

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Phäno- und genotypische Charakterisierung
konsekutiver Isolate eines Patienten mit
rezidivierenden *Clostridium difficile*-Infektionen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Emilie Sachsenheimer

aus

Mannheim

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. med. U. Groß
Ko-Referent:	Prof. Dr. med. H. Schwörer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 20.03.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Phäno- und genotypische Charakterisierung konsekutiver Isolate eines Patienten mit rezidivierenden *Clostridium difficile*-Infektionen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.02.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Einführung <i>Clostridium difficile</i>	1
1.2 Symptome und Risikofaktoren	2
1.2.1 Symptome.....	2
1.2.2 Risikofaktoren	3
1.3 Epidemiologie.....	3
1.3.1 Inzidenz und Mortalität von <i>Clostridium difficile</i> -Infektionen	3
1.3.2 <i>Relapses</i> , Reinfektionen und gemischte Infektionen.....	4
1.3.3 Die Ribotypisierung von <i>Clostridium difficile</i> -Isolaten	5
1.3.4 Der hypervirulente Stamm Ribotyp 027	5
1.4 Pathogenese von <i>Clostridium difficile</i> -Infektionen	5
1.4.1 Die Spore: eine umweltresistente Überdauerungsform als Überlebensstrategie.	6
1.4.2 Der Weg der Sporen	6
1.5 Motilität von <i>Clostridium difficile</i> -Stämmen	7
1.6 Zellteilung und Zelltrennung bei <i>Clostridium difficile</i>	7
1.7 Diagnostik.....	8
1.8 Therapie	8
1.9 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Verwendete Materialien	10
2.1.1 Laborgeräte.....	10
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien	12
2.1.4 Molekularbiologische <i>tool kits</i>	12
2.1.5 Enzyme und zugehörige Reaktionspuffer	13
2.1.6 Chemikalien.....	14
2.1.7 Oligonukleotide	15
2.1.8 Verwendete Bakterienstämme.....	16
2.1.9 Pufferlösungen und Nährmedien	17
2.2 Klinische Datenerhebung	19
2.3 Allgemeine Methoden	19
2.4 Anzuchtbedingungen von Bakterienkulturen	19
2.4.1 Anaerobe Anzucht von <i>Clostridium difficile</i>	19
2.4.2 Anzuchtbedingungen einer <i>Clostridium difficile</i> -Starterkultur	19
2.4.3 Anzucht von <i>Clostridium difficile</i> -Kulturen zur RNA-Isolation.....	20
2.4.4 Anzuchtbedingungen für rasterelektronenmikroskopische Analysen	20

2.5	Genotypische Untersuchungen und klassifizierende Verfahren.....	20
2.5.1	Toxinotypisierung.....	20
2.5.2	Ribotypisierung	21
2.6	Phänotypische Untersuchungen von <i>Clostridium difficile</i> -Stämmen.....	21
2.6.1	Adhärenzassay	21
2.6.2	Motilitäts- und Swimmingassays	21
2.6.3	Antibiogramm.....	22
2.6.4	Sporulationsassays.....	22
2.6.5	Wachstumskurven	23
2.6.6	Mikroskopie und Färbung von Bakterienmembranen	23
2.6.7	Rasterelektronenmikroskopie	23
2.6.8	Detektion der Toxinproduktion bei <i>Clostridium difficile</i>	24
2.7	Konservierende Methoden.....	24
2.7.1	Kryokonservierung von <i>Clostridium difficile</i>	24
2.7.2	Anlegen von Microbanks™ zur Konservierung von <i>Clostridium difficile</i>	24
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.8.1	Polymerase-Kettenreaktion	25
2.8.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.8.3	Sequenzierung von DNA.....	26
2.8.4	Isolierung chromosomaler DNA von <i>Clostridium difficile</i>	26
2.8.5	Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	27
2.8.6	Arbeiten mit RNA	28
3	Ergebnisse	33
3.1	Patientendatenerhebung im Rahmen einer rezidivierenden <i>Clostridium difficile</i> - Erkrankung	33
3.2	Klassifizierung der klinischen Isolate	37
3.2.1	Makromorphologie der <i>Clostridium difficile</i> -Isolate.....	37
3.2.2	Ribotypisierung der Isolate.....	39
3.3	Antibiogramme.....	40
3.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>Clostridium difficile</i> -Isolate.....	42
3.4.1	Sporulationsverhalten der klinischen Isolate.....	42
3.4.2	Motilität der Isolate	44
3.4.3	Absinkverhalten der Isolate	46
3.4.4	Wachstumsverhalten mit Analyse des Absinkverhaltens.....	46
3.4.5	Adhärenz der Isolate.....	48
3.4.6	Zelllängenvariabilitäten zwischen <i>Clostridium difficile</i> -Isolaten.....	48
3.5	Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung	53
4	Diskussion.....	54
4.1	Rezidivierende <i>Clostridium difficile</i> -Infektion - Epidemiologie und klinischer Verlauf	54

4.2	Genetische Charakterisierung der klinischen <i>Clostridium difficile</i> -Isolate.....	57
4.2.1	<i>Clostridium difficile</i> -Stämme des Toxinotyps XI.....	59
4.2.2	Mikroevolution bei wiederkehrenden <i>Clostridium difficile</i> -Infektionen?.....	60
4.3	Phänotypische Variabilität der klinischen <i>Clostridium difficile</i> -Isolate.....	60
4.3.1	Sporulationsverhalten von unterschiedlichen <i>Clostridium difficile</i> -Stämmen..	63
5	Zusammenfassung	65
6	Anhang.....	66
6.1	Vergleichende Literaturrecherche zu <i>Clostridium difficile</i> -Rezidiven.....	66
6.1.1	Rezidivraten.....	66
6.1.2	Reinfektionsraten.....	66
6.2	<i>In silico</i> -Analyse.....	67
7	Literaturverzeichnis	68
7.1	Liste der eigenen Publikationen	79

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AP	alkalische Phosphatase
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BHIS	<i>brain heart infusion supplemented</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CAA	<i>casamino acids</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCFA	Cycloserin Cefoxitin-Fruktose-Agar
CDI	<i>Clostridium difficile</i> -Infektion
CDP*	2-chlor-5-(4-methoxyspiro {1,2-Dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat Dinatriumsalz
CLO	<i>Clostridium difficile</i> -Agar
COS	Columbia-Agar + 5% Schafsblut
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
FM-64	<i>N</i> -(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromid
fwd.	<i>forward</i>
GI	gastrointestinal
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
i.v.	intravenös
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MHF-Agar	Mueller Hinton Agar + 5% Pferdeblut + 20 mg/l β-NAD
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MHK	minimale Hemm-Konzentration
MLS	Multilocus-Sequenz
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nt	<i>not tested</i>
OD _λ	optische Dichte
p.o.	<i>per os</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPI	Protonenpumpeninhibitor
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rev.	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Ribotyp
S	Sporensuspension
S/V	Sporen und vegetativen Zellen in Suspension
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TcdA	Toxin A
TcdB	Toxin B
TOF	<i>time of flight</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
w/v	Masse pro Volumen
ZAP	Zellaufschlusspuffer

1 Einleitung

1.1 Einführung *Clostridium difficile*

Das grampositive, Sporen bildende, obligat anaerobe Stäbchenbakterium *Clostridium difficile* (*C. difficile*) verursacht Antibiotika-assoziierte Durchfallerkrankungen von unterschiedlichster Schwere (Borriello 1998; Rupnik et al. 2009). So kann eine *C. difficile*-Infektion (CDI) neben Diarrhoe und Erbrechen eine sogenannte pseudomembranöse Kolitis verursachen. Außerdem kann in seltenen Fällen eine Darmperforation mit Peritonitis sowie ein toxisches Megakolon als Komplikation mit möglichem letalen Ausgang Folge einer CDI sein.

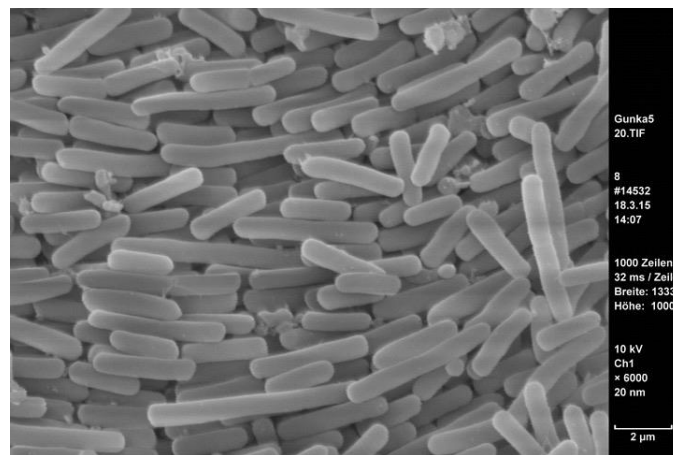


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme einer *C. difficile*-Kolonie eines klinischen Isolats, welches in dieser Arbeit untersucht und in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. C. Wrede am Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der MHH erstellt wurde.

Der Stellenwert von CDIs in Krankenhäusern und ambulantem Umfeld gewinnt stetig an Bedeutung. Dies begründet sich durch die Zunahme der Schwere der Erkrankungen und durch eine steigende Inzidenz der CDIs in den letzten Jahrzehnten (Redelings et al. 2007; Davies et al. 2014; Rupnik et al. 2009; Epidemiologisches Bulletin 2014). Aus der steigenden Inzidenz resultiert, dass CDIs international die häufigste Ursache für nosokomiale Diarrhoen geworden sind und überdies zu den häufigsten nosokomialen Infektionen gehören (Magill et al. 2014; Dubberke und Olsen 2012).

Zudem stellen hohe Rezidivraten (zwischen 15 – 35 %) ein großes Problem dar. Die Kosten, die durch CDIs entstehen, sind folglich eine enorme Belastung für die Gesundheitssysteme der Welt (Lessa et al. 2015; Dubberke und Olsen 2012). Trotz eines sich aus diesem Umstand

ergebenden großen Forschungsinteresses ist vieles hinsichtlich der Morphogenese, Pathogenese und Immunologie des Erregers nicht untersucht. Darüber hinaus ist nur wenig über die Transmission des Keimes sowie über die Entstehung von Infektionswellen mit besonders schweren Verläufen bekannt.

1.2 Symptome und Risikofaktoren

1.2.1 Symptome

Im Vordergrund steht bei einer CDI die Kolitis. Diese Entzündung der Darmwand äußert sich klassischerweise durch Diarrhoe und Übelkeit, aber auch durch Bauchschmerzen, Fieber und Leukozytose (Lübbert et al. 2014; Borriello 1998). In der Koloskopie imponieren die sogenannten Pseudomembranen (siehe **Abbildung 2 A**), welche aus einem fibrinösen Granulozyten-Epithelzellexsudat bestehen (siehe **Abbildung 2 B**) (Rupnik et al. 2009; Schneider et al. 2007; Borriello 1998). Unterhalb dieser Membranen kommt es in der Submukosa zu verschiedenen Ausprägungen von Nekrose und Entzündung. *C. difficile* ist der häufigste Grund für diese sogenannte pseudomembranöse Kolitis, jedoch können auch andere Erreger und Grunderkrankungen Ursache für solch ein klinisches Bild sein. CDIs verlaufen dabei nicht selten fulminant und komplikationsreich (Dallal et al. 2002; Abou Chakra et al. 2014; Lessa et al. 2015).

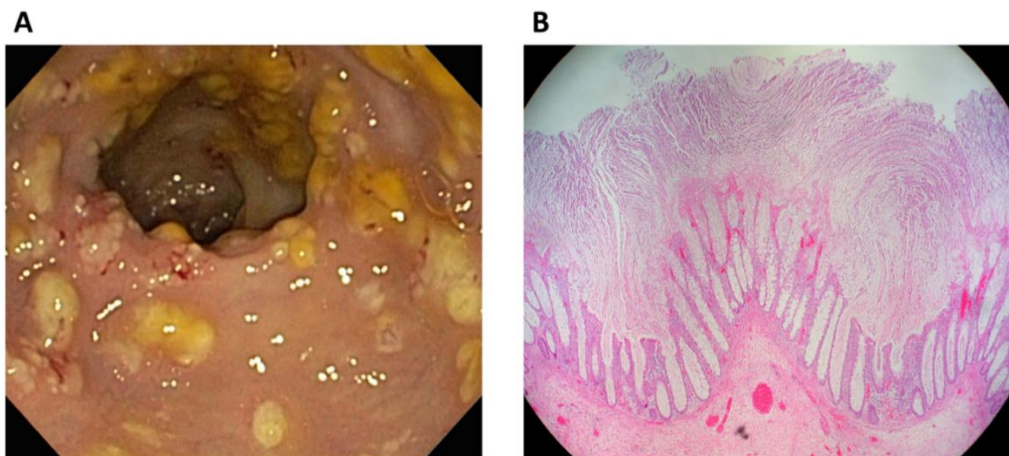


Abbildung 2: Koloskopische Aufnahme (A) sowie Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) einer bioptischen Probe (B) einer pseudomembranösen Kolitis. Fibrinöse Granulozytenexsudate liegen der Schleimhaut des Kolons auf.

Grafikquelle Abbildung 2A:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomembranous_colitis_1.jpg.

Grafikquelle Abbildung 2B:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomembranous_Colitis_\(H%26E\)_\(7414583762\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomembranous_Colitis_(H%26E)_(7414583762).jpg))

1.2.2 Risikofaktoren

Neben gastroenterologischen Eingriffen, einem erhöhten Lebensalter, weiblichem Geschlecht, kaukasischer Herkunft, der Gabe von Protonenpumpenhemmern (PPI) und einer Hospitalisierung ist es in erster Linie die Einnahme von Antibiotika, welche das Risiko für eine *Clostridium difficile*-assoziierte Diarrhoe maßgeblich erhöht (Bauer et al. 2011; Howell et al. 2010; Rupnik et al. 2009; Chalmers et al. 2016). Die Gaben von Clindamycin, Cephalosporinen und Fluorchinolonen haben dabei das größte Risikopotential (Aronsson et al. 1985; Gerding 2004; Rupnik et al. 2009).

Eine Kolonisierung des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakts) mit *C. difficile* muss nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung führen. 0 – 17,5 % der gesunden Bevölkerung sind mit toxischen wie atoxigenen *C. difficile*-Stämmen besiedelt (Ozaki et al. 2004; Kato et al. 2001; Galdys et al. 2014). Insbesondere tragen bis zu 70 % aller Säuglinge und Kleinkinder den Keim in ihrer Darmflora (Tamma und Sandora 2012; Larson et al. 1982; Lessa et al. 2012). Das normale Mikrobiom verhindert eine Ausbreitung von *C. difficile* und die Toxinexpression im Gastrointestinaltrakt (Britton und Young 2014). Antibiotikagaben beeinflussen jedoch das komplexe Gefüge der Darmflora und führen so unter anderem zu einer verminderten Biodiversität (Buffie et al. 2015). Diese Nebenwirkung der antimikrobiellen Behandlung führt schlussendlich zu einer erhöhten Empfänglichkeit für pathogene Erreger und prädisponiert in den meisten Fällen für die Entstehung einer CDI (Rupnik et al. 2009).

1.3 Epidemiologie

1.3.1 Inzidenz und Mortalität von *Clostridium difficile*-Infektionen

C. difficile hat sich als sogenannter „Krankenhauskeim“ in den letzten Jahrzehnten immer häufiger etabliert (Rupnik et al. 2009; Lessa et al. 2015; DePestel und Aronoff 2013). Auch bei Patientenkollektiven, die früher selten betroffen waren, werden CDIs vermehrt verzeichnet. So gibt es Hinweise darauf, dass ambulant erworbene CDIs bei jungen und ansonsten gesunden Menschen zunehmen (Kuntz et al. 2011; Gupta und Khanna 2014; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2005).

Die Inzidenz von CDIs liegt bei ca. 20 – 50 (ambulant erworbene CDIs) bis 90 (nosokomiale CDIs) Erkrankten pro Jahr bezogen auf eine Population von 100.000 (Gupta und Khanna 2014; Lessa et al. 2015; Lessa et al. 2012).

Innerhalb der Krankenhäuser und Pflegeheime kommt *C. difficile* als nosokomiales Erreger eine besondere Bedeutung zu. Durch die Umweltresistenz der Sporen ist die Eindämmung der Verbreitung schwierig. So steigen die Raten der *C. difficile*-positiv getesteten Patienten auf Krankenhausstationen bis zu 35 % an, wohingegen es bei Aufnahme lediglich 3 bis 7 % sind (Schneider et al. 2007).

Bei ca. 15 % der CDIs kommt es zu schweren, potentiell lebensbedrohlichen Verläufen durch das sogenannte toxische Megakolon, Ileus und Darmperforation. Oft bleibt in diesen Fällen nur als Therapieoption die Kolektomie (Abou Chakra et al. 2014).

Die hohe Mortalität, die je nach Studie unterschiedlich ermittelt wurde, hängt maßgeblich von dem spezifischen Patientenkollektiv ab. In einem systematischen Vergleich der Literatur beschrieben Abou Chakra *et al.* (2014) eine mediane Mortalitätsrate von 19 %. Lessa *et al.* (2015) ermittelten hingegen in einer groß angelegten amerikanischen Studie, dass in den ersten 30 Tagen 9,3 % der Patienten mit nosokomialen CDIs verstarben.

Darüber hinaus wird eine Zunahme der Sterblichkeit bei CDIs beobachtet (Redelings et al. 2007; Epidemiologisches Bulletin 2014).

1.3.2 **Relapses, Reinfektionen und gemischte Infektionen**

In ca. 15 – 30 % der Fälle folgt auf eine CDI eine weitere Episode (Barbut et al. 2000; Lessa et al. 2015; Abou Chakra et al. 2014). Dabei kann es sich ursächlich entweder um eine Infektion mit dem gleichen Stamm, einen sogenannten *relapse*, oder mit einem neuen Stamm, eine Reinfektion, handeln. Weiterhin kann es zu der gleichzeitigen Infektion bzw. Besiedlung mit mehreren *C. difficile*-Stämmen kommen (Eyre et al. 2012; Eyre et al. 2013a; Behroozian et al. 2013).

Relapses und Reinfektionen stellen eine besondere Herausforderung an die Therapie. Die andauernde Antibiotikagabe und die Überbesiedlung des GI-Trakts mit *C. difficile* beeinflussen das Mikrobiom des Erkrankten maßgeblich und führen nicht selten zu einer Art Teufelskreis aus Infektion, Antibiotikagabe, symptomfreiem Intervall und Rezidiv.

Auch eine PPI-Gabe kann über die Schwächung der Magensäurebarriere zu einer frühen Germination der Sporen im oberen GI-Trakt führen und somit ein weiterer Risikofaktor für rezidivierende CDIs sein (Linsky et al. 2010).

1.3.3 Die Ribotypisierung von *Clostridium difficile*-Isolaten

Um *C. difficile*-Isolate zu klassifizieren, wird in erster Linie die PCR-Ribotypisierung verwendet. Insgesamt ist die Verteilung der Ribotypen weltweit und auch innerhalb Deutschlands sehr variabel. So sind in Deutschland zurzeit die Ribotypen 001, 027 und 014 vorherrschend (Epidemiologisches Bulletin 2013). In Europa hingegen sind es die Ribotypen 014, 020, 001 und 078 (Bauer et al. 2011).

1.3.4 Der hypervirulente Stamm Ribotyp 027

Das Verfahren der Ribotypisierung ist seit der Ausbreitung des hypervirulenten Ribotyps 027 von besonderer diagnostischer Relevanz. Dieser Ribotyp wurde 2005 erstmalig beschrieben und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (McDonald et al. 2005; Inns et al. 2013). Erklärungen für diese Beobachtungen sind beispielsweise das Vorhandensein des binären Toxins CDT, eine erhöhte Sporulationsrate und eine vermehrte Toxinproduktion (McDonald et al. 2005; Warny et al. 2005; Åkerlund et al. 2008). In Deutschland kam es erstmalig 2007 zum bestätigten Auftreten des hypervirulenten Ribotyps 027 in Niedersachsen (Weil et al. 2007). Seit diesem Zeitpunkt hat sich dieser Ribotyp in ganz Deutschland verbreitet (von Müller et al. 2015; Arvand et al. 2014; Zaiß et al. 2010).

Neben dem Ribotyp 027 ist der weit verbreitete Ribotyp 078 ebenfalls ein als hypervirulent beschriebener Stamm (Goorhuis et al. 2008b; Bauer et al. 2011; Reil et al. 2011; Zaiß et al. 2010).

1.4 Pathogenese von *Clostridium difficile*-Infektionen

C. difficile-Stämme können in unterschiedlicher Kombination über die Toxine A (TcdA), B (TcdB) und das sogenannte binäre Toxin (CDT) verfügen. Auch atoxigene Stämme existieren, diese führen jedoch nach heutigem Wissensstand nicht zu Erkrankungen. Die angesprochene Variabilität der Toxinzusammensetzung wird durch die hohe Anzahl der bekannten Toxintypen deutlich. So sind zurzeit 34 verschiedene Varianten in *C. difficile*-Stämmen bekannt (Rupnik und Janezic 2016).

Bei TcdA und TcdB handelt es sich um Glycosyltransferasen, welche Glukose von UDP-Glukose an GTPasen wie Rho und Rac übertragen. Dadurch werden diese Enzyme inhibiert, was zu einer Zerstörung des Zytoskeletts und zu einer Hemmung der Zellteilung mit nachfolgendem Zelltod führt (Carroll und Bartlett 2011). Die Gene für TcdA, TcdB, und ihre

positiven (TcdR), wie negativen (TcdC) Regulatoren, sowie das für den Transport der Toxine notwendige Holin (TcdE), befinden sich gemeinsam auf dem sogenannten Pathogenitätslocus, dem PaLoc (Voth und Ballard 2005). Das binäre Toxin (CDT) ist nicht Teil dieses PaLocs, sondern verfügt über einen eigenen Locus (*cdt*) und ist an anderer Stelle auf dem Chromosom lokalisiert. CDT wird durch die Gene *ctaA* und *ctaB* kodiert, deren Produkte zusammen das binäre Toxin bilden (Perelle et al. 1997; Gerding et al. 2014). Dieses Toxin besteht unter anderem aus einer ADP-Ribosylase, welche ebenfalls das Zytoskelett destruiert und einen Flüssigkeitsverlust erzeugt (Carroll und Bartlett 2011; Gerding et al. 2014). Dies führt zu einer Abrundung der betroffenen Zelle. Weiterhin scheint CDT die Adhärenz von *C. difficile* zu verstärken (Schwan et al. 2009).

1.4.1 Die Spore: eine umweltresistente Überdauerungsform als Überlebensstrategie

Über die Fähigkeit zur Bildung resistenter Überdauerungsstadien in Form von Sporen verfügen wenige Bakteriengattungen, beispielsweise die der Clostridien und Bacillen. Diese können Endosporen mit einem maximal reduzierten Stoffwechsel und einer dicken, Stressreize überdauernden Sporenhülle bilden. Es sind komplexe Signalkaskaden, welche zu einer Sporenbildung führen. Dabei konnte ein Protein namens Spo0A als ein Masterregulator identifiziert werden (de Hoon et al. 2010; Paredes et al. 2005).

Die Faktoren, welche die Signalkaskaden der Sporulation induzieren, sind bis heute nicht endgültig identifiziert worden. Gleichwohl sind Stressfaktoren (wie Energiestoffdeprivation) mit großer Wahrscheinlichkeit maßgebliche Auslöser der Sporenbildung (Paredes-Sabja et al. 2014; Higgins und Dworkin 2012).

Am Beginn der Sporulation kommt es zu einer asymmetrischen Zellteilung und zur Ausbildung einer Vorspore. Erst nachdem der vollständige mehrschichtige Sporenmantel gebildet wurde, lysiert die Mutterzelle und gibt so die fertige Spore frei (Pereira et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2014).

1.4.2 Der Weg der Sporen

C. difficile Sporen sind in unserer Umwelt ubiquitär verbreitet und besiedeln den Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier über die fäkal-orale Route. Ihre Widerstandsfähigkeit ermöglicht es der Spore, die Magensäurebarriere und andere Stressoren, z.B. eine Sauerstoffexposition, zu überwinden. Erreicht sie den Dünndarm, kommt es zur Auskeimung (Koenigsknecht et al. 2015). Die Germination wird hierbei durch verschiedene Substanzen aus-

gelöst. In erster Linie sind dies die primären Gallensäuren (Howerton et al. 2011). Im Dickdarm wiederum exprimiert das Bakterium seine Zytotoxine und sporuliert anschließend erneut. Auch wenn nach Aufnahme der Sporen innerhalb von weniger als zwei Tagen im gesamten GI-Trakt von Magen bis Enddarm Sporen und vegetative Bakterien nachweisbar sind, scheint die CDI nur im Dickdarm zu histopathologischen Veränderungen zu führen (Koenigsknecht et al. 2015). Die Gründe dafür sind nicht bekannt.

1.5 Motilität von *Clostridium difficile*-Stämmen

Viele *C. difficile*-Stämme sind motil; eine Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von Flagellen. Die genetische Information für die Flagellen liegt auf drei Regulons, also Gruppen von unabhängigen Genen. Namentlich sind dies F1, F2 und F3. Die Expression dieser Gene ist zeitlich und hierarchisch organisiert. Ein Masterregulator konnte jedoch bis jetzt nicht identifiziert werden (Stevenson et al. 2015).

Der Beginn der Flagellenbildung soll durch die Gene der F3-Region reguliert sein. Unter anderem ist eines dieser Gene *sigD* (auch als *fliA* bezeichnet), bei dem es sich vermutlich um einen Regulator der späten Flagellengene handelt (Meouche et al. 2013).

1.6 Zellteilung und Zelltrennung bei *Clostridium difficile*

Zellteilung (Division) und Zelltrennung (Separation) sind zwei zeitlich voneinander abzugrenzende Prozesse im Lebenszyklus von Bakterien. Eine Zellteilung definiert sich zuerst durch die Bildung einer Separationsmembran. Ab diesem Zeitpunkt handelt es sich um zwei Bakterien mit einem voneinander unabhängigen Stoffwechsel. Diese Membran kann vollständig ausgebildet sein, ohne dass sich die beiden Zellen voneinander trennen. Folglich können Bakterien lange Ketten bilden, wenn die Zellseparation gestört ist. Dies ist zum Beispiel bei *B. subtilis* der Fall (Chai et al. 2010). Für klinische *C. difficile*-Isolate wurde ein solches Verhalten bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht beschrieben.

Die Mechanismen der Zellteilung und Zelltrennung bei *C. difficile* sind nur in Ansätzen verstanden. Drei Proteine, Mld A, B und C, scheinen maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt zu sein. So zeigen *mldA*- und *mldB*-Mutanten einen kettenbildenden Phänotyp (Ransom et al. 2014).

1.7 Diagnostik

Für die Untersuchung von Stuhlproben auf *C. difficile* stehen in erster Linie Enzymimmunoassays (EIAs), aber auch PCR- und zellkulturbasierte Methoden zur Verfügung. Die für die CDI-Diagnostik verwendeten kommerziellen EIAs können die konstitutiv exprimierte Glutamatdehydrogenase der Bakterien sowie die Toxine A und B detektieren. Seit dem Jahr 2018 ist zudem ein EIA für das binäre Toxin erhältlich (McGovern et al. 2018). Da die EIAs für die Glutamatdehydrogenase sehr sensitiv, aber wenig spezifisch und die EIAs für die Toxine spezifisch, aber weniger sensitiv sind, wird meist ein Zwei-Stufen-Verfahren durchgeführt. Zunächst wird also der sensitive Antigentest verwendet, daraufhin folgt der spezifische Toxintest (Cohen et al. 2010; Carroll und Bartlett 2011). Auch PCR-basierte Verfahren werden, trotz der damit verbundenen hohen Kosten, immer häufiger in der diagnostischen Routine genutzt, da sie hoch sensitiv und spezifisch das Vorhandensein von *tcdA*, *tcdB* und *cdt* detektieren können (Tenover et al. 2011).

Eine kulturelle Anzucht der Bakterien ist aufwendig und wird daher nur selten zur allgemeinen Diagnostik verwendet. Die Anzucht erfolgt auf selektiven Medien (namentlich beispielsweise CCFA-Agarplatten, CLO-Agarplatten (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)), oder chromID[®] *C. difficile*-Platten (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) bei anaerober Bebrütung über mehrere Tage (George et al. 1979; Boseiwaqa et al. 2013). Häufig wachsen auf diesen Nährböden jedoch auch andere Organismen. *C. difficile* ist unter diesen oft nur für das geübte Auge auszumachen und imponiert hier phänotypisch variabel gräulich, weißlich, wolkig, rau oder glatt-schleimig. Eine exakte Identifikation des Bakteriums kann außerdem durch die Anwendung der MALDI-TOF MS-Methode ausgehend von der Kultur erfolgen (van Veen et al. 2010; Veloo et al. 2011).

1.8 Therapie

Eine symptomfreie Besiedlung mit *C. difficile* bedarf keiner Therapie. Treten Symptome auf, sollte, wenn irgend vertretbar, das zuvor eingenommene Antibiotikum abgesetzt werden (Ofosu 2016). Bei leichten Durchfällen genügt meist diese Maßnahme. Falls jedoch klinische Symptome bestehen und wegen der Schwere der Symptomatik therapiert werden muss, kommt in erster Linie eine Antibiotikagabe in Frage. Neben der Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution wird bei anhaltenden Beschwerden sowie bei Rezidiven zunächst das Nitroimidazolantibiotikum Metronidazol verabreicht. Bei Therapieversagen steht als Reserveantibiotikum Vancomycin zur Verfügung (Kern 2010). Dabei werden nur dann ausreichende

Wirkspiegel erreicht, wenn entgegen der gängigen intravenösen Verabreichungsweise das Antibiotikum oral eingenommen wird (Lübbert et al. 2014).

Eine weitere Therapieoption stellt das seit Anfang dieses Jahrzehnts auf dem Markt verfügbare Fidaxomicin dar. Neueste Studien gehen dabei von einer entsprechenden Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der Rezidivraten im Vergleich zu Vancomycin aus (Eyre et al. 2014; Zhanel et al. 2015; Crook et al. 2012). Zurzeit wird das Medikament nicht zuletzt wegen seiner hohen Kosten nur in Ausnahmefällen verabreicht.

Ein weiterer Ansatz der *C. difficile*-Therapie ergibt sich aus der Kolonisationsresistenz, also der Schutzfunktion der natürlichen Darmflora. So werden im Rahmen von Studien zur Behandlung von Patienten mit therapieresistenten CDIs sogenannte Stuhltransplantationen durchgeführt. Bisherige Daten deuten auf eine hohe Wirksamkeit hin (Rossen et al. 2015).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Von einem Patienten, der wegen schwerer rezidivierender CDIs behandelt wurde, konnten im Laufe der Erkrankungen dreizehn klinische *C. difficile*-Stämme isoliert werden. Trotz eskalierter antibiotischer Therapie konnte bis zum Tod des Patienten (aufgrund einer anderen schweren Grunderkrankung) keine stabile Remission erreicht werden. Dieser Verlauf der Krankengeschichte verdeutlicht ein maßgebliches Problem von CDIs – die Neigung zu Rezidiven. Hierfür sind bis heute die auslösenden Pathomechanismen nicht geklärt.

Eine derartig große Anzahl an klinischen Isolaten von ein und derselben Person ist selten zu gewinnen. Sie definiert den Grundstein für diese Arbeit, deren Ziel in einer vergleichenden geno- und phänotypischen Analyse konsekutiver klinischer *C. difficile*-Isolate besteht. Unter Einbeziehung von Risikofaktoren und umgebenden Parametern soll diese Arbeit zum Verständnis von *C. difficile*-Rezidiven - mit besonderem Augenmerk auf der Stammdiversität - beitragen, um zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise bessere Therapiekonzepte im Rahmen von CDIs zu entwickeln.

2 Material und Methoden

Verwendete Materialien, z. B. Laborgeräte (**Tabelle 1**), Verbrauchsmaterialien (**Tabelle 2**), molekularbiologische Reagenzien (**Tabelle 3**), kommerziell erhältliche molekularbiologische Kits (**Tabelle 4**), Enzyme und Enzympuffer (**Tabelle 5**) sowie Chemikalien (**Tabelle 6**) und Oligonukleotide (**Tabelle 7**), verwendete Bakterienstämme (**Tabelle 8**) sowie Pufferlösungen und Nährmedien (**Tabelle 9**) sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

<i>Laborgerät</i>	<i>Hersteller</i>
Anaerobentöpfe	Merck, Darmstadt
Anaerobes Zelt: Anaerobic Chamber, Type A Vinyl	Coy Laboratory Products, Grass Lake, Michigan, USA
CCD-Kamerasystem: <i>luminescent image analyzer</i> LAS 4000	GE Healthcare, Solingen
Elektrophoreseapparatur: Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiovert 200 M	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen
Hybridisierungs-ofen: Biometra OV 5	Biometra, Göttingen
Mikrobiologischer Inkubator: Heraeus [™] B 13	Fisher Scientific, Schwerte
Photometer: Ultraspec 1000	GE Healthcare Europe, Freiburg; ehemals Amersham Pharmacia Biotech
SDS-PAGE-Gussform: Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell Casting Module	Bio-Rad Laboratories, München
Spektrophotometer: NanoDrop 2000C	Fisher Scientific, Schwerte
Thermocycler: Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Transilluminator: Biometra BioDoc II	Biometra, Göttingen
Universalschüttler: SM-30 Control	Edmund Bühler, Hechingen
Universalzentrifuge: Heraeus [™] multifuge [™] 3	Fisher Scientific, Schwerte
Vortexmischer: Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Ulm
Zelldisruptor: FastPrep [®] FP120	MP Biomedicals Germany, Eschwege
Zentrifuge 1: Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 2: Hermle Z233 MK-2	HERMLE Labortechnik, Wehingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien		
Verbrauchsmaterial	Hersteller	Referenz
Chromogene Platten: chromID® <i>C. difficile</i>	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	43871
CLO (<i>Clostridium difficile</i> Agar)-Platten	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	43431
COS (Columbia agar + 5 % Schafsblut)-Platten	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	43041
Glaskügelchen 0,1 mm	BioSpec Products, Bartlesville, USA	11079101
Impfeschlingen	Sarstedt, Nümbrecht	861562050
MHF-Platten	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	43901
MHK-Teststreifen: Erythromycin	Liofilmchen, Roseto degli Abruzzi, Italien	920511
MHK-Teststreifen: Metronidazol	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	412403
MHK-Teststreifen: Moxifloxacin	Liofilmchen, Roseto degli Abruzzi, Italien	920901
MHK-Teststreifen: Vancomycin	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	525558
Microbanks™: Bakterien-Stammhaltungssystem	Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, Vereinigtes Königreich	PL.170
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml & 2 ml)	Eppendorf, Hamburg	0030120086/ 0030120094
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl & 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.1181/ 70.760.002/ 70.1130
Schraubröhrchen (50 ml & 15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	62.554.001/ 62.547.254
Sterile Filter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht	83.1826
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen	657165

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 3: Molekularbiologische Reagenzien

<i>Molekularbiologische Reagenzien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Referenz</i>
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics Deutschland, früher Boehringer Mannheim, Mannheim	1096176
Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragmente	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	11093274910
CDP-Star	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	11685627001
DIG RNA Labeling Mix 10X	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	11277073910
DNA-Komigrationsstandard: GeneRuler 1 kb	Fisher Scientific, Schwerte	SM0311
dNTP Mix	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	13929323
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Dueren	Ba20140617
Molecular weight marker III, DIG-labeled	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	11218603910
Protector RNase Inhibitor	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	03335399001
Protein Marker IV	VWR International, Erlangen	272110

2.1.4 Molekularbiologische tool kits

Tabelle 4: Molekularbiologische tool kits

<i>Tool Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Referenz</i>
Enzymimmunoassay <i>C. difficile</i> Toxine und Glutamatdehydrogenase: C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®	Alere, Köln	T30550C
PCR-Produkt Purifikations Kit: Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	28106
RNA Purifikations Kit: RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden	74104
Zellysepuffer: Puffer RLT	Qiagen, Hilden	79216

2.1.5 Enzyme und zugehörige Reaktionspuffer

Tabelle 5: Enzyme und zugehörige Pufferlösungen

<i>Enzyme und Puffer</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Referenz</i>
10 X PCR Reaktionspuffer	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	14880900
5 X Phusion HF Reaktionspuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main	B0518
Phusion DNA-Polymerase	Fisher Scientific, Schwerte	F530
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete, Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	04693159001
T4 DNA-Ligase	Fisher Scientific, Schwerte	EL0011
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	10881767001
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim	11146173001

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien		
<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Referenz</i>
2-Propanol	Roth, Karlsruhe	6752.4
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe	69772
Acrylamid: Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe	3029.1
Agarose „NEEO Ultra Qualität“	Roth, Karlsruhe	2327318
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt	1.01201
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg	214010
Bacto™ brain heart infusion	BD, Heidelberg	237500
Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg	212750
Bacto™ Pepton	BD, Heidelberg	211677
Bacto™ Proteose Pepton	BD, Heidelberg	211684
Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg	211705
Beta-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt	15-433
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	1.11746
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe	A.119.1
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C0378
Coomassie Brilliant Blue-G250 „Roti® Quant 5 X“	Roth, Karlsruhe	K015.3
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe	K028.2
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	43817
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	67685
Erythromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	E6376
Essigsäure	Roth, Karlsruhe	3738.2
Ethanol	Roth, Karlsruhe	9065.4
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe	8040.3
FM 4-64	AAT Bioquest, Sunnyvale, USA	21487
Formaldehyd (Formalin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	F8775
Formamide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	F9037
Glycerin	Roth, Karlsruhe	3783.1
Glycin	Roth, Karlsruhe	3790.2
HCl 37 %	Merck, Darmstadt	1.00317
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt	1.04936
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt	105033
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	STBD4332V
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe	K304.2

Nährbouillon für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe	X929.1
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt	1.06404
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt	106498
Natriumlaurylsulfat (SDS) „ultra pur“	Roth, Karlsruhe	2326.2
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt	1.04005
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe	2367.1
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt	1.08382

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 7: Oligonukleotide

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Herkunft</i>
FS1	5' AAACCATGGCG GGG GGATTTT TAGTG- GAAAAATC AAAATAG	fwd. <i>spo0A</i> in pET 26b NcoI	F. Sachsenheimer
FS2	5'TTTCTCGAGTTTAAAC- CATACTATGTT- CTAGTCTTAATTTATCAG	rev. <i>spo0A</i> in pET 26b XhoI	F. Sachsenheimer
FS19	5'TTT- TAAAGCAACACAAC- CTGCC	<i>spo0A</i> flanking fwd.	F. Sachsenheimer
FS20	5'CAAACCTCCTTTT- CTCTTTGCAG	<i>spo0A</i> flanking rev.	F. Sachsenheimer
T7promoter	5'TAATACGACTCA- CTATAGGG	pET 26b(+)	Dr. K. Gunka
T7terminator	5'GCTAGTTATTGCTCA- GCGG	pET 26b(+)	Dr. K. Gunka
Spo0A for.	5'GCTAAGGATGGAATT- GAAGCATTAG	fwd. Sonde für Northern Blot <i>spo0A</i>	F. Sachsenheimer
Spo0A rev.	5'TAAATATCCTTTTATA- TGAGCTGGTACTC	rev. Sonde für Northern Blot <i>spo0A</i>	F. Sachsenheimer
Spo0A rev. T-7	5'CTAATACGACTCA- CTATAGGGAGATAAATA- TCCTTTTATAT- GAGCTGGTACTC	rev. Sonde für Northern Blot <i>spo0A</i> + T7 Promotor	F. Sachsenheimer

2.1.8 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 8: verwendete Bakterienstämme		
<i>C. difficile</i>-Stamm	Ribotyp	Referenz oder Herkunft
klinisches Isolat 1	126	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 2	126	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 3	015	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 4	014	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 5	014	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 6	014	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 7	024	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 8	024	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 9	056	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 10	neuer RT ¹	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 11	neuer RT ¹	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 12	neuer RT ¹	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
klinisches Isolat 13	neuer RT ¹	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen
<i>spo0A</i> -Mutante	027	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen (Sachsenheimer et al. 2018)
Parentales Isolat der <i>spo0A</i> -Mutante	027	DSM27638, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
Referenzribotyp 126	126	Prof. M. Rupnik, Institut für mikrobiologische Forschung, Maribor, Slowenien
Referenzribotyp 078	078	Prof. M. Rupnik, Institut für mikrobiologische Forschung, Maribor, Slowenien
630	012	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DSMZ-Nr.: 27543
R20291	27	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DSMZ-Nr.: 27147
Referenzribotyp 014	014	Prof. L. von Müller, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar
Referenzribotyp 015	015	Prof. L. von Müller, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar

(1) neuer zurzeit nicht epidemischer Stamm.

2.1.9 Pufferlösungen und Nährmedien

Puffer und Medien wurden stets bei 121 °C und 2,1 bar autoklaviert. Lediglich thermolabile Substanzen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Filter).

Tabelle 9: Pufferlösungen und Nährmedien

<i>Name</i>	<i>Menge</i>	<i>Bestandteile</i>
<i>BHIS-Medium</i>	37 g	BHI
	5 g	Hefeextrakt
		mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
		für Platten 15 g Agar hinzufügen, danach autoklavieren
		daraufhin Zugabe von 3 ml Cystein (10 %)
<i>DNA-Ladepuffer 5 X</i>	5 ml	Glycerol (100%)
	4,5 ml	ddH ₂ O
	0,2 ml	50 X TAE
	0,01 g	Bromphenolblau
	0,01 g	Xylencyanol
<i>Enzymatischer Lysepuffer</i>	50 mg	Lysozym
	50 µl	TRIS (1 M, pH 8,0)
	10 µl	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
	2,5 ml	ddH ₂ O
<i>HEPES-Puffer</i>	700 ml	ddH ₂ O
	238.3 g	HEPES
		mit NaOH-Plätzchen auf einen pH von 7,35 titrieren und mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen, danach autoklavieren
<i>Isotonische Kochsalzlösung</i>	9 g	NaCl

<i>LB-Medium</i>	10 g	Trypton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
		mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
		für Platten 18 g Agar hinzufügen, danach autoklavieren

<i>PBS</i>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,42 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
	0,27 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
		mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen, danach autoklavieren

<i>Puffer W</i>	100 mM	TRIS-HCl pH 8
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

<i>Puffer ZAP</i>	6,057 g	TRIS-HCl
	11,68 g	NaCl
		mit HCl auf einen von pH 7,5 titrieren, mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen, danach autoklavieren

<i>TAE-Puffer</i>	242 g	TRIS
	57,1 ml	Essigsäure (100 %)
	100 ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
		mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen

<i>TE-Puffer</i>	500 ml	10 mM TRIS-HCl (pH 8)
	500 ml	1 mM EDTA

2.2 Klinische Datenerhebung

Nach Erteilung des Ethikvotums der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen (Antragsnummer: 11/4/15) wurden Daten zum Krankheitsverlauf des Patienten im Rahmen einer persönlichen Befragung des Betroffenen erhoben.

2.3 Allgemeine Methoden

Die allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der **Tabelle 10** zusammengefasst.

Tabelle 10: Allgemeine Methoden	
 Methode 	 Referenz
Absorptionsmessung	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
Gelelektrophorese von DNA	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	Sanger <i>et al.</i> (1977)

2.4 Anzuchtbedingungen von Bakterienkulturen

2.4.1 Anaerobe Anzucht von *Clostridium difficile*

C. difficile-Stämme wurden bei 37 °C im anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake, Michigan, USA) mit einer Atmosphäre von 5 % CO₂, 5 % H₂ und 90 % N₂ kultiviert und nur für Probenentnahmen aus den anaeroben Bedingungen entfernt. Für die Anzucht im flüssigen Medium wurde einheitlich BHIS (*brain heart infusion supplemented*)-Medium verwendet. Für die Bakterienanzucht auf Platten diente entweder kommerzielles CLO-, COS- oder chromogenes (chromID[®] *C. difficile*) Medium (bioMérieux, Nürtingen). Um passagebedingte Mutationen zu vermeiden, wurden wöchentlich alle *C. difficile*-Stämme aus Microbanks[™] (Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, Vereinigtes Königreich) (siehe **Kapitel 2.7.2**) neu angezogen.

2.4.2 Anzuchtbedingungen einer *Clostridium difficile*-Starterkultur

Um eine unterschiedliche Sporenmenge des Inokulums bei bestimmten phänotypischen Untersuchungen von *C. difficile*-Stämmen zu vermeiden, wurden sogenannte Starterkulturen verwendet. Dafür wurde eine Übernachtskultur in BHIS-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,4 inkubiert. Diese Kultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur in einer 1:100-Verdünnung verwendet. Dieses Verfahren ermöglichte es, die Sporenmenge zu

Beginn der Kultivierung extrem gering zu halten und damit gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

2.4.3 Anzucht von *Clostridium difficile*-Kulturen zur RNA-Isolation

Um ausreichende Mengen von RNA isolieren zu können, wurden mindestens 25 ml von *C. difficile*-Flüssigkulturen geerntet. Zur Inokulation der Hauptkultur wurden dabei stets Starterkulturen verwendet. Die Ernte erfolgte nach 8 h oder 24 h. Um den Stoffwechsel der Zellen in einem möglichst kurzen Zeitraum zu reduzieren, wurden die Kulturen im anaeroben Zelt in konische Zentrifugenröhrchen („Falcon-Röhrchen“), welche gefrorenen Puffer W enthielten (15 ml), transferiert und die Suspension bis zum Auftauen invertiert. Danach folgte die Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4.700 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in Stickstoff schockgefroren und für maximal vier Wochen bei -80 °C gelagert.

2.4.4 Anzuchtbedingungen für rasterelektronenmikroskopische Analysen

Um Aufnahmen der Ultrastruktur von Bakterienkolonien mittels Rasterelektronenmikroskopie anzufertigen, wurde BHIS-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bebrütet.

Nun wurden 5 µl dieser Kultur auf BHIS-Agar (1,5 %) getropft. Die Agarplatte wurde für 48 h anaerob kultiviert und konnte zur weiteren Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie verwendet werden (siehe **Kapitel 2.6.7**).

2.5 Genotypische Untersuchungen und klassifizierende Verfahren

2.5.1 Toxinotypisierung

Eine differenzierte Toxinotypisierung von TcdA, TcdB und CDT wurde freundlicherweise seitens Prof. L. von Müller, Direktor des Konsiliarlaboratorium für *Clostridium difficile* am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg), mithilfe eines Multiplex-PCR-basierten Verfahrens nach den Angaben der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionserkrankungen (ECDIS; <http://www.ecdisnet.eu>) durchgeführt.

2.5.2 Ribotypisierung

Die Ribotypisierung von *C. difficile*-Isolaten wurden unter Leitung von Prof. L. von Müller, nach den Angaben der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionserkrankungen (ECDIS; <http://www.ecdisnet.eu>) und wie zuvor von Indra *et al.* 2008 und von Müller *et al.* 2015 beschrieben, durchgeführt. Die Zuordnung der Stämme erfolgte hierbei durch einen automatisierten Abgleich (BioNumerics version 7.1, Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgien) mit Referenzstämmen der Institutsdatenbank.

2.6 Phänotypische Untersuchungen von *Clostridium difficile*-Stämmen

2.6.1 Adhärenzassay

Um die Stärke der Adhärenz von unterschiedlichen *C. difficile*-Stämmen zu untersuchen, wurden diese in 12-Napf-Zellkulturplatten kultiviert. Hierfür wurden Vorkulturen über Nacht angezüchtet und am nächsten Tag ihre optische Dichte ermittelt. Darauffolgend wurden die Näpfe im anaeroben Zelt auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Das zugefügte Volumen an BHIS wurde dabei vorher entnommen. Zur Reduktion des Mediums wurden die Näpfe bereits am Vortag mit je 4 ml BHIS befüllt und über Nacht im Zelt gelagert. Nun wurden die Kulturen für 24 h im Zelt belassen. Die Platten wurden entnommen und die Bakterienkultur vorsichtig abpipettiert. Am Boden der Näpfe hafteten die adhärennten Zellen. Diese wurden mit 500 µl isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl w/v) gewaschen und mit 0,1 % Kristallviolett versehen. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur ohne Bewegung wurde zweifach mit 1 ml Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend konnte die Platte fotografiert werden.

2.6.2 Motilitäts- und Swimmingassays

Das Motilitäts- und Schwimmverhalten von *C. difficile*-Isolaten wurde mithilfe von Stichagar-Assays ermittelt. Dafür wurden für Motilitätsassays 4 ml BHIS-Agar (0,25 % Agar w/v) in Reaktionsgefäßen und für Swimmingassays BHIS-Agar (0,3 % Agar w/v) in großen Petrischalen verwendet. Eine Einzelkolonie wurde von der Agarplatte vorsichtig mit einer sterilen Impfnadel aufgenommen und senkrecht in den Agar des Reaktionsgefäßes oder der Petrischale bis zum unteren Ende eingeführt. Die Ergebnisse konnten nach zwei Tagen anaerober Bebrütung bestimmt und fotografiert werden.

2.6.3 Antibiogramm

Zunächst wurden je 4 ml BHIS mit den zu untersuchenden *C. difficile*-Stämmen beimpft und über Nacht anaerob bebrütet. Dabei wurde stets auch ein Kontrollstamm angezogen, dessen Resistenzen bekannt sind. Am darauffolgenden Tag wurde die OD₆₀₀ gemessen. Die Kulturen wurden in 5 ml isotonischer Kochsalzlösung mithilfe des McFarland-Standards nach der Formel $0.1 \times 5 \div OD_{600}$ verdünnt. Zuvor wurde dabei die entsprechende Menge der zuzugebenden Kultur der Kochsalzlösung entnommen und verworfen. Die Kultur wurde mit dem Vortexmischer homogenisiert und mit einem sterilen Wattestäbchen großzügig auf einer MHF-Platte ausgestrichen.

Die Metronidazol, Vancomycin, Moxifloxacin und Erythromycin enthaltenden MHK-Teststreifen wurden anschließend vorsichtig mithilfe einer Pinzette auf die Platte gelegt. Das Antibiogramm wurde am Folgetag und nach den durch die EUCAST („European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“, <http://www.eucast.org/>) definierten Grenzwerten abgelesen. Die Antibiotogramme aller klinischen Isolate wurden freundlicherweise zusätzlich auch im Konsiliarlaboratorium für *Clostridium difficile*, Homburg/Saar, durchgeführt.

2.6.4 Sporulationsassays

Sporulationsassays erfolgten nach den Angaben von Burns und Minton (2011). Um die Effektivität der Sporulation zu testen, wurde hier eine Starterkultur angesetzt und zur Inokulation der Hauptkultur verwendet. Nach 24-stündiger und nach 5-tägiger Inkubation wurden pro Kultur je 200 µl entnommen und in je zwei Reaktionsgefäße überführt. Eines der Reaktionsgefäße wurde erneut bis zum Gebrauch unter anaeroben Bedingungen gelagert, um ein Absterben der Zellen zu vermeiden. Die Verdünnungsreihe dieser Probe zeigte die Menge der Sporen sowie der vegetativen Zellen an. Das andere Reaktionsgefäß wurde zur Abtötung der vegetativen Zellen für 25 min bei 60 °C inkubiert. Die Verdünnungsreihe dieser Probe diente ausschließlich zur Darstellung der keimfähigen Sporen. Von beiden Kulturen wurde eine Verdünnungsreihe bis 10⁶ in 10 µl Tropfen zum Vergleich auf chromogenes Medium (chromID[®], bioMérieux, Nürtingen) getropft. Dabei wurde auf eine möglichst kurzzeitige Sauerstoffexposition und die gute Durchmischung der Verdünnungen geachtet. Die Ergebnisse konnten jeweils am Folgetag ausgewertet werden. Als Negativkontrolle wurde ein durch eine *spoOA*-Mutation der Sporenbildung nicht fähiger *C. difficile*-Stamm stets in die Versuchsreihe aufgenommen.

2.6.5 Wachstumskurven

Um das Wachstum von verschiedenen *C. difficile*-Stämmen zu bestimmen, wurden Übernachtskulturen zum Animpfen der Hauptkulturen (auf eine OD₆₀₀ 0,05) verwendet. Das Wachstum der Stämme wurde dabei stündlich mittels Messung der optischen Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$) beobachtet. Jeweils zwei Hauptkulturen von jedem Stamm wurden bebrütet. Ein Reaktionsgefäß wurde vor jeder Messung mit dem Vortexmischer homogenisiert, das andere ohne Bewegung belassen. Die Probe wurde stets dem oberen Zehntel der Kultur entnommen. Durch dieses Verfahren konnten sowohl das Wachstums- als auch das Absinkverhalten der Stämme bestimmt werden.

2.6.6 Mikroskopie und Färbung von Bakterienmembranen

Um mikroskopische Untersuchungen von *C. difficile* durchzuführen, wurden der Bakterienkultur 200 μl entnommen, diese für 3 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und danach in 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun mit 30 μl PBS resuspendiert. Für die Färbung von Bakterienmembranen wurde das Färbereagens FM 4-64 (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) verwendet. Hier wurde das Pellet mit 20 μl PBS und 10 μl FM 4-64 (10 $\mu\text{g/ml}$) versetzt.

5 μl der Bakteriensuspension wurden schließlich auf einen Objektträger appliziert und mit einem Deckplättchen überdeckt. Mikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einem Axiovert 200 M (Zeiss, Göttingen) Mikroskop. Die Bildbearbeitung und Messung der Zelllängen erfolgte mithilfe des Programms AxioVision (Version 4.7.2) (Zeiss, Göttingen).

2.6.7 Rasterelektronenmikroskopie

Um rasterelektronenmikroskopischen Analysen durchzuführen, wurden *C. difficile*-Kolonien, die zuvor wie in **Kapitel 2.4.4** beschrieben kultiviert wurden, mit einem Skalpell mit samt Agar herausgeschnitten. Eine Fixierung der Kolonien wurde mit 2 ml Glutaraldehyd (1,5 %), Paraformaldehyd (1,5 %) und HEPES-Puffer (pH 7,35) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C.

Die weitere Präparation der Kolonien sowie die rasterelektronische Mikroskopie wurde von Dr. C. Wrede am Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der MHH durchgeführt.

2.6.8 Detektion der Toxinproduktion bei *Clostridium difficile*

Der phänotypische Nachweis der Toxine A und B wurde mithilfe des kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (Alere, Köln) nach Angaben des Herstellers erbracht.

2.7 Konservierende Methoden

2.7.1 Kryokonservierung von *Clostridium difficile*

900 µl einer Übernachtskultur wurde in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 100 µl DMSO, welches als Frostschutzmittel fungierte, versetzt. Die Kryokultur wurde bei -80 °C gelagert und diente zum Animpfen von neuen Übernachtskulturen. Dazu wurden der noch gefrorenen Kultur mit der Pipettenspitze jeweils ca. 20 µl entnommen und in frisches Medium überführt.

2.7.2 Anlegen von Microbanks™ zur Konservierung von *Clostridium difficile*

Der Gebrauch von Microbanks™ (Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, Vereinigtes Königreich) ermöglicht eine einheitliche Rekultivierung des Ursprungsorganismus. Auch dieses Verfahren soll wie die Kryokonservierung passagebedingte Mutationen vermeiden.

Zum Anlegen einer Microbank™ wurde mit einem sterilen Wattestäbchen eine große Menge von Kolonien von einer Agarplatte abgenommen und in die Nährbouillon transferiert. Die Microbank™ wurde daraufhin kurz geschüttelt und die überschüssige Flüssigkeit mit einer Glaspipette abgenommen. Die Kultur wurde anschließend bei -20 °C gelagert.


2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion

Über PCR (Polymerase-Kettenreaktionen) können aus einem Gemisch von DNA (mithilfe sequenzspezifischer Primer) DNA-Abschnitte definierter Größe selektiv vermehrt werden. Diese waren dabei zur Erstellung der Sonden für Northern Blots nötig. Die Vermehrung der DNA-Abschnitte geschieht über thermostabile Polymerasen (i.d.R. Taq- oder Phusion-Polymerase), wobei eine definierte Anzahl von Zyklen der Denaturierung und Amplifikation durchlaufen werden. Sowohl die Annealing- als auch die Denaturierungstemperatur variieren nach GC-Gehalt der DNA. Die Elongationszeit ist zudem abhängig von der Länge zu amplifizierender Sequenz. Bei der Taq-Polymerase kann es zu falsch eingebauten Nukleotiden kommen, während der in der Phusion-Polymerase vorhandene Korrekturlesemechanismus dies verhindert, man also ein Reaktionsprodukt bekommt, welches der zu amplifizierenden Sequenz exakt entspricht. Der Reaktionsansatz bestand aus der zu amplifizierenden DNA (Template), einem der Polymerase entsprechenden Reaktionspuffer, sterilem ddH₂O, *forward*- und *reverse*-Primern (**Tabelle 7**) und dNTPs. Die entsprechenden, in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme sind in **Tabelle 11** verzeichnet.

PCR Phusion-Polymerase	
Bestandteile	Menge
Template	1 µl
Polymerase Phusion	1 µl
dNTP's	2 µl
Primer <i>forward</i>	2 µl
Primer <i>reverse</i>	2 µl
HF-Puffer	10 µl
H ₂ O	32 µl

PCR Programm Phusion	
98 °C	3'
98 °C	30''
52 °C	35''
72 °C	bspw. 1'
72 °C	10'
4 °C	Pause



PCR Taq-Polymerase	
Bestandteile	Menge
Template	1,5 µl
Polymerase Taq	0,5 µl
dNTP's	1 µl
Primer <i>forward</i>	1 µl
Primer <i>reverse</i>	2 µl
Puffer	2,5 µl
H ₂ O	17 µl

PCR Programm Taq	
94 °C	5'
94 °C	45''
48 °C	45''
72 °C	bspw. 1' 30''
72 °C	10'
4 °C	Pause




Tabelle 11 – PCR- Programme. (') Minuten. (') Sekunden.

2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe von Plasmiden und PCR-Produkten wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Dazu wurde eine 1 % Agarose TAE-Pufferlösung angesetzt, aufgeköcht und abgekühlt. Dem noch flüssigen Gel wurde im Verhältnis 1:25.000 das DNA-Färbereagenz Midori-Green hinzugefügt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gestellt. Danach wurden die auf das Gel aufzutragenden Proben (4 µl) mit Ladepuffer (3 µl) vermischt und in die durch den Kamm präformierten Kammern pipettiert. Ein DNA-Komigrationsstandard (4 µl) (Fisher Scientific, Schwerte) diente dabei als Größenreferenz. Für die Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel für 45 min an eine 120 V-Spannung angelegt, wodurch die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel der Kammer entnommen, auf eine Quarzplatte gelegt und von unten mit UV-Licht bestrahlt. Die durch den Farbstoff fluoreszierenden DNA-Banden wurden mit dem Biometra BioDoc II Transilluminator (Biometra, Göttingen) fotografiert und hinsichtlich ihrer Größenverteilung analysiert.

2.8.3 Sequenzierung von DNA

Um die Sequenz klonierter DNA-Abschnitte auf Korrektheit zu überprüfen, wurden je 9 µl DNA und 6 µl Primer vermengt und zur Sequenzierung bei Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen) abgegeben. Die Sequenzergebnisse wurden durch BLAST-Abgleich (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) überprüft.

2.8.4 Isolierung chromosomaler DNA von *Clostridium difficile*

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte mithilfe des „DNeasy Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden). Die chromosomale DNA wurde nachfolgend zur Erstellung einer RNA-Sonde für die Durchführung von Northern Blots verwendet. Zunächst wurden hierfür 4 ml BHIS-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C im anaeroben Zelt inkubiert. 1 - 2 ml der Kultur wurden am Folgetag abzentrifugiert (13.000 rpm, 3 min) und das Pellet in enzymatischen Lysepuffer (180 µl) resuspendiert. Es folgte eine 1- bis 2-stündige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden 25 µl RNase A (20 mg/ml) hinzugefügt und für 20 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von Proteinkinase K (25 µl) und Puffer AL (200 µl), folgte eine Inkubation für 30 min bei 56 °C. Dann wurden 200 µl 4 °C kaltes Ethanol (100 %) hinzugefügt und die Suspension mit dem Vortexmischer homogenisiert.

Die entstandene Suspension wurde auf eine Säule zum Binden der DNA überführt und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 500 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben, die erneut zentrifugiert wurde (8.000 rpm, 1 min). Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 wurde die Säule 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und die DNA in 80 µl Wasser, das bereits auf 70 °C erhitzt wurde, für 5 min bei gleichbleibender Temperatur eluiert und anschließend abzentrifugiert (8.000 rpm, 1 min). Dieser Schritt wurde bei Raumtemperatur einmalig wiederholt. Nun konnte das Reaktionsgefäß für weitere 10 min bei 4 °C zentrifugiert werden. Im Überstand befand sich dabei die DNA, mit der weitergearbeitet wurde. Das Sediment aus Sporen wurde verworfen.

2.8.5 Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Die Reinigung der DNA wurde mithilfe des „PCR Purification Kits“ (Qiagen, Hilden) und nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte jedoch mit 30 µl ddH₂O statt des empfohlenen Elutionspuffers, um Störungen der Ligationsreaktion durch die ungeeignete Ionenzusammensetzung des Elutionspuffers zu vermeiden.

2.8.6 Arbeiten mit RNA

Die verwendeten Puffer und Lösungen, die ausschließlich zur Testung von RNA-Sonden und Durchführung einer RNA-Hybridisierung (Northern Blot) verwendet wurden, sind in **Tabelle 12** aufgeführt.

Tabelle 12: verwendete Puffer & Lösungen für Northern Blots und Sondentests

<i>Name</i>	<i>Menge</i>	<i>Bestandteile</i>
10 X DIG-Puffer		Maleinsäure (1 M) in ddH ₂ O, auf pH 7,5 titrieren und autoklavieren
10 X MOPS		MOPS (200 mM) Natriumacetat (50 mM) EDTA (10 mM) in ddH ₂ O auf pH 7,0 mit NaOH titrieren und 10 min bei 98 °C autoklavieren
20 X SSC		NaCl (3 M) Natriumcitrat (0,3 M) in ddH ₂ O auf pH 7,0 titrieren und autoklavieren
Blockierlösung (10 %)	5 g 50 ml	Blocking-Reagenz 1 X DIG-Puffer 1 autoklavieren
Denaturierungslösung		NaOH (50 mM) NaCl (10 mM) in ddH ₂ O autoklavieren
DEPC-Wasser	1 ml	DEPC mit 1 L ddH ₂ O eine Stunde lang auf dem Magnetrührer vermengen dann zweimal autoklavieren

<i>DIG-Puffer 1</i>	1 X DIG-Puffer
<i>DIG-Puffer 2</i>	1 % Blockierlösung in 1 X DIG-Puffer
<i>Neutralisierungslösung</i>	TRIS (100 mM) in ddH ₂ O auf pH 7,4 titrieren und autoklavieren
<i>N-Laurosylsarcosin 10%</i>	10 % N-Laurosylsarcosin in ddH ₂ O autoklavieren
<i>Prähybridisierungslösung</i>	100 ml Formamid (100 %) 50 ml 20 X SSC 40 ml Blockierlösung (10 %) 2 ml N-Laurosylsarcosin (10 %) 0,4 ml SDS (10 %) bei -20 °C lagern
<i>Puffer III</i>	TRIS (100 mM) NaCl (100 mM) in ddH ₂ O auf pH 9,5 titrieren und autoklavieren
<i>RNA-Probenpuffer</i>	9,5 ml Formamid 450 µl RNase freies Wasser 25 µl SDS (10 %) 25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 2,5 mg Bromphenolblau 2,5 mg Xylencyanol 10 µl EDTA (0,5 M)
<i>Waschlösung I</i>	2 X SSC & 0,1 % SDS
<i>Waschlösung II</i>	0,1 X SSC & 0,1 % SDS

2.8.6.1 RNA-Isolation

Um die rigide Zellwand der Bakterien aufzuschließen, wurde das Zellsediment in 496,5 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) mit 3,5 µl Mercaptoethanol und 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Dieses Gemisch wurde in 2,0 ml Schraubdeckelröhrchen, welche 700 mg (zweifach autoklavierte) Glaskügelchen (0,1 mm) enthielten, überführt. Es folgte der Zellaufschluss im Zeldisruptor (Stufe vier) nach folgendem Schema:

1. 2 Zyklen für 30 s, Kühlung auf Eis
2. 3 Zyklen für 30 s, Kühlung auf Eis
3. 2 Zyklen für 30 s, Kühlung auf Eis
4. 3 Zyklen für 30 s, Kühlung auf Eis

Die Glaskügelchen wurden bei 4 °C für 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand diente zur Aufbereitung der RNA.

2.8.6.2 Reinigung von RNA

Die Reinigung der RNA erfolgte mittels des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) und nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde 1 ml Puffer RLT, der 10 µl Mercaptoethanol und 800 µl abs. Ethanol enthielt, entsprechend der in dieser Arbeit geernteten Zellmenge verwendet. Die Elution erfolgte mit eigens hergestelltem DEPC-Wasser (Ribonuklease-freiem Wasser).

2.8.6.3 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Um eine DIG-markierte Sonde herzustellen, wurde der dazu benötigte Bereich auf der *C. difficile*-DNA mit einer PCR amplifiziert und aufgereinigt. Bei der PCR wurde über den *reverse*-Primer der T7-Promotor an das Produkt angefügt. Anschließend wurden PCR-Produkt (3 µl), der DIG-labeling-Mix (2 µl), Transkriptionspuffer (2 µl), T7-Polymerase (1 µl), RNase-Inhibitor (1 µl) und steriles ddH₂O (12 µl) in einem Reaktionsgefäß gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,8 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 2,5 µl LiCl₂ gestoppt. Danach wurden 70 µl Ethanol (-20 °C) hinzugefügt und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde am Folgetag bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die RNA in 50 µl Ethanol gewaschen und für 5 min abzentrifugiert. Die RNA wurde für 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet, bevor sie in 50 µl H₂O für eine Stunde bei 37 °C gelöst wurde. Anschließend wurde sie bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

2.8.6.4 Testen der DIG-markierten RNA-Sonde

Um die RNA-Sonden zu testen, wurde eine positiv geladene Nylonmembran mit sterilem, deionisiertem Wasser durchfeuchtet und in 20 X SSC-Puffer equilibriert. Die Membran wurde luftgetrocknet und eine Verdünnungsreihe der gewünschten Sonde von unverdünnt bis 10^{-5} in 2 μ l Tropfen aufgetragen. Daraufhin wurde die RNA durch UV-Lichtbestrahlung für 90 s vernetzt. Die Membran wurde danach für 5 min in DIG-Puffer 1 geschwenkt. Es folgte eine Inkubation in DIG-Puffer 2 für 30 min und anschließend für 30 min mit einem anti-DIG-AP-Antikörper (1:7500) in DIG-Puffer 2. Die Membran wurde nun dreimal für 10 min in DIG-Puffer 1 gewaschen und in Puffer III für mindestens 10 min inkubiert. Die Detektion der DIG-RNA erfolgte mit 5 μ l CDP-Substrat in 1 ml Puffer III. Die Stärke der Färbung als Maß der gebundenen RNA-Menge wurde mithilfe eines CCD-Kamerasystems (*luminescent image analyzer* LAS 4000, GE Healthcare, Solingen) erfasst.

2.8.6.5 RNA-Hybridisierung (Northern Blot)

Zunächst wurden zur Auftrennung der RNA die Gelkammer, der Kamm und die Gelelektrophoreseapparatur gründlich mit Wasser und Seife gewaschen, schließlich mit deionisiertem Wasser gespült, luftgetrocknet und mit 70 % Ethanol gereinigt. Zur Herstellung eines denaturierenden Agarosegels (0,6 %) wurden 75 ml H₂O mit 10 ml 10 X MOPS und 4,5 g Agarose aufgekocht und im Wärmeschrank auf 65 °C temperiert gehalten. Es erfolgte eine Zugabe von 8,5 ml Formaldehyd mit weiterer Inkubation für 20 min bei 65 °C. Das Gel wurde gegossen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Danach wurde der Kamm entfernt und ein Vorlauf bei 100 V für 10 min durchgeführt. Hierbei diente 1 X MOPS als Laufpuffer. Zwischenzeitlich wurden die RNA-Proben vorbereitet. Je nach Bedarf wurden zwischen 5 – 10 μ g RNA in Reaktionsgefäße gegeben und je auf 10 μ l mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Vom RNA-Standard, mit dem identisch verfahren wurde, wurden 5 μ l verwendet. Schließlich wurden je 5 μ l RNA-Probenpuffer hinzugefügt. Die Proben wurden nun für 10 min bei 65 °C denaturiert, bis zum Auftragen auf Eis gestellt und zügig in die Taschen des denaturierenden Gels pipettiert. Der Elektrophoreselauf wurde für 2,5 h bei 65 V durchgeführt.

Zum Blotten wurde nun die positiv geladene Nylonmembran passend zugeschnitten und auf eine mit destilliertem Wasser durchfeuchtete poröse Trägermembran platziert. Danach wurde eine Plastikmaske zur Abdichtung über die Membran gelegt und das Gel vorsichtig und ohne Luftblasen auf die Membran geschoben. Mithilfe einer Vakuumpumpe wurde ein Unterdruck von ca. einem Bar erzeugt.

Es folgte eine Überschichtung mit Puffern nach folgendem Schema.

1. 5 min Denaturierungspuffer
2. 5 min Neutralisierungspuffer
3. ca. 3 h Puffer 20 X SSC

Die Puffer wurden vor jedem Wechsel abpipettiert. Zur Vermeidung der Austrocknung des Gels wurde ca. alle 30 min Puffer 20 X SSC nachgegossen. Die Membran wurden zur Fixierung 90 s mit UV-Licht bestrahlt und konnte bis zur weiteren Verwendung trocken und staubgeschützt aufbewahrt werden.

Zur Hybridisierung mit der RNA-Sonde wurde die Membran im Hybridisierungsröhrchen mit 25 ml Prähybridisierungslösung bei 68 °C für eine Stunde im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Das Röhrchen wurde aus dem Ofen entnommen und die Lösung entfernt. Dann folgte die Hybridisierung mit 15 µl Sonde in 15 ml Prähybridisierungslösung über Nacht im Ofen bei 68 °C.

Am Folgetag wurde die Membran zunächst zweimal mit ca. 50 ml Waschlösung 1 für 5 min bei Raumtemperatur, daraufhin dreimal mit Waschlösung 2 für je 30 min im Ofen bei 68 °C gewaschen. Die Membran wurde dem Röhrchen entnommen und bei Raumtemperatur in DIG-Puffer 1 für 5 min, sowie anschließend in DIG-Puffer 2 für 30 min geschwenkt. Danach konnte der anti-DIG-AP-Antikörper an die Sonde gebunden werden. Dazu wurde der Antikörper in einem Verhältnis von 1:10.000 mit DIG-Puffer 2 gemischt, auf die Membran gegeben und für 30 min inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 30 min mit DIG-Puffer 1 gewaschen. Die Detektion der Hybride erfolgte mit dem Substrat CDP-STAR. Dazu wurde 1 ml Puffer III mit 5 – 10 µl CDP-STAR gemischt und auf die Membran gegeben. Die Chemielumineszenz wurde mit einem CCD-Kamerasystem (*luminescent image analyzer* LAS 4000, GE Healthcare, Solingen) detektiert und fotografisch festgehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendatenerhebung im Rahmen einer rezidivierenden *Clostridium difficile*-Erkrankung

Die dreizehn klinischen Isolate stammten von einem 73-jährigen multimorbiden, terminal niereninsuffizienten und somit dialysepflichtigen Patienten, welcher seine erste CDI nosokomial erworben hatte. Anamnestische Daten wurden im Rahmen eines ausführlichen Patienteninterviews erhoben.

Der Patient wurde stationär wegen einer Staphylokokkensepsis mit Flucloxacillin 2 g i.v./d und Rifampicin 600 mg p.o./d über vier Wochen therapiert. 24 h nach Entlassung kam es zu wässrigen Durchfällen und einer rapiden Verschlechterung des Allgemeinzustands. Ein ambulanter Therapieversuch seitens des Hausarztes mit Cefuroxim (2 x 250 mg p.o.) blieb erfolglos. Der Zustand des Patienten verschlechterte sich innerhalb von drei Tagen derart, dass er erneut stationär aufgenommen werden musste. Durch mikrobielle Nachweismethoden wurde der Verdacht auf eine CDI sowie auf eine Peritonitis bestätigt. Es erfolgte eine intravenöse und orale Therapie mit Vancomycin, wobei es rasch zu einer Genesung kam. Diese erste Infektion ist dabei als nosokomial erworben einzustufen, da sie am Folgetag der Krankenhausentlassung auftrat.

Zu dem ersten CDI-Rezidiv kam es nach fünf symptomfreien Wochen. Dieses wurde erfolgreich mit Vancomycin und Fidaxomicin im Krankenhaus behandelt. Der Patient erlitt im häuslichen Umfeld jedoch nach kurzen Erholungsphasen weitere CDIs. Dabei handelte es sich zum Teil um ambulant erworbene CDIs, da beispielsweise kein Krankenhausaufenthalt innerhalb der 12 Wochen zwischen dem kulturellen Nachweis von Isolat 6 und den Isolaten 7 – 9 erfolgte. Die Isolate 7 – 9 einerseits und die Isolate 11 und 12 andererseits wurden jeweils zusammen aus zwei Stuhlproben als Mischinfektion isoliert (siehe **Kapitel 3.2** – Klassifizierung der klinischen Isolate). Trotz Antibiotikatherapien trat nie eine dauerhafte Remission ein. Dabei kam es bei den CDIs zu unterschiedlichen Beschwerden, die teils sehr mild, aber auch sehr fulminant verliefen. Weitere Krankenhausaufenthalte wegen schwerer CDI-Symptome wurden seitens des Patienten abgelehnt.

Um mögliche Risikofaktoren zu ermitteln, wurde der Patient neben dem Verlauf der CDIs auch zu Umgebungsfaktoren, Vorerkrankungen und Ernährungsgewohnheiten befragt. Er gab an, keine Haustiere zu besitzen, keine Protonenpumpenhemmer einzunehmen und keine schweren GI-Erkrankungen vor der ersten CDI gehabt zu haben. Weiterhin leide er an einer

chronisch myeloproliferativen Erkrankung. Da es im Rahmen der Peritonealdialyse zur Behandlung seiner Niereninsuffizienz im Endstadium zu einem Eiweißverlust gekommen sei, ernähre er sich möglichst proteinreich. Insgesamt erlitt der Patient innerhalb von 15 Monaten neun Rezidive (**Tabelle 13, Abbildung 3**), bis er schließlich aufgrund einer seiner anderen schweren Grunderkrankungen verstarb.

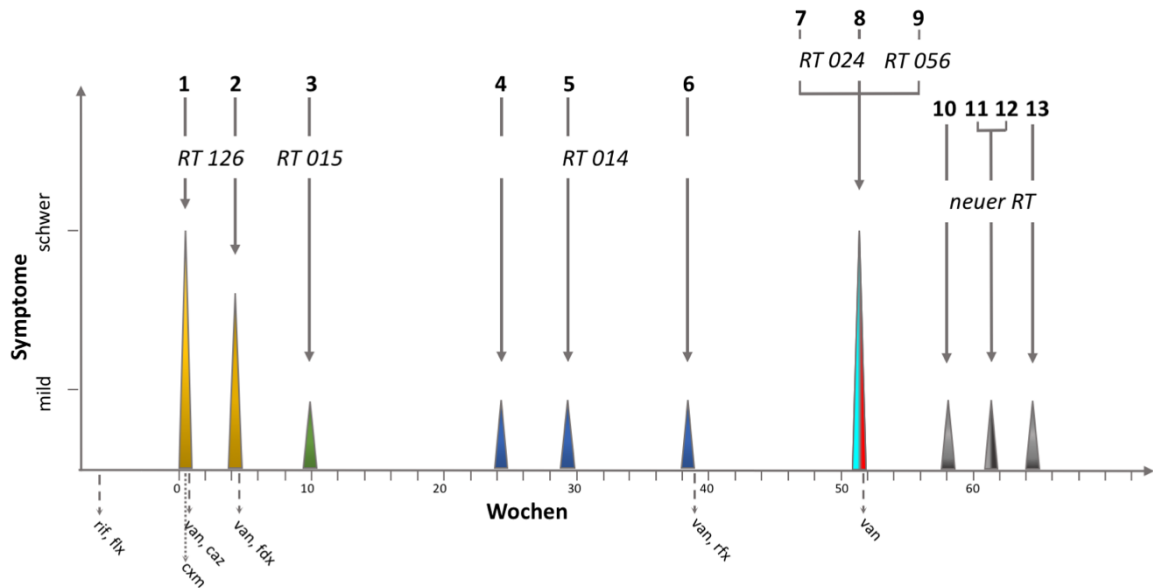


Abbildung 3.: Übersicht über den Krankheitsverlauf. Nach der initialen Infektion kam es über den Verlauf von fünfzehn Monaten zu neun Rezidiven (zehn CDIs insgesamt). Es konnten dreizehn verschiedene *C. difficile*-Isolate kultiviert werden (zwei Mischinfektionen). (Pfeil, oben) Kultureller Nachweis der genannten Isolate. (gestrichelter Pfeil, unten) Antibiotikagabe: (rif) Rifampicin, (flx) Flucloxacillin, (cxm) Cefuroxim, (van) Vancomycin, (caz) Ceftazidin, (fdx) Fidaxomicin, (rfx) Rifaximin.

Tabelle 13: *C. difficile*-Infektionen, Verlauf und Behandlung

<i>Isolate</i>	<i>Antibiotikagabe vor Erkrankung</i>	<i>Antibiotische Behandlung der CDI</i>	<i>Schwere der Erkrankung</i>	<i>Aufenthalt bei Auftreten von Symptomen</i>
1	Flucloxacillin, Rifampicin	Cefuroxim*, Vancomycin, Ceftazidim	++	H
2		Vancomycin, Fidaxomicin	++	H
3		-	-	A
4		-	-	A
5		-	-	H
6		Vancomycin, Rifaximin	- / V.a. Peritonitis	H
7 + 8 + 9		Vancomycin	++	A
10		-	-	A
11 + 12		-	-	A
13		-	-	H

(*) verabreicht vor *C. difficile*-Detektion als Therapie bei schweren Diarrhoen, (H) stationär, (A) ambulant, (++) starke Durchfälle und Erbrechen, (-) keine Antibiotikagabe/ wenige bis keine CDI-Symptome.

Nach Eintreten der Symptome im Rahmen der ersten Infektion wurde mit fünf Tagen Verzögerung erstmalig *C. difficile* detektiert. Bei den nachfolgenden Infektionen wurden Stuhlproben im Laufe eines Tages nach Beginn von Durchfallsymptomatik, Erbrechen, aber auch bei leichten GI-Beschwerden für die mikrobielle Diagnostik entnommen. Die Proben wurden zunächst mithilfe eines Antigentests auf eine von *C. difficile* exprimierte Glutamatdehydrogenase hin untersucht. Bei positiver Testung wurde zudem ein Toxintest (Nachweis von Toxin A und B) direkt aus der Stuhlprobe durchgeführt. Für jede Stuhlprobe wurde eine Kultur auf *C. difficile* angelegt. Bei antigenpositiven Stuhlproben konnte stets *C. difficile* angezüchtet werden, bei antigennegativen Proben bestätigte sich die Testung – *C. difficile*

konnte nicht kultiviert werden. Die direkte Toxintestung aus den Proben war im Gegensatz dazu in mindestens drei Fällen falsch negativ. Der direkte Toxinnachweis aus der Stuhlprobe fiel hier negativ, aus den Kulturen jedoch positiv aus. Zurückzuführen ist dieses Testversagen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine zu geringe Toxinkonzentration innerhalb der Stuhlprobe. Eine Übersicht der durchgeführten diagnostischen Tests sowie der Abstände zwischen den *C. difficile*-Detektionen ist in **Tabelle 14** aufgeführt.

Tabelle 14: Ergebnisse der durchgeführten diagnostischen Tests

<i>Isolate</i>	<i>Wochen zwischen den Isolationen</i>	<i>Antigen (Stuhlprobe)</i>	<i>Toxin (Stuhlprobe)</i>	<i>Toxin (Kultur)</i>
1	0	+	+	+
2	4	+	+	+
3	6	+	-	+
4	14	+	-	+
5	5	+	-	+
6	9	+	+	+
7 + 8 + 9	13	+	+	+
10	7	+	-	-
11 + 12	3	+	-	-
13	3	+	-	-

(+) positives Testergebnis, (-) negatives Testergebnis.

3.2 Klassifizierung der klinischen Isolate

3.2.1 Makromorphologie der *Clostridium difficile*-Isolate

Durch Veränderungen der Koloniegrößen und –beschaffenheit nach kultureller Anzucht auf CLO- und COS-Medium (bioMérieux, Nürtingen) konnten Infektionen mit neuen *C. difficile*-Stämmen identifiziert werden. Während die klinischen Isolate 1 und 2 als kleine, trocken-weißliche Kolonien imponierten, zeigten die anderen klinischen Isolate tendenziell größere, schleimig-gräuliche Kolonien (**Abbildung 4**).

Wenn deutlich verschiedene Koloniemorphologien innerhalb einer Stuhlprobenkultur zu sehen waren, wurden diese getrennt voneinander auf neuen COS-Platten kultiviert. In **Abbildung 4** sind Nahaufnahmen dieser Kolonien festgehalten. Die Isolate 7, 8 und 9 sowie 11 und 12 zeigen einen makromorphologisch diversen Phänotyp, obwohl sie jeweils aus einer Stuhlprobe stammten. Der dadurch aufkommende Verdacht, dass es sich hierbei um Mischinfektionen mit verschiedenen *C. difficile*-Stämmen handelt, konnte durch Ribotypisierung (siehe **Kapitel 3.2.2**) bewiesen werden. Mischinfektionen wurden demzufolge zweimal im Laufe der rezidivierenden CDIs beobachtet.

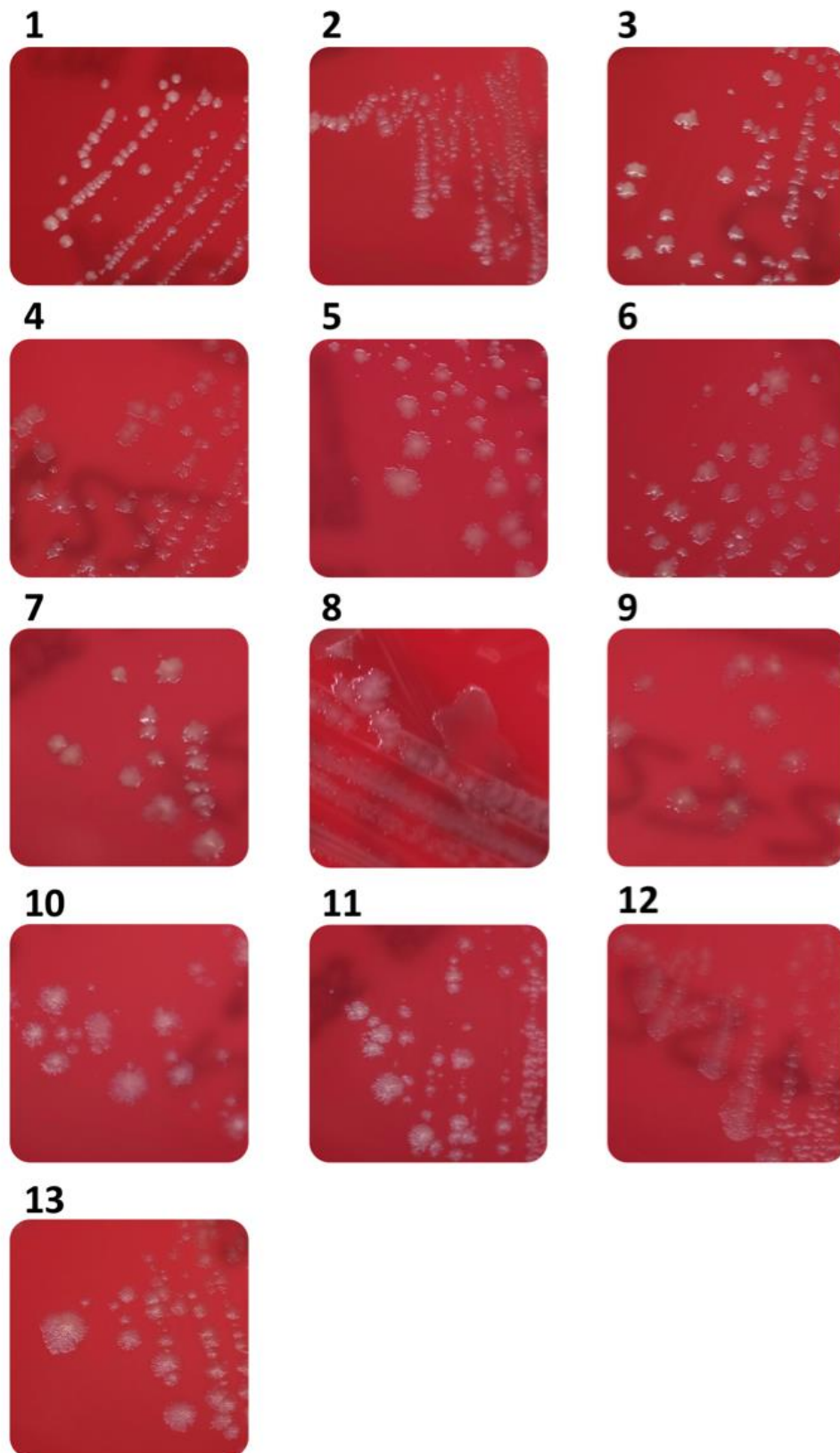


Abbildung 4: Nahaufnahmen der *C. difficile*-Kolonien der 13 klinischen Isolate auf COS-Medium. Isolate 1 und 2 zeigen besonders kleine, trockene Kolonien. Isolate 7, 8 und 9 sowie 10 und 11 wurden jeweils aus einer Stuhlprobe kultiviert (Mischinfektion).

3.2.2 Ribotypisierung der Isolate

Die Ribotypisierung ergab, dass die Isolate 1 und 2 dem Ribotyp 126 angehören. Der Ribotyp 126 exprimiert - so wie der ihm nahestehende Ribotyp 078 - neben den Toxinen A und B auch das binäre Toxin (*cdt*), was durch eine Toxinotypisierung mittels Multiplex-PCR der Isolate 1 und 2 bestätigt wurde. Diese ersten beiden CDIs führten zu einer besonders schweren Krankheitssymptomatik.

Insgesamt erkrankte der Patient mehrfach an Infektionen mit sehr selten vorkommenden Ribotypen. Nur der Ribotyp 014 (Isolate 4 – 6) ist in Deutschland weit verbreitet. Ribotyp 015 (Isolat 3), Ribotyp 024 (Isolate 7 und 8) und Ribotyp 056 (Isolat 9) werden hierzulande nur in Ausnahmen nachgewiesen. Die letzten klinischen Isolate (10 – 13) konnten sogar einem bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht verzeichneten Ribotyp zugeordnet werden. Es handelt sich folglich bei ihnen um einen neuen, zurzeit nicht epidemischen und bisher unbekanntem Ribotyp. Weiterhin wurde in Zusammenarbeit mit Dr. I. Yang (MHH) auch das Vorhandensein des CDT-Gens für die Isolate 10 und 13 nachgewiesen, während keine funktionsfähigen *tcdA*- und *tcdB*-Gene nachgewiesen werden konnten. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der phänotypischen Testung auf Toxin A und B, die für die letzten vier Isolate negativ ausfielen. Eine Übersicht der Ergebnisse der Ribo- und Toxinotypisierung ist in **Tabelle 15** aufgeführt.

Tabelle 15: Ribo- und Toxinotypisierung		
<i>Stamm</i>	<i>Ribotyp</i>	<i>nachgewiesene Toxingene</i>
1	126 (initiale Infektion)	<i>tcdA, tcdB, cdt</i>
2	126 (<i>relapse</i>)	<i>tcdA, tcdB, cdt</i>
3	015 (Reinfektion)	<i>tcdA, tcdB</i>
4	014 (Reinfektion)	<i>tcdA, tcdB</i>
5	014 (<i>relapse</i>)	<i>tcdA, tcdB</i>
6	014 (<i>relapse</i>)	<i>tcdA, tcdB</i>
7 + 8 + 9	024 + 024 + 056 (Reinfektion)	<i>tcdA, tcdB</i>
10	neuer Ribotyp ¹ (Reinfektion)	<i>cdt</i>
11 + 12	neuer Ribotyp ¹ (<i>relapse</i>)	nt
13	neuer Ribotyp ¹ (<i>relapse</i>)	<i>cdt</i>

(nt) nicht untersucht, (1) neuer zurzeit nicht epidemischer Ribotyp.

3.3 Antibiogramme

Die Antibiogramme wurden mithilfe von MHK-Teststreifen bestimmt (**Abbildung 5**) und ergaben für alle klinischen Isolate eine Sensibilität gegenüber Metronidazol und Vancomycin. Resistenzen gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin zeigen nur die Isolate des Ribotyps 126 und der Laborkontrollstamm R20291 (Ribotyp 027) (**Tabelle 16**).

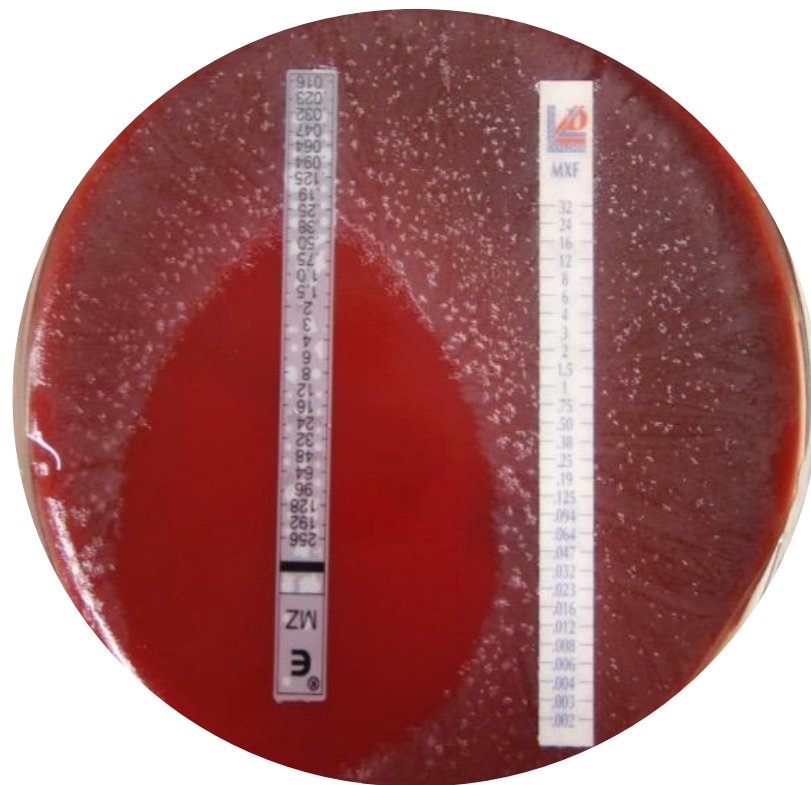


Abbildung 5: Beispiel für eine Antibiotikatestung mithilfe von MHK-Teststreifen. Dieses *C. difficile* Isolat zeigt sich sensibel gegenüber Metronidazol (MZ, mit Hemmhof) und resistent gegenüber Moxifloxacin (MXF, ohne Hemmhof).

Tabelle 16: Antibiotika-Empfindlichkeiten der Isolate

<i>Isolat</i>	<i>Ribotyp</i>	<i>Ery</i>	<i>Moxi</i>	<i>Metro</i>	<i>Vanco</i>
1	126	R	R	S	S
2	126	R	R	S	S
3	015	S	S	S	S
4	014	S	S	S	S
5	014	S	S	S	S
6	014	S	S	S	S
7	024	S	S	S	S
8	024	S	S	S	S
9	056	S	S	S	S
10	neuer RT ¹	S	S	S	S
11	neuer RT ¹	S	S	S	S
12	neuer RT ¹	S	S	S	S
13	neuer RT ¹	S	S	S	S
Kontrollstamm 630	012	R	S	S	S
Kontrollstamm R20291	027	R	R	S	S

(R) Resistent, (S) Sensibel, (Ery) Erythromycin, (Moxi) Moxifloxacin, (Metro) Metronidazol, (Vanco) Vancomycin, (1) neuer zurzeit nicht epidemischer Ribotyp. Mischinfektionen sind grau hinterlegt.

3.4 Phänotypische Charakterisierung der *Clostridium difficile*-Isolate

3.4.1 Sporulationsverhalten der klinischen Isolate

3.4.1.1 Sporulationsassays

Zur Analyse des Sporulationsverhaltens der für die meisten Ribotypen repräsentativen klinischen Isolate 1, 3, 4, 10, 11 und 12 sowie des Laborstamms 630 und einer Negativkontrolle (ein aufgrund einer *spo0A*-Mutation nicht zur Sporulation befähigter Stamm) wurden auf chromogenen Agarplatten Verdünnungsreihen der Flüssigkulturen der Isolate getropft. Wie bereits erörtert (siehe **Kapitel 2.6.4**), wurden für dieses Verfahren eine reine Sporensuspension (S-Reihe) und eine Mischung aus Sporen und vegetativen Zellen (S/V-Reihe) verwendet. Diese gängige Methode wird Sporulationsassay genannt. Unter anaeroben Bedingungen wurde ein Teil der Flüssigkulturen einen Tag, der andere Teil fünf Tage bebrütet und in Verdünnungsreihen auf Agarplatten getropft. Durch die Verwendung eines chromogenen Mediums konnte ermittelt werden, bis zu welcher Verdünnung Sporen vorhanden waren und zu Kolonien auskeimten. Reproduzierbar ($n \geq 3$ je Stamm) konnte gezeigt werden, dass die klinischen Isolate 1 und 2 nach einem Tag deutlich weniger Kolonien in der S-Reihe als die übrigen klinischen Isolate und Referenz- bzw. Laborstämme bildeten. Die S/V-Reihen zeigten keine wesentlichen Unterschiede.

Nach fünftägiger Inkubationszeit waren wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten feststellbar (**Abbildung 6**).

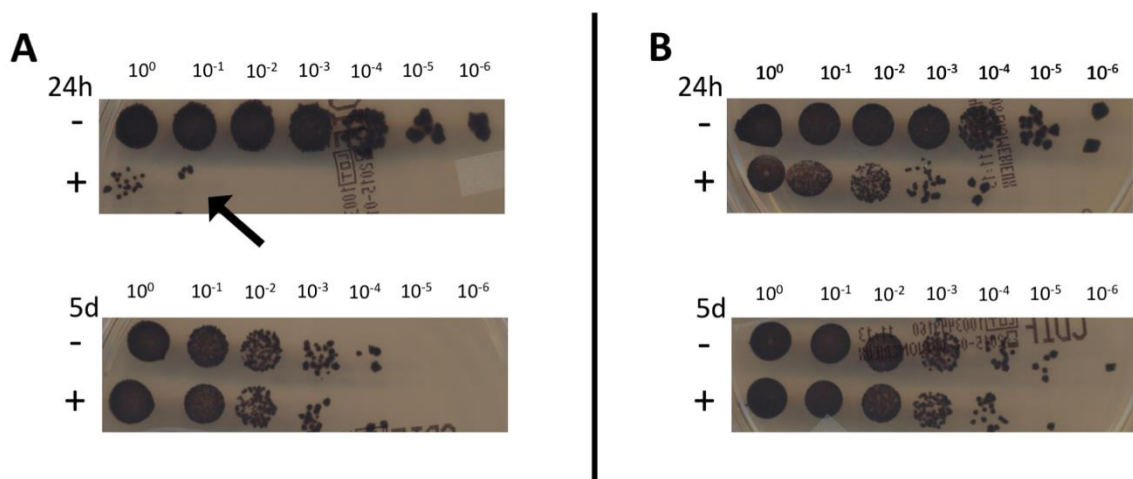


Abbildung 6: Repräsentative Sporulationsassays der klinischen Isolate 1 (A) und 3 (B) nach 24 Stunden und 5 Tagen. (A) Nach 24 Stunden ist bei Isolat 1 nur bei 10^{-1} -Verdünnung Sporenwachstum nachweisbar (Pfeil). (B) Sporen von Isolat 3 keimen nach 24 stündiger Inkubation auch bei starker Verdünnung (10^{-4}) aus. (-) Sporen und vegetativen Zellen (S/V-Reihe), (+) Sporensuspension (S-Reihe).

3.4.1.2 Analyse der *spo0A*-Expression mittels RNA-Hybridisierung

Um die durch die Sporulationsassays begründete Hypothese einer verspäteten Sporulation von Isolat 1 (Ribotyp 126) zu unterstützen, wurde die Expression des Masterregulators der Sporulation *spo0A* mithilfe eines Northern Blots nach 8 h und 24 h anaerober Bebrütung untersucht. Exemplarisch wurden hierfür die klinischen Isolate 1, 3 und 4, die zur Sporenbildung nicht befähigte *spo0A*-Mutante und deren Parenteralstamm sowie die Laborkontrollstämme 630 und R20291 ausgewählt. Nach achtstündiger anaerober Inkubation schien hierbei das Isolat 1 im Vergleich zu den anderen Isolaten und Kontrollstämmen weniger *spo0A*-RNA zu bilden (**Abbildung 7**).

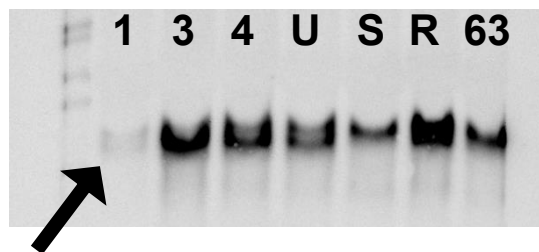


Abbildung 7: Northern Blot der *spo0A* RNA-Expression nach achtstündiger anaerober Bebrütung der repräsentativen klinischen Isolate 1, 3 und 4, einer *spo0A*-Mutante (S) und ihrem zugehörigen Ursprungsstamm (U) sowie den Laborstämmen R20291 (R) und 630 (63). Die *spo0A*-Expression ist bei dem klinischen Isolat 1 nach acht Stunden Bebrütung vergleichsweise gering (Pfeil).

Der *C. difficile*-Stamm S produzierte nach 8 h vergleichsweise ähnlich hohe Mengen an *spo0A*-Transkript wie die anderen klinischen Isolate und Kontrollstämme. Nach 24 h Bebrütung konnten hingegen im Vergleich zu den anderen Isolaten eine deutlich geringere *spo0A*-RNA-Menge detektiert werden (**Abbildung 8**). Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Ausbleiben positiv-verstärkender Rückkopplungsschleifen zurückzuführen.

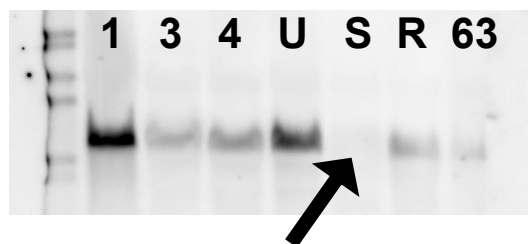


Abbildung 8: Northern Blot der *spo0A*-RNA-Expression nach 24-stündiger anaerober Bebrütung der repräsentativen klinischen Isolate 1, 3 und 4, einer *spo0A*-Mutante (S) und ihrem zugehörigen Ursprungsstamm (U) sowie den Laborstämmen R20291 (R) und 630 (63). Die *spo0A*-RNA-Expression nimmt bei der *spo0A*-Mutante (S) nach 24 h im Vergleich zu den anderen Isolaten deutlich ab (Pfeil).

3.4.2 Motilität der Isolate

Das Motilitätsverhalten der klinischen Isolate wurde mithilfe von sogenannten Motilitäts- (BHIS-Medium, 0,25 % Agar) und Schwimmingsassays (BHIS-Medium, 0,3 % Agar) analysiert und mindestens dreimal für jedes Isolat wiederholt. Während die klinischen Isolate 3 – 9 und die Laborkontrollstämme 630 sowie R20291 sich im semifesten Agar als Zeichen der Beweglichkeit ausbreiteten, zeigten die Isolate 1, 2 und 10 - 13 sowie die Referenzribotypen 078 und 126 einen sessilen Phänotyp (**Abbildung 9**, **Abbildung 10**).

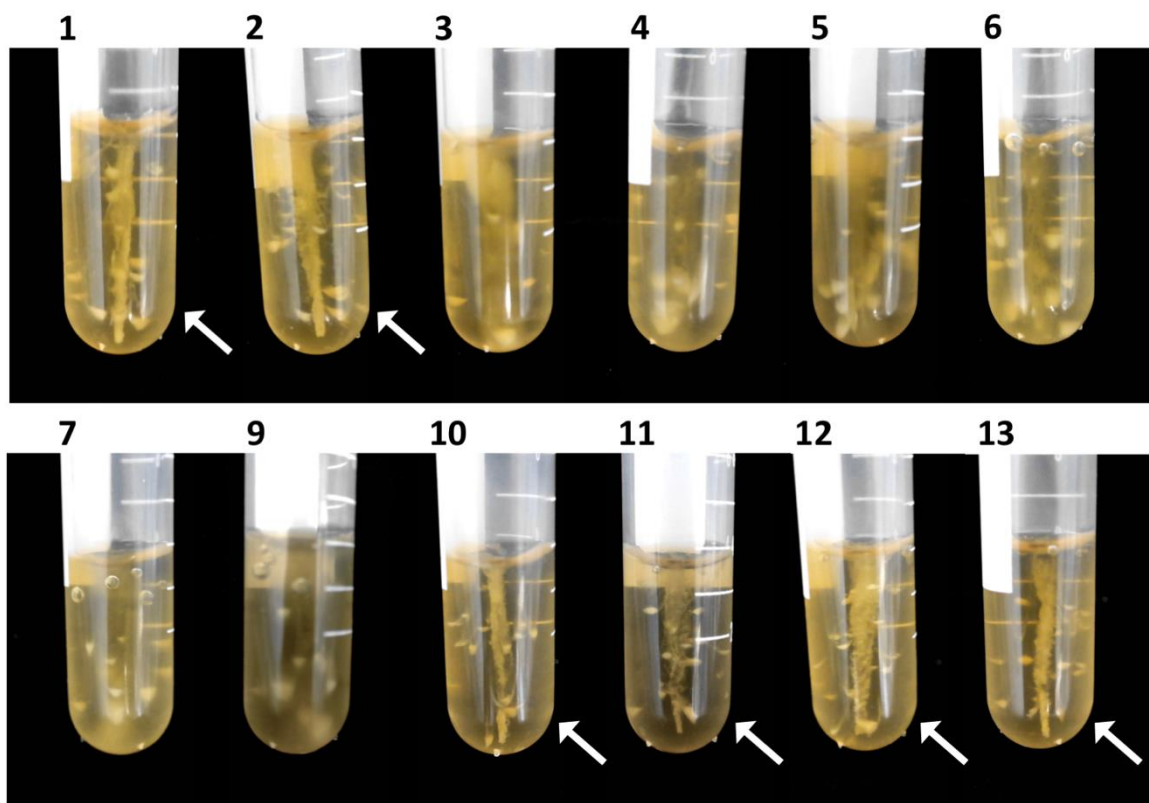


Abbildung 9: Motilitätsassays repräsentativer klinischer Isolate in semifestem LB-Medium. Isolat 1, 2 sowie 10 -13 sind nicht motil (Pfeile). Die Isolate 3 - 7 und 9 sind motil und breiten sich im semifesten BHIS-Medium aus.

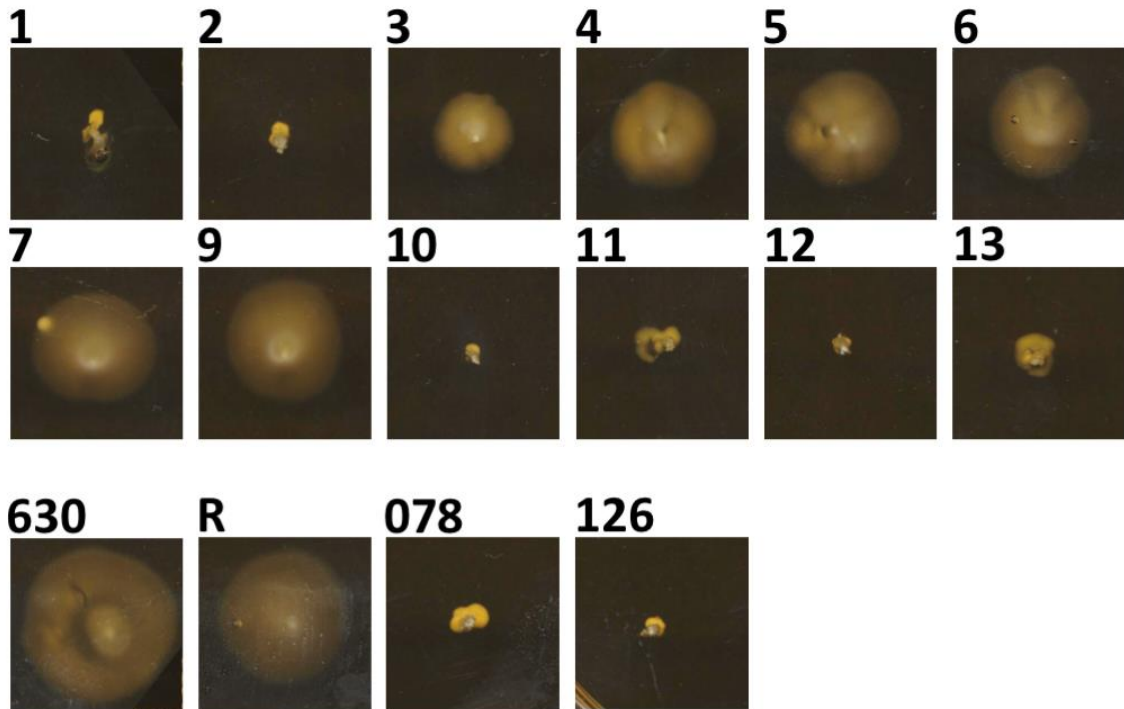


Abbildung 10: Schwimmverhalten repräsentativer Isolate in semifestem LB-Medium (0,3 % Agar). Auch hier zeigen die klinischen Isolate 3 - 7 und 9 sowie die Laborkontrollstämme 630 und R20291 eine ausgeprägte Schwimmmotilität. Die Isolate 1 und 2, 10 - 13 sowie die Referenzribotypen 078 und 126 sind hingegen nicht motil.

(**630**) Laborkontrollstamm 630, (**R**) Laborkontrollstamm R20291, (**78**) Referenzribotyp 078, (**126**) Referenzribotyp 126.

3.4.3 Absinkverhalten der Isolate

Nach 24-stündiger anaerober Inkubation ohne Bewegung der Kulturröhrchen konnte gezeigt werden, dass die klinischen Isolate 1 und 2 zum Boden der Gefäße sanken und sich ein klarer Überstand bildete. Die untersuchten Referenzribotyp-Stämme der Ribotypen 078 und 126 glichen hierin ihren klinischen Pendanten. Bei den anderen klinischen Isolaten sowie den Referenzribotyp-Stämmen 014, 015 und 027 (Laborstamm R20291) und 012 (Laborstamm 630) war dieses Verhalten nicht zu beobachten ($n > 10$). In **Abbildung 11** wird dieses Absinkverhalten durch Aufnahmen von repräsentativen *C. difficile*-Stämmen in Flüssigkultur demonstriert.



Abbildung 11: Flüssigkulturen repräsentativer Isolate nach 24 h Bebrütung. (1) klinisches Isolat 1. (126) Referenzribotyp 126. (78) Referenzribotyp 078. (4) klinisches Isolat 4. (R) Laborstamm R20291. Das klinische Isolat 1, die Referenzribotypen 126 sowie 078 (1, 126 und 78) bilden nach 24 h anaerober Bebrütung als Zeichen ihres Absink-Phänotyps ein Zellsediment. Isolate anderer Ribotypen tun dies nicht (klinisches Isolat 4 und Laborstamm R20291).

3.4.4 Wachstumsverhalten mit Analyse des Absinkverhaltens

Um das Absinkverhaltens im Detail zu bewerten, wurden Wachstumskurven aller klinischen Isolate erhoben und für repräsentative Isolate der verschiedenen Ribotypen mindestens dreifach wiederholt. Alle getesteten klinischen Isolate zeigten stets ein vergleichbares Wachstumsverhalten, wenn die Kulturen vor der Messung der optischen Dichte mit dem Vortexmischer in Suspension gebracht wurden. Der Laborkontrollstamm 630 zeigte im Vergleich hierzu jedoch eine deutlich verlangsamte Biomassenproduktion.

Wurden die Kulturen vor der Probenentnahme nicht resuspendiert, zeigten die Isolate häufig eine geringere Biomassenproduktion auf, was durch eine geringere Nährstoffexposition mangels Durchmischung erklärt werden kann.

Die Isolate 1 und 2 wiesen in diesen Versuchsreihen ein auffällig anderes Wachstumsverhalten im Vergleich zu den anderen klinischen Isolaten und Kontrollstamm 630 auf. Zu Be-

ginn der Kultivierung wuchsen diese Stämme im Vergleich zu den anderen Isolaten synchron. Zwischen exponentieller und stationärer Phase war hier zunächst jedoch eine Stagnation, dann eine eindeutige Abnahme der optischen Dichte zu beobachten (**Abbildung 12 B**). Ein weiterer Wachstumsversuch wurden zudem mit den Referenzribotypen 126, 078, 014 und 015 und den anderen klinischen Isolaten (2, 5, 6 und 8) zur Validierung eines gleichen Wachstumsverhaltens bei gleichen Ribotypen durchgeführt. Dies verdeutlicht, dass uns vorliegende Stämme der Ribotypen 126 sowie 078 ein eindeutiges Absinkverhalten zeigen.

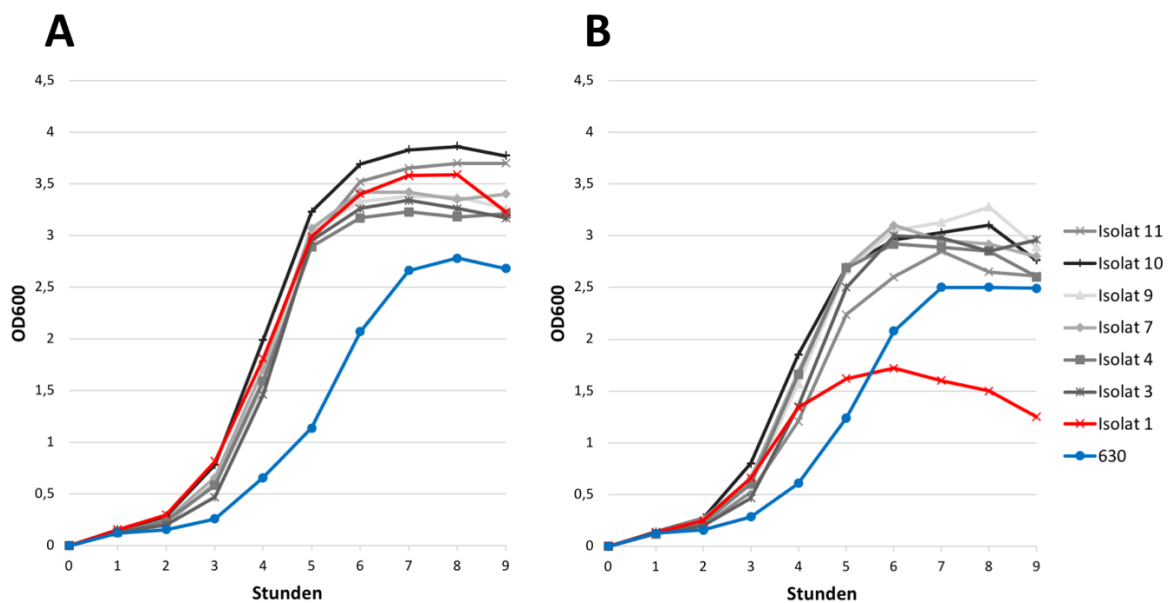


Abbildung 12: Repräsentative Wachstumskurven der klinischen Isolate aller Ribotypen und Kontrollstamm 630.

(A) Optische Dichten (OD₆₀₀) der vor dem Messen resuspendierten Kulturen. Die klinischen Isolate zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten.

(B) Optische Dichten der nicht resuspendierten Kulturen. Isolat 1 (rot) zeigt einen Abfall der optischen Dichte beim Erreichen der stationären Wachstumsphase. Der Laborstamm 630 (blau) zeigt eine geringere Biomassenproduktion im Vergleich zu den klinischen Isolaten.

3.4.5 Adhärenz der Isolate

Adhärenzassays wurden für die ersten sechs klinischen Isolate und mit den Kontrollstämmen 630 und R20291 durchgeführt. In wiederholten Durchführungen ($n = 3$) wiesen die ersten beiden klinischen Isolate einen besonders adhärenenten Phänotyp auf: Nach 24 h Kultivierung verblieb nach Abnahme des Überstands und Waschen der Näpfe ein dickes Zellsediment. Um dies zu verdeutlichen, wurden die Bakterien mit Kristallviolett angefärbt (**Abbildung 13**).

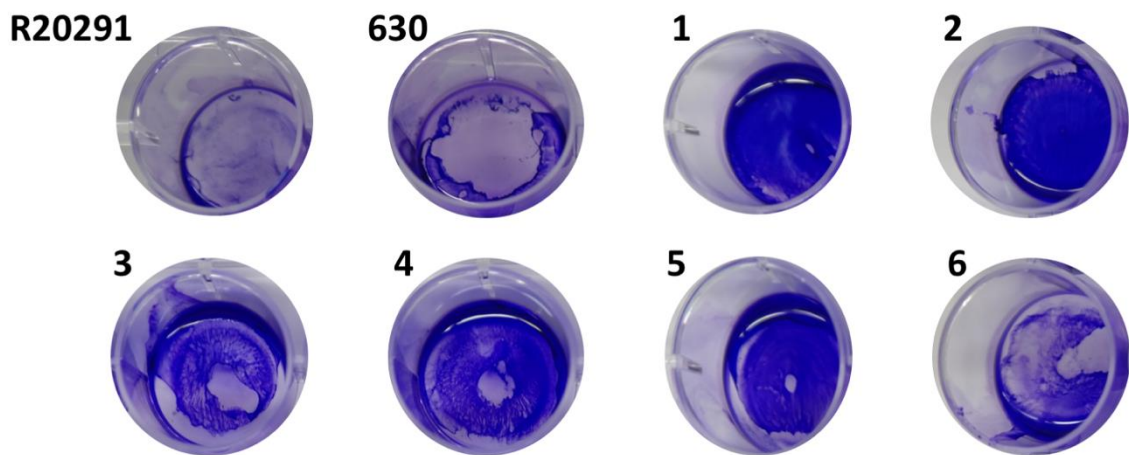


Abbildung 13: Repräsentative Darstellung eines Adhärenzassays der klinischen Isolate 1 – 6 sowie der Kontrollstämme R20291 und 630. Isolate 1 und 2 adhäreren am stärksten am Boden der Näpfe der Zellkulturplatten.

3.4.6 Zelllängenvariabilitäten zwischen *Clostridium difficile*-Isolaten

Um die Zellmorphologie der Bakterien im Detail zu studieren, wurden Kulturen der für die verschiedenen Ribotypen repräsentativen klinischen Isolate 1, 3, 4, 7, 9, 11, 12 und 13 sowie für den Kontrollstamm 630 und den Referenzribotypen 078 mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Die mikroskopische Analyse aller Proben zeigte deutlich elongierte Zellen bei den Ribotypen 078 sowie 126 (klinisches Isolat 1 und 2). Die Zellelongation wurde mit einer Membranfärbung (mit dem Reagenz FM 4-64) und einer anschließenden Fluoreszenzmikroskopie in Hinblick auf die Zellteilung bzw. -trennung bestätigt. Hier zeigte sich neben elongierten Zellen auch ein kettenbildender Phänotyp. Während die verlängerten Einzelzellen auf einen Zellteilungsdefekt hinweisen, ist die Kettenbildung durch die ausbleibende Trennung der Zellen voneinander auf einen Zelltrennungsdefekt zurückzuführen. Vergleichende Aufnahmen zweier klinischer Isolate (klinisches Isolat 1 und klinisches Isolat 4) mit und ohne Elongation und Kettenbildung sind in **Abbildung 14** festgehalten.

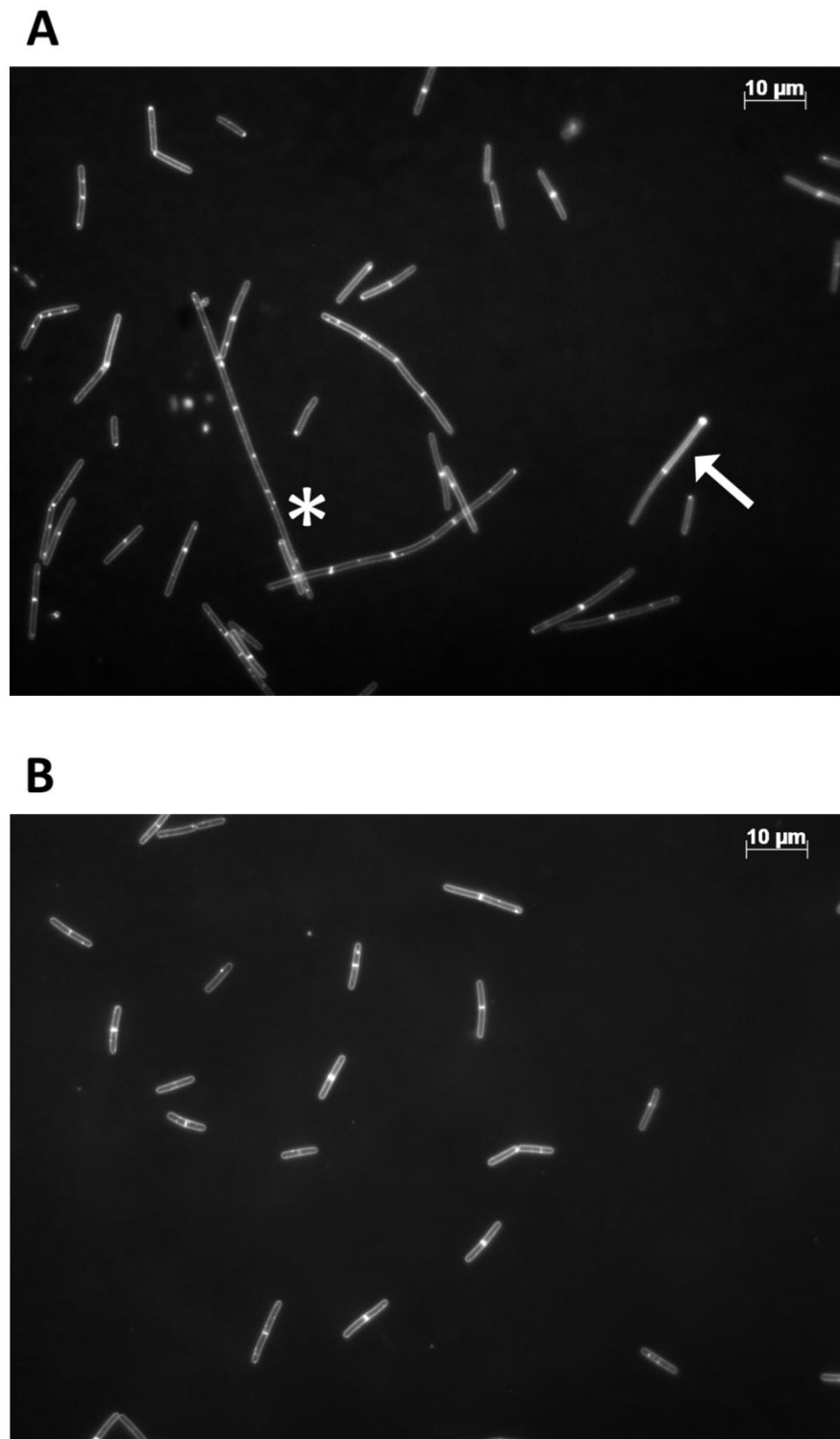


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopie nach Membranfärbung mit FM 4-64 der klinischen Isolate 1 (A) und 4 (B). Isolat 1 zeigt im Vergleich zu Isolat 4 einen elongierten (Pfeil) und kettenbildenden (*) Phänotyp.

Weiterhin wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. C. Wrede am Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchungen zur Bestimmung der bakteriellen Ultrastruktur ausgewählter *C. difficile*-Isolate durchgeführt. Auch hierdurch wurde der elongierte Phänotyp des klinischen Isolates 1 (Ribotyp 126) bestätigt. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen umfassten weiterhin den Kontrollstamm R20291, die klinischen Isolate 3 und 4 als Beispiele für die Ribotypen 014 und 015 sowie die Referenzribotypstämme 126 und 015. Der Referenzribotyp 126 zeigte hierbei jedoch im Gegensatz zum klinischen Isolat 1 keine elongierten Zellen, während der Referenzribotyp 015 seinem klinischen Pendant (Isolat 3) entsprach und keinen elongierten Phänotyp aufwies.

Ein direkter Vergleich der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der klinischen Isolate 1 und 4 ist in **Abbildung 15** festgehalten, während eine Zusammenstellung aller analysierten Isolate in **Abbildung 16** dargestellt ist.

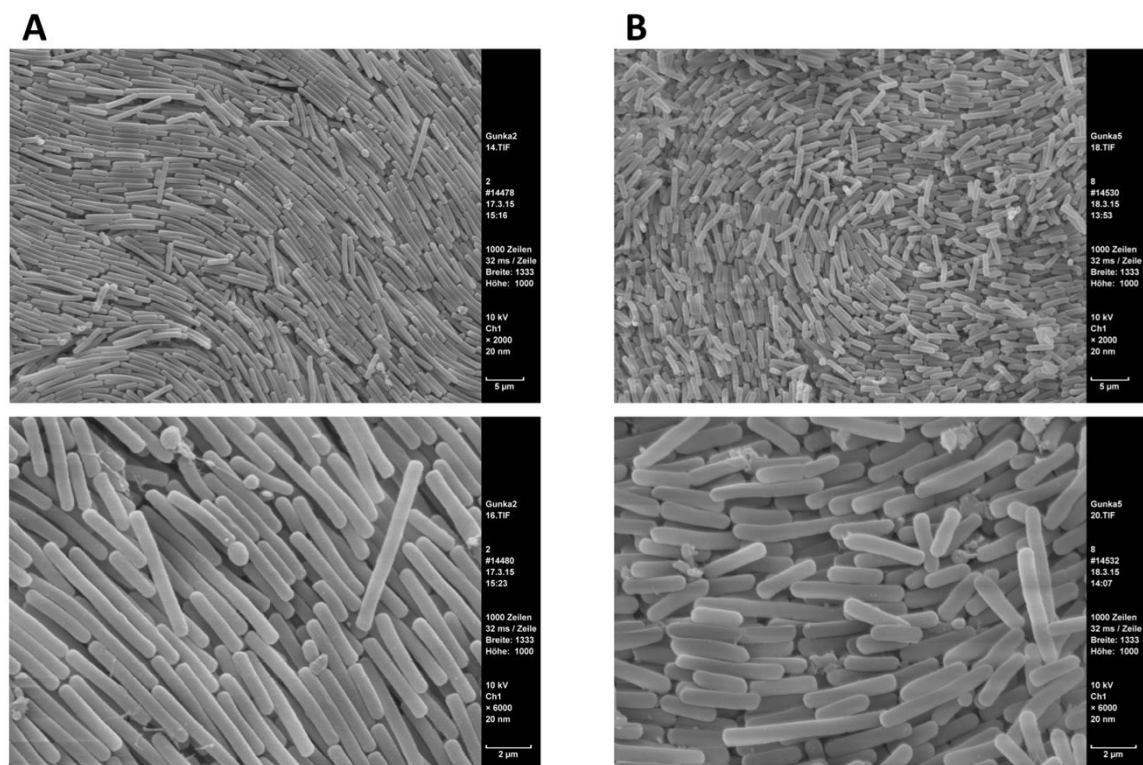


Abbildung 15: Vergleich der REM-Bilder der Isolate 1 und 4. (A) Isolat 1. (B) Isolat 4. Isolat 1 zeigt deutlich elongierte Zellen im Vergleich zu Isolat 4.

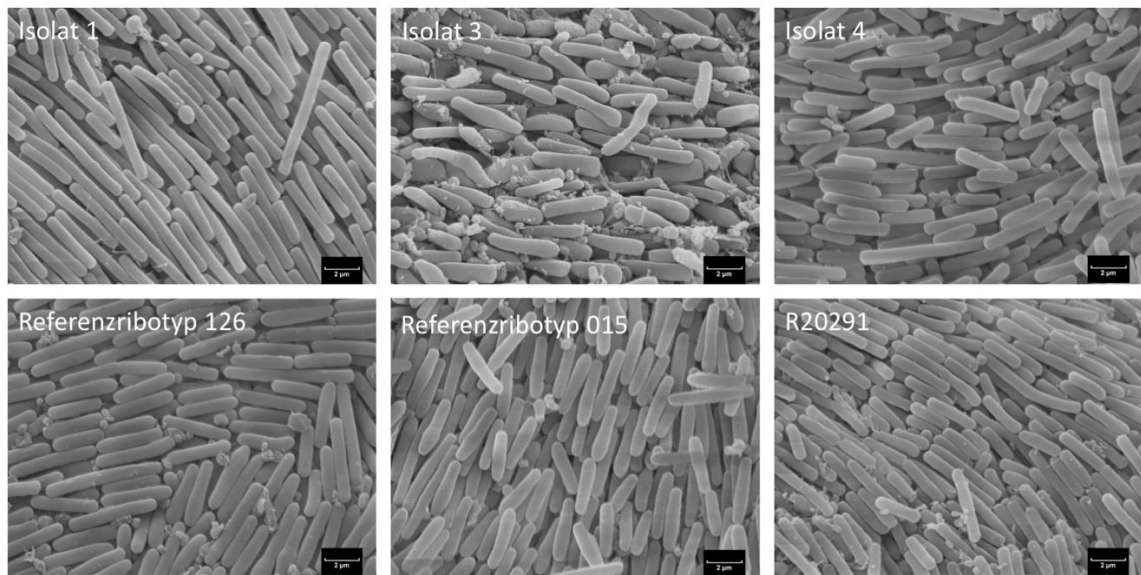


Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der klinischen Isolate 1, 3 und 4, der Referenzribotypen 126 und 015 sowie des Kontrollstamms R20291. Das klinische Isolat 1 zeigt deutlich verlängerte Zellen im Vergleich zu den anderen Isolaten bzw. Stämmen.

Ein quantitativer Vergleich der Kettenlängen der repräsentativen klinischen Isolate 1 und 4 sowie des Kontrollstamms 630 ergab, dass bei dem klinischen Isolat 1 in ca. 23 % Ketten von 3 - 7 Zellen vorlagen (101 gemessene Zellen/ Zellketten), während das klinische Isolat 4 keine Ketten ≥ 3 aufwies (106 gemessene Zellen/ Zellketten). 3er-Zellketten konnten für den Kontrollstamm 630 in nur zwei Fällen beobachtet werden (100 gemessene Zellen/ Zellketten) (Abbildung 17).

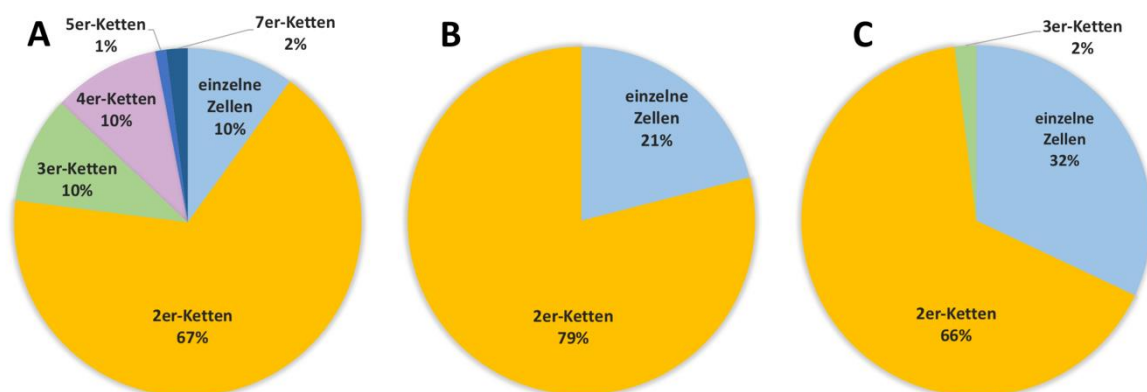


Abbildung 17: Vergleich der Zellenkettenlängen. (A) Isolat 1 (101 gemessene Zellen/ Zellketten). (B) Isolat 4 (106 gemessene Zellen/ Zellketten). (C) Kontrollstamm 630 (100 gemessene Zellen/ Zellketten).

Die Längen einzelner, sich nicht in Teilung befindlicher *C. difficile*-Zellen und Zellen innerhalb der Zellketten bis zur Separationsmembran sowie die Gesamtlänge von Zellketten wurden mithilfe des AxioVision Programms (Version 4.7.2) (Zeiss, Göttingen) gemessen. Hier zeigte das klinische Isolat 1 eine maximale Kettenlänge von 74 μm und eine mediane Zell- und Kettenlänge von 15 μm (101 gemessene Zellen/ Zellketten). Zum Vergleich lag die maximal ermittelte Kettenlänge von Isolat 4 bei 19 μm und die mediane Länge bei 10 μm (106 gemessene Zellen/ Zellketten). Der Kontrollstamm 630 zeigte eine maximale Kettenlänge von 17 μm und eine mediane Länge von 8 μm (100 gemessene Zellen/ Zellketten). Aufgrund der hohen Zahl der ausgemessenen Zelllängen waren die Werte aller drei *C. difficile*-Stämme im jeweiligen Vergleich zueinander hoch signifikant. Die gemessenen Längen der Zellketten sind in **Abbildung 18** in Form eines Boxplots dargestellt.

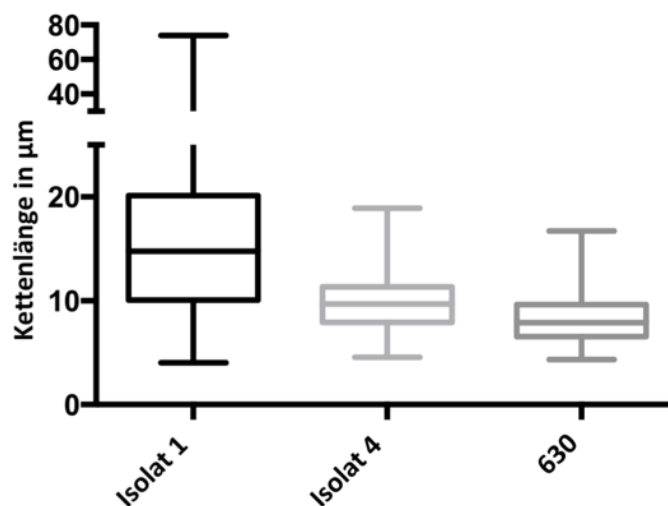


Abbildung 18: Zelllängen der repräsentativen Isolate 1 und 4 sowie des Kontrollstamms 630 im Vergleich (Boxplot). Zellen und Ketten des Isolats 1 sind im Schnitt deutlich länger (mediane Länge: 15 μm). Es konnte für dieses Isolat eine Kettenlänge bis 74 μm gemessen werden. Für das klinische Isolat 4 ist die mediane Länge 10 μm mit einem Maximalwert von 19 μm . Zellen und Ketten des Laborstamms 630 haben eine mediane Länge von 8 μm bei einem Maximalwert von 17 μm . (Für diese Datenerhebung wurden Separationsmembranen innerhalb von Zellketten nicht berücksichtigt, d. h. ausschließlich Längen von Einzelzellen und Gesamtkettenlängen erhoben.)

3.5 Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung

Ein Vergleich der phänotypischen Charakterisierung aller klinischen Isolate ist in der **Tabelle 17** dargestellt.

Tabelle 17: Phänotypische Charakterisierung: Zusammenfassende Tabelle.						
<i>Isolat</i>	<i>Ribotyp</i>	<i>starke Sporulation nach 24 h</i>	<i>Absinkverhalten</i>	<i>motil</i>	<i>verstärkte Adhärenz</i>	<i>Elongierte Zellmorphologie mit Kettenbildung</i>
1	126	-	+	-	+	+
2	126	-	+	-	+	+
3	015	+	-	+	-	-
4	014	+	-	+	-	-
5	014	+	-	+	-	-
6	014	+	-	+	-	-
7 + 8 + 9	024 + 024 + 056	+	-	+	nt	-
10	neuer Ribotyp ¹	+	-	-	nt	-
11 + 12	neuer Ribotyp ¹	+	-	-	nt	-
13	neuer Ribotyp ¹	+	-	-	nt	-

Phänotypisches Verhalten ist semiquantitativ angegeben: (-) fehlt, (+) vorhanden, (nt) nicht getestet, (1) neuer zurzeit nicht epidemischer Ribotyp.

4 Diskussion

4.1 Rezidivierende *Clostridium difficile*-Infektion - Epidemiologie und klinischer Verlauf

Die vorliegende Arbeit gründet auf dem Krankheitsverlauf eines Patienten, der neun CDI-Rezidive erlitt. Mehrere für eine CDI bekannte Risikofaktoren konnten auch bei diesem Patienten identifiziert werden: Neben vorausgegangener Antibiotikatherapie, seinem erhöhten Lebensalter und verschiedenen Grunderkrankungen bestand eine chronische Niereninsuffizienz mit Dialysepflicht. Insbesondere die chronische Niereninsuffizienz im Endstadium gilt dabei als Risikofaktor für CDIs und wird mit einer erhöhten Mortalität während der *C. difficile*-Erkrankung assoziiert (Keddis et al. 2012; Cunney et al. 1998; Eddi et al. 2010).

Hohe Rezidivraten bei CDIs sind ein bekanntes Problem. Dabei kommt es in 15 - 30 % nach Erstinfektion zu erneuten Diarrhoen (Maroo und Lamont 2006; Barbut et al. 2000). Diese Rückfalltendenz stellt eine große Herausforderung an behandelnde Ärzte und eine enorme psychische wie physische Belastung für Patienten dar. Eine Analyse der Wahrscheinlichkeit von Rezidiven und der damit assoziierten Sterblichkeit wurde unter anderem durch Lübbert *et al.* (2016) und Sheitoyan-Pesant *et al.* (2015) vorgenommen. Ein Vergleich ihrer Ergebnisse ist tabellarisch (**Tabelle 18**) im Anhang aufgeführt. Hinsichtlich der Mortalitätsraten bei wiederkehrenden Infektionen widersprechen sich die genannten Autoren. Während Lübbert *et al.* (2016) eine deutliche und stetige Zunahme der Sterblichkeit pro erneuter Infektion beschreiben, verzeichnen Sheitoyan-Pesant *et al.* (2015) abnehmende Mortalitätsraten.

Trotz der hohen Rezidivrate ergibt sich eine extrem niedrige Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von neun Rezidiven, wie sie bei unserem Patienten vorlagen. Bei einer konstant angesetzten Rezidivrate von 15 – 30 % ergäbe sich so eine Gesamtwahrscheinlichkeit von 0,000004 – 0,002 % (ca. 0,004 – 2 von 100.000 CDI Patienten).

Rezidivierende CDIs (Rückfälle) werden entweder durch den gleichen *C. difficile*-Stamm (*relapse*) oder einen anderen *C. difficile*-Stamm (Reinfektion) verursacht (Johnson et al. 1989; Barbut et al. 2000). Bei unseren Untersuchungen wurden bei mindestens 4 von 9 Rezidiven Reinfektionen beobachtet (44,4 %). In der Literatur werden Reinfektionsraten zwischen 16 – 49 % angeführt (Barbut et al. 2000; Sim et al. 2017; Tang-Feldman et al. 2003; Oka et al. 2012; Eyre et al. 2012) (siehe **Tabelle 19**, Anhang).

Mögliche Erklärungen für diese unterschiedlichen Reinfektionsraten wären unter anderem eine variable lokale Epidemiologie, verschiedene Typisierungsmethoden oder eine Auswahl von unterschiedlichen Patientenkohorten. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass im Vergleich zu unseren Ergebnissen die oben genannten Arbeiten nur bis zu drei CDI-Rezidive pro Patient beschreiben. Ein besonderes Kennzeichen des untersuchten Falles war die extrem hohe Rezidivanzahl im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Fällen. Die vergleichsweise hohe Anzahl von Infektionen mit neuen *C. difficile*-Stämmen (44,4 %) in unserer Untersuchung wäre so durch eine Korrelation von hohen Reinfektionsraten mit hohen Rezidivraten zu erklären. Zusätzlich ergeben sich durch die ausschließliche Herkunft der Isolate von einem einzigen Patienten annähernd konstant bleibende Umgebungsfaktoren und Komorbiditäten, welche im Rahmen eines Interviews festgestellt wurden.

Im Verlauf der rezidivierenden Erkrankung des Patienten wurden sowohl nosokomiale als auch ambulant erworbene CDIs beobachtet. Die generelle Datenlage zu ambulant erworbenen CDIs ist spärlich und gründet sich auf wenige Studien mit größtenteils kleinen Patientenkollektiven. Einige wenige epidemiologischen Erhebungen weisen gleichwohl darauf hin, dass ambulant erworbene Infektionen in den letzten Jahrzehnten zugenommen haben (Naggie et al. 2011; Khanna et al. 2012; Vindigni und Surawicz 2015; Wilcox et al. 2008; Fellmeth et al. 2010). Aktuell beträgt die Inzidenz ambulant erworbener CDIs ca. 20 – 27/100.000 pro Jahr (Gupta und Khanna 2014). Diese machen also 1/4 bis 1/3 der CDI-Fälle bei einer Gesamtinzidenz (d. h. nosokomiale plus ambulant erworbene CDIs) von 90/100.000 pro Jahr aus (Wilcox et al. 2008).

Zur Erfassung ambulant erworbener CDIs und zur Abgrenzung gegenüber nosokomialen Infektionen bedarf es einer einheitlichen und eindeutigen Definition. Laut den Leitlinien für *Clostridium difficile*-Infektionen der „Society for Healthcare Epidemiology of America“ (SHEA) und der „Infectious Diseases Society of America“ (IDSA) definiert sich die Abgrenzung von nosokomialen zu ambulant erworbenen CDIs wie in **Abbildung 19** dargestellt (Cohen et al. 2010).

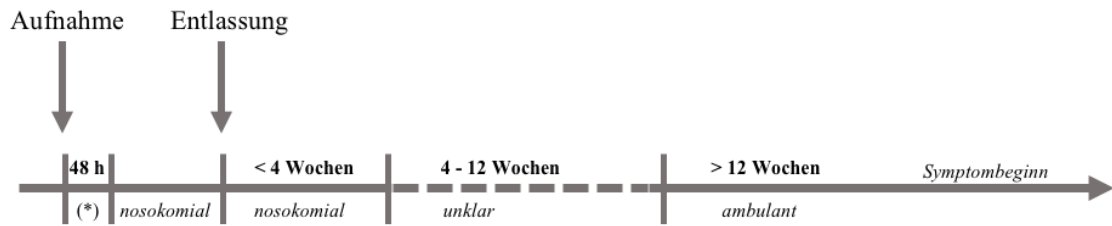


Abbildung 19: Veranschaulichung der Definition von nosokomialen vs. ambulant erworbenen CDIs nach Cohen *et al.* (2010). (*) Ein Symptombeginn innerhalb von 48 h nach Krankenhausaufnahme wird als ambulant erworbene CDI definiert. Ein Symptombeginn nach diesen ersten 48 h und während des Krankenhausaufenthaltes sowie bis zu vier Wochen nach Entlassung gilt als nosokomiale CDI. Wenn Symptome vier bis zwölf Wochen nach Entlassung auftreten, kann keine eindeutige Definition erfolgen. Ab zwölf Wochen nach Entlassung handelt es sich um ambulante Infektionen.

In der vorliegenden Arbeit sind nach obiger Definition die ersten beiden CDIs nosokomial erworben. Die 3. – 6. Infektion lassen sich nicht eindeutig zuordnen. Ab der 7. CDI handelt es sich hingegen um ambulant erworbene Infektionen.

Während im Krankenhausumfeld vor allem von einer Verbreitung von Patient zu Patient ausgegangen wird (Clabots *et al.* 1992; McFarland *et al.* 1989; Dubberke *et al.* 2007), sind spezifische Infektionsquellen im ambulanten Umfeld bisher nicht endgültig geklärt. Eyre *et al.* (2013b) analysierten die Stammzugehörigkeit von *C. difficile* Isolaten, die von Patienten mit nosokomialen und ambulant erworbenen CDIs in Oxfordshire, England, über den Zeitraum von drei Jahren gesammelt wurden und stellten fest, dass sich 45 % der untersuchten *C. difficile*-Stämme von vorher isolierten Stämmen unterschieden. Sie schlussfolgern daraus, dass - neben der Ansteckung durch symptomatische Patienten – *C. difficile*-Stämme aus vielfältigen Quellen eine ausschlaggebende Rolle bei der Transmission spielen müssen. Hier sind als potentielle Infektionsquellen die Verbreitung durch asymptomatische Träger, zoonotische Infektionen sowie die Übertragung durch Lebensmittel und verunreinigtes Wasser zu nennen (Eyre *et al.* 2013b; Hensgens *et al.* 2012; Rodriguez-Palacios *et al.* 2013). Hensgens *et al.* (2012) weisen jedoch darauf hin, dass Sporenmengen in Tieren und Lebensmitteln gering seien und nach wie vor die Übertragung über diesen Weg nicht bewiesen sei.

In diesem Zusammenhang gab der Patient unserer Studie auf Nachfrage an, sich proteinreich zu ernähren, da es durch die Peritonealdialyse zu einem erheblichen Proteinverlust komme. Ansonsten habe er keine ungewöhnlichen Ernährungsgewohnheiten. Um erneute CDIs zu vermeiden, habe unser Patient Krankenhäuser und ambulante medizinische Einrichtungen gemieden. Sein häusliches Inventar sei ferner mit sporenabtötenden Mitteln behandelt worden. Eine Ermittlung der Infektionsquellen der bei ihm nachgewiesenen diversen *C. difficile*-

Isolate war nicht möglich. In diesem Fall könnte also - neben potentiellen Lebensmittelinfektionen - die Ernährung, durch ihren Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms (David et al. 2014; Wu et al. 2011; Turnbaugh et al. 2009), an der Genese der multiplen Rezidive beteiligt gewesen sein.

4.2 Genetische Charakterisierung der klinischen *Clostridium difficile*-Isolate

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche klinische *C. difficile*-Isolate in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für *Clostridium difficile* am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg), toxino- und ribotypisiert. Diese Klassifizierung soll im Folgenden in Bezug auf die Symptomschwere und phänotypische Charakterisierung der Bakterien eingeordnet werden. Um dies in einen weiteren Kontext setzen zu können, werden diese Verfahren und ihr Stellenwert näher beleuchtet.

Hauptvirulenzfaktor von *C. difficile* sind die Toxine TcdA und TcdB. Auch das binäre Toxin wird mit schweren CDI-Verläufen in Verbindung gebracht (Awad et al. 2014; Vedantam et al. 2012; Bacci et al. 2011). Allerdings können toxigene Stämme den Darm auch kolonisieren, ohne Symptome hervorzurufen (Galdys et al. 2014; Ozaki et al. 2004). Atoxigene Stämme scheinen hingegen keine Erkrankungen hervorzurufen (Natarajan et al. 2013).

Eine Assoziation der Ribotypen 027 und 078 mit epidemischen Ausbrüchen, einer erhöhten Rezidivrate und schwer verlaufenden Infektionen konnte in einigen Studien gezeigt werden (Barbut et al. 2007; McDonald et al. 2005; Loo et al. 2015; Abou Chakra et al. 2014). Aus diesem Grunde werden diese Ribotypen auch als hypervirulent bezeichnet. Eine erhöhte Toxinproduktion dient als eine Erklärung für die postulierte erhöhte Stammpathogenität (Carlson et al. 2013; Warny et al. 2005). Merrigan *et al.* verglichen 2010 im Gegenzug vier Ribotyp 027-Stämme mit vier nicht hypervirulenten Isolaten (Laborstamm 630, Ribotyp 001, Ribotyp 008 und *C. difficile*-Stamm K14). Sie beschreiben dabei zwar erhöhte Sporulationsraten, aber keine signifikant erhöhte Toxinproduktion der Ribotyp 027-Isolate. Als mögliche Erklärung wird eine Variabilität der Toxinproduktion unterschiedlicher Isolate eines gleichen Ribotyps angegeben.

Auch die Assoziation zwischen Stammzugehörigkeit und Symptomschwere wird seit den letzten Jahren vermehrt kritisch diskutiert. Demgemäß sprechen manche Autoren dem Ribotyp 027 keine erhöhte Pathogenität zu (Walk et al. 2012; Cloud et al. 2009).

Åkerlund *et al.* konnten im Jahr 2006 so auch bei der epidemiologischen Analyse von 164 Isolaten keine Assoziation zwischen Schwere der CDI und dem die Krankheit verursachenden *C. difficile*-Ribotyp ermitteln. Auch in dieser Studie weisen die Autoren darauf hin, dass bei unterschiedlichen Isolaten eines Ribotyps deutlich unterschiedliche Toxinmengen gemessen wurden. Dies sei dadurch erklärbar, dass unterschiedliche Stämme bzw. Subtypen innerhalb eines identischen Ribotyps existieren. Zudem beobachteten sie ein antiproportionales Verhalten von Sporulation und Toxinproduktion während der stationären Wachstumsphase.

Der Ribotyp 078 korreliert mit schweren klinischen Verläufen und ist somit ebenfalls als hypervirulent anzusehen (Goorhuis *et al.* 2008b). Da das Genom des bei unserem Patienten nachgewiesenen Ribotyp 126 zu 99,7 % dem Genom des Ribotyp 078 (Kurka *et al.* 2014) entspricht, ist auch bei den entsprechenden Isolaten eine Hypervirulenz zu erwarten. In der Tat führte die Infektion mit den klinischen Isolaten 1 und 2 des Ribotyps 126 zu besonders schwer verlaufenden CDIs. Wie die Toxinotypisierung der beiden klinischen Isolate zeigt, exprimiert dieser Ribotyp - wie auch die Ribotypen 078 und 027 - das binäre Toxin.

Der Ribotyp 078 ist in Deutschland weit verbreitet und seine Inzidenz steigt auch europaweit an (Goorhuis *et al.* 2008b; Freeman *et al.* 2010; Rupnik *et al.* 2009). Besonders erwähnenswert ist zudem, dass er einen bedeutenden Anteil der *C. difficile*-Infektionen bei Tieren (wie Kälbern und Schweinen) ausmacht (Goorhuis *et al.* 2008a; Hensgens *et al.* 2012) und daher möglicherweise über den zoonotischen Infektionsweg auf Menschen übertragen werden könnte (Rupnik 2007; Hensgens *et al.* 2012; Tsai *et al.* 2016).

Die im untersuchten Fall sehr schwer verlaufende initiale CDI erfolgte durch einen *C. difficile*-Stamm des Ribotyps 126. Dieser Ribotyp unterscheidet sich genetisch deutlich von den anderen hier untersuchten klinischen Isolaten. Dies ergibt sich durch die Zuordnung der Ribotypen 078, 126 und 033 in einen genetisch abgegrenzten Cluster (Kurka *et al.* 2014) und konnte durch den genetischen Abgleich der Isolate 1 – 10 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MHH validiert werden (Sachsenheimer *et al.* 2018).

Bei dem untersuchten Patienten wurden Mischinfektionen in zwei Fällen beobachtet: Isolate 7, 8 und 9 einerseits sowie Isolate 11 und 12 andererseits wurden aus je einer Stuhlprobe isoliert. Einen ersten Hinweis für Mischinfektionen lieferte eine unterschiedliche Kolonimorphologie. Die Bestätigung erfolgte dann u. a. mittels Ribotypisierung und Genomsequenzierung (Sachsenheimer *et al.* 2018). Die Koexistenz von verschiedenen Stämmen bei

CDIs (sogenannte Mischinfektion) wird mit einem Anteil von 7 % - 16 % der Gesamtinfektionen angegeben (Eyre et al. 2012; Wroblewski et al. 2009; Behroozian et al. 2013; van den Berg et al. 2005). Mit aktuell gängigen Diagnosemethoden, welche auf Antigentesten und Toxintesten basieren (Tenover et al. 2011), sind Mischinfektionen nicht zu erkennen, da sie nicht zwischen verschiedenen Stämmen unterscheiden können. Für den Nachweis von Mischinfektionen wären beispielweise MLST und Ribotypisierung geeignet, die jedoch zu aufwendig für die routinemäßige mikrobiologische Diagnostik sind.

4.2.1 *Clostridium difficile*-Stämme des Toxinotyps XI

Die hier untersuchten Isolate 10 – 13 sind einem bisher unbekanntem und nicht epidemischen Ribotypen zuzuordnen. Diese Stämme verursachten keine bis wenige Symptome. Die durchgeführte Toxinotypisierung ergab dabei ein Muster entsprechend dem Toxinotyp XI, zu dem beispielsweise auch der Ribotyp 033 gehört.

Stämme des *C. difficile* Toxinotyp XI verfügen über einen nur inkomplett vorhandenen, nicht funktionalen Pathogenitätslocus, so dass sie zwar das binäre Toxin CDT exprimieren (Geric et al. 2003), aber Toxin A/B-negativ sind (Geric Stare und Rupnik 2010). In Zusammenarbeit mit Dr. I. Yang und Prof. S. Suerbaum (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MHH) konnte kohärent gezeigt werden, dass dieser bisher unbekanntem Ribotyp dem Toxinotyp XI entspricht (Sachsenheimer et al. 2018).

Die Pathogenität der Toxinotyp XI-Isolate und insbesondere die Rolle des binären Toxins als Virulenzfaktor werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Eckert et al. 2014). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass das binäre Toxin eine deutlich stärkere Adhärenz von *C. difficile* im Darm zu vermitteln scheint (Schwan et al. 2009). Weiterhin konnten Kuehne et al. (2014) die Infektiosität von TcdA-/TcdB-/CDT+ -Stämmen im Hamstermodell demonstrieren (3/9 Hamster verstarben). Allerdings führten diese dabei zu eher untypischen Manifestationen, wie z. B. hämorrhagischen Arealen innerhalb des Dünndarms. Diesen Ergebnissen widersprechend, konnten Geric et al. (2006) keine Kolitis durch Toxinotyp-XI-Stämme im Hamstermodell feststellen. Bei ihren Versuchen zeigte sich, dass es nur zu einer Kolonisation, nicht aber zu einer Infektion kam. Eine Erklärung hierfür könnte in der Verwendung unterschiedlicher bakterieller Stämme liegen. Kuehne et al. (2014) arbeiteten mit Toxinmutanten, während Geric et al. (2006) epidemische Toxinotyp-XI-Stämme untersuchten.

Die Prävalenz des für den Toxinotyp XI repräsentativen Ribotyps 033 scheint sehr gering zu sein. So konnten Geric *et al.* (2003) nur bei 2 % (8/402) der getesteten Stämme diesen Toxinotyp nachweisen. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, dass in der diagnostischen Routine in der Regel nur das Vorhandensein der Toxine A und B, nicht aber des binären Toxins getestet wird (Tenover *et al.* 2011). Es gibt jedoch auch moderne PCR-basierte Methoden (Burnham und Carroll 2013) und seit Anfang des Jahres 2018 einen kommerziellen Schnelltest (McGovern *et al.* 2018), die das Vorhandensein des binären Toxins testen können. Diese Methoden kamen bis jetzt jedoch nicht regelhaft zum Einsatz, weshalb der Toxinotyp XI vermutlich oft unentdeckt blieb.

Die zukünftige epidemiologische Untersuchung der Prävalenz und klinischen Bedeutung von Stämmen des Toxinotyps XI kann folglich zur Erforschung der Pathogenitätsrolle des binären Toxins beitragen.

4.2.2 Mikroevolution bei wiederkehrenden *Clostridium difficile*-Infektionen?

Bei der PCR-Ribotypisierung werden konservierte Bereiche der 16S und 23S rRNA als Primerbindungsstellen genutzt, um variable PCR Produkte zu amplifizieren. Diese dienen als „Fingerabdruck“ der verschiedenen Ribotypen. Allerdings kann mit diesem Verfahren nicht ermittelt werden, ob Einzelnukleotidpolymorphismen oder Mutationen zwischen Isolaten eines Ribotyps vorhanden sind (Knight *et al.* 2015). Es wäre weiterhin denkbar, dass *relapses* mit mutierten *C. difficile*-Isolaten fälschlicherweise als Reinfektionen gedeutet werden, wenn durch die Mutationen ein neues Bandenmuster entstanden wäre.

In Zusammenarbeit mit Dr. I. Yang und Prof. S. Suerbaum konnte jedoch durch Sequenzierung der ersten zehn Isolate ermittelt werden, dass zwischen Stämmen unterschiedlicher Ribotypen (Reinfektionen) keine Mikroevolution stattfindet. Gleichwohl ergeben sich Hinweise auf eine geringfügige Mikroevolution zwischen den hier untersuchten Isolaten gleicher Ribotypen (*relapses*) (Sachsenheimer *et al.* 2018).

4.3 Phänotypische Variabilität der klinischen *Clostridium difficile*-Isolate

Die untersuchten klinischen Isolate weisen eine deutliche phänotypische Variabilität auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass weltweit eine große Anzahl von genetisch diversen *C. difficile*-Stämmen zu CDIs führen können (Knight *et al.* 2015; Barbut *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2014). In einer europäischen multizentrischen Studie mit 411 inkludierten *C. difficile*-

Isolaten wurden 66 verschiedene Ribotypen erfasst (Barbut et al. 2007). Diese Diversität der Ribotypen ist nicht nur auf unterschiedliche geographische Regionen beschränkt, sondern kann - wie in dem hier vorliegenden Fall – auch innerhalb eines einzelnen Patienten beobachtet werden. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass diese phäno- und genotypische Vielfalt einen Selektionsvorteil für das Bakterium darstellen könnte.

Barbut *et al.* (2007) beschreiben, dass eine Assoziation schwerer Krankheitsverläufe mit Stämmen des Ribotyps 027 besteht. Carlson *et al.* (2013) vergleichen hingegen 106 *C. difficile*-Isolate im Hinblick auf ihre Sporulation, ihr Wachstumsverhalten und ihre Toxinproduktion. Sie beobachteten, dass in erster Linie eine erhöhte Sporenproduktion und nicht die Zugehörigkeit zu einem Ribotyp mit klinisch schweren Verläufen assoziiert zu sein scheint und daher eine Phänotypisierung der Ribotypisierung als Prognosefaktor überlegen sei.

Barbut *et al.* (2007) verglichen neben Ribotypen auch Antibiotikaresistenzen, Toxinotypen und zugehörige Patientendaten. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen waren alle Isolate empfindlich gegenüber Metronidazol und Vancomycin, während bei manchen Isolaten eine Resistenz gegen Erythromycin und Moxifloxacin vorlag.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine deutliche Variabilität der Isolate hinsichtlich ihrer Motilität und ihres Schwimmverhaltens, wobei keine Korrelation zwischen Motilität und Schweregrad der CDI festgestellt wird. Flagellen tragen einerseits wesentlich zur Motilität von Bakterien bei, andererseits können sie auch an Adhärenz, Biofilmformation, Transport von Virulenzfaktoren entlang der Zellmembran und Immunmodulation des Wirtes beteiligt sein (Stevenson et al. 2015). So liegt die Vermutung nahe, dass auch bei *C. difficile* Flagellen eine Virulenzfunktion zukommt. Die Bedeutung von Flagellen für die Pathogenität von *C. difficile* ist jedoch umstritten und scheint stammabhängig variabel zu sein (Awad et al. 2014). So können - übereinstimmend mit Stämmen des Ribotyps 126 in unseren Ergebnissen - auch einige nicht motile Stämme schwer verlaufende CDIs auslösen.

Als weiteres Beispiel seien Stämme des hypervirulenten *C. difficile*-Ribotyps 078 genannt, die ebenfalls nicht motil sind. Dieser im Vergleich zu vielen *C. difficile*-Stämmen genetisch divergente Ribotyp (Kurka et al. 2014; Zhou et al. 2014) verfügt nicht über das sogenannte F3-Regulon. Auf diesem Regulon liegen früh exprimierte Flagellenbildungsgene, wie *fliA* (auch als *sigD* bezeichnet). Das Fehlen dieses Regulons führt daher zu einem nicht motilen, unflagellierten Phänotyp (Stevenson et al. 2015; Stabler et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte via Motilitäts- und Swimmingassays gezeigt werden, dass neben Stämmen

des Ribotyps 078, auch Isolate des Ribotyps 126 und des neuen, nicht epidemischen Ribotyps nicht motil sind. In Zusammenarbeit mit Dr. I. Yang und Prof. S. Suerbaum konnte nachgewiesen werden, dass die genannten drei Ribotypen nicht über das *fliA*-Gen verfügen (Sachsenheimer et al. 2018).

Weiterhin nehmen Motilität und Flagellen auch Einfluss auf Adhärenz (Baban et al. 2013) und Toxinproduktion in *C. difficile* (Aubry et al. 2012; Meouche et al. 2013). Das Gen *fliA* und sein Produkt scheinen dabei in der Expression von PaLoc-Genen involviert zu sein, denn die *fliA*-Mutanten des *C. difficile*-Stamms 630 Δ erm (eine Erythromycin-sensitive Variante des Laborstamms 630) produzieren weniger TcdA, TcdB und TcdR (Meouche et al. 2013). Aubry et al. (2012) ermittelten analog zu den Ergebnissen von Meouche et al. (2013) eine verminderte Toxinproduktion bei Deletionsmutanten anderer Flagellengene (*fliM*, *fliF*, *fliG*, und *flhB* - *fliR*). Im Gegensatz dazu konnten sie jedoch auch beobachten, dass eine Deletion von *fliC* zu einer verstärkten Toxinproduktion führt (Aubry et al. 2012). Bei *fliC* handelt es sich um ein für die Flagellenproduktion wichtiges Flagellinbildungsgen (Tasteyre et al. 2000).

Als zusätzliche auffällige Phänotypen der Ribotypen 126 und 078 werden in dieser Arbeit ein verstärktes Absinkverhalten in Flüssigkulturen und eine verstärkte Adhärenz in entsprechenden Testverfahren identifiziert. Die Bedeutung von Flagellen als Adhärenzfaktor wird in der Literatur uneinheitlich bewertet. Tasteyre et al. (2001) fanden Hinweise dafür, dass Flagellen Adhärenz vermitteln können. Dingle et al. (2011) hingegen stellten mit der sogenannten ClosTron-Technologie *fliD*- und *fliC*-Mutanten her, welche trotz fehlender Flagellenexpression in Zellkulturen stärker adhärten. Diese Mutanten zeigten weiterhin eine höhere Toxizität *in vivo* (Hamstermodell) und *in vitro* (Caco-2 Zellen). Studien von Baban et al. (2013) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass der Einfluss von Flagellen auf die Adhärenz stammabhängig zu sein scheint. Auch wir können diese Stammabhängigkeit konstatieren.

Lipovsek et al. (2013) konnten keine deutlichen Unterschiede der Kolonie-Ultrastruktur verschiedener Ribotypen von *C. difficile* feststellen. Sie beobachteten jedoch elongierte Zellen am Rand der Kolonien und beschreiben diese als „invasiv in den Agar penetrierend“ (submers wachsend). In unsere rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden auch die Isolate der Ribotypen 015, 014 und 126 mit einbezogen, wobei der zu Ribotyp 126 homologe Ribotyp 078 auch von Lipovsek et al. (2013) erfasst wird. In Übereinstimmung mit den bereits publizierten Beobachtungen können – bis auf das Isolat 1 – auch zwischen den

hier analysierten klinischen Isolaten 1, 3, 4, den Referenzribotypen 126 und 015 sowie dem Laborstamm R20291 keine Unterschiede der Kolonien in Bezug auf Zellteilung und Zelltrennung beobachtet werden. Sowohl die rasterelektronenmikroskopische Analyse als auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des klinischen Isolats 1 zeigen unabhängig von der Lokalisation innerhalb der Kolonie elongierte Zellen. Nach unserem Kenntnisstand wird in unseren Untersuchungen somit erstmalig eine Zelllängendifferenz zwischen unterschiedlichen Ribotypen erfasst.

Eine mögliche Ursache dieses aberranten Teilungsverhalten könnte in Varianten der *mldA*-, *mldB*- und *mldC*-Gene begründet sein. Diese Gene beschreiben Ransom *et al.* (2014) als nahezu *C. difficile*-spezifische Zelldivisionsproteine. Aus diesem Grund erfolgten weitergehende genetische Analysen in Zusammenarbeit mit Dr. I. Yang und Prof. S. Suerbaum. Der Vergleich der *mld*-Gene der klinischen Isolate 1 – 10 ergibt Unterschiede zwischen den Isolaten verschiedener genetischer Cluster (MLS-Typen) (Isolat 11 – 13 wurden nicht in dieser Studie inkludiert). Interessanterweise kann auch ein Unterschied einer Aminosäure zwischen den kettenbildenden Isolaten 1 und 2 und dem nicht kettenbildenden Isolat 10 festgestellt werden. Diese drei Isolate befinden sich in der gleichen MLS-Gruppe (Sachsenheimer *et al.* 2018).

Weiterhin scheint eher eine Korrelation zwischen der Zelllänge und dem Absinkverhalten als zwischen der Motilität und dem Sedimentieren der Isolate des Ribotyps 126 bzw. 078 vorzuliegen. Diese Vermutung wird auch dadurch verstärkt, dass die anderen ebenfalls nicht-motilen klinischen Isolate 10 – 13 kein verstärktes Absinkverhalten zeigen. Somit scheint die Motilität nicht der ausschlaggebende Faktor für diesen Phänotyp zu sein. Eine mögliche Erklärung des verstärkten Absinkverhaltens des kettenbildenden Isolats könnte hingegen in einem geringeren Verhältnis von Oberfläche zu Gesamtvolumen der Bakterien bestehen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass in zukünftigen phänotypisch-epidemiologischen Studien auch Motilität und Zelllängen von *C. difficile*-Isolaten eingeschlossen werden sollten.

4.3.1 Sporulationsverhalten von unterschiedlichen *Clostridium difficile*-Stämmen

Die durchgeführten Sporulationsassays und die RNA-Hybridisierung des Masterregulators *spo0A* geben Hinweise auf eine verspätete Sporulation der klinischen Isolate 1 und 2 des Ribotyps 126. Der Masterregulator der Sporulation in *C. difficile* Spo0A aktiviert dabei die Kaskade von vier Sporulations-spezifischen RNA-Polymerasen, namentlich die Sigmafak-

toren σ^F , σ^E , σ^G und σ^K . Diese regulieren wiederum mehr als 200 Gene der Sporenbildung (Pereira et al. 2013; Fimlaid et al. 2013). Spo0A scheint zudem auch weitere mögliche Virulenzeigenschaften, wie die Toxinproduktion, zu beeinflussen (Mackin et al. 2013). Deakin *et al.* (2012) konnten eine höhere Toxinkonzentrationen von *spo0A*-Mutanten des Laborstamms R20291 im Vergleich zum Ursprungstamm nachweisen. Dadurch könnte der Masterregulator indirekt in Zusammenhang mit schwer verlaufenden CDIs stehen. Kohärent mit dieser Vermutung deuten unsere Untersuchungen auf eine verspätete Sporulation der klinischen Isolate 1 und 2, welche zu besonders schweren Symptomen führten, hin. Möglicherweise könnte die verspätete Sporulation dieser beiden Isolate auch mit einer erhöhten Toxinproduktion einhergehen. Die Ergebnisse von Carlson *et al.* (2013) stehen dazu jedoch in Widerspruch. Sie beobachteten ausgeprägtere Symptome bei erhöhten Sporulationsraten. Eine mögliche Erklärung für diese uneinheitliche Datenlage könnte ein stammabhängiger Einfluss von Spo0A auf die Toxinproduktion sein, welcher auch von Mackin *et al.* (2013) konstatiert wird.

5 Zusammenfassung

Das grampositive toxinproduzierende Bakterium *Clostridium difficile* ist der hauptsächliche Verursacher der sogenannten Antibiotika-assoziierten Diarrhoe und verursacht gastrointestinale Beschwerden von milder bis fulminanter Symptomatik.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine zunehmende Inzidenz und Mortalität bei nosokomial- wie ambulant erworbenen *C. difficile*-Infektionen verzeichnet. Besonders problematisch ist zudem die Rezidivneigung der Erkrankung, die in Zusammenhang mit einer ausgeprägten Dysbalance des Mikrobioms steht.

Dreizehn *C. difficile*-Isolate, welche aus rezidivierenden Infektionen eines einzelnen Patienten stammten, wurden im Rahmen dieser Arbeit über einen Erkrankungsverlauf von fünfzehn Monaten isoliert und bezüglich ihrer Morphologie, ihres Phäno- und Genotyps vergleichend analysiert. Bei dem Patienten handelte es sich um einen 73-jährigen multimorbiden Mann, der unter anderem an einer Niereninsuffizienz im Endstadium und einer chronisch myeloproliferativen Erkrankung litt. Eine derart große Anzahl aufeinander folgender Isolate eines einzelnen Patienten wurde bisher nicht publiziert.

Eine Ribotypisierung der Stämme ergab eine Anzahl von sechs verschiedenen Ribotypen. Die am Ende des Krankheitsverlaufs isolierten vier Stämme gehören zu einem seltenen Toxin A/B-negativen, CDT-positiven, bisher noch nicht klassifizierten Ribotyp. In Kolonimorphologie, Motilität, Wachstumsverhalten, Sporulation und Zelllänge unterscheiden sich die Stämme phänotypisch zum Teil deutlich voneinander. Durch Motilitätsversuche konnte gezeigt werden, dass sechs Isolate nicht beweglich sind. Fluoreszenzmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Isolate des Ribotyps 126 einen elongierten, kettenbildenden Phänotyp haben. In Flüssigkulturen weisen diese Stämme zudem ein deutliches Absinkverhalten in der stationären Wachstumsphase auf.

Die wiederkehrenden *C. difficile*-Infektionen beruhten in diesem Fall auf einer Mischung von Rezidiven mit Befall des gleichen Stamms und Neuinfektionen.

Die gewonnenen Daten heben die Bedeutung der Analyse der phänotypischen Stammdiversität von *C. difficile*-Isolaten hervor und tragen zum Verständnis von rezidivierenden *C. difficile*-Infektionen bei.

6 Anhang

6.1 Vergleichende Literaturrecherche zu *Clostridium difficile*-Rezidiven

6.1.1 Rezidivraten

Tabelle 18: CDI-Rezidivraten		
Anzahl der CDI-Rezidive	Sheitoyan-Pesant <i>et al.</i> (2015)	Lübbert <i>et al.</i> (2016)
	Rezidivraten bezogen auf das vorherige Ereignis (absolute Zahlen in Klammern)	
1. Rezidiv	25 % (354/1418)	18,2 % (222/1223)
2. Rezidiv	38 % (128/334)	28,4 % (63/222)
3. Rezidiv	29 % (35/121)	30,2 % (19/63)
≥ 4. Rezidive	27 % (9/33)	nicht erfasst

6.1.2 Reinfektionsraten

Tabelle 19: Vergleich der Reinfektionsraten in der Literatur	
Autoren	Reinfektionsraten (absolute Zahlen in Klammern)
Barbut <i>et al.</i> (2000)	48,4 % (45/93)
Eyre <i>et al.</i> (2012)	16 % (88/560)
Oka <i>et al.</i> (2012)	20 % (4/20)
Sim <i>et al.</i> (2017)	15,8 % (3/19)
Tang-Feldman <i>et al.</i> (2003)	33,3 % (6/18)

6.2 *In silico*-Analyse

Tabelle 20: *In silico* Analyse

<i>URL/ Programm</i>	<i>Anbieter</i>	<i>Anwendung</i>
http://genolist.pasteur.fr/	Institut Pasteur, Paris, Frankreich	Recherchen zum Genom von <i>C. difficile</i> und <i>B. subtilis</i>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA	Literaturrecherche
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA	Vergleich von DNA-Sequenzen mit der Datenbank der National Library of Medicine
Mikroskopie Programm: AxioVision Version 4.7.2	Zeiss, Göttingen	Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Ermittlung der Zelllängen verschiedener <i>C. difficile</i> Isolate

7 Literaturverzeichnis

- Abou Chakra CN, Pepin J, Sirard S, Valiquette L (2014): Risk factors for recurrence, complications and mortality in *Clostridium difficile* infection: A systematic review. PLoS One 9, e107420
- Åkerlund T, Persson I, Unemo M, Norén T, Svenungsson B, Wullt M, Burman LG (2008): Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. J Clin Microbiol 46, 1530–1533
- Aronsson B, Möllby R, Nord CE (1985): Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: epidemiological data from Sweden, 1980-1982. J Infect Dis 151, 476–481
- Arvand M, Vollandt D, Bettge-Weller G, Harmanus C, Kuijper EJ, Clostridium difficile study group Hesse (2014): Increased incidence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Hesse, Germany, 2011 to 2013. Euro Surveill 19, pii: 20732
- Aubry A, Hussack G, Chen W, KuoLee R, Twine SM, Fulton KM, Foote S, Carrillo CD, Tanha J, Logan SM (2012): Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*. Infect Immun 80, 3521–3532
- Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D (2014): *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes 5, 579–593
- Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A, Minton NP (2013): The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. PLoS One 8, e73026
- Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KEP (2011): Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. Emerg Infect Dis 17, 976–982
- Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit J-C (2000): Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 38, 2386–2388
- Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I (2007): Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 13, 1048–1057
- Bauer MP, Notermans DW, Benthem BH van, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, Dissel JT van, Kuijper EJ (2011): *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 377, 63–73
- Behroozian AA, Chludzinski JP, Lo ES, Ewing SA, Waslawski S, Newton DW, Young VB, Aronoff DM, Walk ST (2013): Detection of mixed populations of *Clostridium difficile* from symptomatic patients using capillary-based polymerase chain reaction ribotyping. Infect Control Hosp Epidemiol 34, 961–966

- Borriello SP (1998): Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 41, 13–19
- Boseiwaqa LV, Foster NF, Thean SK, Squire MM, Riley TV, Carson KC (2013): Comparison of ChromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar for the recovery of *Clostridium difficile*. *Pathology* 45, 495–500
- Britton RA, Young VB (2014): Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* 146, 1547–1553
- Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, No D, Liu H, Kinnebrew M, Viale A, et al. (2015): Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205–208
- Burnham C-AD, Carroll KC (2013): Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clin Microbiol Rev* 26, 604–630
- Burns DA, Minton NP (2011): Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *J Microbiol Methods* 87, 133–138
- Carlson PE, Walk ST, Bourgis AET, Liu MW, Kopliku F, Lo E, Young VB, Aronoff DM, Hanna PC (2013): The relationship between phenotype, ribotype, and clinical disease in human *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe* 24, 109–116
- Carroll KC, Bartlett JG (2011): Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol* 65, 501–521
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005): Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk: four states, 2005. *Morb Mortal Wkly Rep* 54, 1201–1205
- Chai Y, Norman T, Kolter R, Losick R (2010): An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 24, 754–765
- Chalmers JD, Akram AR, Singanayagam A, Wilcox MH, Hill AT (2016): Risk factors for *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *J Infect* 73, 45–53
- Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN (1992): Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis* 166, 561–567
- Cloud J, Noddin L, Pressman A, Hu M, Kelly C (2009): *Clostridium difficile* strain NAP-1 is not associated with severe disease in a nonepidemic setting. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7, 868–873.e2
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of America, Infectious Diseases Society of America (2010): 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* 31, 431–455

- Crook DW, Walker AS, Kean Y, Weiss K, Cornely OA, Miller MA, Esposito R, Louie TJ, Stoesser NE, Young BC, et al. (2012): Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: meta-analysis of pivotal randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 55, S93–S103
- Cunney RJ, Magee C, McNamara E, Smyth EG, Walshe J (1998): *Clostridium difficile* colitis associated with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 13, 2842–2846
- Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL (2002): Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg* 235, 363–372
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, et al. (2014): Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, et al. (2014): Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EU-CLID). *Lancet Infect Dis* 14, 1208–1219
- de Hoon MJ, Eichenberger P, Vitkup D (2010): Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol* 20, R735–R745
- DePestel DD, Aronoff DM (2013): Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract* 26, 464–475
- Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD (2011): Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar Proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun* 79, 4061–4067
- Dubberke ER, Olsen MA (2012): Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clin Infect Dis* 55, S88–S92
- Dubberke ER, Reske KA, Olsen MA, McMullen KM, Mayfield JL, McDonald LC, Fraser VJ (2007): Evaluation of *Clostridium difficile*-associated disease pressure as a risk factor for *C. difficile*-associated disease. *Arch Intern Med* 167, 1092–1097
- Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, Berger P, Petit A, De Chevigny A, Jean-Pierre H, et al. (2014): Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect* 3, 12–17
- Eddi R, Malik MN, Shakov R, Baddoura WJ, Chandran C, Debari VA (2010): Chronic kidney disease as a risk factor for *Clostridium difficile* infection. *Nephrology* 15, 471–475
- Epidemiologisches Bulletin (2013): Aktuelles zur Epidemiologie von *Clostridium difficile*. *Epidemiol Bull* 26, 241–244
- Epidemiologisches Bulletin (2014): Schwer verlaufende Clostridium-difficile-Infektionen: IfSG Surveillancedaten von 2013. *Epidemiol Bull* 27, 233–237

- Eyre DW, Walker AS, Griffiths D, Wilcox MH, Wyllie DH, Dingle KE, Crook DW, Peto TEA (2012): *Clostridium difficile* mixed infection and reinfection. *J Clin Microbiol* 50, 142–144
- Eyre DW, Cule ML, Griffiths D, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, Wilson DJ (2013a): Detection of mixed infection from bacterial whole genome sequence data allows assessment of its Role in *Clostridium difficile* transmission. *PLoS Comput Biol* 9, e1003059
- Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip CLC, Golubchik T, Batty EM, Finney JM, et al. (2013b): Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 369
- Eyre DW, Babakhani F, Griffiths D, Seddon J, Del Ojo Elias C, Gorbach SL, Peto TEA, Crook DW, Walker AS (2014): Whole-genome sequencing demonstrates that Fidaxomicin is superior to Vancomycin for preventing reinfection and relapse of infection with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 209, 1446–1451
- Fellmeth G, Yarlagadda S, Iyer S (2010): Epidemiology of community-onset *Clostridium difficile* infection in a community in the south of England. *J Infect Public Health* 3, 118–123
- Fimlaid KA, Bond JP, Schutz KC, Putnam EE, Leung JM, Lawley TD, Shen A (2013): Global analysis of the sporulation pathway of *Clostridium difficile*. *PLOS Genet* 9, e1003660
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH (2010): The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev* 23, 529–549
- Galdys AL, Nelson JS, Shutt KA, Schlackman JL, Pakstis DL, Pasculle AW, Marsh JW, Harrison LH, Curry SR (2014): Prevalence and duration of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage among healthy subjects in Pittsburgh, Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 52, 2406–2409
- George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM (1979): Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 9, 214–219
- Gerding DN (2004): Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. *Clin Infect Dis* 38, 646–648
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014): *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes* 5, 15–27
- Geric B, Johnson S, Gerding DN, Grabnar M, Rupnik M (2003): Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large Clostridial toxins. *J Clin Microbiol* 41, 5227–5232
- Geric B, Carman RJ, Rupnik M, Genheimer CW, Sambol SP, Lyerly DM, Gerding DN, Johnson S (2006): Binary toxin-producing, large Clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis* 193, 1143–1150

- Geric Stare B, Rupnik M (2010): *Clostridium difficile* toxinotype XI (A-B-) exhibits unique arrangement of PaLoc and its upstream region. *Anaerobe* 16, 393–395
- Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LAMG, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Kuijper EJ (2008a): *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J Clin Microbiol* 46, 1157–1158
- Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ (2008b): Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 47, 1162–1170
- Gupta A, Khanna S (2014): Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infect Drug Resist* 7, 63–72
- Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, de Boer E, Lipman LJA, Kuijper EJ (2012): *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect* 18, 635–645
- Higgins D, Dworkin J (2012): Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* 36, 131–148
- Howell MD, Novack V, Grgurich P, Soulliard D, Novack L, Pencina M, Talmor D (2010): Iatrogenic gastric acid suppression and the risk of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 170, 784–790
- Howerton A, Ramirez N, Abel-Santos E (2011): Mapping interactions between germinants and *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol* 193, 274–282
- Indra A, Schmid D, Huhulescu S, Hell M, Gattringer R, Hasenberger P, Fiedler A, We-walka G, Allerberger F (2008): Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006–2007. *J Med Microbiol* 57, 702–708
- Inns T, Gorton R, Berrington A, Sails A, Lamagni T, Collins J, Perry J, Hill K, Magee J, Gould K (2013): Effect of ribotype on all-cause mortality following *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 84, 235–241
- Johnson S, Adelman A, Clabots CR, Peterson LR, Gerding DN (1989): Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. *J Infect Dis* 159, 340–343
- Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H, Saikai T, Kobayashi K, Yamagishi T, Nakamura S (2001): Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 50, 720–727
- Keddis MT, Khanna S, Noheria A, Baddour LM, Pardi DS, Qian Q (2012): *Clostridium difficile* infection in patients with chronic kidney disease. *Mayo Clin Proc* 87, 1046–1053
- Kern W (2010): Was gibt es Neues in den neuen Leitlinien zur *Clostridium difficile*-Infektion? *Krankenhaushygiene Update* 5, 213–222

- Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St. Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR (2012): The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 107, 89–95
- Knight DR, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV (2015): Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Rev* 28, 721–741
- Koenigsnecht MJ, Theriot CM, Bergin IL, Schumacher CA, Schloss PD, Young VB (2015): Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun* 83, 934–941
- Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP (2014): Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis* 209, 83–86
- Kuntz JL, Chrischilles EA, Pendergast JF, Herwaldt LA, Polgreen PM (2011): Incidence of and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: a nested case-control study. *BMC Infect Dis* 11, 194
- Kurka H, Ehrenreich A, Ludwig W, Monot M, Rupnik M, Barbut F, Indra A, Dupuy B, Liebl W (2014): Sequence similarity of *Clostridium difficile* strains by analysis of conserved genes and genome content is reflected by their ribotype affiliation. *PLoS One* 9, e86535
- Larson HE, Barclay FE, Honour P, Hill ID (1982): Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J Infect Dis* 146, 727–733
- Lessa FC, Gould CV, McDonald LC (2012): Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clin Infect Dis* 55, S65–S70
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, et al. (2015): Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med* 372, 825–834
- Linsky A, Gupta K, Lawler EV, Fonda JR, Hermos JA (2010): Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 170, 772–778
- Lipovsek S, Leitinger G, Rupnik M (2013): Ultrastructure of *Clostridium difficile* colonies. *Anaerobe* 24, 66–70
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault A-M, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, et al. (2005): A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353, 2442–2449
- Lübbert C, John E, von Müller L (2014): *Clostridium Difficile* infection. *Dtsch Arztebl Int* 111, 723–731
- Lübbert C, Zimmermann L, Borchert J, Hörner B, Mutters R, Rodloff AC (2016): Epidemiology and recurrence rates of *Clostridium difficile* infections in Germany: a secondary data analysis. *Infect Dis Ther* 5, 545–554

- Mackin KE, Carter GP, Howarth P, Rood JI, Lyras D (2013): Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. PLoS One 8, e79666
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, et al. (2014): Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med 370, 1198–1208
- Maroo S, Lamont JT (2006): Recurrent *Clostridium difficile*. Gastroenterology 130, 1311–1316
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2005): An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353, 2433–2441
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE (1989): Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 320, 204–210
- McGovern AM, Androga GO, Moono P, Collins DA, Foster NF, Chang BJ, Riley TV (2018): Evaluation of the Cepheid® Xpert® *C. difficile* binary toxin (BT) diagnostic assay. Anaerobe 51, 12–16
- Meouche IE, Peltier J, Monot M, Soutourina O, Pestel-Caron M, Dupuy B, Pons J-L (2013): Characterization of the SigD regulon of *C. difficile* and its positive control of toxin production through the regulation of *tcdR*. PLoS One 8, e83748
- Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S, Gerding DN, Vedantam G (2010): Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. J Bacteriol 192, 4904–4911
- Naggie S, Miller BA, Zuzak KB, Pence BW, Mayo AJ, Nicholson BP, Kutty PK, McDonald LC, Woods CW (2011): A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection: no role for proton pump inhibitors. Am J Med 124, 276.e1-7
- Natarajan M, Walk ST, Young VB, Aronoff DM (2013): A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. Anaerobe 22, 1–5
- Ofofu A (2016): *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. Ann Gastroenterol 29, 147–154
- Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, Takahashi M, Tanaka M, Taguchi H, Watanabe T, et al. (2012): Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. J Clin Microbiol 50, 915–921
- Ozaki E, Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Matsumoto K, Takada T, Nomoto K, Tanaka R, Nakamura S (2004): *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. J Med Microbiol 53, 167–172

- Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET (2005): A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol* 3, 969–978
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014): *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 22, 406–416
- Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, Martin-Verstraete I, Dupuy B, Henriques AO (2013): The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genetics* 9, e1003782
- Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR (1997): Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 65, 1402–1407
- Ransom EM, Williams KB, Weiss DS, Ellermeier CD (2014): Identification and characterization of a gene cluster required for proper rod shape, cell division, and pathogenesis in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 196, 2290–2300
- Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L (2007): Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999–2004. *Emerg Infect Dis* 13, 1417–1419
- Reil M, Erhard M, Kuijper EJ, Kist M, Zaiss H, Witte W, Gruber H, Borgmann S (2011): Recognition of *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30, 1431–1436
- Rodriguez-Palacios A, Borgmann S, Kline TR, LeJeune JT (2013): *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Anim Health Res Rev* 14, 11–29
- Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, D’Haens GR, de Vos WM, Zoetendal EG, Ponsioen CY (2015): Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: a systematic review. *World J Gastroenterol* 21, 5359–5371
- Rupnik M (2007): Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clin Microbiol Infect* 13, 457–459
- Rupnik M, Janezic S (2016): An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. *J Clin Microbiol* 54, 13–18
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009): *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7, 526–536
- Sachsenheimer FE, Yang I, Zimmermann O, Wrede C, Müller LV, Gunka K, Groß U, Suerbaum S (2018): Genomic and phenotypic diversity of *Clostridium difficile* during long-term sequential recurrences of infection. *Int J Med Microbiol* 3, 364–377
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463–5467

- Schneider T, Eckmanns T, Ignatius R, Weist K, Liesenfeld O (2007): Clostridium-difficile-assoziierte Diarrhö: Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger. Dtsch Arztebl 104, A1588-1594
- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K (2009): *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog 5, e1000626
- Sheitoyan-Pesant C, Abou Chakra, Pépin J, Marcil-Héguy A, Nault V, Valiquette L (2015): Clinical and healthcare burden of multiple recurrences of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 62, 574–580
- Sim JHC, Truong C, Minot SS, Greenfield N, Budvytiene I, Lohith A, Anikst V, Pourmand N, Banaei N (2017): Determining the cause of recurrent *Clostridium difficile* infection using whole genome sequencing. Diagn Microbiol Infect Dis 87, 11–16
- Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, Witney AA, Hinds J, Wren BW (2006): Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent Strains. J Bacteriol 188, 7297–7305
- Stevenson E, Minton NP, Kuehne SA (2015): The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. Trends Microbiol 23, 275–282
- Tamma PD, Sandora TJ (2012): *Clostridium difficile* infection in children: current state and unanswered questions. J Pediatr Infect Dis Soc 1, 230–243
- Tang-Feldman Y, Mayo S, Joseph Silva J, Cohen SH (2003): Molecular analysis of *Clostridium difficile* strains isolated from 18 cases of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 41, 3413–3414
- Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Dodson P, Hyde S, Bourlioux P, Borriello P (2000): A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. Microbiol Read Engl 146, 957–966
- Tasteyre A, Barc M-C, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T (2001): Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect Immun 69, 7937–7940
- Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH (2011): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection: can molecular amplification methods move us out of uncertainty? J Mol Diagn 13, 573–582
- Tsai B-Y, Ko W-C, Chen T-H, Wu Y-C, Lan P-H, Chen Y-H, Hung Y-P, Tsai P-J (2016): Zoonotic potential of the *Clostridium difficile* RT078 family in Taiwan. Anaerobe 41, 125–130
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI (2009): The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. Sci Transl Med 1, 6–14

- van den Berg RJ, Ameen HA, Furusawa T, Claas EC, van der Vorm ER, Kuijper EJ (2005): Coexistence of multiple PCR-ribotype strains of *Clostridium difficile* in faecal samples limits epidemiological studies. *J Med Microbiol* 54, 173–179
- van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010): High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48, 900–907
- Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK (2012): *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 3, 121–134
- Veloo ACM, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ (2011): Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect* 17, 1501–1506
- Vindigni SM, Surawicz CM (2015): *C. difficile* infection: changing epidemiology and management paradigms. *Clin Transl Gastroenterol* 6, e99
- von Müller L, Mock M, Halfmann A, Stahlmann J, Simon A, Herrmann M (2015): Epidemiology of *Clostridium difficile* in Germany based on a single center long-term surveillance and German-wide genotyping of recent isolates provided to the advisory laboratory for diagnostic reasons. *Int J Med Microbiol* 305, 807–813
- Voth DE, Ballard JD (2005): *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18, 247–263
- Walk ST, Micic D, Jain R, Lo ES, Trivedi I, Liu EW, Almassalha LM, Ewing SA, Ring C, Galecki AT, et al. (2012): *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis* 55, 1661–1668
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005): Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet* 366, 1079–1084
- Weil H-P, Brüning T, Fischer-Brügge U, Kuijper E, Kühnen E (2007): *Clostridium difficile*: Neuer hochvirulenter Stamm nachgewiesen. *Dtsch Ärztebl* 104, A 3308
- Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN (2008): A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 62, 388–396
- Wroblewski D, Hannett GE, Bopp DJ, Dumyati GK, Halse TA, Dumas NB, Musser KA (2009): Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 47, 2142–2148
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, et al. (2011): Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108

- Zaiß NH, Witte W, Nübel U (2010): Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerg Infect Dis* 16, 675–677
- Zhanel GG, Walkty AJ, Karlowsky JA (2015): Fidaxomicin: a novel agent for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 26, 305–312
- Zhou Y, Burnham C-AD, Hink T, Chen L, Shaikh N, Wollam A, Sodergren E, Weinstock GM, Tarr PI, Dubberke ER (2014): Phenotypic and genotypic analysis of *Clostridium difficile* isolates: a single-center study. *J Clin Microbiol* 52, 4260–4266

7.1 Liste der eigenen Publikationen

Originalartikel

Sachsenheimer FE, Yang I, Zimmermann O, Wrede C, Müller LV, Gunka K, Groß U, Suerbaum S (2018): Genomic and phenotypic diversity of *Clostridium difficile* during long-term sequential recurrences of infection. *Int J Med Microbiol* 3, 364-377

Abstracts

Sachsenheimer FE, Yang I, Zimmermann O, Wrede C, Müller LV, Gunka K, Groß U, Suerbaum S (2015): An in-depth analysis of a recurrent *Clostridium difficile* infection - adding more pieces to the puzzle; Posterpräsentation durch die Autorin auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Münster, 27. - 30.09.2015

Sachsenheimer FE, Yang I, Zimmermann O, Wrede C, Müller LV, Gunka K, Groß U, Suerbaum S (2017): An in-depth analysis of a recurrent *Clostridium difficile* infection - adding more pieces to the puzzle; Posterpräsentation durch Prof. U. Groß auf der ClostPath-Tagung in Ann Arbor, Michigan, USA, 07. - 10.08.2017

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Uwe Groß für die Vergabe der vorliegenden Arbeit, für die freundliche Aufnahme im Institut und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für viele wertvolle Anregungen und Diskussionsbeiträge.

Große Hilfe erfuhr ich durch Frau Dr. Katrin Gunka im Labor und im beständigen Dialog. Ich danke ihr für die hervorragende fachliche Betreuung und die Unterstützung bei meiner Einarbeitung in die methodischen Verfahren. Zudem hätte ich mir auch auf persönlicher Ebene keine bessere Betreuerin wünschen können.

Frau Ortrud Zimmermann danke ich für die Einführung in mikrobiologische Arbeitsmethoden, für lange, anregende Diskussionen und für die Vermittlung der Proben. Ihr Engagement und ihre Unterstützung haben maßgeblich zum positiven Fortgang dieser Arbeit beigetragen.

Einen wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit hat Herr Priv. Doz. Heinrich Köchel geleistet. Für seinen beständigen Rat und seine aufmunternde und inspirierende Begleitung danke ich ihm sehr.

Den Kooperationspartnern Herrn Prof. Lutz von Müller, Herrn Prof. Sebastian Suerbaum, Frau Dr. Ines Yang, Herrn Dr. Cristoph Wrede und Frau Prof. Maja Rupnik danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Auch danke ich Frau Ines Oehmig, ihre Arbeit erleichterte den Laboralltag sehr.

Ein weiteres Dankeschön richtet sich an die übrigen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie. Ich habe mich dort sehr wohl gefühlt. Diese gute Arbeitsatmosphäre haben dabei insbesondere Frau Roswitha Nast, Frau Emilia Gomez Molero und Frau Katrin Gunka geprägt.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei dem Patienten bedanken, der durch seine Einwilligung zur Probenanalyse und zur Erhebung der anamnestischen Daten diese Arbeit möglich machte.