

VALIDACIJA POSTOPKA UGOTAVLJANJA PRISOTNOSTI BAKTERIJE *Clostridium difficile* V VZORCIH SUROVEGA MESA

Majda Biasizzo*, Stanka Vadnjal, Urška Henigman, Urška Jamnikar Ciglencečki

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Ljubljana, Slovenija

majda.biasizzo@vf.uni-lj.si

Bakterije *Clostridium difficile* povzročajo pri ljudeh različna obolenja, ki so mnogokrat povezana z bolnišničnim zdravljenjem in antibiotičnimi terapijami. Prenos teh bakterij preko živali, pri katerih so bile tudi izolirane, na živila in s hrano na ljudi, še ni potrjen. Podatki o kontaminaciji živil so zelo različni, kar je lahko povezano tudi z uporabo različnih postopkov dokazovanja. V naši raziskavi smo optimizirali in med seboj primerjali različne parametre pri postopku ugotavljanja prisotnosti bakterij *C. difficile* z molekularno metodo PCR v realnem času in izolacijo na trdnih gojiščih. Spreminjali smo čas obogatitve vzorcev, ter pri izolaciji obdelavo vzorcev po obogatitvi in uporabo trdnih gojišč. Najprimernejši izbrani postopek smo preverili na različnih vzorcih surovega mesa, vključno z začinjnim in mariniranim mesom. Mejo zaznavanja metode smo določili pri 5-10 cfu, kjer je bila občutljivost metode PCR v realnem času 100% in izolacija 96%. Izbrano metodo smo ocenili kot primerno za ugotavljanje prisotnosti bakterij *C. difficile* v vzorcih surovega mesa.

Ključne besede: *Clostridium difficile*, metoda izolacije in molekularne detekcije, živila, vzorci mesa, validacija postopka

Uvod

Clostridium difficile (*C. difficile*) je gram-pozitivna, sporogena, anaerobna bakterija, ki lahko povzroča različna obolenja pri ljudeh in živalih. Okužba lahko poteka brez kliničnih znakov, lahko pa se izraža kot driska, kolitis, v hujših primerih lahko celo vodi v perforacijo črevesja, sepsu in smrt (Rupnik in sod., 2009; Gauld in Limbago, 2010). Pri ljudeh je okužba s to bakterijo najpogostejši vzrok drisk pri bolnikih, ki so hospitalizirani, oziroma tistih, ki so zdravljeni z antibiotiki (Freeman in sod., 2010). Objavljene so številne študije, v katerih primerjajo seve, ki so bili izolirani pri ljudeh, pri živalih in iz živil, ter izpostavljajo možnost prenosa teh bakterij iz živali na ljudi preko živil (Rupnik in Songer, 2010). Bakterije *C. difficile* so bile izolirane iz različnih vrst živil, večinoma iz živil živalskega izvora. Podatki o stopnji kontaminacije so zelo različni in kažejo na občutno pogostejšo kontaminacijo živil v državah Severne Amerike (do 50%), v primerjavi z Evropo (do 5%) (Rupnik in Songer, 2010). Postopki ugotavljanja prisotnosti ter izolacije bakterije *C. difficile* tako pri testiranju kliničnega materiala, kakor živil so različni in zato izsledke teh testiranj težko primerjamo med seboj. V naši raziskavi opisujemo validacijo postopkov, s katerimi ugotavljamo prisotnost bakterij *C. difficile* - izolacijo iz vzorcev surovega mesa in mesnih pripravkov ter molekularno metodo PCR v realnem času.

Material in metode

V prvi stopnji validacije smo pripravili vzorce mletega mesa (10 g) in jih do uporabe zamrznili pri -70°C . Vzorce smo inokulirali s 3 različnimi sevi *C. difficile* v različnih koncentracijah. Uporabili smo seve: S1 - ATCC 9689, S2 - T7/MB izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri teletu, S3 - CD 400 izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri prašiču.

Seve smo hranili anaerobno pri 37°C v gojišču - cooked meat medium (CMM) (Oxoid, VB). Da smo pripravili pričakovan nivo kontaminacije vzorcev, smo kulture razredčili ter desetim gramom mesa dodali ustrezen volumen bakterijske suspenzije. Da bi ugotovili ali razlike med sevi lahko vplivajo na uspešnost metode (sposobnost razmnoževanja v bujonu, rastnost na gojiščih), smo v tem poskusu inokulirali vzorce z vsakim sevom posebej. Za določitev meje zaznavanja postopka, smo pripravili 3 koncentracijske nivoje: 500-1000, 50-100, 10-50 cfu/vzorec in za vsako kombinacijo nivoja in seva po 2 vzorca. Kot kontrolo postopka smo ob vsaki seriji inokulacij vzorcev preverili tudi število bakterij v inokulumu. Vzoredno z vzorci mesa smo testirali posamezne seve v obogatitvenem bujonu brez mesa, vzorec ne-inokuliranega mesa ter vzorec samega obogatitvenega bujona. Skupno smo v prvi stopnji pripravili 33 vzorcev.

Vse vzorce smo obogatili v 90 ml gojišča TCCFB-CD+L, ki je sestavljen iz Cikloserin Cefoksitin fruktozega bujona (40 g/L proteoza pepton (Biolife), 5.0 g/L dinatrijevega hidrogen fosfata (Merck), 2.0 g/L natrijevega klorida (Merck), 0.1 g/L magnezijevega sulfata (Sigma-Aldrich), 6.0 g/L Fruktoze D (-)(F) (Fisher Scientific.), z dodatkom tauroholične kisline (Calbiochem), ter po avtoklaviranju še *Clostridium difficile* suplementa (Oxoid) in lizocima (Serva).

Vzorce smo inkubirali v anaerobnih pogojih (GENbox anaer, BIOMERIEUX), pri 37°C za 1, 4 in/ali 7 dni.

Po obogatitvi smo odvzeli vzorce za postopek PCR v realnem času in za izolacijo. Izolacijo s presajanjem na plošče smo izvajali direktno iz obogatitve vzorca in z nasajanjem sedimenta po obdelavi z 96% etanolom (1:1) in centrifugiranjem (4000g, 10 min). Vzorce smo nasadili na krvne plošče in plošče CCFA - *Clostridium difficile* agar base (Oxoid) ter jih 48 ur inkubirali anaerobno pri 37°C .

V drugi stopnji validacije smo uporabili vzorce različnih vrst mesa, vključili smo tudi začinjena in marinirana živila (Tabela 1). Skupno smo pregledali 25 različnih vzorcev, ki smo jih pripravili v dvojniku ter enemu dodali inokulum z bakterijsko kulturo *C. difficile*, drugemu pa ne. Inokulum smo pripravili v obliki koktajla vseh treh sevov, ki smo ga vzorcem dodali v volumnu, da smo dosegli koncentracijo *C. difficile* 5-20 cfu/vzorec. Glede na rezultate prve stopnje validacije smo v drugi stopnji za molekularno detekcijo uporabili 1 dnevno obogatitev pri 37°C v TCCFB-CD+L v anaerobnih pogojih, ter za izolacijo 4 oz. 7 dnevno obogatitev. Detekcijo in izolacijo smo izvedli po že opisanem postopku. Za izolacijo smo uporabili plošče CCFA in krvni agar.

Rezultati

V prvi stopnji validacije smo z molekularno metodo PCR v realnem času prisotnost *C. difficile* v vseh treh koncentracijskih območjih ugotovili že po 1 dnevu obogatitve, medtem ko izolacija po 1 dnevu pri najvišji stopnji kontaminacije ni bila uspešna. Ko smo inkubacijo podaljšali na 4 oz. 7 dni, pa smo *C. difficile* izolirali iz vseh inokuliranih vzorcev. Pri nasajanju vzorcev direktno iz obogatitvenega bujona je bila stopnja detekcije občutno slabša kot po

centrifugiranju in nasajanju sedimenta. Izolacije vzorcev kontaminiranih s srednjo in nizko koncentracijo smo, glede na ugotovitve pri višjih koncentraciji, testirali po 4 in nato še po 7 dneh obogatitve. Izolacija *C. difficile* je bila pri inokuliranih vzorcih mesa v obeh primerih uspešna (12/12). Vendar pa je bila po 4 dneh slabša izolacija sevov, kjer ni bilo prisotnega mesa (5/6), medtem ko smo po 7 dneh uspešno izolirali *C. difficile*, a je bila rast na ploščah občutno šibkejša v primerjavi z rastjo, ko je bil bakterijski sev dodan k mesu.

Tabela 1: Rezultati validacije postopkov izolacije bakterije *C. difficile* v mesu in mesnih pripravkih, ocena rasti pri izolaciji ter ugotavljanje prisotnosti nukleinske kisline *C. difficile* z metodo PCR v realnem času (M - vzorec mesa; M+S1/S2/S3 – vzorec mesa inokuliran s sevom *C. difficile* S1, S2 ali S3; - negativno oz. ni rasti; + pozitivno oz. šibka rast; ++ dobra rast; +++ zelo dobra rast)

| Št. | Vzorec | Vzorci brez dodatka | | | | | Vzorci z dodatkom kulture <i>C. difficile</i> (5-20cfu) | | | | | | |
|-----|-----------------------------|---------------------|----|--------|----|--------|---|-------|--------|-------|--------|-------|----|
| | | Obogatitev | | | | | | | | | | | |
| | | 1 dan | | 4 dni | | 7 dni | | 1 dan | | 4 dni | | 7 dni | |
| | | qPCR | KA | TCC-FA | KA | TCC-FA | qPCR | KA | TCC-FA | KA | TCC-FA | qPCR | KA |
| 1 | Masa za čevapčice | - | - | - | - | - | + | ++ | ++ | ++ | +++ | | |
| 2 | Pleskavica | - | - | - | - | - | + | ++ | ++ | ++ | +++ | | |
| 3 | Piščančje meso | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 4 | Masa za čevapčice | - | - | - | - | - | + | +++ | + | +++ | +++ | | |
| 5 | Mariniran svinjski vrat | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 6 | Piščančje meso | - | - | - | - | - | + | +++ | ++ | +++ | +++ | | |
| 7 | Piščančji vok | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 8 | Piščančje meso | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 9 | Piščančje meso | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 10 | Piščančji vok | - | - | - | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | | |
| 11 | Mešano mleto meso | - | | | - | - | + | | | - | ++ | | |
| 12 | Čevapčiči | - | | | - | - | + | | | + | ++ | | |
| 13 | Začinjena piščančja krila | - | | | - | - | + | | | - | +++ | | |
| 14 | Piščančje meso | - | | | - | - | + | | | + | + | | |
| 15 | Piščančje meso - file | - | | | - | - | + | | | ++ | + | | |
| 16 | Mleto meso | - | | | - | - | + | | | + | ++ | | |
| 17 | Piščančje meso - krače | - | | | - | - | + | | | + | +++ | | |
| 18 | Mleto meso | - | | | - | - | + | | | ++ | +++ | | |
| 19 | Mleto meso | - | | | - | - | + | | | - | - | | |
| 20 | Piščančja nabodala | - | | | - | - | + | | | + | +++ | | |
| 21 | Piščančje nogice - polnjene | - | | | - | - | + | | | + | +++ | | |
| 22 | Mleto meso | - | | | - | - | + | | | ++ | +++ | | |
| 23 | TCC-FB | - | | | - | - | + | | | +++ | +++ | | |
| 24 | TCC-FB | - | | | - | - | + | | | +++ | +++ | | |
| 25 | TCC-FB | - | | | - | - | + | | | + | ++ | | |

V drugi stopnji validacije nismo dokazali prisotnosti *C. difficile* pri nobenem od neinokuliranih vzorcev, ne z uporabo molekularne metode PCR v realnem času, kakor tudi ne z metodo izolacije (Tabela 1). Izolacija po 4 dneh obogatitve (prvih 10 vzorcev) je bila sicer uspešna (10/10), vendar je bila rast pri nekaterih vzorcih šibka, medtem ko je bila po 7 dnevni obogatitve le-ta ocenjena kot zelo dobra (10/10). Izolacijo zadnjih 15 inokuliranih vzorcev smo izvedli le po 7 dneh obogatitve in je bila uspešna pri 93% vzorcev (14/15). Skupno je bila občutljivost ugotavljanja bakterij *C. difficile* z molekularno metodo PCR v realnem času 100%, pri izolaciji po 7 dneh obogatitve na krvnih ploščah 88% (22/25) ter z uporabo plošč CCFA 96% (24/25).

Razprava

Z raziskavo smo želeli določiti ustrezen postopek za ugotavljanje prisotnosti kakor tudi za izolacijo bakterij *C. difficile*, ki bi ga v nadaljevanju uporabljali za določanje pojavljanja teh bakterij v vzorcih živil. Primerjali smo uspešnost molekularne metode (PCR v realnem času) in izolacije glede na različen čas obogatitve vzorcev (1, 4 in 7 dni). Poleg tega smo pri izolaciji primerjali tudi postopke nasajanja na trdno gojišče (krvni agar, CCFA) direktno iz obogatitvenega bujona ter s predhodno obdelavo z etanolom in centrifugiranjem.

Ugotovili smo, da za ugotavljanje prisotnosti z metodo PCR v realnem času zadošča že enodnevna obogatitev v TCCFB-CD+L medtem, ko ja za uspešno izolacijo potrebnih kar 7 dni obogatitve. Izolacija po obdelavi z etanolom in centrifugiranjem se je izkazala za uspešnejšo v primerjavi z direktnim nasajanjem iz obogatitvenega bujona. Uporaba selektivnih plošč CCFA se je v primerjavi z neselektivnim krvnim agarjem, zaradi manjšega števila motečih anaerobnih kontaminantov v vzorcih, izkazala kot boljša izbira. Z opisano metodo smo uspeli določiti prisotnost in izolirati *C. difficile* pri 96% (24/25) vzorcev pri testirani koncentraciji 5-10 cfu/vzorec, kar smo tudi določili za mejo zaznavanja naše metode.

Za namen nadaljnjih raziskav smo izbrali sledeč postopek:

1. stopnja: obogatitev 10g vzorca + 90 ml TCCFB-CD+L; 37°C; anaerobno
2. stopnja: po 1 dnevu obogatitve detekcija s PCR v realnem času
3. stopnja: po 7 dneh obogatitve – izolacija:
obdelava z 96% etanolom (1:1) 30 min;
centrifugiranje 4000g 10 min;
nasajanje sedimenta po odstranitvi tekočine na plošče CCFA;
inkubacija 37°C anaerobno 2 dni

Reference

Freemen J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorthuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 529–49.

Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? Clin Infect Dis. 2010; 51: 577-82.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 2009; 7: 526-536.

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

Validation of *Clostridium difficile* detection from meat samples

Clostridium difficile cause various human diseases often associated with hospital treatment and antibiotic therapies. Transmission of those bacteria through animal reservoirs and food to the people has not been confirmed yet. Data about food contamination varies widely and can be the result of different detection methods used. In our study we have optimized the molecular detection method and the isolation on solid media, regarding the enrichment time. In addition different sample treatment after enrichment and different isolation plates were used. Our optimised protocol was tested using raw meats of different origin, including spiced and marinated. The limit of detection for our method of isolation and detection of *C. difficile* out of meat samples was set at 5-10 CFU per sample, with the 100% sensitivity for qPCR and 96%.for isolation.

Key words: *Clostridium difficile*, detection and isolation method, food, meat samples, validation