

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/139



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-2236
Naslov projekta	Razširjenost bakterije <i>Clostridium difficile</i> pri domačih živalih, v mesu in mesnih izdelkih, ter njen zoonotski pomen
Vodja projekta	11133 Matjaž Ocepek
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4649
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	377 Zavod za zdravstveno varstvo Maribor
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.02 Animalna patologija in epizootiologija
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	4.03
- Veda	4 Kmetijske vede
- Področje	4.03 Veterina

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Bakterija *Clostridium difficile* (CD) je pri človeku najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih okužb. Bolezen običajno nastopi po antibiotičnem zdravljenju in poteka v različnih oblikah, od blage driske do hudega psevdomembranoznega kolitisa, ki lahko ogroža življenje bolnikov. V zadnjih letih pogostnost in pomen teh okužb močno narašča,

pojavnjajo se okužbe v domačem okolju, ki niso povezane s predhodno uporabo antibiotikov. To dejstvo še posebej izpostavi potrebo, da najdemo vir teh okužb in preverimo zoonotski potencial bolezni.

Z raziskavami v okviru projekta smo:

- ugotovili razširjenost CD pri ovcah (pozitivnih 2,4 % živali) in kozah (pozitivnih 5,4 % živali). Rezultati kažejo, da so tudi mali prežvekovalci, posebej mladiči, lahko rezervoar za CD in da so kolonizirani s podobnimi ribotipi kot ljudje in druge živalske vrste v Sloveniji;
- pri perutnini ugotovili velike razlike v številu koloniziranih živali s CD na različnih farmah. S starostjo se je odstotek koloniziranih živali praviloma zmanjševal, vendar so bile posamezne živali pozitivne tudi na klavni liniji. Klavnica bi lahko bila skupen vir za kontaminacijo živil, okolje pa vir klostridijskih spor za perutnino. Pri perutnini je bila ugotovljena izredna pestrost ribotipov;
- pri pregledu farne prašičev, izolirali CD iz 65,4 % sesnih pujskov, CD pri pitancih nismo izolirali, pri svinjah pa v 61 % primerov. V približno enakem odstotku so bili pozitivni pujski in svinje z drisko ali brez. Vsi sevi so pripadali istemu ribotipu;
- CD našli na lupini enega jajca iz domače proizvodnje. Vsi ostali vzorci površine in vsebine jajc, mesa, mesnih izdelkov in zelenjave pa so bili negativni na CD;
- z E-testi preverili občutljivost sevov CD, ki so pripadali različnim ribotipom na metronidazol in vankomicin. Vrednosti MIC so bile nizke. Z mikrodilucijsko metodo smo 92 humanim in 96 živalskim izolatom določili občutljivost za 30 antibiotikov. Posamezni sevi pa so bili odporni proti tetraciklinu, eritromicinu, klindamicinu in moksifloksacinu. Prav tako smo pri humanih kot pri živalskih izolatih ugotovili znižano občutljivost na rifampicin, daptomicin, oksacilin in streptomycin. Na splošno je več humanih izolatov odpornih na moksifloksacin, klindamicin in eritromicin, živalskih pa na oksacilin;
- vpeljali tipizacijsko metodo MLVA;
- primerjali 260 sevov izoliranih pri živalih s 653 sevi izoliranih pri ljudeh. V primerjavo smo vključili podatke o izoliranih sevih v okviru tega projekta ter sevih izoliranih v času pred tem projektom. Sevi so se prekrivali v dveh najpogostejših ribotipih;
- izboljšali postopek dokazovanja CD v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve v bujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času. Rezultati te študije kažejo, da je enodnevna predobogatitev, ki ji sledi dokazovanje vseh treh toksinskih genov CD zanesljiv in hiter presejalni test, predvsem za vzorce z nizkim številom CD, saj ni bilo kultura pozitivnih/rtPCR negativnih vzorcev.

ANG

Clostridium difficile (CD) is the most common cause of human hospital-associated enteric infection. It typically occurs following antimicrobial therapy and manifests a wide spectrum of clinical signs from mild diarrhoea to life-threatening pseudomembranous colitis. In recent years, disease incidence and severity of CD infection has increased. Also, community-acquired CD infections have emerged that are not associated with previous use of antimicrobials. These facts emphasize the need for finding the source of infection and evaluating the zoonotic potential of the disease.

Within the research project:

- CD prevalence was determined in sheep (2,4 %) and goats (5,4 %). The results showed that small ruminants, especially young animals, may be the reservoir of CD. PCR ribotypes are overlapping with PCR ribotypes detected in other animals and humans in our geographic area;
- CD prevalence in poultry varied widely between the farms. The colonization rates have generally decreased with age, but there were positive animals also found at the slaughter line, which may be the source for food contamination. The source of spores for the poultry may be a farm environment. Great diversity of PCR ribotypes was found in poultry;
- CD prevalence in suckling piglets was 65,4 %, in fattening pigs 0% and 61 % in sows. There was no significant difference in prevalence between diarrhoeic and subclinical groups. All isolates belong to same PCR ribotype;
- CD was found in one sample of eggshell surface from extensive production. All other samples of eggs, meat, meat products and vegetable were negative for CD;
- susceptibility of CD of various PCR ribotypes to metronidazol and vancomycin was tested using E-tests. MIC values were low. 96 animal and 92 human isolates were tested for susceptibility to 30 antimicrobials. We found multiresistant strains in human and in animal isolates. In isolates of both sources decreased susceptibility was found for rifampicin, daptomycin, oxacillin and streptomycin. In general, more human isolates were resistant to moksifloksacin, klindamicin and erythromycin, and more animal strains were resistant to oxacillin;
- MLVA typing method has been implemented;

- 260 animal isolates were compared to 653 human isolates. Data on isolates obtained within this project and previous isolates were included in comparison. The strains are shared between humans and animals in two the most common PCR ribotypes;
- detection of CD in samples with low number of CD was improved using a pre-enrichment step followed by rtPCR amplification. Results of this study demonstrate that only one day of enrichment followed by rtPCR amplification of all three toxin genes can be applied as accurate and rapid screening test, as no culture positive/rtPCR negative samples were observed.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Bakterija *Clostridium difficile* je pri človeku najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih okužb. Bolezen običajno nastopi po antibiotičnem zdravljenju in poteka v različnih oblikah, od blage driske do hudega psevdomembranoznega kolitisa, ki lahko ogroža življenje bolnikov. V zadnjih letih pogostnost in pomen teh okužb močno narašča, pojavljajo se okužbe v domačem okolju, ki niso povezane s predhodno uporabo antibiotikov. To dejstvo še posebej izpostavi potrebo, da najdemo vir teh okužb in preverimo zoonotski potencial bolezni. Bakterija *C. difficile* se vse pogosteje izolira tudi iz domačih živalih, kjer je prisotna v črevesju in lahko predvsem pri mladih povzroča driske. Z raziskovalnim projektom smo želeli:

- ugotoviti njeno razširjenost pri vrstah domačih živali, ki doslej še niso bile vključene v raziskave (perutnina, drobnica), oziroma razširiti raziskave pri prašičih na vse starostne kategorije, s poudarkom na ločevanju koloniziranih zdravih ter bolnih živali
- ugotoviti prisotnost bakterije v mesu in jajcih
- določiti odpornost *C. difficile* proti antibiotikom
- vpeljati metodo MLVA in s tipizacijo sevov oceniti možnosti prenašanja bakterije med različnimi živalskimi vrstami in z živalskega gostitelja na človeka
- z določitvijo pogostosti različnih toksinotipov pri živalih razširiti temeljno znanje o značilnostih in delovanju variantnih toksinotipov
- razviti čim učinkovitejšo kombinacijo klasične gojiščne in molekularne preiskave.

Razširjenost pri domačih živalih

Drobnica

Pregledali smo 129 koz in 85 ovc. Pri 24,7 % ovcah je bila prisotna klinična driska, koze so bile vse brez klinične slike. Pri odraslih živalih *C. difficile* nismo ugotovili. *C. difficile* smo izolirali pri 2 jagenjčkih (1-16 dni starih; 5 %), 6 kozličkih, starih 3-14 dni (18,8 %) in pri enem kozličku, starem 4 mesece (1,5 %), kjer smo ugotovili 2 različna ribotipa (toksigen in netoksigen sev). Nobena žival, pozitivna na *C. difficile*, ni imela izražene driske. Sevi so pripadali 4 različnim toksinotipom (TT), XII in XIa (ovčja izolata) ter 0 in V (kozji izolati). Ugotovili smo tudi 6 različnih ribotipov (RT) 056, 045, 010, 014/020, SLO 061 in SLO 151. Ovčja izolata sta pripadala dvema pulzotipoma, medtem ko smo kozje izolate razvrstili v pet pulzotipov in ugotovili, da je bilo pet sevov enakih sevom izoliranih iz sesnih pujskov (RT 045) oziroma brojlerja iz farma D (RT 014/020). Rezultati kažejo, da so tudi mali prežvekovalci, posebej mladiči, lahko rezervoar za *C. difficile* in da so kolonizirani s podobnimi RT kot ljudje in druge živalske vrste v Sloveniji.

Perutnina

Preiskali smo 881 vzorcev (567 z brojlerskih farm in 314 s farm nesnic). Izbrali smo 9 različnih lokacij. Na brojlerskih farmah smo preiskali 500 vzorcev blata, 46 vzorcev s klavne linije in 21 vzorcev okolja. Na farmah nesnic smo preiskali 298 vzorcev blata in 16 vzorcev okolja/ostalih živali na farmah. Ker smo pričakovali, da je *C. difficile* pri različnih starostnih skupinah živali prisoten v različnem odstotku, smo jato spremljali skozi cikel produkcije, od matične jate naprej. Izolacijo smo izvedli preko obogatitvenih gojišč. *C. difficile* smo izolirali iz 202/881 (22,9 %) vzorcev na 6/9 (66,7 %) farmah. Le v eni brojlerski jati *C. difficile* nismo dokazali. Na splošno je bila kolonizacija nizka pri matičnih jatah (4,7 %). Pri njihovih potomcih je bila kolonizacija nizka v starosti 1-3 dni, in sicer 0 do 5 % (n=80), pri starosti 6-8 dni, se je odstotek koloniziranih živali povišal na dveh farmah, kjer smo *C. difficile* potrdili pri 85 % (17/20) brojlerjev (farma E) in 70 % (35/50) jarkic (farma G), medtem ko je na ostalih šestih farmah (farme A, B, C, F, H, I) ostalo nizko število pozitivnih živali do konca vzorčenja (0-10 %). Na brojlerski farmi, ki smo jo najprej vzorčili (farma D), starostne skupine 6-8 dni nismo vzorčili, je pa bilo 40 % 16-dnevni brojlerjev pozitivnih. Pri starosti okoli 14 dni, je bil odstotek na farmah E in G še vedno visok (70 % pri brojlerjih (14/20) oziroma 65,4 % (34/52) pri jarkicah). Prisotnost *C. difficile* se s starostjo zmanjšuje in pred zakolom ali preden jarkice

začnejo nesti jajca in tako vstopajo v prehransko verigo, je kolonizacija spet nizka, 0-10 %. Naši rezultati kažejo velike razlike v številu koloniziranih živali na različnih farmah, zato smo pregledali tudi vzorce iz klavnice in okoljske vzorce na prisotnost *C. difficile*. Na brojlarskih farmah sta bila pozitivna 2/21 (9,5 %) vzorcev okolja in 1/36 (2,8 %) vzorcev iz linije klanja (voda za skubljenje). Zanimivo je, da smo ravno na farmi, kjer pri živalih nismo ugotovili *C. difficile*, le-to izolirali iz vzorca vode za pitje in nastilja. Na farmah z nesnicami smo ugotovili 6/16 (37,5 %) pozitivnih vzorcev okolja – zemlja med stavbami, nastilj, feces drugih živali, ki se pasejo na posestvu. Vsi vzorci so bili pozitivni na farmi G. Klavnica bi lahko bila skupen vir za kontaminacijo živil, okolje pa bi lahko predstavljajo vir klostridijskih spor za perutnino, vendar bi bilo za potrditev potrebno pregledati več vzorcev.

Ugotovili smo izredno pestrost RT na eni farmi, pa tudi znotraj starostnih skupin in posamezne živali – skupaj je bilo določenih 22 različnih RT, ki so pripadali TT 0, V, XII in XXIV, oziroma so bili netoksigeni. Najbolj pogost je bil RT 014/020 (30/123; 24,4 %), sledijo mu RT 002, 001/072 in 046, kar se ujema s pogostostjo RT pri ljudeh v Sloveniji. Še večjo pestrost sevov smo dokazali z metodo PFGE (54 pulzotipov), s katero smo lahko dodatno ločili posamezne seve znotraj določenega RT. Izolati iz brojlerjev in jarkic so pripadali enakim pulzotipom. Izolat iz klavnice je imel enak pulzotip kot dva brojlarska izolata (RT 002), poleg tega pa smo enak pulzotip dokazali tudi pri humanem izolatu. Tudi nekateri perutninski in humani izolati RT 014/020 so imeli enake pulzotipe.

Pregledali smo tudi 75 puranov, starih 85-182 dni, na treh farmah in 10 vzorcev perutnine (dve jati) iz ekstenzivne reje. *C. difficile* pri puranih nismo izolirali, medtem ko je bil en vzorec nesnice iz ekstenzivne reje pozitiven (TT 0/RT SLO 114).

Prašiči

Pri pregledu farme prašičev, ki smo jo pregledovali tudi v prejšnjem projektu in dokazali TT V/RT 045, smo ugotovili presenetljivo sliko, saj je bilo tokrat pozitivnih 61 od 100 (61 %) odraslih svinj. V velikem odstotku so bili pozitivni tudi sesni pujski (65,4 %). Vsi pregledani pitanci so bili negativni. *C. difficile* smo izolirali pri 68,8 % (33/48) pujskov, ki so imeli drisko in pri 68,3 % (56/82) pujskov brez driske. Vsi izolati so pripadali TT V/RT 045. Z metodo PFGE smo izolatom določili sedem pulzotipov (večina sevov je bila podobnih, dva pa sta se zelo razlikovala od ostalih). Enake profile PFGE smo dokazali tudi pri kozjih izolatih in dveh izolatih (RT 045) iz perutnine (brojlarska matična jata).

Hrana

Medtem, ko je kar nekaj objav o kontaminaciji mesa, mesnih izdelkov in zelenjave v državah EU, podatkov za jajca ni. V času projekta smo pregledali 61 vzorcev mesa in mesnih izdelkov, 3 pripravljene solate, 5 vzorcev kalčkov ter 59 jajc (površina jajc n=59, vsebina jajc n=30) od različnih proizvajalcev; trg, trgovine, domača reja. Izmed vseh testiranih vzorcev smo *C. difficile* našli samo na lupini enega jajca iz domače reje. Izolirali smo dva seva, ki sta pripadala RT 014/020 in 002. Del rezultatov je bil predstavljen na kongresu 4th ICDS (Zidaric V, Rupnik M; *Clostridium difficile* in meat products, eggs and vegetables in Slovenia).

Občutljivost na protimikrobna zdravila

Z E-testi smo občutljivost na metronidazol in vankomicin, zdravili izbora v humani medicini, preskusili pri 12 sevih različnih RT. Pričakovano so bile vrednosti MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) nizke in ker med našimi izolati nismo pričakovali odpornosti, smo se odločili, da bomo občutljivost pri večjem številu živalskih in humanih izolatov določili z mikrodilucijsko metodo. Izbrali smo 92 humanih in 96 živalskih izolatov različnih RT in določili občutljivost za 30 antibiotikov. Vsi sevi so bili na metronidazol in vankomicin občutljivi. Med izolati smo ugotovili seve, ki so odporni proti tetraciklinu, eritromicinu, klindamicinu in moksifloksacinu (12 %, 18,5 %, 41,3 % oziroma 12 % humanih izolatov ter pri 19,6 %, 8,3 %, 38,5 % in 4,2 % živalskih izolatih). Tako pri humanih kot pri živalskih izolatih smo ugotovili znižano občutljivost na rifampicin, daptomicin, oksacilin in streptomycin. Odpornost proti streptomycinu je bila izražena v visokem odstotku pri humanih RT 078, 014/020 in 017 in pri prašičjih RT 150 in 045. Pri slednjem smo ugotovili visok odstotek hkratne odpornosti proti oksacilinu in streptomycinu, do česar bi lahko prišlo zaradi pogoste uporabe antibiotikov v intenzivnih prašičjih rejah. Multirezistenco smo odkrili pri humanih in živalskih sevih RT 012, 017, 027, 045, 046, 078, 150, 010 in SLO 080. Med njimi sta tudi dva RT, ki nista toksigena (010 in SLO 080). Naši rezultati kažejo, da je odstotek odpornih sevov večji pri humanih izolatih za moksifloksacin, klindamicin, eritromicin; za oksacilin pa pri živalskih izolatih. Rezultati so bili predstavljeni na kongresu 4th ICDS (Pirš T, et al. Antimicrobial susceptibility testing of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution).

Molekularna tipizacija

V okviru projekta je bila predvidena vpeljava metode MLVA, ki temelji na pomnoževanju večih kromosomalnih lokusov, ki vključujejo sekvence s tandemskimi ponovitvami. Za *C. difficile* je

opisanih več različnih začetnih oligonukleotidov za MLVA, saj so prve objave podajale metodo, ki pri nekaterih ribotipih (npr. 078) ni zaznala treh lokusov. Metoda je bila vpeljana in rezultati so vključeni v doktoratu mlade raziskovalke S. Janežič (2012).

Prav tako smo v okviru projekta primerjali seve izolirane pri živalih s sevi izoliranimi pri ljudeh. V primerjavo smo vključili podatke o izoliranih sevih v okviru tega projekta ter sevih izoliranih v času pred tem projektom. Sevi so bili izolirani na ZZV Maribor ali na VF Univerze v Ljubljani in so vključeni v zbirko na ZZV Maribor. Izolirani so bili v letih 2007 do 2010. V primerjavo je bilo vključenih 653 humanih izolatov in 260 živalskih izolatov. Zaradi preglednosti podajamo samo prvih pet najpogostejših ribotipov za vsakega gostitelja, kjer opazamo prekrivanje v 2 najpogostejših RT. Pri humanih izolatih so bili v tem obdobju najpogostejši RT 014/020 (20,7%), 002 (8,1%), 012 (4,7%), 023 (4,7%), SLO 009 (4,7%). Med živalskimi izolati so bili najpogostejši 045 (24,2%), 014/020 (13,8%), 002 (12,7%), 131 (11,9%), SLO 011 (11,5%). Rezultati so objavljeni v članku Janežič S, et al. (2012). BMC Microbiol., 12(1):48. Prav tako pa so bili predstavljeni v okviru vabljenega predavanja na nacionalni konferenci o Zoonozah (RUPNIK, M, et al. Zoonotski potencial bakterije *Clostridium difficile* V: PETROVEC, Miroslav (ur.). 4. Baničevi dnevi, Radenci, november 2012. Zoonoze : [zbornik prispevkov], (Medicinski razgledi, Supplement, letn. 51, 6). Ljubljana: Medicinski razgledi, 2012, str. 213-18.

Optimizacija diagnostike *C. difficile* s kombinacijo klasične bakteriološke preiskave in metode PCR v realnem času

Izboljšali smo postopek dokazovanja *C. difficile* v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve v bujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času (rtPCR) na aparaturi LightCycler. Samo en vzorec (2,5 %) je bil kultura in LC rtPCR (direktno dokazovanje) pozitiven, medtem ko je bilo po sedem dnevni obogatitvi 33 (82,5 %) vzorcev kultura pozitivnih. Samo en dan predobogatitve je izrazil povečal število kultura (15; 37,5 %) in LC rtPCR (28; 70 %) pozitivnih vzorcev. Rezultati te študije kažejo, da je enodnevna predobogatitev, ki ji sledi dokazovanje vseh treh toksinskih genov *C. difficile* z LC rtPCR zanesljiv in hiter presejalni test, predvsem za vzorce z nizkim številom *C. difficile*, saj ni bilo kultura pozitivnih/LC rtPCR negativnih vzorcev. Izboljšani postopek je objavljen v članku Avberšek J, et al. (2013). Vet Microbiol., in press.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

V skladu s planom dela smo z raziskovalnim projektom:

ugotovili razširjenost *C. difficile* (CD) pri ovcah (pozitivnih 2,4 % živali) in kozah (pozitivnih 5,4 % živali). Rezultati kažejo, da so tudi mali prežvekovalci, posebej mladiči, lahko rezervoar za CD in da so kolonizirani s podobnimi ribotipi kot ljudje in druge živalske vrste v Sloveniji;

pri perutnini ugotovili velike razlike v številu koloniziranih živali s CD na različnih farmah. S starostjo se je odstotek koloniziranih živali praviloma zmanjševal, vendar so bile posamezne živali pozitivne tudi na klavni liniji. Klavnica bi lahko bila skupen vir za kontaminacijo živil, okolje pa bi lahko predstavlja vir klostridijskih spor za perutnino. Za razliko od prašičev je bila pri perutnini ugotovljena izredna pestrost ribotipov in tipov PFGE na eni farmi, pa tudi znotraj starostnih skupin in posamezne živali. Nekateri perutninski in humani izolati ribotipa 014/020 so imeli enake pulzotipe;

preiskali tri reje puranov, kjer pa CD nismo izolirali;

pri pregledu farne prašičev, pri sesnih pujskih izolirali CD v 65,4 % primerov, pri pitancih CD nismo izolirali, pri svinjah pa v 61 % primerov. V približno enakem odstotku so bili pozitivni pujski in svinje z drisko ali brez. Vsi sevi so pripadali istemu ribotipu;

CD našli na lupini enega jajca iz domače proizvodnje. Vsi ostali vzorci površine in vsebine jajc, mesa, mesnih izdelkov in zelenjave pa so bili negativni na CD;

z E-testi preverili občutljivost sevov CD, ki so pripadali različnim ribotipom na metronidazol in vankomicin. Pričakovano so bile vrednosti MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) nizke. Z mikrodilucijsko metodo smo 92 humanim in 96 živalskim izolatom določili občutljivost za 30 antibiotikov. Posamezni sevi pa so bili odporni proti tetraciklinu, eritromicinu, klindamicinu in moksifloksacinu. Prav tako smo pri humanih kot pri živalskih izolatih ugotovili znižano občutljivost na rifampicin, daptomicin, oksacilin in streptomycin. Na splošno je več humanih izolatov odpornih na moksifloksacin, klindamicin in eritromicin, živalskih pa na oksacilin;

vpeljali metodo MLVA. Rezultati so vključeni v doktoratu mlade raziskovalke S. Janežič (2012);

primerjali 260 sevov izoliranih pri živalih s 653 sevi izoliranih pri ljudeh. V primerjavo smo vključili podatke o izoliranih sevih v okviru tega projekta ter sevih izoliranih v času pred tem projektom. Sevi so se prekrivali v dveh najpogostejših ribotipih;

izboljšali postopek dokazovanja CD v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve

ujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler (LC rtPCR). Rezultati te študije kažejo, da je enodnevna predobogatitev, ki ji sledi dokazovanje vseh treh toksinskih genov *C. difficile* z LC rtPCR zanesljiv in hiter presejalni test, predvsem za vzorce z nizkim številom *C. difficile*, saj ni bilo kultura pozitivnih/LC rtPCR negativnih vzorcev. pridobljene rezultate objavili v uveljavljenih mednarodnih revijah.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Ni bilo sprememb.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	652319	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Okužbe z <i>Clostridium difficile</i>
		ANG	<i>Clostridium difficile</i> infection
	Opis	SLO	Pregledni članek opisuje novejšje spremembe v epidemiologiji, dejavnike virulence in klinične vidike okužb z bakterijo <i>C. difficile</i> , ki je trenutno ena izmed najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb.
		ANG	This review summarizes the recent epidemiological changes, virulence factors and clinical aspects of <i>C. difficile</i> which is now considered one of the most important causes of health care-associated infections.
	Objavljeno v	Nature Publishing Group.; Nature reviews; 2009; issue 7, Vol. 7; str. 526-536; Impact Factor: 17.644; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.333; A": 1; A': 1; WoS: QU; Avtorji / Authors: Rupnik Maja, Wilcox Mark, Gerding Dale N.	
Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	3096186	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Raznolikost sevov <i>Clostridium difficile</i> pri prašičih in ostalih živalih v Sloveniji
		ANG	Diversity of <i>Clostridium difficile</i> in pigs and other animals in Slovenia
	Opis	SLO	<i>Clostridium difficile</i> smo izolirali iz blata pri 247/485 (50,9 %) pujskih (toksinotipa V in 0, ribotipi 066, 029, SI 011, SI 010), 4/42 (9,5 %) teletih (toksinotipa XIa in 0, ribotipi 014/020, 002, 033) in 1/20 (5 %) žrebetu (toksinotip XIa, ribotip 033). Z metodo PFGE smo prašičjim izolatom določili šest pulzotipov, govejim izolatom pa tri pulzotipe. Edini konjski izolat se z metodo PFGE ni razlikoval od govejega izolata (toksinotip XIa/ribotip 033). Nobeden od dokazanih genotipov ni bil prisoten pri vseh treh pregledanih živalskih vrstah.
		ANG	<i>Clostridium difficile</i> was isolated from 247/485 (50.9%) piglet fecal samples, from 4/42 (9.5%) calf fecal samples, and 1/20 (5%) horse fecal samples. Piglet isolates belonged to two toxinotypes (V and 0), four PCR-ribotypes (066, 029, SI 011, SI 010), and six pulsotypes. Bovine isolates were grouped into two toxinotypes (XIa and 0), three PCR-ribotypes (014/020, 002, 033), and three pulsotypes. The only equine isolate was indistinguishable from one calf isolate (XIa/033) in toxinotype, PCR-ribotype, and pulsotype. None of detected genotypes was present in all three animal hosts.
	Objavljeno v	Elsevier; Proceedings of the 9th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, June 24-27, 2008, Long Beach; Anaerobe; 2009; Vol. 15, No. 6; str. 252-255; Impact Factor: 1.633; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.333; WoS: QU; Avtorji / Authors: Avberšek Jana, Janežič Sandra, Pate Mateja, Rupnik Maja, Zidarič Valerija,	

		Logar Katarina, Vengušt Modest, Zemljič Mateja, Pirš Tina, Ocepek Matjaž	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	512091960	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Clostridium difficile: porajajoča se zoonoza
		<i>ANG</i>	Clostridium difficile: (re)emergence of zoonotic potential.
	Opis	<i>SLO</i>	Članek je vabljeni prispevek, ki komentira podatke o prisotnosti C. difficile v hrani ter pri živalih in metode za ugotavljanje prenosov med temi rezervoarji.
		<i>ANG</i>	This publication is an invited comment, that describes current views on C. difficile in animals and in food and views on methods for study the transmission from mentioned reservoirs to humans.
	Objavljeno v	The University of Chicago Press; Clinical infectious diseases; 2010; Vol.51; str. 583-584; Impact Factor: 8.186;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.177; A': 1; WoS: NI, NN, QU; Avtorji / Authors: Rupnik Maja	
	Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek	
4.	COBISS ID	3394682	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Dokazovanje Clostridium difficile pri živalih
		<i>ANG</i>	Detection of Clostridium difficile in animals
	Opis	<i>SLO</i>	Opisali smo novo metodo pomnoževanja v realnem času (TMrtPCR) za direktno dokazovanje C. difficile v fecesu živali. Dokazovali smo gene za toksin A, B in za binarni toksin. Slednji je klinično pomemben, še posebej zaradi povezanosti z izven bolnišničnimi okužbami ljudi. TMrtPCR je zaradi hitrosti dobra presejalna metoda, vendar se v primeru negativnega rezultata priporoča uporaba obogatitvenih gojišč v izogib lažno negativnim rezultatom.
		<i>ANG</i>	The study describes a novel TMrtPCR for the direct detection of C. difficile in animal faecal samples. TMrtPCR targets the genes for toxins A and B, and binary toxin; detection of the latter is becoming more important due to its potential clinical significance and association with CA-CDI. TMrtPCR could be the preferred screening method, because of its advantages: it is faster and it provides the first information about the toxin type. Because of possible false negative TMrtPCR results, enrichment culture should be performed for the specimens with negative or inconclusive rtPCR results as a second step for C. difficile detection in animal samples.
	Objavljeno v	Longman Group; International Clostridium difficile Symposium 2010; Journal of medical microbiology; 2011; Vol. 60, iss. 8; str. 1119-1125; Impact Factor: 2.502;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.321; WoS: QU; Avtorji / Authors: Avberšek Jana, Cotman Marko, Ocepek Matjaž	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	3521658	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Najpogostejši genotipi Clostridium difficile, drugi kot ribotip 078, pri ljudeh, živalih in okolju.
		<i>ANG</i>	Clostridium difficile genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animals and environmental isolates
	Opis	<i>SLO</i>	V tej študiji smo dokazali, da je poleg ribotipa 078 še veliko drugih ribotipov (014/020, 002, 029), ki jih najdemo tako pri ljudeh kot pri živalih. Najpogostejši humani genotipi lahko preživijo tudi v okolju. Z metodo PFGE smo opazili genetsko sorodnost različnih izolatov, kar nakazuje na možnost prenosa določenih genotipov med različnimi rezervoarji.

	ANG	Results of this study showed that many other ribotypes (014/020, 002, 029) in addition to 078 are shared between humans and animals. Most prevalent types in humans have the ability to survive in the environment. The genetic relatedness observed with PFGE suggests that transmission of given genotype between different reservoirs is likely to occur.
Objavljeno v		BioMed Central; BMC microbiology; 2012; Vol. 12, art. no. 48; str. 1-10; Impact Factor: 3.044; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.321; WoS: QU; Avtorji / Authors: Janežič Sandra, Ocepek Matjaž, Zidarič Valerija, Rupnik Maja
Tipologija	1.01	Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	512100664 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Nov pogled na patogenezo clostridium difficile ANG Updated view on Clostridium difficile pathogenesis
	Opis	SLO Članica projektne skupine je bila vabljeni predavatelj na seriji seminarjev, ki jih organizira Scottish Infection Research Network. Tema predavanja je vključevala opis vloge živali in hrane pri okužbi. ANG Member of project consortium was invited speaker at the series of seminars organized by Scottish Infection Research Network. Topic included the role of animals and food in disease transmission.
	Šifra	B.05 Gostujoči profesor na inštitutu/univerzi
	Objavljeno v	2010; Avtorji / Authors: Rupnik Maja
	Tipologija	3.14 Predavanje na tuji univerzi
2.	COBISS ID	3237242 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Ugotavljanje občutljivosti živalskih izolatov Clostridium difficile za protimikrobna zdravila z mikrodilucijsko metodo. ANG Antimicrobial susceptibility testing of animal isolates of Clostridium difficile by broth microdilution
	Opis	SLO 31 izolatov C. difficile iz prašičev, telet, psov in konjev je bilo testiranih glede občutljivosti za 30 različnih antibiotikov. Uporabili smo dvojce različnih komercialno pripravljenih plošč za mikrodilucijsko metodo in sicer za anaerobne in po Gramu pozitivne bakterije. Pri vseh izolatih je bila minimalna inhibitorna koncentracija za vankomicin manjša od 0,5 µg/ml in za metronidazol manjša od 1 µg/ml. Za dodatna testiranja smo uporabili tudi E-test. Rezultati so bili skladni, razen v enem primeru. Ugotovili smo, da je mikrodilucijska metoda dobro ponovljiva in zanesljiva. ANG Antimicrobial susceptibility to 30 antimicrobial agents of 31 C. difficile isolates from pigs, calves, dogs and a horse was examined. The method was broth microdilution on commercially available plates for monitoring resistance of anaerobic and Gram-positive bacteria. All tested isolates were inhibited by concentrations that did not exceed 0.5 µg/ml for vancomycin and 1 µg/ml for metronidazole. E-test was performed for further determination of MICs. The results of two methods were agreeable for all but one strain. The broth microdilution method in this study showed as reproducible and reliable
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	Anaerobe Society of the Americas; Anaerobe 2010; 2010; Str. 154; Avtorji / Authors: Pirš Tina, Avberšek Jana, Zdovc Irena, Ocepek Matjaž

	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci		
3.	COBISS ID	512109368	Vir: COBISS.SI	
	Naslov	SLO	Clostridium difficile pri živalih in v hrani: nova grožnja zdravju?	
		ANG	Clostridium difficile in animals and food: a new emerging threat?	
	Opis	SLO	V vabljenem predavanju na kongresu Francoskega društva za mikrobiologijo je predavateljica predstavila podatke o širjenju bakterije C. difficile v živalskem rezervoarju, ter možnih prenosih med ljudmi in živalmi in pomenu teh prenosov za porast izvenbolnišničnih okužb.	
		ANG	This was invited lecture at meeting dedicated to C. difficile organized by French Microbiological Society. It has covered current spread of C. difficile within animal reservoir and possible transmission routes between humans and animals and their importance for community associated C. difficile infections.	
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje		
	Objavljeno v	2011; Avtorji / Authors: Rupnik Maja		
Tipologija	3.16 Vabljeno predavanje na konferenci brez natisa			
4.	COBISS ID	263192832	Vir: vpis v poročilo	
	Naslov	SLO	Knjiga povzetkov / 4th ICDS - International Clostridium Difficile Symposium, September, 20th to 22nd 2012, Bled, Slovenia	
		ANG	Abstract book / 4th ICDS - International Clostridium Difficile Symposium, September, 20th to 22nd 2012, Bled, Slovenia	
	Opis	SLO	Članica projektne skupine (M. Rupnik) je predsednica Organizacijskega odbora mednarodnega kongresa 4th International Clostridium difficile Symposium, ki je potekal septembra 2012 na Bledu, Slovenija.	
		ANG	President of the organizing committee of 4th International Clostridium difficile Symposium, September 2012, Bled, Slovenia	
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja		
	Objavljeno v	Abstract book / 4th ICDS - International Clostridium Difficile Symposium, September, 20th to 22nd 2012, Bled, Slovenia		
Tipologija	2.30 Zbornik strokovnih ali nerecenziranih znanstvenih prispevkov na konferenci			
5.	COBISS ID	3584378	Vir: COBISS.SI	
	Naslov	SLO	Clostridium difficile pri ovcah in kozah v Sloveniji	
		ANG	Clostridium difficile in goats and sheep in Slovenia	
	Opis	SLO	Rezultati študije nakazujejo, da je drobnica lahko rezervoar C. difficile in da so predvsem mlade živali kolonizirane s podobnimi ribotipi kot druge živali in ljudje. Ribotip 014/020, ki smo ga izolirali pri kozi, je najpogostejši ribotip v Sloveniji in smo ga dokazali tudi pri ljudeh, perutnini, teletih, psu in v okolju.	
		ANG	The results of this study indicate that young domestic small ruminants may also be the reservoir of C. difficile and are colonized with similar ribotypes as other animals and humans. Ribotype 014/020 found in goat is the most prevalent in Slovenia and was also isolated from humans, poultry, calves, dog and the environment.	
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci		
	Objavljeno v	Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2012; Str. 186; Avtorji / Authors: Avberšek Jana, Pirš Tina, Mićunović Jasna, Zajc Urška, Rupnik Maja, Ocepek Matjaž		
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci			

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Poglavje v monografiji:

RUPNIK, Maja, SONGER, J. Glenn. Clostridium difficile : its potential as a source of foodborne disease. V: TAYLOR, Steve L. (ur.). Advances in food and nutrition research. Vol. 60, (Advances in food and nutrition research, Vol. 60). 1st ed. Amsterdam [etc.]: Elsevier/Academic Press, cop. 2010, str. 53-66.

Vabljen predavatelj:

Rupnik M. Clostridium difficile - a new zoonotic disease? Workshop „Zoonosen und Bakterielle Meningitis, AGES Akademie, Bad Waltersdorf, 22. in 23. 1. 2009.

RUPNIK, Maja, ZIDARIČ, Valerija, OCEPEK, Matjaž, JANEŽIČ, Sandra. Zoonotski potencial bakterije Clostridium difficile = Zoonotic potential of Clostridium difficile. V: PETROVEC, Miroslav (ur.). 4. Baničevi dnevi, Radenci, november 2012 – Zoonoze.

Organizacija kongresov:

ICDS (3rd International Clostridium difficile Symposium), Bled 2010, Predsednica organizacijskega odbora M. Rupnik

ICDS (4th International Clostridium difficile Symposium), Bled 2012, Predsednica organizacijskega odbora M. Rupnik

9th Congress of the Slovenian Biochemical Society, 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation, 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011, Sopredsednica organizacijskega odbora M. Rupnik

15th Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology [also] 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology, 3rd-7th July, 2012, Ljubljana, Sopredsednik organizacijskega odbora M. Ocepek

Uredništvo

Acta medico-biotechnica. Rupnik, Maja (član uredniškega odbora). Maribor: Medicinska fakulteta.

Anaerobe. Rupnik, Maja (področni urednik 2010, 2011). London; San Diego: Academic Press. Slovenian veterinary research. Ocepek, Matjaž (član uredniškega odbora). [English ed.].

Ljubljana: Veterinarska fakulteta.

Mentorstvo

Doktorska disertacija: JANEŽIČ, Sandra. Analiza medgenske regije ribosomskih operonov pri bakteriji Clostridium difficile (2012) Mentor: M. Rupnik

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Rezultati raziskav so pomemben prispevek k poznavanju prevalence okužb pri perutnini in drobnici, saj so do sedaj podatki o tem zelo skopi.

Prav tako smo razširili znanje o pogostosti različnih toksinotipov pri teh živalskih vrstah, kar prav tako do sedaj ni bilo opisano.

Opravili smo tudi eno najboljširnejših ribotipizacij živalskih in humanih sevov in tipizacijo živalskih sevov z metodo PFGE. Rezultati so nam pokazali, da so živali potencialni vir opkužbe za ljudi, obenem pa smo dobili vpogled v poti širjenja okužb znotraj in med različnimi živalskimi vrstami.

Ugotovljena nukleotidna zaporedja sevov, ki smo jih izolirali iz različnih živalskih vrst, bodo omogočila razvoj učinkovitejših metod za ugotavljanje in tipizacijo bakterij vrste C. difficile.

Ugotovili smo, da so meso in jajca v naših razmerah sicer možen vir okužb s C. difficile, a je tveganje nizko.

Opravili smo eno prvih obširnejših testiranj izolatov iz živali na občutljivost proti protimikrobnim sredstvom in njihovo primerjavo s sevi, izoliranimi iz ljudi v istem časovnem intervalu na skupnem geografskem področju. Zaradi širokega nabora protimikrobnih sredstev, saj smo za en sev določili občutljivost za 30 protimikrobnih sredstev, smo dobili dober vpogled na vzorce odpornosti tako glede na izvora seva kot tudi glede na njegov ribotip oziroma toksinotip.

Izboljšali smo postopek dokazovanja *C. difficile* v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve v bujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času (rtPCR) na aparaturi LightCycler. S tem smo dobili zanesljiv in hiter presejalni test, predvsem za vzorce z nizkim številom *C. difficile*.

ANG

Our study contribute important knowledge on prevalence of *C. difficile* in poultry and small ruminants, where data has been scarce until now. Also, extended knowledge on frequency and diversity of toxinotypes in these animal species, which had not been described before. This is also one of the most extended PCR ribotyping studies of human and animal isolates, and PFGE typing of animal isolates. The results indicate the animals as a potential source of infection for humans and show the transmission route of infections within and between animal species. Nucleotide sequences obtained from isolates of different animal species will allow development of more efficient methods for detection and typing of *C. difficile*. Meat and eggs were found as a possible, but unlikely source of *C. difficile* infections in our conditions. The study also includes one of the most comprehensive testing for antimicrobial susceptibility of animal strains and comparison to human strains, which have been isolated from common geographical area in the same time interval. As much as 30 antimicrobials have been tested for one strain and therefore we were able to get a good insight of susceptibility patterns within various animal species, various PCR ribotypes and toxinotypes, respectively. We improved the procedure for the detection of *C. difficile* in samples with low number of bacteria. Pre-enrichment step was added prior to LightCycler rtPCR with the purpose to increase the number of *C. difficile* in samples. Described procedure is accurate and rapid screening test for samples with low number of *C. difficile*.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Z ugotovitvijo prevalence bakterije *C. difficile* pri različnih vrstah domačih živali in njene odvisnosti od starostne skupine živali smo dobili osnovne podatke o razširjenosti bakterije pri živalih v Sloveniji. Genotipizacija izoliranih sevov in primerjava klonalnosti bakterijskih populacij pri ljudeh in živalih pa nam je pokazala možnosti prenosa med živalskimi vrstami in med živalmi in ljudmi. Poleg tega smo ugotovili, da okolje predstavlja pomemben vir klostridijskih spor za živali in ljudi. Rezultati so podlaga za načrt preventivnih ukrepov za omejitev širjenja in izbruhov okužb pri živalih, kar bo vplivalo na ekonomičnost pridelave hrane in oceno dejanskega zoonotskega potenciala okužb z bakterijo *C. difficile*. Slovenija je tako med prvimi državami, ki imajo zelo dobro raziskan tako živalski kot humani rezervoar (objavljeno v Janezic in sod., 2011, BMC Microbiol).

Spremljanje vzorcev odpornosti in morebitnega širjenja je pomembno, rezultati pa med državami zelo variirajo. Iz obširnih podatkov o občutljivosti živalskih sevov lahko zaključimo, da v Sloveniji zaenkrat še niso problem sevi z odpornostjo proti zdravilom izbora za zdravljenje ljudi, metronidazolu in vankomicinu, smo pa ugotovili več multirezistentnih sevov, ki so pripadala različnim ribotipom. Pri izolatih iz intenzivnih prašičjih rej, kjer se antibiotiki veliko uporabljajo tako v terapevtske kot preventivne namene, smo opazili prevladujoč vzorec rezistence na oksacilin in streptomycin, kar bi bila lahko podlaga za nadaljnje spremljanje teh sevov, povezavo z drugimi odpornimi bakterijami (npr. MRSA) in izdelavo smernic za racionalno uporabo antibiotikov v intenzivnih farmskih rejah.

V projektu razvita metoda, ki je izboljšala diagnostiko vzorcev z nizkim številom bakterij, je hitrejša od obstoječih metod in z njo bomo lahko dobili nove pomembne informacije o prisotnosti *C. difficile* tudi v hrani in okolju, saj za te vzorce ni standardnega postopka in je tako primerjava rezultatov različnih študij omejena.

V okviru projekta so se izobraževali številni mladi raziskovalci. Tako je bila med drugim izdelana ena doktorska disertacija, nadaljnji dve pa sta v zaključni fazi izdelave.

Člani projektne skupine so v času projekta objavili iz tematike *C. difficile* 26 znanstvenih člankov, od tega 10 v revijah iz kategorije A1.

ANG

Basic data on prevalence of *C. difficile* in various animal species in Slovenia were obtained, also regarding animal age group. Genotyping of isolates and clonal comparison of animal and human bacterial population have shown possible transmission routes between different animal species and between animals and humans. Additionally, the environment has been found as an important source of clostridial spores for animals and humans. The results represent the basis for planning preventive measures for limitation of transmission and outbreaks, which would impact economical food production and evaluation of zoonotic potential of *C. difficile* infection. Slovenia is one of the first countries, where both human and animal reservoir are intensively investigated (published in Janezic et al., 2011, BMC Microbiol).

Monitoring of antimicrobial susceptibility patterns and a possible increasing of resistance is very important, as results vary widely between the countries. There have been no metronidazole and vancomycin resistant strains found in Slovenia. However, we found multiresistant strains of various PCR ribotypes. In intensive pig farms, where antibiotics are commonly used for therapy and as well for prophylaxis, we found predominant resistance to oxacillin and streptomycin. This may be the basis to monitor these strains in future, also in connection with other resistant bacteria (MRSA), and to make guidance criteria for antimicrobial use in intensive farming. Improved procedure for the detection of *C. difficile* in samples with low number of bacteria, described within this project, is faster than existing methods and could be applied to different samples, which could broaden the knowledge about prevalence of *C. difficile* in food and environmental samples. Furthermore, there is no standard approach for the detection of *C. difficile* in food; therefore, application of improved procedure could enable comparison of results obtained in different studies.

Within the research project there were more young researchers trained and educated. One doctoral thesis was finished and two more are in the process of finalisation.

Members of the research groups published 26 scientific articles on *C. difficile* in the time of the project, 10 of those were published in journals of A1 category.

**11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni**

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

12.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Zmanjšanje porabe materialov in					

G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

13.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

--	--

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
		1.	
		2.	
		3.	
		4.	
		5.	
Komentar			
Ocena			

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³

14.1. Izjemni znanstveni dosežek

Izboljšali smo postopek dokazovanja *C. difficile* v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve v bujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler (LC rtPCR). Enodnevna predobogatitev, ki ji sledi dokazovanje vseh treh toksinskih genov *C. difficile* z LC rtPCR je zanesljiv postopek, ki nam poda prvo informacijo o prisotnem toksinskem tipu in je hitrejši od obstoječih metod. Postopek je primeren tudi za pregledovanje večjega števila vzorcev, saj vzorcev z negativnim rtPCR rezultatom po enodnevni inkubaciji ni potrebno nadaljnje gojiti za pridobitev izolata. S tem postopkom bi lahko dobili tudi nove pomembne informacije o prisotnosti *C. difficile* v hrani in okolju, saj za te vzorce ni standardnega postopka in je tako primerjava rezultatov različnih študij omejena. Raziskava je objavljena v *Veterinary microbiology* (druga revija na področju veterinarstva) [COBISS.SI-ID 3637882]

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Med izjemne družbeno-ekonomske dosežke uvrščamo organizacijo kongresa 4th International Clostridium difficile Symposium (ICDS). To je najpomembnejša mednarodna konferenca na temo raziskav bakterije *C. difficile*, kar dokazuje tudi konstantno naraščanje števila udeležencev (leta 2010 204 udeleženci iz več kot 20 držav; v 2012 je bilo 261 udeležencev in 34 držav iz vseh kontinentov). ICDS tradicionalno poteka v Sloveniji od leta 2004. Udeležujejo se je vse najpomembnejše raziskovalne skupine, ki se ukvarjajo s *C. difficile* z zelo različnih aspektov. M. Rupnik je med glavnimi pobudniki te konference ter glavni organizator in predsedujoča Organizacijskemu odboru. To njej in njeni skupini ter celotnemu slovenskemu raziskovalnemu prostoru daje izjemno mednarodno prepoznavnost. Informacija o vseh kongresih ICDS je dosegljiva na povezavi www.icds.si

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Matjaž Ocepek

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	28.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/139

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v

letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00

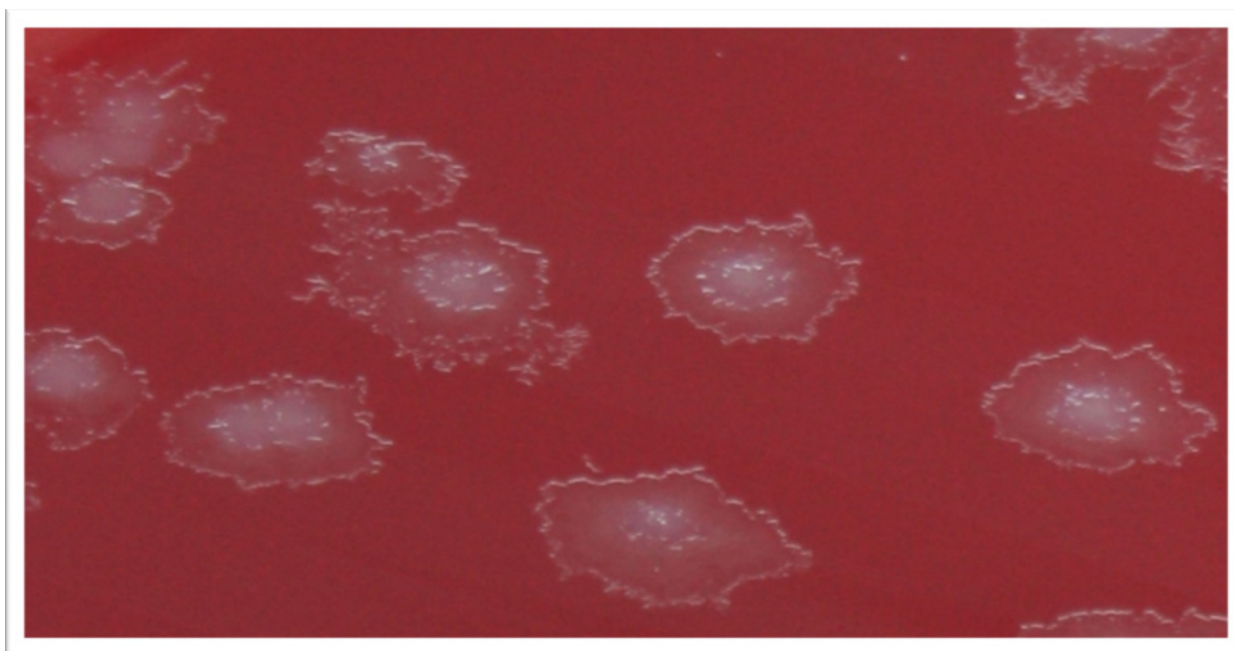
60-F0-22-2A-A9-9D-2A-65-DB-AF-75-66-3B-34-BD-D8-2C-1B-BA-FD

Biotehniške vede

Področje: 4.04 Veterina

Dosežek 1: Izboljšava postopka dokazovanja *Clostridium difficile* pri živalih

Vir: AVBERŠEK, J., et al. Improved detection of *Clostridium difficile* in animals by using enrichment culture followed by LightCycler real-time PCR. *Vet. microbiol.* [Print ed.], 2013, in press.



Izboljšali smo postopek dokazovanja *C. difficile* v vzorcih z nizkim številom bakterij z vpeljavo obogatitve v bujonu pred pomnoževanjem z metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler (LC rtPCR). Enodnevna predobogatitev, ki ji sledi dokazovanje vseh treh toksinskih genov *C. difficile* z LC rtPCR je zanesljiv postopek, ki nam poda prvo informacijo o prisotnem toksinskem tipu in je hitrejši od obstoječih metod. Postopek je primeren tudi za pregledovanje večjega števila vzorcev, saj vzorcev z negativnim rtPCR rezultatom po enodnevni inkubaciji ni potrebno nadaljnje gojiti za pridobitev izolata. S tem postopkom bi lahko dobili tudi nove pomembne informacije o prisotnosti *C. difficile* v hrani in okolju, saj za te vzorce ni standardnega postopka in je tako primerjava rezultatov različnih študij omejena.

4th ICDS

International
Clostridium difficile
Symposium

September,
20th to 22nd 2012
Bled, Slovenia

ICDS je na področju raziskav bakterije *C. difficile* osrednji dogodek v svetovnem merilu. Na tem kongresu se srečujejo vse najpomembnejše raziskovalne skupine iz kliničnih, univerzitetnih ter industrijskih okolij. Serija kongresov ICDS se je pričela leta 2004 in tradicionalno potekajo v Sloveniji.

www.icds.si

Organizing committee

Maja Rupnik (Maribor, Slovenia)
Anne Collignon (Paris, France)
Michel Delmee (Brussels, Belgium)
Bruno Dupuy (Paris, France)
Dale Gerding (Chicago, USA)
Haru Kato (Tokyo, Japan)
Tom Louie (Calgary, Canada)
Paola Mastrantonio (Rome, Italy)
Nigel Minton (Nottingham, UK)
Ian Poxton (Edinburg, UK)
Tom Riley (Perth, Australia)
Bo-Moon Shin (Seoul, Korea)
Glenn Songer (Ames, USA)
Linc Sonenshein (Boston, USA)
Scot Weese (Guelph, Canada)

1st ICDS, Kranjska Gora, 2004 (70 udeležencev)

2nd ICDS, Maribor, 2007 (120 udeležencev)

3rd ICDS, Bled, 2010 (204 udeležencev iz več kot 20 držav)

4th ICDS, Bled, 2012 (261 udeležencev iz več kot 34 držav)

Maja Rupnik je predsednica organizacijskega odbora in glavni organizator kongresov ICDS.

