

Univerza  
v Ljubljani  
*Veterinarska*  
fakulteta



Petra Bandelj

DINAMIKA IZLOČANJA IN ZNAČILNOSTI SEVOV  
BAKTERIJE *Clostridium difficile* V REJAH KRAV  
MOLZNIC

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 636.2.034.09:579.852.13:57.083:577.21(043.3)

Petra Bandelj, dr. vet. med.

DINAMIKA IZLOČANJA IN ZNAČILNOSTI SEVOV BAKTERIJE  
*Clostridium difficile* V REJAH KRAV MOLZNIC

Doktorska disertacija

THE DYNAMICS OF SHEDDING AND STRAIN  
CHARACTERIZATION OF *Clostridium difficile* ON DAIRY  
FARMS

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2014

Petra Bandelj

Dinamika izločanja in značilnosti sevov bakterije *Clostridium difficile* v rejah krav molznic

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: zn. svet. dr. Matjaž Ocepek

Somentorica: prof. dr. Maja Rupnik

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: viš. zn. sod. dr. Brane Krt

Član: doc. dr. Jože Starič

Član: doc. dr. Maja Sočan

"Sometimes the heart is so heavy that we turn away from it and forget that its throbbing is the wisest message of life, a wordless message that says, "Live, be, move, rejoice – you are alive!" Without the heart's wise rhythm, we could not exist." – *Michael Jackson, Dancing the Dream*

## IZVLEČEK

Ključne besede: Epidemiologija – veterinarska; klostridijske infekcije – mikrobiologija; *Clostridium difficile* – izolacija in čiščenje – genetika – klasifikacija; feces – mikrobiologija; polimerazna, verižna reakcija – metode; ribotipizacija; mikrobnii občutljivostni testi; govedo

*Clostridium difficile* (v nadaljevanju CD) je bakterija, ki povzroča driske pri ljudeh in živalih, ko se poruši normalna mikrobiota črevesja. Živali v okolju ljudi bi lahko bile vir izvenbolnišnične okužbe s CD. V okviru doktorske naloge smo z metodo qPCR pregledali 540 skupnih vzorcev blata krav molznic, 511 skupnih vzorcev blata telet in 2442 posameznih vzorcev blata telet 20 različnih družinskih kmetij. Vse pozitivne vzorce blata govedi ( $n = 297$ ) in dodatne okoljske vzorce smo pregledali z gojitveno metodo. Pridobljene izolate ( $n = 165$ ) smo tipizirali in ugotovili skupno 24 različnih ribotipov in 6 različnih toksinotipov. Med njimi je prevladoval ribotip 033. Prvič smo izolirali dva nova ribotipa in en nov toksinotip. Z metodo MLVA smo ugotovili, da večina govejih klonalnih sevov CD kroži znotraj ene kmetije oziroma znotraj geografsko povezanih kmetij, kar pa ne velja za okoljske seve. Dokazali smo tudi prenos govejega seva CD z ene kmetije na drugo preko prodaje teleta. Z metodo določanja občutljivosti za antibiotike smo testirali 159 sevov CD. Najvišja stopnja odpornosti je bila proti antibiotikom eritromicin (93,3%), sledila sta daptomicin (68,6%) in klindamicin (46,1%). Sevi CD ribotipa 012 so pokazali visoko hkratno odpornost proti antibiotikom eritromicin, klindamicin, rifampicin in tetraciklin. Ugotavliali smo prevalenco in različne dejavnike tveganja na izločanje CD v blatu goveda. Na večjo prevalenco CD najbolj vplivajo starost telet, bolezni in zdravljenje krav ter sprememba prehrane. Bolezni krav, predvsem mastitis, in zdravljenje vplivajo izključno na teleta med 21. in 57. dnem starosti. Na slednje vpliva tudi lisasta (LS) pasma goveda. V nalogi smo vpeljali statistično podprt sistem določanja dinamike izločanja bakterije CD v rejah krav molznic, ki ima veliko epidemiološko vrednost. Poleg tega smo vpeljali, optimizirali in validirali predhodno objavljen qPCR za 16S rDNA gen CD in novo mikrotitrsko ploščo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije 17 antibiotikov. Ugotovili smo, da so na družinskih kmetijah krav molznic prisotni sevi, ki bi lahko bili nevarni za ljudi, vendar je njihova prevalenca nizka. Zaradi nepatogenosti prevladujočih ribotipov CD na kmetijah lahko sklepamo, da imajo družinske kmetije v lokalni skupnosti bolj indikativno vlogo v epidemiologiji izvenbolnišnične okužbe s CD.

## ABSTRACT

Key words: Epidemiology – veterinary; clostridium infections – microbiology; *Clostridium difficile* – isolation and purification – genetics – classification; feces – microbiology; polymerase chain reaction – methods; ribotyping; microbial sensitivity tests; cattle

*Clostridium difficile* (CD) is a common cause of diarrhea in humans and animals, when gut microbiota is disturbed. Animals in our environment could be the source of community acquired CDI. In our study 540 pooled fecal samples from dairy cows, 511 pooled fecal samples and 2442 individual fecal samples from calves from 20 dairy farms, were examined with qPCR. Environmental and positive cattle samples (n=297) were cultured for CD. Typing of 165 CD strains revealed 24 different ribotypes and 6 different toxinotypes. Ribotype 033 was most represented. Two new CD ribotype and one new toxinotype were discovered. MLVA showed that most clonal cattle CD isolates circulate within each farm or within farms in the same geographic region, which is different from environmental CD strains. Also, a transmission of a CD isolate from one farm to another through a calf was proved. Antibiotic susceptibility testing plates were used for further analysis of 159 CD isolates. The highest level of resistance was against erithromycin (93,3%), followed by daptomycin (68,6%) and clindamycin (46,1%). *Clostridium difficile* ribotype 012 showed high multidrug resistance for erithromycin, clindamycin, rifampicin and tetracycline. Results indicated that risk factors associated with higher CD prevalence and shedding are younger calves, diseases of cows, treatment of cows and change in diet. Treatment and diseases of cows, especially mastitis, affected only calves between 21 and 57 days of age. This group of calves were also affected by cattle breed (Simmental). In conclusion, a statistically supported system for evaluation of the dynamics of CD shedding in dairy farms was implemented, which has a great epidemiological value. A newly optimized qPCR for 16S rDNA CD gene was validated based on MIQE standard to support precise epidemiological investigations. Also a new microtiter MIC plate for 17 antibiotics that are used for CDI treatment and epidemiological research, was developed. In the end, dairy farms do harbor some CD strains that could be dangerous to humans, although their prevalence is low. Because of nonpathogenic properties of the predominant CD ribotype on farms, we could conclude that family farms have in their local communities a more indicative role in the epidemiology of community-acquired CDI.

## KAZALO

IZVLEČEK.....	5
ABSTRACT.....	6
KAZALO.....	7
KAZALO TABEL.....	10
KAZALO SLIK.....	13
SEZNAM OKRAJŠAV.....	15
1. UVOD.....	18
2. PREGLED LITERATURE.....	20
2.1. Splošne značilnosti bakterije <i>Clostridium difficile</i> .....	20
2.2. Zgodovinski pregled.....	21
2.3. Dejavniki virulence bakterije <i>Clostridium difficile</i> .....	21
2.4. Patogeneza bolezni CDI in zdravljenje.....	22
2.4.1. CDI pri živalih.....	24
2.4.2. Zdravljenje CDI pri ljudeh.....	26
2.5. Laboratorijska diagnostika.....	27
2.5.1. Izolacija bakterije CD na gojiščih.....	27
2.5.2. Dokazovanje in kvantifikacija nukleinske kisline.....	29
2.5.3. Genotipizacija bakterije <i>Clostridium difficile</i> .....	30
2.5.3.1. Toksinotipizacija.....	31
2.5.3.2. PCR-ribotipizacija.....	32
2.5.3.3. Analiza multilokusnega števila tandemskih ponovitev (MLVA) .....	32
2.5.4. Občutljivost na antibiotike.....	34
2.5.4.1. Penicilini.....	35
2.5.4.2. Antibiotiki MLS (makrolidi-linkozamidi-streptogramin B).....	36
2.5.4.3. Kinoloni.....	37
2.5.4.4. Cefalosporini.....	37
2.5.4.5. Tetraciklini.....	37
2.5.4.6. Ostali antibiotiki.....	38
2.6. Epidemiologija in dejavniki tveganja za okužbo s CD.....	38
2.6.1. Epidemiologija CD pri ljudeh.....	38
2.6.2. Epidemiologija CD pri živalih.....	39
2.6.3. Dejavniki tveganja za okužbo s <i>Clostridium difficile</i> .....	42
3. MATERIALI IN METODE.....	44
3.1. Živali in vzorci.....	44
3.1.1. Opis vzorčenih rej goveda.....	44
3.1.1.1. Kmetija 1.....	44
3.1.1.2. Kmetija 2.....	45

3.1.1.3. Kmetija 3.....	45
3.1.1.4. Kmetija 4.....	46
3.1.1.5. Kmetija 5.....	46
3.1.1.6. Kmetija 6.....	46
3.1.1.7. Kmetija 7.....	46
3.1.1.8. Kmetija 8.....	47
3.1.1.9. Kmetija 9.....	48
3.1.1.10. Kmetija 10.....	48
3.1.1.11. Kmetija 11.....	49
3.1.1.12. Kmetija 12.....	49
3.1.1.13. Kmetija 13.....	50
3.1.1.14. Kmetija 14.....	50
3.1.1.15. Kmetija 15.....	50
3.1.1.16. Kmetija 16.....	50
3.1.1.17. Kmetija 17.....	51
3.1.1.18. Kmetija 18.....	51
3.1.1.19. Kmetija 19.....	52
3.1.1.20. Kmetija 20.....	52
3.1.2. Vzorci blata goveda in vzorci okolja.....	53
3.1.2.1. Vzorci blata goveda.....	53
3.1.2.2. Okoljski vzorci.....	53
3.2. Metode.....	55
3.2.1. Izolacija DNA iz blata.....	55
3.2.2. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) za določanje 16S rRNA gena bakterije <i>Clostridium difficile</i> .....	56
3.2.3. Določanje CD v blatu in okoljskih vzorcih z gojitveno preiskavo.....	59
3.2.4. Statistična obdelava podatkov.....	59
3.2.5. Molekularna tipizacija sevov CD.....	60
3.2.5.1. PCR-ribotipizacija in toksinotipizacija sevov CD.....	60
3.2.5.2. MLVA sevov CD.....	60
3.2.6. Občutljivost sevov CD na antibiotike.....	64
3.2.6.1. Postopek dela za plošče Micronaut-S CD MIC.....	65
4. REZULTATI.....	66
4.1. Zdravstveni status kmetij.....	66
4.2. Rezultati optimizacije in validacije qPCR.....	67
4.3. Prevalenca <i>Clostridium difficile</i> v blatu goveda in molekularna karakterizacija.....	67
4.3.1. Skupinski vzorci blata krav molznic.....	67
4.3.2. Skupinski in individualni vzorci blata telet.....	67
4.4. Kvantifikacija <i>Clostridium difficile</i> v blatu telet.....	72
4.5. Statistično ovrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na višjo prevalenco CD na kmetijah.....	75

4.5.1. Univariatna analiza.....	75
4.5.2. Multivariatna analiza.....	76
4.6. Molekularna karakterizacija sevov CD z ribotipizacijo in toksinotipizacijo.....	79
4.6.1. Sevi bakterije <i>Clostridium difficile</i> iz blata goveda.....	79
4.6.2. Prevalenca in karakterizacija sevov bakterije <i>Clostridium difficile</i> iz okolja kmetij.....	81
4.7. Primerjava okoljskih in govejih izolatov <i>Clostridium difficile</i> z metodo MLVA.....	84
4.7.1. Interpretacija sorodstvenega drevesa izolatov bakterije CD ribotipa 033 .....	84
4.8. Validacija plošč Micronaut-S CD MIC.....	86
4.9. Rezultati testiranja občutljivosti bakterije <i>Clostridium difficile</i> na antibiotike.....	87
4.9.1. Minimalne inhibitorne koncentracije za seve CD ribotipa 033 in SLO 060.....	90
4.9.2. Opredelitev sevov CD, občutljivih na antibiotike in odpornih proti njim, na podlagi mejnih vrednosti EUCAST.....	92
5. RAZPRAVA.....	94
5.1. Prevalenca, kvantifikacija in dejavniki, ki vplivajo na izločanje CD na družinskih kmetijah krav molznic...95	95
5.2. Molekularne značilnosti sevov CD, prisotne pri govedu in v okolini kmetij.....	99
5.3. Občutljivost izoliranih sevov CD na antibiotike.....	101
6. ZAKLJUČKI.....	106
7. POVZETEK.....	109
8. SUMMARY.....	112
9. ZAHVALE.....	115
10. LITERATURA.....	117
11. PRILOGE.....	133
11.1. Rezultati optimizacije qPCR za 16S rRNA gen bakterije CD in učinkovitost izolacije DNA iz blata goveda.....	133
11.2. Dinamika izločanja CD pri teletih med raziskavo .....	134
11.3. Število CD v blatu goveda pri teletih, ki so bila med vzorčenji samo 1-krat pozitivna.....	136
11.4. Rezultati MLVA.....	138
11.5. Validacija plošč Micronaut-S CD MIC.....	143
11.6. Minimalne inhibitorne koncentracije izoliranih sevov CD.....	145

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Prevalenca CD pri govedu.....	40
Table 1: CD prevalence in cattle.....	40
Tabela 2: Optimizirana sestava reakcijske mešanice za qPCR 16S rRNA CD.....	57
Table 2: Optimized reaction mix composition for qPCR 16S rRNA CD.....	57
Tabela 3: Sekvence začetnih oligonukleotidov za izbrane lokuse CD MLVA.....	61
Table 3: MLVA CD primer sequences for selected loci.....	61
Tabela 4: Program pomnoževanja za CD MLVA.....	62
Table 4: MLVA CD multiplication protocol.....	62
Tabela 5: Sekvence začetnih oligonukleotidov za izbrane lokuse CD MLVA ribotip 033.....	63
Table 5: MLVA CD ribotype 033 primer sequences for selected loci.....	63
Tabela 6: Program pomnoževanja za CD MLVA ribotip 033.....	63
Table 6: MLVA CD ribotype 033 muliplication protocol.....	63
Tabela 7: Nukleotidno zaporedje tandemskih ponovitev uporabljenih lokusov, lokacija na genomski sekvenci in število bp v priležnih regijah seva 630 bakterije CD.....	64
Table 7: Tandem repeat sequences, location on gene and number of bp in CD strain 630.....	64
Tabela 8: Plošča Micronaut-S CD MIC, razporeditev in koncentracije protimikrobnih zdravil ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	65
Table 8: Micronaut-S CD plate MIC, distribution and antimicrobial concentrations ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	65
Tabela 9: Zdravstveni status vzorčenih kmetij.....	66
Table 9: Health status of sampling farms.....	66
Tabela 10: Rezultati optimizacije qPCR protokola za 16S rRNA gen bakterije CD.....	133
Table 10: Optimization results for CD qPCR 16S rRNA gene.....	133
Tabela 11: Učinkovitost izolacije DNA iz blata goveda.....	133
Table 11: Efficiency of DNA isolation from cattle feces.....	133
Tabela 12: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev krav molznic in telet.....	69
Table 12: Results of pooled fecal samples from cows and calves .....	69
Tabela 13: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev krav molznic.....	70
Table 13: Results of pooled fecal samples from cows.....	70
Tabela 14: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev telet.....	71
Table 14: Result of pooled fecal samples from cows.....	71
Tabela 15: Rezultati kvantifikacije bakterije CD v blatu večkrat pozitivnih teletih (Priloga 11.2.).....	134
Table 15: Quantification results for CD in feces of calves that were positive multiple times.....	134
Tabela 16: Rezultati kvantifikacije bakterije CD v blatu 1-krat pozitivnih teletih (0–21 dni) (Priloga 11.3.)....	136
Table 16: Quantification results for CD in feces of calves with single positive sample (0-21 days).....	136
Tabela 17: Rezultati kvantifikacije bakterije CD v blatu 1-krat pozitivnih teletih (22–180 dni) (Priloga 11.3.).	137
Table 17: Quantification results for CD in feces of once positive calves (22-180 days).....	137
Tabela 18: Okoljski in drugi dejavniki, ki vplivajo na prisotnost CD na kmetijah.....	77
Table 18: Environmental and other risk factor associated with higher CD prevalence on farms.....	77

Tabela 19: Prevalenca CD na kmetijah v povezavi z dejavniki bolezni in zdravljenjem.....	78
Table 19: Diseases and treatment as risk factors associated with farms with higher CD prevalence .....	78
Tabela 20: Pregled rezultatov individualnih vzorcev telet po kmetijah in molekularna karakterizacija sevov CD.....	80
Table 20: Results for individual fecal samples from calves and molecular characterization of isolated CD strains.....	80
Tabela 21: Razporeditev okoljskih sevov CD po kmetijah in letnih časih.....	82
Table 21: Distribution of environmental CD strains by farms and seasons.....	82
Tabela 22: Prevalenca in molekularna karakterizacija sevov CD, izoliranih iz okolja kmetij.....	83
Table 22: Prevalence and molecular characterization of CD strains from the farms environment.....	83
Tabela 23: Primerjava rezultatov MLVA za CD ribotip 033 (Priloga 11.4.).....	138
Table 23: Comparison of MLVA results for CD ribotype 033 .....	138
Tabela 24: Rezultati MLVA za okoljske izolate CD ribotip 033 (Priloga 11.4.).....	141
Table 24: MLVA results for environmental isolates of CD ribotype 033 .....	141
Tabela 25: Rezultati MLVA za CD, izoliranih iz govejih vzorcev, ki niso ribotip 033 (Priloga 11.4.).....	142
Table 25: MLVA results for CD isolated from cattle feces other than ribotype 033.....	142
Tabela 26: Kontrola zanesljivosti plošč Micronaut-S CD MIC za ugotavljanje občutljivosti na antibiotike (Priloga 11.5.).....	143
Table 26: Quality control of Micronaut-s CD plates MIC for antibiotic susceptibility testing.....	143
Tabela 27: Ponovljivost plošč Micronaut-S CD MIC za ugotavljanje občutljivosti na antibiotike in primerjava z E-testi (Priloga 11.5.).....	144
Table 27: Reproducibility of Micronaut-S CD plates MIC for antimicrobial susceptibility testing and comperisment with E-Tests.....	144
Tabela 28: Občutljivost na antibiotike govejih in okoljskih sevov CD, testiranih na ploščah Micronaut-S MIC CD .....	88
Table 28: Antibiotic susceptibility for cattle and environmental CD strains tested with Micronaut-S MIC CD plates.....	88
Tabela 29: Razporeditev vseh izoliranih sevov CD glede občutljivosti na posamezne antibiotike.....	89
Table 29: Distribution of all isolated CD strain based on different antibiotic susceptibility .....	89
Tabela 30: Vrednosti MIC 50 in MIC 90 za dva najpogosteje izolirana ribotipa CD.....	91
Table 30: MIC 50 and MIC 90 values for the two most frequently isolated ribotypes of CD.....	91
Tabela 31: Razpon MIC za CD izolate ribotipov 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018 in 023 (Priloga 11.6.).....	145
Table 31: MIC range for CD isolates ribotype 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018 in 023 .....	145
Tabela 32: Razpon MIC za CD izolate ribotip 033, 045, 071, 077, 081, SLO 025, SLO 029, SLO 036 (Priloga 11.6.).....	146
Table 32: MIC range for CD isolates ribotype 033, 045, 071, 077, 081, SLO 025, SLO 029, SLO 036 .....	146

Tabela 33: Razpon MIC za CD izolate ribotipov SLO 053, SLO 057, SLO 060, SLO 063, SLO 084, SLO 116, SLO 195, SLO 196 (Priloga 11.6.).....	147
Table 33: MIC range for CD isolates ribotype SLO 053, SLO 057, SLO 060, SLO 063, SLO 084, SLO 116, SLO 195, SLO 196.....	147
Tabela 34: Odpornost in kombinacije odpornosti proti antibiotikom za izolirane seve CD .....	93
Table 34: Antibiotic resistance and combination of resistance for isolated CD strains.....	93

## KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Clostridium difficile</i> (CD) ( <a href="http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3385&amp;image=3330_clostridium, 24.2.2014">http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3385&amp;image=3330_clostridium, 24.2.2014</a> ) .....	20
Figure 1: <i>Clostridium difficile</i> (CD) .....	20
Slika 2: Shematski prikaz psevdomembranoznega kolitisa ( <a href="http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/_Pseudomembranous_Colitis/_pseudomembranous_colitis.html, 24.2.2014">http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/_Pseudomembranous_Colitis/_pseudomembranous_colitis.html, 24.2.2014</a> ) .....	23
Figure 2: Schematic view of pseudomembranosus colitis .....	23
Slika 3: Psevdomembranozni kolitis pri človeku ( <a href="http://ekspoze.files.wordpress.com/2012/04/clostridium-difficile-colon_fs1.jpg, 24.2.2014">http://ekspoze.files.wordpress.com/2012/04/clostridium-difficile-colon_fs1.jpg, 24.2.2014</a> ) .....	23
Figure 3: Pseudomembranosus colitis in human .....	23
Slika 4: Patoanatomske spremembe prašiča s CDI ( <a href="http://www.pig333.com/photo-of-the-week/20-Jun-2013_71, 24.2.2014">http://www.pig333.com/photo-of-the-week/20-Jun-2013_71, 24.2.2014</a> ) .....	24
Figure 4: Patoanatomic changes in a pig with CDI .....	24
Slika 5: Driska pri odraslem konju, sum CDI (Oregon, ZDA).....	25
Figure 5: Diarrhea in adult horse, CDI suspected (Oregon, USA).....	25
Slika 6: CD na gojišču.....	28
Fugure 6: CD culture.....	28
Slika 7: Prosta reja goveda pasme ČB (kmetija 1).....	45
Figure 7: Free-stall type housing of Black and white (BW) cattle farm (farm 1).....	45
Slika 8: Teleta pasme ČB v individualnih boksih (kmetija 7).....	47
Figure 8: BW calves housed in individual pens (farm 7).....	47
Slike 9: Presušene ČB krave na paši (kmetija 10).....	48
Figure 9: Free-stall type housing BW cows during dry period (farm 10).....	48
Slika 10: Vezana reja s pašo krav molznic pasme LS (kmetija 11).....	49
Figure 10: Simmental cattle in a tie-type farm with pasture (farm 11).....	49
Slika 11: Teleta pasme LS v skupinskem boksu med napajanjem (kmetija 17).....	51
Figure 11: Simmental calves in a group pen during feeding (farm 17).....	51
Slika 12: Vezana reja krav pasme LS (kmetija 18).....	52
Figure 12: Simmental cattle in a tie-type farm (farm 18).....	52
Slika 13: Okoljski vzorci: a) pes pri teletih v hlevu 17, b) mačka v hlevu 15, c) kozel in pav na kmetiji 11, č) kokoš s piščanci v hlevu 15, d) gnezdo lastovk v hlevu 4, e) gnoj in okolje kmetije 16 .....	54
Figure 13: Environmental samples: a) dog interacting with calves in the barn 17, b) cat in the barn 15, c) goat and peacock on farm 11, č) hen with chickens in the barn 15, d) Barn swallow nest inside the barn 4, e) manure and the surroundings of farm 16 .....	54
Slika 14: Povprečno število celic CD v blatu telet starosti od 0 do 21 dni.....	73
Figure 14: Average cell CD number in feces from calves aged from 0 to 21 days.....	73
Slika 15: Povprečno število celic CD v blatu telet starosti od 22 do 56 dni.....	73
Figure 15: Average cell CD number in feces from calves aged from 22 to 56 days.....	73

Slika 16: Povprečno število celic CD v blatu telet starosti od 57 do 180 dni.....74  
Figure 16: Average cell CD number in feces from calves aged from 57 to 180 days.....74

Slika 17: Sorodstveno drevo izolatov bakterije *Clostridium difficile* ribotip-a 033 iz blata telet in okolja kmetij.85  
Figure 17: Minimal spanning tree for CD ribotype 033 isolated from calves feces and environmental samples...85

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADP; adenozin difosfat

ATCC; referenčni sev (ang. american type culture collection)

BH1; bovine herpesvirus 1 (glej IBR)

BLAST; ang. basic local alignment search tool

bp; bazni par

BVD; goveja virusna driska (ang. bovine viral diarrhea)

CACDI; izvenbolnišnična okužba z bakterijo *Clostridium difficile* (ang. Community-associated *Clostridium difficile* infection)

CD; *Clostridium difficile*

Cdc42; poddružina majhnih GTZ-az

CDI; infekcija z bakterijo *Clostridium difficile* (ang. *Clostridium difficile* infection)

CDT; binarni toksin bakterije *Clostridium difficile*

CdtLoc; toksinski lokus binarnega toksina (ang. *Clostridium difficile* toxin locus)

CI: interval zaupanja (ang. confidence interval)

CLSI; Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute)

CROPs; homologne regije, ki jih najdemo na C-terminalnih koncih toksinov A in B (ang. combined repetitive oligopeptides)

CV; koeficient variacije (ang. coefficient of variance)

Cy3; fluorescentno barvilo cianin-3

ČB; črno-bela pasma goveda

DNA; deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)

E; učinkovitost qPCR-ja (ang. efficiency of qPCR)

ECOFF; epidemiološki prag (ang. epidemiological cut off)

EIA; encimsko imunski test (ang. enzyme immunoassay)

eMLVA; razširjen MLVA (ang. extended MLVA)

EUCAST; Evropska komisija za testiranje antimikrobnne občutljivosti (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

FAM; fluorescentno barvilo 6-karboksifluorescein

GTP; gvanozin trifosfat

HEX; fluorescentno barvilo 6-karboksi-2',4,4',5',7,7'-heksaklorofluorescein

IBR; infekcijozni goveji rinotraheitis (ang. Infectious bovine rhinotracheitis)

IPK; interna pozitivna kontrola

ISR; medgenski prostor (ang. intergenic spacer region)

JOE; fluorescentno barvilo 6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifluorescein

Kb; kilo baznih parov

LCT; veliki klostridijski toksini (ang. large clostridial toxins)

LOD; spodnja meja detekcije (ang. limit of detection)

LOQ; spodnja meja kvantifikacije (ang. limit of quantification)

LS; lisasta pasma goveda

MALDI TOF; ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (ang. matrix-assisted laser desorption/ionization) z merjenjem časa potovanja (ang. time of flight)

MAP; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mb; mega baznih parov

MIC; minimalna inhibitorna koncentracija

plošča MIC; mikrotitrsko plošča za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov (ang. broth microdilution plate)

MIQE; minimalne informacije za objavo qPCR protokolov ( ang. minimal information for publication of quantitative real-time PCR experiments)

MLST; tipizacija na osnovi zaporedja več lokusov (ang. multilocus sequence typing)

MLVA; multilokusno spremenljivo število tandemskih ponovitev (ang. multilocus variable number tandem repeat analysis)

MMA; Mastitis, metritis, agalaktija sindrom

MST; drevo sorodnosti (ang. minimum spanning tree)

NED; 2'-kloro-5'fluoro-7',8'-fused fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescin

OR; razmerje obetov (ang. odd ratio)

P; verjetnost (ang. probability)

PaLoc; toksinski lokus (ang. pathogenicity locus)

PCR; verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

PFGE; gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (ang. pulse-field gel electrophoresis)

PMC; psevdomembranzni kolitis (ang. pseudomembranous colitis)

qPCR; kvantitativni PCR v realnem času (ang. quantitative real-time PCR)

R<sup>2</sup>; koeficient korelacije (ang. coefficient of correlation)

Radio-PAGE; avtoradiografična poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. autoradiography  
polyacrylamide gel electrophoresis)

Rac; poddružina majhnih GTP-az

rDNA; ribosomalna DNA

REA; polimorfizem restriktivnih fragmentov celotne DNA (ang. restriction endonuclease analysis)

Rho; poddružina majhnih GTP-az

RJ: rjava pasma goveda

RNA; ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)

SE; standardna napaka (ang. standard error)

SD; standardna značilnost oziroma standardna deviacija (ang. standard deviation)

SNPs; polimorfizmi enega nukleotida (ang. single nucleotide polymorphisms)

STRD; seštevek razlik med številom tandemskih ponovitev (ang. summed tandem repeat difference)

TAMRA; nefluorescentni dušilec 6-karboksi-tetrametil-rodamin

TcdA; toksin A bakterije *Clostridium difficile*

TcdB; toksin B bakterije *Clostridium difficile*

TSA; ang. tryptic soy agar

UDP-glukoza; uracil difosfat glukoza

VIC; 2'-kloro-7'-fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescin

WGS; metoda sekveniranja celotnega genoma (ang. whole genome sequencing)

## 1. UVOD

Bakterija *Clostridium difficile* (CD) je pomemben patogen za človeka in nekatere živalske vrste. Znana je predvsem kot povzročitelj drisk po zdravljenju s protimikrobnimi zdravili (v nadaljevanju antibiotiki). Njeni toksini (A, B, binarni toksin) v prebavilih povzročijo celično smrt, kar lahko privede do driske, psevdomembranoznega kolitisa (PMC) ali celo do smrti gostitelja (Voet in Ballard, 2005; Rupnik in sod., 2009).

Bakterija je v največji meri prisotna v neonatalnem obdobju pri živalih in ljudeh (Keessen in sod., 2011; Rousseau in sod., 2012; Schutze in sod., 2013). S starostjo prevalenca CD upada in naraste le ob predhodnem porušenju mikrobiote, kar je opisano pri ljudeh in konjih (Båverud 2002; Rupnik in sod., 2009, Keessen in sod., 2011). *Clostridium difficile* so dokazali pri večini proizvodnih in ljubiteljskih vrstah živali, ki niso kazale znakov okužbe, kar pomeni, da bi tudi klinično zdrave živali lahko bile pomemben vir okužbe za ljudi (Gould in Limbago, 2010). Čeprav neposrednega dokaza o prenosu okužbe CD še ni (Keessen in sod., 2011), je iz raziskav razvidno, da si z živalmi delimo nekatere pogoste ribotipe bakterije, kar kaže na verjetne prenose med živalmi in ljudmi (McNamara in sod., 2011; Keessen in sod., 2011; Janežič in sod., 2012). Zelo malo študij opisuje, kdaj se CD najbolj izloča iz organizma, v kakšnem številu in kaj vpliva na izločanje bakterije v okolje. Nasprotno je dinamika izločanja CD pri živalih, ki so v intenzivni vzreji oziroma proizvodnji in hkrati v tesnem stiku z ljudmi in njihovo okolico, v veliki meri nepoznana. Do zdaj so bile longitudinalne študije opravljene le pri prašičih, konjih, teletih, perutnini in otrocih (Weese in sod., 2010b; Rodriguez-Palacios et al., 2011b; Houser et al., 2012; Rousseau in sod., 2012; Schoster in sod., 2012b; Zidarič et al., 2012; Hawken in sod., 2013). Dejavniki tveganja so opisani v veliki večini le pri ljudeh in konjih (Båverud in sod., 1997; Bignardi, 1998; Gustafsson in sod., 2004; Garey in sod., 2008a, b, c). Na področju epidemiologije bakterije CD še ni objavljenih raziskav, ki bi izpostavila problematiko krav molznic na srednje velikih oziroma družinskih kmetijah. Družinske kmetije so v Sloveniji kot tudi v ostali Evropi najpogostejša in najpomembnejša oblika kmetovanja, ki pomaga vzdrževati okolje in socialno-ekonomski status na podeželju (European Commission, 2013). Na tovrstnih kmetijah so redno prisotne različne vrste domačih in divjih živali, poleg tega pa kmetije vedno bolj vstopajo v neposredno tržno povezano s potrošniki (mlečni izdelki – mlekomati, mesni izdelki, zelenjavni izdelki gnojeni z domaćim gnojem).

Z našo nalogo smo želeli kronološko preveriti, ali imajo oziroma kakšno vlogo imajo različni dejavniki v intenzivni rejji (starost živali, prehrana, proizvodnja, bolezni, zdravljenje, letni čas in dostopnost gospodarstva za druge domače ali divje živali) na izločanje CD pri govedu. V študijo smo vključili tudi primerjavo sevov na srednje velikih kmetijah z že znanimi sevi, ki jih najdemo pri ljudeh.

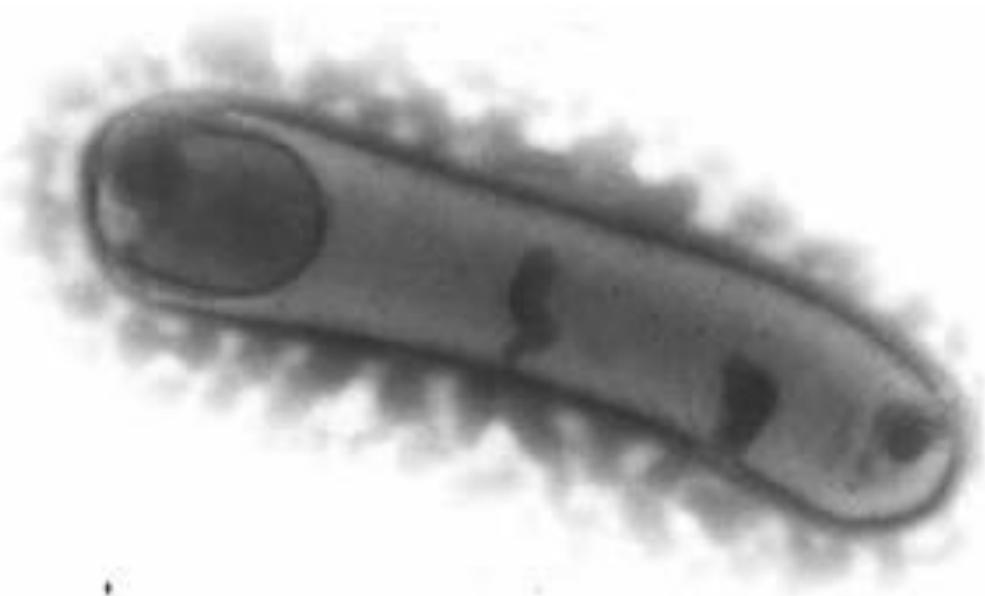
Tako je bil namen naše študije preveriti naslednje raziskovalne hipoteze:

1. Izločanje bakterije CD je odvisno od starosti živali.
2. Izločanje bakterije CD je odvisno od zdravstvenega stanja živali v hlevu.
3. Dinamika izločanja CD v obdobju enega leta je odvisna od naravnih/fizioloških dejavnikov in dejavnikov, ki nastanejo kot posledica intenzivne proizvodnje.
4. Toksigeni sevi CD, ki so primerljivi z znanimi človeškimi sevi, so prisotni na srednje velikih kmetijah krav molznic.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Splošne značilnosti bakterije *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* je po Gramu pozitivna, anaerobna, sporogena in gibljiva bakterija paličaste oblike. Endospore so ovalne in ležijo subterminalno (Hatheway, 1990). Bakterija je velika  $0,5\text{--}1,9 \times 3\text{--}16,9 \mu\text{m}$ . Genom bakterije, velikosti 4,4 Mb, ima nizek delež gvanina in citozina (Sebaihia in sod., 2006). Na krvnem agarju rastejo bakterije CD pri optimalni temperaturi 30–37 °C. Po anaerobni inkubaciji dva do tri dni dobijo značilen vonj po konjskih iztrebkih in značilno obliko. Kolonije so večinoma ploščate ali rahlo konveksne, z motno ali svetlečo površino. Oblika je lahko okrogla, čeprav so večinoma rizoidne. Barva kolonij je lahko siva, bela in tudi svetlo rumena (Baverud, 2002).



Slika 1: *Clostridium difficile* (vir naveden v kazalu)

Figure 1: *Clostridium difficile*

## 2.2. Zgodovinski pregled

Leta 1893 je Finney prvič opisal bolezen psevdomembranozni kolitis (PMC) pri ženski po operaciji (citirano po Lyerly in sod., 1988). Število primerov bolezni se je drastično zvišalo v obdobju, ko so se začeli intenzivneje uporabljati antibiotiki. Prva sta bakterijo odkrila in jo izolirala Hall in O'Toole leta 1935 (citirano po Lyerly in sod., 1988). Opisala sta jo kot del normalne črevesne mikrobiote novorojenčkov in jo zaradi težke izolacije poimenovala *Bacillus difficile*. V kasnejših letih so znanstveniki ugotavliali patogenezo delovanja CD na živalskih modelih. Hrčki so se izkazali za živali, ki so najbolj občutljive na delovanje CD in zato tudi najbolj primerne za raziskovanje toksičnega delovanja bakterije (citirano po Lyerly in sod., 1988). Že takrat so opazili, da novorojenčki in mladiči hrčka kljub prisotnim velikim količinam toksigenih CD (50-odstotna prevalenca), ostajajo asimptomatski (Bolton in sod., 1984; Kim in sod., 1987, citirano po Lyerly in sod., 1988). Razlog za to naj bi bilo pomanjkanje receptorjev za toksine. Največja dejavnika tveganja na razvoj bolezni sta takrat bila predhodna uporaba antibiotikov in bolnišnično okolje. Danes je okužba z bakterijo CD ena najpogostejših bolnišničnih okužb na svetu, ki povzroča driske po antibiotičnem zdravljenju (Jawa in Mercer, 2012).

## 2.3. Dejavniki virulence bakterije *Clostridium difficile*

Bakterija CD ima več dejavnikov virulence, med katerimi so glavni trije toksini: toksin A (TcdA), toksin B (TcdB) in binarni toksin (CDT, ang. *Clostridium difficile* toxin). Prva dva sta bolj raziskana in delujeta kot glukoziltransferazi na majhne GTP-azne proteine, medtem ko binarni toksin deluje kot ADP-riboziltransferaza in bistveno pripomore k učinkovitejši kolonizaciji črevesja gostitelja. Na splošno toksini v prebavilih povzročijo celično smrt, klinični znaki se kažejo kot driska in PMC. Huda oblika bolezni lahko povzroči smrt gostitelja (Voth in Ballard, 2005; Rupnik in sod., 2009).

Poleg toksinov imajo bakterije CD tudi druge dejavnike virulence, ki pripomorejo k bolj učinkoviti kolonizaciji in okužbi. Površinske beljakovine (Cwp66, SlpA), fimbrije, biček in hidrolitični encimi (hialuronidaza, želatinaza, nevraminidaza, kolagenaza, heparinaza) so dejavniki, ki virulenco povečujejo neposredno (Borriello, 1998; Vedantam in sod., 2012). Posredno pa patogeno delovanje poveča tvorba polisaharidne kapsule, ki oteži fagocitozo CD

s strani makrofagov (Borriello, 1998; Vedantam in sod., 2012). Eden pomembnejših dejavnikov je tudi neobčutljivost proti antibiotikom. Njihova uporaba vpliva na bakterije CD, ki nanj niso občutljive, tako da omogoči njihovo hitro razmnoževanje v črevesju. Poleg tega pride tudi do povečanega izražanja faktorjev, ki pripomorejo k bolj učinkoviti kolonizaciji (Denéve in sod., 2008).

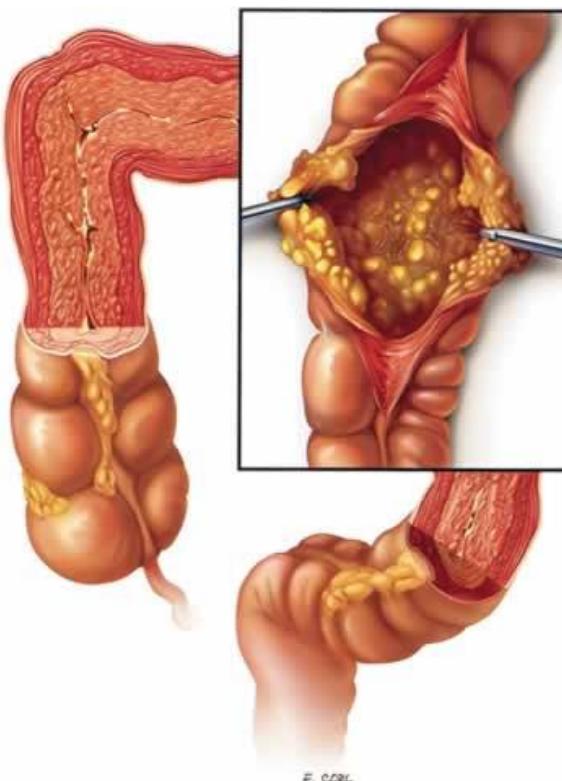
## 2.4. Patogeneza bolezni CDI in zdravljenje

Za nastanek bolezni so odgovorni predvsem dejavniki virulence bakterije CD, med katerimi imajo največji vpliv toksini (Borriello, 1998; Voth in Ballard, 2005; Vedantam in sod., 2012). Resnost kliničnih znakov in izid infekcije je odvisen predvsem od starosti gostitelja, različnih drugih sočasnih bolezni, uporabe antibiotikov ter od prirojenega in pridobljenega imunskega odgovora gostitelja (Kelly in Kyne, 2011).

Klinične oblike CDI pri ljudeh so različne. Bolezen lahko poteka asimptomatsko (brez kliničnih znakov) ali pa kot fulminantni kolitis. Med simptomatsko obliko okužbe pride do akutnega vnetnega odgovora črevesja, obsežne infiltracije črevesne sluznice z nevtrofilci in do poškodbe črevesne stene. Najbolj značilni klinični znaki CDI so trebušni krči, vročina, povišano število belih krvnih celic, povišanje serumskega kreatinina, hipoalbuminemija in psevdomembrane na sluznici črevesja (Borriello, 1998; Dallal in sod., 2002; Voth in Ballard, 2005; Jawa in Mercer, 2012). Pogosta posledica vnetja je tudi paralitični ileus, ki lahko privede do toksičnega megakolona. Značilna je profuzna vodena driska. Njene posledice so slabost, dehidracija, letargija in huda hipoalbuminemija zaradi izgube proteinov preko črevesne sluznice (Borriello, 1998; Sunenshine in McDonald, 2006; Jawa in Mercer, 2012).

Pri resnejši obliki okužbe pride do nastanka PMC. Psevdomembrane so rumenobele obloge eksudata premra do 10 mm (Vaishnavi, 2010). Med oblogami je sluznica črevesja normalna ali blago hiperemična. Spremembe so običajno omejene na debelo črevo, vendar je včasih prizadeto tudi tanko črevo. Tako stanje napreduje, dokler ne nastane membranozni eksudat, ki prekrije večji del sluznice debelega črevesa. Če pride do ulceracije v submukozo, je stanje za bolnika zelo nevarno. Histološko se kaže kot nekroza epitelija z akumulacijo fibrina, sluzi in odluščenih celic (Pothoulakis, 1996). Iz sistemski cirkulacije pride do infiltracije polimorfonuklearnih levkocitov in eozinofilcev v lamino proprio sluznice in v eksudat lezij

(Kelly in sod., 1994). V naslednji fazi pride do infiltracije teh celic v sluznico črevesja in kripte. Lezije prekrite s oblogami tako zavzamejo večjo površino sluznice. Možne so komplikacije, kot so globoka nekroza in ulceracija submukoze debelega črevesa. V primeru perforacije stene črevesja se razvije sepsa, kar poslabša bolnikovo prognozo (Borriello, 1998).



Slika 2: Shematski prikaz psevdomembranoznega kolitisa  
(vir naveden v kazalu)

Figure 2: Schematic view of pseudomembranosus colitis



Slika 3: Psevdomembranozni kolitis pri človeku  
(vir naveden v kazalu)

Figure 3: Pseudomembranosus colitis in human

Večina kliničnih znakov CDI je vezana na dogajanje v debelem črevesju, vendar se lahko pojavijo spremembe tudi drugje. CDI lahko povzroči klinične znake bolezni tankega črevesja, bakteriemijo, reaktivni artritis, cellulitis (vnetje podkožja), nekrotizirajoči fascilitis, osteomielitis, znotraj-trebušne abscese, lokalizirane okužbe kože, okužbe vsadkov itd. (Vaishnavi, 2010). Večina bolnikov s prisotnimi znaki izven črevesne CDI je imela v anamnezi nedavno hospitalizacijo in črevesno obliko CDI. Smrtnost je v teh primerih zelo visoka (Mattila in sod., 2013) in predvsem odvisna od imunskega odgovora organizma.

Imunski odgovor organizma ima zelo velik vpliv na razvoj in intenzivnost CDI. Imunsko oslabeli pacienti, ki imajo nezadovoljivo število makrofagov in IgA protiteles v prebavnem traktu ter slabši odziv IgM in IgG protiteles ob okužbi, so bolj dovzetni za hujšo obliko CDI (Kyne in sod., 2001; Johal in sod., 2004). Enako velja tudi za bolnike s slabim imunskim odgovorom na toksine CD (Kyne in sod., 2000).

#### 2.4.1. CDI pri živalih

Patogeneza in klinična slika se znotraj vrste in med vrstami lahko zelo razlikuje. Pri prašičih je CD pogost patogen, vendar zbolevajo večinoma samo sesni prašički, mlajši od 7 dni. Obolenje so dokazali eksperimentalno z inokulacijo spor CD sesnim prašičkom, ki so se jim kasneje razvili znaki, zančilni za CDI, kot sta driska (pastozna do vodena) ali obstipacija (Songer in Anderson, 2006; Steele in sod., 2010). Bolezen pri sesnih prašičkih lahko poteka tudi brez kliničnih znakov oziroma asimptomatsko. Obolevnost je do 100-odstotna, medtem ko je smrtnost lahko do 16-odstotna (Hopman in sod., 2011; Keessen in sod., 2011).



Slika 4: Patoanatomske spremembe prašiča s CDI (vir naveden v kazalu)

Figure 4: Patoanatomic changes in a pig with CDI

*Clostridium difficile* spada med najpomembnejše črevesne patogene bakterije konj. Za CDI so dovetna tako mlada žrebata kot odrasle živali (Diab in sod., 2013). Klinična slika je

nespecifična. Konji so lahko asimptomatski ali kažejo blago drisko do hudega hemoragičnega nekrotizirajočega enterokolitisa (Keessen in sod., 2011). Žrebeta, ki se okužijo takoj po rojstvu imajo vodeno/krvavo drisko in kažejo znake depresije, dehidracije in toksemije. Večinoma sledi smrt žrebeta. Odrasli konji najpogosteje kažejo znake kolike s povišano telesno temperaturo (Båverud, 2002; Diab in sod., 2013). Smrtnost pri žrebetih in odraslih konjih je med 0 in 42 %. Patoanatomske spremembe so pri žrebetih, mlajših od 1 meseca, večinoma omejene na tanko črevo, medtem ko se pri starejših žrebetih in odraslih konjih spremembe pojavljajo skoraj izključno v debelem in slepem črevesju (Diab in sod., 2013). Črevesje je v obeh primerih spremenjeno. Stena črevesja je lahko zadebeljena in prekrita na več mestih z oranžno psevdomembrano. Debelo črevo je največkrat bolj zadebeljeno oziroma edematozno z multifokalnimi lezijami, prekritimi s svetlo zelenimi psevdomembranami. Histološko je sprememba na sluznici videti kot hemoragična, koagulativna nekroza. Na področju črevesne sluznice in submukoze pa so pogosto vidne tromboze majhnih in srednje velikih žil ter skupki po Gramu pozitivnih bacilov (Diab in sod., 2013). Hujšo klinično sliko pri konjih s CDI so povezali s sevi, ki niso odporni na metronidazol, in s sevi, ki izločajo toksin A (Keessen in sod., 2011).



Slika 5: Driska pri odraselom konju, sum CDI (Oregon, ZDA) (Foto: P. Bandelj)

Figure 5: Diarrhea in adult horse, CDI suspected (Oregon, USA)

Pri odraslem govedu še ni dokazane klinične slike CDI. Teleta so večinoma asimptomatska, vendar lahko imajo tudi drisko. Vloga CD pri teletih z drisko še ni jasno določena (Hammitt in sod., 2008; Rodriguez-Palacios in sod., 2006 in 2007; Keessen in sod., 2011, Zidarič in sod., 2012), čeprav direktna inokulacija črevesja anestetiziranih telet s toksini bakterije CD povzroči akumulacijo tekočine, poškodbo tkiva in infiltracijo nevtrofilcev, kar nakazuje, da lahko podobne lezije nastanejo pri produkciji toksina *in vivo* (Hammitt in sod., 2008).

*Clostridium difficile* se kot možen etiološki dejavnik lahko izjemoma dokaže pri psih in mačkah z drisko, medtem ko perutnina ne kaže nobenih kliničnih znakov, značilnih za CDI (Keessen in sod., 2011). Izjemno so na CDI občutljivi mali glodavci. Pri njih se razvije huda oblika bolezni in so zato tudi najbolj primeren model za študije CD in njihovih toksinov (Knoop, 1979; Keessen in sod., 2011).

#### 2.4.2. Zdravljenje CDI pri ljudeh

Najpogosteje se CDI zdravi z antibiotiki. Zdravili izbora sta še vedno vankomicin in metronidazol. Vankomicin je primernejši, a se zaradi dražje terapije redkeje uporablja kot metronidazol (Jawa in Mercer, 2012; Surawicz in sod., 2013). Različne študije niso ugotovile razlik med terapijo z različnimi antibiotiki, kot so vankomicin, metronidazol, rifaksimin, nitazoksanid in fidaksomicin. Boljše uspehe so ugotovili le pri zdravljenju s teikoplaninom, a ga zaradi visoke cene in potencialnih stranskih učinkov le redko uporabljajo za zdravljenje CDI (Nelson in sod., 2011). Prednost fidaksomicina je v tem, da ima nižjo stopnjo ponavljanja CDI v primerjavi z vankomicinom (Louie in sod. 2011).

Nekateri znanstveniki menijo, da je uporaba širokospektralnih antibiotikov (metronidazol, vankomicin) za zdravljenje psevdomembranoznega kolitisa zastarela in jo je treba opustiti. Razvoj novih terapevtskih učinkov se je tako v zadnjih letih usmeril v razvoj antibiotikov z ozkim spektrom delovanja, v vzdrževanje črevesne mikrobiote in inhibicije delovanja toksinov CD (Voth in Ballard, 2005). Za zelo učinkovito se je izkazalo zdravljenje s fekalno transplantacijo iz zdravega organizma na bolnega preko nazogastrične sonde (Rohlke in Stollman, 2012), medtem ko terapija s probiotiki za zdaj nima dokazanega vpliva (Cohen in sod., 2010). Pri napredku v razvoju zdravil pa se znanstveniki osredotočajo na izdelavo tarčnih zdravil za preprečevanje vstopa in inhibicijo delovanja toksinov v celicah gostitelja (Davies in sod., 2011).

Pri zdravljenju CDI se kljub alternativnim možnostim in obetavnim raziskavam, zdravniki in veterinarji držijo splošnih smernic zdravljenja, ki temeljijo na čim krajši uporabi antibiotikov, čim hitrejši obnovitvi črevesne mikrobiote in spodbujanju boljšega imunskega odgovora (Jawa in Mercer, 2012).

## 2.5. Laboratorijska diagnostika

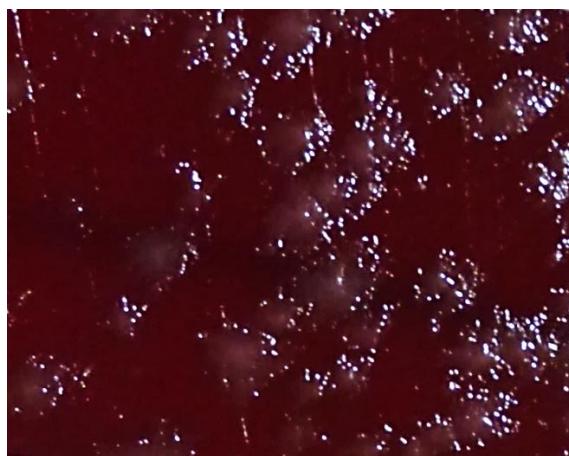
Dokazovanje bakterije CD iz različnih kužnin se je začelo leta 1935, ko sta Hall in O'Toole dokazala bakterijo paličaste oblike v normalni črevesni mikrobioti dojenčkov. Že takrat so opisali njeno izolacijo kot težavno, in zato bakteriji dali ime *Bacillus difficile*. Bakterijo so pozneje preimenovali v *Clostridium difficile*, vendar je izolacija ostala še naprej izziv za mnoge raziskovalce (citirano po Lyerly in sod., 1988). Dandanes se poleg osamitve bakterije na specifičnih gojiščih in dokazovanja toksinov na podlagi citotoksičnih in encimskoimunskih (EIA) testov, diagnostični in raziskovalni laboratoriji poslužujejo predvsem molekularnih metod. Z njimi bodisi dokazujemo prisotnost bakterije in/ali njenih toksinov bodisi ugotavljamо sorodstvene vezi bakterij na podlagi podobnosti genoma (genotipizacija). Pri epidemioloških študijah je predvsem pomembno, da so izbrani testi učinkoviti, natančni in hitri in da omogočijo obdelavo čim večjega števila tako posameznih kot skupinskih vzorcev. Za ta namen je zelo primerna uporaba kvantitativne metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR, angl. quantitative real time PCR). Ob tem so za ugotavljanje epidemioloških povezav potrebni testi, s katerimi se ugotavlja različni profili in lastnosti sevov CD, za kar se uporablja različne genotipizacijske metode. Genotipizacijske metode praviloma zahtevajo DNA, izolirano iz čistih kultur, za kar je potrebna predhodna izolacija na selektivnih gojiščih za CD.

### 2.5.1. Izolacija bakterije CD na gojiščih

Izolacija bakterije iz kužnin (največkrat iz blata) poteka preko selektivnih gojišč, ki imajo nalogo spodbujanja germinacijo spor CD in zatiranja rasti drugih bakterij. V ta namen se gojišča obogatijo z različnimi antibiotiki in dodatki, kot so konjska ali ovčja kri, jajčni rumenjak, natrijev tauroholat, lizocim ipd. (Marler in sod., 1992; Wilcox in sod., 2000). George je leta 1979 s svojimi sodelavci uporabljal fruktozni agar s cikloserinom in cefoksitinom, vendar so danes na voljo tudi druga komercialna gojišča. Poleg selektivnega

gojišča je pomemben tudi celoten postopek izolacije. Raziskovalci so ugotovili, da se občutljivost metode poveča z uporabo alkoholnega šoka pred dvodnevno anaerobno inkubacijo pri 37 °C (Borriello in Honour, 1981). Leta 2005 je primerjava različnih protokolov izpostavila uporabo fruktoznega bujona s cikloserinom in cefoksitinom, kateremu je dodan 0,1-odstoten natrijev tauroholat. Temu po protokolu sledi 30-minutni alkoholni šok, pri katerem sta količina vzorca in absolutnega alkohola v enakem razmerju. Po inkubaciji v alkoholu se vzorec nasadi na selektivno trdno gojišče za CD (Wilson in sod., 1982; Arroyo in sod., 2005b). Različne postopke izolacije so primerjali tudi leta 2013, ko so raziskovalci ugotovili bistveno boljšo občutljivost metode z uporabo toplotnega šoka (10 min, 80 °C) kot pri sedemdnevni inkubaciji v obogatitvenem tekočem gojišču in dvodnevni inkubaciji na TSA II (ang. tryptic soy agar) agarju (Hink in sod., 2013). Istega leta so objavili študijo primerjave občutljivosti izolacije z dolžino inkubacije v obogatitvenem bujonu z alkoholnim šokom ali brez njega. Najboljšo občutljivost so ugotovili po 7. dnevu inkubacije in alkoholnem šoku (Avberšek in sod., 2013).

Za prepoznavanje kolonij CD na selektivnem gojišču so potrebne izkušnje strokovnih delavcev, saj je veliko testov nezanesljivih (prolinska-aminopeptidaza z diskami, biokemija, antigenska lateksna aglutinacija) in identifikacija temelji večinoma na značilni morfologiji kolonij in vonju po konjskem gnuju (Levett, 1984; Fedorko in Williams, 1997; Tenover in sod., 2011). V nekaterih laboratorijih se poslužujejo komercialnih biokemijskih metod in diagnostičnega sistema na osnovi masne spektrometrije, MALDI TOF (ang. matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) (Burnham in Carroll, 2013).



Slika 6: CD na gojišču (Foto: P. Bandelj)

Figure 6: CD culture

### 2.5.2. Dokazovanje in kvantifikacija nukleinske kisline

Za dokazovanje in detekcijo bakterijske DNA se uporablajo molekularne metode. Kljub temu, da v celoti ne morejo nadomestiti specifične gojitvene preiskave, so zaradi hitrosti, specifičnosti in veliko boljše občutljivosti izredno uporabne za diagnostične in raziskovalne namene. Klasična verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) je kvalitativna metoda, pri kateri se v zelo kratkem času pomnožujejo fragmenti DNA iz kompleksnih genetskih vzorcev (Saiki in sod., 1985; Bustin in sod., 2012). To je bila revolucionarna metoda, ki je odprla nova poglavja v mikrobiologiji, biomedicini in forenzični diagnostiki. Slabost te metode je predvsem v nezmožnosti kvantifikacije količine začetne DNA v vzorcu. Na to so znanstveniki odgovorili proti koncu 20. stoletja z razvojem kvantitativne PCR metode v realnem času (qPCR). Metoda qPCR temelji na detekciji fluorescentnih reporterskih molekul, ki se sproščajo ob pomnoževanju tarčne DNA. Omogoča nam spremjanje PCR pomnoževanja v realnem času, zato je metoda izbire za detekcijo in kvantifikacijo nukleinske kisline (Bustin in sod., 2012). Prednosti te metode so tudi veliko večja občutljivost, specifičnost, robustnost, hitrost, enostavnost, možnost avtomatizacije in obdelave velikega števila vzorcev. Ob tem, za razliko od klasične metode PCR, po končanem pomnoževanju produktov ni treba dodatno dokazovati. Z razvojem novih reagentov in vedno manjših reakcijskih volumnov je tudi cenovno vedno bolj ugodna (Bustin in sod., 2012). Vendar zahteva metoda qPCR pri vsakem koraku razvoja veliko mero natančnosti in doslednosti, drugače nas lahko dobljeni podatki zavedejo v nepravilno interpretacijo rezultatov in k objavi protokolov, ki so neponovljivi in nezanesljivi. Zato je leta 2009 Bustin s sodelavci objavil članek, v katerem je določil minimalne informacije za objavo qPCR protokolov (MIQE, ang. minimal information for publication of quantitative real-time PCR experiments), in tako pripomogel k standardizaciji metode qPCR. Članki, objavljeni po teh navodilih, tako odgovorijo na vprašanja ponovljivosti in zanesljivosti qPCR protokolov in zagotovijo veliko večjo verodostojnost dobljenih rezultatov in njihovih interpretacij (Bustin in sod., 2009).

V literaturi je veliko protokolov qPCR, ki so usmerjeni predvsem na detekcijo genov za toksine bakterije CD (Sloan in sod., 2008; Wroblewski in sod., 2009; de Boer in sod., 2010; Avberšek in sod., 2011; Barbut in sod., 2011; Luna in sod., 2011, Hoegh in sod., 2012;

Jayarantne in sod., 2013). Manj je protokolov, ki bi ugotavliali tudi prisotnost netoksigenih sevov bakterije CD. S pomočjo qPCR za detekcijo gena 16S rDNA CD lahko tako kvantificiramo netoksigene in toksigene bakterije CD v vzorcu. To nam pomaga pri oceni dejavnikov tveganja za razvoj CDI in v epidemioloških študijah (Balamurugan in sod., 2008; Mutters in sod., 2009; Matsuda in sod., 2012). Prvi objavljen protokol za kvantifikacijo CD na podlagi gena 16S rRNA je nastal leta 2004 (Rintilla in sod., 2004). Sledil je Penders in leta 2005 s sodelavci razvil protokol za kvantifikacijo bakterij CD, *Escherichia coli* in *Bifidobacterium spp.* v prebavnem traktu novorojenčkov. Meji detekcije sta bili med  $6 \times 10^3$  in  $6 \times 10^4$  celic na gram vzorca (Rintilla in sod., 2004) ter 2000 CFU (ang. colony forming units) na gram vzorca blata (Penders in sod., 2005). Leta 2008 je Balamurugan s sodelavci kvantificiral CD pri pacientih z ulcerativnim kolitisom, medtem ko je Naaber leta 2011 s sodelavci določil število CD pri pacientih z drisko po antibiotičnem zdravljenju. Noben od naštetih objavljenih qPCR protokolov za dokazovanje 16S rDNA nima podanih informacij, ki bi zadovoljili MIQE navodilom.

Ključni del uspeha molekularnih metod je v sami ekstrakciji DNA iz kompleksnih matrikov, kot je na primer blato. V zadnjih letih se izboljšuje detekcija CD v kliničnih vzorcih predvsem zaradi izboljšanih postopkov izolacije DNA, ki uporabljajo poleg kemične in encimske obdelave vzorcev tudi mehanično. Z mehaničnim razbitjem, največkrat ga dosežejo z uporabo majhnih kroglic v mehanskih razbijalcih (kroglični razbijalci), se razbije debele celične stene in spore ter tako še poveča izplen skupne DNA v vzorcih (Logar in sod., 2012).

### 2.5.3. Genotipizacija bakterije *Clostridium difficile*

Metode za tipizacijo lahko uvrstimo v dve kategoriji, fenotipske in genotipske metode. Fenotipske metode tipizirajo bakterije CD na podlagi produktov izraženih genov, medtem ko genotipske metode analizirajo njihov genetski profil. V 80. letih prejšnjega stoletja so se kot prve razvile fenotipske metode, med katere spadajo serotipizacija z aglutinacijo na predmetnem steklu, poliakrilamidna gelska elektroforeza (radio PAGE; ang. autoradiography polyacrylamide gel electrophoresis) in z imunskim prenosom (imunoblot) z uporabo kunčjega antiseruma štirih različnih sevov CD (Delmee in sod., 1985; Toma in sod., 1988; Mulligan in sod., 1988). Zaradi slabe ponovljivosti, nezadostne tipizacijske in diskriminatorne vrednosti pa so fenotipske metode za potrebe epidemioloških študij zamenjale

genotipizacijske metode. To se je zgodilo v zadnjem desetletju prejšnjega stoletja (Cohen in sod., 2001).

Genotipizacijske metode delimo na tri skupine na podlagi principov delovanja, in sicer:

1. na restrikciji genoma z restriktijskimi encimi in kasnejši analizi na agaroznem gelu,
2. na pomnoževanju specifičnih odsekov genoma s klasično metodo PCR in
3. na določitvi in analizi nukleotidnega zaporedja izbranih odsekov DNA (Janežič in Rupnik, 2010).

Najpogosteje uporabljene metode so: polimorfizem restriktijskih fragmentov celotne DNA (REA; ang. restriction endonuclease analysis), elektroforeza v pulzirajočem gelu (PFGE, ang. pulsed-field gel electrophoresis), kapilarna ali klasična PCR-ribotipizacija, multilokusno spremenljivo število tandemskih ponovitev (MLVA, ang. multilocus variable number tandem repeat analysis) in tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (MLST; ang. multilocus sequence typing). Zadnje čase prihaja v ospredje metoda sekveniranja celotnega genoma (WGS; ang. whole genome sequencing), pri kateri lahko variabilnost med sevi primerjamo tudi na podlagi analize polimorfizmov enega nukleotida (SNPs; ang. single nucleotide polymorphisms) (Knetsch in sod., 2013).

#### 2.5.3.1. Toksinotipizacija

Toksinotipizacija je metoda, s katero zaznamo polimorfizme na področju genov za toksin A in B, ki ga poznamo kot regijo PaLoc. Od šestih regij (A1-A3 in B1-B3) sta najbolj variabilni regiji B1 in A3, ki omogočata razlikovanje med večino znanih toksinotipov na podlagi razlik v dolžini produktov PCR po cepitvi z restriktijskimi encimi. Z metodo PCR pomnožimo želene fragmente genoma, ki jih nato razrežemo s pomočjo restriktijskih encimov *HincII/AccI* in *EcoRI*. Na podlagi variabilnost regij B1 in A3 na PaLoc razdelimo seve v različne toksinotipe (Rupnik in sod., 1998; Rupnik in sod., 2001, Kuijper in sod., 2009). Toksinotip 0 imajo vsi sevi, ki imajo enako PaLoc regijo kot referenčni sev VPI 10463. Seve, ki se razlikujejo od referenčnega seva, pa se uvršča v 31 različnih toksinotipov. Toksinotipe se označuje z rimskimi številkami (I-XXXI) (Rupnik, 2011). Toksinotipizacija ima dobro korelacijo s serotipizacijo in ribotipizacijo, s tem da lahko toksinotipizacija loči več podskupin znotraj seroskupin in se zelo dobro dopolnjuje s PCR-ribotipizacijo. (Rupnik in sod., 1998; Rupnik, 2001). Metoda ima slabo moč ločljivosti med sevi, vendar je njena

prednost v 100-odstotni ponovljivosti in podatku o prisotnosti genov za toksine (Kuijper in sod., 2009).

#### 2.5.3.2. PCR-ribotipizacija

PCR-ribotipizacija je trenutno najbolj razširjena metoda tipizacije (Knetsch in sod., 2013). Prvi je to metodo uporabil Görtler leta 1993, ko je za razlikovanje med različnimi sevi izkoristil variabilnost medgenskega prostora (ISR; ang. intergenic spacer region) med 16S in 23S ribosomalno DNA (rDNA) (Görtler, 1993). Variabilnost v kombinaciji z več kopijami rDNA v genomu daje po PCR pomnoževanju fragmente različne velikosti (250–600 bp), ki jih ločimo z navadno ali kapilarno gelsko elektroforezo. Na podlagi dobljenega vzorca se različni izolati med seboj razdelijo v skupine, PCR-ribotipe, ki so večinoma označeni s trimestno arabsko številko, kadar se uporablja standardna nomenklatura Cardiff (Stubbs in sod., 1999). Za PCR-ribotipizacijo lahko uporabimo dva para začetnih oligonukleotidov, opisala sta jih Bidet s sodelavci in Stubbs s sodelavci, vendar imata slednja začetna oligonukleotida boljšo diskriminatorno vrednost (Bidet in sod., 1999; Stubbs in sod., 1999; Knetsch in sod., 2013). Opisana je tudi različica začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo direktno ribotipizacijo iz celokupne DNA, izolirane iz vzorca blata (Janežič in sod., 2011). PCR-ribotipizacija loči že več kot 400 različnih PCR-ribotipov, njeni rezultati pa so ob uporabi enakih referenčnih sevov med laboratoriji primerljivi. Metoda je robustna, ponovljiva in ima relativno dobro moč razlikovanja (Knetsch in sod., 2013).

#### 2.5.3.3. Analiza multilokusnega števila tandemskih ponovitev (MLVA)

MLVA ali analiza multilokusnega spremenljivega števila tandemskih ponovitev je metoda, ki ima od genotipizacijskih metod največjo moč razlikovanja med sevi. Zato je metoda zelo uporabna pri epidemioloških študijah izbruhovalnih bolezni in pri ugotavljanju možnih poti prenosa med pacienti in okoljem. MLVA temelji na pomnoževanju kratkih tandemskih ponovitev, ki se razlikujejo po velikosti in so razpršeni po genomu. Dobljene pomnožene fragmente ločimo med seboj na podlagi avtomatiziranega sekveniranja ali kapilarne elektroforeze, ki ji sledi manualna ali avtomatizirana analiza fragmentov (Knetsch in sod., 2013). Število preiskovanih lokusov v različnih študijah variira (6–15), vendar se jih za dobro diskriminacijo med sevi uporablja najmanj 6 oziroma 7 (van der Berg in sod., 2007; Tanner in sod., 2010; Manzoor in sod., 2011). Razlike med številom tandemskih ponovitev se seštejejo

(STRD; ang. summed tandem repeat difference) in na podlagi tega se izriše drevo sorodnosti (MST; ang. minimum spanning tree) različnih sevov CD. Bakterije so kloni, kadar se razlikujejo za manj kot 2 STRD, medtem ko so genetsko v sorodu bakterije s STRD manj kot 10 (Marsh in sod., 2006; Goorhuis in sod. 2008). Metoda se je največkrat uporabljala pri raziskavah izbruhoval CDI PCR-ribotipa 027 v Angliji, Franciji in na Nizozemskem (Eckert in sod., 2011; Goorhuis in sod., 2011; Fawley in Wilcox, 2011). Leta 2006 je Marsh s sodelavci prvi objavil validacijo MLVA za CD na sedmih lokusih. Rezultate so primerjali z rezultati analize restrikcijske endonukleaze (REA; ang. restriction endonuclease analysis), ki je do takrat veljala za standardno metodo genotipizacije CD (Kuijper in sod., 1987; Marsh in sod., 2006). Metoda se je izkazala za zelo uporabno pri epidemioloških študijah bolnišničnih izbruhoval bolezni, povzročenih s PCR-ribotipi 001, 002, 017, 027, 078 in 106 (Marsh in sod., 2006, Manzoor in sod., 2011). Naslednje leto je van der Berg s sodelavci za MLVA uporabila 4 lokuse po Marshu (Marsh in sod., 2006) in 3 nove začetne oligonukleotide za lokuse CdC6, CdF3 in CdH9. Metodo je optimizirala na PCR-ribotipih 001, 017 in 027 (van der Berg in sod., 2007). Leta 2008 so s pomočjo MLVA ugotovili, da je PCR-ribotip 078, odgovoren za izbruhe CDI pri ljudeh, genetsko identičen PCR-ribotipu 078, izoliranemu iz vzorcev prašičev. Uporabili so metodo po van der Bergu (van der Berg in sod., 2007) z modifikacijo negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida za lokus CdG8 (Goorhuis in sod., 2008). Bakker s sodelavci je leta 2010 objavil modificirano metodo MLVA za PCR-ribotip 078 na 7 lokusih po van der Bergovi in sod. (2007). Spremenili so le temperature prileganja in koncentracijo magnezijevega klorida za lokuse CdB7, CdC6 in CdG8. Ugotovili so tudi, da PCR-ribotip 078 nima lokusa CdA6 in da ima kljub temu MLVA (na podlagi 6 lokusov) enako moč razlikovanja (Bakker in sod., 2010). Istega leta je Tanner s sodelavci objavil protokol, optimiziran za PCR-ribotip 027. Za osnovo so uporabili 6 že prej objavljenih lokusov (CdA6, CdB7, CdC6, CdE7, CdG8, CDR60) (Marsh in sod., 2006; van der Berg in sod., 2007). Da bi povečali izkupiček pomnožene DNA in zmanjšali velikost fragmentov, so raziskovalci spremenili negativno usmerjen začetni oligonukleotid za CdG8 in začetna oligonukleotida za CDR60. Namesto kapilarnega sekvenatorja ali kapilarne elektroforeze so za detekcijo uporabili elektroforezo na agaroznem gelu (Tanner in sod., 2010). Leta 2011 so v Angliji dodali 7 obstoječim lokusom še 8 novih, z namenom da bi lahko MLVA uporabili tudi za ločevanje med PCR-ribotipi. Nov protokol so poimenovali razširjen MLVA (eMLVA; ang. extended MLVA). Tako oblikovan protokol lahko bolje kot prej objavljeni protokoli loči med

najpogostejšimi PCR-ribotipi (izoliranimi pri ljudeh) in znotraj njih (001, 002, 012, 014, 015, 017, 020, 027, 078 in 106) (Manzoor in sod., 2011).

Za optimalno uporabo metode MLVA je potrebnih več protokolov, saj niso vsi lokusi prisotni ali variabilni pri vseh PCR-ribotipih. To pomeni, da je metodo treba optimizirati in validirati za vsak PCR-ribotip posebej (Knetsch in sod., 2013).

#### 2.5.4. Občutljivost na antibiotike

Bakterija CD je že od svojega odkritja dalje pomembna zaradi svoje naravne odpornosti proti večini antibiotikov. Zato imajo antibiotiki posebno mesto pri razvoju CDI predvsem pri ljudeh in veljajo za pomemben dejavnik tveganja. V zadnjem času pa so nekateri sevi CD razvili odpornost proti protimikrobnim zdravilom (metronidazol, vankomicin), ki se sicer uporablajo za zdravljenje CDI, kar povečuje problem (Brazier in sod., 2001; Peláez in sod., 2002; Baines in sod., 2008). Ob tem lahko pomembno vlogo igrajo netoksigeni sevi CD, ki so odporni proti določenim antibiotikom. Ti lahko prenesejo odpornost proti antibiotikom na tiste toksigene seve, ki so bili predhodno občutljivi za antibiotike. Razvoj takih sevov omogoča nemoteno kolonizacijo CD ob uporabi antibiotikov in razvoj hude oblike CDI, ki je zelo težko ozdravljiva. Zato je pomembno spremljati odpornost bakterije CD proti različnim skupinam antibiotikov, ki se uporablajo za zdravljenje ljudi in živali (Erikstrup in sod., 2012, Pirs in sod., 2013).

Raziskovalci že vrsto let spremljajo vedno večjo prevalenco manj občutljivih sevov CD, vendar pri tem manjka enostavna metoda za rutinsko ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom v kliničnih mikrobioloških laboratorijih, ki bi omogočila boljšo primerjavo med študijami (Erikstrup in sod., 2012). Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (CLSI, ang. Clinical and Laboratory Standards Institute) trenutno predlaga uporabo agar dilucijske metode (referenčna metoda CLSI) ali eno od gradientnih metod. Agar dilucijska metoda je ponovljiva metoda, primerna za nadzor in ovrednotenje novih antibiotikov, vendar je tehnično preveč zahtevna za rutinski laboratorij (Erikstrup in sod., 2012). Do danes so se najbolj uveljavile gradientne metode, kot so E-testi, ki določijo natančnejšo koncentracijo antibiotika, pri kateri je rast CD še zavirana. Metoda je uporabna za posamezne vzorce in za ugotavljanje rezistence proti posameznim antibiotikom, vendar je velika slabost metode njena cena (Citron in sod., 1991; Rosenblatt in Gustafson, 1995; Erikstrup in sod., 2012). Nekateri so predlagali uporabo

disk difuzijske metode, saj je enostavna za izvedbo in cenejša v primerjavi z večino metod. Študije so dokazale, da je metoda primerljiva za nekatere antibiotike (vankomicin, metronidazol, manj za moksifloksacin) in nekatere odporne seve CD (Wong in sod., 1999; Levett, 1988, Erikstrup in sod., 2012). Največja pomanjkljivost je v dobljenih rezultatih. Z disk difuzijsko metodo določimo cono inhibicije v mm. Ta nam pove, ali je sev CD občutljiv, srednje občutljiv ali odporen (ang. S-sensitive, I-intermediate, R-resistant) proti določenemu antibiotiku. Ostale metode imajo to prednost, da nam rezultate podajo v koncentracijah antibiotikov, kar je veliko bolj uporabno za primerjavo različnih sevov med sabo. Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, ang. minimal inhibitory concentration) antibiotikov na mikrotitrski plošči (ang. broth microdilution plate) je ena od metod, ki bi lahko rešila problem testiranja odpornosti bakterije CD proti antibiotikom. Sicer je metoda po CLSI priporočena le za ugotavljanje odpornosti bakterij iz skupine *Bacillus fragilis*, vendar se je izkazala za uporabno tudi za monitoring bakterije CD humanega, živalskega in okoljskega izvora (Båverud in sod., 2004; Pirš in sod., 2013). Prednost metode je enostavna izvedba, enostavno odčitavanje rezultatov in cena. Slabost te metode je pomanjkanje komercialno dostopnih plošč MIC za CD s specifičnim izborom antibiotikov in njihovih koncentracij (Pirš in sod., 2013).

Rezultati raziskav in vrednosti MIC za različne skupine antibiotikov, objavljene na internetni strani Evropske komisije za testiranje občutljivosti na antibiotike (EUCAST, ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), so:

#### 2.5.4.1. Penicilini

Antibiotiki iz skupine betalaktamov zavrejo prečno povezovanje peptidoglikanov v bakterijski celični steni, kar poveča njeno prepustnost in povzroči propad (bakteriocidno delovanje) predvsem po Gramu pozitivnih bakterij. Sevi CD so za antibiotike iz skupine  $\beta$ -laktamov praviloma zelo občutljivi (Norman in sod., 2009; Zidarič in sod., 2012; Kalchayanand in sod., 2013, Keessen in sod., 2013). Izjema so prasiči iz študije iz ZDA, pri katerih je bilo 53 % sevov CD zmerno občutljivih in 36 % odpornih proti ampicilinu (Norman in sod., 2009) ter brojlerji iz Zimbabveja, kjer je bilo občutljivih na ampicilin le 74,5 % izolatov (Simango in Mwakurudza, 2008). V študiji iz leta 2013 so v Sloveniji ugotovili okoli 20-odstotno odpornost proti ampicilinu in okrog 40-odstotno proti penicilinu. Proti oksacilinu so bili živalski sevi CD (17,7%) so bili v primerjavi s humanimi sevi (4,3 %) občutno bolj odporni.

(Pirš in sod., 2013). Živalski sevi CD kažejo tudi veliko stopnjo odpornosti (28–50-odstotno) proti imipenemu, antibiotiku, namenjenemu za zdravljenje ljudi (Keessen in sod., 2013; Pirš in sod., 2013). Mejne vrednosti EUCAST za penicilinske antibiotike in antibiotike v kombinaciji s penicilini še niso določene, vendar so okvirne vrednosti MIC amoksicilina in amoksicilina s klavulansko kislino med 0,125 µg/ml in 4 µg/ml. Distribucija MIC za benzil-penicilin je med 0,25 µg/ml in 8 µg/ml, medtem ko je za piperacilin v kombinaciji s tazobaktanom MIC za večino CD sevov med 0,5 µg/ml in 32 µg/ml (EUCAST, 2013). Za ostale penicilinske antibiotike CD vrednosti EUCAST še niso bile objavljene.

#### 2.5.4.2. Antibiotiki MLS (makrolidi-linkozamidi-streptogramin B)

Veliko objav vključuje ugotavljanje občutljivosti makrolidnega antibiotika eritromicina. Eritromicin deluje bakteriostatično tako, da zavre sintezo bakterijskih proteinov. Mejna vrednost MIC, ovrednotena po EUCAST-u, je 2 µg/ml (EUCAST, 2013). Sevi CD, izolirani iz goveda, prašičev in konjev, so dokaj neobčutljivi proti temu antibiotiku (R: 59–100 %) (Båverud in sod., 1998; Zidarič in sod., 2012; Keessen in sod., 2013), največkrat zaradi gena *erm(B)*, ki kodira rRNA metilazo (Spigaglia in sod., 2011).

Antibiotik klindamicin spada v skupino linkozamidov, ki delujejo bakteriostatično tako, da inhibirajo sintezo bakterijskih proteinov. Klindamicin je prvi antibiotik, katerega uporaba je privedla do nastanka CD psevdomembranoznega kolitisa. Najpogosteji mehanizem odpornosti je enak kot pri eritromicinu (gen *erm(B)*) in zato je visoka stopnja odpornosti med humanimi in živalskimi sevi pričakovana (Spigaglia in sod., 2011). Po EUCAST-u poznamo nizko (nad 16 µg/ml) in visoko (nad 256 µg/ml) stopnjo odpornosti, večina sevov pa se giba med koncentracijo od 0,5 µg/ml in 16 µg/ml (EUCAST, 2013). Sicer so v primerjavi s človeškimi sevi zaznali velik odstotek občutljivih sevov CD, izoliranih iz živali (McNamara in sod., 2011; Janežič in sod., 2012; Keessen in sod., 2013), vendar je veliko raziskav, v katerih so bili tudi živalski (prašiči, govedo) sevi odporni proti klindamicinu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Rodriguez-Palacios in sod., 2007; Norman in sod., 2009; Rodriguez-Palacios in sod., 2011). Srednje občutljivih sevov CD v študiji iz Slovenije je bilo okoli 40 %, a se je uporaba komercialnih plošč MIC zaradi neprekriwanja mejnih vrednosti za CD po EUCAST-u (mejna vrednost po EUCAST-u: 16 µg/ml; najvišja koncentracija na komercialni plošči MIC: 8 µg/ml) izkazala za pomanjkljivo (Pirš in sod., 2013).

#### 2.5.4.3. Kinoloni

Kinoloni, predvsem fluorokinoloni, so velika skupina antibiotikov, ki se uporabljamajo tako v humani kot v veterinarski medicini. Antibiotiki delujejo bakteriocidno s tem, da zavirajo delovanje bakterijske DNA giraze, ki posledično prepreči pomnoževanje in transkripcijo bakterijske DNA. Zaradi večje uporabe antibiotikov iz te skupine so sevi CD razvili večjo stopnjo odpornosti kot sicer (Spigaglia in sod., 2008; Pirš in sod., 2013). Sevi CD so proti ciprofloksacinu in norfloksacinu skoraj popolnoma neobčutljivi (Simango in Mwakurudza, 2008; Norman in sod., 2009; Keessen in sod., 2013; Pirš in sod., 2013). Proti levofloksacinu je odpornost sevov CD med 0 in 75 % (Jhung in sod., 2008; Rodriguez-Palacios in sod., 2006), medtem ko je proti moksifloksacinu odpornost med 0 in največ 16 % (Jhung in sod., 2008; Rodriguez-Palacios in sod., 2011a; Keessen in sod., 2013, Pirš in sod., 2013). Mejna vrednost EUCAST je znana samo za moksifloksacin, ki je 4 µg/ml. Porazdelitev sevov za ciprofloksacin pa je med koncentracijami 8 µg/ml in 256 µg/ml (EUCAST, 2013).

#### 2.5.4.4. Cefalosporini

Na bakterijo CD cefalosporini ne vplivajo inhibitorno. Cefalosporini zavirajo sintezo peptidoglikanske mreže v celični steni bakterije, kar jim omogoča baktericidno delovanje. Kasnejše generacije cefalosporinov so bolj usmerjene na po Gramu negativne kot na po Gramu pozitivne organizme, zato je večina sevov CD visoko odpornih (Hammitt in sod., 2008; Simango in Mwakurudza in sod., 2008; Norman in sod., 2009; Keessen in sod., 2013). Vrednosti EUCAST za to skupino antibiotikov proti CD niso podane.

#### 2.5.4.5. Tetraciklini

Tetraciklini (tetraciklin, oksitetraciklin, doksiciklin) so najpogosteje uporabljeni antibiotiki v veterinarski medicini. Z vezavo na 30S ribosomalno podenoto inhibirajo sintezo proteinov (bakteriostatično delovanje). Mejna vrednost EUCAST je za seve CD postavljena na 0,25 µg/ml (EUCAST, 2013). Poznamo pa tudi nizko (2 µg/ml) in visoko (256 µg/ml) stopnjo odpornosti sevov CD. Costa in sodelavci (2011) ter Zidarič in sodelavci (2012) so pri teletih v Kanadi in Belgiji ugotovili od 65,8 do 93 % proti tetraciklinu odpornih sevov CD. Visoko stopnjo občutljivosti za tetraciklin pa so ugotovili pri prašičih iz ZDA (90-odstotna) in Nizozemske (100-odstotna) ter pri brojlerjih iz Zimbabveja (100-odstotna) (Simango in Mwakurudza, 2008; Norman in sod., 2009; Keessen in sod., 2013). Enako stopnjo

občutljivosti so raziskovalci ugotovili tudi za doksiciklin pri teletih (92-odstotna) in brojlerjih (100-odstotna) (Simango in Mwakurudza, 2008; Zidarič in sod., 2012).

#### 2.5.4.6. Ostali antibiotiki

Živalski sevi CD so velikokrat odporni še proti trimetoprim/sulfametoksazolu (26-odstotna odpornost) in gentamicinu (92–100 %) (Sinamgo in Mwakurudza, 2008; Keessen in sod., 2013; Pirš in sod., 2013), medtem ko so še zelo občutljivi za antibiotike, kot so kloramfenikol (98–100 %), linezolid (100 %), metronidazol (100 %), vankomicin (100 %) in tigeciklin (98–100 %) (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; 2011a; Norman in sod., 2009; Pirš in sod., 2013). Mejna vrednost EUCAST za metronidazol in vankomicin je 2 µg/ml, za tigeciklin pa 0,25 µg/ml (EUCAST, 2013). Mejna vrednost EUCAST za rifampicin je 0,004 µg/ml. Nizka odpornost je nad 0,5 µg/ml in visoka nad 32 µg/ml (EUCAST, 2013). Slednjo so pri živalih dokazali le pri konjih (Båverud in sod., 1998).

### 2.6. Epidemiologija in dejavniki tveganja za okužbo s CD

#### 2.6.1. Epidemiologija CD pri ljudeh

Prevalenca CD je po podatkih študij pri zdravih odraslih ljudeh precej različna – v vzorcih blata so potrdili prisotnost CD v 3 % do 50 % preiskovane populacije (Iizuka in sod., 2004; Kuijper in sod., 2006), medtem ko je bila pri zdravih novorojenčkih prevalenca kar do 80 % (Kuijper in sod., 2006). V okviru epidemioloških študij se poleg ugotavljanja pogostosti CD v vzorcih blata v preiskovani populaciji s pomočjo ribotipizacije razloči različne seve CD s poudarkom na identifikaciji toksigenih ribotipov, saj so le-ti povezani z težjo obliko CDI in obsežnejšimi izbruhi. Globalno ribotip 027 povzroča največ težko potekajočih okužb in izbruuhov, ki jih je težko obvladati, čeprav je prisotnost ribotipov 001, 014, 020 in 078 pogosteje (Hensgens in sod., 2009; Bauer in sod., 2011). Za razliko od ribotipa 027, ki je pogosto povzročitelj izbruha CDI v bolnišničnem okolju (McDonald in sod., 2005, Keessen in sod., 2011), je ribotip 078 največkrat prepoznan pri izvenbolnišnični obliki CDI (Goorhuis in sod., 2008). Izbruhi CDI, povzročeni z ribotipom 078, so v Evropi v porastu (Bauer in sod., 2011). Ribotip 078 je daleč najpogostejši ribotip farmskih živali (Keel in sod., 2007; Avberšek in sod., 2009; Debast in sod., 2009, Janežič in sod., 2014), kar nakazuje, da so lahko živali vir kontaminacije okolja in posledično okužbe ljudi (Keessen in sod., 2011).

Prenos okužbe z živali na ljudi bi lahko potekal preko neposrednega stika, preko okolja ali z uživanjem živil živalskega izvora, vendar neposrednega dokaza o prenosu še ni (McNamara in sod., 2011; Keessen in sod., 2011). Značilnost izvenbolnišnične CDI je, da zbolevajo mladi, na splošno zdravi ljudje, nosečnice in ljudje brez predhodnega bolnišničnega zdravljenja ali izvenbolnišničnega zdravljenja z antibiotiki (Pépin in sod., 2004; Kim in sod., 2008; Roush in sod., 2008; Freeman in sod., 2010).

### 2.6.2. Epidemiologija CD pri živalih

Vloga bakterije CD pri govedu še ni znana. Kolonizacija pri odraslem govedu poteka brez kliničnih znakov, kar je velikokrat značilno tudi za teleta. Goveji pitanci se navadno okužijo v neonatalnem obdobju in so lahko pozitivni na CD proti koncu obdobja pitanja brez kliničnih znakov. Naravno kolonizacijo bakterije so pri teličkih dokazali že v prvem dnevu po telitvi (Rodriguez-Palacios in sod., 2007), z največjo stopnjo prevalence okoli 16. dne starosti (Doosti in Mokhtari-Farsani, 2014). V povprečju je prevalenca CD pri teletih z drisko ali brez nje med 6 % in 25,3 % (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Hammitt in sod., 2008; Pirš in sod., 2008; Houser in sod., 2012; Koene in sod., 2012; Rodriguez in sod., 2012; Romano in sod., 2012; Zidarič in sod., 2012);, v nekaterih primerih celo do 56 % (Knight in sod., 2013). Z biološkim poskusom na teletih, ki so jim peroralno aplicirali visoke doze spor CD, raziskovalci niso uspeli sprožiti nastanka kliničnih znakov CDI (Rodriguez-Palacios in sod., 2007). Tudi Hammit s sod. (2008) je kljub večji prevalenci CD pri teletih z drisko ugotovil, da so toksini večkrat prisotni pri vzorcih telet brez kliničnih znakov. To nakazuje večjo vlogo goveda, koloniziranega s CD, ki lahko v tem primeru služi kot pomnoževalec bakterije in vir kontaminacije okolja (Rupnik in Songer, 2010). Odraslo govedo ima nizko prevalenco CD, in sicer med 0 in 6,9 % (Al saif in Brazier, 1996; Thitaram in sod., 2011; Rodriguez in sod., 2012). Najpogostejsa ribotipa sta 078 in 033 (Keel in sod., 2007; Costa in sod., 2011; Zidarič in sod., 2012; Knight in sod., 2013, Janežič in sod., 2014). Raznolikost sevov v zgodnjem obdobju življenja telet je večja kot pri starejših teletih tako kot tudi prevalenca znotraj populacije (Zidarič in sod., 2012).

Podatki iz literature so za prevalenco CD pri govedu zbrani v Tabeli 1.

Pri prašičkih je prevalenca med 25 in 50 %, v nekaterih primerih tudi do 100 % (Pirš in sod., 2008; Norman in sod., 2009; Weese in sod., 2010b; Hopman in sod., 2011; Hawken in sod.,

2013). S starostjo se pri prašičih prevalenca zmanjša na 0 do 4 % (Debast in sod., 2009, Indra in sod., 2009; Norman in sod., 2009), Najpogosteji izoliran ribotip pri prašičih je 078 (Keel in sod., 2007; Weese in sod., 2010b, Hopman in sod., 2011, Janežič in sod., 2014).

Prevalenca se s starostjo manjša tudi pri piščancih (Zidarič in sod., 2008), v povprečju pa je med 1,6 in 29 % (Al saif in Brazier, 1996; Simango in Mwakurudza, 2008, Koene in sod., 2012).

Tabela 1: Prevalenca CD pri govedu

Table 1: CD prevalence in cattle

Kategorija	Starost	Število testiranih	% pozitivnih	CD ribotipi	Lokacija	Leto	Referenca
Teleta			1 izolat	NC	Kanada	2005	Arroyo in sod., 2005
Teleta, driska	- 1 mes.	278	14,9	017, 027, NC	Kanada	2006	Rodriguez in sod., 2006
Teleta, zdrava		144	7,6				
Teleta	- 2 mes.		33 izolatov	078,002,033	ZDA	2007	Keel in sod., 2007
Teleta	- 21 dni	56	1,8	033	Slovenija	2008	Pirš in sod., 2008
Teleta, driska	1–42 dni	253	25,3	078, 017, 027,	ZDA	2008	Hammitt in sod., 2008
Teleta, zdrava		53	12,7	NC			
Teleta		42	9,5	077,002,033	Slovenija	2009	Avberšek in sod., 2009
Teleta		204	0,49	078	Švica	2010	Hofer in sod., 2010
Teleta		71	33,8		ZDA	2010	Houser in sod., 2010
Teleta	8–10 dni	200	61	078, NC	Kanada	2011	Costa in sod., 2011
		174	32				
	149–157 dni	156	2				
Pitanci	7–8 mescev	186	12,9	078, NC	ZDA	2011	Rodriguez Palacios in sod., 2011b
	-čez 1 teden	176	0				
	-čez 4 tedne	176	1,7				
	-čez 12 tednov	168	0				
	-čez 20 tednov	168	3,6				
	-pred klanjem	167	1,2				
Teleta		200	28		ZDA	2012	Houser in sod., 2012
	- 2 tedna	200	8				
	4–6 tednov	200	9				
	8–10 tednov	200	3				
	12–18 tednov	200	5				
	20–22 tednov	200	12				
Teleta		100	6	012, 033	Nizozemska	2012	Koene in sod., 2012
Teleta		47	12,7	033, 003, 066, 070	Švica	2012	Romano in sod., 2012

Kategorija	Starost	Število testiranih	% pozitivnih	CD ribotipi	Lokacija	Leto	Referenca
Teleta	14 dni	300	7	078, 045, 033, 126, 010, 012	Belgia	2012	Zidarič in sod., 2012
	18 dni	50	10				
	25 dni	50	16				
	32 dni	50	12				
	46 dni	50	2				
	194 dni	50	0				
Teleta	- 90 dni	18	22,2	078, 015	Belgia	2012	Rodriguez in sod., 2012
Pitanci	- ob prihodu	539	3,7	078	Kanada	2012	Costa in sod., 2012
	- vmes	335	6,2				
Teleta	- 7 dni	360	56%	127, 033, 126, 056, 103, 002, 137, 064, 014, 087, 078, 015, NC	Avstralija	2013	Knight in sod., 2013
	- 180 dni	26	3,8%				
Teleta	Driska	999	17,6	033, 078, 045	Nemčija	2013	Schneeberg in sod., 2013
Teleta	3–25 dni	150	60		Iran	2014	Doosti in Mokhtari-Farsani, 2014
Govedo		104	0		U.K.	1996	Al saif in Brazier., 1996
Govedo		67	4,5	014, NC	Avstria	2009	Indra in sod., 2009
Govedo		50	0		ZDA	2011	McNamara in sod., 2011
Govedo		944	1,8	078, NC	ZDA	2011	Rodriguez-Palacios in sod., 2011
Govedo, mlečno Govedo, mesno		1325	2,4		ZDA	2011	Thitaram in sod., 2011
		2965	6,3				
Govedo	11–52 mesecev	202	6,9	002, 014, 081, 087, NC	Belgia	2012	Rodriguez in sod., 2012
Govedo, mlečno		105	0,95	012	Nizozemska	2012	Koene in sod., 2012
Govedo		63	1,5	137	Švica	2012	Romano in sod., 2012
Govedo		506	5,7		Nemčija	2013	Schmid in sod., 2013
Govedo		280	1,8	056, NC	Avstralija	2013	Knight in sod., 2013

NC – ribotipi, ki niso določeni po Cardiff nomenklaturi

Ocenjena prevalenca bakterije pri žrebetih, mlajših od 14 dni, je do 29 % (Båverud in sod., 2003), medtem ko so starejši zdravi konji skoraj popolnoma negativni (od 0 do 7 %) (Båverud in sod., 2003; Al saif in Brazier, 1996; Medina-Torres in sod., 2011). Pri starejših konjih s klinično sliko driske je odstotek izoliranih bakterij CD med 12,7 in 53,3 % (Weese in sod., 2001; Båverud in sod., 2003; Schoster in sod., 2012a). Najpogosteje izolirani ribotipi so 001, 078 in 027 (Medina-Torres in sod., 2011; Schoster in sod., 2012a,b).

Pri psih in mačkah je prevalenca bakterije med 2 in 25 %, neodvisno od prisotnosti klinične slike (Al saif in Brazier, 1996; Koene in sod., 2012). Prisotnost ene imunsko oslabele osebe v gospodinjstvu pa vpliva na večjo kolonizacijo s CD pri psih znotraj istega gospodinjstva (Weese in sod., 2010a). Najpogostejsi ribotip pri psih v Kanadi je 001 (Weese, 2010), v Evropi pa 014 in 010 (Koene in sod., 2012).

#### 2.6.3. Dejavniki tveganja za okužbo s *Clostridium difficile*

Na kolonizacijo črevesja z bakterijo CD vplivajo različni dejavniki, ki lahko spremenijo potek okužbe. Potek in izid okužbe je pri starejših ljudeh večinoma hujši kot pri proizvodnih živalih, ki take starosti ne doživijo. Pri ljudeh je ključen dejavnik tveganja za pojav CDI starost nad 64 let (Pépin in sod., 2004; Garey in sod., 2008a), medtem ko pri živalih, z izjemo konjev, skoraj vedno obolevajo živali v neonatalnem obdobju (Frazier in sod., 1993; Waters in sod., 1998; Songer in sod., 2000; Rodriguez-Palacios in sod., 2006). Nekatere, na primer perutnina, pa celo nikoli ne zbolijo za CDI in so samo rezervoar bakterije (Zidarič in sod., 2008; Koene in sod., 2012). Izjema so mladi noji v vzrejališču in pingvin, pri katerih sta bila opisana primera hude oblike CDI (Hines in Dickerson, 1993; Frazier in sod., 1993). Pri pingvinu je na razvoj CDI vplivala uporaba antibiotikov. Številne študije so potrdile, da je pri ljudeh antibiotično zdravljenje za razvoj CDI ključno. Sprva so CDI povezali z jemanjem klindamicina, kasneje pa so raziskave potrdile, da jemanje antibiotikov katerekoli skupine lahko sproži nastanek klinične slike okužbe s CD (Båverud, 2002). CDI je v današnjem času največkrat povezan z jemanjem fluorokinolonov, kar je verjetno posledica njihove široke uporabe (Knoop, 1979; Hines in Dickerson, 1993; Kiss in Bilkei, 2005). Metaanaliza iz leta 2013 je dokazala povezavo med uporabo antibiotikov in razvojem izvenbolnišnične okužbe s CD (CACDI, ang. Community-associated *Clostridium difficile* infection). Največje tveganje za razvoj CACDI tako predstavlja uporaba klindamicina. Sledijo fluorokinoloni, cefalosporini, penicilini, makrolidi in sulfonamid/trimetoprim. Zanimivo je, da uporaba tetraciklinov ni povečala možnosti razvoja CACDI (Deshpande in sod., 2013).

Pri živalih so vpletjenost antibiotikov pri razvoju CDI oziroma prisotnost bakterije CD raziskovali in ugotovili pri konjih, morskih prašičkih in pri nekaterih drugih živalskih vrstah (Knoop, 1979; Båverud, 2002; Clooten et al., 2008). Vpliva pa niso dokazali pri govedu, ki je zaradi intenzivne vzreje pogosto izpostavljen boleznim in zato tudi večji uporabi antibiotikov (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Costa in sod., 2012).

Raziskani so bili še nekateri drugi dejavniki, ki vplivajo na povečano razmnoževanje CD v prebavnem traktu ljudi in živali. Pri ljudeh so raziskali dejavnike, kot so hospitalizacija, pridružene kronične bolezni, jemanje zdravila (npr. zaviralcev protonskih črpalk), prisotnost domačih živali in vpliv okolja (Al saif in Brazier, 1996; Pépin in sod., 2004; Balamurugan in sod., 2008; McNamara in sod., 2011; Cho in sod., 2012; Janežič in sod., 2012). Nekaj podobnih raziskav je bilo opravljenih tudi pri živalih, vendar je teh študij malo in so bile opravljene na relativno majhnem številu živali. Pri konjih je bilo ugotovljeno, da hospitalizacija, uporaba antibiotikov in sprememb krme vplivajo na razvoj CDI (Båverud, 2002), medtem ko je longitudinalna študija zdravih konjev ugotovila, da bi lahko bil, zaradi prehodne kolonizacije, vsak konj v raziskavi vsaj enkrat pozitiven na CD, če bi vzorčili dovolj dolgo (Schoster in sod., 2012b). Študije na prašičih so ugotovile, da na prisotnost CD vpliva predvsem starost (Weese in sod., 2010b; Hawken in sod., 2013) in mogoče okolje (Rodríguez-Palacios in sod., 2006; Norman in sod., 2009; Hopman in sod., 2011; Keessen in sod., 2011), čeprav sta Kiss in Bilkei leta 2005 dokazala povezavo med sindromom MMA (Mastitis Metritis Agalaktija) in prevalenco CD pri svinjah na Hrvaškem. Starost vpliva na prevalenco CD tudi pri teletih (Costa in sod., 2011), medtem ko naj ne bi vplivala preventivna uporaba antibiotikov (Rodríguez-Palacios et al., 2011b). Pri odraslem govedu, razen prevalence, ni bilo še nobene raziskave, ki bi ugotovljala povezavo prisotnosti CD s sočasnimi boleznimi, vplivom krme ali vplivi okolja.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Živali in vzorci

##### 3.1.1. Opis vzorčenih rej goveda

V raziskavo smo vključili 20 srednje velikih družinskih kmetij, ki vzrejajo krave molznice. Kmetije se nahajajo v občinah Ljubljana, Medvode, Vodice, Dobrova-Polhov Gradec, Škofljica in Poljane nad Škofjo Loko. Na kmetijah smo od novembra 2011 do novembra 2012 vsaka dva tedna vzorčili blato goveda (skupno 27-krat). V študijo smo vključili vse krave v laktaciji (od prve laktacije dalje) in vsa teleta do 6 mesecev starosti.

Poleg tega smo vsake 3 mesece vzorčili še okolico vsake kmetije. Pri tem smo zbirali vzorce krme, vode, zemlje, gnoja in domačih živali na kmetiji (psov, mačk, perutnine, drobnice, kopitarjev). V poletnem obdobju smo vzorčili tudi hlevske muhe in iztrebke lastovk na hlevski opremi.

Iz baze podatkov Govedorejske službe Slovenije smo za vse živali zbrali podatke o pasmi in starosti. Za krave molznice smo zbrali podatke o povprečni mesečni proizvodnji mleka in povprečnem številu somatskih celic. V javno dostopni bazi podatkov Agencije za okolje pa smo dobili informacijo o povprečni vlagi in temperaturi okolja na dan vzorčenja.

Med vzorčenjem smo beležili prisotnost zdravstvenih težav živali na kmetiji in morebitno zdravljenje. Poleg tega smo beležili tudi vse spremembe v prehrani živali, prostorski ureditvi hleva in prisotnosti domačih in prostoživečih živali na kmetiji. Z uveljavljenimi testi smo tudi preverili zdravstveni status kmetij na povzročitelje paratuberkuloze (MAP, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*), listerioze (*Listeria monocytogenes*), rinotraheitis goveda (IBR, ang. infectious bovine rhinotracheitis ali BH1 ang., bovine herpesvirus 1) in goveje virusne driske (BVD, ang., bovine viral diarrhea).

3.1.1.1. Kmetija 1 se nahaja v vasi Žlebe, občina Medvode. Poglavitna dejavnost kmetije je reja krav molznic (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka in mlečnih izdelkov – siri). Prevladuje črno-bela pasma (ČB). Krave (n=17–21) so v prosti rejì in od pomladi do jeseni so del dneva na paši. Teleta so izključno v enem skupnem boksu do približno 6. meseca starosti. Krave molznice krmijo z mrvo, krmili in koruzo. Teleta pa krmijo s kravjim mlekom do 3. meseca starosti, z mrvo in krmili. Vse živali

dobivajo tudi mineralno-vitaminski dodatek. Druge živali na posestvu so pes in mačke, občasno tudi prašiči.



Slika 7: Prosta reja goveda pasme ČB (kmetija 1) (Foto: P.Bandelj)

Figure 7: Free-stall type housing of Black and white (BW) cattle farm (farm 1)

3.1.1.2. Kmetija 2 se nahaja v vasi Seničica, občina Medvode. Poglavitna dejavnost kmetije je reja krav molznic (proizvodnja in prodaja mleka). Prevladuje pasma ČB. Krave ( $n=11-13$ ) so v vezani reji, teleta do 6. meseca starosti pa v večinoma individualnih boksih, včasih tudi v paru. Prehrana krav molznic temelji na silaži (travna 34 %, koruzna 33 %), mrvi (33 %), ječmenu, močnih krmilih in soji. Teleta krmijo s kravjim mlekom do 1. meseca starosti, nato pa z mlečnim nadomestkom in mrvo do odstaviteve (približno do 3 mesecev starosti). Vse živali dobivajo tudi mineralno-vitaminski dodatek. Druge živali na posestvu so pes in mačke.

3.1.1.3. Kmetija 3 se nahaja v vasi Preska, občina Medvode. Kmetija redi govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka) znotraj strnjenega naselja. Krave ( $n=10-13$ ) so v vezani reji, teleta pa v individualnih ali skupinskih boksih. Teleta so večinoma v drugem poslopu kot krave molznice, kjer imajo občasno stik tudi z domačimi prašiči. Prehrana krav molznic je zaradi načina dela tekom leta zelo konstantna in se ne spreminja. Temelji pa na koruzni silaži (50%), travni silaži (30%),

mrvi (20%), močnih krmilih, ječmenu, koruzi in mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta do 3 mesecev dobivajo kravje mleko, mrvo in krmila. Druge živali na posestvu so pes, kokoši in prašiči.

3.1.1.4. Kmetija 4 se nahaja v vasi Sp. Pirniče, občina Medvode. Nekoliko večja kmetija sredi naselja redi izključno krave molznice pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave (n=23–27) so v vezani reji, teleta pa večinoma v individualnih boksih. Prehrana molznic temelji na 55 % travne silaže (tudi detelje), 35 % koruzne silaže, 10 % mrve in močnih krmilih. Teleta do 1. tedna starosti dobijo kravje mleko, nato pa mlečni nadomestek (razen telet moškega spola, ki se do prodaje napajajo s kravjim mlekom). Poleg mleka dobijo teleta še krmila in mrvo. Vse živali dobijo tudi mineralno vitaminski dodatek. Druge živali na posestvu so mačke.

3.1.1.5. Kmetija 5 se nahaja v vasi Zavrh pod Šmarno goro, občina Medvode. Kmetija sredi naselja redi krave molznice predvsem pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave (n=21–24) so v prosti reji, teleta pa v individualnih ali skupinskih boksih. Prehrana molznic temelji na travni in koruzni silaži (skupaj 67 %), mrvi (33 %), močnih krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta dobijo kravje mleko do odstavitve (približno do 3 mesecev starosti), mrvo in krmila. Druge živali na posestvu so trije psi, maček, osel in svinja.

3.1.1.6. Kmetija 6 se nahaja v vasi Zavrh pod Šmarno goro, občina Medvode. Kmetija na koncu vasi redi predvsem govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave (n=14–18) so v vezani reji, teleta pa večinoma v individualnih boksih. Prehrana krav molznic temelji na 35 % travne silaže, 35 % koruzne silaže, 30 % mrve, koruzi, močnih krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta dobivajo kravje mleko prvih nekaj tednov, nato pa mlečni nadomestek ali vodo, mrvo in krmila. Druge živali na posestvu so mačke.

3.1.1.7. Kmetija 7 se nahaja v vasi Smlednik, občina Medvode. Kmetija se nahaja sredi naselja in redi izključno govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka in mesa). Poleg reje krav molznic se kmetija 7 ukvarja tudi s proizvodnjo in prodajo

sadja in sadnih izdelkov. Krave (n=23–26) so v prosti rejji na globokem slamnatem nastilju, tega popolnoma zamenjajo 2-krat na teden. Teleta so prvi mesec v individualnih boksih, nato pa v skupinskih. Prehrana molznic je vse leto zelo konstantna in temelji na 60 % travne silaže, 40 % koruzne silaže, močnih krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Občasno dobivajo tudi tritikalo in koruzo. Teleta dobivajo izključno kravje mleko do 3. meseca starosti in mrvo, kasneje pa tudi travno silažo. Druge živali na posestvu so mačke in pes, ta se je pred 25. vzorčenjem izgubil.



Slika 8: Teleta pasme ČB v individualnih boksih (kmetija 7) (Foto: P. Bandelj)

Figure 8: Black and white calves in individual pens (farm 7)

3.1.1.8. Kmetija 8 se nahaja v vasi Hraše, občina Medvode. Kmetija se nahaja sredi naselja in redi predvsem govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave (n=29–33) so v vezani rejji, teleta pa v skupinskih boksih. Prehrana krav molznic temelji na travni (34 %) in koruzni (33 %) silaži, mrvi (33 %), močnih krmilih in mineralno-vitaminskih dodatkih. Teleta dobivajo kravje mleko do 4. oziroma 5. meseca starosti. Ob tem še mrvo, nato pa mlečni nadomestek. Druge živali na posestvu so mačke in pes.

3.1.1.9. Kmetija 9 se nahaja v vasi Zapoge, občina Vodice. Kmetija sredi naselja redi predvsem govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Poleg tega na kmetiji pridelujejo in prodajajo tudi krompir. Krave molznice ( $n=16-19$ ) so v vezani rejii, teleta pa v individualnih boksih. Med vzorčenji so hlev preurejali in nekoliko povečali. Prehrana molznic temelji na travni (34 %) in koruzni (33 %) silaži, mrvi (33 %), močnih krmilih, ječmenu, koruzi, tritikali ter mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta dobivajo večinoma mlečni nadomestek, mrvo in krmila. Druge živali na posestvu so pes in konj.

3.1.1.10. Kmetija 10 se nahaja sredi naselja Pustnice, občina Vodice. Kmetija redi izključno govedo pasme ČB (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave molznice ( $n=16-20$ ) so v vezani rejii, teleta pa prvih nekaj tednov v individualnih boksih, nato v skupinskih. Krave so v obdobju presušitve v prosti rejii s pašo. Prehrana krav molznic temelji na koruzni silaži (70 %), mrvi (30 %), močnih krmilih, koruzi, pšenici, sončničnih tropinah in mineralno-vitaminski mešanici. Prehrana telet pa na kravjem mleku in mrvi. Druge živali na posestvu so pes in mačke. Na kmetiji so med vzorčenji imeli veliko težav s proizvodnjo in rejo molznic, zaradi tega so bolj kot po navadi krave nadomeščali z nakupi krav iz drugih rej.



Slika 9: Presušene ČB krave na paši (kmetija 10) (Foto: P. Bandelj)

Figure 9: Free-roaming BW cows during dry period (farm 10)

3.1.1.11. Kmetija 11 se nahaja v vasi Koseze, občina Vodice. Kmetija je izven naselja ob robu gozda in redi izključno kombinirano lisasto (LS) pasmo goveda (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka). Krave (n=14–16) so v vezani reji, vendar so od pomladci do jeseni tekom dneva na paši. Teleta so v individualnih boksih, čez poletje pa imajo dostop na manjši skupni pašnik. Prehrana temelji (poleg paše) na travni (34%), koruzni (33 %) silaži, mrvi (33 %) in mineralno-vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na mlečnem nadomestku, mrvi in mineralno-vitaminskem dodatku. Druge živali na posestvu so kokoši v prosti reji, mačke, dva psa, dva pava in kozel. Zaradi bližine gozda se na pašnih površinah velikokrat zadržuje srnjad in druge prostoživeče živali.



Slika 10: Vezana reja s pašo krav molznic pasme LS (kmetija 11) (Foto: P. Bandelj)

Figure 10: Simmental cattle in a tie type farm with pasture (farm 11)

3.1.1.12. Kmetija 12 se nahaja v vasi Vojsko, občina Vodice. Kmetija redi izključno govedo pasme ČB (proizvodnja in prodaja mleka) v vezani reji. Prehrana krav molznic (n=27–33) temelji na koruzni (60 %) in travni (30 %) silaži, mrvi (10 %), močnih krmilih, koruzi, tritikali in mineralno-vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na mlečnem nadomestku, mrvi, koruzni silaži, koruzi in tritikali. Druge živali na posestvu so pes, mačka, občasno jagenjček. Hlev so med vzorčenji preuredili in povečali število stojišč.

3.1.1.13. Kmetija 13 se nahaja v vasi Vojsko, občina Vodice. Kmetija redi govedo pasme ČB in LS (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka in mlečnih izdelkov) v vezani reji. Kmetija poleg prodaje mlečnih izdelkov goji ter prodaja piro in pekovske izdelke iz pirine moke. Prehrana molznic ( $n=16-18$ ) temelji na koruzni (50 %) in travni (25 %) silaži, mrvi (25 %), močnih krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta so sprva v individualnih boksih, nato jih združijo v skupinskega. Prehrana telet temelji na kravjem mleku in mlečnem nadomestku, mrvi, krmilih in vitaminskem dodatku. Starejša teleta se napaja z vodo. Druge živali na posestvu so še kokoši in kunci.

3.1.1.14. Kmetija 14 se nahaja v neposredni bližini srednje šole v gosto naseljenem predelu Ljubljana-Šentvid, občina Ljubljana. Kmetija redi izključno govedo pasme LS (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka ter prirejo in prodajo mesa oziroma telet) v vezani reji. Teleta so v individualnih boksih ali v paru. Na kmetiji dokupujejo teleta z okoliških kmetij in jih redijo do starosti 6 mesecev ali 2 let. Teleta prodajo za rejo, bike pa za meso. Prehrana krav ( $n=11-18$ ) temelji na travni silaži (70 %), sveži travi (20 %), mrvi (10 %), ječmenu, koruzi, tritikali, grahu in vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na kravjem mleku in mlečnem nadomestku, mrvi ter na dopolnilni krmni mešanici. Druge živali na posestvu so še kokoši in koze.

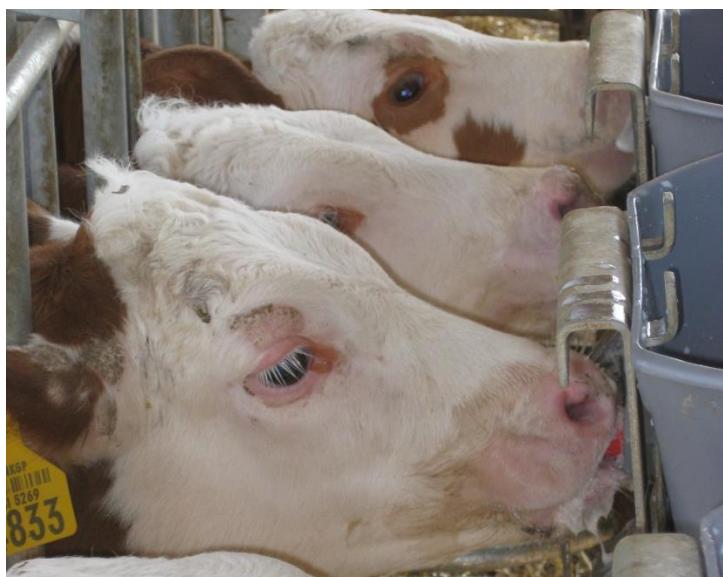
3.1.1.15. Kmetija 15 se nahaja v predelu Šentvid mesta Ljubljana, občina Ljubljana. Kmetija redi izključno govedo pasme LS (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka) v vezani reji. Teleta so v individualnih boksih. Prehrana molznic ( $n=13-15$ ) temelji na koruzni (50 %) in travni (25 %) silaži, mrvi (25 %), močnih krmilih, zmletem žitu in mineralno-vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na kravjem mleku, mrvi, krmilih in malo silaže (koruzne ali travne). V poletnem in jesenskem obdobju dobijo krave in teleta svežo pokošeno travo. Druge živali na posestvu so mačke in kokoši.

3.1.1.16. Kmetija 16 se nahaja v predelu Šentvid, mesta Ljubljana, občina Ljubljana. Kmetija redi izključno govedo pasme LS (proizvodnja in prodaja mleka) v vezani reji. Teleta so v individualnih boksih. Prehrana krav ( $n=13-15$ ) temelji na koruzni silaži, močnih krmilih, koruzi, ječmenu in mineralno-vitaminskem dodatku. V poletnem in

jesenskem obdobju polagajo kravam in teletom tudi sveže pokošeno travo. Prehrana telet temelji na kravjem mleku, mrvi in mineralno-vitaminskem dodatku. Druge živali na posestvu so mačke in kokoši.

3.1.1.17. Kmetija 17 se nahaja ob robu naselja Gabrje, občina Dobrova-Polhov Gradec.

Kmetija redi izključno govedo pasme LS (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka) v prosti reji. Teleta so večinoma v skupinskih boksih. Prehrana krav molznic ( $n=31-40$ ) temelji na koruzni (55 %) in travni (35 %) silaži ter mrvi (10 %). Dodatno krmijo tudi močna krmila, sončnične tropine, melaso in mineralno-vitaminski dodatek. Do 2 mesecev teleta napajajo s kravjim mlekom, nato z mlečnim nadomestkom. Teleta dobivajo še ječmen, koruzo, sončnične tropine, sojo, cel oves, mrvo in mineralno-vitaminski dodatek. Na posestvu je še pes.



Slika 11: Teleta pasme LS v skupinskom boksu med napajanjem (kmetija 17) (Foto: P. Bandelj)

Figure 11: Simmental calves in a group pen during feeding (farm 17)

3.1.1.18. Kmetija 18 se nahaja na robu naselja Dobrova, v občini Dobrova-Polhov Gradec. Kmetija redi govedo pasme LS (ukvarja se s proizvodnjo in prodajo mleka) v vezani reji. Teleta so v individualnih boksih. Prehrana krav molznic ( $n=11-14$ ) temelji na mrvi (60 %), koruzni (30 %) in travni (10 %) silaži, močnih krmilih, koruzi in mineralno-vitaminskem dodatku. Teleta do 1. meseca starosti napajajo s kravjim mlekom, nato pa z mlečnim nadomestkom. Prehrano telet dopolnjujejo z mrvo in

mineralno-vitaminskim dodatkom. Drugi živali na posestvu sta pes in mačka. Kmetija je v bližini gozda, zato na njenem ozemlju velikokrat opazijo lisice in druge prostoživeče živali.



Slika 12: Vezana reja krav pasme LS (kmetija 18) (Foto: P. Bandelj)

Figure 12: Simmental cattle in a tie type farm (farm 18)

3.1.1.19. Kmetija 19 se nahaja v naselju Škofljica, občina Škofljica. Na kmetiji redijo krave molznice rjave (RJ) pasme in pasme ČB v prosti reji (ukvarjajo se s proizvodnjo in prodajo mleka). Teleta so prve mesece v individualnih boksih, nato so premeščena v skupinske bokse. Prehrana molznic ( $n=32-37$ ) temelji na 55 % koruzne in 40 % travne silaže, 5 % mrve, močnih krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na mlečnem nadomestku in mrvi. Drugi živali na posestvu sta mačka in pes.

3.1.1.20. Kmetija 20 se nahaja na podeželju v naselju Vinharje, občina Poljane nad Škofjo Loko. Na kmetiji redijo izključno govedo pasme LS (proizvodnja in prodaja mleka) v vezani reji. Teleta so v individualnih boksih. Prehrana krav ( $n=9-11$ ) temelji na travni silaži, mrvi, močnih krmilih, koruzi in mineralno-vitaminskem dodatku. Prehrana telet temelji na kravjem mleku, mrvi, krmilih in mineralno-vitaminskem dodatku. Druge živali na posestvu so mačke, kokoši, koza in pes.

### 3.1.2. Vzorci blata goveda in vzorci okolja

#### 3.1.2.1. Vzorci blata goveda

V raziskavi smo testirali 540 skupinskih vzorcev blata krav molznic in 511 skupinskih vzorcev blata telet. Vzorce blata smo jemali iz rektuma vsake živali s čistimi pregledovalnimi rokavicami (Simps'S, Slovenija), jih v njih shranili in označili. Individualne vzorce smo združili v laboratoriju do enega dneva po vzorčenju v sterilne 0,3-litrske posode (Golias, Slovenija). Natančen postopek združevanja je opisan v poglavju 3.2.1. Vzorce telet (2442) smo shranili tudi individualno v 2-mililitrske sterilne epruvete (Eppendorf Tubes®, Nemčija). Skupne vzorce blata goveda smo obdelali še isti dan, medtem ko smo posamezne vzorce telet do nadalnjih preiskav shranili pri temperaturi  $-70^{\circ}\text{C}$ . Skupne vzorce goveda, razredčene 1 : 3 s sterilno destilirano vodo v 2-mililitrskih sterilnih epruvetah, smo shranili pri temperaturi  $-70^{\circ}\text{C}$  za morebitne nadaljnje preiskave. V blatu skupnih vzorcev goveda smo ugotavljali prisotnost bakterije CD s qPCR. Če je bil skupni vzorec blata telet pozitiven na CD, smo s qPCR testirali še vse individualne vzorce blata telet. Pri vseh qPCR pozitivnih skupnih vzorcih krav molznic in pozitivnih individualnih vzorcih telet smo opravili še gojivno preiskavo.

#### 3.1.2.2. Okoljski vzorci

V raziskavi smo testirali tudi 440 vzorcev iz okolja (okolje, druge domače živali na kmetiji, muhe in iztrebke lastovk). Na vsaki kmetiji smo na 3 mesece (4-krat na leto) testirali vzorce zemlje okoli hleva (80), vode iz napajalnika (80), krme (80) in gnoja (80). Vzorce smo shranili v sterilne 10–50-mililitrske centrifugirke (Sarstedt, Nemčija). Domačim živalim na kmetiji (80) smo s sterilnimi brisi (Deltalab, Španija) odvzeli rektalni oziroma kloakalni bris ali bris svežega iztrebka (kjer rektalnega/kloakalnega brisa ni bilo mogoče odvzeti). V poletnem obdobju smo v sterilne 10-mililitrske centrifugirke shranili tudi hlevske muhe (*Stomoxys calcitrans*) in iztrebke kmečkih lastovk (*Hirundo rustica*) na hlevskem orodju (skupno 40 vzorcev). Vse vzorce smo testirali z gojivno preiskavo najkasneje v roku dveh dni po odvzetju.



Slika 13: Okoljski vzorci: a) pes pri teletih na kmetiji 17, b) mačka v hlevu 15, c) kozel in pav na kmetiji 11, č) kokoš s piščanci v hlevu 15, d) gnezdo lastovk v hlevu 4, e) gnoj in okolje kmetije 16

Figure 13: Environmental samples: a) dog interacting with calves from farm 17, b) cat in the barn 15, c) goat and peacock on farm 11, č) hen with chickens in the barn 15, d) Barn swallow nest inside the barn 4, e) manure and the surroundings of farm 16

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Izolacija DNA iz blata

Za izolacijo DNA iz blata živali smo uporabili komplet kemikalij SmartHelix<sup>TM</sup> First DNAid Kit (IFB, Slovenija). Komplet temelji na mehanski lizi celične stene bakterijskih celic s steklenimi kroglicami.

Začetni material skupnih vzorcev za izolacijo CD iz blata je bil odvisen od števila živali v skupnem vzorcu oziroma od števila krav molznic in števila telet na posamezni kmetiji. Od vsake krave molznice na posamezni kmetiji smo odtehtali 1 g blata v sterilno 0,3-litrsko posodo (Golias, Slovenija), tako da je skupni vzorec na koncu tehtal med 9 in 40 g. Za skupne vzorce telet smo naredili enako, tako da so skupni vzorci tehtali med 1 in 14 g. Vzorce smo razredčili s sterilno destilirano vodo v razmerju 1 : 3 in jih nato stresali na stresalniku KS 4000 i control (IKA, Nemčija) 30 minut pri 250 rpm, da smo dobili homogenizirano vsebino. Od 1 do 2 ml vsakega vzorca smo centrifugirali 5 minut pri 10.000 x g in odlili supernatant, da smo dobili približno 0,5 g peleta. Temu smo dodali 400 µl pufra za razgrajevanje in 8 µl proteinaze K (20 mg/ml) (Sigma, ZDA). Peletu smo dodali še 375 mg sterilnih steklenih kroglic premera  $\leq 106 \mu\text{m}$  (Sigma, ZDA), te so omogočile mehanično homogenizacijo na stresalniku Magna Lyser (Roche, Nemčija) pri 6400 rpm za 45 sekund. Vzorce smo nato inkubirali 15 minut pri 56 °C, ponovili stresanje, inkubacijo in ponovno stresanje pod enakimi pogoji. Nato smo vzorce inkubirali še 10 minut pri 99 °C. Po končani inkubaciji smo pustili, da se vzorci ohladijo na sobni temperaturi (od 5 do 10 minut). Vzorce smo nato centrifugirali 5 minut pri 10.000 x g in supernatant prenesli v nove sterilne 2 ml epice (Eppendorf Tubes®, Nemčija). Dodali smo 1 ml pufra za vezavo, pulzirajoče vorteksirali 15 sekund in prenesli 700–750 µl vzorca v kolonice Econospin (v kitu). Vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi 2 minuti in jih nato centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g. Filtrat smo zavrgli ter v kolonice prenesli še preostanek vzorca, ki smo ga prav tako 2 minuti inkubirali in centrifugirali 5 minut pri 10.000 x g. Filtrat smo znova zavrgli. V kolonico smo nato dodali 600 µl pufra za spiranje, 1 minuto centrifugirali pri 16.000 x g, zavrgli filtrat, znova dodali pufer za spiranje (400 µl) in 5 minut centrifugirali pri 16.000 x g. Nato smo kolonice še ponovno 1 minuto centrifugirali pri 16.000 x g, da smo se prepričali, da ni ostankov pufra v vzorcu. Po končanem centrifugiranju smo kolonice prestavili v nove sterilne 1,5 ml epice (Eppendorf Tubes®, Nemčija), dodali 100 µl elucijskega pufra, inkubirali od 1 do 2 minuti in

1 minuto centrifugirali pri 16.000 × g. Kolonice smo zavrgli, eluat pa obdržali in shranili pri temperaturi –20 °C do nadalnjih preiskav.

Vzorce posameznih telet smo obdelali po enakem postopku, le da smo na začetku odtehtali le okoli 0,2 g vzorca. Dodali smo jim sterilno destilirano vodo v razmerju 1 : 3. Vzorce smo homogenizirali z vorteksiranjem. Preostali postopek je enak kot za skupne vzorce blata.

### 3.2.2. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) za določanje 16S rRNA gena bakterije *Clostridium difficile*

Za detekcijo gena 16S rRNA bakterije CD smo uporabili nekoliko spremenjen protokol, ki ga je leta 2005 objavil Penders s sodelavci. Uporabili smo enake začetne oligonukleotide in sondo TaqMan (Tabela 3) in jih *in silico* spletnim programom Basic Local Alignment Tool (BLAST) preverili, ali so 100-odstotno specifični (Altschul in sod., 1990) za CD [številka dostopa: AB548672]. Amplikon gena 16S rRNA, dolžine 151 bp, ima v genomu CD 7–11 kopij (Sadeghifard in sod., 2006). Protokol smo spremenili, ker smo dosegali boljše rezultate z dodajanjem manjše količine izolirane DNA in z uporabo druge komercialne mešanice reagentov TaqMan PCR. Količino DNA, dodano v reakcijsko mešanico za PCR, smo zmanjšali iz 10 µl na 1 µl. S primerjavo treh komercialnih mešanic reagentov TaqMan PCR pa smo ugotovili veliko boljši potek reakcije qPCR pri uporabi FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, Nemčija) kot pri TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, ZDA) in TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems, ZDA). Vse reakcije qPCR smo pomnožili z AB 7500 Fast (Applied Biosystems, ZDA) na mikrotitrskih ploščah z 96 luknjicami. Pomnoževanje se je začelo z 2-minutnim segrevanjem pri 50 °C in aktivacijo polimeraze DNA (hot-start) pri 95 °C za 10 minut. Denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje je potekalo v 45 ciklih pri 15-sekundnem segrevanju pri 95 °C in enominutnem pri 60 °C. Optimizirana sestava reakcijske mešanice za PCR je prikazana v tabeli 3.

Tabela 2: Optimizirana sestava reakcijske mešanice za qPCR 16S rRNA CD

Table 2: Optimized reaction mix composition for qPCR 16S rRNA CD

Reagent/material	Volumen
Sterilna voda brez DNaz/RNaz (Gibco, ZDA)	11 µl
FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, Nemčija)	12,5 µl
Pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid (CDF) (Sigma, ZDA) 5'-TTGAGCGATTACTCGGTAAAGA-3'	0,225 µl (900 nM)
Negativno usmerjen začetni oligonukleotid (CDR) (Sigma, ZDA) 5'-TGTACTGGCTCACCTTGATATTCA-3'	0,225 µl (900 nM)
TaqMan sonda CD 16S (Sigma, ZDA) FAM*-CCACCGCGTTACTCACCCGTCCG-TAMRA*	0,05 µl (200 nM)
DNA	1 µl
Končna količina	25 µl

\* Sonda ima na 5'-koncu vezano fluorescentno barvilo 6-karboksifluorescein (FAM), na 3'-koncu pa vezan nefluorescentni dušilec 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA).

Za ugotavljanje možne inhibicije v reakcijah qPCR kot posledice izolacije DNA iz kompleksnega matriksa smo uvedli še interno kontrolo pomnoževanja (IPK, ang. TaqMan exogenous internal positive control) (VIC sonda, Applied Biosystem, ZDA). Pripravili smo jo po navodilih proizvajalca. Reakcijska qPCR mešanica je vsebovala le začetne oligonukleotide in sondu za pomnoževanje IPK. Pri 10 pozitivnih vzorcih telet smo primerjali vrednosti Cq (ang. quantification cycle) 2-kratnih ponovitev IPK v vzorcih, njihovih redčinah (1 : 10) in v sterilni destilirani vodi. V testiranih vzorcih blata telet ni bilo zaznati inhibicije reakcije qPCR. Za primerjavo razlik med variancami vrednosti Cq za IPK smo uporabili Leveneov test varianc.

Po optimizaciji metode qPCR smo opravili še validacijo po MIQE navodilih. Čisto kulturo referenčnega seva CD 51377 (ribotip 127, toksinotip VI) smo uporabili za pripravo 10-kratnih serijskih redčin. Število bakterij CD (vegetativnih celic in spor) smo prešteli pod mikroskopom z uporabo Neubauerjeve kamrice in mikroskopiranjem v temnem polju. Število bakterij na mililiter smo izračunali iz redčin  $10^{-2}$  in  $10^{-3}$  z uporabo naslednje enačbe:

Število bakterij na ml = povprečno število bakterij na kvadrat (iz 4 kvadratov) x (faktor redčin) x  $10^4$ .

Da bi preverili optimiziran qPCR protokol za 16S rRNA gen bakterije CD, smo naredili redčine koncentracij od  $7,72 \times 10^7$  do 0,772 bakterij/ml destilirane vode. V treh ponovitvah smo redčine 3-krat testirali. Da bi preverili učinkovitost izolacije DNA iz blata goveda, smo naredili še drugo serijo redčin, v katerih je bilo število bakterij v začetni koncentraciji  $3,86 \times 10^7$ /ml, v končni redčini pa približno 0,386 bakterij/ml. V slednjem primeru smo v blato goveda, negativno na CD (s qPCR za 16S CD in gojitveno preiskavo), dodali po 100 µl redčin v treh ponovitvah. Vsako izolirano DNA smo testirali v treh ponovitvah s qPCR za CD 16S rRNA gen. Spodnjo mejo detekcije (LOD, ang. limit of detection) smo določili kot najnižjo koncentracijo bakterij CD, pri kateri smo dobili pozitiven signal pomnoževanja za CD v vsaj 1/3 reakcij. Za mejo kvantifikacije (LOQ, ang. limit of quantification) smo določili najnižjo koncentracijo bakterij, pri kateri smo dobili pozitiven signal pomnoževanja v vseh treh ponovitvah. Učinkovitost pomnoževanja (E, ang. efficiency) smo izračunali iz naklona (k, ang. slope) linearne regresijske premice med  $\log_{10}$  vrednostmi koncentracije tarčne DNA (x-os) in vrednostmi Cq (y-os) po naslednji enačbi (Pfaffl, 2001):

$$E = 10^{(1/k)} - 1$$

To pomeni, da bi se morale za 100-odstotno učinkovitost pomnoževanja ( $E = 1$ ) v enem ciklu reakcije qPCR pomnožiti vse tarčne molekule DNA ( $k = -3,33$ ). Določili smo tudi linearni razpon meritev (ang. dynamic range) in koeficient korelacije ( $R^2$ ). Ponovljivost reakcij smo določili na podlagi koeficiente variacije (CV, ang. coefficient of variance) znotraj enega testiranja (ang. intra-assay CV) in med tremi testiranji (ang. inter-assay CV). Uporabili smo vrednosti števila bakterij pri določeni vrednosti Cq. Izračuni testiranj so predstavljeni v tabeli 10 in 11.

### 3.2.3. Določanje CD v blatu in okoljskih vzorcih z gojitveno preiskavo

*Clostridium difficile* v blatu goveda in v okoljskih vzorcih smo ugotavljeni tudi s specifično gojitveno preiskavo. Vse vzorce blata (0,5–1 g), pozitivne na CD s qPCR (skupinske vzorce krav molznic, individualne vzorce telet), in vse okoljske vzorce smo testirali po enakem postopku, ta je opisan v Avberšek in sod. (2009). Vzorce smo nacepili v cikloserin-cefoksitin fruktozni obogatitveni bujon z 0,1-odstotnim natrijevim tauroholatom (Sigma, ZDA), ki smo mu dodali lizocim (5 mg/l) za boljšo germinacijo spor. Po sedemdnevni inkubaciji v anaerobnih pogojih smo 1 ml vzorca prenesli v 2-mililitrske sterilne epice (Eppendorf Tubes®, Nemčija) in mu dodali enak volumen absolutnega etanola ter inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi (alkoholni šok). Po alkoholnem šoku smo vzorce 10 minut centrifugirali pri 16.000 x g, odstranili supernatant, usedlino pa nasadili na standardni selektivni medij, obogaten s cikloserinom, cefoksitinom in lizocimom (Oxoid, Anglija). Vzorce smo inkubirali še od 2 do 4 dni anaerobno pri 37 °C. Identifikacija vzorcev je temeljila na morfoložiji in tipičnem vonju. Izolate smo potrdili s qPCR, kot je opisano v poglavju 3.2.2. DNA iz bakterijske kulture za molekularno potrditev CD smo izolirali tako, da smo kolonije (3–5 kolonij) iz čiste kulture suspendirali v sterilni destilirani vodi (100-200 µl), 15 minut segrevali pri 95 °C in na koncu 2 minuti centrifugirali še pri 14.167 x g.

### 3.2.4. Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili univariatni linearni mešani vzročni model (ang. univariate linear mixed effects model), s katerim smo preverili asociacijo med neodvisnimi spremenljivkami (koledarska in meteorološka sezona, povprečna dnevna temperatura in vlažnost, pozitivno okolje CD, sprememba infrastrukture, tip kmetije, paša, sprememba krme, pasma, nova teleta, povprečna mesečna proizvodnja mleka in število somatskih celic, zdravstveni status kmetij, paraziti v blatu goveda, prisotnost bolezni, driske, ostale gastrointestinalne in metabolne bolezni, mastitis, respiratorne bolezni, antibiotično ter neantibiotično zdravljenje) in različnimi izidi (prisotnost CD pri kravah molznicih in/ali pri teletih, CD pri teletih od 0 do 21 dni starosti, CD pri teletih od 22 do 56 dni starosti in CD pri teletih od 57 do 180 dni starosti). Meja signifikantnosti je določena na  $P \leq 0,01$ .

V nadaljevanju smo z multivariatno statistično analizo podatkov (ang. multivariate mixed effect model) ugotavljeni medsebojne povezave med različnimi dejavniki, ki najbolj vplivajo

na izločanje CD pri govedu. Možni izidi so bili kot pri univariatni analizi; prisotnost CD na kmetiji, CD pri kravah, CD pri teletih, CD pri teletih od 0 do 21 dni starosti, CD pri teletih od 22 do 56 dni starosti in CD pri teletih od 57 do 180 dni starosti. Upoštevani dejavniki tveganja so bili uporaba antibiotikov, prisotnost bolezni (mastitis), nova teleta, sprememba prehrane, pasma goveda in letni časi. Spremenljivki "bolezni" in "uporaba antibiotikov" smo zaradi visoke korelacije uvrstili v svoja modela, pri katerih smo opazovali efekt drugih relevantnih spremenljivk. Vključili smo le rezultate modela, ki se boljše vključijo na podlagi Akaike informacijskega kriterija. Pri multivariatnem mešanem vzročnem modelu analize smo določili mejo za signifikantne rezultate na  $P \leq 0,05$ . Podatke smo analizirali s pomočjo programskega orodja R (The R Project for Statistical Computing verzija 3.0.1).

### 3.2.5. Molekularna tipizacija sevov CD

#### 3.2.5.1. PCR-ribotipizacija in toksinotipizacija sevov CD

Vse seve CD, ki smo jih izolirali preko bogatitvenega gojišča, smo kot spore na filtrirnem papirju poslali v Zavod za zdravstveno varstvo Maribor (zdaj NLZO), kjer so jim določili PCR-ribotipe in toksinotipe. Za PCR-ribotipizacijo so uporabili začetne oligonukleotide, ki jih je opisal Bidet s sodelavci (1999), v pogojih, ki so bili že objavljeni v Janežič in Rupnik (2010). Za toksinotipizacijo toksina A in B so uporabili protokol opisan v Rupnik in sod. (1998), za binarni toksin pa protokol opisan v Stubbs in sod. (2010).

#### 3.2.5.2. MLVA sevov CD

Seve CD, izolirane preko gojitvene preiskave, smo testirali še z metodo MLVA, ta ima najboljšo moč ločljivosti med sevi. V ta namen smo uporabili že objavljen protokol (Manzoor in sod., 2011) in seve tipizirali na podlagi 7 specifičnih lokusov: CdA6, CdB7, CdC6, CdE7 (van der Berg in sod., 2007), CdG8 (van der Berg in sod., 2007; Tanner in sod., 2010), CDR60 (Tanner in sod., 2010), CDR5 (Marsh in sod., 2006). Sekvence začetnih oligonukleotidov za te lokuse in podatki o barvilu, s katerim so označeni, so napisani v tabeli 3. Za vsak lokus posebej smo pripravili svojo reakcijsko mešanico. Ta je vsebovala 12,5 µl FastStart Universal Probe Master (Rox), 200 nM od vsakega začetnega oligonukleotida in sterilno destilirano vodo do 24 µl volumna. Za končni volumen 25 µl smo dodali 1 µl izolirane DNA iz čiste bakterijske kulture. Po uvodnih rezultatih smo končni volumen reakcijske mešanice sorazmerno zmanjšali na 15 µl. Volumen dodane DNA je ostal enak. Postopek smo nekoliko optimizirali za

lažjo in hitrejšo obdelavo večjih količin vzorcev, tako da smo pomnoževanje izvajali na mikrotitrskih ploščah (96 x 0,1 ml) na aparaturi AB 7500 Fast (Applied Biosystems, ZDA). Da ne bi svetloba v aparaturi oslabila obarvanih začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici, smo mikrotitrsko ploščo prekrili s posebno adhezivno aluminijasto folijo (Adhesive PCR Foil Seal, Thermo scientific, Anglija). Program pomnoževanja je zapisan v tabeli 4.

Tabela 3: Sekvence začetnih oligonukleotidov za izbrane lokuse CD MLVA

Table 3: MLVA CD primer sequences for selected loci

Lokus	Sekvence začetnih oligonukleotidov (5'-3')	
	Pozitivno usmerjeni	Negativno usmerjeni
CdA6	FAM-TTAATTGAGGGAGAATGTTAAA	AAATACTTTCCCACTTCTAA
CdB7	HEX-CTTAACTAACTAACTCTAACCGAGTAA	TTATATTTATGGGCATGTTAAA
CdC6	Cy3-GTTTAGAACATCTAACAGCATTATTGGA	ATTGGAATTGAATGTAACAAAA
CdE7	HEX--TGGAGCTATGGAAATTGATAA	CAAATACATCTGCATTAATTCTT
CdG8	FAM-TGTATGAAGCAAGCTTTTATT	AATCTAATAATCCAGTAATTAAATT
CDR60	Cy3-AGTTGTAGGAAAGTGTGAAATAGAT	CGCATTAAATTCACTCCTCAT
CDR5	JOE-AGCCATTATCAATCCTTCTAT	AATTTAAGTTAACGTTTCTACAT

FAM (6-karboksifluorescein), HEX (6-karboksi-2',4,4',5',7,7'-heksaklorofluorescein), Cy3 (cianin-3), JOE (6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifluorescein)

Po pomnoževanju smo 1 µl produkta zmešali z 8,5 µl HiDi formamida in 0,5 µl LIZ600 velikostnim standardom (ang. LIZ600 size standard) (Applied Biosystems, ZDA). Mešanico smo denaturirali s 5-minutnim segrevanjem pri 95 °C in nato ohladili v hladni kopeli. Vzorce smo nato prenesli v genetski analizator 3130xl (Applied Biosystems, ZDA) in določili natančno velikost produktov z večbarvno kapilarno elektroforezo. Za analizo vzorcev smo uporabili Gene-Mapper Software 4.0 (Applied Biosystems, ZDA). Za izračun števila ponovitev tandemskih sekvenč smod od dobljenega rezultata odšteli določene priležne regije (ang. flanking region) in ostanek delili s številom nukleotidov v tandemski ponovitvi določenega lokusa (Tabela 7).

Tabela 4: Program pomnoževanja za CD MLVA

Table 4: MLVA CD multiplication protocol

Proces	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	95	1	35
Spajanje začetnih oligonukleotidov z DNA	56	1	
Podaljševanje	72	1	
Končno podaljševanje	72	5	1
Ohlajanje	10	~	

Metoda MLVA po zgoraj opisanem protokolu se je za seve CD z ribotipom 033 izkazala za neuporabno, zato smo za pomoč zaprosili kolege z Nizozemske (Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Centre, Leiden, Nizozemska). Ti so nam testirali seve CD ribotipa 033 po že objavljenem protokolu (van der Berg in sod., 2007; Bakker in sod., 2010). Razlike so samo v nukleotidnem zaporedju začetnega oligonukleotida lokusa CdG8 (Goorhuis in sod., 2008), večji koncentraciji MgCl (4 mM) ter temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov za lokus CdB7 in CdG8 (47°C) in lokus CdC6 (46°C). Za ostale lokuse (CdE7, CdF3, CdH9) je temperatura prileganja 51 °C. V spodnji tabeli so opisani začetni oligonukleotidi in program pomnoževanja (Tabela 5 in 6). Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala 12,5 µl HotStar Taq master mix-a (Qiagen, Nemčija), 500 nM vsakega začetnega oligonukleotida, 2,5 µl MgCl (4 mM) ozioroma 0,75 µl MgCl (1,2 mM) za lokusa CdF3 in CdH9, 6,5 µl (8,25 µl za lokusa CdF3 in CdH9) sterilne destilirane vode in 2,5 µl DNA. Reakcije so potekale v končnem volumnu 25 µl.

Tabela 5: Sekvence začetnih oligonukleotidov za izbrane lokuse CD MLVA ribotip 033

Table 5: MLVA CD ribotype 033 primer sequences for selected loci

Lokus	Sekvence začetnih oligonukleotidov (5'-3')	
	Pozitivno usmerjeni	Negativno usmerjeni
CdB7	FAM-CTTAATACTAAACTAACTCTAACCAAGCTAA	TTATATTATGGGCATGTTAAA
CdC6	HEX-GTTTAGAATCTAACAGCATTATTGA	ATTGGAATTGAATGTAACAAAA
CdE7	FAM--TGGAGCTATGGAAATTGATAA	CAAATACATCTGCATTAATTCTT
CdF3	HEX-TTTTGAAACTGAACCAACATA	ACAAAAGACTGTGCAAATATACTAA
CdG8	NED-TGTATGAAGCAAGCTTTTATT	ACCAAAAATTCTAACCCAAC
CdH9	VIC-GTTTGAGGAAACAAACCTATC	GATGAGGAAATAGAAGAGTTCAA

FAM (6-karboksifluorescein), HEX (6-karboksi-2',4,4',5',7,7'-heksaklorofluorescein), NED (2'-kloro-5'fluoro-7',8'-fused fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescin), VIC (2'-kloro-7'-fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescin)

Tabela 6: Program pomnoževanja za CD MLVA ribotip 033

Table 6: MLVA CD ribotype 033 multiplication protocol

Proces	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Začetna denaturacija	94	12	1
Denaturacija	94	0,5	
Spajanje začetnih oligonukleotidov z DNA	51 ali 46 ali 47	0,5	35
Podaljševanje	72	0,5	
Končno podaljševanje	72	10	1
Ohlajanje	15	~	

Po pomnoževanju se 1 µl produkta zmeša z 9,5 µl HiDi formamida in 1 µl ROX500 velikostnim standardom (ang. ROX500 size standard). Mešanico se denaturira s 5-minutnim segrevanjem pri temperaturi 95 °C in nato ohladi v hladni kopeli. Vzorce se nato prenese v genetski analizator ABI3100 (Applied Biosystems, ZDA) in določi natančno velikost produktov z večbarvno kapilarno elektroforezo. Za analizo vzorcev se uporabi Genescan software (Applied Biosystems, ZDA). Za izdelavo sorodstvenega drevesa pa BioNumerics software 4.6 (Applied Maths, Belgija).

Tabela 7: Nukleotidno zaporedje tandemskih ponovitev uporabljenih lokusov, lokacija na genomske sekvenci in število bp v priležnih regijah seva 630 bakterije CD

Table 7: Tandem repeat sequences, location on gene and number of bp in CD strain 630

Lokus	Nukleotidno zaporedje tandemne ponovitve	Lokacija na genomski sekvenci seva CD 630	Priležna regija (bp)
CdA6	AAGAGC	755721	103
CdB7	ATCTTCTT	3688632	101
CdC6	TATTGC	3239736	99
CdE7	ATAGATT	167124	93
CdF3	TTA	1954915	129
CdG8	TAAAAGAG	664660	130; 96*
CdH9	TCTTCTTCC	4116072	142
CDR60	GTAAATAGGATGTAAAA	677132	141
CDR5	TATATTGG	692929	199

\* – število bp priležne regije za lokus CdG8 MLVA ribotipa 033

### 3.2.6. Občutljivost sevov CD za antibiotike

Vse seve CD smo pregledali še na občutljivost za 17 različnih antibiotikov. V ta namen smo skupaj z nekaterimi svetovno uveljavljenimi znanstveniki iz Kanade in Slovenije po naročilu oblikovali mikrotitrsko ploščo za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov (Micronaut-S CD plošča MIC) (Merlin Diagnostika GmbH, Nemčija). Izbrali smo antibiotike, ki se najpogosteje uporabljajo v humani in veterinarski medicini, ter druge pomembne antibiotike pri raziskovanju odpornosti naspluh. Redčine antibiotikov smo določili na podlagi mejnih vrednosti EUCAST ter za ugotavljanje nizke in visoke stopnje odpornosti (EUCAST, 2013). Plošče smo validirali tako, da smo preverili zanesljivost, primerljivost, ponovljivost in obnovljivost rezultatov. Zanesljivost smo preverili z 2-kratnim testiranjem referenčnih sevov bakterij *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bacteroides thetaiaomicron* (ATCC 29741), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) in *Clostridium difficile* (ATCC 700057). Primerljivost smo preverili tako, da smo primerjali rezultate E-testov (6-8 antibiotikov) in plošč Micronaut-S CD MIC za 5 različnih PCR-ribotipov bakterije CD. Teste smo za vsak sev izvajali v paralelkah. Da bi preverili ponovljivost novih plošč Micronaut-S CD MIC, je ena oseba 5 različnih sevov CD testirala 8-krat v 1 dnevnu. Obnovljivost in robustnost metode smo preverili tako, da so 4 osebe na različne dni testirale 5 različnih sevov CD. Pri tem je vsak uporabil drug način pipetiranja in različne tehnične pripomočke.

### 3.2.6.1. Postopek dela za plošče Micronaut-S CD MIC

Seve bakterije CD smo nasadili na krvni agar in jih anaerobno inkubirali. Izbrali smo nekaj posameznih kolonij, starosti med 18 in 24 ur, in jih homogenizirali v 1 ml 0,9-odstotnem NaCl do gostote, ki ustreza McFarland standardu 0,5. Nato smo odpipetirali 200 µl suspenzije v 11 ml bujon Wilkins Chalgren (Oxoid, Anglija), ki smo ga predhodno segreli na 37 °C. Po homogenizaciji smo po 100 µl bujona avtomatsko odpipetirali v vsako jamico Micronaut-S CD plošče MIC (Tabela 8). Plošče smo nato pokrili s perforirano folijo in jih anaerobno inkubirali od 1 do 2 dni pri 37 °C. Rezultate smo odčitali vizualno ali z avtomatičnim čitalcem plošč (Merlin diagnostika GmbH, Nemčija). Z izjemo inkubacij je postopek dela potekal v aerobnih pogojih.

Tabela 8: Plošča Micronaut-S CD MIC (koncentracija antibiotika v µg/ml)

Table 8: Micronaut-S CD plate MIC (antibiotic concentration in µg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMX 16	CLI 512	TET 16	DPT 8	RAM 64	LIN 8	CEX 256	T/S 16/304	OXA 8	ERY 512	LEX 32	MOX 32
B	AMX 8	CLI 256	TET 8	DPT 4	RAM 32	LIN 4	CEX 128	T/S 8/152	OXA 4	ERY 256	LEX 16	MOX 16
C	AMX 4	CLI 32	TET 4	DPT 2	RAM 1	LIN 2	CEX 64	T/S 4/76	OXA 2	ERY 8	LEX 8	MOX 8
D	AMX 2	CLI 16	TET 2	DPT 1	RAM 0,5	LIN 1	CEX 32	T/S 2/38	OXA 1	ERY 4	LEX 4	MOX 4
E	AMX 1	CLI 8	TET 1	IMP 32	RAM 0,25	TIG 0,5	CEX 16	T/S 1/19	OXA 0,5	ERY 2	LEX 2	MOX 2
F	AMX 0,5	CLI 4	TET 0,5	IMP 16	RAM 0,0078	TIG 0,25	CEX 8	T/S 0,5/9,5	OXA 0,25	ERY 1	FUS 4	FUS 2
G	AMX 0,25	CLI 2	TET 0,25	IMP 8	RAM 0,0039	TIG 0,125	MTR 4	MTR 2	MTR 1	MTR 0,5	MTR 0,25	POS
H	AMX 0,125	CLI 1	TET 0,125	IMP 4	RAM 0,0019	TIG 0,0625	VAN 4	VAN 2	VAN 1	VAN 0,5	VAN 0,25	NEG

(AMX – amoksicilin; CLI – klindamicin; TET – tetraciklin; DP – daptomicin; IMP – imipenem; RAM – rifampicin; LIN – linezolid; TIG – tigeciklin; CEX – cefriaksom; TMS – trimetoprim/sulfametoksazol; OXA – oksacilin; ERY – eritromicin; LEX – levofloksacin; MOX – moksifloksacin; FUS – fusidna kislina; MTR – metronidazol; VAN – vankomicin; POS – pozitivna kontrola; NEG – negativna kontrola)

## 4. REZULTATI

V rezultatih bomo prikazali:

1. Zdravstveni status kmetij.
  2. Prevalenco, dinamiko izločanja in molekularno karakterizacijo sevov CD skupaj z validacijo in optimizacijo qPCR.
  3. Antibiotično občutljivost izoliranih sevov CD skupaj z validacijo plošč Micronaut-S CD MIC.
- ### 4.1. Zdravstveni status kmetij

Iz skupinskih vzorcev blata smo ugotovili 50-odstotno prevalenco *L. monocytogenes*, medtem ko so bile vse kmetije negativne na MAP. Protitelesa proti virusu IBR smo v bazenskem vzorcu mleka ugotovili pri 20 %, medtem ko smo protitelesa proti virusu BVD ugotovili samo na eni kmetiji (5 %). Zdravstveni status kmetij je opisan v tabeli 9.

Tabela 9: Zdravstveni status vzorčenih kmetij

Table 9: Health status of sampling farms

Kmetija	Paratuberkuloza	Listerioza	BVD	IBR
Kmetija 1	-	-	-	-
Kmetija 2	-	-	-	+
Kmetija 3	-	-	-	+
Kmetija 4	-	+	-	-
Kmetija 5	-	+	-	-
Kmetija 6	-	-	-	-
Kmetija 7	-	-	-	-
Kmetija 8	-	+	-	+
Kmetija 9	-	-	-	-
Kmetija 10	-	+	+	+
Kmetija 11	-	-	-	-
Kmetija 12	-	+	-	-
Kmetija 13	-	-	-	-
Kmetija 14	-	+	-	-
Kmetija 15	-	-	-	-
Kmetija 16	-	-	-	-
Kmetija 17	-	+	-	-
Kmetija 18	-	+	-	-
Kmetija 19	-	+	-	-
Kmetija 20	-	+	-	-

Paratuberkuloza – identifikacija MAP po protokolu Logar in sod. (2012); Listerioza – identifikacija *L. monocytogenes* po protokolu Zelenik in sod. (2014); BVD – prisotnost protiteles proti povzročitelju goveje virusne driske (Svanovir® BVDV-Ab); IBR – prisotnost protiteles proti povzročitelju infekcionsnega govejega rinotraheitisa (Svanovir® IBR-Ab).

#### 4.2. Rezultati optimizacije in validacije qPCR

V tabeli 10 in 11 (Priloga 11.1.) so opisani rezultati optimizacije in validacije protokola za qPCR 16S rRNA gena za CD ter rezultati učinkovitosti izolacije DNA iz blata goveda. Spodnja meja detekcije (LOD) je bila 7,72 celic CD /g blata, medtem ko je bila spodnja meja kvantifikacije (LOQ) 77,2 celic CD /g blata. Koeficient korelacije ( $R^2$ ) je bil med 0,9957 in 0,9968, učinkovitost izolacije pa med 87,89 % in 90,96 %. Koeficient variacije (CV) med poskusi je bil med 3,71 % in 9,57 %.

#### 4.3. Prevalenca *Clostridium difficile* v blatu goveda in molekularna karakterizacija

V blatu telet in krav molznic smo na 20 kmetijah v obdobju enega leta dokazali bakterijo *Clostridium difficile* na vseh kmetijah (100 %). Z dobljenimi rezultati skupinskih vzorcev blata goveda smo dokazali prevalenco CD na kmetijah med vzorčenji od 15 % do 70 % (povprečno 40 %, +-SD 12,5 %, +-SE 2,4 %) in od 3,7 % do 74,1 % (povprečno 39,8 %, +-SD 22,3 %, +-SE 5 %) med posameznimi kmetijami v obdobju enega leta. Pregled rezultatov skupnih vzorcev blata goveda je v tabeli 12.

##### 4.3.1. Skupinski vzorci blata krav molznic

Število kmetij, ki so imele vsaj enkrat pozitivne vzorce krav molznic, je bilo 14/20 (70 %). Od 540 skupnih vzorcev blata krav molznic je bilo s qPCR CD 16S pozitivnih 54 (10 %) vzorcev. Prevalenca CD se je med vzorčenji gibala od 0 do 25 % (povprečno 10 %, +-SD 7,1%, +-SE 1,4 %) in med kmetijami od 0 do 44,4 % (povprečno 10 %, +-SD 10,3 %, +-SE 2,4%). Z gojitveno preiskavo smo pregledali vseh 54 s qPCR pozitivnih skupinskih vzorcev blata krav in izolirali le en sev CD. Tako je prevalenca pri kravah molznicah samo na podlagi gojitvene preiskave le 0,2-odstotna (1/540). Rezultati prevalence CD so prikazani v tabeli 13.

##### 4.3.2. Skupinski in individualni vzorci blata telet

V obdobju enega leta so bili telički z vseh kmetij (20/20; 100 %) vsaj enkrat pozitivni. Od 511 skupinskih vzorcev blata telet je bilo s qPCR CD 16S pozitivnih 182 (35,6 %). Prevalenca CD se je med vzorčenji gibala od 15 do 55 % (povprečno 35,7 %, +-SD 11,4 %, +-SE 2,2) in med posameznimi kmetijami od 3,7 do 66,7 % (povprečno 35,7 %, +-SD 21 %, +-SE 4,7 %). DNA smo izolirali iz 918 individualnih vzorcev blata telet, ki so izvirali iz qPCR pozitivnih skupinskih vzorcev. Od tega je bilo 243 qPCR pozitivnih vzorcev na CD 16S. Skupno

glezano je bilo torej s qPCR za CD pozitivnih 10 % telet (243/2442). Vse pozitivne individualne vzorce (n = 243) smo nasadili na gojišča in izolirali seve CD iz 101 vzorcev (102 sevov) blata telet. Z gojitveno preiskavo smo CD potrdili pri 4,1 % (101/2442) vzorcih telet. Rezultati prevalence so prikazani v tabeli 14.

Tabela 12: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev krav molznic in telet  
 Table 12: Results of pooled fecal samples from cows and calves

Vzor Kme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Skupaj	%
1										+										3	15	
2				+	+	+		+	+											7	35	
3					+						+									5	25	
4	+	+				+		+		+				+		+	+			9	45	
5								+						+	+	+				5	25	
6		+		+	+	+		+		+		+								11	55	
7		+		+	+			+					+		+	+	+			7	35	
8	+	+		+	+			+												10	50	
9	+			+	+					+			+		+	+				7	35	
10				+	+			+		+			+	+	+	+	+			10	50	
11	+			+	+			+		+		+	+	+	+	+	+	+		14	70	
12			+	+	+						+			+						8	40	
13	+				+			+		+			+							7	35	
14	+			+	+					+										6	30	
15				+		+		+							+	+				7	35	
16	+					+		+						+	+					9	45	
17	+					+		+								+	+			6	30	
18				+						+	+									5	25	
19	+		+	+	+			+		+			+	+						9	45	
20				+				+				+								5	25	
21	+	+	+	+				+		+				+	+	+	+	+		11	55	
22	+			+	+	+		+		+				+	+		+	+		12	60	
23	+				+	+		+						+	+	+		+		10	50	
24	+	+			+	+								+	+					8	40	
25	+					+	+	+						+	+	+				9	45	
26								+						+	+	+				6	35	
27									+							+	+			9	45	
Skupaj	12	10	3	16	17	10	1	20	1	14	12	2	1	16	17	14	12	15	11	11	215	40
%	44,4	37	11,1	59,3	63	37	3,7	74,1	3,7	51,8	44,4	7,4	3,7	59,3	63	51,8	44,4	55,6	40,7	40,7	39,8	

Vzor – številka vzorčenja; Kme – številka kmetije; + – pozitiven skupinski vzorec krav molznic in/ali telet na qPCR 16S rRNA gen bakterijo CD

Tabela 13: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev krav molznic

Tabel 13: Results of pooled fecal samples from cows

Vzor Kme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Skupaj	%
1																					0	0
2																					1	5
3							+														2	10
4	+							+													3	15
5																					1	5
6									+												3	15
7																					1	5
8									+												1	5
9	+																				2	10
10										+											3	15
11										+											5	25
12			+																		4	20
13		+																			2	10
14																					0	0
15								+													3	15
16								+													3	15
17								+													1	5
18																					0	0
19										+											2	10
20																					0	0
21			+																		1	5
22									+												2	10
23									+												3	15
24	+	+							+												3	15
25										+											1	5
26										+											2	10
27			+						+												5	25
Skupaj	3	4	1	0	2	4	0	12	0	2	3	0	0	4	2	5	3	0	3	6	54	10
%	11,1	14,8	3,7	0	7,4	14,8	0	44,4	0	7,4	11,1	0	0	14,8	7,4	18,5	11,1	0	11,1	22,2	10	

Vzor – številka vzorčenja; Kme – številka kmetije; + – pozitiven skupinski vzorec krav molznic na qPCR 16S rRNA gen bakterijo CD

Tabela 14: Pregled rezultatov skupinskih vzorcev telet

Table 14: Results of pooled fecal samples from calves

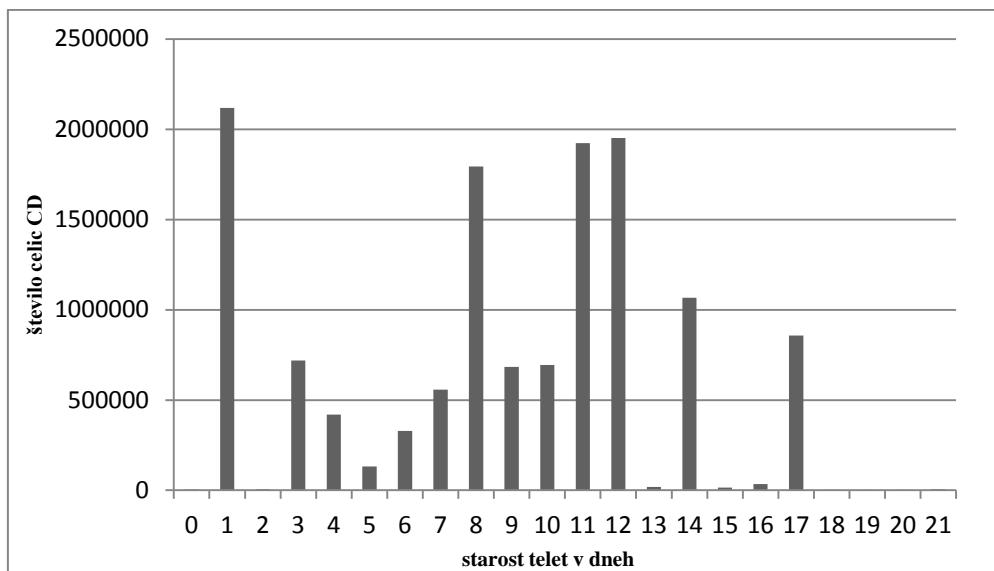
Vzor\Kme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Skupaj	%
1	12	4	1	4	3	6	12	2	1	+7	2	5	3	9	3	+4	+5	3	9	1	3	15
2	14	4	1	+3	+4	+5	10	+3	+2	6	2	6	5	9	3	5	4	+4	7	+1	7	35
3	12	3	2	4	+3	5	10	4	2	4	+6	3	5	11	+4	3	+5	3	8	2	4	20
4	11	+5	1	2	2	+6	12	+4	1	+6	4	3	5	+10	3	+3	+9	3	9	+2	8	40
5	7	+4	4	2	2	5	12	+6	2	5	4	2	6	+12	+3	3	5	3	10	1	4	20
6	8	+4	4	+3	+4	6	12	+7	2	+6	+5	3	+6	12	3	3	7	+3	11	+2	9	45
7	7	+3	5	+3	+5	5	12	+7	1	7	2	4	5	+11	2	+4	+7	2	8	2	7	35
8	+7	+3	9	+4	+4	5	13	10	/	7	+3	3	5	11	2	+4	+6	+3	+7	2	9	47,4
9	5	2	8	+5	+4	2	11	8	1	+7	3	3	5	+11	/	+3	+11	2	2	1	6	31,6
10	4	2	7	+6	+5	1	8	5	1	+6	+3	4	2	+11	+1	3	+9	+4	2	3	8	40
11	+3	2	8	+6	+5	1	7	5	/	+3	3	+3	1	+11	+1	+2	+10	+2	2	2	10	52,6
12	5	2	4	+6	+6	/	8	5	1	3	+3	4	3	+12	1	2	10	2	+5	2	5	26,3
13	4	+2	4	6	+6	/	10	+5	/	+5	3	2	3	+14	/	1	8	2	+3	2	6	35,3
14	4	+3	4	+5	+7	1	10	5	/	+4	+3	3	3	11	/	1	8	+3	4	2	6	33,3
15	3	3	3	+5	6	+1	9	6	/	5	3	3	2	11	+2	1	5	3	+5	2	4	21
16	+4	2	3	6	6	+1	10	6	1	+6	1	2	2	11	+3	1	5	+2	+5	+2	7	35
17	+5	/	3	5	5	+2	7	5	2	5	1	3	2	11	+3	1	+6	+2	5	1	5	26,3
18	4	/	3	+8	4	/	8	4	2	+5	+2	5	2	10	+3	1	1	+2	5	1	5	27,8
19	+4	/	+4	+8	+4	/	8	+4	2	4	1	3	2	+11	+4	1	3	+2	6	1	8	44,4
20	5	/	3	+6	3	/	8	+6	3	+6	1	+3	3	10	+4	/	7	2	8	1	5	29,4
21	+6	/	+2	+8	3	/	8	+3	3	6	+2	3	5	12	+5	+1	+6	+3	+9	1	10	55,6
22	+5	/	1	+9	+5	+2	8	+2	3	+6	+3	6	5	+14	+5	1	+4	2	+8	1	11	57,9
23	+5	/	1	10	+5	+2	8	+2	4	8	2	4	6	+14	+6	+2	4	+3	8	+2	9	47,4
24	5	/	3	12	+5	+3	10	2	5	8	3	4	6	+13	+8	2	3	+3	9	+3	6	31,6
25	+5	/	3	10	4	+4	+11	+2	3	7	+4	5	6	+14	+5	+3	3	+2	9	/	9	50
26	9	/	3	7	+5	3	11	+3	3	5	2	5	6	+13	+5	2	3	2	+10	/	5	27,8
27	8	/	3	+7	+6	3	10	+4	3	6	2	4	6	+14	4	2	+3	+3	10	/	6	33,3
<b>Skupaj +</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>182</b>	<b>35,7</b>
<b>%</b>	<b>33,3</b>	<b>43,7</b>	<b>7,4</b>	<b>59,3</b>	<b>63</b>	<b>42,9</b>	<b>3,7</b>	<b>51,8</b>	<b>4,5</b>	<b>44,4</b>	<b>37</b>	<b>7,4</b>	<b>3,7</b>	<b>55,6</b>	<b>66,7</b>	<b>34,6</b>	<b>44,4</b>	<b>55,6</b>	<b>29,6</b>	<b>25</b>	<b>35,7</b>	
<b>Št. telet</b>	<b>171</b>	<b>48</b>	<b>97</b>	<b>160</b>	<b>121</b>	<b>69</b>	<b>263</b>	<b>125</b>	<b>48</b>	<b>153</b>	<b>73</b>	<b>98</b>	<b>110</b>	<b>313</b>	<b>83</b>	<b>59</b>	<b>157</b>	<b>70</b>	<b>184</b>	<b>40</b>	<b>2442</b>	
<b>DNA izol.</b>	<b>44</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>92</b>	<b>83</b>	<b>26</b>	<b>11</b>	<b>58</b>	<b>2</b>	<b>67</b>	<b>34</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>185</b>	<b>62</b>	<b>26</b>	<b>81</b>	<b>41</b>	<b>52</b>	<b>12</b>	<b>918</b>	

Vzor – številka vzorčenja; Kme – številka kmetije; Št. telet – skupno število vzorčenih telet na kmetiji; DNA izol – skupno število telet iz pozitivnih skupinskih vzorcev telet; n – število telet v skupinskem vzorcu; + – pozitiven skupinski vzorec telet na qPCR 16S rRNA gen za bakterijo CD; / – ni vzorca (telet)

#### 4.4. Kvantifikacija *Clostridium difficile* v blatu telet

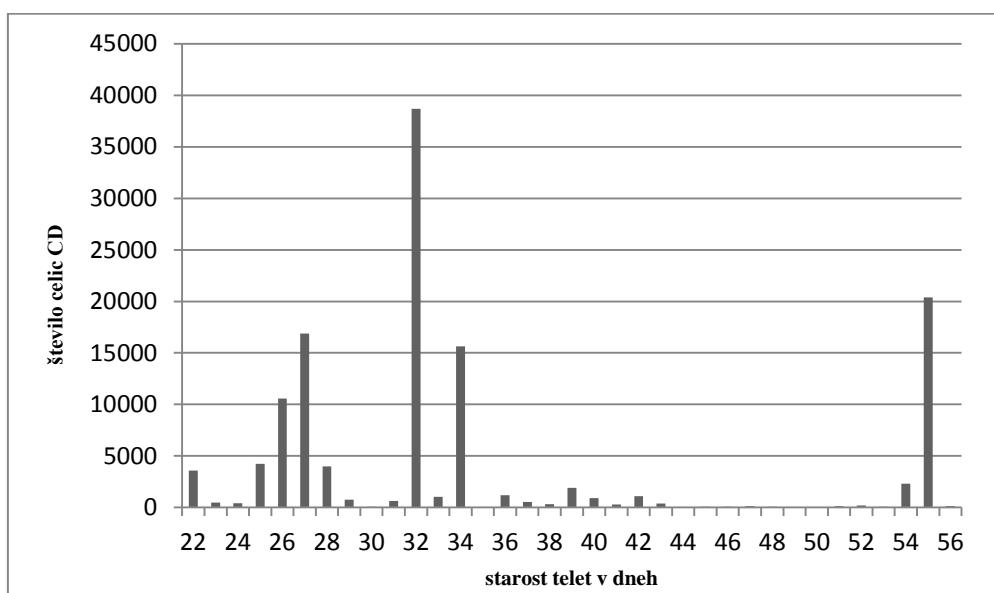
Pozitivne vzorce blata telet smo kvantificirali s pomočjo že omenjenega qPCR za 16S rDNA gen bakterije CD. Nekatera teleta ( $n = 48$ ) so bila med vzorčenji večkrat pozitivna (2–6-krat), ostala pa samo enkrat. V tabeli 15 (Priloga 11.2.) so navedeni rezultati kvantifikacije CD za teleta, ki so bila večkrat pozitivna, v tabeli 16 in 17 (Priloga 11.3.) pa posamezni pozitivni vzorci. Teleta smo razdelili v 3 starostne skupine na podlagi metabolizma in vloge predželodcev. Povprečje števila celic CD v prvi starostni skupini (0–21 dni) je bilo  $6,1 \times 10^5$  (Slika 14), medtem ko je bilo povprečje v drugi starostni skupini (22–56 dni)  $4,1 \times 10^3$  celic (Slika 15), v tretji (57–180 dni) pa  $2,8 \times 10^2$  celic (Slika 16). Skupno gledano so imela v povprečju največje število celic v blatu teleta stara 1 dan ( $n = 2,1 \times 10^6$  celic/g blata). Sledila so teleta stara 11 in 12 dni, pri katerih smo ugotovili povprečno izločanje skoraj 2 milijonov celic CD ( $n = 1,9 \times 10^6$  celic/g blata), ter pozitivna teleta stara 8 dni, pri katerih smo ugotovili povprečno izločanje  $1,8 \times 10^6$  celic/g blata. Novorojena teleta (starost 0 dni), pozitivna na CD s qPCR, so imela povprečno število celic v gramu blata  $4,7 \times 10^3$ .

Pri večkrat pozitivnih teletih ( $n = 48$ , Tabela 15, Priloga 11.2.) je število celic CD s starostjo večinoma padalo ( $n = 25$ ; 52,1 %), število je naraščalo samo pri šestih teletih (12,5 %). Pri dveh teletih (Tele 19 in 31; 4,2 %) smo znotraj šestih tednov opazili tako naraščanje in padanje števila celic v blatu. Kar nekaj telet je imelo 2 vala izločanja CD, in sicer prvi val v obdobju prve ali druge starostne skupine, ter drugi val v obdobju tretje starostne skupine ( $n = 11$ ; 22,9 %). Nekatera teleta so imela 2 vala izločanja znotraj prve in druge starostne skupine ( $n = 7$ ; 14,6 %), eno tele (Tele 20; 2,1 %) pa znotraj tretje starostne skupine. Pri večini je bilo število celic CD v drugem valu izločanja precej nižje kot v prvem valu. Pet telet (10,4 %) je imelo celo tri vale izločanja CD v vseh treh starostnih skupinah.



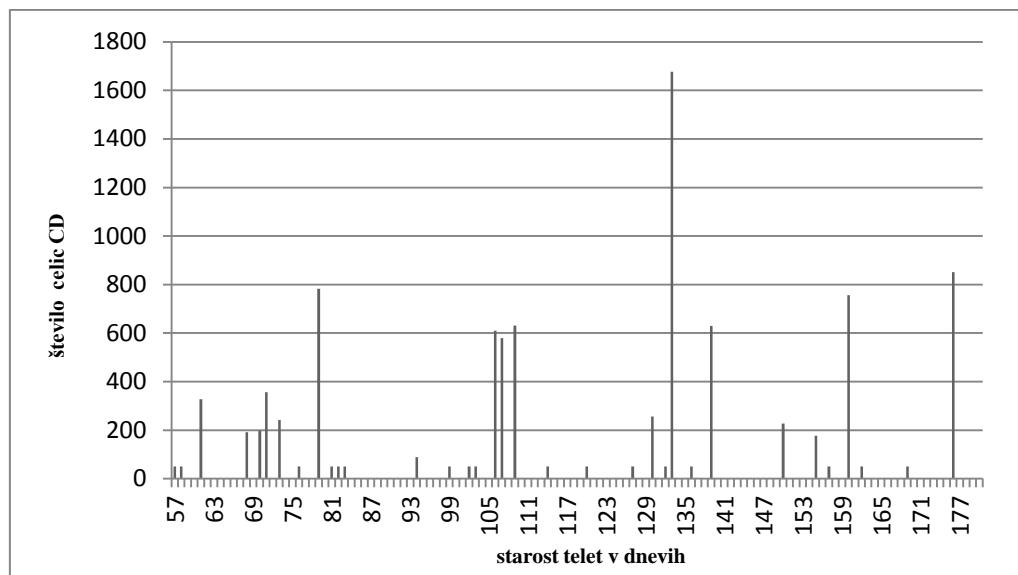
Slika 14: Povprečno število celič CD v blatu telet starosti od 0 do 21 dni

Figure 14: Average CD cell number in feces from calves aged from 0 to 21 days



Slika 15: Povprečno število celič CD v blatu telet starosti od 22 do 56 dni

Figure 15: Average CD cell number in feces from calves aged from 22 to 56 days



Slika 16: Povprečno število celič CD v blatu telet starosti od 57 do 180 dni

Figure 16: Average CD cell number in feces from calves aged from 57 to 180 days

#### 4.5. Statistično ovrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na višjo prevalenco CD na kmetijah

##### 4.5.1. Univariatna analiza

Statistična (univariatna) analiza podatkov je izpostavila potencialne dejavnike, ki vplivajo na višjo prevalenco bakterije CD pri govedu (Tabela 18 in 19). Dejavniki na kmetijah, ki so na splošno najbolj prispevali k povečanemu izločanju CD v blatu goveda, so sprememba prehrane (OR: 4,24; CI: 99 % CI: 1,92-9,35; P = 0,0003), nova teleta (OR: 3,71; 99 % CI: 1,79-7,7; P = 0,0004), bolezni (OR: 2,06; 99 % CI: 1,32-3,22; P = 0,0014), predvsem mastitis (OR: 2,12; 99 % CI: 1,23-3,63; P = 0,0065) in zdravljenje krav z drugimi zdravili (OR: 2,35; 99 % CI: 1,42-3,9; P = 0,0009). Na višjo prevalenco CD na kmetijah so vplivale tudi bolezni krav (OR: 1,97; 99 % CI: 1,21-3,21; P = 0,0066), zdravljenje krav z antibiotiki (OR: 1,9; 99 % CI: 1,12-3,19; P = 0,0152) in splošna uporaba neantibiotičnih zdravil (OR: 1,96; 99 % CI: 1,19-3,23; P = 0,008).

Sprememba prehrane (OR: 5,5; 99 % CI: 2,32-13,06; P = 0,0001) je edini dejavnik, ki vpliva na višjo prevalenco CD v blatu krav molznic, medtem ko pri teletih (starosti od 0 do 180 dni) vplivajo dejavniki, kot so prihod novih telet (OR: 4,6; 99 % CI: 2,29-9,23; P = 0,0000), prisotnost bolezni na kmetiji (OR: 2,4; 99 % CI: 1,52-3,79; P = 0,0002), bolezni krav (OR: 2,22; 99 % CI: 1,39-3,55; P = 0,0008), predvsem mastitis (OR: 2,26; CI: 99 % CI: 1,31-3,9; P=0,0035), bolezni telet (OR: 1,88; 99 % CI: 1,17-3,04; P = 0,0092), driska pri teletih (OR: 1,93; 99 % CI: 1,15-3,23; P = 0,0121), skupno antibiotično (OR: 1,92; 99 % CI: 1,16-3,18; P = 0,0112) in neantibiotično (OR: 2,29; CI: 99% CI: 1,43-3,65; P=0,0005) zdravljenje ter antibiotično (OR: 1,98; 99 % CI: 1,19-3,29; P = 0,0088) in neantibiotično (OR: 2,56; 99 % CI: 1,54-4,24; P = 0,0003) zdravljenje krav.

Za prvo skupino telet (starosti od 0 do 21 dni) smo dokazali statistično signifikantno višjo prevalenco CD v poletnem meteorološkem obdobju v primerjavi z zimskim (OR: 5,08; 99 % CI: 1,51-17,02; P = 0,0085) in ob spremembi prehrane (OR: 12,35; 99 % CI: 2,26-67,63; P = 0,0038). Lisasta pasma (OR: 20,02; 99 % CI: 2,52-159,09; P = 0,0046) je vplivala na višjo prevalenco v drugi skupini telet (starosti od 22 do 56 dni). Nekoliko manj je na drugo skupino vplivala prisotnost parazitov v blatu telet, ki niso *Buxtonella* sp. (OR: 3,52; 99 % CI: 1,24-; P = 0,0184). Teleta iz te skupine so edina, ki so imela pozitivno korelacijo z višjo prevalenco CD in boleznimi pri kravah (OR: 3,49; 99 % CI: 1,64-7,42; P = 0,0011), mastitisom (OR: 3,69; 99 % CI: 1,47-9,27; P = 0,0055), antibiotičnim (OR: 3,94; 99 % CI: 1,88-8,24; P =

0,0003) in neantibiotičnim zdravljenjem (OR: 2,87; 99 % CI: 1,42-5,79; P = 0,0033) ter antibiotičnim (OR: 3,11; 99 % CI: 1,47-6,57; P = 0,003) in neantibiotičnim (OR: 2,69; 99 % CI: 1,24-5,81; P = 0,0122) zdravljenjem krav. Statistično signifikantni dejavniki tveganja v tretji skupini telet (starosti od 57 do 180 dni) so sprememba prehrane (OR: 3,46; 99 % CI: 1,37-8,7; P = 0,0085), možnost paše (OR: 4,79; 99 % CI: 1,75-13,12; P = 0,0023) in višja povprečna mesečna proizvodnja mleka (OR: 1; 99 % CI: 0,99-1; P = 0,005).

#### 4.5.2. Multivariatna analiza

Z multivariatno statistično analizo smo ugotovili, da na prisotnost CD na kmetiji vplivajo dejavniki, kot so bolezni goveda (OR: 2; 95 % CI: 1,17-3,42; P = 0,0115), nova teleta (OR: 4,34; 95 % CI: 2,04-9,23; P = 0,0001) in sprememba prehrane (OR: 6,44; 95 % CI: 2,71-15,33; P = 0,0000). Da so krave na kmetijah CD pozitivne, vplivajo dejavniki, kot so uporaba antibiotikov (OR: 2,63; 95 % CI: 1,06-6,53; P = 0,04) in sprememba prehrane (OR: 8,36; 95 % CI: 3,29-21,28; P = 0,0000). Skupno na prisotnost CD pri teletih v večji meri vplivajo dejavniki, kot so bolezni (OR: 2,14; 95 % CI: 1,21-3,78; P = 0,0085), nova teleta (OR: 5,27; 95 % CI: 2,51-11,05; P = 0,0000) in sprememba prehrane (OR: 3,79; 95 % CI: 1,57-9,14; P = 0,003), medtem ko ima nekoliko manjši vpliv prisotnost mastitisa pri kravah (OR: 2,16; 95 % CI: 0,99-4,72; P = 0,0542). Večja je verjetnost, da so teleta prve starostne skupine (od 0 do 21 dni) pozitivna na CD v poletnem času (OR: 3,34; 95 % CI: 1,45-7,72; P = 0,0047) oziroma če pride na kmetiji do spremembe v prehrani (OR: 11,82; 95 % CI: 1,74-80,48; P = 0,0116) ali če so teleta lisaste pasme (OR: 5,19; 95 % CI: 2-13,47; P = 0,0007). Na teleta v drugi starostni skupini vplivata dva dejavnika tveganja, in sicer uporaba antibiotikov (OR: 3,53; 95 % CI: 1,35-9,22; P = 0,0099) in vnetje imena oziroma mastitis pri kravah (OR: 5,17; 95 % CI: 1,81-14,79; P = 0,0022). Pri teletih, starejših od 56 dni (od 57 do 180 dni), pa na prisotnost CD v njihovem blatu vpliva samo sprememba prehrane (OR: 4,24; 95 % CI: 1,51-11,93; P = 0,0062).

Tabela 18: Okoljski in drugi dejavniki, ki vplivajo na prisotnost CD na kmetijah

Table 18: Environmental and other risk factor associated with higher CD prevalence on farms

	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Clostridium difficile</i> pri teletih			
Dejavniki tveganja	Kmetije	Krave molznice	0–180 dni	0–21 dni	22–56 dni	57–180 dni
Podnebje:						
- koledarska sezona zima vs. pomlad zima vs. jesen				P=0,0491		P=0,0410
- meteorološka sezona zima vs. poletje				P=0,0085; P=0,0047*		
- povp. dnevna T - povp. dnevna vlaga		P=0,0301			P=0,0470	
Okolje:						
- zemlja - gnoj - voda iz napajalnika - krma - nove domače živali - prisotnost lastovk		P=0,0238				
Kmetija:						
- sprememba hleva - tip - paša						P=0,0023
- sprememba prehrane	P=0,0003; P=0,0000*	P=0,0001; P=0,0001*	P=0,0334; P=0,0030	P=0,0038; P=0,0116*		P=0,0085;
- pasma - črno-bela - lisasta			P=0,0402	P=0,0007*	P=0,0046	P=0,0062*
- nova teleta	P=0,0004; P=0,0001*		P=0,0000; P=0,0000*			P=0,0354
Mlečnost:						
- povp. mesečna mlečnost - povp. št.somatskih celic						P=0,0050
Zdravstveno stanje:						
- paratuberkuloza - listerioza - BVD - IBR	P=0,0209		P=0,0473			
Paraziti v blatu:						
- krave molznice <i>Buxtonella</i> sp. ostalo						
- teleta <i>Buxtonella</i> sp. ostalo						P=0,0184

Vrednosti P, višje od 0,05, niso prikazane, \*- P vrednosti multivariatne analize

Tabela 19: Prevalenca CD na kmetijah v povezavi z dejavniki bolezni in zdravljenjem

Table 19: Diseases and treatment as risk factors associated with farm with higher CD prevalence

	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Clostridium difficile</i> pri teletih			
Dejavniki tveganja	Kmetije	Krave molznice	0–180 dni	0–21 dni	22–56 dni	57–180 dni
Bolezni na splošno: - driska - ostale GI/metabolične - respiratorne	P=0,0014; P=0,0115*		P=0,0002; P=0,0085* P=0,0412		P=0,0277	
Bolezni krav: - driska - ostale GI/metabolične - respiratorne - mastitis	P=0,0066  P=0,0065		P=0,0008  P=0,0035; P=0,0542*		P=0,0011  P=0,0055; P=0,0022*	
Bolezni telet: - driska - ostale GI/metabolične - respiratorne	P=0,0157		P=0,0092 P=0,0121			
Antibiotično zdravljenje: - krav - telet	P=0,0273  P=0,0152	P=0,0375*	P=0,0112 P=0,0088		P=0,0003; P=0,0099* P=0,0030	
Neantibiotično zdravljenje: - krav - telet	P=0,0080  P=0,0009		P=0,0005 P=0,0003		P=0,0033 P=0,0122	

Vrednosti P, više od 0,05, niso prikazane, \*- P vrednosti multivariatne analize

#### 4.6. Molekularna karakterizacija sevov CD z ribotipizacijo in toksinotipizacijo

##### 4.6.1. Sevi bakterije *Clostridium difficile* iz blata goveda

Skupno smo iz blata goveda izolirali 103 seve CD. Edini sev iz blata krav molznic je bil izoliran iz skupinskega vzorca krav kmetije 19. Ribotipizacija in toksinotipizacija sta sev CD uvrstili v ribotip 071, ki nima v svojem genomu zapisa za toksine (toksin negativen ali tox-). Še dva seva CD sta imela enake značilnosti in oba sta pripadala teletoma z iste kmetije kot kravji izolat (kmetija 19). Sicer je bil najpogosteje izoliran ribotip pri teletih ribotip 033/toksinotip XIa (77/102, 75,5 %). Izoliran je bil na 12 kmetijah (12/20, 60 %) in na šestih je bil edini izoliran ribotip (6/20, 30 %). Na dveh kmetijah (kmetija 10 in 14) smo poleg ribotipa 033 izolirali še ribotip 012 toksinotipa 0 (4/102, 3,9 %), ki je bil drugi najpogosteje izoliran ribotip v blatu telet. Iz vzorca enega teleta (kmetija 18) smo izolirali dva seva CD, in sicer ribotip 077/toksinotip 0 in ribotip SLO 029/toksinotip 0. Kmetiji 13 in 20 sta edini kmetiji, pri katerih iz blata goveda nismo izolirali nobenega seva CD. Največje število sevov CD smo izolirali iz blata telet na kmetiji 15 (17/102, 16,7 %). Največjo pestrost izoliranih sevov CD je bilo na kmetijah 8, 10, 14 in 18, pri katerih smo dokazali prisotnost vsaj treh različnih ribotipov. Skupno smo tako izolirali 16 različnih ribotipov in 4 različne toksinotipe bakterije CD. Od tega je bil ribotip SLO 195/toksinotip 0 izoliran prvič. Rezultati ribotipizacije in toksinotipizacije sevov CD, izoliranih iz vzorcev blata telet, so predstavljeni v tabeli 20.

Tabela 20: Pregled rezultatov individualnih vzorcev telet po kmetijah in molekularna karakterizacija sevov CD  
 Table 20: Results for individual fecal samples from calves and molecular characterization of isolated CD strains

Vzorci	Kmetija	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Skupaj	%
	Št. vz.telet	171	48	97	160	121	69	263	125	48	153	73	98	110	313	83	59	157	70	184	40	2442	100
Preiskave	DNA izol.	44	24	6	92	83	26	11	58	2	67	34	6	6	185	62	26	81	41	52	12	918	37,6
	qPCR +	11	8	1	17	32	15	2	15	2	10	9	1	1	30	29	12	24	14	6	4	243	10
	Kultura +	2	5	1	8	7	6	2	4	1	5	2	1	0	11	17	7	11	10(9)	2	0	102(101)	4,2(4,1)
Ribotip	Toksinotip																						
001/072	0	1																				1	1
002	0																					3	2,9
003	0																					1	1
005	0																					1	1
012	0																					4	3,9
014/020	0																					2	2
018	0																					1	1
023	IV																					1	1
033	XIa	1	5		8	7	5				1		1		9	16	7	11	6			77	75,5
071	Tox-																					2	2
077	0																					3	2,9
SLO 029	0																					1	1
SLO 036	0																					1	1
SLO 084	Tox-																					2	2
SLO 116	Tox-																					1	1
SLO 195	0																					1	1

Št. vz.telet – število vzorcev telet; DNA izol – skupno število telet iz pozitivnih skupinskih vzorcev telet; qPCR+ – individualni vzorci telet pozitivni s qPCR za CD; Kultura+ – število sevov CD, izoliranih z gojitveno preiskavo; (n) – število individualnih vzorcev telet pozitivnih z gojitveno preiskavo tam, kjer je bilo izoliranih več sevov na vzorec

#### 4.6.2. Prevalenca in karakterizacija sevov bakterije *Clostridium difficile* iz okolja kmetij

Iz okoljskih vzorcev ( $n = 475$ ) 20 kmetij smo izolirali CD iz 61 vzorcev (12,8 %). Vsaj enkrat pozitivne so bile vse kmetije z izjemo kmetij 7 in 20 (18/20, 90%), pri katerih nismo izolirali nobenega seva CD (Tabela 21). Iz šestih vzorcev smo izolirali CD na kmetiji 15, medtem ko so bili 5-krat pozitivni okoljski vzorci kmetij 6, 11, 14 in 16. Po štiri CD pozitivne vzorce pa so imele kmetije 3, 5, 17 in 18.

Na podlagi letnih časov (Tabela 22) je bilo največ sevov CD izoliranih v pomladnjem (16/113, 14,2 %) in jesenskem (18/106, 17 %) obdobju. V poletnem obdobju smo iz 144 vzorcev izolirali 16 sevov CD (11,1 %), v zimskem obdobju pa iz 11 vzorcev (11/112, 9,8 %) 12 izolatov. V vzorcih zemlje ( $n = 80$ ) smo CD izolirali v 35 % vzorcev (28/80; med letnimi časi je prevalenca variirala med 25%–40%), medtem ko smo iz vzorcev gnoja ( $n = 80$ ) CD izolirali v 28,7 % primerov (23/80; med letnimi časi je prevalenca variirala med 20–35%). Prevalenca CD je v vzorcih krme ( $n = 80$ ) in vode iz napajalnika ( $n = 80$ ) predstavljala 3,75 % (3/80) za oboje, s tem da so bili vzorci krme pozitivni v pomladnjem in jesenskem obdobju, medtem ko so bili vzorci vode pozitivni v vseh obdobjih, razen v pomladnjem.

Od 115 vzorčenih domačih živali na kmetijah smo CD izolirali samo iz dveh. Oba pozitivna vzorca sta bila izolirana iz perutnine, in sicer iz odraselga petelina in petelina starega dva tedna. Odrasel petelin (2 izolirana seva CD) s kmetije 16 je bil zaradi ektoparazitov izredno izčrpan, medtem ko je bil dva tedna star petelin s kmetije 15 klinično popolnoma zdrav. Prevalenca CD pri ostalih domačih živalih na kmetijah je bila tako 1,7-odstotna (2/115). V poletnem obdobju smo dodatno vzorčili še hlevske muhe (*Stomoxys calcitrans*) in blato lastovk (*Hirundo rustica*) na hlevski opremi. Iz vzorcev lastovk nismo izolirali CD, pri vzorcih hlevskih muh pa sta bila dva vzorca pozitivna (kmetiji 5 in 8).

Pestrost ribotipov in toksinotipov je bila v okoljskih vzorcih velika. *Clostridium difficile* iz 61 pozitivnih vzorcev (62 sevov CD) smo razvrstili v 19 različnih ribotipov in 6 različnih toksinotipov. Toksin negativni ribotipi so bili le SLO 057 (vzorec zemlje, kmetija 14), SLO 116 (vzorec krme, kmetija 8) in na novo izoliran ribotip SLO 196 (vzorec mladega petelina, kmetija 15). Toksinotip 0 so imeli ribotipi 001/072, 002, 003, 012, 014/020, 018, 077, 081, SLO 025, SLO 036, SLO 053 in SLO 063. Toksinotip IV je imel ribotip 023, ki je bil izoliran iz dveh vzorcev zemlje (kmetija 3) in enega vzorca gnoja (kmetija 12). Eden od izoliranih

sevov CD (ribotip 045) odraslega petelina je imel toksinotip V, medtem ko sta ribotipa 033 in SLO 060 imela toksinotip XIa. Pri sevu CD ribotipa 033 smo odkrili novo različico toksinotipa XIa, in sicer XIc, ki je bil določen pri sevih CD iz vzorca muh s kmetije 5 ter iz vzorcev gnoja in zemlje s kmetij 5 in 6 iz istega naselja. Ribotip 033 je bil identificiran pri 22,6 % (14/62) vzorcev; v vzorcu muh (kmetija 5) ter iz vzorcev zemlje (kmetija 2, 5, 13, 14 in 15) in gnoja (kmetija 2, 4, 5 in 6). Najpogosteje najden CD ribotip SLO 060 smo izolirali v 27,4 % (17/62) iz vzorcev zemlje (kmetija 11, 14, 15, 17 in 18), gnoja (kmetija 14, 16, 17 in 18), vode iz napajalnika (kmetija 15) in iz vzorca odraslega petelina (kmetija 16). Dva seva smo tekom postopka izolacije izgubili (vzorec zemlje, kmetija 2, in vzorec muh, kmetija 8).

Tabela 21: Razporeditev okoljskih sevov CD po kmetijah in letnih časih

Table 21: Distribution of environmental CD strains by farms and seasons

Kmetija	Letni čas - vzorec (ribotip, toksinotip)			
	Zima	Pomlad	Poletje	Jesen
<b>Kmetija 1</b>		Z (001/072, 0 ) G (001/072, 0 )		
<b>Kmetija 2</b>	Z (014/020, 0 )			Z (033, XIa) G (033, XIa)
<b>Kmetija 3</b>		Z (023, IV)	Z (023, IV) G (014/020, 0 )	Z
<b>Kmetija 4</b>		G (033, XIa)	G (033, XIa)	
<b>Kmetija 5</b>		Z (033, XIc)	G (033, XIa) M (033, XIc)	Z (033, XIc)
<b>Kmetija 6</b>		Z (012, 0 ) G (033, XIc)	G (033, XIc)	G (033, XIc) K (003, 0 )
<b>Kmetija 7</b>				
<b>Kmetija 8</b>		K (SLO 116, tox-)	M	
<b>Kmetija 9</b>	Z (018, 0 )		G (014/020, 0 )	Z (SLO 025, 0 )
<b>Kmetija 10</b>				K (001/072, 0 )
<b>Kmetija 11</b>	Z (SLO 060,XIa) G (SLO 036,0 )		Z (023, IV) V (SLO 036, 0 )	Z (023, IV)
<b>Kmetija 12</b>	G (023, IV)	Z (014/020, 0 )		
<b>Kmetija 13</b>	Z (SLO 063,0 )	Z (033, XIa)	Z (081, 0 )	
<b>Kmetija 14</b>	G (SLO 060, XIa)	Z (SLO 057, tox-) G (002, 0 )	Z (033, XIa)	G (SLO 060, XIa)
<b>Kmetija 15</b>	Z (033,XIa)	Z (SLO 060, XIa)	Z (SLO 060, XIa) P (SLO 196, tox-)	Z (SLO 060, XIa) V (SLO 060, XIa)
<b>Kmetija 16</b>	G (SLO 060,XIa) V (014/020,0 ) P(045,V;SLO060,XIa)	G (014/020, 0 )		G (SLO 060, XIa)
<b>Kmetija 17</b>		G (SLO 060, XIa)	Z (SLO 060, XIa)	Z (SLO 060, XIa) G (SLO 060, XIa)
<b>Kmetija 18</b>		G (077, 0 )	Z (SLO 060, XIa)	Z (SLO 060, XIa) G (SLO 060, XIa)
<b>Kmetija 19</b>				G (SLO 053, 0 )
<b>Kmetija 20</b>				

Z – vzorec zemlje, G – vzorec gnoja, K – vzorec krme, V – vzorec vode, P – bris kloake petelina, M – vzorec hlevskih muh (*Stomoxys calcitrans*)

Tabela 22: Prevalenca in molekularna karakterizacija sevov CD, izoliranih iz okolja kmetij

Table 22: Prevalence and molecular characterization of CD strains from the farms environment

Okoljski vzorci	CD					Molekularna karakterizacija sevov CD	
	Zima	Pomlad	Poletje	Jesen	Celo leto	PCR-ribotipi	Toksinotipi
Gnoj	4/20 (20%)	7/20 (35%)	5/20 (25%)	7/20 (35%)	23/80 (28.7%)	001/072 002 014/020 023 033 077 SLO 036 SLO 053 SLO 060	0 0 0 IV XIa, XIc (nov) 0 0 0 XIa
Zemlja	5/20 (25%)	8/20 (40%)	7/20 (35%)	8/20 (40%)	28/80 (35%)	001/072 012 014/020 018 023 033 081 SLO 025 SLO 057 SLO 060 SLO 063	0 0 0 0 IV XIa, XIc (nov) 0 0 tox- XIa 0
Krma	0/20 (0%)	1/20 (5%)	0/20 (0%)	2/20 (10%)	3/80 (3.75%)	001/072 003 SLO 116	0 0 tox-
Voda iz napajjalnika	1/20 (5%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)	1/20 (5%)	3/80 (3.75%)	014/020 SLO 036 SLO 060	0 0 XIa
Ostale domače živali	1 (2 seva)/32 (3.1%) – odrasel petelin	0/33 (0%)	1/24 (4.2%) – 2 tedna star petelin	0/26 (0%)	2/115 (1.7%)	045 SLO 060 SLO 196 (nov)	V XIa tox-
Kmečka lastovka ( <i>Hirundo rustica</i> )	/	/	0/20 (0%)	/	0/20 (0%)		
Hlevska muha ( <i>Stomoxys calcitrans</i> )	/	/	2/20 (10%)	/	2/20 (10%)	033	XIc (nov)
Skupaj	11(12)/112 (9.8%)	16/113 (14.2%)	16/144 (11.1%)	18/106 (17%)	61/475 (12.8%)		

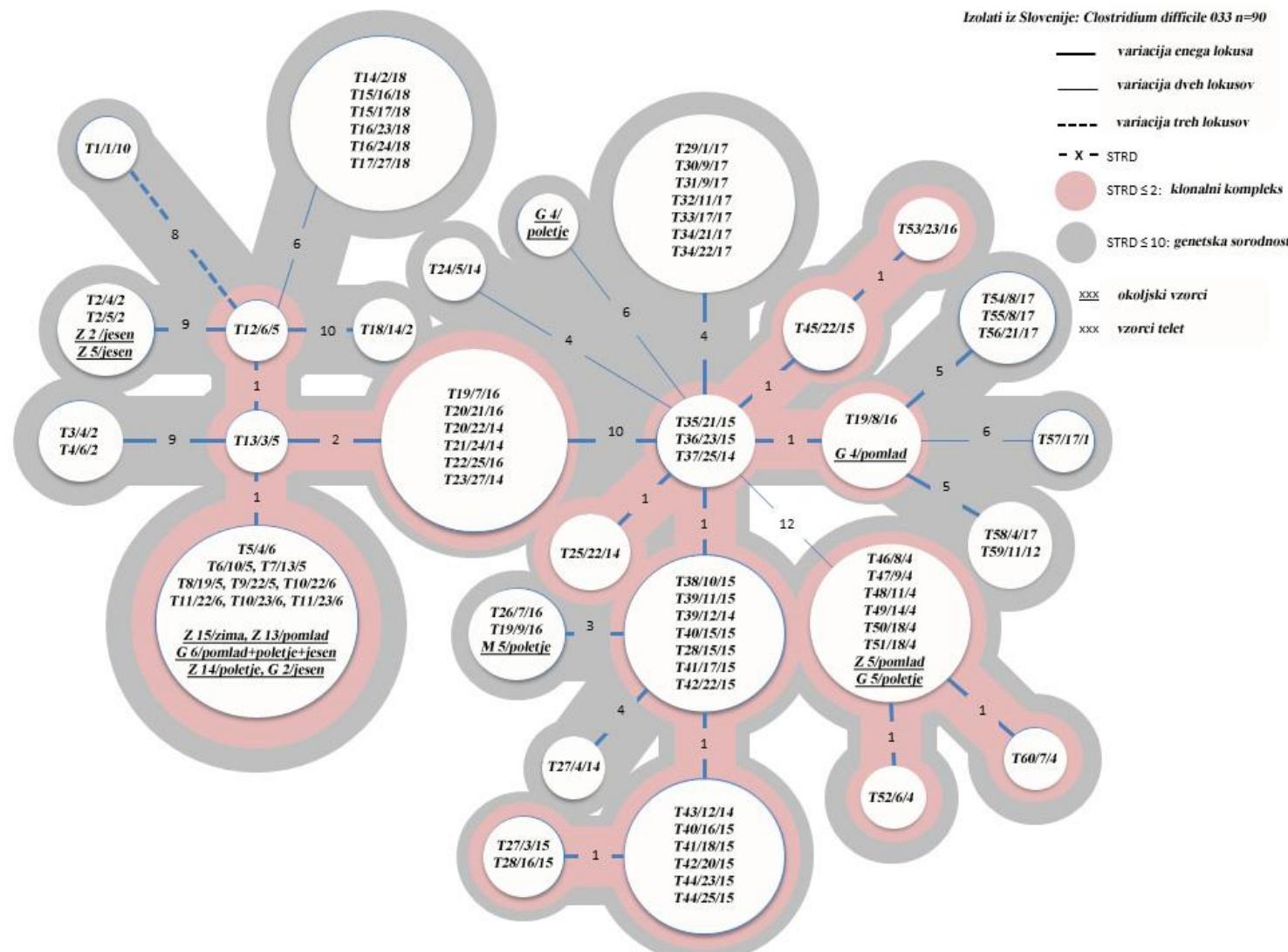
#### 4.7. Primerjava okoljskih in govejih izolatov *Clostridium difficile* z metodo MLVA

Poleg molekularne tipizacije na osnovi ribotipizacije in toksinotipizacije smo seve CD ribotipa 033 tipizirali še z metodo MLVA. Po začetnem vpeljevanju metode, ko smo testirali vse goveje ribotipe in seve CD, smo ugotovili, da metoda ne daje zadovoljivih rezultatov. Sevi CD ribotipa 033 so med izoliranimi sevi odločno prevladovali, zato smo samo te okoljske in goveje seve poslali na Nizozemsko. Slika 17 prikazuje sorodstvene povezave med telečimi in okoljskimi izolati v obliki sorodstvenega drevesa ali MST (ang. minimal spanning tree). V tabeli 23 in 24 v prilogi 11.4. so rezultati MLVA CD ribotipa 033 iz laboratorija na Nizozemskem. Rezultati MLVA ostalih govejih ribotipov CD so v tabeli 25 (Priloga 11.4.).

##### 4.7.1. Interpretacija sorodstvenega drevesa izolatov bakterije CD ribotipa 033

Na sliki 17 je razvidna izredna genetska sorodnost znotraj večine izolatov CD ribotipa 033. Večinoma so v istem klonalnem kompleksu izolati z iste kmetije (kmetije 4, 17 in 18) oziroma iz istega kraja (kmetiji 5 in 6, kmetije 14, 15 in 16). Teleta (T), ki so bila med različnimi vzorčenji pozitivna na CD ribotip 033, so imela izolate z enakim klonom (T2, T10, T11, T15, T16, T20, T34, T39, T44), v enakem klonalnem kompleksu s  $\text{STRD} \leq 2$  (T40, T41, T42), v genetskem sorodu s  $\text{STRD} \leq 10$  (T27 in T28), ali pa so bili genetsko nesorodni s  $\text{STRD} > 10$  (T19). T20 s kmetije 16 in T39 s kmetije 15 sta bila prodana kmetiji 14. Oba teleta sta bila ob vzorčenju na kmetiji 14 ponovno pozitivna in z enakim klonom bakterije kot pri predhodnem vzorčenju.

Okoljski vzorci (14), ki so bili pozitivni na CD ribotip 033, so bili večinoma iz vzorcev zemlje in gnoja. Iz vzorca zemlje kmetije 2 in 5 v jesenskem vzorčenju okolja smo izolirali enak klon CD kot od teleta T2 kmetije 2. Iz vzorcev zemlje kmetije 13 (pomlad), 14 (poletje) in 15 (zima) ter iz vzorcev gnoja kmetije 2 (jesen) in kmetije 6 (pomlad, poletje, jesen) smo izolirali enak klon CD kot pri teletih od T5 do T11 kmetije 5 in 6. Iz vzorca zemlje (pomlad) in gnoja (poletje) kmetije 5 smo dobili izolat, ki je klonalno enak izolatom telet od T46 do T51 kmetije 4. Iz vzorca gnoja (pomlad) kmetije 4 smo dobili izolat, ki je enak enemu od izolatov teleta T19. Edini izolat CD iz vzorca muh (poletje) kmetije 5 je enak izolatu teleta T26 in enemu od izolatov teleta T19 kmetije 16. Izolat CD iz vzorca gnoja (poletje) kmetije 4 je v genetskem sorodu z večino telet s kmetije 14 in 15, s teletom T19 kmetije 16 ter z vzorcem gnoja (pomlad) kmetije 4.



Slika 17: Sorodstveno drevo izolatov bakterije CD ribotipa 033 iz blata telet in okolja kmetij

Legenda: Tn/n/n – individualna št. vzorca telet/št. vzorčenja/kmetija; Z n – vzorec zemlje na kmetiji n; G n – vzorec gnoja na kmetiji n; M n – vzorec muh na kmetiji n

Figure 17: Minimal spanning tree for CD ribotype 033 isolated from calves feces and environmental samples

Legend: Tn/n/n – individual number/sampling time/farm; Z n – soil sample on farm n; G n – manure sample from farm n; M n – flies from farm n

#### 4.8. Validacija plošč Micronaut-S CD MIC

Z ugotavljanjem zanesljivosti metode smo ugotovili, da je metoda popolnoma zanesljiva za vse antibiotike, ki so prisotni na plošči, z izjemo eritromicina, tigeciklina in linezolida (Tabela 26, Priloga 11.5.). Rezultati vrednosti za MIC eritromicina niso bili v območju, ki ga navaja standard CLSI (CLSI, M100-S23, 2013) za referenčna seva bakterij *S. aureus* in *E. faecalis*, medtem ko so bile vrednosti MIC za tigeciklin izven dovoljenih mej za referenčna seva bakterij *E. faecalis* in *B. thetaiotaomicron*. Vrednost MIC za linezolid je bila izven dovoljenih mej le za eno od paralelk referenčnega seva *B. thetaiotaomicron*. Dovoljene meje za referenčni sev bakterije CD so v standardu CLSI opisane samo za tigeciklin, in ta je bil v našem primeru znotraj dovoljenih mej. Za referenčni sev *C. perfringens* ni opisanega standarda CLSI za nobeno protimikrobnno zdravilo.

Primerjava rezultatov E-testov in Micronaut-S CD plošče MIC je izpostavila problem različnih proizvajalcev E-testov. E-testi proizvajalca Liofilchem®MTS so se izkazali za neuporabne za bakterijo CD. Rezultati so predstavljeni v tabeli 27, vendar jih za ovrednotenje primerljivosti s ploščami Micronaut-S CD MIC nismo uporabili.

Ponovljivost plošč Micronaut-S CD MIC je za večino antibiotikov zelo dobra (Tabela 27, priloga 11.5.). Nekoliko večji razpon je bil pri amoksicilinu, klindamicinu, oksacilinu in trimetoprim/sulfametoksazolu. Pri teh antibiotikih je bila ponovljivost pri nekaterih sevih med tremi zaporednimi koncentracijami antibiotika, vendar je bila večina ponovitev v sredinski koncentraciji.

Rezultati obnovljivosti so pokazali, da je za dobre in obnovljive rezultate pomembna uporaba svežih bujonov Wilkins Chalgren, vzpostavitev vmesnikov, ki plošče med seboj nekoliko razmaknejo, in uporaba perforiranih folij (Sensititre® TREK, Anglija). Namesto perforiranih folij se za isti namen lahko uporabi druge plošče MIC.

Rezultati so bili izredno slabi (tudi kontrola rasti negativna) tam, kjer smo uporabili perforirane folije (Micronaut-Merlin, Nemčija), ali tam, kjer nismo uporabili vmesnikov med ploščami. Boljše in obnovljive rezultate smo dobili, ko smo uporabili sveže (1–7 dni stare) bujone Wilkins Chalgren.

#### 4.9. Rezultati testiranja občutljivosti na antibiotike

Rezultati testiranja sevov CD s ploščami Micronaut-S CD so opisani v tabelah 28–34. Razpon za amoksicilin MIC je od  $\leq 0,125$  do  $> 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ , čeprav sta MIC 50 in MIC 90  $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Okoljski sevi CD imajo MIC 50  $0,25$  in MIC 90  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , en okoljski sev CD pa ima MIC  $>16 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Izolirani sevi CD imajo razpon MIC za ceftriakson od  $\leq 8 \mu\text{g}/\text{ml}$  do  $> 256 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 in 90 za vse seve je  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ , za goveje seve CD pa je MIC 90  $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Dva goveja seva (1,26 %) sta imela MIC  $> 64 \mu\text{g}/\text{ml}$  in en sev (0,63 %) MIC  $> 256 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Razpon MIC za daptomicin je  $\leq 1$  do  $> 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 za vse seve CD je  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ , medtem ko je MIC 90  $> 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Sevi CD imajo MIC za eritromicin med  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $>512 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 za vse seve je  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MIC 90 je  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Trije goveji sevi CD imajo MIC za eritromicin nad  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ , medtem ko imata 2 okoljska in 1 goveji sev CD MIC  $> 256 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 in MIC 90 za imipenem je  $\leq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Razpon je do  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  za okoljske seve in do  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  za goveje seve CD. Antibiotik klindamicin ima za seve CD razpon MIC od  $\leq 1$  do  $512 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 za okoljske seve je  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ , medtem ko je za goveje seve  $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 90 je za vse seve  $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Vsi izolati CD imajo MIC 50 in MIC 90 za levofloksacin  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , z razponom med  $\leq 2$  do  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Razpon MIC za linezolid je za vse seve od  $\leq 1$  do  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 je  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MIC 90 je  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Razpon MIC za oksacilin je med  $\leq 0,25$  in  $> 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 je  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MIC 90 je  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  za vse izolirane seve CD. Razpon MIC za trimetoprim/sulfametoksazol je od 1/19 do  $> 16/304 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 za goveje seve je  $4/76 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $8/152 \mu\text{g}/\text{ml}$  za okoljske seve. MIC 90 za goveje seve je  $8/152 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $16/304 \mu\text{g}/\text{ml}$  za okoljske seve. Za vse seve je razpon MIC za antibiotik vankomicin od  $\leq 0,25$  do  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . MIC 50 in MIC 90 je za vse seve  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Fusidna kislina, metronidazol, moksifloksacin, rifampicin, tetraciklin in tigeciklin imajo vrednosti MIC 50 in 90 nižje od najnižje koncentracije na plošči Micronaut-S CD. Trije goveji sevi CD imajo MIC enak ali večji od  $64 \mu\text{g}/\text{ml}$  za antibiotik rifampicin. En okoljski sev CD ima MIC za tetraciklin  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  in štirje sevi CD, izolirani iz govejega blata, imajo MIC za tetraciklin  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

Tabela 28: Občutljivost na antibiotike govejih in okoljskih sevov CD, testiranih na ploščah Micronaut-S CD MIC

Table 28: Antibiotic susceptibility for cattle and environmental CD strains tested with Micronaut-S CD plates MIC

ANTIBIOTIK	GOVEDO ( $\mu\text{g/ml}$ )		OKOLJE ( $\mu\text{g/ml}$ )		VSI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90
<b>AMOKSICILIN</b> <b>(razpon)</b>	=0,25 (≤0,125 - =0,5)	=0,25	=0,25 (≤0,125 - >16)	=0,5	=0,25 (≤0,125 - >16)	=0,25
<b>CEFTRIAKSON</b> <b>(razpon)</b>	=16 (≤8 - >256)	=32	=16 (≤8 - =32)	=16	=16 (≤8 - >256)	=16
<b>KLINDAMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=32 (≤1 - =512)	=32	=16 (≤1 - =512)	=32	=16 (≤1 - =512)	=32
<b>DAPTOMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=8 (≤1 - >8)	>8	=8 (≤1 - >8)	>8	=8 (≤1 - >8)	>8
<b>ERITROMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=4 (≤1 - >512)	=8	=4 (≤1 - >512)	=8	=4 (≤1 - >512)	=8
<b>FUSIDNA KISLINA</b> <b>(razpon)</b>	≤2 (≤2)	≤2	≤2 (≤2)	≤2	≤2 (≤2)	≤2
<b>IMIPENEM</b> <b>(razpon)</b>	≤4 (≤4 - =16)	≤4	≤4 (≤4 - =8)	≤4	≤4 (≤4 - =16)	≤4
<b>LEVOFLOKSACIN</b> <b>(razpon)</b>	=4 (≤2 - =16)	=4	=4 (≤2 - =16)	=4	=4 (≤2 - =16)	=4
<b>LINEZOLID</b> <b>(razpon)</b>	≤1 (≤1 - =2)	≤1	≤1 (≤1 - =2)	≤1	≤1 (≤1 - =2)	≤2
<b>METRONIDAZOL</b> <b>(razpon)</b>	≤0,25 (≤0,25 - =0,5)	≤0,25	≤0,25 (≤0,25 - =1)	≤0,25	≤0,25 (≤0,25 - =1)	≤0,25
<b>MOKSIFLOKSACIN</b> <b>(razpon)</b>	≤2 (≤2 - =4)	≤2	≤2 (≤2 - =4)	≤2	≤2 (≤2 - =4)	≤2
<b>OKSACILIN</b> <b>(razpon)</b>	=2 (≤0,25 - =8)	=4	=2 (≤0,25 - >8)	=4	=2 (≤0,25 - >8)	=4
<b>RIFAMPICIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,00195 (≤0,00195 - >64)	≤0,00195	≤0,00195 (≤0,00195 - =0,25)	≤0,00195	≤0,00195 (≤0,00195 - >64)	≤0,00195
<b>TETRACIKLIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,125 (≤0,125 - =16)	≤0,125	≤0,125 (≤0,125 - =8)	≤0,125	≤0,125 (≤0,125 - =16)	≤0,125
<b>TIGECIKLIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,0625 (≤0,0625)	≤0,0625	≤0,0625 (≤0,0625)	≤0,0625	≤0,0625 (≤0,0625)	≤0,0625
<b>TRIMETOPRIM-SULFAMETOKSAZOL</b> <b>(razpon)</b>	=4/76 (=2/38 - >16/304)	=8/152	=8/152 (=1/19 - >16/304)	=16/304	=4/76 (=1/19 - >16/304)	=8/152
<b>VANKOMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=0,5 (≤0,25 - =1)	=0,5	=0,5 (≤0,25 - =1)	=0,5	=0,5 (≤0,25 - =1)	=0,5

Tabela 29: Razporeditev vseh izoliranih sevov CD glede občutljivosti za posamezni antibiotik  
 Table 29: Distribution of all isolated CD strain based on individual antibiotic susceptibility

ANTIBIOTIK	PLOŠČA MICRONAUT-S CD MIC - koncentracija antibiotikov ( $\mu\text{g/ml}$ )																
	$\leq 0,00195$	0,0039	0,0078	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Amoksicilin					22,65	67,92	8,8	0	0	0	0	0	0	0	0,63		
Cefriksolon										24,52	66,04	7,55	1,26	0	0	0,63	
Daptomicin							1,88	11,32	18,24	42,15	26,41						
Eritromicin							1,88	5,04	78,63	10,69	1,88				0	0	1,88
Fusidna kislina								100	0								
Imipenem									94,97	4,4	0,63	0					
Klindamicin							5,66	5,66	8,8	16,98	16,35	43,41	0,63		0	2,51	0
Levofloksacin								18,86	78,62	1,26	1,26	0					
Linezolid							91,82	8,18	0	0							
Metronidazol					96,24	1,88	1,88	0	0								
Moksifloksacin								98,74	1,26	0	0	0	0	0			
Oksacilin					27,67	1,88	1,26	30,2	35,85	2,51	0,63						
Rifampicin	94,34	0	0,63			3,14	0	0				0	0,63	1,26			
Tetraciklin				96,86	0	0	0	0	0	0,63	2,51						
Tigeciklin				100	0	0	0										
Trimetoprim/sulfametoksazol							0	0,63	1,88	49,69	40,26	3,77	3,77				
Vankomicin						14,47	81,76	3,77	0	0							

Rdeče številke prikazujejo seve (%) odporne za vse testirane koncentracije antibiotikov; Siva polja – netestirane koncentracije antibiotikov; Številke v belih, rdečih in modrih poljih prikazujejo število sevov (%), občutljivih na določeno koncentracijo antibiotika. Modra polja so pod epidemiološkim CUT OFF-om (ECOFF), medtem ko so rdeča polja nad ECOFF, navpično odenbeljena črta pri metronidazolu in vankomicinu predstavlja določeno mejo po EUCAST-u med odpornimi in občutljivimi sevi CD. Za kombinacijo Trimetoprim/sulfametoksazol je navedena le koncentracija antibiotika Trimetoprim.

#### 4.9.1. Minimalne inhibitorne koncentracije za seve CD ribotipa 033 in SLO 060

Izoliranim sevom CD ribotipa 033 in SLO 060 smo določili razpon MIC, MIC 50 in MIC 90 (Tabela 30). Ostalim sevom smo zaradi manjšega števila izolatov določili samo razpon MIC (Tabela 31-33, Priloga 11.6.). Ribotipa 033 in SLO 060 imata enake vrednosti MIC 50 in 90 za amoksicilin ( $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), cefriakson ( $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), daptomicin (MIC 50  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ , MIC 90 nad  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), eritromicin ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), fusidno kislino ( $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), imipenem ( $\leq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), klindamicin ( $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), linezolid (MIC 50  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , MIC 90  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), moksifloksacin ( $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), oksacilin ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), tetraciklin ( $\leq 0,125 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in tigeciklin ( $\leq 0,0625 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). MIC 50 in 90 za CD ribotipa 033 je  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , medtem ko je MIC 50 za ribotip SLO 060  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MIC 90  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Za izolate CD ribotipa SLO 060 je MIC 90 za metronidazol  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , za rifampicin  $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$  in vankomicin  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Za oba ribotipa je MIC 50 za trimetoprim/sulfametoksazolin  $8/152 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Enak je MIC 90 za ribotip 033. MIC 90 za ribotip SLO 060 je nad  $16/304 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

Tabela 30: Vrednosti MIC 50 in MIC 90 za dva najpogosteje izolirana seva CD  
 Table 30: MIC 50 and MIC 90 values for the two most frequently isolated strains of CD

ANTIBIOTIK	033 (µg/ml)		SLO 060 (µg/ml)	
	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90
<b>AMOKSICILIN</b> <b>(razpon)</b>	=0,25 (≤0,125 - >16)	=0,25	=0,25 (≤0,125 - =0,5)	=0,5
<b>CEFTRIAKSON</b> <b>(razpon)</b>	=16 (≤8 - =32)	=16	=16 (≤8 - =16)	=16
<b>KLINDAMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=32 (=4 - =32)	=32	=32 (=8 - =32)	=32
<b>DAPTOMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=8 (=4 - >8)	>8	=8 (=8 - >8)	>8
<b>ERITROMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=4 (=2 - >512)	=4	=4 (=4)	=4
<b>FUSIDNA KISLINA</b> <b>(razpon)</b>	≤2 (≤2)	≤2	≤2 (≤2)	≤2
<b>IMIPENEM</b> <b>(razpon)</b>	≤4 (≤4 - =8)	≤4	≤4 (≤4)	≤4
<b>LEVOFLOKSACIN</b> <b>(razpon)</b>	=4 (≤2 - =4)	=4	=4 (≤2 - =16)	=8
<b>LINEZOLID</b> <b>(razpon)</b>	≤1 (≤1 - =2)	=2	≤1 (≤1 - =2)	=2
<b>METRONIDAZOL</b> <b>(razpon)</b>	≤0,25 (≤0,25)	≤0,25	≤0,25 (≤0,25 - =1)	=1
<b>MOKSIFLOKSACIN</b> <b>(razpon)</b>	≤2 (≤2)	≤2	≤2 (≤2 - =4)	≤2
<b>OKSACILIN</b> <b>(razpon)</b>	=4 (=2 - >8)	=4	=4 (=2 - =8)	=4
<b>RIFAMPICIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,00195 (≤0,00195 - =0,25)	≤0,00195	≤0,00195 (≤0,00195 - =0,25)	=0,25
<b>TETRACIKLIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,125 (≤0,125 - =8)	≤0,125	≤0,125 (≤0,125)	≤0,125
<b>TIGECIKLIN</b> <b>(razpon)</b>	≤0,0625 (≤0,0625)	≤0,0625	≤0,0625 (≤0,0625)	≤0,0625
<b>TRIMETOPRIM-SULFAMETOKSAZOL</b> <b>(razpon)</b>	=8/152 (=2/38 - >16/304)	=8/152	=8/152 (=4/76 - >16/304)	>16/304
<b>VANKOMICIN</b> <b>(razpon)</b>	=0,5 (≤0,25 - =1)	=0,5	=0,5 (≤0,25 - =1)	=1

#### 4.9.2. Opredelitev sevov CD, občutljivih za antibiotike in odpornih proti njim, na podlagi mejnih vrednosti EUCAST

Na podlagi mejnih vrednosti EUCAST (EUCAST, 2013) so vsi izolirani sevi CD občutljivi za metronidazol in vankomicin. Pod priporočljivim epidemiološkim pragom (ECOFF, ang. epidemiological cutt off) so tudi vsi sevi CD za fusidno kislino, moksifloksacin in tigeciklin. Nekateri izolirani sevi CD so nad priporočljivim epidemiološkim pragom za antibiotike daptomicin (68,6 %), eritromicin (93,1 %), klindamicin (46,5 %), rifampicin (5,7 %) in tetraciklin (3,1 %) (Tabela 29, 34).

Od vseh testiranih sevov CD je proti vsaj enemu antibiotiku (eritromicin) odpornih kar 93,1 % (148/159) sevov. Proti vsaj dvema antibiotikoma je odpornih 73 % (116/159) testiranih sevov in 45,9 % (73/159) sevov je odpornih proti vsaj trem testiranim antibiotikom. Samo proti eritromicinu je odpornih 20,1 % (32/159) sevov CD, medtem ko je odpornost v kombinaciji eritromicin in daptomicin prisotna pri 25,2 % (40/159). Najpogostejsa je hkratna odpornost proti trem antibiotikom, in sicer eritromicin, daptomicin in klindamicin (63/159, 39,6 %).

Visoko odpornost proti antibiotikom eritromicin ( $> 8 \mu\text{g/ml}$ ), klindamicin ( $> 32 \mu\text{g/ml}$ , 512  $\mu\text{g/ml}$ ), rifampicin (64  $\mu\text{g/ml}$ ,  $> 64 \mu\text{g/ml}$ ) in tetraciklin (16  $\mu\text{g/ml}$ ) smo ugotovili pri sevih CD ribotipa 012 (3/5, 60 %). Izmed teh je imel en sev najvišje testirane vrednosti MIC tudi proti antibiotikoma ceftriakson ( $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) in trimetoprim/sulfametoksazol ( $> 16/304 \mu\text{g/ml}$ ). Dva seva CD ribotipa 012, ki sta bila občutljiva za rifampicin ( $\leq 0,00195 \mu\text{g/ml}$ ), sta bila prav tako kot ostali sevi CD ribotipa 012 visoko odporna proti klindamicinu (512  $\mu\text{g/ml}$ ), vendar sta imela višjo vrednost MIC za eritromicin ( $> 512 \mu\text{g/ml}$ ). En sev je bil za tetraciklin občutljiv ( $\leq 0,0625 \mu\text{g/ml}$ ), en pa odporen (8  $\mu\text{g/ml}$ ).

Štirje sevi CD ribotipa SLO 060 so imeli MIC za rifampicin 0,25  $\mu\text{g/ml}$  in MIC za trimetoprim/sulfametoksazol nad 16/304  $\mu\text{g/ml}$ . Poleg rifampicina so bili odporni tudi proti eritromicinu (4  $\mu\text{g/ml}$ , 100 %), daptomicinu (8  $\mu\text{g/ml}$ , 75 %;  $> 8 \mu\text{g/ml}$ , 25%) in klindamicinu (32  $\mu\text{g/ml}$ , 75%). Trije sevi so imeli višje vrednosti MIC za levofloksacin (8  $\mu\text{g/ml}$ , 66 %; 16  $\mu\text{g/ml}$ , 33 %) in en sev je imel MIC za moksifloksacin 4  $\mu\text{g/ml}$ .

Izoliran sev CD ribotipa 077 je imel MIC za moksifloksacin 4 µg/ml in MIC za levofloksacin 16 µg/ml, medtem ko sta MIC za eritromicin (4 µg/ml) in rifampicin (0,0078 µg/ml) nad epidemiološkim pragom.

Visoko odpornost proti eritromicinu ( $> 512 \mu\text{g/ml}$ ) in tetraciklinu ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) je imel en sev CD ribotipa 033, izoliran iz okolja (gnoj, kmetija 4), ki je bil poleg tega odporen tudi na klindamicin ( $32 \mu\text{g/ml}$ ) in daptomicin ( $8 \mu\text{g/ml}$ ). Ta sev je bil edini, ki je imel vrednost MIC za amoksicilin nad  $16 \mu\text{g/ml}$ .

Tabela 34: Odpornost in kombinacije odpornosti proti antibiotikom za izolirane seve CD  
Table 34: Antibiotic resistance and combination of resistance for isolated CD strains

Odpornost	Št.	%	skupno	%
Eritromicin	32	20,1	148	93,1
Eritromicin Daptomicin	40	25,2	110	69,2
Eritromicin Klindamicin	3	1,9	74	46,5
Eritromicin Rifampicin	1	0,6	9	5,7
Eritromicin Tetraciklin	0	0	5	3,2
Eritromicin Daptomicin Klindamicin	63	39,6	68	42,8
Eritromicin Klindamicin Rifampicin	0	0	7	4,4
Eritromicin Klindamicin Tetraciklin	1	0,6	5	3,2
Eritromicin Daptomicin Rifampicin	1	0,6	6	3,8
Eritromicin Daptomicin Tetraciklin	0	0	2	1,3
Eritromicin Daptomicin Klindamicin Rifampicin	3	1,9	5	3,2
Eritromicin Daptomicin Klindamicin Tetraciklin	0	0	2	1,3
Eritromicin Klindamicin Rifampicin Tetraciklin	2	1,3	4	2,5
Eritromicin Daptomicin Klindamicin Rifampicin Tetraciklin	2	1,3	2	1,3

Odpornost – nad epidemiološkim pragom, določen po EUCAST (2013), Št. – število samo tistih CD sevov, ki imajo odpornost samo proti določenim antibiotikom; skupno – število vseh CD sevov, ki imajo odpornost proti določenim antibiotikom, vendar imajo lahko zraven odpornost tudi za druga antibiotike

## 5. RAZPRAVA

Okužba s *Clostridium difficile* predstavlja v današnjem času pri ljudeh velik zdravstveni in ekonomski problem, predvsem v razvitih državah sveta. V ZDA ocenjujejo škodo tudi do tri milijarde ameriških dolarjev letno, a so avtorji mnenja, da je realna škoda verjetno še veliko večja (Dubberke in Wertheimer, 2009). Velik delež odpade na bolnišnično pridobljen CDI, manjši pa na izvenbolnišnični CDI (Pépin in sod., 2004), ta je v zadnjem desetletju v porastu (Khanna in sod., 2012). Izvenbolnišnični CDI največkrat povezujejo z okoljem človeka, v katerem naj bi bile živali glavni rezervoar bakterije (Simango in Mwakurudza, 2008; Avberšek in sod., 2009; Knight in sod., 2013). Visoko prevalenco CD so dokazali pri večini farmskih živali v intenzivni proizvodnji, kot so prašiči, govedo in perutnina (Hammit in sod., 2008; Simango in Mwakurudza, 2008; Zidarič in sod., 2008; Weese in sod., 2010b; Costa in sod., 2011; Hopman in sod., 2011; Hawken in sod., 2013; Knight in sod., 2013). Visoka prevalenca CD na velikih farmah je lahko posledica stresa, ki ga živali doživljajo pri velikem številu živali in gostoti naseljenosti. Večja je tudi možna obremenitev okolja zaradi večjih količin proizvedenega gnoja. Velike farme so večinoma oddaljene od naselij. Stik med živalmi in ljudmi ter med različnimi vrstami živali je običajno omejen na zaposlene oz. na omejeno število ljudi. Zaposleni na farmskih rejah se lahko okužijo s CD in bakterijsko mikrobioto preneseno v domače okolje. Manjše družinske kmetije so pogosto locirane znotraj naselij in so tesno povezane z lokalno skupnostjo. Tisti, ki prebivajo na manjših družinskih kmetijah, so večinoma v tesnem stiku z živalmi v različnih fazah proizvodnje. Živali tovrstnih kmetij prihajajo redno v stik z drugimi domačimi in prostozivečimi vrstami živali. Zaradi pestre epidemiološke situacije na takih kmetijah je lahko možnost prenosa CD med ljudmi in živalmi veliko večja kot na velikih farmah za intenzivno pritejo mesa ali mleka.

V naši raziskavi smo žeeli ugotoviti prevalenco, dinamiko izločanja in značilnosti sevov CD na družinskih kmetijah krav molznic v obdobju enega leta. Tovrstna študija je med prvimi, ki pomagajo razumeti vlogo družinskih kmetij v ekologiji in epidemiologiji CD, izvenbolnišničnem CDI in CDI pri živalih.

V našo študijo smo vključili 20 družinskih kmetij iz okolice Ljubljane, ki redijo krave molznice. Vzorčili smo v dvotedenskih razmikih vse leto, kar je veliko več kot pri drugih longitudinalnih študijah, pri katerih so vzorčili mesečno eno ali nekaj kmetij (Schoster in sod., 2012b) ali pa so intervali vzorčenja spremenjali, da so se osredotočili na mlajše živali in na

živali tik pred odhodom v klavnico (Zidarič in sod., 2008; Weese in sod., 2010b, Houser in sod., 2012; Zidarič in sod., 2012; Hawken in sod., 2013). V naše vzorčenje smo vključili dve kategoriji živali, s katerimi imajo kmetje največ stika, in sicer odrasle krave molznice v obdobju laktacije in teleta do 6 mesecev starosti. Za natančno metodo detekcije in kvantifikacije CD v blatu goveda smo še pred začetkom vzorčenja vpeljali, optimizirali in validirali qPCR za 16S rDNA gen (Bandelj in sod., 2013). Spodnja meja detekcije (LOD) je bila določena na 7,72 CD bakterij/g blata, medtem ko je bila spodnja meja kvantifikacije (LOQ) določena na 77,2 CD bakterij/g blata. Naša metoda je občutljivejša od vseh prej objavljenih protokolov za dokazovanje 16S rDNA gen za CD (Rintilla in sod., 2004; Penders in sod., 2005; Balamurugan in sod., 2008; Naaber in sod., 2011) in do zdaj edina, ki sledi navodilom MIQE (ang. minimal information for publication of quantitative PCR experiments) (Bandelj in sod., 2013). Prav tako smo zaradi pomanjkanja univerzalne metode določanja odpornosti sevov CD proti antibiotikom vpeljali in optimizirali novo mikrodilucijsko mikrotitrsko ploščo, prilagojeno za določanje vrednosti MIC 17 antibiotikov (Micronaut-S CD plošča MIC). Metodo smo tudi delno validirali in na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je metoda učinkovita in pod enakimi pogoji dela tudi zanesljiva. Z dodatno optimizacijo bi metoda lahko pomenila korak bližje k bolj poenotenemu načinu določanja vrednosti MIC za bakterijo CD.

### 5.1. Prevalenca, kvantifikacija in dejavniki, ki vplivajo na izločanje CD na družinskih kmetijah krav molznic

Na družinskih kmetijah v okolici Ljubljane smo v obdobju enega leta ugotovili prevalenco bakterije CD med 3,7 in 74,1 %. Vsaka kmetija je bila vsaj enkrat pozitivna (100 %), kar potrjuje trditev avtorjev Weese in sod. (2010b) in Schoster in sod. (2012b), da lahko zaradi prehodnega izločanja bakterijo CD občasno najdemo na vsaki farmi. Povprečna prevalenca CD pri kravah molznicah je bila v našem primeru 10 %, kar je več kot pri drugih študijah, pri katerih so ugotovili 0,95, 1,5, 2,4 in 4,5-odstotno prevalenco (Indra in sod., 2009; Thitaram in sod., 2011; Koene in sod., 2012; Romano in sod., 2012). Razlike v prevalenci lahko pripisemo uporabi skupinskih vzorcev blata in zelo občutljivi kombinaciji metode izolacije DNA s qPCR (Bandelj in sod., 2013) namesto posameznih vzorcev in gojitvene preiskave. Kot smo pričakovali, so imela teleta veliko višjo prevalenco CD. V skupinskih vzorcih blata telet je bila prevalenca CD višja kot pri skupinskih vzorcih krav, in sicer 35,7-odstotna, če pa

smo upoštevali posamezne vzorce blata telet, je bila prevalenca le 10-odstotna (243/2442). Rezultati so tako v okviru predhodno objavljenih raziskav, pri katerih so prevalenco pri teletih ocenili med 6 in 25,3 % (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Hammitt in sod., 2008; Pirš in sod., 2008; Houser in sod., 2012; Koene in sod., 2012; Rodriguez in sod., 2012; Romano in sod., 2012; Zidarič in sod., 2012) ter celo do 56 % pri teletih do 7 dni starosti (Knight in sod., 2013). Čeprav je prevalenca v našem primeru primerljiva s predhodnimi objavami, verjetno primerjava ni realna, ker smo uporabili za presejalno metodo qPCR in ne gojitveno preiskavo kot večina študij. Gojitvena preiskava se je izkazala za manj občutljivo kot qPCR (Bandelj in sod., 2013), in če bi za primerjavo upoštevali rezultate naše gojitvene preiskave, bi bila prevalenca pri skupnih vzorcih krav 0,2-odstotna in pri individualnih vzorcih telet 4,1-odstotna, kar je veliko manj kot pri drugih prej omenjenih raziskavah. Nižja prevalenca na družinskih kmetijah lahko pomeni, da so teleta, rojena in rejena na isti kmetiji, podvržena manjšemu stresu kot teleta z različnih kmetij, ki jih združujejo v velike skupine na farmah. Zaradi tega je možno, da imajo družinske kmetije v lokalni skupnosti bolj indikativno vlogo v epidemiologiji izvenbolnišničnega CDI.

S kvantifikacijo CD smo ugotovili, da teleta iz prve starostne skupine (od 0 do 21 dni) izločajo v povprečju  $6,1 \times 10^5$  CD celic/g blata, medtem ko je povprečje druge starostne skupine (od 22 do 56 dni)  $4,1 \times 10^3$  CD celic/g blata, tretje (od 57 do 180 dni) pa  $2,8 \times 10^2$  CD celic/g blata. S starostjo se tako znižuje ne samo prevalenca CD v populaciji, temveč tudi število izločenih bakterij v blatu. Upadanje prevalence s starostjo je bilo sicer že večkrat dokazano pri teletih, prašičih in perutnini (Zidarič in sod., 2008; Costa in sod., 2011; Hawken in sod., 2013), vendar do zdaj še ni bilo dokaza tudi o upadanju števila celic CD v blatu (št. CD celic/g blata) s starostjo živali. Čeprav smo pozitivne vzorce CD dobili tudi pri novorojenih teletih (0 dni starosti), imajo daleč največje število CD v blatu teleta, stara en dan. Število bakterij nato upade in pri sedmem dnevu znova naraste. Vrh doseže okoli 12. dneva starosti in upade do 17. dne. Drugi in manjši val naraščanja števila CD je med 25. in 34. dnem, medtem ko je še en manjši val okoli 55. dne starosti telet. V tretji starostni skupini telet je zaradi sporadičnosti pozitivnih vzorcev in večjega razpona dnevov starosti telet težje določiti val naraščanja števila CD.

Poleg različnih prevalenc CD pri teletih, kravah molznicah in na kmetijah, ki smo jih določili na podlagi rezultatov qPCR, smo s pomočjo velikega števila pridobljenih podatkov preverili

statistično signifikantnost številnih potencialnih dejavnikov tveganja. Objavljenih je nekaj raziskav, v katerih so proučevali pomen letnega časa in mesecev na prevalenco CD. Norman je s sodelavci (2009) ugotovil pozitivno asociacijo med jesensko/zimskimi meseci in višjo prevalenco CD pri prašičih, medtem ko so istega leta v Kanadi ugotovili višjo prevalenco CD v mesnih izdelkih januarja in februarja (Rodriguez-Palacios in sod., 2009). Ugotovili so tudi, da imajo teleta, mlajša od enega meseca, v maju, juniju in juliju statistično značilno višjo prevalenco kot v mesecu avgustu (Rodriguez-Palacios in sod., 2006). V naši raziskavi smo ugotovili, da je petkrat večja verjetnost, da bodo teleta, mlajša od treh tednov, izločala CD med poletnimi meseci (junij, julij, avgust) kot med zimskimi meseci (december, januar, februar). Poleg tega smo zasledili tudi šibko pozitivno korelacijo med višjimi zunanjimi temperaturami in prisotnostjo CD pri kravah ter med povprečno dnevno vlažnostjo in prisotnostjo CD pri teletih iz druge starostne skupine, vendar rezultati niso statistično signifikantni. Poglavitni dejavnik tveganja, ki smo ga v naši raziskavi zasledili, je sprememba prehrane. Vrednosti P med vsemi starostnimi kategorijami (razen telet iz druge skupine) se gibljejo med 0,0334 in 0,0001. Tako imajo krave 5,5-krat večjo verjetnost, teleta iz prve skupine pa celo 12-krat večjo verjetnost, da bodo ob spremembji prehrane pozitivna na CD. Tudi v predhodnih raziskavah pri konjih so ugotovili, da sprememba prehrane poveča izločanje CD (Båverud in sod., 1997; Gustafsson in sod., 2004; Keessen in sod., 2011). Ob tem smo ugotovili, da prihod novega teleta v hlev, z rojstvom ali nakupom, poveča verjetnost izločanja CD na kmetiji za 3,7-krat in pri teletih za 4,6-krat, medtem ko pri kravah večje verjetnosti ni. Ti rezultati niso presenetljivi, saj teleta iz prve starostne skupine v povprečju izločajo daleč največ CD/g vzorca blata. Bolj presenetljiv statistično signifikanten rezultat je, da na prevalenco CD pri teletih iz druge starostne skupine vpliva pasma goveda. Pri teletih pasme LS, starih od 22 do 56 dni, je celo 20-krat večjo verjetnost, da izločajo CD v blatu, kot teleta pasme ČB. Taki rezultati so lahko posledica zahtev po vedno večji proizvodnji mleka pri kravah pasme LS, ki genetsko nimajo tako dobrih predispozicij za mlečnost kot krave pasme ČB. Lisasta pasma goveda je za razliko od pasme ČB, ki je izključno mlečna pasma, kombinirana, kar pomeni, da ima poleg dobre mlečnosti tudi dober prirast. Če od take krave zahtevamo visoko mlečnost, jo potisnemo do mej njenih genetskih sposobnosti, kar pomeni veliko večji stres za organizem in posledično večje število bolezni (npr. mastitis) (Jovanovac in sod., 2004; Oltenacu in Broom, 2010). To lahko pusti posledice tudi pri hitro rastočih teletih, ki mleko takih krav zauživajo. Zaradi tega smo preverili tudi možne statistično

signifikantne povezave z večjo prevalenco CD in dejavniki tveganja, kot so bolezni, antibiotično in neantibiotično zdravljenje. Nekateri avtorji so že ugotavljali povezave med antibiotičnim zdravljenjem pri govedu in prevalenco CD, vendar rezultati niso bili statistično signifikantni (Rodriguez-Palacios in sod., 2006; Rodriguez-Palacios in sod., 2011b; Costa in sod., 2012). Po drugi strani pa so pri konjih ugotovili korelacijo med večjo prevalenco CD ali CDI in uporabo antibiotikov (Knoop, 1979; Hines in Dickerson, 1993; Båverud in sod., 1997; Gustafsson in sod., 1997; Båverud in sod., 1998; Gustafsson in sod., 2004; Kiss in Bilkei, 2005). V naši raziskavi tovrstne povezave pri kravah molznicah nismo ugotovili, smo pa ugotovili, da bolezni telet in krav, predvsem mastitis, ter antibiotično in neantibiotično zdravljenje krav vplivata na višjo prevalenco CD pri teletih in posledično na kmetijah. Pri teletih smo ugotovili, da so dejavniki, ki vplivajo na izločanje CD, bolezni krav (predvsem mastitis), bolezni telet, antibiotično in neantibiotično zdravljenje krav. Od bolezni pri teletih smo ugotovili samo šibko korelacijo med prevalenco CD in prisotnostjo driske pri teletih, kar je v skladu s prejšnjimi ugotovitvami avtorjev, v katerih so nekateri našli povezavo (Hammitt et al., 2008; Clooten et al., 2008), nekateri pa ne (Struble et al., 1994; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Yaeger et al., 2007; Alvarez-Perez et al., 2009). Zanimivo je, da smo znotraj različnih starostnih skupin telet ugotovili, da bolezni krav (mastitis) in antibiotično ter neantibiotično zdravljenje krav vplivajo izključno samo na drugo starostno skupino telet (od 22 do 56 dni). Možno je, da so teleta v tem starostnem obdobju bolj občutljiva zaradi prehoda iz monogastričnega metabolizma v metabolizem pravega prežvekovalca (Drackley, 2008). Lahko pa je tudi posledica načina reje na srednje velikih kmetijah, kjer se velikokrat zgodi, da mleko krav, ki so v karenci zaradi zdravljenja, napajajo teletom v tem starostnem obdobju. Kmetje tako mleko neradi ponudijo teletom, mlajšim od treh tednov, zaradi strahu, da bi se pri njih razvila driska, medtem ko se teleta, starejša od 2 mesecev, napaja večinoma z mlečnim nadomestkom. Vsekakor je možno, da je vzrok v kombinaciji, in sicer občutljiv razvoj mikrobiote v predželodcih in napajanje z mlekom zdravljenih krav, vendar so za pravilno interpretacijo tovrstnih rezultatov potrebne nadaljnje raziskave. Zanimivo je tudi to, da na teleta iz tretje skupine (od 57 do 180 dni) vplivajo poleg že prej omenjene spremembe v prehrani tudi povprečna mesečna proizvodnja mleka krav molznic in možnost paše. Poseben poudarek smo dali na parazitološke preiskave blata, ki pa se niso pokazali kot dejavniki tveganja. Izjema je blaga korelacija med prevalenco CD in parazitov, ki niso iz rodu *Buxtonella* sp., pri teletih iz druge starostne skupine.

Na koncu lahko z rezultati potrdimo, da je izločanje CD na srednje velikih kmetijah krav molznic odvisno od starosti živali in od zdravstvenega stanja živali v hlevu. Poleg tega smo potrdili tudi, da nekateri fiziološki in naravni dejavniki, ki so posledica intenzivne proizvodnje, tudi vplivajo na izločanje CD pri govedu. Predvsem je tu v ospredju vpliv spremembe prehrane. Naravni dejavniki, kot so sprememba temperature, vlage in prisotnost drugih živalskih domačih in prostoživečih vrst, pa na izločanje CD v našem primeru niso vplivali.

## 5.2. Molekularne značilnosti sevov CD, prisotne pri govedu in v okolini kmetij

Molekularne značilnosti izoliranih sevov CD smo ugotavljali s pomočjo ribotipizacije, toksinotipizacije in MLVA. Do zdaj so odkrili, da si ljudje in živali delijo nekatere seve CD, vendar epidemiološkega dokaza o prenosu še ni (Keessen in sod., 2011). Predvsem je za izvenbolnišnični CDI pomemben CD ribotipa 078, ki ga pogosto najdemo tudi pri rejnih živalih (Hensgens in sod., 2009; Keessen in sod., 2011; Koene in sod., 2012), vendar ga v našem primeru nismo izolirali. Iz vzorcev blata lastovk v okolju kmetij nismo uspeli izolirati nobenega seva CD, kljub temu da smo pri lastovkah pred jesensko selitvijo v Afriko nedavno dokazali prisotnost tako ribotipa 078 kot 014 in 002 (Bandelj in sod., 2014). Smo pa uspeli iz okolja kmetij in blata telet izolirati nekatere druge toksigene seve CD, ki so bili izolirani tudi pri ljudeh, in sicer CD ribotipa 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018, 023, 033, 045 in 081 (Keel in sod., 2007; Bignardi in Settle, 2008; Hensgens in sod., 2009; Janežič in sod., 2012; Koene in sod., 2012; Skraban in sod., 2013). Nekateri od teh, kot npr. ribotipi 001/072, 002 in 014/020, so znani povzročitelji bolezni pri ljudeh (Hensgens in sod., 2009; Janežič in sod., 2012; Koene in sod., 2012; Skraban in sod., 2013). Skupno smo tako izolirali 24 različnih ribotipov, od katerih je bilo 11 takih, ki smo jih izolirali iz blata govedi in iz vzorcev okolja kmetij. Skupno smo iz blata govedi izolirali 16 različnih ribotipov, medtem ko smo jih iz vzorcev okolice kmetij izolirali 19. Izolat CD ribotipa 071, ki smo ga izolirali iz skupinskega vzorca krav na kmetiji 19, je na podlagi ribotipizacije in toksinotipizacije enak obema izolatom CD iz blata telet iste kmetije. Izolirali smo tudi dva nova ribotipa (SLO 195 in SLO 196) in en nov toksinotip (XIc). Sevi ribotipa 033 toksinotipa XIc so bili izolirani iz okoljskih vzorcev gnoja, zemlje in hlevskih muh. Toxinotipa XIc pri telečjih izolatih CD ribotipa 033 nismo ugotovili. Ribotip 033 je bil najpogosteje izoliran iz vzorcev blata telet (75,5 %) in zelo pogosto iz okoljskih vzorcev (22,6 %). Zato je bil najbolj primeren za

nadaljnjo molekularno karakterizacijo in ugotavljanje sorodstvenih povezav z metodo MLVA. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da so sorodstveno zelo povezani izolati istih kmetij, predvsem je to dobro vidno na kmetijah 4, 6, 17 in 18. Nekoliko (za en lokus) so se sevi CD spremenili na kmetiji 5 in 15, vendar še vedno spadajo v isti klonalni kompleks. Predvsem je zanimiva povezava kmetij 5 in 6, 14 in 15 ter 14 in 16. Kmetije 14, 15 in 16 povezuje lokacija, vendar so sevi v istem klonalnem kompleksu samo med kmetijama 14 in 15 ter 14 in 16. To pa zato, ker kmetiji 15 in 16 prodajata moška teleta kmetiji 14. Povezava je tako predvidljiva in je dokaz prenosa klonalnega seva CD z ene kmetije na drugo. Tele kmetije 16 (T20) je bilo pri 21. vzorčenju pozitivno na CD. Enak sev smo izolirali pri istem teletu tudi pri naslednjem vzorčenju na kmetiji 14. Čez 4 in 10 tednov pa smo enak sev izolirali iz blata telet T21 in T23 kmetije 14, ki nista bila predhodno na kmetiji 16. S tem smo dokazali, da se je bakterija v okolju obdržala in kasneje okužila dve teleti. Zanimivo je tudi, da imata kmetiji iz istega naselja (kmetija 5 in 6) enak sev CD, pri tem pa med njima ni znanih izmenjav (prodaj). Tako je tudi zanimivo, da je trikrat pozitivno tele (T19) s kmetije 16 vsako naslednje vzorčenje izločalo med seboj nesorodne ( $\text{STRD} \leq 10$ ) oziroma neklonalne ( $\text{STRD} \leq 2$ ) CD ribotipa 033. Za slednje rezultate nimamo razlage, kakor tudi nimamo razlage, zakaj so nekateri okoljski sevi CD ribotipa 033 klonalni sevom CD, ki izvirajo od telet iz drugih kmetij. Predvsem je to vidno pri okoljskih sevih CD kmetije 5. Slednji sevi so enaki sevom CD, izoliranih iz vzorcev blata telet na kmetijah 2, 4 in 16. Okoljski izolati CD kmetij 2, 13, 14 in 15 pa so kloni izolatom CD telet kmetij 5 in 6.

Študije so pokazale, da je izpostavljenost manj toksigenim sevom CD koristna pri preprečevanju izvenbolnišnične okužbe s CD (Sambol in sod., 2002; Songer in sod., 2007). Glede na veliko prevalenco manj toksigenih sevov CD na družinskih kmetijah v naši študiji, bi lahko sklepali, da imajo take kmetije poleg indikativne vloge tudi preventivno, čeprav je za takoj trditev nujno potrebne nadaljno raziskovanje na tem področju. Je pa to prva tovrstna študija pri živalih in njeni rezultati ter način izpeljave študije bodo koristni za nadaljnje raziskave na področju epidemiologije in ekologije CD ter drugih nevarnih bakterij. Na tem mestu bi bilo prav, da omenimo, da je optimizacija metode MLVA zahtevna in z razvojem sekvenciranja celotnega genoma (WGS, ang. whole genome sequencing) celo nekoliko nesmiselna. Tako bi bilo v prihodnje smiselno epidemiološke raziskave nadgraditi z rezultati nove generacije sekvenciranja.

### 5.3. Občutljivost izoliranih sevov CD za antibiotike

V sklopu naše raziskave smo tudi žeeli ugotoviti, ali sevi CD, izolirani iz živali in okolja kmetij, predstavlajo nevarnost za razvoj izvenbolnišnične CDI. Zaradi tega smo izolirane seve CD testirali za antibiotike, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini, kot tudi za antibiotike, ki se uporabljajo pri raziskovanju odpornosti.

Vankomicin in metronidazol sta antibiotika izbire za zdravljenje CDI pri ljudeh, zato je njuno učinkovitost proti CD treba spremljati. V naši raziskavi smo podobno kot drugi avtorji (Rodriguez-Palacios in sod., 2006, 2011, 2011b; Indra in sod., 2009; Zidarič in sod., 2012) ugotovili 100-odstotno občutljivost govejih in okoljskih sevov CD za oba antibiotika z MIC pod objavljeno mejno vrednostjo EUCAST 2 µg/ml (EUCAST, 2013). Tudi fusidno kislino, ki jo lahko glede na klinično učinkovitost primerjamo z metronidazolom (Norén in sod., 2010), uporabljajo v humani medicini za zdravljenje CDI. Podobno kot pri metronidazolu je učinkovitost fusidne kisline proti CD še vedno zelo dobra in v našem primeru tudi 100-odstotna.

V zadnjih letih raziskovalci ugotavljajo učinkovitost tudi nekaterih drugih antibiotikov, kot so linezolid, tigeciklin, daptomicin in rifampicin, za zdravljenje hujših oblik CDI in CDI, pri katerih je CD odporen proti antibiotikom izbora. Linezolid zmanjšuje toksičnost sevov CD v črevesju (Baines in sod., 2011), medtem ko je uporaba tigeciklina indicirana izključno v primerih, ko je bila terapija z vankomicinom in metronidazolom neuspešna (Larson in sod., 2011). Raziskave na govejih sevih CD (Rodriguez-Palacios in sod., 2011, 2011b) in tudi naši rezultati potrjujejo *in vitro* učinkovitost obeh antibiotikov, čeprav so bili sevi CD ribotipa 078, izolirani pri govedu iz ZDA, odporni proti linezolidu (Rodriguez-Palacios in sod., 2011b). Klinično še nepreizkušen antibiotik daptomicin učinkuje baktericidno na po Gramu pozitivne anaerobe. *In vitro* študije so pokazale dobro učinkovitost proti humanim sevom CD (Norén in sod., 2010, Pirš in sod., 2013). Pri študiji iz leta 2013 so ugotovili odpornost proti daptomicinu le pri 2,1 % živalskih izolatov CD in MIC 50 1 µg/ml ter MIC 90 4 µg/ml (Pirš in sod., 2013), kar pa je veliko manj kot pri naših izolatih, pri katerih smo zasledili odpornost pri 68,6 % izoliranih sevov CD z MIC 50 8 µg/ml in MIC 90 > 8 µg/ml. Vzrok za razliko je možno pripisati različnim ribotipom CD, različnim kategorijam živali in tudi različnemu načinu vzreje, vendar je zaradi majhnega števila študij o odpornosti CD proti daptomicinu hitro sklepanje o vzroku nezanesljivo. Rifampicin je eden od antibiotikov, ki se uporablja za

zdravljenje tuberkuloze pri ljudeh. Do zdaj je pokazal dobro učinkovitost tudi proti CD (Garey in sod., 2008b), vendar je njegova samostojna uporaba za zdravljenje CDI vprašljiva, saj pride hitro do razvoja visoke odpornosti (Norén in sod., 2010; Pirš in sod., 2013). Študij na živalskih izolatih CD je zelo malo. Ena od njih navaja 100-odstotno odpornost pri konjskih izolatih CD (Båverud in sod., 1998), druga pa o 1-odstotni rezistenci pri različnih živalskih izolatih (Pirš in sod., 2013). V našem primeru smo ugotovili odpornost proti rifampicinu pri 2,5 % govejih sevov CD in pri 5,6 % vseh izoliranih sevov CD v naši raziskavi.

Cefalosporinov se za zdravljenje CDI ne uporablja, so pa pogosto uporabljeni antibiotiki v humani in veterinarski medicini. Zaradi kratkotrajne karence za meso in brez karence za mleko se cefalosporini druge in tretje generacije zelo pogosto uporabljajo pri govedu v mlečni proizvodnji. Antibiotiki iz skupine cefalosporinov so znani po tem, da na CD ne učinkujejo inhibitorno in večinoma povečajo možnosti za nastanek CDI (Norén in sod., 2010; Deshpande in sod., 2013; Pirš in sod., 2013), zato smo pričakovali visoke vrednosti MIC za ceftriakson. V nasprotju s pričakovanim je večina sevov CD imela MIC  $\leq 32 \mu\text{g}/\text{ml}$  in le 1,9 % izoliranih sevov je imelo MIC nad  $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ , kar je manj kot pri drugih študijah živalskih CD, pri katerih je bila MIC za ceftiofur  $\geq 64 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Hammitt in sod., 2008) in MIC za cefuroksim  $> 256 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Keessen in sod., 2013).

Iz skupine betalaktamskih antibiotikov smo testirali še antibiotike amoksicilin, oksacilin in imipenem. Amoksicilin se v kombinaciji s klavulansko kislino ali brez nje pogosto uporablja v veterinarski in humani medicini, medtem ko se oksacilin uporablja le redko. Pri govedu se amoksicilin največkrat uporablja za zdravljenje mastitisa, oksacilin pa le kot preventiva ob presušitvi. Amoksicilin se je po pričakovanju na podlagi prejšnjih študij *in vitro* izkazal za učinkovitega proti izoliranim sevom CD (Keessen in sod., 2013; Zidarič in sod., 2013), z izjemo enega okoljskega seva, ki je bil izoliran iz gnoja kmetije 4. Ta CD ribotipa 033 je imel MIC nad  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ , kar nakazuje možnost prisotnosti  $\beta$ -laktamaz (Norén in sod., 2010). Za razliko od amoksicilina so vrednosti MIC oksacilina višje in raznolikost med CD sevi je večja. Rezultate lahko primerjamo samo z rezultati študije iz leta 2013 (Pirš in sod., 2013), v kateri so ugotovili MIC 50 za živalske seve  $\leq 0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MIC 90 nad  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Naši rezultati za živalske seve CD so bili višji za MIC 50, in sicer  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ , ter nižji za MIC 90, ki je bila  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Imipenem spada v skupino  $\beta$ -laktamskih antibiotikov z zelo širokim spektrom delovanja. Uporablja ga za zdravljenje infekcij s pseudomonasom pri ljudeh. Stopnja

rezistence za človeške izolate CD je med 29 in 53,5 %, medtem ko je za prašičje izolate CD med 28,1 in 50 %, kar je presenetljivo visoko, ker se imipenem ne uporablja v veterinarski medicini (Keessen in sod., 2013; Pirš in sod., 2013). V teh študijah so določili mejo za rezistenco na podlagi priporočljivih EUCAST MIC za anaerobe, ki je  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Če to mejo upoštevamo tudi pri naši raziskavi, so vsi izolirani sevi CD, z izjemo enega govejega seva CD ribotipa 023 ( $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), občutljivi za imipenem (99,4%), vendar je za pravilno interpretacijo rezultatov treba določiti epidemiološko mejno vrednost specifično za CD, za kar pa je potrebnih več raziskav z univerzalno metodo ugotavljanja občutljivosti za antibiotike.

Tetracikline se pogosto uporablja v veterinarski medicini kot preventivo pri respiratornih obolenjih predvsem goveda ob stresnih okoliščinah (združevanje telet z različnih farm v večje skupine) in za zdravljenje mastitisa. V študijah, v katerih so testirali seve CD, pridobljene v takih okoliščinah, so ugotovili od 76 do 93-odstotno odpornost (Costa in sod., 2011, Zidarič in sod., 2012), medtem ko so pri prašičih ugotovili od 90 do 100-odstotno občutljivost (Norman in sod., 2009; Keessen in sod., 2013). V naši raziskavi smo ugotovili odpornost proti tetraciklinu pri 2,5 % govejih sevov CD in pri 3,14 % vseh izoliranih sevov CD, kar je pričakovano glede na to, da teleta z družinskih kmetij niso podvržena tolikšnemu stresu in preventivnemu zdravljenju z antibiotiki kot teleta na velikih farmah.

Klindamicin je prvi antibiotik, ki je bil povezan z nastankom driske po antibiotičnem zdravljenju oziroma s CDI. Mehанизem odpornosti je enak kot proti eritromicinu, zato je zelo pogosta hkratna visoka odpornost proti obema antibiotikoma (Norén in sod., 2010; Pirš in sod., 2013). Eritromycin je veterinarski in humani antibiotik, ki se je uporabljal za respiratorne infekcije, povzročene z manj pogostimi (atipičnimi) organizmi. Povezan je s smrtnimi primeri CDI pri kobilah, katerih žrebeta so bila zdravljena z eritromicinom, ter z nastankom akutnega kolitisa pri konjih, ki so jim eksperimentalno aplicirali eritromycin (Gustafsson in sod., 1997; Båverud in sod., 1998). Eritromycin se pri govedu ne uporablja, vendar se ga pogosto testira *in vitro* zaradi spremeljanja razvoja odpornosti sevov CD (Keessen in sod., 2013; Pirš in sod., 2013). Na podlagi opisanih epidemioloških pragov smo odpornost proti eritromycinu ugotovili pri 93 % vseh izoliranih sevov CD, na klindamicin pa pri 46,6 % izoliranih sevov. Študija na govejih izolatih CD iz Belgije je pokazala 73,7-odstotno odpornost proti eritromycinu (Zidarič in sod., 2012), medtem ko so bili goveji sevi CD iz ZDA občutljivi z MIC med 0,5 in  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Hammitt in sod., 2008). Sevi CD, izolirani iz prašičev, konj, perutnine in ljudi, so imeli 59,

100, 2 in 76-odstotno odpornost proti eritromicinu (Båverud in sod., 1998; Simango in Mwakurudza, 2008; Keessen in sod., 2013). Prav tako raznoliki so tudi rezultati testiranja občutljivosti za antibiotik klindamicin. V nekaterih študijah so opisali od 12 do 93-odstotno prisotnost odpornih sevov CD pri govedu in od 4 do 100-odstotno pri prašičih (Jhung in sod., 2008; Rodriguez Palacios in sod., 2006, 2011a; Norman in sod., 2009; Keessen in sod., 2013). Zanimivo je to, da smo visoko odpornost proti eritromicinu (100 %), klindamicinu (100 %), rifampicinu (60 %) in tetraciklinu (80 %) ugotovili le pri sevih CD ribotipa 012, izoliranih iz blata goveda (4 sevi CD) in okolja (1 sev CD). Kombinacijo visoke odpornosti proti eritromicinu, klindamicinu in rifampicinu pri CD ribotipa 012 so že večkrat opazili tudi drugi raziskovalci, vendar do zdaj le pri humanih vzorcih pacientov s CDI (Norén in sod., 2010; Ackermann in sod., 2003). Podobno kot opisani humani sevi so imeli tudi naši sevi sočasno odpornost na tetraciklin (80 %), vendar ne tudi na moksifloksacin. Samo dva seva CD, in sicer ribotipa 077 in SLO 060, sta imela vrednosti MIC za moksifloksacin tik pod epidemiološkim pragom ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), s tem da je imel sev ribotipa 077 MIC za levofloksacin  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Podobne rezultate so objavili tudi drugi raziskovalci, vendar je zaradi pomanjkanja epidemioloških mejnih vrednosti za CD interpretacija rezultatov vprašljiva (Jhung in sod., 2008; McNamara in sod., 2011; Rodriguez Palacios in sod., 2011b; Janežič in sod., 2012).

Trimetoprim/sulfametoksazol je antibiotik, ki se ga v veterinarski in tudi v humani medicini veliko uporablja predvsem za zdravljenje respiratornih in urogenitalnih infekcij pri govedu in drugih živalih. Zaradi široke uporabe nas je zanimal njegov vpliv na CD. Epidemiološke mejne vrednosti EUCAST za CD niso objavljene, zato lahko dobljene vrednosti MIC primerjamo le z rezultati študije iz leta 2013 (Pirš in sod., 2013), kjer pa so nižje (MIC 50  $2/38 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; MIC 90  $> 4/76 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) kot pri naših izolatih CD (MIC 50  $4/76 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; MIC 90  $8/152 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Pri tem antibiotiku sta tudi MIC 50 in 90 pri naših okoljskih sevih višji od govejih sevov CD, kar pa je tudi edina večja razlika med okoljskimi in govejimi sevi CD. Slednje potrjuje ugotovitve različnih raziskovalcev, da je distribucija vrednosti MIC odvisna bolj od ribotipa CD kot od njihovega izvora (Norén in sod., 2010).

Glede na dobljene rezultate smo ugotovili, da je novo vpeljana metoda dobra za določanje odpornosti CD proti antibiotikom. Kljub temu smo pri testiranju obnovljivosti naleteli na nekatere težave, pri katerih se je izkazalo, da metoda omogoča še veliko optimizacije in izboljšav, kar bo treba upoštevati pri nadaljnji raziskavah. Namen testiranja izoliranih sevov

CD je bil ugotavljanje odpornosti in hkratne odpornosti proti več antibiotikom pri sevih CD, ki jih lahko najdemo pri govedu in v okolini družinskih kmetij, ter ugotoviti, ali lahko predstavljajo nevarnost za razvoj CDI pri ljudeh. Ugotovili smo, da so na srednje velikih kmetijah krav molznic vsekakor prisotni večkrat odporni sevi CD, ki jih najdemo tudi pri ljudeh, vendar je njihova prevalenca prenizka, da bi predstavljala resnejšo grožnjo za razvoj izvenbolnišnične CDI. Tako lahko sklepamo, da imajo manjše kmetije bolj indikativno oziroma preventivno vlogo kot pa vlogo vira bakterij CD, ki povzroča izvenbolnišnično CDI.

## 6. ZAKLJUČKI

Optimizirali in validirali smo metodo za določanje bakterije *Clostridium difficile* (CD) v blatu goveda, ki sledi navodilom MIQE. Metoda temelji na učinkoviti izolaciji klostridijske DNA ter na specifičnem in visoko občutljivem kvantitativnem testu PCR v realnem času (qPCR). Meja detekcije je 7,72 CD celic/g blata, medtem ko je spodnja meja kvantifikacije 77,2 CD celic/g blata. Obe meji sta nižji od doslej objavljenih za detekcijo in kvantifikacijo CD v blatu.

Na podlagi rezultatov preiskav blata telet s qPCR lahko potrdimo, da je izločanje bakterije CD odvisno od starosti živali. Povprečno število CD pozitivnih telet upada s starostjo, tako kot tudi upada povprečno število bakterij CD v njihovem blatu.

Z univariatno in multivariatno statistično analizo podatkov smo ugotovili, da je izločanje bakterije CD odvisno od zdravstvenega stanja živali v hlevu, kar je razvidno predvsem pri skupini telet v drugem starostnem obdobju (od 22 do 56 dni). Med različnimi kategorijami bolezni je največji dejavnik tveganja vnetje imena oziroma mastitis. Na izločanje CD pri teletih iz druge starostne skupine močno vpliva tudi uporaba antibiotičnih in neantibiotičnih zdravil.

Na izločanje CD v blatu goveda večinoma ne vplivajo naravnii dejavniki, kot so povprečna dnevna temperatura in vlaga v okolju, prisotnost CD v okolju kmetij ter prisotnost drugih domačih in prostoživečih živali. V primerjavi z zimskim meteorološkim obdobjem na izločanje CD v blatu veliko bolj vpliva poletno, saj poveča možnost izločanja CD pri teletih iz prve starostne skupine (od 0 do 21 dni) celo za 5-krat.

Spremembe fizioloških dejavnikov vplivajo na večje izločanje CD pri govedu. Predvsem ima močan vpliv na izločanje CD na kmetijah spremembu prehrane. Prihod oziroma rojstvo novih telet tudi poveča verjetnost izločanja CD na kmetijah, na račun večje verjetnosti izločanja CD v njihovem blatu. Za izločanje CD pri teletih druge starostne skupine je zelo pomembna LS pasma goveda, saj je pri njih v intenzivni proizvodnji povečana možnost izločanja CD za kar 20-krat. Za krave in teleta iz prve starostne skupine je edini dejavnik tveganja spremembu prehrane, medtem ko je za teleta iz tretje starostne skupine dejavnik tveganja poleg

spremembe prehrane tudi možnost paše. Na splošno na prevalenco CD pri teletih najbolj vpliva prihod ali rojstvo novih telet, saj ta poveča možnost za pozitiven rezultat za 4,6-krat.

Toksigeni sevi CD, ki so primerljivi z znanimi človeškimi sevi, so prisotni na srednje velikih kmetijah krav molznic. S pomočjo ribotipizacije in toksinotipizacije sevov CD, izoliranih s srednje velikih kmetij, smo ugotovili prisotnost toksigenih ribotipov 001/072, 002 in 014/020, ki lahko pri ljudeh povzročijo bolezen. Najpogosteje izoliran ribotip v naši raziskavi je bil ribotip 033 toksinotipa XIa (75,5 % v blatu telet), ki pa pri ljudeh ne povzroča bolezni.

Iz okoljskih vzorcev smo izolirali nov netoksigen ribotip SLO 196 in nov toksinotip XIc ribotipa 033 bakterije CD. Iz vzorcev blata telet smo izolirali nov ribotip SLO 195 toksinotipa 0.

Z metodo MLVA smo prvič dokazali prenos sevov CD z ene kmetije na drugo preko prodaje okuženih telet. Poleg tega smo dokazali, da so se CD, izločeni v okolje z blatom kupljenih telet, ohranili in kasneje okužili druga teleta. Med epidemiološko povezanimi rejami krožijo enaki in različni sevi CD. Ugotovili smo tudi, da sevi CD, izolirani iz okolja kmetij, niso nujno enaki sevom, izoliranih iz blata telet na istih kmetijah, temveč so večkrat podobni sevom prisotnih pri teletih na drugih kmetijah.

Na podlagi prevalence in molekularne karakterizacije sevov CD lahko sklepamo, da srednje velike kmetije krav molznic ne predstavljajo večjega tveganja za okužbo ljudi z izvenbolnišničnim CD. Možno je celo, da take kmetije znotraj svoje dejavnosti v lokalni skupnosti in s širjenjem nenevarnih sevov CD v okolje dvigujejo odpornost proti izvenbolnišnični CDI.

V sodelovanju s strokovnjaki iz Slovenije in tujine smo oblikovali mikrotitrsko ploščo za določanje MIC 17 antibiotikov proti CD ter metodo validirali in delno optimizirali. S pomočjo nove plošče MIC smo korak bližje k standarizaciji postopka za določanje odpornosti bakterije CD proti antibiotikom.

Ugotovili smo visoko prevalenco odpornosti proti antibiotikom eritromicin (93 %), daptomicin (68,6 %) in klindamicin (46,6 %). Nekateri sevi CD, ki so bili izolirani v naši raziskavi, so bili odporni proti antibiotikoma rifampicin (5,6 %) in tetraciklin (3,1 %), medtem ko so bili vsi občutljivi za antibiotike metronidazol, vankomicin, fusidna kislina,

moksifloksacin, linezolid in tigeciklin. Nekateri sevi so imeli visoke ali višje vrednosti MIC za amoksicilin (0,6 %), imipenem (0,6 %), levofloksacin (2,5 %), oksacilin (3,5 %), ceftriakson (1,9 %) in trimetoprim/sulfametoksazol (7,5 %).

Potrdili smo ugotovitve drugih raziskovalcev, da je hkratna odpornost na več antibiotikov vezana bolj na ribotip kot na izvor CD. Tako smo hkratno in visoko stopnjo odpornosti proti eritromicinu, klindamicinu, tetraciklinu in rifampicinu ugotovili le pri sevih CD ribotipa 012. Nižjo stopnjo odpornosti proti rifampicinu, eritromicinu, klindamicinu ter odpornost proti daptomicinu smo ugotovili le pri nekaterih okoljskih sevih CD ribotipa SLO 060. Hkratno odpornost proti klindamicinu, tetraciklinu in daptomicinu, visoko odpornost proti eritromicinu in nizko odpornost proti rifampicinu ter visoko vrednost MIC za amoksicilin smo ugotovili le pri enem sevu CD ribotipa 033.

Ugotovili smo, da je pri okoljskih in govejih sevih bakterije CD prisotna odpornost proti antibiotikom, ki se jih, z izjemo tetraciklina, v slovenski veterinarski medicini ne uporablja. Za antibiotike, ki se v veterinarski medicini redno uporabljajo, pa bo treba določiti epidemiološke mejne vrednosti in spremljati seve z visokimi vrednostnimi MIC.

## 7. POVZETEK

*Clostridium difficile* lahko povzroči bolezni pri živalih in ljudeh. Je najpogostejši povzročitelj drisk po antibiotičnem zdravljenju. Ob bolnišnično pridobljeni CDI je v porastu tudi izvenbolnišnična CDI. Njen glavni vir okužbe še ni znan. Dosedanje raziskave namigujejo, da bi lahko bile glavni vir okužbe živali, saj so pri živalih v intenzivni proizvodnji ugotovili seve CD enakih ribotipov kot pri ljudeh, vendar dokaza o prenosu še ni. Poleg tega še ni znano, kaj vpliva na izločanje CD pri živalih in kakšne so značilnosti sevov CD na kmetijah. Te so za razliko od večjih farm bolj vključene v dejavnosti lokalne skupnosti.

V doktorski nalogi smo raziskali dinamiko izločanja CD na srednje velikih družinskih kmetijah krav molznic v Sloveniji. V ta namen smo uporabili različne teste (qPCR blata, gojitvena preiskava), s katerimi smo na 20 kmetijah 27-krat v obdobju enega leta pregledali vse krave molznice in teleta do šestega meseca starosti. Ob tem smo vsak letni čas pregledali tudi okolje kmetij. S kvantifikacijskim PCR smo ugotavljali število CD v blatu goveda. Statistično smo z univariatno in multivariatno analizo podatkov žeeli ovrednotiti različne dejavnike okolja, menedžmenta in živali, ki bi lahko vplivali na prevalenco CD na kmetijah, pri kravah molznicah in pri teletih. Pri tem smo upoštevali tudi splošno zdravstveno stanje črede. S pomočjo metod ribotipizacije in toksinotipizacije smo ugotavljali, kateri sevi CD so prisotni na takih kmetijah in ali so nevarni za ljudi. Sorodnost med izolati CD z različnih kmetij smo določili s pomočjo metode MLVA. Na koncu je bil naš namen tudi ugotoviti občutljivost živalskih in okoljskih sevov CD za antibiotike, ki se uporablajo v humani in veterinarski medicini, ter na podlagi rezultatov ugotoviti, pri katerih antibiotikih, ki se uporablajo v veterinarski medicini, je potrebna previdna uporaba pri živalih.

V okviru doktorskega dela smo optimizirali in po navodilih MIQE validirali predhodno objavljen protokol za detekcijo gena 16S rDNA CD, ki nam je služil pri ugotavljanju prisotnosti in števila CD v vzorcih blata. Optimiziran protokol ima doslej najnižjo objavljeno mejo detekcije (7,72 CD celic/g blata) in kvantifikacije (77,2 CD celic/g blata), kar nam omogoča direktno detekcijo CD iz blata živali in določitev natančnega števila bakterij CD v vzorcih.

S to metodo smo v obdobju enega leta pregledali 540 skupnih vzorcev krav molznic, 511 skupnih vzorcev telet in 918 individualnih vzorcev telet. Na podlagi skupnih vzorcev smo

ugotovili 10-odstotno prevalenco pri kravah molznicah in 35,6-odstotno prevalenco pri teletih. Na podlagi rezultatov statistične analize podatkov smo ugotovili, da na višjo prevalenco CD na družinskih kmetijah vplivajo spremembe prehrane in zdravljenje krav. Okolje je imelo statistično značilen vpliv samo na skupino telet med 0 in 21 dni starosti, in sicer je bila prevalenca CD v poletnem obdobju višja kot v zimskem. Bolezni krav, predvsem mastitis, in zdravljenje vplivajo na prevalenco izključno pri teletih med 21. in 57. dnem starosti, pri katerih smo opazili tudi vpliv pasme goveda (LS).

Z gojitveno preiskavo smo pregledali vse pozitivne vzorce goveda in vzorce, pridobljene iz okolja kmetij. Ugotovili smo skupno 24 različnih ribotipov in 6 različnih toksinotipov. Med njimi je prevladoval ribotip 033, ki je predstavljal 75,5 % govejih izolatov in 22,6 % okoljskih izolatov. Ugotovili smo tudi nekatere ribotipe CD (001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018, 023, 033, 045 in 081), ki so bili predhodno že izolirani pri ljudeh, med njimi tudi nekatere, ki lahko povzročijo CDI. Prvič smo izolirali seva CD ribotipa SLO 195 in SLO 196 in toksinotip XIc ribotipa 033. Z metodo MLVA smo določili sorodstvene povezave CD znotraj ribotipa 033. Ugotovili smo, da večina govejih klonalnih sevov CD kroži znotraj ene kmetije oziroma znotraj geografsko povezanih kmetij, medtem ko so okoljski sevi CD večkrat v sorodu z govejimi sevi, ki navidezno niso povezani. Dokazali smo tudi prenos govejega seva CD z ene kmetije na drugo preko prodaje teleta.

V okviru raziskave smo vpeljali in validirali novo mikrotitrsko in mikrodilucijsko metodo (Micronaut-S CD plošča MIC) za ugotavljanje občutljivosti za antibiotike. Rezultati testiranja izoliranih sevov CD so pokazali najvišjo stopnjo rezistence za antibiotik eritromicin (93,3-odstotno). Temu sta sledila antibiotika daptomicin (68,6-odstotna rezistenca) in klindamicin (46,1-odstotna rezistenca). Sevi CD ribotipa 012 so pokazali visoko multirezistenco na antibiotike eritromicin, klindamicin, rifampicin in tetraciklin. Zanimiva je ugotovitev, da so živalski in okoljski sevi v veliki večini rezistentni na antibiotike, ki se jih v slovenski veterinarski medicini ne uporablja.

V nalogi smo vpeljali statistično podprt sistem določanja dinamike izločanja bakterije CD v rejah krav molznic, ki ima veliko epidemiološko vrednost. Poleg tega smo optimizirali in validirali dve novi metodi, uporabni za diagnostiko in kontrolo CDI. Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da nižja prevalenca CD na družinskih kmetijah in redka prisotnost toksigenih sevov CD, ki povzročajo CDI pri ljudeh, pomeni, da imajo družinske kmetije v lokalni

skupnosti bolj indikativno, če ne celo preventivno vlogo v epidemiologiji izvenbolnišnične CDI.

## 8. SUMMARY

*Clostridium difficile* can cause illness in animals and humans, and is the most common cause of antibiotic induced diarrhea. Besides the growing rate of nosocomial CDI, community-acquired CDI has also increased. Animals have been suggested as a source for community-acquired CDI and studies have shown that animal and human strains of CD overlap, although transmission of CD between species has yet to be proven. Besides that, factors that contribute to increase CD shedding in animals are not known, as it is not known what type of strains are found on farms that are fully integrated in the activities of the local community.

The scope of this doctoral thesis was to explore CD dynamics on middle-size family dairy farms in Slovenia. For this reason, different methods (fecal qPCR, bacterial culture) were used to examine all dairy cows and calves to six month of age, 27-times during one year on 20 farms. Also, environmental samples were taken from each farm during every season. With quantitative PCR we determined, if the number of shed CD is influenced by calves' age. Statistical univariate and multivariate mixed effect model were used to analyse risk factors that would influence CD prevalence from the environment, farms management and animals. In doing that, farms health status was also taken into account. Ribotyping and toxinotyping methods were used to determine, if CD strains present on such farms pose any danger for humans. To determine the degree of genetic relatedness between different CD strains MLVA was used. At the end, our scope was also to determine the antibiotic susceptibility of animal and environmental CD strains to antibiotics used in human and veterinary medicine. Based on the this results, we could identify antibiotics, prescribed in veterinary medicine, that need caution use.

In our study, a previously published qPCR protocol for the detection of 16S rDNA CD gene was optimized and validated following MIQE guidelines, which was used for detection and quantification of CD in fecal samples. The newly optimized qPCR protocol has the lowest limit of detection (7,72 CD cells/g feces) and quantification (77,2 CD cells/g feces) publish to date and is suitable for direct detection of CD from fecal samples and enables precise quantification.

Altogether, 540 pooled dairy cow samples, 511 pooled and 918 individual calves samples were screened for CD. Based on results of pooled samples, a 10% CD prevalence in dairy

cows and a 35,6% CD prevalence in calves, were found. Major risk factors that contribute to increased CD prevalence on farms arrise from farm management and animals health status, such as change in diet and treatment of cows. Environmental factors showed statistically significant results only in calves aged from 0 to 21 days, where they was a higher CD prevalence in summer when compared to winter season. Treatment and diseases in cows, especially mastitis were recognized as major risk factors only in calves aged from 21 to 57 days. Interestingly, in this group of calves, those who were of Simmental breed had also a higher chance of shedding CD, than Black and white calves.

All positive pooled cattle samples and farms environmental samples were examined using culture method. Altogether, 24 different ribotypes and 6 different toxinotypes were determined. *Clostridium difficile* ribotype 033 was most predominant, representing 75,5% of cattle and 22,6% of environmental CD isolates. *Clostridium difficile* ribotypes 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018, 023, 033, 045 in 081 that were previously found in humans, were also identified and some can cause human CDI. For the first time, CD ribotype SLO 195 and SLO 196 were cultured. Also a new toxinotype XIc was identified in some strains of CD ribotype 033. All CD ribotype 033 were later analysed with MLVA to determine their genetical relations, where we discovered that most clonal cattle CD isolates circulate within each farm or within farms in the same geographic region. On the other hand, environmental CD isolated from one farm were frequently closely related to cattle CD isolates from another farm, which were seemingly unconnected. Also, a transmission of a CD isolate from one farm to another with selling and buying of a calf was proved.

During the course of this study a new microtiter microdilution method (Micronaut-S CD MIC plate) was optimized and validated. The highest level of resistance was for erithromycin (93,3%), followed by daptomycin (68,6%) and clindamycin (46,1%). *Clostridium difficile* ribotype 012 showed high multidrug resistance for erithromycin, clindamycin, rifampicin and tetracycline. Interestingly, animal and environmental CD strains were mostly resistant to antibiotics, which are not used in Slovenian veterinary medicine.

In conclusion, a statistically supported system for evaluation of the dynamics of CD shedding in dairy farms was implemented, which has a great epidemiological value. Two new methods were optimized and validated for better diagnosis and control of CDI. In the end, results show that middle-size dairy farms do harbor some CD strains that could be dangerous to humans,

although their prevalence is low. Based on results found in this study, we could conclude that family farms have in their local communities a more indicative, if not a more preventive role in the epidemiology of community-acquired CDI.

## 9. ZAHVALE

Sprva naj povem, da si nikoli nisem želeta doktorata. Po zadnjem izpitu na faksu sem si rekla, da je zame konec izpitov in take oblike stresa. Kot se vidi, je obveljal pregovor, da se zarečenega kruha največ pojde.

Sreča sem imela, da sem v obdobju pred začetkom MRja dobila delo kot terenski veterinar. Pod mentorstvo me je vzel *France Briški*, ki je eden izmed tistih mentorjev-veterinarjev z ogromno znanja in izkušenj, ki ga spretno in uspešno prenasa na svoje vajence. Da se vsakič znova veselim dela na terenu, da to delo uspešno opravljam in da sem imela možnost izkoristiti njegove stranke za svoj doktorat, se imam zahvaliti izključno njemu. HVALA!

*Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije* za štipendijo mladega raziskovalca.

Mentorju, *dr. Matjažu Ocepku* za preprostost in podporo tekom MRja. Vem, da lahko računam na vas.

Somentorici *dr. Maja Rupnik* za vso opravljeno ribotipizacijo/toksinotipizacijo in konstruktivne komentarje.

*Dr. Céline Harmanus* iz Nizozemske, da me je rešila iz MLVA more; podjetju *Micronaut*, ker smo jih uspeli prepričati o pomembnosti MIC plošč za *C. difficile*, *dr. Aleksandri Vergles-Rataj* za požrtvovalnost in neštete ure iskanja parazitov in *dr. Roku Blagusu* za statistični plan vzorčenja in obdelavo podatkov.

Seveda vsem "mojim" kmetom, ki so bili vseskozi tekom vzorčenja res enkratni in brez njih ter njihovega sodelovanja ne bi mogli izpeljati tako ambicioznega vzorčenja. Vsem še enkrat HVALA!

Moji "cimri" *Katarini*, brez katere bi se v svetu standardov, krivulj, qPCRjev, sond takih in drugačnih, totalno izgubila. Naučila me je natančnosti, pazljivosti (kar veterinarjem velikokrat manjka) in predvsem delat stvari tako kot je treba. Poleg tega, mi je bila in je v veliko moralno podporo.

Moji drugi "cimri" *Alenki* in malo bolj oddaljeni cimri v podtlaku, *Milojki*, ki najbolj vesta, kaj vse smo "čarali" v LMB prostorih. Hvala za vse nasvete, spodbude, razumevanje in pomoč.

Nekoliko v presledkih, zaradi porodniške, ampak nič manj pomembna je tu *Darja*, ki se ji moram zahvalit za svojo pozitivno energijo, strokovnost in pozornost na podrobnosti. Veliko je prispevala, na boljše in kvalitetnejše delovno okolje. En velik HVALA gre tudi *Urški Jamnikar-Ciglenečki*, ki se je v zelo kratkem obdobju izkazala za zelo dobro "cimro" od katere sem se veliko naučila. Vse skupaj štejem v molekularni Dream team! ☺

Za pomoč in mnenje pri izdelavi MIC plošč se moram zahvaliti poleg že drugje omenjenih tudi *Majdi Golob*, *dr. Tini Pirš*, *dr. Ireni Zdovc*, *Olgji* in *dr. Scott Weese-u*. Za prijetno vzdušje in vsesplošno pomoč pa tudi *Nataši*, *Magdi*, *Maji Lepen*, *Ireni Klasinc* in ostalim IMPjevcem/VFjevcem. *Maji Kavalič* pa tudi za pomoč pri vzorčenju okolja in delu v laboratoriju. Zahvale gredo tudi na virološki del inštituta in sicer, sošolki *Danijeli*, *Poloni*, *Urški Kuhar*, *dr. Ivanu Toplaku* in *dr. Petru Hostniku* za pomoč pri doktoratu in drugih projektih, *dr. Marko Cotmanu* za trud pri MLVA (ni nam bilo usojeno), *Alešu Budkoviču* za računalniško pomoč in *mag. Mateji Stvarnik* za dobro voljo med papirno vojno in prijaznost.

Članom komisije, *dr. Branetu Krtu*, *dr. Maji Sočan* in *dr. Jožetu Stariču* za natančen pregled in predloge za izboljšanje doktorskega dela.

Vodji Centra za informatiko in knjižnico na Veterinarski fakulteti *mag. Giti Grečs-Smole* za natančen pregled citirane literature in lektorici *Vidi Meško* za lektoriranje doktorskega dela.

*Olgji Frlic* za splošno podporo, skupno učenje, dolge sprehode, pomoč pri vzorčenju in še bi lahko naštevala ☺. Hvala *Tjaši Kompari*, *dr. Tomiju Trilarju* in še vsem ostalim prijateljem doma in v tujini.

Moji super družini (*ata, mama* in *sestra Mojca*), ki me brezpogojno podpira in spoštuje, ter moji psički *Sambi-ki* za 16 let veselja. Hvala tudi podaljšani družini *Gorazdu*, *Diani*, *Katjuši*, *Tonetu* in ostalim, za vso pomoč pri doktoratu in tudi drugače.

Mojemu *Modestu*, ki je res najbolj odgovoren za uspešno zaključitev raziskave in tega doktorata. Kot "skriti" mentor in idejni vodja, kot strokovna in moralna podpora, mi je vedno pomagal in stal ob strani. Tudi takrat, ko je bilo treba ob 5h zjutraj pri -15°C na vzorčenje s službenim avtom z zaledenelimi šipami brez delujočih brisalcev. Če bi jaz vozila, ne bi daleč prišla.

## 10. LITERATURA

- Ackermann G, Degner A, Cohen SH, Silva J Jr, Rudloff AC. Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS (B)) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 599–603.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Mayers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403–10.
- 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.
- Al saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol* 1996; 45(2): 133–7.
- Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, et al. Use of selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 5341–3.
- 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.
- Avberšek J, Janežič S, Pate M, et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe* 2009; 15(6): 252–5.
- 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.
- Baines SD, Noel AR, Huscroft GS, et al. Evaluation of linezolid for the treatment of *Clostridium difficile* infection caused by epidemic strains using an in vitro human gut model. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (7): 1537–46.
- Baines SD, O'Connor R, Freeman J, et al. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(5): 1046–52.
- Bakker D, Corver J, Harmanus C, Goorhuis A, Keessen EC, Fawley WN. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates based on multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3744–9.
- Balamurugan R, Balaji V, Ramakrishna BS. Estimation of faecal carriage of *Clostridium difficile* in patients with ulcerative colitis using real time polymerase chain reaction. *Indian J Med Res* 2008; 127(5): 472–7.
- Bandelj P, Logar K, Usenik AM, Vengušt 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.

Bandelj P, Trilar T, Blagus R, et al. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European barn swallows (*Hirundo rustica*) during migration.

BMC Vet Res 2014; 10: e40 (4 str.).

<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-10-40.pdf> (12.11.2014)

Barbut F, Monot M, Rousseau A, et al. Rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection by multiplex real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(10): 1279–85.

Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011; 377(9759): 63–73.

Båverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. Vet Q 2002; 24(4): 203–19.

Båverud V, Franklin A, Gunnarsson A, Gustafsson A, Hellander-Edman A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. Equine Vet J 1998; 30(6): 482–8.

Båverud V, Gustafsson A, Franklin A, Lindholm A in A Gunnarsson. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics.

Equine Vet J 1997; 29(4): 279–84.

Båverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspán A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility.

Equine Vet J 2003; 35(5): 465–71.

Båverud V, Gunnarsson A, Karlsson M, Franklin A. Antimicrobial susceptibility of equine and environmental isolates of *Clostridium difficile*. Microb Drug Resist 2004; 10(1): 57–63.

Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett 1999; 175(2): 261–6.

Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998; 40(1): 1–15.

Bignardi GE, Settle C. Different ribotypes in community-acquired *Clostridium difficile*. J Hosp Infect 2008; 70(1): 96–8.

Bolton RP, Tait SK, Dear PRF, Losowsky MS. Asymptomatic neonatal colonisation by *Clostridium difficile*. Arch Dis Child 1984; 59(5): 466–72.

Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl C): 13–9.

Borriello SP, Honour P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. J Clin Pathol 1981; 34(10): 1124–7.

Brazier JS. The diagnosis of *C. difficile*-associated disease. J Antimicrob Chemother 1998; 41(Suppl C): 47–57.

Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(5): 741–2.

Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories.

*Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (3): 604–30.

Bustin SA, Zaccara S, Nolan T. An introduction to the real-time polymerase chain reaction. In: Filion M, eds. Quantitative real-time PCR in applied microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2012: 3-25.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611–22.

Cho SM, Lee JJ, Yoon HJ. Clinical risk factors *Clostridium difficile*-associated diseases. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(3): 256–61.

Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2197–203.

Clooten J, Kruth S, Arroyo L, Weese JS. Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet Microbiol* 2008; 129(1/2): 209–14.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013: (CLSI document M100-S23)

Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA).

*Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31(5): 431–55.

Cohen SH, Tang YJ, Silva J Jr. Molecular typing methods for the epidemiological identification of *Clostridium difficile* strains. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1(1): 61–70.

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 Microbiol* 2011; 152: 379–84.

Costa MC, Reid-Smith R, Gow S, et al. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from feedlot beef cattle upon arrival and mid-feeding period. *BMC Vet Res* 2012; 8: e38 (7 str.).

<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-8-38.pdf> (12.11.2014)

Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: An underappreciated and increasing cause of death and complications.

*Ann Surg* 2002; 235(3): 363–72.

Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. Biochem J 2011; 436 (3): 517–26.

Debast SB, van Leengoed LAMG, 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.

Delmee M, Homel M, Wauters G. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. J Clin Microbiol 1985; 21(3): 323–7.

Denéve C, Janoir C, Delomenie C, Collignon A. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expresion. J Med Microbiol 2008; 57(6): 732–8.

Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, et al. Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2013; 68(9): 1951–61.

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.

Diab SS, Songer G, Uzal FA. *Clostridium difficile* infection in horses: a review.  
Vet microbiol 2013; 167(1/2): 42–9.

Doosti A, Mokhtari-Farsani A. Study of the frequency of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA and cdtB genes in feces of calves in south west of Iran.

Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014; 13: e21 (6 str.).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060091/pdf/1476-0711-13-21.pdf> (12.11.2014)

Drackley JK. Calf nutrition from birth to breeding.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 2008; 24(1): 55–86.

Dubberke ER, Wertheimer AI. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30(1): 57–66.

Eckert C, Vromman F, Halkovich A, Barbut F. Multilocus variable-number tandem repeat analysis: a helpful tool for subtyping French *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates. J Med Microbiol 2011; 60(8): 1088–94.

Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cutt-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect 2012; 18(8): E266–72.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters; version 3.1. Basel: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013.

<http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=222> (14.11.2013)

European Commission. Agriculture and rural development. Brussels: European Commission, 2013.

[http://ec.europa.eu/agriculture/family-farming/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/family-farming/index_en.htm) (14.11.2013)

Fawley WN, Wilcox MH; *Clostridium difficile* ribotyping network for England and northern Ireland. An enhanced DNA fingerprinting service to investigate potential *Clostridium difficile* infection case clusters sharing the same PCR ribotype.

J Clin Microbiol 2011; 49(12): 4333–7.

Fedorko DP, Williams EC. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*.

J Clin Microbiol 1997; 35(5): 1258–9.

Frazier KS, Herron AJ, Hines II ME, Gaskin JM, Altman NH. Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*).

J Vet Diagn Invest 1993; 5(4): 623–5.

Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 529–49.

Garey DN, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 2008a; 70(4): 298–304.

Garey KW, Salazar M, Shah D, Rodrique R, DuPont HL. Rifamycin antibiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Ann Pharmacother 2008b; 42 (6): 827–35.

Garey KW, Dao-Tran TK, Jiang ZD, Price MP, Gentry LO, Dupont HL. A clinical risk index for *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients receiving broad-spectrum antibiotics. J Hosp Infect 2008c; 70: 142–7.

George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 1979; 9(2): 214–19.

Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078.

Clin Infect Dis 2008; 47(9): 1162–70.

Goorhuis A, Debast SB, Dutilh JC, et al. Type-specific risk factors and outcome in an outbreak with 2 different *Clostridium difficile* types simultaneously in 1 hospital.

Clin Infect Dis 2011; 53(9): 860–869.

Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clin Infect Dis 2010; 51(5): 577–82.

Gürtler V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable lenght 16S-23S rDNA spacer regions. J Gen Microbiol 1993; 139(12): 3089–97.

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.

Gustafsson A, Båverud V, Gunnarsson A, Rantzien MH, Lindholm A, Franklin A. The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. Equine Vet J 1997; 29(4): 314–8.

Hammitt MC, Bueschel DM, Keel MK, et al. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. Vet Microbiol 2008; 127(3/4): 343–52.

Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3(1): 66–98.

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.

Hensgens MP, Goorhuis A, Notermans DW, van Benthem BH, Kuijper EJ. Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. Euro Surveill 2009; 14(45): pii=19402 (3 str.)

<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N45/art19402.pdf> (12.11.2014)

Hines RS, Dickerson S. Pseudomembranous enteritis associated with ciprofloxacin and *Clostridium difficile* in a penguin (*Eudyptes chrysolophus*). J Zoo Wildl Med 1993; 24(4): 553–6.

Hink T, Burnham CAD, Dubberke ER. A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. Anaerobe 2013; 19: 39–43.

Hoegh AM, Nielsen JB, Lester A, Friis-Møller A, Schønning K. A multiplex internally controlled real-time PCR assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile* and identification of hypervirulent strain 027/ST-1.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(6): 1073–9.

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.

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

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.

Houser BA, Soehnien MK, Wolfgang DR, Lysczek HR, Burns CM, Jayarao BM. Prevalence of *Clostridium difficile* toxin genes in the feces of veal calves and incidence of ground veal contamination. Foodborne Pathog Dis 2012; 9(1): 32–6.

Iizuka M, Konno S, Itou H, et al. Novel evidence suggesting *Clostridium difficile* is present in human gut microbiota more frequently than previously suspected.  
*Microbiol Immunol* 2004; 48(11): 889–92.

Indra A, Lassnig H, Baliko N, et al. *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent?  
*Wien Klin Wochenschr* 2009; 121(3/4): 91–5.

Janežič S, Indra A, Allerberger F, Rupnik M. Use of different molecular typing methods for the study of heterogeneity within *Clostridium difficile* toxinotypes V and III.  
*J Med Microbiol* 2011; 60(8): 1101–7.

Janežič S, Ocepek M, Zidarič V, Rupnik M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates.  
*BMC Microbiol* 2012; 12: e48 (8 str.)  
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-12-48.pdf> (12.11.2014)

Janežič S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: Pulse-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol* 2010; 646: 55–65.

Janežič S, Zidarič V, Pardon B, et al. International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains.  
*BMC Microbiol* 2014; 14: 173 (doi: 10.1186/1471-2180-14-173).

Jayarantne PA, Monkman L, Broukhanski G, Pillai DR, Lee C. Real-time polymerase chain reaction method for detection of toxigenic *Clostridium difficile* from stool and presumptive identification of NAP1 clone. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75(2): 121–3.

Jawa RS, Mercer DW. *Clostridium difficile*-associated infection: a disease of varying severity. *Am J Surg* 2012; 204(6): 836–42.

Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(7): 1039–45.

Johal SS, Lambert CP, Hammond J, James PD, Borriello SP, Mahida YR. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and nonrecurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol* 2004; 57(9): 973–9.

Jovanovac S, Kuterovac K, Bulić V, Rimac D. Milk production in recorded cows in the last ten years in Croatia. *Acta Agric Slov* 2004; 8(S1): 145–51.

Kalchayanand N, Arthur TM, Bosilevac JM, et al. Isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with beef cattle and commercially produced ground beef.  
*J Food Prot* 2013; 75(2): 256–64.

Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese JS, Songer JG. Prevalence of PCR Ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species.  
*J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1963–4.

Keessen EC, Gaastra W, Lipman LJ. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol* 2011; 153(3/4): 205–17.

Keessen EC, Hensgens MPM, Spigaglia P, et al. Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet *Clostridium difficile* PCR-ribotype 078.

*Antimicrob Resist Infect Control* 2013; 2: e14 (6 str.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3651393/pdf/2047-2994-2-14.pdf> (12.11.2014)

Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, et al. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest* 1994; 93(4): 1257–65.

Kelly CP, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*.

*J Med Microbiol* 2011; 60(8): 1070–9.

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.

Kim PH, Iaconis JP, Rolfe RD. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileoceccitis and transfer of protection to infant hamsters.

*Infect Immun* 1987; 55(12): 2984–92.

Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001–2006. *Pediatrics* 2008; 122(6): 1266–70.

Kiss D, Bilkei G. A new periparturient disease in Eastern Europe, *Clostridium difficile* causes postparturient sow losses. *Theriogenology* 2005; 63(1): 17–23.

Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveill* 2013; 18(4): e20381 (11 str.)

<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N04/art20381.pdf> (12.11.2014)

Knight DR, Thean S, Putsathit P, Fenwick S, Riley TV. Cross-sectional study reveals high prevalence of *Clostridium difficile* non-PCR ribotype 078 strains in Australian veal calves at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(8): 2630–5.

Knoop FC. Clindamycin-associated enterocolitis in guinea pigs: evidence for a bacterial toxin. *Infect Immun* 1979; 23(1): 31–3.

Koene MGJ, Mevius D, Wagenaar JA, et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates.

*Clin Microbiol Infect* 2012; 18(8): 778–84.

Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for Clostridium difficile, EU Member States, European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe.

Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 6): 2–18.

Kuijper EJ, Oudbier JH, Stuifbergen WN, Jansz A, Zanen HC. Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. J Clin Microbiol 1987; 25(4): 751–3.

Kuijper EJ, van den Berg RJ, Brazier JS. Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. Methods Mol Biol 2009; 551: 159–71.

Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. N Engl J Med 2000; 342(6): 390–7.

Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea.

Lancet 2001; 357(9251): 189–93.

Larson KC, Belliveau PP, Spooner LM. Tigecycline for the treatment of severe *Clostridium difficile* infection. Ann Pharmacother 2011; 45 (7/8): 1005–10.

Levett PN. Detection of *Clostridium difficile* in faeces by direct gas liquid chromatography. J Clin Pathol 1984; 37(2): 117–9.

Levett PN. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* determined by disc diffusion and breakpoints methods. J Antimicrob Chemother 1988; 22(2): 167–73.

Logar K, Kopinč R, Bandelj P, Starič J, Lapanje A, Ocepek M. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. BMC Vet Res 2012; 8: e49 (10 str.)

<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-8-49.pdf> (12.11.2014)

Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 2011; 364(5): 422–31.

Luna RA, Boyanton BL, Mehta S, et al. Rapid stool-based diagnosis of *Clostridium difficile* infection by real-time PCR in a children's hospital. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 851–7.

Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988; 1(1): 1–18.

Manzoor SE, Tanner HE, Marriott CL, et al. Extended multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Clostridium difficile* correlates exactly with ribotyping and enables identification of hospital transmission. J Clin Microbiol 2011; 49(10): 3523–30.

- Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J Clin Microbiol* 1992; 30(2): 514–6.
- Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in hospitals. *J Clin Microbiol* 2006; 44(7): 2558–66.
- Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Sensitive quantification of *Clostridium difficile* by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) targeting rRNA molecules. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(15): 5111–8.
- Mattila E, Arkkila P, Mattila PS, Tarkka E, Tissari P, Anttila VJ. Extraintestinal *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2013; 57(6): e148–53 (6 str.)  
<http://cid.oxfordjournals.org/content/57/6/e148.full.pdf+html> (12.11.2014)
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005; 353(23): 2433–41.
- McNamara SE, Abdujamilova N, Somsel P, Gordonillo MJ, Dedecker MJ, Bartlett PC. Carriage of *Clostridium difficile* and other enteric pathogens among a 4-H avocational cohort. *Zoonoses Public Health* 2011; 58(3): 192–9.
- Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol* 2011; 152: 212–5.
- Mulligan ME, Peterson LR, Kwok RY, Clabots CR, Gerding DN. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1988; 26(1): 41–6.
- Mutters R, Nonnenmacher C, Susin C, Albrecht U, Kropatsch R, Schumacher S. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. *J Hosp Infect* 2009; 71(1): 43–8.
- Naaber P, Stsepetova J, Smidt I, et al. Quantification of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated-diarrhea patients. *J Clin Microbiol* 2011; 49(10): 3656–8.
- Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, et al. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (9): CD004610 (doi: 0.1002/14651858.CD004610.pub4).
- Norén T, Alriksson I, Akerlund T, Burman LG, Unemo M. In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993–2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(8): 1104–10.
- 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.

Oltenacu PA, Broom DM. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim Welfare* 2010; 19(S): 39–49.

Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1647–50.

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.

Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004; 171(5): 466–72.

Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45 (6 str.).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/pdf/gne045.pdf> (12.11.2014)

Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, et al. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. *J Med Microbiol* 2013; 62(9): 1478–1485.

Pirš T, Ocepek M, Rupnik M. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *J Med Microbiol* 2008; 57(6): 790–2.

Pothoulakis C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8(11): 1041–7.

Rintilla T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2004; 97(6): 1166–77.

Rodriguez-Palacios A, Koohmaraie M, LeJeune JT. Prevalence, enumeration, and antimicrobial agent resistance of *Clostridium difficile* in cattle at harvest in the United States. *J Food Prot* 2011; 74(10): 1618–24.

Rodriguez-Palacios A, Pickworth C, Loerch S, LeJeune JT. Transient fecal shedding and limited animal-to-animal transmission of *Clostridium difficile* by naturally infected finishing feedlot cattle. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(10): 3391–7.

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

Rodriguez-Palacios A, Stämpfli HR, Stalker M, Duffield T, Weese JS. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. *Vet Microbiol* 2007; 124(1/2): 166–72.

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.

Rodriguez C, Taminius B, Van Broeck J, Avesani V, Delmée M, Daube G. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium.

*Anaerobe* 2012; 18(6): 621–5.

Rohlke F, Stollman N. Fecal microbiota transplantation in relapsing *Clostridium difficile* infection. *Therap Adv Gastroenterol* 2012; 5(6): 403–20.

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: 545–8.

Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22(3): 279–84.

Rouphael NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women.

*Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(6): 635.e1–6 (6 str.).

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937808001361#> (12.11.2014)

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.

Rupnik M. *Clostridium difficile* toxinotypes. Maribor: Institute of Public Health; Faculty of Medicine, 2011.

<http://www.mf.uni-mb.si/tox/> (27.11.2013)

Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmee M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates.

*J Clin Microbiol* 1998; 36(8): 2240–7.

Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 2001; 147(2): 439–47.

Rupnik M, Songer JG. *Clostridium difficile*: its potential as a source of foodborne disease. *Adv Food Nutr Res* 2010; 60: 53–66.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(7): 526–36.

Sadeghifard N, Gürtler V, Beer M, Seviour RJ. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 7311–23.

Saiki RK, Scharf S, Falonna F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230(4732): 1350–4.

Sambol SP, Merrigan MM, Tang JK, Johnson S, Gerdin DN. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. J Infect Dis 2002; 186(12): 1781–9.

Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Grossmann E, Seyboldt C. Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. J Med Microbiol 2013; 62(8): 1190–8.

Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR, Shewen PE, Weese JS. Presence and molecular characterization of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in intestinal compartments of healthy horses. BMC Vet Res 2012a; 8: e94 (6 str.).

<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-8-94.pdf> (12.11.2014)

Schoster A, Staempfli HR, Arroyo LG, et al. Longitudinal study of *Clostridium difficile* and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in healthy horses in a community setting. Vet Microbiol 2012b; 159(3/4): 364–70.

Schutze GE, Willoughby RE, Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. *Clostridium difficile* infection in infants and children. Pediatrics 2013; 131(1): 196–200.

Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, et al. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat Genet 2006; 38(7): 779–86.

Simango C, Mwakurudza S. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int J Food Microbiol 2008; 124(3): 268–70.

Skraban J, Dzeroski S, Zenko B, Mongus D, Gangi S, Rupnik M. Gut microbiota patterns associated with colonization of different *Clostridium difficile* ribotypes. PLoS One 2013; 8(2): e58005 (13 str.).

<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0058005&representation=PDF> (12.11.2014)

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.

Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. Anaerobe 2006; 12(1): 1–4.

Songer JG, Jones R, Anderson MA, Barbara AJ, Post KW, Trinh HT. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. Vet Microbiol 2007; 124(3/4): 358–61.

- Songer JG, Post KW, Larson DJ, Jost BH, Glock RD. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health Prod* 2000; 8(4): 185–9.
- Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(10): 2227–34.
- Steele J, Feng H, Parry N, Tzipori S. Piglet models of acute or chronic *Clostridium difficile* illness. *J Infect Dis* 2010; 201(3): 428–34.
- Struble AL, Tang YJ, Kass PH, Gumerlock PH, Madewell BR, Silva J Jr. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: A period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6(3): 342–7.
- Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37(2): 461–3.
- Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 2006; 73(2): 187–97.
- 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.
- Tanner HE, Hardy KJ, Hawkey PM. Coexistence of multiple multilocus variable-number tandem-repeat analysis subtypes of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 strains within fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2010; 48(3): 985–7.
- Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Can molecular amplification methods move us out of uncertainty? *J Mol Diagn* 2011; 13(6): 573–82.
- Thitaram SN, Frank JF, Lyon SA, et al. *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J Food Prot* 2011; 74(1): 130–3.
- Toma S, Leslak G, Magnus M, Lo HL, Delmée M. Serotyping of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1988; 26(3): 426–8.
- van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 1024–8.
- Vaishnavi C. Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated disease. *Indian J Med Res* 2010; 131: 487–99.
- Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes* 2012; 3(2): 121–34.

- Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005; 18(2): 247–63.
- Waters EH, Orr JP, Clark EG, Schaufele CM. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. J Vet Diagn Invest 1998; 10(1): 104–8.
- Weese JS. *Clostridium difficile* in food – innocent bystander or serious threat? Clin Microbiol Infect 2010; 16(1): 3–10.
- 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.
- 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(4): 1100–4.
- Weese JS, Wakeford T, Reid-Smith R, Rousseau J, Friendship R. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. Anaerobe 2010b; 16 (5): 501–4.
- Wilcox MH, Fawley WN, Parnell P. Value of lysozyme agar incorporation and alkaline thioglycollate exposure for the environmental recovery of *Clostridium difficile*. J Hosp Infect 2000; 44(1): 65–9.
- Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety R. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 1982; 15(3): 443–6.
- Wong SS, Woo PC, Luk WK, Yuen KY. Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(1): 1–6.
- Wroblewski D, Hannett GE, Bopp DJ, et al. Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2142–8.
- 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.
- Zelenik K, Avberšek J, Pate M, et al. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission: a case report. Zoonoses Public Health 2014; 61(4): 238–41
- Zidarič V, Zemljič M, Janežič S, Kocuvan A, Rupnik M. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. Anaerobe 2008; 14(6): 325–7.

Zidarič V, Pardon B, dos Vultos T, et al. Different antibiotic resistance and sporulation properties within multiclonal *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078, 126, and 033 in a single calf farm. Appl Environ Microbiol 2012; 78(24): 8515–22.

## 11. PRILOGE

### 11.1. Rezultati optimizacije qPCR za 16S rRNA gen bakterije CD in učinkovitost izolacije DNA iz blata goveda

Tabela 10: Rezultati optimizacije qPCR protokola za 16S rRNA gen bakterije CD

Table 10: Optimization results for CD qPCR 16S rRNA gene

Št. eksperimenta	Dinamični razpon detekcije <sup>a</sup> / Dinamični razpon kvantifikacije <sup>a</sup>	Linearna regresija			CV znotraj poskusa [%]	CV med poskusi [%]	LOQ (povprečje Cq)
		Naklon (k)	R <sup>2</sup>	E [%]		<b>1,81 - 21,12</b>	
1	7,72x10 <sup>7</sup> – 7,72 / 7,72x10 <sup>7</sup> – 77,2	-3,4888	0,9993	93,48	1,33 - 18,03		35,08
2	7,72x10 <sup>7</sup> – 7,72 / 7,72x10 <sup>7</sup> – 77,2	-3,5689	0,9989	90,63	1,29 - 12,99		35,57
3	7,72x10 <sup>7</sup> – 7,72 / 7,72x10 <sup>7</sup> – 77,2	-3,4924	0,9993	93,35	1,30 - 30,23		34,74

E – učinkovitos pomnoževanjat, R<sup>2</sup> – koeficient korelacije, CV – koeficient variacije, LOQ – spodnja meja kvantifikacije, <sup>a</sup> – število bakterij CD/0,5g blata goveda

Tabela 11: Učinkovitost izolacije DNA iz blata goveda

Table 11: Efficiency of DNA isolation from cattle feces

Št. eksperimenta	Dinamični razpon detekcije <sup>a</sup> / Dinamični razpon kvantifikacije <sup>a</sup>	Linearna regresija			CV znotraj poskusa [%]	CV med poskusi [%]	LOQ (povprečje Cq)
		Naklon (k)	R <sup>2</sup>	E [%]		<b>3,71 - 9,57</b>	
1	3,86x10 <sup>6</sup> – 3,86 / 3,86x10 <sup>6</sup> – 38,6	-3,6509	0,9961	87,89	6,98 - 28,57		37,27
2	3,86x10 <sup>6</sup> – 3,86 / 3,86x10 <sup>6</sup> – 38,6	-3,5595	0,9957	90,96	5,31 - 19,17		37,02
3	3,86x10 <sup>6</sup> – 3,86 / 3,86x10 <sup>6</sup> – 38,6	-3,6303	0,9968	88,56	7,33 - 13,89		37,36

E - učinkovitost, R<sup>2</sup> – koeficient korelacije, CV – koeficient variacije, LOQ – meje kvantifikacije, <sup>a</sup> – število bakterij CD/0,5g blata goveda

### 11.2. Dinamika izločanja CD pri teletih med raziskavo

Tabela 15: Rezultati kvantifikacije CD v blatu večkrat pozitivnih telet

Table 15: Quantification results for CD in feces of calves that were positive multiple times

Tele										
<b>26</b>	Starost (dni)	11	25	39	53	67	81	95	109	123
	Število CD	274108	0	0	0	0	0	0	631	0
<b>27</b>	Starost (dni)	12	25	40						
	Število CD	10811054	938	0						
<b>28</b>	Starost (dni)	2	16	30	44	58	72			
	Število CD	0	105727	0	0	LOQ	0			
<b>29</b>	Starost (dni)	9	23	37	51					
	Število CD	2919	0	LOQ	0					
<b>30</b>	Starost (dni)	7	21	35						
	Število CD	2589994	1152	0						
<b>31</b>	Starost (dni)	4	18	32	46					
	Število CD	0	806	38702	LOQ					
<b>32</b>	Starost (dni)	7	21	35						
	Število CD	9630	1827	0						
<b>33</b>	Starost (dni)	6	20	34						
	Število CD	1587504	5278	0						
<b>34</b>	Starost (dni)	9	23	37	51	65	79	93		
	Število CD	3906984	1316	1055	0	0	783	0		
<b>35</b>	Starost (dni)	13	27	42	55	69	83	97		
	Število CD	53735	66424	LOQ	20396	0	LOQ	0		
<b>36</b>	Starost (dni)	12	26	40	54	68				
	Število CD	842730	1084	0	304	0				
<b>37</b>	Starost (dni)	3	17	31	45	59				
	Število CD	7260792	1346	632	LOQ	0				
<b>38</b>	Starost (dni)	5	19	33	47	61	75			
	Število CD	11629	137	3715	0	723	0			
<b>39</b>	Starost (dni)	34	48	62	76	90				
	Število CD	294	0	0	LOQ	0				
<b>40</b>	Starost (dni)	9	23	37	51					
	Število CD	207	LOQ	LOQ	0					
<b>41</b>	Starost (dni)	10	24	38						
	Število CD	428	401	0						
<b>42</b>	Starost (dni)	6	20	34						
	Število CD	28022	779	0						
<b>43</b>	Starost (dni)	20	34	48	62	76	90	104	118	132
	Število CD	0	30971	0	0	0	0	0	0	LOQ
<b>44</b>	Starost (dni)	9	22	37						
	Število CD	3593368	4064	0						
<b>45</b>	Starost (dni)	8	21	36						
	Število CD	678040	1627	0						
<b>46</b>	Starost (dni)	11	25	39	53	67	81			
	Število CD	129	13724	0	0	537	0			
<b>47</b>	Starost (dni)	0	14	28	42	56				
	Število CD	0	3200151	7897	2160	0				
<b>48</b>	Starost (dni)	12	26	40						
	Število CD	48901	8297	0						

LOQ – pod mejo kvantifikacije

### 11.3. Število CD v blatu goveda pri teletih, ki so bila med vzorčenji samo 1-krat pozitivna

Tabela 16: Rezultati kvantifikacije CD v blatu 1-krat pozitivnih telet (0-21 dni)

Table 16: Quantification results for CD in feces of calves with single positive sample (0-21 days)

Starost (dni)	Število CD								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>0</b>	126	1063	324	2997	22058				
<b>1</b>	453	2015	1010999						
<b>2</b>	3673	3746	17778	26562	742	LOQ			
<b>3</b>	14080	6854	631	148	15386	35678	1241893	793	
<b>4</b>	14070	176509	3060471	1812	309534	206422	6279	465	387
<b>5</b>	769	3639	776376	6516	249096	618			
<b>6</b>	966	24861							
<b>7</b>	23203	3614	165202						
<b>8</b>	896280	5440930	8504	1083	2303	562	9010042	1889085	667
<b>9</b>	2378	11188	932	1483	LOQ				
<b>10</b>	1374886	45473	14966	1219	3425663				
<b>11</b>	468	9341018							
<b>12</b>	104	471							
<b>13</b>	178	474							
<b>14</b>	913	641							
<b>15</b>	129	1399							
<b>16</b>	657	28544							
<b>17</b>	2707	LOQ							
<b>18</b>	/								
<b>19</b>	341	3188							
<b>20</b>	/								
<b>21</b>	21211								

LOQ – pod mejo kvantifikacije

Tabela 17: Rezultati kvantifikacije CD v blatu 1-krat pozitivnih telet (22-180 dni)

Table 17: Quantification results for CD in feces of calves with single positive sample (22-180 days)

Starost (dni)	Število CD
22	6254
23	LOQ
25	LOQ
26	22303
27	158
30	LOQ
33	LOQ
41	276
43	382
47	LOQ
48	LOQ
56	LOQ
67	LOQ
81	LOQ
82	LOQ (2X)
102	LOQ
107	579
114	LOQ
120	LOQ
127	LOQ
130	256
133	1677
136	LOQ
139	629
150	227
155	177
160	756
169	LOQ

LOQ – pod mejo kvantifikacije

#### 11.4. Rezultati MLVA

Tabela 23: Primerjava rezultatov MLVA za CD ribotip 033

Table 23: Comparison of MLVA results for CD ribotype 033

Vzorec	Ribotip	št. TP MLVA (Slovenija)						št. TP MLVA (Nizozemska)						
		CdA6	CdB7	CdC6	CdE7	CdG8	CDR60	CDR5	CdB7	CdC6	CdE7	CdF3	CdH9	CdG8*
T1/1/10	033	10	10	10			2	8	24	10	7	4	2	12
T2/4/2	033	10	10	3/11			2		20	10	8	4	2	18
T2/5/2	033	10	10				2		20	10	8	4	2	18
T3/4/2	033	10	10	3			2		20	9	8	4	2	18
T4/6/2	033	10	10	11			2		20	9	8	4	2	18
T5/4/6	033	10	8	11			2		20	8	8	4	2	9
T6/10/5	033	10	8	11	9		2		20	8	8	4	2	9
T7/13/5	033	10	8	11	9		2		20	8	8	4	2	9
T8/19/5	033	10	8	11	9		2		20	8	8	4	2	9
T9/22/5	033	10	8	2			2		20	8	8	4	2	9
T10/22/6	033	10	8	2			2		20	8	8	4	2	9
T10/23/6	033	10	8	12			2		20	8	8	4	2	9
T11/22/6	033	10	8	2			2		20	8	8	4	2	9
T11/23/6	033	10	8	2			2		20	8	8	4	2	9
T12/6/5	033	10	8				2		20	10	8	4	2	9
T13/3/5	033	10	8	3			2		20	9	8	4	2	9
T14/2/18	033	10	10	3/11			2		25	10	8	4	2	10
T15/16/18	033	10	10				2		25	10	8	4	2	10
T15/17/18	033	10	10	11			2		25	10	8	4	2	10
T16/23/18	033	10	10	2			2		25	10	8	4	2	10
T16/24/18	033	10	10	2			2		25	10	8	4	2	10
T17/27/18	033	10	10	10			2		25	10	8	4	2	10
T18/14/2	033	10	10	11			2		20	10	8	4	2	19
T19/7/16	033	10	9	11			2		22	9	8	4	2	9
T19/8/16	033	10	9	2			2		23	9	8	4	2	19
T19/9/16	033								21	9	8	4	2	16

Vzorec	Ribotip	št. TP MLVA (Slovenija)						št. TP MLVA (Nizozemska)						
		CdA6	CdB7	CdC6	CdE7	CdG8	CDR60	CDR5	CdB7	CdC6	CdE7	CdF3	CdH9	CdG8*
T20/21/16	033		10	9	11	9	2		22	9	8	4	2	9
T20/22/14	033		10	9	14		2		22	9	8	4	2	9
T21/24/14	033								22	9	8	4	2	9
T22/25/16	033		10	9	2		2		22	9	8	4	2	9
T23/27/14	033			9	2		2		22	9	8	4	2	9
T24/5/14	033		10	9			2		19	8	8	4	2	19
T25/22/14	033		10	10	2		2		22	10	8	4	2	19
T26/7/16	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	16
T27/3/15	033		10	9	3		2		21	10	8	4	2	20
T27/4/14	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	15
T28/15/15	033	1	11	9	11		2		21	9	8	4	2	19
T28/16/15	033								21	10	8	4	2	20
T29/1/17	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	23
T30/9/17	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	23
T31/9/17	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	23
T32/11/17	033			9	11				22	9	8	4	2	23
T33/17/17	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	23
T34/21/17	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	23
T34/22/17	033								22	9	8	4	2	23
T35/21/15	033		10	9	11		2		22	9	8	4	2	19
T36/25/14	033		10	9	8		2		22	9	8	4	2	19
T36/23/15	033								22	9	8	4	2	19
T38/10/15	033		10	9	11		2	6	21	9	8	4	2	19
T39/11/15	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	19
T39/12/14	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	19
T40/15/15	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	19
T40/16/15	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	20
T41/17/15	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	19
T41/18/15	033								21	9	8	4	2	20
T42/20/15	033								21	9	8	4	2	20
T42/22/15	033								21	9	8	4	2	19
T43/12/14	033		10	9	11		2		21	9	8	4	2	20
T44/25/15	033		10	9	2		2		21	9	8	4	2	20

Vzorec	Ribotip	št. TP MLVA (Slovenija)						št. TP MLVA (Nizozemska)						
		CdA6	CdB7	CdC6	CdE7	CdG8	CDR60	CDR5	CdB7	CdC6	CdE7	CdF3	CdH9	CdG8*
T44/23/15	033								21	9	8	4	2	20
T45/22/15	033								22	9	8	4	2	20
T46/8/4	033	10	9	2			2		16	9	8	4	2	13
T47/9/4	033	10	9	11			2		16	9	8	4	2	13
T48/11/4	033	10	9	11	13		2		16	9	8	4	2	13
T49/14/4	033			9	11	13			16	9	8	4	2	13
T50/18/4	033	10	9				2		16	9	8	4	2	13
T51/18/4	033	10	9	11	13		2		16	9	8	4	2	13
T52/6/4	033	10	9	11			2		16	10	8	4	2	13
T53/23/16	033	10	10	2			2		22	10	8	4	2	20
T54/8/17	033	10	9	11			2		23	9	8	4	2	24
T55/8/17	033	10	9	11			2		23	9	8	4	2	24
T56/21/17	033	10	9	11	43		2		23	9	8	4	2	24
T57/17/1	033	10	14				2		23	14	8	4	2	18
T58/4/17	033	10	9	11			2		23	9	8	4	2	14
T59/11/12	033	10	9	11	14		2		23	9	8	4	2	14
T60/7/4	033	32	10	9	11		2		16	8	8	4	2	13

TP – tandemiske ponovitve

Tabela 24: Rezultati MLVA za okoljske izolate CD ribotip 033

Table 24: MLVA results for environmental isolates of CD ribotype 033

Vzorec	Kmetija	Sezona	Ribotip	št. TP MLVA (Nizozemska)					
				CdB7	CdC6	CdE7	CdF3	CdH9	CdG8*
gnoj	4	Pomlad	033	23	9	8	4	2	19
zemlja	5	Pomlad	033	16	9	8	4	2	13
gnoj	6	Pomlad	033	20	8	8	4	2	9
zemlja	13	Pomlad	033	20	8	8	4	2	9
gnoj	4	Poletje	033	22	8	8	4	2	14
gnoj	5	Poletje	033	16	9	8	4	2	13
gnoj	6	Poletje	033	20	8	8	4	2	9
zemlja	14	Poletje	033	20	8	8	4	2	9
muhe	5	Poletje	033	21	9	8	4	2	16
gnoj	2	Jesen	033	20	8	8	4	2	9
zemlja	2	Jesen	033	20	10	8	4	2	18
zemlja	5	Jesen	033	20	10	8	4	2	18
gnoj	6	Jesen	033	20	8	8	4	2	9
zemlja	15	Zima	033	20	8	8	4	2	9

TP – tandemske ponovitve

Tabela 25: Rezultati MLVA za CD, izoliranih iz govejih vzorcev blata, ki niso ribotip 033

Table 25: MLVA results for CD isolated from cattle feces other than ribotype 033

Tele	Kmetija	Vzorčenje	Ribotip	št. TP MLVA (Slovenija)						
				CdA6	CdB7	CdC6	CdE7	CdG8	CDR60	CDR5
1	1	21	001/072	40	14/34	19	8	12	12	31
2	8	2	002	39	10/13	20	10		2	
3	14	11	002	17	10/24	27	10	7	2	16/18
4	7	25	002	27	10	10	10		2	
5	6	17	003	29	4/34	22	13	2		21
6	3	19	005	33	10	25	14	10	2	9
7	10	10	012	28	16	28	9	4	15	5
8	10	11	012	28	16	28	9			4/5
9	10	16	012	28	16	28	9	4	2	5
10	14	19	012	27	15	14	10	5	15	6
11	7	25	014/020	26	10/14	13	2		2	6
12	5	26	014/020	24	14	25	2	7		17
13	9	2	018	34	11	9	8	8	10	9
14	11	8	023		10	21	11	6	2	3
15	19	12	071	13/28	22	10	10	5		20
16	19	16	071	28	22	14	10	5		2
17	19	11	071							
18	18	10	077	26	13	25	9	9	3	17
19	18	14	077	26	10/13	25	9	9	2/3	17
20	18	11	077							
21	18	14	SLO 029	23	10	21	9	8	2	11
22	11	12	SLO 036	39	13	20	6	24	3	20
23	8	5	SLO 084	12	10	22	8		2	13
24	8	6	SLO 084	12	10/26	23/32	8		2	
25	8	19	SLO 116	28	6	23	11	15		22
26	10	10	SLO 195	29	34	23	5	4		7

TP – tandemске ponovitve

## 11.5. Validacija plošč Micronaut-S CD MIC

Tabela 26: Kontrola zanesljivosti plošč Micronaut-S CD MIC za ugotavljanje občutljivosti za antibiotike

Table 26: Quality control of Micronaut-s CD plates MIC for antibiotic susceptibility testing

	SA ATCC 29213		EF ATCC 29212		BF ATCC 25285		BT ATCC 29741		CP ATCC 13124		CD ATCC 700057	
Antibiotik	CLSI	MIC	CLSI	MIC	CLSI	MIC	CLSI	MIC	CLSI	MIC	CLSI	MIC
Amoksicilin		1		0,5		16;>16		16		≤0,125		0,25;0,5
Ceftriaxon	1-8	≤8		64;128		64		32		≤8		≤8;16
Clindamicin	0,06-0,25	≤1	4-16	16	0,5-2	≤1	2-8	2;4		≤1		≤1;2
Daptomicin	0,12-1	≤1	1-4	2		>8		>8		8;4		4
Eritromicin	0,25-1	2	1-4	8		8		>8		>8		4;8
Fusidna k.	0,06-0,25	≤2		4		≤2		≤2		≤2		≤2
Imipenem	0,012-0,06	≤4	0,5-2	≤4	0,03-0,25	≤4	0,25-1	≤4		≤4		≤4
Levofloksacin	0,06-0,5	≤2	0,25-2	≤2		≤2		4		≤2		4
Linezolid	1-4	2	1-4	2	2-8	2	2-8	≤1; 2		≤1		≤1
Metronidazol		>4		>4	0,25-2	0,5	0,5-4	1		>4		≤0,25
Moksifloksacin	0,015-0,12	≤2	0,06-0,5	≤2	0,12-0,5	≤2	1-8	≤2		≤2		≤2
Oksacilin	0,12-0,5	≤0,25	8-32	8		>8		>8		≤0,25		≤0,25
Rifampicin	0,004-0,015	0,00781	0,5-4	1		0,25		0,25		0,003;0,007		≤0,00195
Tetraciklin	0,12-1	0,25;0,5	8-32	>16		≤0,125		4		≤0,125		16
Tigeciklin	0,03-0,25	0,125;0,25	0,03-0,12	0,25	0,06-0,5	≤0,0625	0,25-1	≤0,0625		≤0,0625	0,03-0,12	≤0,06;0,125
Trimetoprim/S	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5		4/76		2/38		>16/304		2/38
Vankomicin	0,5-2	1	1-4	2		>4		>4		1		0,5
KR/NK		+/-		+/-		+/-		+/-		+/-		+/-

CLSI – dovoljen MIC razpon za referenčne seve bakterij po standardu CLSI M100-S23 (Januar 2013); MIC – dobljena minimalna inhibitorna koncentracija; KR/NK – kontrola rasti/negativna kontrola; SA – *S. aureus*; EF – *E. faecalis*; BF – *B. fragilis*; BT – *B. thetaiotaomicron*; CP – *C. perfringens*; CD – *C. difficile*; Fusidna k. – fusidna kislina; Trimetoprim/S – trimetoprim/sulfametoksazol; +/- - rast/ni rasti

Tabela 27: Ponovljivost plošč Micronaut-S CD MIC za ugotavljanje občutljivosti za antibiotike in primerjava z E-testi  
 Table 27: Reproducibility of Micronaut-S CD plates MIC for antibiotic susceptibility testing and comparison with E-Tests

	CD ATCC 700057		CD 1 (033/XIa)		CD 2 (012/0)		CD 3 (071/tox-)		CD 4 (014-020/0)	
Antibiotik	E-test	MIC	E-test	MIC	E-test	MIC	E-test	MIC	E-test	MIC
<b>Amoksicilin</b>		≤0,125;0,25;0,5		≤0,125		0,5		0,25;0,5		≤0,125;0,25
<b>Ceftriakson</b>		≤8		≤8;16		32		16		≤8, 16
<b>Clindamicin</b>		2;4;8		2;4;8		>32;512		4;8;16		4;8;16
<b>Daptomicin</b>		2;4		8;>8		2;4		2		≤1;2
<b>Eritromicin</b>	0,75	4	1	4	pon	>512	1,5	2;4	1	4
<b>Fusidna k.</b>		≤2		≤2		≤2		≤2		≤2
<b>Imipenem</b>	R-pon	≤4	R-pon	≤4	R-pon	≤4	R-pon	≤4	R-pon	≤4
<b>Levofloksacin</b>		4		≤2;4		4		≤2;4		≤2;4
<b>Linezolid</b>		≤1		≤1		≤1		≤1		≤1
<b>Metronidazol</b>	0,23;0,32	≤0,25	0,94	≤0,25	≤0,016;0,016	≤0,25		≤0,25		≤0,25;0,5
<b>Moksifloksacin</b>		≤2		≤2		≤2		≤2		≤2
<b>Oksacilin</b>	6;8	≤0,25;1;2	4;6	1;2	pon	≤0,25	12	≤0,25;0,5;1	6;12	≤0,25
<b>Rifampicin</b>		≤0,0019		≤0,0019		≤0,0019		≤0,0019		≤0,0019
<b>Tetraciklin</b>		16		≤0,125		16		≤0,125		≤0,125
<b>Tigeciklin</b>		≤0,0625		≤0,0625		≤0,0625		≤0,0625		≤0,0625;0,125
<b>Trimetoprim/S</b>		2/38;4/76;8/152		4/76;8/152		4/76;8/152		4/76		2/38;4/76
<b>Vankomicin</b>	0,5;0,75	0,5	0,38	≤0,25;0,5	0,047;0,064;0,094	0,5	0,38	0,5	0,19;0,25	0,5
<b>KR/NK</b>		+/-		+/-		+/-		+/-		+/-

MIC – rezultati osmih ponavljanj plošč Micronaut-S CD MIC; KR/NK – kontrola rasti/negativna kontrola; +/- - rast/ni rasti; R-pon – odpornost proti antibiotiku in potrebovno ponavljanje vzorca; pon – potrebovno ponavljanje zaradi slabe rasti

### 11.6. Minimalne inhibitorne koncentracije izoliranih sevov CD

Tabela 31: Razpon MIC za CD izolate ribotip 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018 in 023

Table 31: MIC range for CD isolates ribotype 001/072, 002, 003, 005, 012, 014/020, 018 in 023

RIBOTIP	001/072	002	003	005	012	014/020	018	023
Št. sevov	4	4	2	1	5	6	2	5
Amoksicilin	≤0,125 - =0,25	=0,25	≤0,125	≤0,125	=0,5	≤0,125 - =0,25	=0,25	≤0,125 - =0,25
Ceftriakson	≤8	≤8 - =16	≤8	=16	=32 - >256	≤8 - =32	≤8	=16 - =32
Klindamicin	≤1 - =8	≤1 - =16	≤1 - =32	=8	>32 - =512	=4 - =16	=2 - =4	≤1 - =2
Daptomicin	≤1 - =4	=2 - =4	=2 - =4	=2	≤1 - >8	=2 - =8	=2 - =4	=2 - =4
Eritromicin	=2 - =8	=4 - =8	=4	≤1	>8 - >512	=4 - =8	=8	≤1 - =4
Fusidna kislina	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Imipenem	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4 - =8	≤4	≤4	≤4 - =16
Levofloksacin	≤2 - =4	=4	=4	=4	≤2 - =4	=4	=4	≤2 - =4
Linezolid	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Metronidazol	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25 - =0,5	≤0,25 - =0,5	≤0,25	≤0,25
Moksifloksacin	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Oksacilin	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25 - =8	≤0,25 - =2	≤0,25	≤0,25
Rifampicin	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195 - >64	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195
Tetraciklin	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125 - =16	≤0,125	≤0,125	≤0,125
Tigeciklin	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625
Trimetoprim/sulfametoksazol	=1/19 - =8/152	=4/76	=4/76	=2/38	=4/76 - >16/304	=4/76	=4/76	=2/38 - =8/152
Vankomicin	≤0,25 - =0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	=0,5 - =1	≤0,25 - =0,5	≤0,25 - =0,5	≤0,25 - =0,5

Tabela 32 Razpon MIC za CD izolate ribotip 033, 045, 071, 077, 081, SLO 025, SLO 029, SLO 036

Table 32: MIC range for CD isolates ribotype 033, 045, 071, 077, 081, SLO 025, SLO 029, SLO 036

RIBOTIP	033	045	071	077	081	SLO 025	SLO 029	SLO 036
Št. sevov	91	1	3	4	1	1	1	3
Amoksicilin	≤0,125 - >16	=0,25	=0,25 - =0,5	=0,25 - =0,5	=0,25	=0,25	=0,25	=0,25
Ceftriakson	≤8 - =32	=16	≤8 - =16	=0,25	=16	≤8	=16	≤8 - =16
Klindamicin	=4 - =32	=4	=8 - =32	=2 - =4	=4	=8	=8	=4 - =8
Daptomicin	=4 - >8	>8	=2 - =4	=2 - =4	=4	=4	=4	=4
Eritromicin	=2 - >512	=4	=4	=4 - =8	=8	=2	=8	=4
Fusidna kislina	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Imipenem	≤4 - =8	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Levofloksacin	≤2 - =4	=4	=4	=4 - =16	=4	=4	≤2	=4
Linezolid	≤1 - =2	≤1	≤1	≤1 - =2	≤1	≤1	≤1	≤1
Metronidazol	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Moksifloksacin	≤2	≤2	≤2	≤2 - =4	≤2	≤2	≤2	≤2
Oksacilin	=2 - >8	=1	≤0,25 - =0,5	≤0,25 - =0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Rifampicin	≤0,00195 - =0,25	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195 - =0,0078	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195
Tetraciklin	≤0,125 - =8	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125
Tigeciklin	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625
Trimetoprim/sulfametoksazol	=2/38 - >16/304	=8/152	=4/76 - =16/304	=4/76	=8/152	=4/76	=4/76	=4/76
Vankomicin	≤0,25 - =1	=0,5	=0,5	≤0,25 - =0,5	=0,5	=0,5	=0,5	=0,5

Tabela 33: Razpon MIC za CD izolate ribotip SLO 053, SLO 057, SLO 060, SLO 063, SLO 084, SLO 116, SLO 195, SLO 196

Table 33: MIC range for CD isolates ribotype SLO 053, SLO 057, SLO 060, SLO 063, SLO 084, SLO 116, SLO 195, SLO 196

RIBOTIP	SLO 053	SLO 057	SLO 060	SLO 063	SLO 084	SLO 116	SLO 195	SLO 196
Št. sevov	1	1	16	1	2	2	1	1
Amoksicilin	=0,25	=0,25	≤0,125 - =0,5	≤0,125	=0,25	≤0,125 - =0,25	=0,25	≤0,125
Ceftriakson	≤8	=16	≤8 - =16	≤8	≤8	≤8 - =16	≤8	≤8
Klindamicin	=4	=4	≤8 - =32	=2	=4 - =8	=2 - =8	=16	≤1
Daptomicin	=8	=2	≤8 - >8	≤1	=4	=2 - =4	=4	=4
Eritromicin	=8	=4	=4	=2	=4 - =8	≤1 - =4	=8	=2
Fusidna kislina	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Imipenem	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Levofloksacin	=4	=4	≤2 - =16	≤2	=4	≤2 - =4	=4	≤2
Linezolid	≤1	≤1	≤1 - =2	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Metronidazol	≤0,25	≤0,25	≤0,25 - =1	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Moksifloksacin	≤2	≤2	≤2 - =4	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Oksacilin	≤0,25	≤0,25	=2 - =8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Rifampicin	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195 - =0,25	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195	≤0,00195
Tetraciklin	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125
Tigeciklin	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625
Trimetoprim/sulfametoksazol	=4/76	=4/76	≤4/76 - >16/304	=4/76	=8/152	=4/76	=4/76	=4/76
Vankomicin	≤0,25	=0,5	≤0,25 - =1	≤0,25	=0,5	≤0,25 - =0,5	=0,5	≤0,25