

IZBOLJŠAVA POSTOPKA DOKAZOVANJA BAKTERIJE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* PRI ŽIVALIH



dr. Jana AVBERŠEK

**Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo**

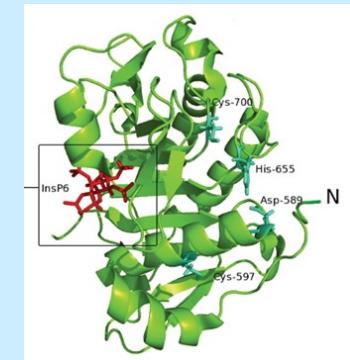
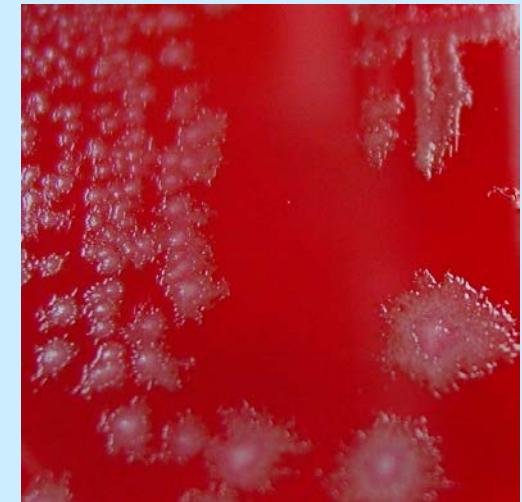


Ljubljana, 26. 9. 2014

Clostridium difficile

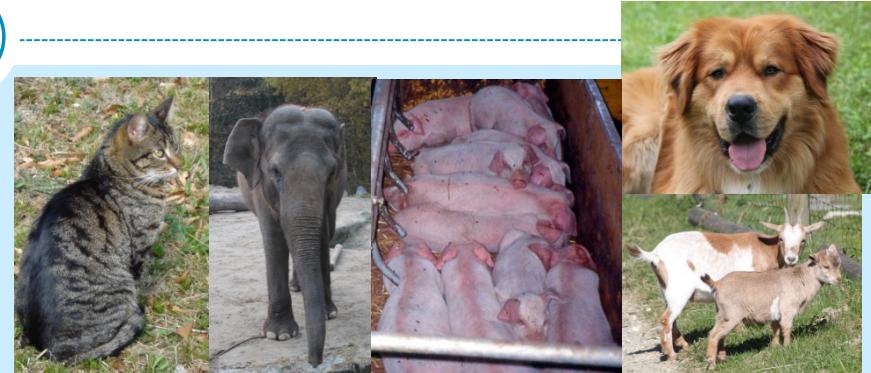


- po Gramu pozitivna bakterija
- anaerobna, sporogena bakterija
- del črevesne mikrobiote
- lahko proizvaja tri toksine – toksin A, toksin B, binarni toksin CDT



C. difficile pri ljudeh in živalih

- bolnišnične črevesne okužbe (uporaba antibiotikov) – blaga driska, psevdomembranozni kolitis, predrtje črevesja
- zdravi prenašalci (< 5 %)
- močno virulentni sevi (027/NAP1/BI/III)
- okužbe pri zdravih, mladih ljudeh brez stika z bolnišničnim okoljem (ribotip 078)



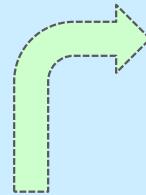
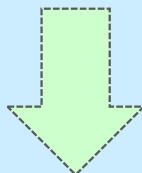
- povzročitelj črevesnih bolezni predvsem pri mladih živalih (pujski, teleta, žrebeta)
- klinično zdrave živali - prenašalci bakterije v prebavnem traktu (s starostjo kolonizacija upada)
- perutnina rezervoar *C. difficile*



Hrana in okolje



- razlike v prevalenci med ZDA/Kanado in Evropo
- voda (površinske vode, pitna in bazenska voda), zemlja, zrak, prah na farmah
- insekti, miši, ptiči kot vektor na prašičjih farmah
- čistilne naprave



zoonoza?

enaki genotipi pri ljudeh, živalih,
v hrani in okolju



Stanje v Sloveniji



- 2011 – 1. izbruh v bolnišnici (ribotip 027)
- število prijavljenih primerov in hospitaliziranih narašča (07-11 → 0,9-6,6 primerov/100.000 preb.)
- živali – sesni pujski (52 %), manj pri govedu, perutnina (62 %), psi, mačke, konji, ovce, koze,...
- reke (68 %)
- meso, mesni izdelki, solate neg; jajca (1 poz/49)
- 11/90 ribotipov enakih pri ljudeh, živalih in v okolju (014/020, 002, 001/072)



Diagnostika/dokazovanje *C. difficile* pri ljudeh in živalih

LJUDJE

- večstopenjski algoritmi:
presejalni test
(GDH EIA)

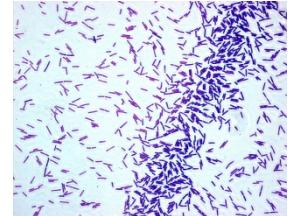
+

potrditveni test (EIA za toksine, test cititoksičnosti, toksigena kultura, rtPCR)

ŽIVALI

- izolacija bakterije iz blata
 - nujna uporaba obogatitvenega selektivnega gojišča
- EIA in komercialni testi
rtPCR niso priporočljivi
- le en rtPCR za uporabo v veterini (Houser in sod., 2010)

Namen raziskave



- Obstojče metode, ki so uporabne v veterini so dolgotrajne (9 dni) ali slabo občutljive/specifične (prib. 11 % rtPCR lažno negativnih vzorcev v primerjavi s kulturo).
- ↓
- Izboljšava postopka dokazovanja *C. difficile* pri živalih (vzorci z nizkim številom bakterij).





Improved detection of *Clostridium difficile* in animals by using enrichment culture followed by LightCycler real-time PCR



Jana Avberšek *, Urška Zajc, Jasna Mićunović, Matjaž Ocepek

University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Gerbičeva 60, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

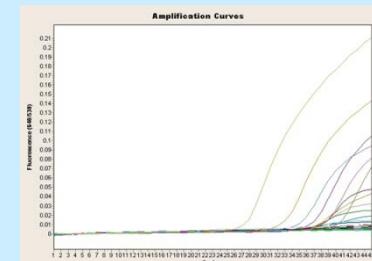
enodnevna obogatitev v selektivnem tekočem gojišču



rtPCR za vse tri toksinske gene, ki smo ga razvili in validirali na živalskih vzorcih, in z njim lahko zaznamo variantne oblike *C. difficile*



rezultati v dveh dneh



UPORABNA VREDNOST REZULTATOV



- postopek se lahko uporablja kot samostojna metoda, saj ni lažno negativnih rtPCR rezultatov
- primeren za pregledovanje večjega števila vzorcev (vzorci z negativnim rtPCR rezultatom ni potrebno preiskovati naprej)
- vzorci hrane, okolja (zemlja, voda, krma...)
- bolnišnično okolje, domovi za starejše...

ZAHVALA



Javna agencija
za raziskovalno dejavnost
Republike Slovenije



- MR
- P4-0092