav tako lahko pomemben vir kontaminacije (Tkalec in sod., 2019).

2.3 DIAGNOSTIKA

2.3.1 Klasične mikrobiološke preiskave

Limbago in sodelavci (2012) so izvedli raziskavo, s katero so želeli določiti optimalno metodo za izolacijo *C. difficile* iz mesa. Preizkusili so tri različne obogatitvene medije, in sicer *C. difficile* moksalaktam norfloksacin (CDMN) bujon (ThermoFisher Scientific, ZDA) z 0,1 % tauroholatom in brez toplotnega šoka, možgansko-srčni infuzijski bujon (BHI, angl. Brain Heart Infusion) (ThermoFisher Scientific, ZDA) z 0,1 % tauroholatom (BHIT) in brez toplotnega šoka ter BHIT s toplotnim šokom. Po obogatitvi vzorcev mleto govedine, inokuliranih s suspenzijo spor *C. difficile*, so po enem, dveh in petih dneh precepili vzorce neposredno na trdna gojišča ali pa so pred inokulacijo izvedli še šok z etanolom ali toploto. Uporabili so tri različna trdna gojišča – anaerobni krvni agar (anaBAP, angl. anaerobic Blood Agar Plate) (PathCon Laboratories, ZDA), cikloserin cefoksitin fruktozni agar s tauroholatom (CCFA-ST) (ThermoFisher Scientific, ZDA) in CDMN agar s tauroholatom. Najboljše rezultate so ugotovili po tri- ali petdnevni inkubaciji obogatitvenega bujona BHIT brez toplotnega šoka. Vsa tri trdna gojišča so se izkazala za enako učinkovita. Glede na učinkovitost, ceno in enostavnost uporabe so predlagali metodo, in sicer inkubacija 3–5 dni v obogatitvenem bujonu BHI in nato presaditev alikvotov tretiranih z alkoholnim šokom in netretirane alikvote na trdne plošče anaBAP in CCFA-ST.

Pred inkubacijo na trdnem gojišču je priporočljivo izvesti večdnevno obogatitev v tekočem gojišču, ki izboljša občutljivost metode za 18–20 % (Tenover in sod., 2010). Biasizzo in sodelavci (2018) so primerjali učinkovitost obogatitvenih medijev za vzorce mesa in mesnih pripravkov, ki so jih inokulirali z različnimi sevi *C. difficile*. Uporabili so cikloserin cefoksitin fruktozni bujon z dodatkom tauroholične kisline, D-cikloserina, cefoksitina in lizocima (TCCFB+L), cikloserin cefoksitin manitolni bujon s tauroholatom in lizocimom (CCMB-TAL) ter bujon TCCFB+L z dodatkom CDMN in lizocima (CDMN+L). *C. difficile* so dokazali z izolacijo na trdnih ploščah in metodo qPCR. Ugotovili so, da je TCCFB+L najbolj učinkovit obogatitveni bujon in priporočili štiri dnevno inkubacijo pri 37 °C za dokazovanje *C. difficile* z metodo qPCR in sedem dnevno inkubacijo za dokazovanje *C. difficile* z izolacijo na cikloserin cefoksitin fruktoznem agarju (CCFA) po predhodnem alkoholnem šoku.

Za diagnostiko okužb ljudi s *C. difficile* se klasična bakteriološka preiskava v laboratorijih po Evropi čedalje manj uporablja, v ZDA pa je skoraj ne uporabljajo več. Čeprav je metoda izredno občutljiva, je za izvedbo potrebno veliko časa, za ločitev toksigenih sevov od netoksigenih pa je potrebno opraviti dodatne analize izolatov (molekularne metode, toksigena kultura) (Peterson in Kelly, 1993; Blossom in McDonald, 2007). Bakterija je izredno občutljiva že na zelo nizke koncentracije kisika v okolju, zato je med klasično bakteriološko preiskavo pomembno stalno ohranjanje anaerobnih pogojev (Edwards in sod., 2013). Kljub temu ima klasična bakteriološka preiskava še vedno velik pomen, saj je toksigena kultura najbolj občutljiva metoda (94–100 %) za dokaz bakterije (Sloan in sod., 2008; Badger in sod., 2012), poleg tega pa omogoča dokaz aktivne okužbe (žive bakterije), testiranje občutljivosti za antibiotike, preučevanje virulence in zaporedje genoma (Lagier in sod., 2015)

2.3.2 Molekularne preiskave

2.3.2.1 Osamitev nukleinskih kislin *C. difficile*

Zaradi pomembnosti okužb s *C. difficile* se za dokazovanje bakterije pogosto uporabljajo tehnike pomnoževanja nukleinskih kislin (Song in sod., 2018). Občutljivost teh metod lahko izboljšamo s predhodno obogatitvijo vzorca in/ali učinkovitejšo metodo osamitve DNA (Houser in sod., 2010; Avberšek in sod., 2013).

Na tržišču je vedno več hitrih in učinkovitih komercialnih kompletov reagentov za osamitev nukleinskih kislin. Kljub temu pa za osamitev nukleinskih kislin iz bakterije *C. difficile* niso določene standardizirane ali priporočene metode (Metcalf in Weese, 2012). Plašč spore *C. difficile* je zelo odporen in ga je težko lizirati, zato je sprostitve nukleinskih kislin iz spore omejena, kar znižuje učinkovitost metod za osamitev DNA (Miller in sod., 1999; Dauphin in sod., 2009). Na voljo so različni postopki za osamitev DNA, kot so encimska, kemična ali toplotna liza, mehansko razbitje s kroglicami, sonifikacija ali z magnetnimi kroglicami, na katere se veže DNA ter njihove kombinacije (Nylund in sod., 2010).

Po Gramu pozitivne bakterije lahko učinkovito liziramo z encimom lizocim, medtem ko so kemijske raztopine za lizo običajno neučinkovite (Salazar in Asenjo, 2007; Wielinga in sod.,

2011). Bolj učinkovita je kombinirana uporaba encimskih in kemijskih metod lize (Luna in sod., 2006; Nadkarni in sod., 2009), vendar je uporaba še vedno nepraktična, saj je obdelava dolgotrajna, liza odpornih bakterij pa je nezadostna. Za odporne bakterije z debelo celično steno so običajno potrebne mehanske metode lize, kot je razbijanje s kroglicami (Nylund in sod., 2010; Vandeventer in sod., 2011). Za izboljšanje lize odpornih bakterij lahko kombiniramo metodo razbijanja s kroglicami s kemijskimi in/ali encimskimi metodami lize (Anderberg in sod., 1995; Käser in sod., 2009). Osamitev DNA iz spor je zamudna, težavna in uporaba določenih kemikalij ali postopkov mehanske lize lahko poškoduje bakterijsko DNA (Aslan in sod., 2008).

Hrana ima že sama po sebi zelo raznoliko in kompleksno sestavo, kar je tudi potrebno upoštevati pri izboru metode za osamitev DNA. Visoka vsebnost maščob in beljakovin ter spremenljiv razpon pH vrednosti lahko negativno vplivajo na metode za osamitev DNA (Basu in sod., 2013). Sestavine hrane, kot so maščobe, beljakovine, divalentni kationi (kalcij) in druge organske snovi, lahko delujejo kot inhibitorji PCR reakcije (Rossen in sod., 1992; Bickley in sod., 1996; Quigley in sod., 2012). Specifične lastnosti hrane lahko onemogočijo ločitev mikroorganizmov od sestavin hrane in tako je posledično onemogočena optimalna liza celic in sprostitve DNA (Erickson in Kornacki, 2003; Leishman in sod., 2010).

Idealni komercialni komplet reagentov za osamitev nukleinskih kislin *C. difficile* bi moral omogočiti učinkovito lizo vegetativnih celic in spor, odstranitev inhibitorjev, ki bi lahko vplivali na potek encimskih reakcij, moral bi biti neodvisen od lastnosti seva bakterije, preprosto izvedljiv, hiter in poceni (Rantakokko-Jalava in Jalava, 2002).

V raziskavi, ki so jo izvedli Avberšek in sodelavci (2017), so uporabili tri različne postopke za osamitev DNA iz spor *C. difficile* v iztrebkih prašičev, inokuliranih s spori *C. difficile* v različnih koncentracijah in vzorcih iztrebkov prašičkov, vzorčenih na farmi. Za izvedbo postopka A so uporabili QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Nemčija), za izvedbo postopka B pa enak komplet reagentov, vendar so vzorec pred inkubacijo na 95 °C tudi mehansko obdelali v MagNA Lyser instrumentu (Roche Diagnostics, Nemčija) (angl. bead beating). Za izvedbo postopka C so uporabili komplet reagentov DNA Isolation from Complex Samples (ICS) (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija). Ta komplet reagentov je namenjen osamitvi DNA iz kompleksnih vzorcev in bakterij z debelo celično steno

(Avberšek in sod., 2017). Učinkovitost osamitve DNA iz spor so preverili z metodo qPCR (Avberšek in sod., 2011; Avberšek in sod., 2013). Osamitev DNA s postopkom C se je izkazala za najbolj občutljivo, kar pomeni, da je za optimalno osamitev DNA najboljša kombinacija mehanske in encimske/kemijske metode lize spor.

V raziskavi, ki sta jo izvedla Metcalf in Weese (2012), so primerjali štiri komercialne komplete reagentov za osamitev DNA iz suspenzije bakterij *C. difficile*, in sicer Maxwell 16 SEV Tissue DNA Preparation kit (Promega, ZDA), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Nemčija), MagNA Pure LC DNA Isolation kit III (Roche Diagnostics, Nemčija) in Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc., ZDA). DNA so osamili iz vzorcev z vegetativnimi celicami in vzorcev s spori *C. difficile* PCR ribotipov 027 in 078. Najvišje koncentracije DNA so pridobili iz vegetativnih celic in spor pri osamitvi s kompletom reagentov MagNA Pure LC DNA Isolation kit III, le pri osamitvi DNA iz spor PCR ribotipa 078 so dokazali najvišjo koncentracijo DNA s pomočjo Maxwell 16 SEV Tissue DNA Preparation kit.

V raziskavi, ki so jo izvedli Freifeld in sodelavci (2012), so razvili novo kombinirano metodo za hitro osamitev DNA in dokazovanje *C. difficile* z metodo PCR v iztrebkih (LMR/PCR) ter primerjali ugotovljene rezultate z ali brez uporabe metode razbitja s kroglicami. Ugotovili so, da so produkti PCR v primerih osamitve DNA s kroglicami nekoliko boljši, predvsem pri nižjih koncentracijah DNA.

V raziskavi, ki so jo izvedli Grzeškowiak in sodelavci (2016), so želeli izboljšati osamitev DNA iz spor *C. difficile* v vzorcih prašičjih iztrebkov. Pred postopkom osamitve DNA s komercialnim kompletom reagentov QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Nemčija), so uporabili različne fizikalne postopke, kot so segrevanje v mikrovalovni pečici, večkratno razbitje s kroglicami in kombinacija obeh. Učinke različnih postopkov so primerjali s pomočjo qPCR. Najboljše rezultate so ugotovili ob predhodni obdelavi vzorca z večkratnim razbijanjem s kroglicami.

V raziskavi, ki so jo izvedli Yoon in sodelavci (2016), so primerjali dve metodi za osamitev DNA *C. difficile* iz kliničnih vzorcev iztrebkov. Primerjali so komplet reagentov na osnovi magnetnih kroglic (Stool DNA/RNA Purification kit; Sigma-Aldrich, ZDA) s kompletom

reagentov na osnovi membranskih kolon (QIAamp DNA Stool Mini kit; Qiagen, Nemčija). S kompletom reagentov na osnovi magnetnih kroglic so dokazali večje količine DNA *C. difficile*.

2.3.2.2 Dokazovanje prisotnosti DNA *C. difficile* z metodo qPCR

Za dokazovanje prisotnosti DNA *C. difficile* najpogosteje uporabljamo metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času oz. qPCR (Quinn in sod., 2011).

Z metodo qPCR pozitivno reakcijo zaznamo kot kopičenje fluorescenčnega signala, medtem ko je vrednost cikla praga reakcije (Ct) (angl. threshold cycle) obratno sorazmerna začetni količini DNA v vzorcu. To pomeni, da nižja kot je vrednost Ct, več DNA je bilo v začetnem vzorcu in obratno (Heid in sod., 1996; Wong in Medrano, 2005). Tako mora biti teoretično med 10x redčitvami nukleinske kisline razlika v vrednosti Ct 3,36. Tarčni geni, ki se uporabljajo za dokazovanje *C. difficile* so najpogosteje triozna fosfat izomeraza (*tpi*) (Lemee in sod., 2004b), geni, ki kodirajo različne toksine (Songer in sod., 2009), gen 16S rRNA (Penders in sod., 2005) ter gen, ki določa encim glutamat dehidrogenazo (*gdh*) (Paltansing in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBIRA IN PRIPRAVA VZORCEV

V prvem delu raziskave smo analizirali vzorce mletega mesa, katere smo inokulirali z različnimi sevi *C. difficile* in znanim številom bakterij. Vzorce mletega mesa (10 g mešanice govejega in svinjskega mesa) smo inokulirali s tremi različnimi sevi *C. difficile*: S1 – ATCC 9689, S2 – T7/MB izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri teletu ter S3 – CD 400 izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri prašiču. Sev S1 pripada PCR ribotipu 001 in toksinotipu 0, ki proizvaja toksina A in B, sev S2 pripada PCR ribotipu 014/020 in toksinotipu 0, ki proizvaja toksina A in B, sev S3 pa pripada PCR ribotipu 045 in toksinotipu V, ki proizvaja toksine A, B in binarni toksin.

Vzorce mletega mesa smo inokulirali s pripravljeno kulturo treh sevov. Posamezne seve smo oživili tako, da smo jih nasadili na krvni agar (Blood agar base No. 2, Oxoid, Velika Britanija) z dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi. Po enodnevni inkubaciji na 37 °C v anaerobnih pogojih smo kolonijo posameznega seva prenesli v bujon CMM (Cooked Meat Medium, Oxoid, Velika Britanija) ter inkubirali dva dni pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Anaerobne pogoje smo ustvarili z generatorjem za anaerobno inkubacijo bakterij (GENbag anaer, Biomerieux, Francija) v polikarbonatnih loncih (Oxoid, Velika Britanija). V 9 ml peptonsko slane raztopine (Natrium chlorid, Merck, Nemčija; Proteose Pepton, Biolife, Italija) smo odmerili po 100 µL iz posameznih bakterijskih kultur v CMM ter suspenzije nato še razredčili, da smo dobili željene koncentracije posameznih sevov bakterij *C. difficile*. Koncentracijo *C. difficile* v pripravljenih inokulumih smo preverili tako, da smo jih vzporedno nasadili tudi na krvni agar ter po dvodnevni inkubaciji pri 37 °C v anaerobnih pogojih prešteli kolonije.

Da bi ugotovili, ali lastnosti različnih sevov lahko vplivajo na uspešnost osamitve in posledično dokazovanje DNA, smo vzorce mletega mesa inokulirali z vsakim sevom posebej ter s tremi različnimi koncentracijami dvodnevne *C. difficile* obogatitvene kulture: 10–50 CFU/vzorec, 50–100 CFU/vzorec in 500–1000 CFU/vzorec. Kot kontrolo celotnega postopka smo vzporedno s testiranimi vzorci mletega mesa testirali posamezne seve v obogatitvenem bujonu brez mesa (pozitivna kontrola), vzorec ne-inokuliranega mletega mesa ter vzorec samega obogatitvenega bujona (negativni kontroli).

V drugem delu raziskave smo analizirali vzorce različnih vrst mesa in mesnih pripravkov, vključno z začinenimi in mariniranimi živili, ter jih inokulirali z bakterijsko kulturo *C. difficile*. Inokulum smo pripravili kot mešanico vseh treh sevov v enakih razmerjih (po 100 µL), katero smo razredčili s peptonsko slano raztopino (Merck, Nemčija) tako, da smo dosegli koncentracijo 5–20 CFU/vzorec. Različne vrste mesa, ki smo jih uporabili, so bile pri vzorcih 1 in 4 masa za čevapčiče, vzorcu 2 pleskavice, vzorcih 3, 6, 8 in 9 meso piščancev brojlerjev, vzorcu 5 marinirana svinjska vratovina ter vzorcu 7 piščančji vok. Inokulirani vzorci mesa po 10 g so bili v sterilni plastični vrečki shranjeni v zamrzovalniku na –70 °C do izvedbe analiz.

3.2 OBOGATITEV VZORCEV

Število bakterij *C. difficile* v hrani je pogosto nizko, zato smo vse vzorce inokuliranega mesa obogatili v gojišču cikloserin cefoksitin fruktozni bujon z dodatkom tauroholične kisline lizocima (TCCFB+L) in jih inkubirali štiri dni v anaerobnih pogojih pri 37 °C.

Obogatitveno gojišče TCCFB+L je sestavljeno iz 40 g/l proteoznega peptona (Bioline, Italija), 5,0 g/l dinatrijevega hidrogenfosfata (Merck, Nemčija), 2,0 g/l natrijevega klorida (Merck, Nemčija), 0,1 g/l magnezijevega sulfata (Sigma-Aldrich, ZDA), 6,0 g/l fruktoze D (–) (ThermoFisher Scientific, ZDA) in 1,0 g/l natrijeve soli tauroholične kisline (Merck, Nemčija). Po avtoklaviranju in ohlajanju smo osnovnemu bujonu dodali še dodatek za *C. difficile*, in sicer 250,0 mg/l D-cikloserina, 8,0 mg/l cefoksitina (Oxoid, Velika Britanija) in 0,01 g/l lizocima (Serva, Nemčija) (Biasizzo in sod., 2018).

Za obogatitev smo uporabili sterilno plastično vrečko, v kateri smo 10 g inokuliranega vzorca mesa zalili z 90 ml gojišča TCCFB+L. Vsebinsko smo eno minuto homogenizirali v peristaltičnem mešalcu (BegMixer, Francija). Nato smo vrečke z vzorci premestili v anaerobne lonce (Oxoid, Velika Britanija) z generatorjem anaerobnih pogojev (GENbag anaer, Biomerieux, Francija), jih neprodušno zaprli in inkubirali štiri dni pri 37 °C (Biasizzo in sod., 2018).

3.3 OSAMITEV DNA *C. DIFFICILE*

Za osamitev DNA bakterije *C. difficile* smo uporabili tri različne komercialne komplete reagentov, in sicer foodproof Sample Preparation kit II (FP) (Biotecon Diagnostics, Nemčija), High Pure PCR Template Preparation kit (HP) (Roche Diagnostics, Nemčija) in DNA Isolation from Complex Samples (ICS) (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija). Pri tem smo sledili navodilom proizvajalcev. Epruvete z osamljeno DNA smo ustrezno označili in do nadaljnje uporabe hranili pri -70°C .

V raziskavi smo se osredotočili na primerjavo različnih metod lize, kot so kemijska, encimska (proteinaza K, lizocim), obdelava z visoko temperaturo in mehanska (razbijanje s kroglicami). Komplet reagentov FP za lizo celic izkorišča le encimsko-kemijske (pufer za liziranje, lizocim, proteinaza K) postopke. Komplet reagentov HP vključuje poleg encimsko-kemijskih (pufer za liziranje, lizocim, proteinaza K) postopkov tudi dodaten pufer za odstranitev inhibitorjev. Komplet reagentov ICS pa za lizo celic kombinira mehanske (razbijanje s kroglicami na MagnaLyser-ju), encimsko-kemijske (D pufer, proteinaza K) postopke in toplotno obdelavo vzorcev (inkubacija pri 100°C).

3.3.1 Osamitev DNA s kompletom reagentov foodproof Sample Preparation kit II

V 1,5 ml epruveto smo prenesli 1 ml tekočega gojišča in nato centrifugirali 5 min pri $8000\times g$. Supernatant smo odstranili in sediment resuspendirali v $200\ \mu\text{l}$ pufru za liziranje. Dodali smo $10\ \mu\text{l}$ lizocima, dobro premešali in inkubirali 10 min pri 37°C . Nato smo dodali $200\ \mu\text{l}$ pufru za vezavo in $40\ \mu\text{l}$ proteinaze K ter vsakič dobro premešali. Sledila je inkubacija 10 min pri 72°C . Nato smo dodali še $100\ \mu\text{l}$ izopropanola in centrifugirali 15 sek pri $12000\times g$. Celotno mešanico smo nato prenesli v epruveto s filtrom in centrifugirali 1 min pri $5000\times g$. Supernatant v zbirni epruveti smo zavrgli, v epruveto s filtrom dodali $450\ \mu\text{l}$ pufru za spiranje in centrifugirali 1 min pri $5000\times g$. Spiranje smo še enkrat ponovili, zavrgli zbirno epruveto s supernatantom in centrifugirali 10 sek pri maksimalnih obratih, da smo odstranili ves pufer za spiranje. Epruveto s filtrom smo prenesli v novo 1,5 ml epruveto, dodali $50\ \mu\text{l}$ elucijskega pufru,

predhodno segretega na 70 °C ter inkubirali pri sobni temperaturi 1–2 min. Epruveto smo nato centrifugirali 1 min pri 5000xg. V 1,5 ml epruveto smo zbrali osamljeno DNA.

3.3.2 Osamitev DNA s kompletom reagentov High Pure PCR Template Preparation kit

V 1,5 ml epruveto smo prenesli 1 ml tekočega gojišča in centrifugirali 5 min pri 10000xg. Supernatant smo odstranili, sediment pa resuspendirali v 200 µl PBS ter dodali 200 µl Tissue Lysis Buffer in 15 µl lizocima (10 mg/ml v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Sledila je inkubacija 15 min na 37 °C. Nato smo dodali 200 µl pufra za vezanje in 40 µl proteinaze K ter inkubirali 10 min na 70 °C. Potem smo dodali še 100 µl izopropanola. Vso mešanico smo prenesli v epruveto s filtrom in centrifugirali 1 min pri 8000xg. Supernatant v zbirni epruveti smo zavrgli in spojili epruveto s filtrom z novo zbirno epruveto. V epruveto s filtrom smo dodali 500 µl pufra za odstranitev inhibitorjev in centrifugirali 1 min pri 8000xg. Ponovno smo zavrgli supernatant, v epruveto s filtrom dodali 500 µl pufra za spiranje in centrifugirali 1 min pri 8000xg. Spiranje smo še enkrat ponovili, zavrgli zbirno epruveto s supernatantom in centrifugirali 10 sek pri maksimalnih obratih, da smo odstranili ves pufer za spiranje. Epruveto s filtrom smo prenesli v novo 1,5 ml epruveto, dodali 200 µl ogretega (70 °C) elucijskega pufra in centrifugirali 1 min pri 8000xg. V 1,5 ml epruveto smo zbrali osamljeno DNA.

3.3.3 Osamitev DNA s kompletom reagentov DNA Isolation from Complex Samples

V MagnaLyser epruveto s kroglicami smo prenesli 1,5 ml tekočega gojišča in centrifugirali 5 min pri 10000xg. Supernatant smo odstranili in dodali 392 µl DNAid Complex D pufra in 8 µl proteinaze K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, ZDA). Nato smo vzorec trikrat obdelali s stresanjem v stresalniku MagnaLyser (Roche Diagnostics, Švica) 45 sek pri 6400 obratov/min. Po vsakem stresanju je sledila inkubacija, in sicer po prvih dveh za 15 min pri 56 °C, po tretjem stresanju pa za 10 min pri 100 °C. Po končanem tretjem stresanju smo vzorec ohladili na sobno temperaturo in ga centrifugirali 5 min na 10000xg. Vzorec smo potem pazljivo prenesli v novo 2 ml epruveto, dodali trikratni volumen volumna vzorca DNAid Complex B pufra, vorteksirali

in za kratek čas centrifugirali. Ves vzorec smo postopoma, po 700 µl vzorca, prenesli v epruveto s filtrom, inkubirali za 1 min na sobni temperaturi in nato centrifugirali za 1 min pri 16000xg. Supernatant v zbirni epruveti smo zavrgli, v epruveto s filtrom dodali 600 µl DNAid Complex W pufra in centrifugirali 1 min pri 16000xg. Ponovno smo zavrgli supernatant, v epruveto s filtrom dodali 500 µl W pufra in centrifugirali 5 min pri 16000xg. Supernatant smo zavrgli in ponovno centrifugirali za 1 min pri 16000xg. Epruveto s filtrom smo nato prenesli v novo 1,5 ml epruveto, dodali 100 µl DNAid Complex E pufra, inkubirali 1 min pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 min pri 16000xg. V 1,5 ml epruveto smo zbrali osamljeno DNA.

3.4 DOKAZ DNA *C. DIFFICILE* Z METODO qPCR

Za dokaz prisotnosti DNA *C. difficile* smo uporabili metodo qPCR s sondo TaqMan specifično za gen 16S rRNA. qPCR smo izvedli s pomočjo kompleta reagentov FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics, Nemčija). Reakcijska mešanica s končnim reakcijskim volumnom 25 µl je vsebovala: 2 µl vzorca DNA, 10 µl vode brez DNaz in RNaz, 12,5 µl qPCR encimske mešanice (master miks FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics, Nemčija)), 0,05 µl TaqMan sonde CD 16S (5'-FAM-CCACGCGTTACTCACCCGTC CG-3') (100 pmol/µl) (Sigma-Aldrich, ZDA) ter po 0,225 µl pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (angl. forward primer) CD 16S (5'-TTGAGCGATT TACTTCGGTAAAGA-3') (100 pmol/µl) in negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida (angl. reverse primer) CD 16S (5'-TGTACTGGCTCACCTTTGATATTCA-3') (100 pmol/µl) (Sigma-Aldrich, ZDA) (Penders in sod., 2005; Bandelj in sod., 2013).

DNA smo pomnoževali na aparaturi MX3005P (Stratagene, ZDA). Temperaturni pogoji, pod katerimi je potekala reakcija, so vključevali začetno aktivacijo encima UNG (uracil-DNA N-glikozilaza) za preprečitev navzkrižne kontaminacije 2 minuti pri 50 °C. Sledila je 10-minutna denaturacija z aktivacijo FastStart Taq DNA polimeraze pri 95 °C. V nadaljnjih 45 temperaturnih ciklih je 15 sekund dolgi denaturaciji pri 95 °C sledilo enominutno prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde ter podaljševanje verige pri 60 °C.

Prag reakcije smo nastavili ročno na 0,1. Ugotovljene vrednosti Ct smo analizirali. Pri vzorcih, katerih vrednosti Ct so bile med 38 in 40, smo ponovno izvedli qPCR. Za vzorce, katerih vrednosti Ct so bile nad 40 smo ocenili, da v njih ni bilo prisotne DNA *C. difficile*.

4 REZULTATI

4.1 VZORCI MLETEGA MESA, INOKULIRANI S TREMI RAZLIČNIMI SEVI *C. DIFFICILE* PRI TREH RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

4.1.1 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom *C. difficile* S1

Vzorci mletega mesa smo inokulirali s sevom *C. difficile* S1 – ATCC 9689. Pri osamitvi DNA s komercialnima kompletoma reagentov FP in ICS smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec in najvišjo pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec. Pri osamitvi DNA s komercialnim kompletom reagentov HP pa smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec in najvišjo pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec (Tabela 1, Slika 2).

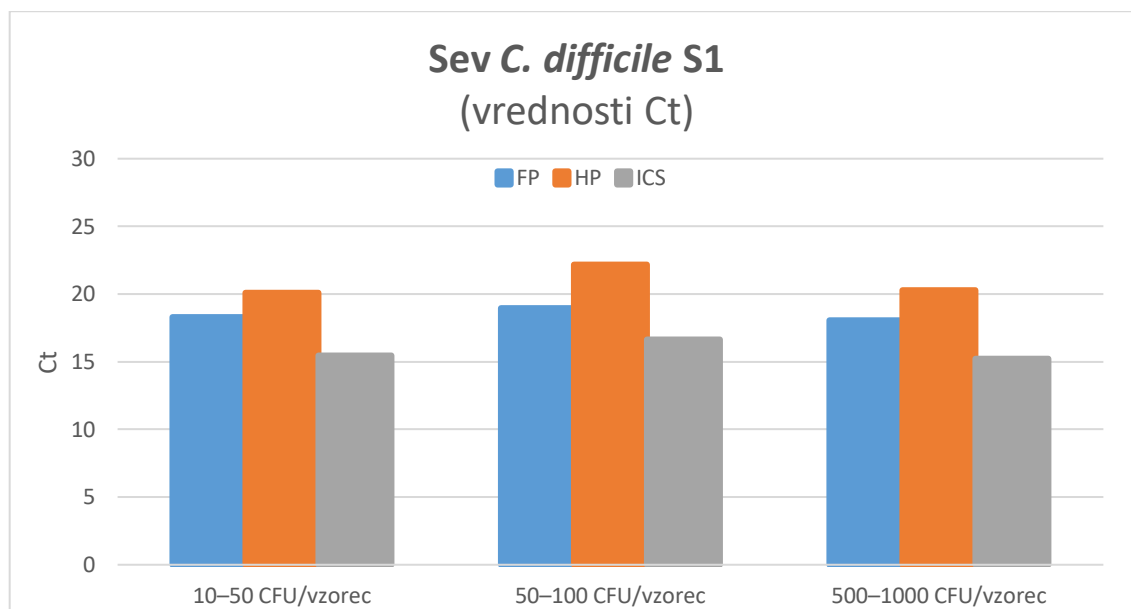
Tabela 1: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s *C. difficile* S1, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 1: Comparison of qPCR results (Ct value) for samples of minced meat, inoculated with *C. difficile* S1, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Sev <i>C. difficile</i> S1 (vrednosti Ct)	10–50 CFU/vzorec	50–100 CFU/vzorec	500–1000 CFU/vzorec
FP	18,30	18,95	18,08
HP	20,08	22,17	20,29
ICS	15,46	16,64	15,22

Pri vseh treh koncentracijah (10–50, 50–100 in 500–1000 CFU/vzorec) smo najnižje vrednosti Ct ugotovili pri osamitvi DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov ICS, najvišje pa s HP (Tabela 1, Slika 2). Opazimo lahko, da smo pri vseh treh komercialnih kompletih reagentov najvišje vrednosti Ct ugotovili pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec, medtem ko so

si vrednosti Ct pri koncentracijah 10–50 in 500–1000 CFU/vzorec pri posameznem kompletu reagentov zelo podobne (Tabela 1, Slika 2).



Slika 2: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami *C. difficile* S1, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).

Figure 2: Illustration of qPCR results for minced meat samples, inoculated at three different concentrations with *C. difficile* S1, from which DNA was extracted with three different commercial kits (FP, HP and ICS).

4.1.2 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom *C. difficile* S2

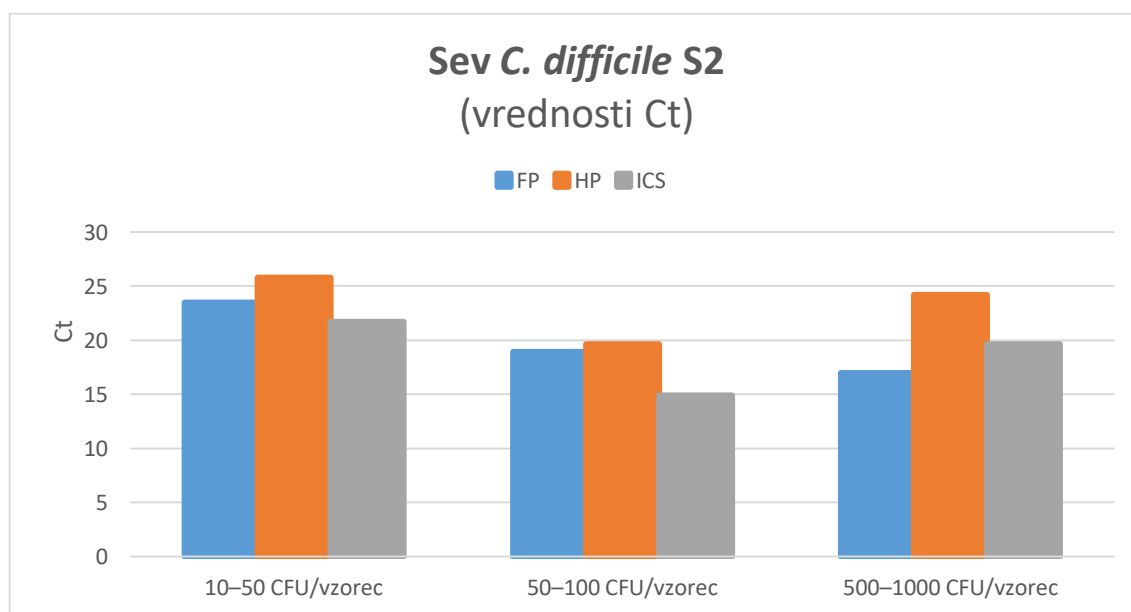
Vzorci mletega mesa smo inokulirali s sevom *C. difficile* S2 – T7/MB. Pri osamitvi DNA s komercialnim kompletom reagentov FP smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec in najvišjo pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec. Pri osamitvi DNA s kompletoma reagentov HP in ICS pa smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec in najvišjo pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec (Tabela 2, Slika 3).

Tabela 2: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s *C. difficile* S2, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 2: Comparison of qPCR results (Ct value) for samples of minced meat, inoculated with *C. difficile* S2, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Sev <i>C. difficile</i> S2 (vrednosti Ct)	10–50 CFU/vzorec	50–100 CFU/vzorec	500–1000 CFU/vzorec
FP	23,46	18,92	16,98
HP	25,78	19,63	24,19
ICS	21,70	14,92	19,61

Pri koncentracijah 10–50 in 50–100 CFU/vzorec smo najnižje vrednosti Ct ugotovili pri osamitvi DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov ICS, najvišje pa s HP. Pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec pa smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri osamitvi DNA s pomočjo kompleta reagentov FP, srednjo z ICS in najvišjo s HP (Tabela 2, Slika 3).



Slika 3: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami *C. difficile* S2, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).

Figure 3: Illustration of qPCR results for minced meat samples, inoculated at three different concentrations with *C. difficile* S2, from which DNA was extracted with three different commercial kits (FP, HP and ICS).

4.1.3 Vzorci mletega mesa, inokulirani s sevom *C. difficile* S3

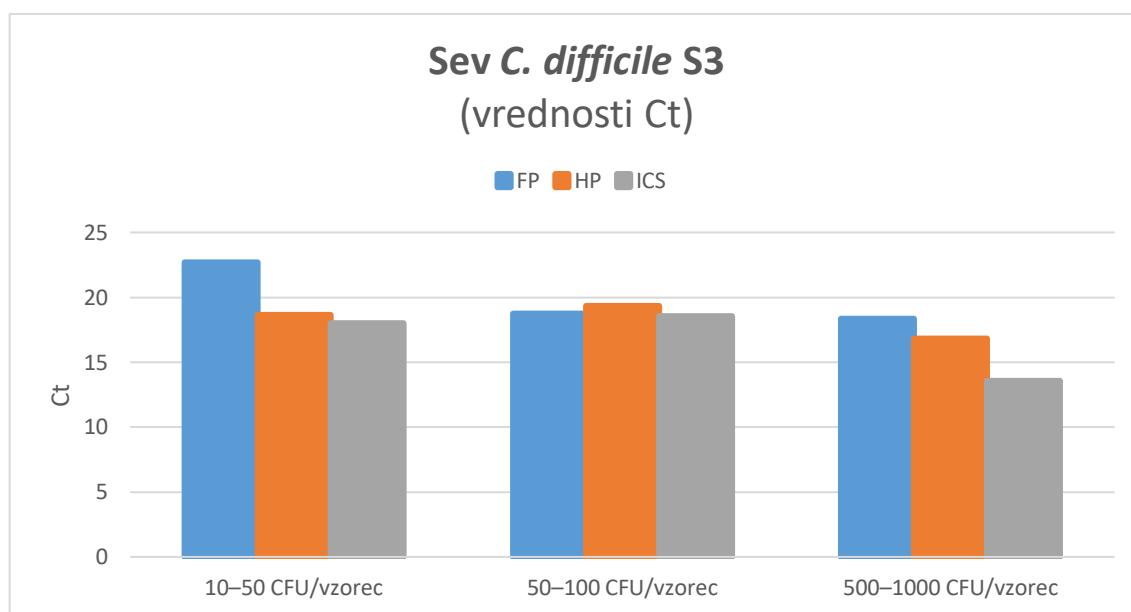
Vzorci mletega mesa smo inokulirali s sevom *C. difficile* S3 – CD 400. Pri osamitvi DNA s komercialnim kompletom reagentov FP smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec in najvišjo pri 10–50 CFU/vzorec. Pri osamitvi DNA s kompletoma reagentov HP in ICS pa smo najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 1000 CFU/vzorec in najvišjo pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec (Tabela 3).

Tabela 3: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce mletega mesa, inokulirane s *C. difficile* S3, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 3: Comparison of qPCR results (Ct value) for samples of minced meat, inoculated with *C. difficile* S3, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Sev <i>C. difficile</i> S3 (vrednosti Ct)	10–50 CFU/vzorec	50–100 CFU/vzorec	500–1000 CFU/vzorec
FP	22,67	18,74	18,35
HP	18,67	19,32	16,81
ICS	18,00	18,56	13,59

Pri vseh treh koncentracijah smo najnižje vrednosti Ct ugotovili pri osamitvi DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov ICS. Pri koncentracijah 10–50 in 500–1000 CFU/vzorec smo srednje vrednosti Ct ugotovili pri osamitvi DNA s kompletom reagentov HP in najvišje pri FP, pri koncentraciji 50–100 CFU/vzorec pa srednje pri kompletu reagentov FP in najvišje pri HP (Tabela 3, Slika 4).



Slika 4: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce mletga mesa, inokulirane s tremi različnimi koncentracijami *C. difficile* S3, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).

Figure 4: Illustration of qPCR results for minced meat samples, inoculated at three different concentrations with *C. difficile* S3, from which DNA was extracted with three different commercial kits (FP, HP and ICS).

4.1.4 Primerjava različnih kompletov reagentov za osamitev DNA pri testiranju vzorcev mletga mesa, inokuliranih z bakterijo *C. difficile*

Pri osamitvi DNA s komercialnim kompletom reagentov FP smo pri vseh treh sevih *C. difficile* ugotovili najnižjo vrednost Ct pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec, pri vzorcih mletga mesa s sevom *C. difficile* S1 smo najvišjo vrednost Ct ugotovili pri 50–100 CFU/vzorec, pri vzorcih mletga mesa s sevoma *C. difficile* S2 in S3 pa pri 10–50 CFU/vzorec.

Pri osamitvi DNA s kompletom reagentov ICS smo pri vzorcih mletga mesa s sevoma *C. difficile* S1 in S3 najnižjo vrednost Ct ugotovili pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec in najvišjo pri 50–100 CFU/vzorec, pri vzorcih mletga mesa s sevom *C. difficile* S2 pa najnižjo pri 50–100 CFU/vzorec in najvišjo pri 10–50 CFU/vzorec.

Pri osamitvi DNA s kompletom reagentov HP pa smo pri vzorcih mletega mesa s sevom *C. difficile* S1 ugotovili najnižjo vrednost Ct pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec in najvišjo pri 50–100 CFU/vzorec, pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S2 najnižjo pri 50–100 CFU/vzorec in najvišjo pri 10–50 CFU/vzorec ter pri vzorcih s sevom *C. difficile* S3 najnižjo pri 500–1000 CFU/vzorec in najvišjo pri 50–100 CFU/vzorec (Tabele 1, 2 in 3).

V skoraj vseh primerih smo najnižje vrednosti Ct ugotovili pri vzorcih, iz katerih je bila DNA osamljena s komercialnim kompletom reagentov ICS, le pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S2 pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec pa smo ugotovili srednjo vrednost (za 2,62 cikla višjo od najnižje vrednosti pri kompletu reagentov FP). Pri vzorcih mletega mesa, iz katerih je bila DNA osamljena s kompletom reagentov FP, smo večinoma ugotovili srednje vrednosti Ct, razen pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S2 pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec, ko smo ugotovili najnižjo vrednost Ct ter pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S3 pri koncentracijah 10–50 in 500–1000 CFU/vzorec najvišjo vrednost Ct. Najvišje vrednosti Ct pa smo ugotovili pri vzorcih mletega mesa, iz katerih je bila DNA osamljena s kompletom reagentov HP, razen pri vzorcih mletega mesa s sevom *C. difficile* S3 pri koncentracijah 10–50 in 500–1000 CFU/vzorec, ko smo ugotovili srednjo vrednost Ct (Tabela 4).

Pri primerjavi komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA opazimo, da smo pri osamitvi DNA s kompletom reagentov ICS v primerjavi s FP ugotovili v povprečju za 2,31 cikla nižje vrednosti Ct, v primerjavi s kompletom reagentov HP pa za 3,69 cikle nižje vrednosti Ct. Pri osamitvi DNA s kompletom reagentov FP pa smo v primerjavi s HP ugotovili v povprečju za 1,39 cikle nižje vrednosti Ct (Tabela 4).

Tabela 4: Primerjava rezultatov za vzorce mletega mesa, inokulirane s tremi različnimi sevi *C. difficile* pri treh različnih koncentracijah, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 4: Comparison of results for samples of minced meat, inoculated with three different strains of *C. difficile* at three different concentrations, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Sev <i>C. difficile</i> S1 (razlika med vrednostmi Ct)	FP – ICS	HP – ICS	HP – FP
10–50 CFU/vzorec	2,84	4,62	1,78
50–100 CFU/vzorec	2,31	5,53	3,22
500–1000 CFU/vzorec	2,86	5,07	2,21
Sev <i>C. difficile</i> S2 (razlika med vrednostmi Ct)	FP – ICS	HP – ICS	HP – FP
10–50 CFU/vzorec	1,76	4,08	2,32
50–100 CFU/vzorec	4,01	4,71	0,71
500–1000 CFU/vzorec	– 2,62	4,58	7,21
Sev <i>C. difficile</i> S3 (razlika med vrednostmi Ct)	FP – ICS	HP – ICS	HP – FP
10–50 CFU/vzorec	4,67	0,66	– 4
50–100 CFU/vzorec	0,17	0,76	0,58
500–1000 CFU/vzorec	4,76	3,22	– 1,54
Povprečje ± standardni odklon	2,31 ± 2,22	3,69 ± 1,70	1,39 ± 2,94

4.2 VZORCI ZAČINJENEGA IN MARINIRANEGA MESA, INOKULIRANI Z MEŠANICO TREH RAZLIČNIH SEVOV *C. DIFFICILE*

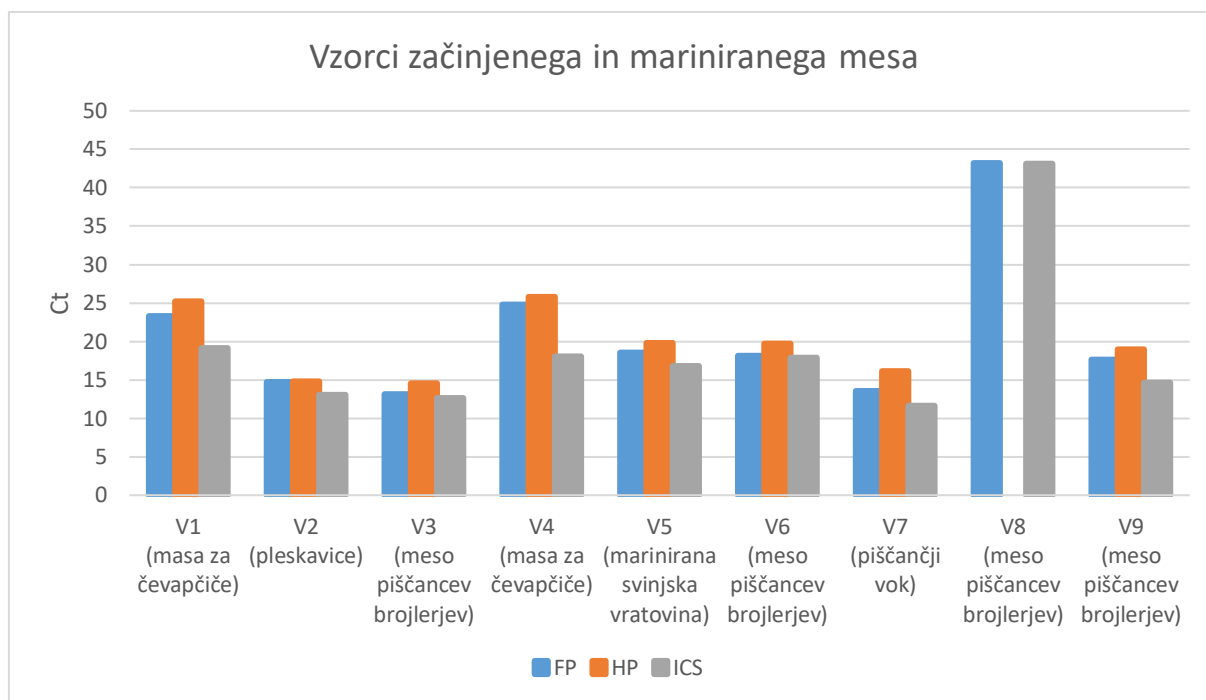
V drugem delu raziskave smo preiskovali vzorce različnih vrst mesa in mesnih pripravkov, vključno z začinjenimi in mariniranimi živili ter jih inokulirali z mešanico vseh treh izbranih sevov *C. difficile* tako, da smo dosegli koncentracijo 5–20 CFU/vzorec.

V vseh primerih smo najnižje vrednosti Ct ugotovili pri vzorcih DNA, osamljenih s komercialnim kompletom reagentov ICS, srednje s FP in najvišje s HP. Pri vzorcu V8 smo po osamitvi s kompletoma reagentov FP in ICS ugotovili zelo visoke vrednosti Ct (> 40), pri kompletu reagentov HP pa celo negativen rezultat (Tabela 5, Slika 5).

Tabela 5: Primerjava rezultatov qPCR (vrednosti Ct) za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 5: Comparison of qPCR results (Ct values) for samples of spiced and marinated meat, inoculated with a mixture of all three strains of *C. difficile*, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Oznaka vzorca (vrednosti Ct)	Vrsta začinjenega, mariniranega mesa	FP	HP	ICS
V1	Masa za čevapčiče	23,30	25,19	19,14
V2	Pleskavice	14,70	14,83	13,02
V3	Meso piščancev brojlerjev	13,12	14,51	12,60
V4	Masa za čevapčiče	24,77	25,83	18,07
V5	Marinirana svinjska vratovina	18,58	19,82	16,77
V6	Meso piščancev brojlerjev	18,15	19,74	17,87
V7	Piščančji vok	13,56	16,14	11,65
V8	Meso piščancev brojlerjev	43,21	negativno	43,14
V9	Meso piščancev brojlerjev	17,64	18,93	14,63



Slika 5: Ponazoritev rezultatov qPCR za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*, iz katerih je bila DNA osamljena s tremi različnimi komercialnimi kompleti reagentov (FP, HP in ICS).

Figure 5: Illustration of qPCR results for samples of spiced and marinated meat, inoculated with a mixture of all three strains of *C. difficile*, from which DNA was extracted with three different commercial kits (FP, HP in ICS).

Če primerjamo komercialne komplete reagentov, ki smo jih uporabili za osamitev DNA pri testiranju vzorcev začinjenega in mariniranega mesa, inokuliranih z mešanico vseh treh sevov *C. difficile* opazimo, da smo pri osamitvi DNA s kompletom reagentov ICS v primerjavi s FP ugotovili v povprečju za 2,51 cikla nižje vrednosti Ct, v primerjavi s kompletom reagentov HP pa za 3,91 cikle nižje vrednosti Ct. Pri osamitvi DNA s kompletom reagentov FP pa smo v primerjavi s HP ugotovili v povprečju za 1,4 cikle nižje vrednosti Ct (Tabela 6).

Tabela 6: Primerjava rezultatov za vzorce začinjenega in mariniranega mesa, inokulirane z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*, glede na uporabljen komercialni komplet reagentov za osamitev DNA.

Table 6: Comparison of results for samples of spiced and marinated meat, inoculated with a mixture of all three strains of *C. difficile*, in relation to applied commercial DNA extraction kit.

Oznaka vzorca (razlika med vrednostmi Ct)	Vrsta začinjenega, mariniranega mesa	FP – ICS	HP – ICS	HP – FP
V1	Masa za čevapčiče	4,16	6,05	1,89
V2	Pleskavice	1,68	1,81	0,13
V3	Meso piščancev brojlerjev	0,52	1,91	1,39
V4	Masa za čevapčiče	6,7	7,76	1,06
V5	Marinirana svinjska vratovina	1,81	3,05	1,24
V6	Meso piščancev brojlerjev	0,28	1,87	1,59
V7	Piščančji vok	1,91	4,49	2,58
V9	Meso piščancev brojlerjev	3,01	4,3	1,29
Povprečje* ± standardni odklon		2,51 ± 1,97	3,91 ± 2,04	1,40 ± 0,66

*Povprečje brez V8 – Vzorec V8 smo izločili, saj v njem nismo dokazali prisotnosti DNA (komplet reagentov

HP) oz. so bile vrednosti Ct nad 40

Average without V8 – The V8 sample was excluded because no DNA was detected (HP reagent kit) or Ct values were above 40

5 RAZPRAVA

Z raziskavo smo želeli ugotoviti, kateri izmed treh uporabljenih komercialnih kompletov reagentov, foodproof Sample Preparation kit II (Biotecon Diagnostics, Nemčija) (FP), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Nemčija) (HP) in DNA Isolation from Complex Samples (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija) (ICS), je najučinkovitejši za osamitev DNA iz obogatenih vzorcev mesa in mesnih pripravkov, inokuliranih z bakterijo *C. difficile*.

Prisotnost *C. difficile* so že dokazali pri živalih, v mesu in mesnih pripravkih, morski hrani in zelenjavi. Kljub temu, da so v hrani in pri živalih ugotovili enake PCR ribotipe kot pri ljudeh (O'Neill in sod., 1993; Lemee in sod., 2004a; Arroyo in sod., 2005; Hensgens in sod., 2012), pa neposredna okužba preko hrane še ni bila dokazana (Hensgens in sod., 2012). Število vzorcev, v katerih je bila ugotovljena prisotnost *C. difficile* in število spor v teh vzorcih je običajno nizko (Hensgens in sod., 2012), vendar je kljub temu okužba preko hrane še vedno mogoča (Weese in sod., 2010b), saj so spore bakterije izjemno odporne na neugodne fizikalne in kemijske dejavnike (Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Gerding in sod., 2008; Weese in sod., 2010b).

Pred začetkom naše raziskave smo pričakovali, da bomo najnižje vrednosti Ct, kar pomeni največjo količino bakterijske DNA v vzorcih mletega mesa, ugotovili pri vzorcih, inokuliranih s koncentracijo 500–1000 CFU/vzorec, srednje vrednosti pri 50–100 CFU/vzorec ter najvišje pri 10–50 CFU/vzorec. Pričakovane rezultate pri vseh treh koncentracijah smo potrdili le pri osamitvi DNA s komercialnim kompletom reagentov FP pri testiranju vzorcev mletega mesa s sevoma *C. difficile* S2 in S3. Pričakovan rezultat smo s tem kompletom reagentov ugotovili tudi pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S1 pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec (najnižja vrednost Ct). Pri osamitvi s kompletom reagentov ICS smo pričakovane rezultate ugotovili pri vzorcih mletega mesa s sevi *C. difficile* S1 in S3 pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec (najnižja vrednost Ct) ter pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S2 pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec (najvišja vrednost Ct). Pri osamitvi s kompletom reagentov HP pa smo pričakovane rezultate ugotovili pri vzorcu mletega mesa s sevom *C. difficile* S2 pri koncentraciji 10–50 CFU/vzorec (najvišja vrednost Ct) in pri vzorcu mletega mesa s sevom S3 pri koncentraciji 500–1000 CFU/vzorec (najnižja vrednost Ct) (Tabela 1, 2 in 3). Vendar kljub

temu, da smo v teh primerih dobili pričakovane rezultate (padajoče/naraščajoče vrednosti Ct v odvisnosti od koncentracije *C. difficile*), se vrednosti Ct med desetkratnimi redčitvami večinoma niso razlikovale za približno 3,3, kot je bilo pričakovano (Higuchi in sod., 1992). Možen razlog za to je, da ne gre dejansko za desetkratne razredčine, saj je razpon uporabljenih koncentracij razmeroma širok (10–50 CFU/vzorec, 50–100 CFU/vzorec in 500–1000 CFU/vzorec). Vzrok je lahko tudi v tem, da smo za inokulum uporabili obogatitveno kulturo, ki vsebuje mešanico spor in vegetativnih celic *C. difficile*, saj različno razmerje posledično vpliva na učinkovitost osamitve DNA.

V prvem delu raziskave smo pri večini vzorcev, v drugem delu pa pri vseh vzorcih z metodo qPCR ugotovili najnižje vrednosti Ct pri vzorcih DNA, osamljenih s komercialnim kompletom reagentov ICS, iz česar lahko sklepamo, da je bil ta komplet reagentov najučinkovitejši za osamitev nukleinskih kislin *C. difficile*, sledi FP, najslabši pa je bil HP. Pri vzorcu V8 iz drugega dela raziskave smo po osamitvi s komercialnima kompletoma reagentov FP in ICS ugotovili zelo visoke vrednosti Ct (> 40), pri kompletu reagentov HP pa celo negativen rezultat, kar kaže na prisotnost inhibitorjev PCR v vzorcu ali vpliv matriksa vzorca na osamitev DNA (Metcalf in Weese, 2012).

Rezultati prvega dela raziskave, ki prikazujejo vrednosti Ct, ugotovljene po osamitvi DNA s proučevanimi kompleti reagentov iz vzorcev mletega mesa inokuliranih s posameznim sevom *C. difficile*, so zelo podobni (Slika 2, 3 in 4), kar kaže na to, da so bili posamezni komercialni kompleti reagentov za osamitev DNA *C. difficile* podobno učinkoviti. S kompletom reagentov ICS smo dokazali večjo količino bakterijske DNA pri posamezni koncentraciji *C. difficile* v vzorcih, kot s kompletoma reagentov FP in HP. Najbolj učinkovit komplet reagentov za osamitev DNA *C. difficile* je bil torej ICS, kjer smo za lizo celic uporabili mehanske postopke (razbijanje s kroglicami), encimsko-kemijske učinkovine in toplotno obdelavo vzorca. Vendar pa so slabosti metode razbitja s kroglicami potreba po specializirani opreми, spremenljivost učinkovitosti osamitve in večja nevarnost kontaminacije z aerosoli (Anderberg in sod., 1995; Käser in sod., 2009). Srednje učinkovit je bil komplet reagentov FP, kjer smo za lizo uporabili le encimsko-kemijske učinkovine, medtem ko se je za najmanj učinkovitega izkazal komplet reagentov HP, kjer smo za lizo celic uporabili encimsko-kemijske učinkovine, poleg tega pa vključuje tudi pufer za odstranitev inhibitorjev.

Komercialni komplet reagentov ICS je namenjen osamitvi DNA pri testiranju kompleksnih vzorcev in odpornih bakterij z debelejšo celično steno. Komplet reagentov ICS je torej učinkovit za lizo spor, poleg tega pa glede na rezultate raziskave, ki so jo izvedli Avberšek in sodelavci (2017), metoda večkratnega razbitja s kroglicami verjetno pripomore tudi pri lizi vegetativnih celic *C. difficile*. Komercialni komplet reagentov FP je namenjen osamitvi DNA iz kompleksnih vzorcev hrane in je glede na raziskavo, ki so jo izvedli Avberšek in sodelavci (2013), ustrezen za osamitev DNA spor in vegetativnih celic *C. difficile*, njegova pomanjkljivost pa je visoka cena. Komercialni komplet reagentov HP je učinkovit za osamitev DNA spor in vegetativnih celic *C. difficile*, vendar so v raziskavi, ki sta jo izvedla Metcalf in Weese (2012), dokazali višje koncentracije DNA z uporabo nekaterih drugih komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA, predvsem MagNA Pure LC DNA Isolation kit III (Roche Diagnostics, Nemčija). Zanimivo pa je, da so s posameznim proučevanim kompletom reagentov večinoma osamili večje količine DNA iz spor kot iz vegetativnih celic, razen prav pri uporabi kompleta reagentov MagNA Pure LC DNA Isolation kit III (Roche Diagnostics, Nemčija).

Zagotovo obstajajo tudi določene omejitve naše raziskave in ena izmed njih je ta, da nismo uporabili eksogene interne pozitivne kontrole (IPC, angl. internal positive control), ki omogoča zaznavo prisotnosti inhibitorjev v postopku qPCR (Hoorfar in sod., 2004). Običajno se prisotnosti inhibitorjev PCR reakcije ni mogoče izogniti, zato je potrebno izbrati ustrezno metodo osamitve DNA, ki omogoča čim boljše odstranitev inhibitorjev. Hrana pogosto vsebuje različne inhibitorje PCR reakcije (Deer in sod., 2010). Vzorci živalskega izvora vsebujejo inhibitorje kot so maščobe, beljakovine (Bickley in sod., 1996; Quigley in sod., 2012), kolagen (Scholz in sod., 1998), melanin (Eckhart in sod., 2000), hem (Al-Soud in Rådström, 2001), mioglobin (Bélec in sod., 1998) in laktoferin (Al-Soud in Rådström, 2001).

Poleg tega bi postopek osamitve DNA lahko izvedli tudi v duplikatih, a žal za to nismo imeli na voljo zadostne količine izvirnega vzorca. Zagotovo je potrebno pri interpretaciji rezultatov upoštevati tudi dejstvo, da so bile v obogatenih vzorcih prisotne tako spore kot vegetativne celice *C. difficile*, ter da so bila razmerja med njimi v različnih vzorcih, morda zaradi nehomogenega inokuluma, lahko različna. Razmerje spor in vegetativnih celic v posameznem vzorcu bi bilo ob ponovljeni raziskavi morda dobro preveriti z mikroskopijo.

Na podlagi rezultatov drugega dela raziskave smo želeli oceniti vpliv matriksa vzorcev na osamitev in kasnejši dokaz prisotnosti DNA *C. difficile*. Pri štirih vzorcih mesa piščancev brojlerjev (V3, V6, V8 in V9) smo dobili zelo različne rezultate, od nizkih vrednosti Ct (najnižja 12,60) do visokih (najvišja 19,74), pri vzorcu V8 pa celo vrednosti Ct nad 40 in negativen rezultat. Nizke vrednosti Ct smo dobili pri vzorcu mesa za pleskavice V2 (od 13,02 do 14,83) in vzorcu s piščančjim mesom v voku V7 (od 11,65 do 16,14), kar lahko pomeni, da matriks teh vzorcev ni imel večjega vpliva na sam postopek osamitve DNA. Nekoliko višje vrednosti Ct pa smo ugotovili pri vzorcu marinirane svinjske vratovine V5 (od 16,77 do 19,82), najvišje pa pri vzorcih mase za čevapčiče V1 in V4 (od 18,07 do 25,83), kar lahko pomeni, da je matriks teh vzorcev negativno vplival na postopek osamitve DNA, iz česar sklepamo, da bi lahko težavo povzročale začimbe, ki so bile dodane mesim pripravkom.

V raziskavi smo želeli preveriti tudi vpliv posameznega seva *C. difficile* na osamitev DNA, saj imajo sevi *C. difficile*, uporabljeni za inokulacijo, različne lastnosti in pripadajo različnim PCR ribotipom in toksinotipom. Ob primerjavi učinkovitosti postopkov osamitve DNA pa se je izkazalo, da nismo zaznali bistvenih razlik med vrednostimi Ct pri posameznih komercialnih kompletih. Osamitev DNA iz vseh treh sevov *C. difficile* je bila podobno učinkovita, morda je bila nekoliko slabše učinkovita le osamitev DNA iz seva 2 *C. difficile*.

Do sedaj še ni bilo raziskave, ki bi primerjala učinkovitost različnih komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA bakterije *C. difficile* pri testiranju različnih vzorcev mesa in mesnih pripravkov. Raziskovalci so se sicer lotevali podobnih primerjav, a iz drugih vrst vzorcev, najpogosteje iz iztrebkov živali. Kljub temu so bile njihove ugotovitve podobne našim, in to je, da je potrebno za osamitev DNA bakterije *C. difficile* uporabiti metode, ki za lizo celic vključujejo različne postopke (Anderberg in sod., 1995; Miller in sod., 1999; Dauphin in sod., 2009; Käser in sod., 2009; Freifeld in sod., 2012; Metcalf in Weese, 2012; Grzeškowiak in sod., 2016; Yoon in sod., 2016; Avberšek in sod., 2017). Tekom raziskave smo ugotovili, da je za optimalno osamitev DNA *C. difficile* iz različnih vrst mesa in mesnih pripravkov potrebno kombinirati mehanske (razbijanje s kroglicami), encimsko-kemijske postopke in toplotno obdelavo vzorcev.

6 SKLEPI

Hipoteza 1: Najbolj učinkovit komercialni komplet reagentov za osamitev DNA C. difficile iz obogatenih vzorcev mesa in mesnih pripravkov bo DNA Isolation from Complex Samples (ICS), kjer se liza celic izvaja z mehanskimi (razbitje s kroglicami) in encimsko-kemijskimi postopki ter toplotno obdelavo vzorca, manj učinkovit bo High Pure PCR Template Preparation kit (HP), saj poleg encimsko-kemijskih postopkov lize vključuje tudi pufer za odstranitev inhibitorjev, najmanj učinkovit pa bo foodproof Sample Preparation kit II (FP), kjer se za lizo celic uporabljajo le encimsko-kemijski postopki.

Hipotezo smo deloma potrdili, saj smo tako pri vzorcih mletega mesa, kot pri vzorcih mesnih pripravkov, z metodo qPCR ugotovili najnižje vrednosti Ct pri vzorcih DNA, osamljenih s pomočjo komercialnega kompleta reagentov ICS. Vendar pa smo nasprotno od pričakovanega pri večini vzorcev DNA, osamljenih s pomočjo komercialnega kompleta reagentov FP, ugotovili srednje vrednosti Ct, pri osamitvi s pomočjo komercialnega kompleta reagentov HP pa najvišje vrednosti Ct. Komercialni komplet reagentov ICS se je torej izkazal za najbolj učinkovitega, komplet reagentov HP pa najmanj učinkovitega izmed proučevanih kompletov reagentov za osamitev DNA *C. difficile* iz vzorcev mesa in mesnih pripravkov.

Hipoteza 2: Posamezni komercialni komplet reagentov za osamitev DNA (ICS, HP, FP) bo enako učinkovit za osamitev DNA različnih sevov C. difficile, ne glede na to, da pripadajo različnim PCR ribotipom in toksinotipom.

Hipotezo smo potrdili, saj se je pri osamitvi DNA vseh treh različnih sevov *C. difficile* za najbolj učinkovitega izkazal komercialni komplet reagentov DNA Isolation from Complex Samples, srednje komplet reagentov foodproof Sample Preparation kit II, najslabše pa komplet reagentov High Pure PCR Template Preparation kit.

Hipoteza 3: Učinkovitost komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA (ICS, HP, FP)

C. difficile se bo razlikovala med osamitvami iz vzorcev mesa ter vzorcev mesnih pripravkov.

Hipotezo smo deloma potrdili, saj smo v drugem delu raziskave, ko smo osamili DNA iz različnih vzorcev mesnih pripravkov, dobili nekoliko nižje vrednosti Ct kot v prvem delu raziskave, ko smo osamili DNA iz vzorcev mletega mesa. A predvidevali smo, da se bo zgodilo ravno nasprotno in bomo nižje vrednosti Ct ugotovili v prvem delu raziskave, saj so vzorcem mesnih pripravkov dodane različne začimbe, ki bi lahko negativno vplivale na osamitev DNA. Vendar pa smo tudi zgolj med vzorci mesnih pripravkov zaznali različne vrednosti Ct, kar kaže na to, da dodatne sestavine v posameznem vzorcu vplivajo na postopek osamitve DNA in da je potrebno vsak inokulirani vzorec obravnavati posebej.

7 POVZETEK

Bakterija *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) se zaradi svoje anaerobne narave v hrani nahaja v obliki spor (Kochan in sod., 2017; Shrestha in Sorg, 2018). Spore so zelo odporne, saj jih obdaja debel plašč, ki je sestavljen iz večih lamel (Paredes-Sabja in sod., 2014). Odpornost spor znižuje učinkovitost postopkov za osamitev DNA (Miller in sod., 1999; Dauphin in sod., 2009). Poleg tega lahko tudi prisotnost maščob in beljakovin ter druge sestavine hrane negativno vplivajo na osamitev DNA (Basu in sod., 2013) in na potek verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Rossen in sod., 1992; Bickley in sod., 1996; Quigley in sod., 2012). Z raziskavo smo želeli določiti najbolj učinkovito metodo osamitve DNA *C. difficile* iz vzorcev mesa in mesnih pripravkov, da bi s tem izboljšali občutljivost dokazovanja.

V raziskavi smo primerjali učinkovitost treh komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA bakterije *C. difficile* v vzorcih mesa in mesnih pripravkov. Bakterije v vzorcih mesa, inokuliranih s *C. difficile*, smo namnožili s predhodno obogatitvijo s štiridnevno inkubacijo v gojišču TCCFB+L pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Z namnožitvijo bakterij smo se izognili temu, da bi bile v vzorcih prisotne le spore. Trije različni komercialni kompleti reagentov, ki smo jih uporabili za osamitev DNA bakterije *C. difficile*, so bili foodproof Sample Preparation kit II (Bioteccon Diagnostics, Nemčija) (FP), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Nemčija) (HP) in DNA Isolation from Complex Samples (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija) (ICS). Raziskavo smo izvedli v dveh delih. V prvem delu smo uporabili vzorce mletega mesa, katere smo inokulirali s tremi različnimi sevi *C. difficile* in znanim številom bakterij. Da bi ugotovili ali lastnosti različnih sevov lahko vplivajo na uspešnost metode, smo vzorce mletega mesa inokulirali z vsakim sevom posebej ter pri treh različnih koncentracijah. V drugem delu raziskave smo uporabili vzorce različnih vrst mesa in mesnih pripravkov, vključno z začinjenimi in mariniranimi živili ter jih inokulirali z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*.

V obeh delih raziskave je bil glede na rezultate metode PCR v realnem času s sondo TaqMan najučinkovitejši komercialni komplet reagentov ICS (v prvem delu raziskave smo pri osamitvi DNA z ICS v primerjavi s FP ugotovili v povprečju za 2,31 cikla, v primerjavi s HP pa za 3,69 cikla nižje vrednosti Ct, v drugem delu pa v primerjavi s FP za 2,51 cikla, v primerjavi s HP pa

za 3,91 cikla nižje vrednosti Ct). Manj učinkovit je bil FP (v prvem delu raziskave smo pri osamitvi DNA s FP v primerjavi s HP ugotovili v povprečju za 1,39 cikla, v drugem delu pa za 1,4 cikla nižje vrednosti Ct), najmanj pa HP. Z raziskavo smo ugotovili, da je za optimalno osamitev DNA *C. difficile* iz različnih vrst mesa in mesnih pripravkov priporočljivo kombinirati mehanske ter encimsko-kemijske postopke lize, skupaj s toplotno obdelavo vzorcev. V raziskavi smo želeli tudi preveriti vpliv posameznega seva *C. difficile* na osamitev DNA, saj imajo sevi *C. difficile*, uporabljeni za inokulacijo, različne lastnosti. Izkazalo se je, da je bila osamitev DNA iz vseh treh sevov *C. difficile* podobno učinkovita, morda je bila nekoliko slabše učinkovita osamitev DNA iz seva 2 *C. difficile*. Na podlagi rezultatov drugega dela raziskave smo želeli oceniti tudi vpliv matriksa vzorcev na osamitev in kasnejši dokaz prisotnosti DNA *C. difficile*. Predvidevali smo, da bomo višje vrednosti Ct ugotovili v drugem delu raziskave, saj so vzorcem mesnih pripravkov dodane različne začimbe, ki bi lahko negativno vplivale na osamitev DNA. V naši raziskavi pa smo ugotovili ravno nasprotno, saj smo v drugem delu raziskave, ko smo osamili DNA iz različnih vzorcev mesnih pripravkov, dobili nekoliko nižje vrednosti Ct, kot v prvem delu raziskave, ko smo osamili DNA iz vzorcev mletega mesa. Kljub temu pa smo tudi zgolj med vzorci mesnih pripravkov zaznali različne vrednosti Ct, kar kaže na to, da različne sestavine v posameznem vzorcu vplivajo na postopek osamitve DNA in je potrebno vsak inokulirani vzorec obravnavati posebej.

8 ZAHVALE

Zahvaliti se želim predvsem mentorici, doc. dr. Urški Jamnikar Ciglencečki, za vso strokovno pomoč, nasvete, podporo, potrpežljivost in razumevanje. Brez njene pomoči raziskovalne naloge v takšni obliki ne bi bilo. Zahvaljujem se tudi asist. raz. dr. Majdi Biasizzo in doc. dr. Stanki Vadnjal za pomoč pri pripravi vzorcev.

Zahvaljujem se tudi partnerju, družini in prijateljem za vso podporo, spodbujanje in dobro voljo. Predvsem bi se za vso pomoč zahvalila sestri Anji in mami Mojci. Posebna zahvala gre tudi mački Mini.

9 LITERATURA

- Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol 1996; 45(2): 133–7. doi: 10.1099/00222615-45-2-133
- Alam MJ, Anu A, Walk ST, Garey KW. Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs. Anaerobe 2014; 27: 31–3. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.03.002
- Almeida R, Gerbaba T, Petrof EO. Recurrent *Clostridium difficile* infection and the microbiome. J Gastroenterol 2016; 51(1): 1–10. doi: 10.1007/s00535-015-1099-3
- Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 485–93. doi: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001
- Álvarez-Hernández DA, González-Chávez AM, González-Hermosillo-Cornejo D, Franyuti-Kelly GA, Díaz-Girón-Gidi A, Vázquez-López R. Present and past perspectives on *Clostridium difficile* infection. Rev Gastroenterol Mex 2018; 83(1): 41–50. doi: 10.1016/j.rgmx.2017.03.004
- Alvarez-Perez S, Blanco JL, Bouza E, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. Vet Microbiol 2009; 137(3-4): 302–5. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.015
- Alvarez-Perez S, Blanco JL, Peláez T, et al. High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. Res Vet Sci 2013; 95(2): 358–61. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.021
- Anderberg RJ, Strachan JA, Cangelosi GA. Purification of DNA from *Mycobacterium* species without sonication or phenol. BioTechniques 1995; 18(2): 217–9.
- Anderson DJ, Rojas LF, Watson S, et al. Identification of novel risk factors for community-acquired *Clostridium difficile* infection using spatial statistics and geographic information system analyses. PLoS One 2017; 12(5): e0176285. doi: 10.1371/journal.pone.0176285

Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J Med Microbiol 2005; 54(2): 163–6. doi: 10.1099/jmm.0.45805-0

Arruda PH, Madson DM, Ramirez A, Rowe E, Lizer JT, Songer JG. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. Anaerobe 2013; 22: 104–10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.010.

Aslan K, Previte MJ, Zhang Y, Gallagher T, Baillie L, Geddes CD. Extraction and detection of DNA from *Bacillus anthracis* spores and the vegetative cells within 1 min. Anal Chem 2008; 80(11): 4125–32. doi: 10.1021/ac800519r

Avberšek J, Cotman M, Ocepek M. Detection of *Clostridium difficile* in animals: comparison of real-time PCR assays with the culture method. J Med Microbiol 2011; 60(8): 1119–25. doi: 10.1099/jmm.0.030304-0

Avberšek J, Zajc U, Mićunović J, Ocepek M. Improved detection of *Clostridium difficile* in animals by using enrichment culture followed by LightCycler real-time PCR. Vet Microbiol 2013; 164(1/2): 93–100. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.031

Avberšek J, Pirš T, Pate M, Rupnik M, Ocepek M. *Clostridium difficile* in goats and sheep in Slovenia: characterisation of strains and evidence of age-related shedding. Anaerobe 2014; 28: 163–7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.06.009

Avberšek J, Zajc U, Gruntar I, Krt B, Ocepek M. Evaluation and comparison of DNA extraction kits for the detection of *Clostridium difficile* in spiked and field faeces from piglets by using real-time PCR. Slov Vet Res 2017; 54(4): 143–8. doi: 10.26873/SVR-323-2017

Badger VO, Ledeboer NA, Graham MB, Edmiston Jr CE. *Clostridium difficile*: epidemiology, pathogenesis, management, and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2012; 36(6): 645–62. doi: 10.1177/0148607112446703

Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emerg Infect Dis 2009; 15(5): 817–8. doi: 10.3201/eid1505.081186

Bandelj P, Briski F, Frlic O, et al. Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms. Vet Res 2016; 47(1): 41. doi: 10.1186/s13567-016-0326-0

Bandelj P, Harmanus C, Cotman M, Kuijper EJ, Ocepek M, Vengust M. Quantification of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in feces of calves of different age and determination of predominant *Clostridioides difficile* ribotype 033 relatedness and transmission between family dairy farms using multilocus variable-number tandem-repeat analysis. BMC Vet Res 2018; 14(1): 298. doi: 10.1186/s12917-018-1616-8

Bandelj P, Logar K, Usenik AM, Vengust M, Ocepek M. An improved qPCR protocol for rapid detection and quantification of *Clostridium difficile* in cattle feces. FEMS Microbiol Lett 2013; 341(2): 115–21. doi: 10.1111/1574-6968.12102

Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978; 298(10): 531–4. doi: 10.1056/NEJM197803092981003

Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. J Infect Dis 1977; 136(5): 701–5. doi: 10.1093/infdis/136.5.701

Basu S, Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Potential application of superparamagnetic nanoparticles for extraction of bacterial genomic DNA from contaminated food and environmental samples. J Sci Food Agric 2013; 93(4): 788–93. doi: 10.1002/jsfa.5798

Båverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspan A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. Equine Vet J 2003; 35(5): 465–71. doi: 10.2746/042516403775600505

Båverud V, Gustafsson A, Franklin A, Lindholm A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. Equine Vet J 1997; 29(4): 279–84. doi: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb03124.x

- Bélec L, Authier JR, Eliezer-Vanerot MC, Piédouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* 1998; 21(8): 1064–7. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199808)21:8<1064::aid-mus11>3.0.co;2-u
- Biasizzo M, Vadjal S, Henigman U, Krizman M, Kirbis A, Jamnikar-Ciglenecki U. Development and validation of a new protocol for detecting and recovering *Clostridium difficile* from meat samples. *J Food Prot* 2018; 81(4): 561–8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-354
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22(2): 153–8. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb01131.x
- Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 1998; 40(1): 1–15. doi: 10.1016/s0195-6701(98)90019-6
- Bloomfield LE, Riley TV. Epidemiology and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: a narrative review. *Infect Dis Ther* 2016; 5(3): 231–51. doi: 10.1007/s40121-016-0117-y
- Blossom DB, McDonald LC. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2007; 45(2): 222–7. doi: 10.1086/518874
- Bouttier S, Barc MC, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(4): 733–5. doi: 10.3201/eid1604.091138
- Brown AW, Wilson RB. *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins: a narrative review. *Gastroenterol Rep* 2018; 6(3): 157–66. doi: 10.1093/gastro/goy016
- Cho A, Byun JW, Kim JW, Oh SI, Lee MH, Kim HY. Low prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs in Korea. *J Food Prot* 2015; 78(5): 1034–6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-493

Collins DA, Putsathit P, Elliott B, Riley TV. Laboratory-based surveillance of *Clostridium difficile* strains circulating in the Australian healthcare setting in 2012. *Pathology* 2017; 49(3): 309–13. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.013

Collins MD, Lawson PA, Willems A, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Evol Microbiol* 1994; 44(4): 812–26. doi: 10.1099/00207713-44-4-812

Costa MC, Stämpfli HR, Arroyo LG, Pearl DL, Weese JS. Epidemiology of *Clostridium difficile* on a veal farm: prevalence, molecular characterization and tetracycline resistance. *Vet Microbiology* 2011; 152(3-4): 379–84. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.014

Dabard J, Dubos F, Martinet L, Ducluzeau R. Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infect Immun* 1979; 24(1): 7–11.

Darkoh C, Odo C, DuPont HL. Accessory gene regulator-1 locus is essential for virulence and pathogenesis of *Clostridium difficile*. *MBio* 2016; 7(4): e01237–16. doi: 10.1128/mBio.01237-16

Dauphin LA, Moser BD, Bowen MD. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *J Microbiol Methods* 2009; 76(1): 30–7. doi: 10.1016/j.mimet.2008.09.004

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2011; 144(3): 561–4. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.007

Debast SB, Van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environ Microbiol* 2009; 11(2): 505–11. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01790.x

Deer DM, Lampel KA, González-Escalona N. A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50(4): 366–72. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02804.x

Deng K, Plaza-Garrido A, Torres JA, Paredes-Sabja D. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiol* 2015; 46: 218–21. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.022

Didelot X, Eyre DW, Cule M, et al. Microevolutionary analysis of *Clostridium difficile* genomes to investigate transmission. *Genome Biol* 2012; 13(12): R118. doi: 10.1186/gb-2012-13-12-r118

Donnelly ML, Li W, Li YQ, Hinkel L, Setlow P, Shen A. A *Clostridium difficile*-specific, gel-forming protein required for optimal spore germination. *MBio* 2017; 8(1): e02085–16. doi: 10.1128/mBio.02085-16

Eckert C, Burghoffer B, Barbut F. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *J Med Microbiol* 2013; 62(9): 1435–8. doi: 10.1099/jmm.0.056358-0

Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(3): 726–30. doi: 10.1006/bbrc.2000.2716

Edwards AN, McBride SM. Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 358(2): 110–8. doi: 10.1111/1574-6968.12499

Edwards AN, Suárez JM, McBride SM. Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *J Vis Exp* 2013; (79): e50787. doi: 10.3791/50787

Erickson MC, Kornacki JL. *Bacillus anthracis*: current knowledge in relation to contamination of food. *J Food Prot* 2003; 66(4): 691–9. doi: 10.4315/0362-028x-66.4.691

Ersöz ŞŞ, Coşansu S. Prevalence of *Clostridium difficile* isolated from beef and chicken meat products in Turkey. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2018; 38(4): 759–67. doi: 10.5851/kosfa.2018.e14

Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 2013; 369(13): 1195–205. doi: 10.1056/NEJMoa1216064

Ezaki T. Family VII. *Peptostreptococcaceae* fam. nov. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. New York: Springer Science & Business Media, 2009: 738–828, 1008–15.

Fimlaid KA, Jensen O, Donnelly ML, Francis MB, Sorg JA, Shen A. Identification of a novel lipoprotein regulator of *Clostridium difficile* spore germination. *PLoS Pathog* 2015; 11(10): e1005239. doi: 10.1371/journal.ppat.1005239

Freifeld AG, Simonsen KA, Booth CS, et al. A new rapid method for *Clostridium difficile* DNA extraction and detection in stool: toward point-of-care diagnostic testing. *J Mol Diagn* 2012; 14(3): 274–9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.01.003

Fry PR, Thakur S, Abley M, Gebreyes WA. Antimicrobial resistance, toxinotype, and genotypic profiling of *Clostridium difficile* isolates of swine origin. *J Clin Microbiol* 2012; 50(7): 2366–72. doi: 10.1128/JCM.06581-11

Gérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 2013; 3(1): 14–24. doi: 10.3390/pathogens3010014

Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 2014; 5(1): 15–27. doi: 10.4161/gmic.26854

Gerding DN, Muto CA, Owens RC. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (1): 43–9. doi: 10.1086/521861

Ghose C. *Clostridium difficile* infection in the twenty-first century. *Emerg Microbes Infect* 2013; 2(9): e62. doi: 10.1038/emi.2013.62

Gil F, Lagos-Moraga S, Calderón-Romero P, Pizarro-Guajardo M, Paredes-Sabja D. Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe* 2017; 45: 3–9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.02.018

Goldenberg SD, French GL. Lack of association of tcdC type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. J Infect 2011; 62(5): 355–62. doi: 10.1016/j.jinf.2011.03.001

Grzeškowiak Ł, Zentek J, Vahjen W. Physical pre-treatment improves efficient DNA extraction and qPCR sensitivity from *Clostridium difficile* spores in faecal swine specimens. Curr Microbiol 2016; 73(5): 727–31. doi: 10.1007/s00284-016-1123-8

Gustafsson A, Båverud V, Gunnarsson A, Pringle J, Franklin A. Study of faecal shedding of *Clostridium difficile* in horses treated with penicillin. Equine Vet J 2004; 36(2): 180–2. doi: 10.2746/0425164044868657

Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49(2): 390–402. doi:10.1001/archpedi.1935.01970020105010

Hawken P, Weese JS, Friendship R, Warriner K. Longitudinal study of *Clostridium difficile* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pigs from weaning through to the end of processing. J Food Prot 2013; 76(4): 624–30. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-330

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6(10): 986–94. doi: 10.1101/gr.6.10.986

Hensgens MP, Keessen EC, Squire MM, et al. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease?. Clin Microbiol Infect 2012; 18(7): 635–45. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x

Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36(1): 131–48. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 1992; 10(4): 413–7. doi: 10.1038/nbt0492-413

Hofer E, Haechler H, Frei R, Stephan R. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. J Food Prot 2010; 73(5): 973–5. doi: 10.4315/0362-028x-73.5.973

Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 1863–8. doi: 10.1128/jcm.42.5.1863-1868.2004

Hopman NEM, Keessen EC, Harmanus C, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol* 2011; 149(1-2): 186–92. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.013

Houser BA, Hattel AL, Jayarao BM. Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile* toxin-encoding strains. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7(6): 719–26. doi: 10.1089/fpd.2009.0483

Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 2016; 37: 13–24. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.009

Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *Int J Food Microbiol* 2010; 138(1/2): 172–5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022

Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea?. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(8): 2883–7. doi: 10.1128/AAC.01443-06

Käser M, Ruf MT, Hauser J, Marsollier L, Pluschke G. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(2): 414–8. doi: 10.1128/AEM.01358-08

Kecerova Z, Cizek A, Nyc O, Krutova M. *Clostridium difficile* isolates derived from Czech horses are resistant to enrofloxacin; cluster to clades 1 and 5 and ribotype 033 predominates. *Anaerobe* 2019; 56: 17–21. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.01.005

Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1963–4. doi: 10.1128/JCM.00224-07

Keessen EC, Harmanus C, Dohmen W. *Clostridium difficile* infection associated with pig farms. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(6): 1032–4. doi: 10.3201/eid1906.121645

Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, et al. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(1): 89–95. doi: 10.1038/ajg.2011.398

Kim HY, Cho A, Kim JW, Kim H, Kim B. High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. *Anaerobe* 2018; 51: 42–6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.03.012

Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveill* 2014; 19(45): e20954. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.45.20954

Knight DR, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV. Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(3): 721–41. doi: 10.1128/CMR.00127-14

Knight DR, Riley TV. Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*. *Front Public Health* 2019; 7: 164. doi: 10.3389/fpubh.2019.00164

Knight DR, Riley TV. Prevalence of gastrointestinal *Clostridium difficile* carriage in Australian sheep and lambs. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(18): 5689–92. doi: 10.1128/AEM.01888-13

Knight DR, Squire MM, Collins DA, Riley TV. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Front Microbiol* 2017; 7: 2138. doi: 10.3389/fmicb.2016.02138

Knight DR, Thean S, Putsathit P, Fenwick S, Riley TV. *Clostridium difficile* carriage in Australian cattle: a cross-sectional study reveals high prevalence of non-PCR ribotype 078 strains in veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 2630–5. doi: 10.1128/AEM.03951-12

Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, et al. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLoS Pathog* 2017; 13(7): e1006443. doi: 10.1371/journal.ppat.1006443

Krutova M, Zouharova M, Matejkova J, et al. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. *Int J Med Microbiol* 2018; 308(7): 770–5. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.05.006

Kumar N, Miyajima F, He M, et al. Genome-based infection tracking reveals dynamics of *Clostridium difficile* transmission and disease recurrence. *Clin Infect Dis* 2016; 62(6): 746–52. doi: 10.1093/cid/civ1031

Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(1): 208–36. doi: 10.1128/CMR.00110-14

Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016; 40: 95–9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008

Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 2015; 372(16): 1539–48. doi: 10.1056/NEJMra1403772

Leishman ON, Labuza TP, Diez-Gonzalez F. Hydrophobic properties and extraction of *Bacillus anthracis* spores from liquid foods. *Food Microbiol* 2010; 27(5): 661–6. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.001

Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol* 2004a; 42(6): 2609–17. doi: 10.1128/JCM.42.6.2609-2617.2004

Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004b; 42(12): 5710–4. doi: 10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004

Levett PN. *Clostridium difficile* in habitats other than the human gastro-intestinal tract. *J Infect* 1986; 12(3): 253–63. doi: 10.1016/s0163-4453(86)94294-5

Lim SC, Foster NF, Elliott B, Riley TV. High prevalence of *Clostridium difficile* on retail root vegetables, Western Australia. J Appl Microbiol 2018; 124(2): 585–90. doi: 10.1111/jam.13653

Limbago B, Thompson AD, Greene SA, et al. Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of US retail meats. Food Microbiol 2012; 32(2): 448–51. doi: 10.1016/j.fm.2012.08.005

Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. N Engl J Med 2011; 365(18): 1693–703. doi: 10.1056/NEJMoa1012413

Luna VA, King DS, Peak KK, et al. *Bacillus anthracis* virulent plasmid pX02 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2367–77. doi: 10.1128/JCM.00154-06

Lund BM, Peck MW. A possible route for foodborne transmission of *Clostridium difficile*?. Foodborne Pathog Dis 2015; 12(3): 177–82. doi: 10.1089/fpd.2014.1842

Magistrali CF, Maresca C, Cucco L, et al. Prevalence and risk factors associated with *Clostridium difficile* shedding in veal calves in Italy. Anaerobe 2015; 33: 42–7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.01.010

Marsh JW, Tulenko MM, Shutt KA, et al. Multi-locus variable number tandem repeat analysis for investigation of the genetic association of *Clostridium difficile* isolates from food, food animals and humans. Anaerobe 2011; 17(4): 156–60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.05.015

Martin JS, Monaghan TM, Wilcox MH. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016; 13(4): 206–16. doi: 10.1038/nrgastro.2016.25

McBee RH. Intestinal flora of some Antarctic birds and mammals. J Bacteriol 1960; 79(2): 311–2.

McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(3): 409–15. doi: 10.3201/eid1205.051064

Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol* 2011; 152(1-2): 212–5. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.012

Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe* 2011; 17(2): 85–6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.02.008

Metcalf D, Weese JS. Evaluation of commercial kits for extraction of DNA and RNA from *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 2012; 18(6): 608–13. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.003

Metcalf DS, Costa MC, Dew WMV, Weese JS. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Lett Appl Microbiol* 2010; 51(5): 600–2. doi: 10.1111/j.1472-765x.2010.02933.x

Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(11): 4715–24.

Morishita T, Nakayama T, Kamiya T, Mori S, Isobe K, Furuta Y. Basic and clinical aspects of *Clostridium difficile* colitis. *Rev Gastroenterol Perú* 2004; 24(3): 263–9.

Nadkarni MA, Martin FE, Hunter N, Jacques NA. Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 296(1): 45–51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01629.x

Norén T, Åkerlund T, Bäck E, et al. Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired *Clostridium difficile* infection in a Swedish county. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3635–43. doi: 10.1128/JCM.42.8.3635-3643.2004

Norén T, Johansson K, Unemo M. *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(1): O2–6. doi: 10.1111/1469-0691.12296

Norman KN, Harvey RB, Andrews K, et al. Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2014; 31(6): 1127–9. doi: 10.1080/19440049.2014.888785

Norman KN, Harvey RB, Scott HM, Hume ME, Andrews K, Brawley AD. Varied prevalence of *Clostridium difficile* in an integrated swine operation. *Anaerobe* 2009; 15(6): 256–60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.09.006

Nylund L, Heilig HG, Salminen S, de Vos WM, Satokari R. Semi-automated extraction of microbial DNA from feces for qPCR and phylogenetic microarray analysis. *J Microbiol Methods* 2010; 83(2): 231–5. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.003

O'Neill G, Adams JE, Bowman RA, Riley TV. A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiol Infect* 1993; 111(2): 257–64. doi: 10.1017/s095026880005696x

Otten AM, Reid-Smith RJ, Fazil A, Weese JS. Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. *Epidemiol Infect* 2010; 138(6): 907–14. doi: 10.1017/S0950268809991646

Ozaki E, Kato H, Kita H, et al. *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. *J Med Microbiol* 2004; 53(2): 167–72. doi: 10.1099/jmm.0.05376-0

Paltansing SV, Van Den Berg RJ, Guseinova RA, Visser CE, Van Der Vorm ER, Kuijper EJ. Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands, 2005. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(11): 1058–64. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01793.x

Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 2014; 22(7): 406–16. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.003

Paredes-Sabja D, Torres JA, Setlow P, Sarker MR. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. *J Bacteriol* 2008; 190(4): 1190–201. doi: 10.1128/JB.01748-07

Pasquale V, Romano V, Rupnik M, et al. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiol* 2012; 31(2): 309–12. doi: 10.1016/j.fm.2012.03.001

Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE. Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-

fed and formula-fed infants by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett 2005; 243(1): 141–7. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.052

Peterson LR, Kelly PJ. The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Infect Dis Clin North Am 1993; 7(2): 277–93.

Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1988; 56(9): 2299–306. doi: 10.1128/IAI.56.9.2299-2306.1988

Quigley L, O'Sullivan O, Beresford TP, Paul Ross R, Fitzgerald GF, Cotter PD. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. J Appl Microbiol 2012; 113(1): 96–105. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan PJ, Fanning S, Fitzpatrick ES. Veterinary microbiology and microbial disease: *Clostridium* species. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2011: 233–49.

Rabold D, Espelage W, Abu Sin M, et al. The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. PloS One 2018; 13(2): e0193411. doi: 10.1371/journal.pone.0193411

Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4211–7. doi: 10.1128/jcm.40.11.4211-4217.2002

Rodriguez C, Hakimi DE, Vanleyssem R, et al. *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment: assessing the spread of the bacterium. Vet Microbiol 2017; 210: 183–7. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.010

Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. In: Donelli G. Advances in microbiology, infectious diseases and public health. Vol 2. Gewerbestrasse: Springer International Publishing, 2016: 65–92. doi: 10.1007/978-3-319-27935-0

Rodriguez-Palacios A, Ilic S, LeJeune JT. Subboiling moist heat favors the selection of enteric pathogen *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 spores in food. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016; 2016: e1462405. doi: 10.1155/2016/1462405

Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, et al. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(5): 802–5. doi: 10.3201/eid1505.081084

Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Weese JS. *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe* 2010; 16(5): 540–2. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.05.004

Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3): 485–7. doi: 10.3201/eid1303.060988

Rodriguez-Palacios A, Stämpfli HR, Duffield T, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(11): 1730–6. doi: 10.3201/eid1211.051581

Romano V, Albanese F, Dumontet S, Krovacek K, Petrini O, Pasquale V. Prevalence and genotypic characterization of *Clostridium difficile* from ruminants in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 2012; 59(8): 545–8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01540.x

Romano V, Pasquale V, Lemee L, et al. *Clostridioides difficile* in the environment, food, animals and humans in southern Italy: Occurrence and genetic relatedness. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018; 59: 41–6. doi: 10.1016/j.cimid.2018.08.006

Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 1992; 17(1): 37–45. doi: 10.1016/0168-1605(92)90017-w

Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault AC, Le Monnier A, Collignon A. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis* 2012; 55(9): 1209–15. doi: 10.1093/cid/cis637

Rupnik M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease?. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(5): 457–9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01687.x

Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* 2007; 29(7): 985–94. doi: 10.1007/s10529-007-9345-2

Schaechter M, Engleberg NC, DiRita VJ, Dermody TS. Schaechter's mechanisms of microbial disease: Clostridia: Diarrheal disease, tissue infection, botulism and tetanus. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 235–41.

Scholz M, Giddings I, Pusch CM. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal Biochem* 1998; 259(2): 283–6. doi: 10.1006/abio.1998.2676

Schoster A, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS, Guardabassi L. Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. *J Vet Intern Med* 2015; 29(3): 925–31. doi: 10.1111/jvim.12584

Shrestha R, Sorg JA. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. *Anaerobe* 2018; 49: 41–7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.12.001

Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 1996–2001. doi: 10.1128/JCM.00032-08

Song PH, Min JH, Kim YS, et al. Rapid and accurate diagnosis of *Clostridium difficile* infection by real-time polymerase chain reaction. *Intest Res* 2018; 16(1): 109–115. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.109

Songer JG, Post KW, Larson DJ, Jost BH, Glock RD. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *J Swine Health Prod* 2000; 8(4): 185–9.

Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(5): 819–21. doi: 10.3201/eid1505.081071

Sorg JA, Sonenshein AL. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol* 2008; 190(7): 2505–12. doi: 10.1128/JB.01765-07

Stein K, Egan S, Lynch H, et al. PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. *Anaerobe* 2017; 48: 237–41. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.10.004

Sun X, Hirota SA. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol* 2015; 63(2): 193–202. doi: 10.1016/j.molimm.2014.09.005

Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol* 2013; 108(4): 478–98. doi: 10.1038/ajg.2013.4

Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3719–24. doi: 10.1128/JCM.00427-10

Tkalec V, Jamnikar-Ciglenecki U, Rupnik M, Vadnjal S, Zelenik K, Biasizzo M. *Clostridioides difficile* in national food surveillance, Slovenia, 2015 to 2017. *Euro Surveill* 2020; 25(16): e1900479. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.1900479

Tkalec V, Janežič S, Skok B, et al. High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes compared to some other vegetables in Slovenia. *Food Microbiol* 2019; 78: 194–200. doi: 10.1016/j.fm.2018.10.017

Troiano T, Harmanus C, Sanders IM, et al. Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes in edible marine bivalve molluscs in Italy. *Int J Food Microbiol* 2015; 208: 30–4. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.002

Vandeventer PE, Weigel KM, Salazar J, et al. Mechanical disruption of lysis-resistant bacterial cells by use of a miniature, low-power, disposable device. *J Clin Microbiol* 2011; 49(7): 2533–9. doi: 10.1128/JCM.02171-10

Von Abercron SMM, Karlsson F, Wigh GT, Wierup M, Krovacek K. Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *J Food Prot* 2009; 72(8): 1732–4. doi: 10.4315/0362-028x-72.8.1732

- Warriner K, Xu C, Habash M, Sultan S, Weese SJ. Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: significant sources of *C. difficile* community-acquired infection?. *J Appl Microbiol* 2017; 122(3): 542–53. doi: 10.1111/jam.13338
- Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(15): 5009–11. doi: 10.1128/AEM.00480-09
- Weese JS, Finley R, Reid-Smith RR, Janecko N, Rousseau J. Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiol Infect* 2010a; 138(8): 1100–4. doi: 10.1017/S0950268809991312
- Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol* 2010b; 50(4): 362–5. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x
- Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet J* 2001; 33(4): 403–9. doi: 10.2746/042516401776249534
- Wheeldon LJ, Worthington T, Lambert PA. Histidine acts as a co-germinant with glycine and taurocholate for *Clostridium difficile* spores. *J Appl Microbiol* 2011; 110(4): 987–94. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04953.x
- Wielinga PR, De Heer L, De Groot A, et al. Evaluation of DNA extraction methods for *Bacillus anthracis* spores spiked to food and feed matrices at biosafety level 3 conditions. *Int J Food Microbiol* 2011; 150(2/3): 122–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.023
- Winston JA, Theriot CM. Impact of microbial derived secondary bile acids on colonization resistance against *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract. *Anaerobe* 2016; 41: 44–50. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.05.003
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1): 75–85. doi: 10.2144/05391RV01
- Yaeger MJ, Kinyon JM, Songer JG. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and

microscopic lesions. J Vet Diagn Invest 2007; 19(1): 52–9. doi:
10.1177/104063870701900108

Yoon JG, Kang JS, Hwang SY, Song J, Jeong SH. Magnetic bead-based nucleic acid purification kit: Clinical application and performance evaluation in stool specimens. J Microbiol Methods 2016; 124: 62–8. doi: 10.1016/j.mimet.2016.03.011

Zhu D, Sorg JA, Sun X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. Front Cell Infect Microbiol 2018; 8: 29. doi: 10.3389/fcimb.2018.00029

Zidarič V, Beigot S, Lapajne S, Rupnik M. The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. Anaerobe 2010; 16(4): 371–5. doi:
10.1016/j.anaerobe.2010.06.001