

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

**Das Wachstums- und Sporulationsverhalten  
klinischer *Clostridioides-difficile*-Isolate unter  
intestinalen Gallensalzkonzentrationen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Elif Yilmaz**

aus

Göttingen

Göttingen, den 30.03.2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. U. Groß

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. V. Ellenrieder

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. U. Groß

Ko-Referent/in: Prof. Dr. V. Ellenrieder

Drittreferent/in: Prof. Dr. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 14.12.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Das Wachstums- und Sporulationsverhalten klinischer *Clostridioides-difficile*-Isolate unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 30.03.2021

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Clostridioides-difficile</i> .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	2
1.1.2 Sporulation .....	2
1.1.3 Auskeimung .....	2
1.2 <i>Clostridioides-difficile</i> -Infektion (CDI).....	3
1.2.1 Risikofaktoren.....	4
1.2.2 Pathogenese und Klinik .....	4
1.2.3 Therapie und Prognose .....	5
1.3 Gallensalze.....	5
1.4 Zielsetzung und Fragestellung.....	8
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Material .....	9
2.1.1 Bezugsquellen .....	9
2.1.2 Puffer, Kulturmedien und Gallensalze .....	10
2.1.3 Herstellung von Gallensalz-Lösungen.....	12
2.1.4 Gallensalze.....	12
2.1.5 Auswahl der <i>Clostridioides-difficile</i> -Stämme .....	13
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Allgemeine Wachstumsbedingungen .....	15
2.2.2 Toxinotypisierung .....	15
2.2.3 Ribotypisierung.....	15
2.2.4 Lichtmikroskopie.....	15
2.2.5 Kultivierung von <i>Clostridioides-difficile</i> -Sporen .....	16
2.2.6 Kultivierung von vegetativen <i>Clostridioides-difficile</i> .....	16
2.2.7 Keimungsverhalten von Sporen unter Gallensalzen .....	17
2.2.8 Wachstumsverhalten unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen.....	17
2.2.9 Sporulationsverhalten unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen.....	18
2.2.10 Statistische Auswertung.....	19
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>20</b>
3.1 Keimungsverhalten von <i>Clostridioides-difficile</i> -Sporen.....	20
3.1.1 Keimungsverhalten in reinem BHIS-Medium.....	21
3.1.2 Vergleich des Einflusses aller Gallensalze auf die Auskeimung von <i>Clostridioides-difficile</i> .....	21
3.1.3 Keimungsverhalten bei Anwesenheit von keimungsaktivierenden Gallensalzen .....	22
3.1.4 Keimungsverhalten bei Anwesenheit von wachstumshemmenden Gallensalzen .....	25
3.2 Bestimmung der Wachstumsraten von <i>Clostridioides-difficile</i> .....	27

---

3.2.1	Wachstumsraten in reinem BHIS-Medium.....	27
3.2.2	Wachstumsraten bei Anwesenheit von wachstumsaktivierenden Gallensalzen.....	28
3.2.3	Wachstumsraten bei Anwesenheit von wachstumshemmenden Gallensalzen.....	30
3.3	Untersuchung des Sporulationsverhaltens von vegetativen <i>Clostridioides-difficile</i> .....	32
3.3.1	Einfluss von Gallensalzen in der Wachstumsphase von <i>Clostridioides-difficile</i> .....	33
3.3.2	Einfluss von intestinalen Gallensalzkonzentrationen auf das Sporulationsverhalten von <i>Clostridioides-difficile</i> .....	34
3.3.3	Einfluss von Stuhlkonzentrationen der Gallensalze auf das Sporulationsverhalten von <i>Clostridioides-difficile</i> .....	35
3.3.4	Wachstums- und Sporulationsverhalten der einzelnen Stämme.....	38
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1	Sporenkeimung.....	54
4.2	Wachstumsverhalten.....	54
4.3	Sporulation.....	56
4.4	Therapiealternativen im Rahmen einer CDI.....	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Herkunft und Einfluss der Gallensalze auf den Lebenszyklus von <i>C.-difficile</i> .....	7
Abbildung 2.1 Wellplatten-Versuchsaufbau zur Inkubation von <i>C.-difficile</i> -Sporen mit verschiedenen Gallensalzen .....	17
Abbildung 2.2 Hungate-Versuchsaufbau zur Ermittlung der Wachstumskurve von auskeimenden <i>C.-difficile</i> -Sporen in vegetative Zellen.....	17
Abbildung 2.3 Spore assay-Versuchsaufbau zur Ermittlung der Sporen in CFU/ml von <i>C.-difficile</i> .....	18
Abbildung 3.1 OD <sub>600</sub> -Mittelwerte aller <i>C.-difficile</i> -Stämme nach 24 h Inkubation in BHIS-Medium .....	21
Abbildung 3.2 Vergleich des Wachstumsverhaltens als Mittelwert ihrer Klade in BHIS .....	22
Abbildung 3.3 Auskeimung und Wachstum von 23 <i>C.-difficile</i> -Stämmen unter den Gallensalzen TCA, CA, GCA, CDCA, UDCA, DCA und LCA.....	22
Abbildung 3.4 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter TCA. Dosisangabe in % .....	24
Abbildung 3.5 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter GCA. Dosisangabe in % .....	24
Abbildung 3.6 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter CA. Dosisangabe in % .....	24
Abbildung 3.7 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter CDCA. Dosisangabe in % .....	26
Abbildung 3.8 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter DCA. Dosisangabe in % .....	26
Abbildung 3.9 Dosisabhängige OD <sub>600</sub> -Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter LCA. Dosisangabe in % .....	26
Abbildung 3.10 Wachstumskurven aller Stämme als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h in reinem BHIS-Medium.....	28
Abbildung 3.11 Wachstumskurven aller Stämme als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von TCA .....	29
Abbildung 3.12 Wachstumskurven aller Stämme als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von CA.....	29
Abbildung 3.13 Wachstumskurven aller Stämme als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von GCA .....	29
Abbildungen 3.14, 3.15, 3.16, 3.17: Wachstum aller Stämme als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation und CDCA. ....	30
Abbildung 3.18 Wachstumskurven als OD <sub>600</sub> -Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h in CDCA und DCA .....	31
Abbildung 3.19 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme in reinem BHIS-Medium.....	34
Abbildung 3.20 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter intestinaler DCA Konzentration.....	35
Abbildung 3.21 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter intestinaler CDCA-Konzentration. ....	35
Abbildung 3.22 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter DCA-Stuhlkonzentration.....	36
Abbildung 3.23 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter CDCA-Stuhlkonzentration.....	36
Abbildung 3.24 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t <sub>0</sub> , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter LCA-Stuhlkonzentration.....	37

Abbildung 3.25 Überblick: Zusammenfassung der Sporentests aller getesteten Ribotypen und Gallensalze .....	38
Abbildung 3.26 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes 630 (RT 012, Klade 1) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	39
Abbildung 3.27 Wachstumskurven von 630 (RT 012, Klade 1) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	39
Abbildung 3.28 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes SC009 (RT 001, Klade 1) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	40
Abbildung 3.29 Wachstumskurven von SC009 (RT 001, Klade 1) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	40
Abbildung 3.30 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes Cdiff 1 (RT 027, Klade 2) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	42
Abbildung 3.31 Wachstumskurven von Cdiff 1 (RT 027, Klade 2) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	42
Abbildung 3.32 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes R20291 (RT 027, Klade 2) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	43
Abbildung 3.33 Wachstumskurven von R20291 (RT 027, Klade 2) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	43
Abbildung 3.34 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes LvM 023 (RT 023, Klade 3) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	45
Abbildung 3.35 Wachstumskurven von LvM 023 (RT 023, Klade 3) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	45
Abbildung 3.36 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes Cdiff XII (RT 127, Klade 3) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	46
Abbildung 3.37 Wachstumskurven von Cdiff XII (RT 127, Klade 3) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	46
Abbildung 3.38 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes MC002 (RT 126, Klade 5) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	48
Abbildung 3.39 Wachstumskurven von MC002 (RT 126, Klade 5) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	48
Abbildung 3.40 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes SC052 (RT 078, Klade 5) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	49
Abbildung 3.41 Wachstumskurven von SC052 (RT 078, Klade 5) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen .....	49
Abbildung 4.1 Teufelskreis in der Behandlung einer CDI .....	51
Abbildung 4.2 Physiologische Gallensalzkonzentrationen entlang des Darmverlaufs.....	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Gallensalze und Wirkungen auf das Auskeimungs- und Wachstumsverhalten von <i>C.-difficile</i> .....	6
Tabelle 2.1 Chemikalien .....	9
Tabelle 2.2 Gebrauchtwaren.....	9
Tabelle 2.3 Verwendete Geräte und Programme .....	10
Tabelle 2.4 Puffer und Nährmedien.....	11
Tabelle 2.5 Gallensalze .....	12
Tabelle 2.6 Gallensalzkonzentrationen, Angabe in Mol (mM) und Prozent (%).....	12
Tabelle 2.7 Herkunft und Eigenschaften der getesteten <i>C.-difficile</i> -Stämme.....	14
Tabelle 3.1 Definierte Grenzwerte, Definition und farbliche Markierung der OD <sub>600</sub> -Werte zur optimierten Darstellung des Auskeimungs- und Wachstumsverhaltens.....	20
Tabelle 3.2 Signifikanzniveaus der Kladen.....	22
Tabelle 3.3 Signifikanzniveaus aller Gallensalze im Vergleich .....	22
Tabelle 3.4 Auskeimung und Wachstum von <i>C.-difficile</i> -Isolaten nach 24 h Inkubation unter TCA, GCA und CA .....	23
Tabelle 3.5 Signifikanzniveaus unter TCA .....	24
Tabelle 3.6 Signifikanzniveaus unter GCA.....	24
Tabelle 3.7 Signifikanzniveaus unter CA.....	24
Tabelle 3.8 Messung der OD <sub>600</sub> der <i>C.-difficile</i> -Isolate nach 24 h Inkubation unter den keimungsinhibierenden Gallensalzen CDCA, LCA und DCA .....	25
Tabelle 3.9 Signifikanzniveaus unter CDCA.....	26
Tabelle 3.10 Signifikanzniveaus unter DCA .....	26
Tabelle 3.11 Signifikanzniveaus unter LCA .....	26



## Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua, Wasser
AB	Antibiotisch
AWMF	Arbeitsgemeinschaften der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BHIS-Medium	Brain Heart Infusion-Medium, supplemented with yeast (Hefezusatz)
C.	Clostridioides
CA	Cholat
CD	Cluster of Differentiation
CDCA	Chenodeoxycholat
CDI	<i>Clostridioides-difficile</i> -Infektion
CDT	Cytolethal distending toxin
CFU	Colony forming units
COS-Agar	Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut-Zusatz
DCA	Deoxycholat
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH
GCA	Glykocholat
LCA	Lithocholat
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
RT	Ribotyp
RKI	Robert Koch-Institut
SMC	Sporulation-Mediums für Clostridioides
TCA	Taurocholat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
(v/v)	% (v/v) Volumenprozent: Anteilsvolumen Gesamtvolumen

# 1 Einleitung

In den letzten Jahren entwickelte sich *Clostridioides-difficile* zum häufigsten Erreger nosokomial erworbener Diarrhoen und zeichnet sich durch eine zunehmende Inzidenz, Morbidität und Mortalität der *Clostridioides-difficile*-Infektionen (CDI) aus (Miller et al. 2010). Begünstigende Faktoren sind hierbei eine schnelle Ausbreitung und Überdauerung resistenter Sporen (Dubberke et al. 2007; Kuijper et al. 2008). Die Therapie einer chronisch-rezidivierenden CDI stellt eine zusätzliche Herausforderung dar. Aufgrund einer zunehmenden Resistenz gegenüber gängigen antibiotischen Therapien und den schwerwiegenden Folgeerscheinungen einer langfristigen Antibiose, wie die Veränderung der physiologischen Darmflora, wird nach Therapiealternativen gesucht (Pepin 2004; Sebahia et al. 2006; Buffie et al. 2012; Bassis et al. 2014; Chakra et al. 2014; Tartof et al. 2015). Es wird angenommen, dass eine intakte Darmflora und ein physiologischer Gallensalzmetabolismus in der Prävention und der langfristigen Ausheilung einer CDI eine große Rolle spielen (Sorg 2014; Weingarden et al. 2014; Joyce und Gahan 2016; Brown et al. 2018; Kochan et al. 2018a). Um den Einfluss der physiologischen Gallensalzkonzentrationen auf den Lebenszyklus von *C.-difficile* zu verstehen, wurde diese Forschungsarbeit in Kooperation mit dem Norddeutschen Zentrum für Mikrobielle Genomerforschung (NZMG 2020) erarbeitet.

## 1.1 *Clostridioides-difficile*

*C.-difficile* ist ein Gram-positives Stäbchenbakterium und kann zur menschlichen Darmflora gehören (Hall und O’toole 1935; Lawson et al. 2016). Verschiedene Studien zeigten Kolonisierungsraten von 4 – 5 % toxigener *C.-difficile* -Stämme und bis zu 13 % gesamt (toxigener und nicht-toxigener) Stämme in Stuhlproben gesunder Erwachsener (Fekety und Shah 1993; Ozaki et al. 2004). Während es unter anaeroben, strikt mikroaerophilen (max. 5 % Sauerstoff) Bedingungen in seiner vegetativen Form vorkommt, kann es als Sporenbildner sein Überleben auch außerhalb des Wirts sichern. Die Sporen sind metabolisch inaktiv und daher resistent gegenüber Antibiotika und dem menschlichen Immunsystem (Sebahia et al. 2006; Paredes-Sabja und Sarker 2012). In der Umgebung können sie nicht durch Hitze, Sauerstoff, Säuren oder ethanolbasierte Desinfektion eliminiert werden (Ali et al. 2011). Im Allgemeinen kann man *C.-difficile* -Stämme in fünf Kladen unterteilen. Man unterscheidet apathogene von pathogenen, toxinproduzierenden Stämmen. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit zeigten die untersuchten klinischen Isolate verschiedene Toxintypen, darunter pathogene Stämme, die Toxin A und B (TcdA + und TcdB +), nur ein Toxin (TcdA oder TcdB) und/oder ein binäres Toxin (CDI) produzieren (Berg et al. 2004; Voth und Ballard 2005; Gerding et al. 2014). Im Falle einer Kolonisation mit pathogenen Stämmen kann u. a. eine intakte Darmflora den Ausbruch der Infektion verhindern. Symptomatische Träger von pathogenen Stämmen wiesen hier häufig eine verringerte Darmfloradiversität vor (Rea et al. 2012).

### 1.1.1 Epidemiologie

Nicht nur durch das Auftreten sehr virulenter Stämme, u. a. des Ribotyps 027 (Barbut et al. 2007; Kuijper et al. 2008), sondern auch durch eine zunehmende Resistenz gegenüber gängigen antibiotischen Therapien mit Metronidazol steigt die Inzidenz, Morbidität und Mortalität der CDI in den letzten Jahrzehnten an (Pepin 2004; Miller et al. 2010). Bis vor einigen Jahren stellte Ribotyp 001 den prävalentesten Subtyp in Deutschland (Berger et al. 2018). Mit dem Auftreten des virulenten Ribotyps 027 wandelte sich dies (Ausbruchsuntersuchungen bei *Clostridium-(Clostridioides)difficile* 2018). Die Zunahme von ambulant-erworbenen *C.-difficile*-assoziierten Krankheiten belastet das Gesundheitssystem zusätzlich (Smits et al. 2016). Interessanterweise betrifft diese u. a. nicht risikogefährdete Menschen, wie Kinder, junge Erwachsene und Schwangere (Wilcox et al. 2008; Hensgens et al. 2011). Insgesamt führen somit Infektionskrankheiten durch *C.-difficile* zu hohen Kosten in Europa und den USA (ca. 1 – 3 Milliarden Dollar (Jones et al. 2013; Lessa et al. 2015)).

### 1.1.2 Sporulation

Als höchst resiliente Zellform spielen Sporen eine bedeutende Rolle in der Transmission, der Re-Infektion und der Umweltpersistenz von *C.-difficile* (Nicholson et al. 2000; Carroll und Bartlett 2011; Deakin et al. 2012; Setlow 2014). Da die Sporen das Überleben des Bakteriums sichern, findet während der Replikation vegetativer Zellen zeitgleich die Sporulation statt (Howerton et al. 2013b; Koenigsknecht et al. 2015). Als strikt anaerobes Bakterium wird bei Nährstoffmangel ein erschwertes vegetatives Wachstum ebenso wie die Sporulation eingeleitet (Burbulys et al. 1991; Underwood et al. 2009; Higgins und Dworkin 2012). Die Sporulation erfolgt in vielen nacheinander folgenden Phasen und dauert ca. acht Stunden (Paredes-Sabja et al. 2014; Saujet et al. 2014; Fimlaid und Shen 2015). Damit die Teilung von Bakterien beginnen kann, muss eine vegetative Zelle zwei Kopien der kondensierten Chromosomen enthalten. Im Rahmen der asymmetrischen Teilung kommt es zur Trennung der Zelle in eine kleinere Vorspore und einer größeren Mutterzelle. Die asymmetrische Teilung ermöglicht die Synthese einer speziellen Zellwand, welche aus zwei Peptidoglykanschichten, einer primordialen Keimzellwand, dem Kern und einer proteinreichen Oberflächenschicht besteht. Diese ermöglicht der Spore eine vollständige Resistenz gegen physische (z. B. Hitze) und chemische Agenzien (Setlow 2006). Die Sporen dienen auch der Transmission. Dank ihrer speziellen Zellwand werden die Sporen nicht durch die Magensäure zersetzt, allerdings findet im Magen auch keine Auskeimung statt (Wilson et al. 1985; Kochan et al. 2018a). Nach Passage des Magens können die Sporen dann im Dünndarm auskeimen.

### 1.1.3 Auskeimung

Damit eine CDI symptomatisch wird, müssen die *C.-difficile*-Sporen auskeimen (Howerton et al. 2013b). Die Auskeimung wird in der Spore initiiert, sobald spezielle Stimuli wie keimungsaktivierende Gallensalze (bspw. CA, TCA), Aminosäuren (Glycin) und divalente Kationen (Calcium)

durch Keimungsrezeptoren wahrgenommen werden (Setlow 2003; Sorg und Sonenshein 2008; Setlow und Johnson 2013; Kochan et al. 2018b). Nach Inokulation der Sporen findet innerhalb von sechs Stunden die Auskeimung statt, wobei die höchsten Konzentrationen der Toxine und der vegetativen Zellen im Kolon nach 24 Stunden nachweisbar sind (Koenigsnecht et al. 2015). Die Auskeimung ist in einen zweiteiligen biochemischen Prozess gegliedert und wird u. a. auch durch den pH reguliert (Kochan et al. 2017; Kochan et al. 2018b; Kochan et al. 2018a). Es folgt ein zweistündiger Prozess, der zu einem Verlust der metabolisch-inaktiven Eigenschaft der Sporen und zur Umwandlung in eine vegetative Zellen führt (Setlow 2003; Sorg und Sonenshein 2008; Dembek et al. 2013). Sobald Sporen den Gastrointestinaltrakt erreicht haben, können sie im Ileum auskeimen, wo sie auf hohe Konzentration von primären Gallensalzen und Glycin als Ko-Germinanten treffen (Rao et al. 2006; Ridlon et al. 2006; Sorg und Sonenshein 2008). *In vitro* Studien zeigten, dass einige Stämme auch in reinem BHIS-Medium auskeimen können (Heeg et al. 2012). Ab dem Cäcum finden sich für das Wachstum notwendige anaerobe Bedingungen. Da in gesunden Menschen die Konzentration sekundärer Gallensalze wie Deoxycholat (DCA) im Kolon hoch sind, könnte dadurch das Wachstum eingeschränkt werden. Dies könnte ein Schutz gegen eine Kolonisierung und folglich Infektion darstellen (Carey und Watson 1955; Thomas et al. 2001).

## 1.2 *Clostridioides-difficile*-Infektion (CDI)

Eine CDI kann unterschiedliche symptomatische Ausprägungen zeigen: Von einer asymptomatischen Kolonisation, akuten Diarrhoen, kann es bis zur Ausbildung einer pseudomembranösen Kolitis mit fulminantem Verlauf kommen, welche u. a. als toxisches Megakolon mit Perforation in einer Sepsis mündet (Hurley und Nguyen 2002). Hier beeinflussen neben den Toxinen auch die u.g. Risikofaktoren das klinische Bild. Eine Inokulation von pathogenen *C.-difficile*-Sporen kann zu einer Kolonisation im Gastrointestinaltrakt führen (Deakin et al. 2012; Paredes-Sabja et al. 2014). Häufig ermöglicht jedoch erst die Einnahme von oralen Antibiotika die Entwicklung einer CDI (Rea et al. 2012). Dieses ist der Tatsache geschuldet, dass die physiologische Darmflora durch einen Kolonisationswiderstand eine Resistenz gegenüber einer CDI bildet (Reeves et al. 2011; Britton und Young 2012; Buffie et al. 2012; Theriot et al. 2014; Buffie et al. 2015), indem das Wachstum von *C.-difficile* verhindert wird. Obwohl der Kolonisationswiderstand noch nicht ganz erforscht ist, wird er als die Fähigkeit der physiologischen Darmflora definiert, sich gegen eine Infektion von pathogenen Keimen zu schützen (Vollaard und Clasener 1994; Lawley und Walker 2013). Ob tatsächlich eine physiologische Darmflora alleinig ausreichend protektiv ist, bleibt zu hinterfragen, da eine CDI auch bei Patienten mit mutmaßlich normaler Darmflora ausbrechen kann (Bauer et al. 2008; Wilcox et al. 2008). Frühere Studien über Wachstumsraten von *C.-difficile* in physiologischer und antibiotisch-veränderter Darmflora zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Während *in vitro* Modelle zeigen, dass *C.-difficile* unter nicht-veränderter Darmflora nicht in der Lage ist zu replizieren (Wilson et al. 1985; Borriello und Barclay 1986; Freeman et al. 2003), zeigt eine aktuelle Studie ein stammabhängiges Wachstum in Nährmedien sowohl dysbiotischer, als auch normaler Darmflora (Horvat und Rupnik 2018). Es gibt Hinweise, dass sekundäre Gallensalze eine entscheidende Rolle

im Wachstum von *C.-difficile* spielen (Sorg 2014; Weingarden et al. 2014; Joyce und Gahan 2016). Die Bedeutung der sekundären Gallensalze wird auch in der Therapie einer rezidivierenden CDI durch Stuhltransplantation erklärt: So wird postuliert, dass die Ausheilung einer CDI neben einer Normalisierung der Darmflora, auch aufgrund der Wiederherstellung des Gallensalzmetabolismus bedingt ist (Brown et al. 2018). Allerdings konnte eine aktuelle Studie von Kochan et. al zeigen, dass *C.-difficile* Sporen im Ileum auch unabhängig von antibiotischer Therapie auskeimen können, indem sie die inhibitorischen Gallensalze durch Auskeimungssynergien umgehen (2018b). Die Hemmung der Auskeimung spielt damit eher eine geringe Rolle für die Kolonisierungsresistenz durch die lokale Darmflora. Stattdessen wird angenommen, dass der Gallensalzstoffwechsel im Kolon durch die Hemmung des Wachstums vegetativer Zellen die Entwicklung einer CDI beeinflusst (Kochan et al. 2018a).

### 1.2.1 Risikofaktoren

Eine antibiotische Therapie zählt zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer CDI (Buffie et al. 2012; Bassis et al. 2014; Chakra et al. 2014; Tartof et al. 2015). Während eine antibiotische Therapie die physiologische Darmflora minimiert, ist *C.-difficile* resistent gegenüber vielen Antibiotika (u. a. Erythromycin, Chloramphenicol und Tetrazykline) (Sebahia et al. 2006). Die Einnahme von Antazida vereinfacht ebenso die Auskeimung der *C.-difficile*-Sporen (Trifan et al. 2017). Trotz ausreichender Konzentration keimungsaktivierender Metabolite findet im Duodenum kaum Auskeimung statt, was durch einen zu sauren pH-Wert begründet wird. Sporen sind pH-resistent aber dennoch nicht in der Lage unter saurem pH-Wert auszukeimen (Kochan et al. 2018a). Antazida heben nicht nur den intestinalen pH-Wert an, sondern vermindern auch die Calciumresorption (Freedberg et al. 2014; Trifan et al. 2017). Die höchsten Auskeimungsraten finden unter einem pH-Wert von 6.5 – 8.5 im terminalen Ileum statt, bevor Gallensalze und Calcium reabsorbiert werden. Diese Effekte könnten zu höheren Keimungsraten im Dünndarm und zu *C.-difficile*-Kolonisierung unter geringeren Infektionsdosen führen (Kochan et al. 2018a). Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer CDI sind ein Krankenhausaufenthalt und die Inokulation von epidemischen *C.-difficile*-Sporen. Risikofaktoren für einen fulminanten Verlauf sind ein höheres Lebensalter von über 65 Jahren, schwere Begleiterkrankungen und eine Immunsuppression (Le Monnier et al. 2014).

### 1.2.2 Pathogenese und Klinik

Wichtige bakterielle Virulenzfaktoren sind die Toxine von *C.-difficile* (Voth und Ballard 2005; Carter et al. 2012). Im Darm wird das Epithel durch die Haupttoxine TcdA und TcdB geschädigt. Durch Inaktivierung von GTP-bindenden Proteinen, Aktin-Kondensation, sowie Desintegration vom Zytoskelett und Zellrundung kommt es zum Zelltod (Voth und Ballard 2005). Sehr virulente Stämme (RT 027 und 078) sind ebenfalls in der Lage ein weiteres binäres Toxin, die *C.-difficile* Transferase (CDT) zu produzieren. Dadurch kann *C.-difficile* leichter am Epithel anhaften (Schwan et al. 2014).

Es wird diskutiert, ob sich schlimmere Verläufe einer CDI bei CDT-positiven Isolaten zeigen (Miller et al. 2010; Bacci et al. 2011; Goldenberg und French 2011).

### 1.2.3 Therapie und Prognose

Die CDI wird zurzeit mit Metronidazol, Vancomycin oder ggf. Fidaxomicin therapiert (Leitlinie CDI 2015). Während bei milden Verläufen einer CDI eine Antibiose mit Metronidazol erfolgt, wird bei schwereren Verläufen Vancomycin empfohlen (Surawicz et al. 2013). Allerdings ist die Rezidivrate mit 20 – 30 % der Patienten nach Beendigung der Therapie hoch (Debast et al. 2014), wobei sich unter einer Therapie mit Fidaxomicin niedrigere Rezidivraten zeigen (Louie et al. 2011). In der Behandlung der chronisch-rezidivierenden *C.-difficile*-Infektion zeigte sich sogar ein höheres Risiko von 40 – 65 % eines Wiederauftretens der Krankheit (Kelly 2012). Durch eine antibiotische Therapie wird jedoch die mikrobiotische Darmflora weiter geschädigt und die Sporen nicht abgetötet, was das Wiederauftreten einer CDI erklären könnte (s. Abbildung 4.1). Auf der Suche nach Therapiealternativen zur Antibiose, wurden u. a. Gaben von Gallensalz-Analoga und Stuhltransplantationen erprobt (Howerton et al. 2013a; Kociolek und Gerding 2016). Zur erfolgreichen Therapie einer CDI sollte neben der Elimination des Bakteriums und seinen schädigenden Toxinen die bakterielle Flora und der physiologische Darmmetabolismus erhalten bleiben. Tatsächlich zeigen Stuhltransplantationen in der Behandlung von chronischen CDI gute Resultate mit hohen Heilungsraten (Borody und Khoruts 2011; Gough et al. 2011; van Nood et al. 2013; Quraishi et al. 2017). Hier scheint die im Rahmen der Stuhltransplantationen wiederhergestellte Aktivität der bakteriellen Hydrolasen (s. 1.3 Gallensalze) ausschlaggebend für den Erfolg zu sein (Mullish et al. 2019).

## 1.3 Gallensalze

Gallensalze sind Cholesterolderivate, die von Hepatozyten synthetisiert werden. Zusammen mit Chenodeoxycholat (CDCA) werden die anderen primären Gallensalze (CA, GCA, TCA u. a.) anschließend mit der Galleflüssigkeit ins Duodenum sezerniert (Chiang 2009) (vgl. Abbildung 1.1). Im Darm ermöglichen sie die Verdauung von Fetten (Ridlon et al. 2006; Hofmann 2009). Als biologische Detergenzien dienen sie u. a. durch Oxidation im Darm als Schutz gegen pathogene Keime (Kakiyama et al. 2013; Staley et al. 2017). Sobald Gallensalze im Gastrointestinaltrakt angekommen sind, werden sie zum einen mithilfe bakterieller Gallensalzhydrolasen dekonjugiert und zum anderen mit der durch *Clostridium scindens* sezernierten 7-Dehydroxylase dehydroxyliert (Weingarden et al. 2014; Buffie et al. 2015), was zur Entstehung sekundärer Gallensalze wie Lithocholat (LCA) und Deoxycholat (DCA) führt (Chiang 2009). Die Entstehung sekundärer Gallensalze ist also durch die bakteriell bedingten Reaktionen Dekonjugation und Dehydroxylation zu erklären (Ridlon et al. 2006). Die Bedeutung der bakteriellen Flora für den Gallensalzmetabolismus kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass in einem Darm ohne bakterielle Besiedlung keine sekundären Gallensalze detektierbar waren (Sayin et al. 2013).

Gallensalze spielen mit ihren keimungsaktivierenden und/oder wachstumsinhibierenden Eigenschaften eine entscheidende Rolle im Lebenszyklus von *C.-difficile*. Hierbei unterscheiden sich die von der Leber produzierten primären Gallensalze Chenodeoxycholat (CDCA), Cholat (CA) und ihre Derivate von den sekundären Gallensalzen, bspw. Deoxycholat (DCA) und Lithocholat (LCA), welche durch bakterielle Reaktionen im Darm entstehen (Abbildung 1.1). Vielfach konnte gezeigt werden, dass primäre Gallensalze wie Cholat (CA) und ihre konjugierten Derivate Glykocholat (GCA) und Taurocholat (TCA), ebenso wie das sekundäre Gallensalz Deoxycholat (DCA) potente Keimungsaktivatoren sind (Wilson et al. 1985; Sorg und Sonenshein 2008; 2010). Im Gegensatz dazu sind die sekundären Gallensalze eher keimungsinhibierend (LCA) und/oder wachstumsinhibierend (LCA, DCA) auf vegetative Zellen (Francis et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2014; Theriot und Young 2015) während lediglich ein primäres Gallensalz (CDCA) auch keimungsinhibierend wirkt (Sorg und Sonenshein 2010). In Tabelle 1.1 sind die Gallensalze und Wirkungen, wie oben beschrieben, aufgelistet. Eine intakte Darmflora bietet demnach auch durch ihren Metabolismus der Gallensalze einen Kolonisationswiderstand gegen *C.-difficile*. Hierbei scheinen die 7-Dehydroxylase-produzierenden Darmbakterien, welche durch Dehydroxylierung sekundäre Gallensalze wie DCA und LCA produzieren, entscheidend zu sein (Ridlon et al. 2006; Buffie et al. 2015).

Tabelle 1.1 Gallensalze und Wirkungen auf das Auskeimungs- und Wachstumsverhalten von *C.-difficile*.

Gallensalz		Wirkung auf	
		Auskeimung der Sporen	Wachstum der vegetativen Zellen
primär	CDCA	inhibierend	
	CA	aktivierend	
	TCA	aktivierend	
	GCA	aktivierend	
sekundär	LCA	inhibierend	inhibierend
	DCA	aktivierend	inhibierend

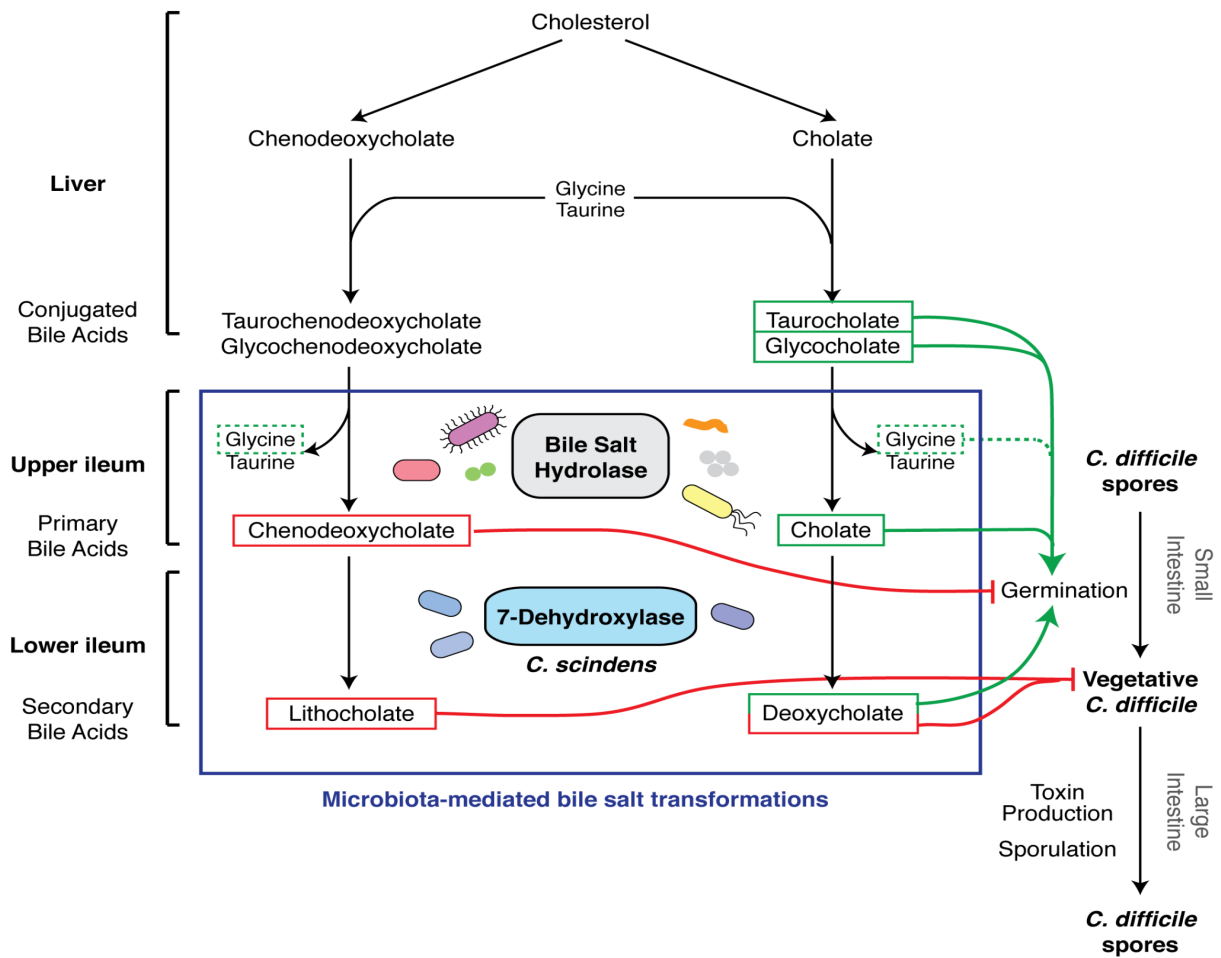


Abbildung 1.1 Herkunft und Einfluss der Gallensalze auf den Lebenszyklus von *C.-difficile* (modifiziert nach Shen 2015, mit freundlicher Genehmigung der Autorin).



## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Problematisch an der antibiotischen Therapie einer CDI ist die Veränderung der lokalen Darmflora und – dadurch bedingt – ein Einfluss auf den Gallensalzmetabolismus. In den bisherigen Studien wurde nicht berücksichtigt, dass im Darm andere Gallensalzkonzentrationen vorherrschen, als die beispielsweise standardmäßig in den Versuchen verwendete Konzentration von 0,1 % (Sorg und Sonenshein 2010). Zudem sind die Ergebnisse zu Gallensalzwirkungen nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Stämme benutzt wurden. Um eine effektive Behandlung und Prophylaxe gegen eine Reinfektion zu gewährleisten, ist das Verständnis des Lebenszyklus‘ dieses Bakteriums in Bezug auf physiologische Gallensalzkonzentrationen im menschlichen Darm erforderlich.

Ziel dieser Studie ist es daher, den Einfluss physiologischer Gallensalzkonzentrationen auf das Keimungs- und Wachstumsverhalten von *C.-difficile* zu untersuchen. Um zu ergründen, ob sich dabei stammspezifische Unterschiede im Hinblick auf die Gallensalzwirkung zeigen, wurden 23 klinische Isolate von CDI-Patienten aus fünf existierenden Kladen von *C.-difficile* mit unterschiedlichen Ribotypen, Toxinausstattung und Herkunft in die Analysen einbezogen. Es wurde untersucht, wie sich das Keimungs- und Wachstumsverhalten der *C.-difficile*-Sporen unter der standardisierten aber artifiziellen 0,1 % Gallensalzkonzentrationen im Vergleich zu intestinalen und fäkalen Gallensalzkonzentrationen verhalten. Da die Rolle der Gallensalze hinsichtlich der Sporeninduktion noch ungeklärt ist, wurde auch untersucht, ob wachstumshemmende Gallensalze eine erneute Sporeninduktion beeinflussen können und dadurch eine Rolle für die Infektiosität und Persistenz einer CDI spielen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bezugsquellen

Tabelle 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
A. bidestillata (destilliertes Wasser)	Stadtwerke Göttingen
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Agar	BD, Heidelberg
Brain-Heart-Infusion-Pulver	BD, Heidelberg
Chenodeoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glychocholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hefeextrakt	BD, Heidelberg
L-Cystein	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lithocholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumsulfid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	Merck, Darmstadt
Proteose Peptone	BD, Heidelberg
Resazurin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Taurocholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS	Roth, Karlsruhe
Ursodeoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2.2 Gebrauchtwaren

Ware	Hersteller
Deckgläschen	Menzel Gläser, Thermo scientific, Braunschweig
Gefäße	Falcon, Heidelberg; Greiner, Nürtingen
	Sarstedt, Nümbrecht
Genbox anaer-Generatoren	BioMérieux, SA, Nürtingen
Handstückzähler	Hartenstein, Würzburg
Hungate-Röhrchen (Stopfen und Deckel)	Chemglass Life Science, Dunn Labortechnik GmbH
Immersionsöl 518 N	Zeiss, Göttingen
Impfshlingen	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen, Größen:	Sterican <sup>R</sup> , Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 2.2 Gebrauchtwaren

- 17, G 24 x 1" / ø 0,55 x 25 mm	Thermo-Scientific, Braunschweig
- 20, G 27 x 3/4" / ø 0,40 x 20 mm	Eppendorf, Hamburg
Objektträger: Menzel-Glas	Biosphere FilterTips, Sarstedt, Nümbrecht,
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, versch. Größen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen 2ml, BD Discardit II	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Thoma-Kammersystem, Brand, Wertheim
Zählkammer	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur-Multiwell-Platten Cellstar	

Tabelle 2.3 Verwendete Geräte und Programme

Gerät/Programm	Hersteller
Anaerobes Vinyl-Zelt	Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA
Autoklav,	Schütt, Göttingen
Heizblock, Thermomixer 5436	Schütt, Göttingen
Inverses Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Laminar flow-Arbeitsbank	Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA
Microsoft Word/Excel	Microsoft Corporation, Redmond, VA, USA
Mikroliterpipetten, Gilson, Pipettman	Abimed, Langenfeld
Multilabel Microplate Reader Victor 2, Model 1420	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 200 M Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
SAS 9.4	SAS Corporation Inc., Cary, NC, USA
Spektralphotometer, Nanocolor Vis II	Marchery Nagel, Düren
Vortex	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Puffer, Kulturmedien und Gallensalze

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, mit *Aqua dest.* angefertigt. Die Mengenangaben in Tabelle 2.4 beziehen sich auf 1 Liter Lösung. Zum Sterilisieren wurden hitzestabile Lösungen bei 121 °C, 20 min und 2 bar autoklaviert, hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) (Eppendorf, Hamburg). Für anaerobe Hungate-Lösungen wurde der Redoxindikator Resazurin mit einer Endkonzentration 0,0001 % v/v zum BHIS-Medium hinzugegeben. Um den Sauerstoff zu entfernen, wurde das Medium in der Mikrowelle aufgeköcht, anschließend für

10 Minuten mit N<sub>2</sub> begast und 24 h in einem anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake) inkubiert, bis sich ein Farbumschlag einstellte. Im anaeroben Zelt erfolgte der luftdichte Verschluss der Hungates mit Deckel, dann das Ausschleusen und Autoklavieren. Wenn nicht anders beschrieben, wurde nach dem Autoklavieren zum BHIS-Medium L-Cystein in einer Endkonzentration von 0,03 % w/v hinzugegeben. Vor Verwendung der Nährmedien konnte durch das Reduktionsmittel Natriumsulfid (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) eventuell vorhandener Restsauerstoff entfernt werden.

Tabelle 2.4 Puffer und Nährmedien

<b>Brain-Heart-Infusion (BHIS)</b>	37 g Bacto™ Brain Heart Infusion Pulver, BD 5 g Bacto™ Hefeextrakt, Pulver, BD <i>Nach dem Autoklavieren, Zugabe von 3 ml 10 % L-Cystein-Lösung (w/v)</i>
<b>Chrom-ID™ C.-difficile-Agar</b>	Gekauft bei bioMérieux SA, Nürtingen
<b>Columbia-Blutagar-Platten</b> (gekauft bei bioMérieux SA)	12 g pankreatisch abgebautes Casein 5 g peptisch abgebautes Tiergewebe 3 g Hefeextrakt 1 g Rindfleischextrakt 1 g Maisstärke 5 g Natriumchlorid 13,5 g Agar-Agar 5 % defibriertes Schafblut
<b>Glycerin-Lösung</b>	30:70 Glycerin-BHIS-Gemisch
<b>L-Cystein 10 % (w/v)</b>	1 g L-Cysteine hydrochloride, >98 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 52-89-1
<b>Natriumsulfid 12 % (w/v)</b>	1,2 g, Sodium sulfide nonhydrate, > 98 %, ACS Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Sigma Aldrich, CAS: 1313-84-4 016-009-00-8
<b>PBS-Puffer-Lösung</b>	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,72 g Kaliumdihydrogenphosphat
<b>Resazurin 0,1 % (w/v)</b>	1 g Resazurin sodium salt, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 62758-13-8
<b>SMC-Agar</b>	90 g Bacto™-Pepton, BD 5 g Bacto™-Proteose Peptone, Pulver, BD 1 g Ammoniumsulfat, Roth 1 g TRIS, Roth 15,5 g Agar, BD <i>Nach dem Autoklavieren, Zugabe von 3 ml 10 % L-Cystein-Lösung (w/v)</i>

### 2.1.3 Herstellung von Gallensalz-Lösungen

Zur Herstellung von 10 %-Gallensalz-Lösungen (w/v) (Tabelle 2.5) wurde je 1 g der verschiedenen Gallensalze (TCA, CA, GCA, DCA, CDCA) in 10 ml destilliertem Wasser, für LCA in 10 ml Dimethylsulfoxid, für UDCA in 10 ml Ethanol gelöst und gevortext (Bender&Hobein, Zürich, Schweiz). Entsprechend wurde zur Herstellung von intestinalen Gallensalz-Konzentrationen vorgegangen. Anschließend wurden die Lösungen sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Tabelle 2.5 Gallensalze

<b>Chenodeoxycholat (CDCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Natrium chenodeoxycholate, >97 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 2646-38-0
<b>Cholat (CA)</b> 10 % (w/v)	1 g Natrium cholate hydrate, 98 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 206986-87-0
<b>Deoxycholat (DCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Natrium deoxycholate, >97 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 302-95-4
<b>Glycocholat (GCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Natrium glycocholate hydrate, >97 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 338950-81-5
<b>Lithocholat (LCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Lithocholic acid, >95 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 434-13-9
<b>Taurocholat (TCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Taurocholate acid sodium salt hydrate, >95 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 345909-26-4
<b>Ursodeoxycholat (UDCA)</b> 10 % (w/v)	1 g Ursodeoxycholic acid, ≥99 %, Pulver, Sigma Aldrich, CAS: 128-13-2

### 2.1.4 Gallensalze

Die für diese Arbeit getesteten Konzentrationen der Gallensalze sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6 Gallensalzkonzentrationen, Angabe in Mol (mM) und Prozent (%).

D: Duodenum, J: Jejunum, die höchste und niedrigste intestinale Konzentration fett hervorgehoben. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde in dieser Tabelle auf das Komma als Dezimaltrennzeichen verzichtet.

Gallensalz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration			
		Intestinal (Moreno et. al 2006)		Stuhl (Weingarden 2016)	Standard (Sorg u. Sonenshein 2010)
		Niedrig [mM, %]	Hoch [mM, %]	Median [mM, %]	[mM, %]
<b>TCA</b>	537.68	D: <b>0.8388, 0.05</b>	D: 4.194, 0.22	0.55, 0.03	1.86, 0.1

Tabelle 2.6 Gallensalzkonzentrationen, Angabe in Mol (mM) und Prozent (%).

D: Duodenum, J: Jejunum, die höchste und niedrigste intestinale Konzentration fett hervorgehoben. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde in dieser Tabelle auf das Komma als Dezimaltrennzeichen verzichtet.

		J: 0.9694, 0.052	J: <b>4.847, 0.26</b>		
<b>CA</b>	430.55	D: <b>0.0058, 0.00025</b> J: 0.0066, 0.00028	D: 0.029, 0.0012 J: <b>0.033, 0.0014</b>	1.45, 0.06	2.32, 0.1
<b>GCA</b>	487.6	D: 0.3126, 0.01524 J: <b>0.381, 0.0185</b>	D: <b>1.563, 0.076</b> J: 1.905, 0.0929	nicht nachweisbar	2.05, 0.1
<b>CDCA</b>	414.55	D: 0.005428, 0.0002 J: <b>0.0019, 0.00008</b>	D: <b>0.027, 0.0011</b> J: 0.00967, 0.0004	0.37, 0.02	2.41, 0.1
<b>DCA</b>	414.55	D: 0.00508, 0.0002 J: <b>0.0016, 0.00007</b>	D: <b>0.0254, 0.0011</b> J: 0.0082, 0.00034	1.24, 0.05	2.41, 0.1
<b>LCA</b>	376.57	nicht nachweisbar		0.95, 0.04	2.66, 0.1
<b>UDCA</b>	392.57	nicht nachweisbar			2.54, 0.1

### 2.1.5 Auswahl der *Clostridioides-difficile*-Stämme

Die in dieser Arbeit getesteten 23 *C.-difficile*-Stämme, davon 21 klinische Isolate und 2 Referenzstämme sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Es sind der Name, die DSMZ-Nummer, der Ribotyp, Toxinotyp, Klade und die Herkunft jedes Stammes angegeben. Die klinischen Isolate wurden von der Medizinischen Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen aus humanen Stuhlproben von symptomatischen CDI-Trägern gesammelt, aufgereinigt und bei -80 °C gelagert. Die Ribotypisierung erfolgte durch Prof. Dr. Maja Rupnik in Slowenien. Die klinischen Stämme wurden von Prof. Dr. Lutz von Müller und Frau Zimmermann bereitgestellt.

Tabelle 2.7 Herkunft und Eigenschaften der getesteten *C.-difficile*-Stämme.

Name	DSMZ	Ribotyp	Toxinotyp	Toxin PCR	Klade	Herkunft
630	28645	012	0	tcdA, tcdB	1	Referenz
EC005-01-01	100007	011/049	(-)	-	1	Ghana
EC001-01-01	28666	084 (CE)	(-)	-	1	Ghana
MC008-01-01	29632	SLO 160	0	tcdA, tcdB	1	Indonesien
SC009-01-01	29745	001/072	0	tcdA, tcdB	1	Deutschland
MC001-01-01	29018	053	0	tcdA, tcdB	1	Indonesien
MC020-01-01	29644	014/020	0	tcdA, tcdB	1	Indonesien
SC045-01-01	29686	005	0	tcdA, tcdB	1	Deutschland
SC049-01-01	29687	002	0	tcdA, tcdB	1	Deutschland
Cdiff 3	27640	027	III	tcdA, tcdB, CDT	2	Deutschland
SC037-01-01	28196	027	III	tcdA, tcdB, CDT	2	Deutschland
Cdiff 1	27638	027	III	tcdA, tcdB, CDT	2	Deutschland
R20291	27147	027	III	tcdA, tcdB, CDT	2	Referenz
Lutz v. Müller	102859	023	unbekannt	tcdA, tcdB, CDT	3	Deutschland
Nübel, 2015 Dud.	102978	unbekannt	unbekannt	tcdA, tcdB, CDT	3	Deutschland
Cdiff XII	102860	127	unbekannt	tcdA, tcdB, CDT	3	Deutschland
EC003-01-01	28669	SLO 091	(-)	-	4	Ghana
MC003-01-01	29627	017	VIII	tcdB	4	Indonesien
MC005-01-01	29629	SLO 235	(-)	-	4	Indonesien
EC004-01-01	28670	SLO 237	Xib	CDT	4	Ghana
MC002-01-01	29020	126	V	tcdA, tcdB, CDT	5	Indonesien
SC052-02-01	29747	078	V	tcdA, tcdB, CDT	5	Deutschland
3022	101085	unbekannt	unbekannt	A**, CDT	5	Deutschland

\*\* tcdA als putatives Pseudogen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Wachstumsbedingungen

Die *C.-difficile*-Stämme wurden bei 37 °C in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) unter einer Gaskonzentration von 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % H<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub> kultiviert. Für Flüssigkulturen wurde BHIS (Brain Heart Infusion supplemented, BD, Heidelberg, Germany) ergänzt mit 0,5 % Hefeextrakt (BD, Heidelberg, Deutschland) und 0,03 % L-Cystein (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) benutzt. Zur Kultivierung auf Platten wurden chromID™ *C.-difficile*-Agar (CDIFF), *Clostridium difficile*-Agar (CLO) oder Columbia agar mit 5 % Schafsblut (COS) (bioMérieux Nürtingen, Deutschland) verwendet. Die Platten wurden für 24 – 48 h inkubiert.

### 2.2.2 Toxinotypisierung

Zur Detektion der Haupttoxingene (tcdA, tcdB) und der binären Toxingene (cdtA, cdtB) wurde Multiplex-PCR, entsprechend den europäischen Diagnostikstandards, verwendet. Die Toxinotypisierung erfolgte durch Prof. Dr. Maja Rupnik, Prof. Dr. Lutz von Müller, die Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, bzw. durch Genomanalysen in Kollaboration mit Dr. Thomas Riedel.

### 2.2.3 Ribotypisierung

Eine PCR-Ribotypisierung wurde bei allen *C.-difficile*-Isolaten gemäß der europäischen Leitlinie zur Diagnostik (RKI-Ratgeber - *Clostridioides-difficile*) durchgeführt. Die Analyse der charakteristischen Ribotypisierungsmuster wurde mithilfe von Kapillarelektrophoresen von Fluoreszenz-markierten Fragmenten (Beckmann Coulter, Brea, California USA) durchgeführt. Die Ribotypen wurden mithilfe von automatisierten Stammzuweisungen basierend auf dem Referenzstamm der Datenbank identifiziert (BioNumerics Version 7.1, Applied Math, Sint Martens-Latem, Belgien).

### 2.2.4 Lichtmikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Kulturen aus der Anaerobenkammer geschleust. Die Zellen wurden durch die Zentrifugation bei 12.000 rpm bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zell-Pellet in PBS-Lösung pH 7.4 (phosphate buffered saline) gereinigt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS resuspendiert und auf einem Objektträger aufgetragen. Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Mikroskop durchgeführt.



### 2.2.5 Kultivierung von *Clostridioides-difficile*-Sporen

Zur Herstellung einer Sporenlösung, wurde jeder Stamm (Tabelle 2.7) auf COS-Agar-Platten (bioMérieux, BD) unter anaeroben Bedingungen (Coy Laboratory Products) 24 – 48 h bei 37 °C kultiviert. Zur Induktion der Sporulation wurden drei bis fünf Kolonien mithilfe von sterilen Impfschlingen (10 µL, Sarstedt) auf SMC-Agar-Platten übertragen und erneut fünf bis sieben Tage bei 37 °C anaerob inkubiert (Edwards und McBride 2016). Anschließend wurden die Platten 24 h aerob und bei Raumtemperatur gelagert, um den Großteil vegetativer Zellen abzutöten. Unter der Laminar flow (Thermo Scientific) erfolgte die Probenentnahme der Sporen mithilfe von sterilen Impfschlingen in 10 %-PBS-Lösung. Um restliche vegetative Zellen abzutöten, wurde die Lösung für 25 min bei 60 °C erhitzt, danach drei bis fünf Mal mit 10 % PBS-Lösung gewaschen und das Zell-Pellet in PBS gelöst. Von der Sporenlösung wurden 500 µL-Aliquots in 1,5 ml Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) angefertigt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Sporenzahl erfolgte mit einer Bakterienzählkammer nach Thoma (0,01 mm Tiefe, 1/25 mm<sup>2</sup> je Großquadrat) im Doppelansatz mit jeweils 10 µl Probe. Dazu wurden je 6 Großquadrate ausgezählt und der Großquadratmittelwert berechnet (Formel 1)

$$N_{(\text{zellzahl pro ml})} = \frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}} \cdot 2,5 \cdot 10^6 \cdot VDF$$

**Formel 1: Berechnung der Zellzahl (N).** VDF, Verdünnungsfaktor.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde das sterile Arbeiten unter dem Bunsenbrenner oder der Laminar flow (Thermo Scientific, zur Sporenaufbereitung) gewährleistet.

### 2.2.6 Kultivierung von vegetativen *Clostridioides-difficile*

Mithilfe der Hungate-Technik wurden *C. difficile*-Sporen zum Keimen gebracht, um eine reine Kultur mit vegetativen Zellen zu erhalten (Hungate 1950). Dazu wurde 10 µL Sporenlösung in 4 ml BHIS-Medium mit 0,03 % L-Cystein-Zusatz (w/v) in anaeroben Hungates bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Auskeimung der Sporen zu induzieren, wurde das BHIS-Medium mit 0,1 % TCA (w/v) angereichert. Das bakterielle Wachstum wurde anhand stündlicher Messungen der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) in einem Spektralphotometer (Nanocolor Vis II, Marchery Nagel) verfolgt. Ein Anstieg der OD<sub>600</sub> korrelierte mit einem bakteriellen Wachstum. Sobald das exponentielle Wachstum eingetreten und die OD<sub>600</sub> auf 0,5 gestiegen war, wurden die Zellen in einem neuen Hungate in einer 1:100 Verdünnung in BHIS ohne TCA kultiviert und erneut bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Dieser Prozess wurde noch einmal für eine 1:100 BHIS-Verdünnung wiederholt. Die exponentiellen Zellen (OD<sub>600</sub> ~0,5) wurden abzentrifugiert, das Zellpellet in 500 µL (30:70) Glycerin-BHIS-Gemisch gelöst und die Kultur bei -20 °C gelagert. Zum Animpfen der Stämme wurden 40 µL der Glycerin-Stammlösung in 4 ml BHIS-Medium inkubiert.

### 2.2.7 Keimungsverhalten von Sporen unter Gallensalzen

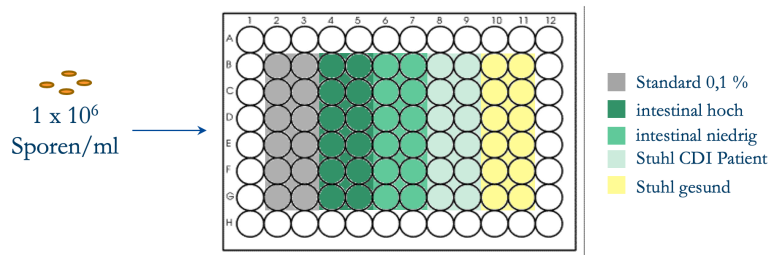


Abbildung 2.1 Wellplatten-Versuchsaufbau zur Inkubation von *C.-difficile*-Sporen mit verschiedenen Gallensalzen.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde das Keimungsverhalten von Sporen unter unterschiedlichen intestinalen Gallensalzkonzentrationen durch Messungen der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) in Wellplatten (Abbildung 2.1) untersucht. Dazu wurde pro Well eine Menge von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml, in 2 ml flüssigem BHIS-Medium unter Zugabe der verschiedenen Gallensalzkonzentrationen für 24 h anaerob inkubiert. Insgesamt wurden sieben Gallensalze (TCA, CA, GCA, DCA, CDCA, LCA und UDCA) in fünf verschiedenen Konzentrationen getestet. Die getesteten Konzentrationen sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen. Zur Abtötung restlicher vegetativer *C.-difficile*-Zellen erfolgte eine 25-minütige Erhitzung der Sporensuspension auf 60 °C. Um sicherzustellen, dass diese Methode alle vegetativen Zellen eliminiert, diente die sporulationsunfähige Spo0A-Mutante (Cdiff 1; DSM 27638) als Negativkontrolle. Zur Aktivierung der enzymatischen Aktivität, wurden die Gallensalze vor Zugabe zum Medium im Heizblock (Schütt, Göttingen) 10 min auf 37 °C erwärmt. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch Messungen der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) zum Zeitpunkt 0 ( $t_0$ ) und nach 24 h ( $t_{24}$ ). Bei Zunahme der  $OD_{600}$  zum Zeitpunkt  $t_{24}$  wurde jede Probe unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Reinheit, Motilität und Morphologie der vegetativen Zellen begutachtet.

### 2.2.8 Wachstumsverhalten unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen

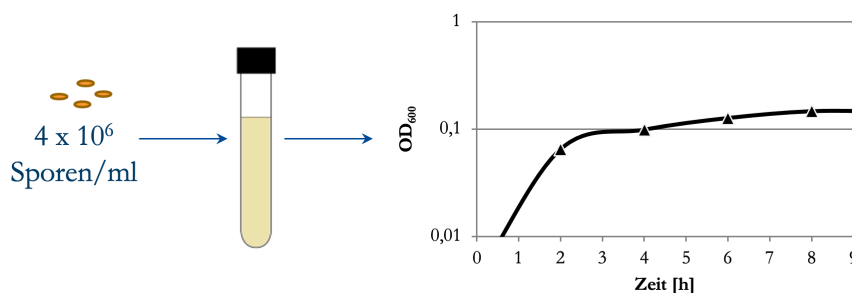


Abbildung 2.2 Hungate-Versuchsaufbau zur Ermittlung der Wachstumskurve von auskeimenden *C.-difficile*-Sporen in vegetative Zellen.

Um das Auskeimen der Sporen und das anschließende Wachstum von *C.-difficile* darzustellen, wurde mithilfe von Hungate-Röhrchen das Wachstumsverhalten von *C.-difficile* unter vier unterschiedlichen Gallensalzkonzentrationen in einem Zeitraum von 9 h analysiert. Die Inkubationszeit

wurde auf neun Stunden beschränkt, da bisherige Studienergebnisse zeigten, dass nach diesem Zeitraum eine Auskeimung auch unabhängig eines Gallensalzeinflusses stattfindet (Pereira et al. 2013). Dazu wurden  $4 \times 10^6$  Sporen/ml in 4 ml anaerobem BHIS-Flüssigmedium mit fünf verschiedenen Gallensalzen bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde anhand von stündlichen OD<sub>600</sub>-Messungen mithilfe eines Spektralphotometer (Nanocolor Vis II, Marchery Nagel) dokumentiert (Abbildung 2.2). Um zu untersuchen, wie Gallensalze das Wachstum unter physiologischen Bedingungen beeinflussen wurden das Wachstum reinem BHIS-Medium, für keimungsaktivierende Gallensalze (TCA, GCA, CA) hohe duodenale Konzentrationen und für keimungsinhibierende Gallensalze (CDCA, DCA) zusätzlich hohe jejunale Konzentrationen (Tabelle 2.6) getestet. LCA konnte intestinal nicht detektiert werden (Perez de la Cruz Moreno et al. 2006).

### 2.2.9 Sporulationsverhalten unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen

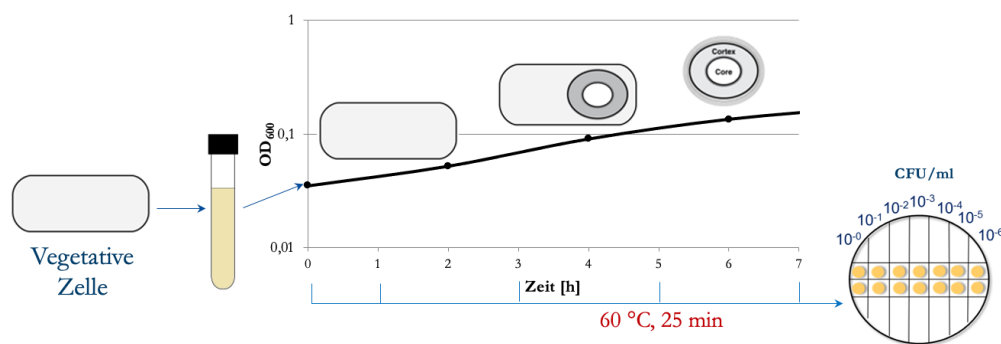


Abbildung 2.3 Sporulationsassay-Versuchsaufbau zur Ermittlung der Sporen in CFU/ml von *C.-difficile*.

Um den Einfluss von wachstumsinhibierenden Gallensalzen auf die Sporulationsinduktion zu untersuchen, wurden Sporulationsassays durchgeführt (Abbildung 2.3). Dazu wurden vegetative *C.-difficile*-Zellen in anaerobem BHIS-Medium in Hungate-Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad (Wasserbad-Schüttler, Köttermann) kultiviert. Es wurden 40 µL der vegetativen Zellen in 4 ml anaerobem BHIS-Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen (Vorkultur 1). Diese Vorkultur wurde anschließend genutzt, um sechs neue Hungate-Röhrchen mit 4 ml anaeroben BHIS-Medium und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 anzupfen. Diese Subkultivierung ermöglichte dabei das Wachstum rein exponentieller vegetativer Zellen. Sobald die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> 0,5 angewachsen war, wurde 200 µL Probe mit einer sterilen Impfnadel (Sterican-Kanüle, Größe 17, Braun) entnommen, in ein 1,5-ml Eppendorfgefäß überführt und für 25 min bei 60 °C erhitzt um vegetative Zellen abzutöten. Anschließend wurden sequentielle Verdünnungsreihen (10<sup>0</sup> – 10<sup>6</sup>) der Probe in PBS-Lösung angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde jeweils 10 µl im Doppelansatz auf Chrom-ID-Platten aufgetropft und für 24 h unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Diese Probe diente später als Referenz zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>, ohne den Einfluss von Gallensalzen. Parallel dazu wurden jeweils zwei inhibierende Gallensalzkonzentrationen von CDCA, DCA und LCA (hohe intestinale- (CDCA 0,027 mM/0,0011 %; DCA 0,0254 mM/0,0011 %), und Stuhlkonzentration (CDCA 0,37 mM/0,02 %; DCA 1,24 mM/0,05 %; LCA 0,95 mM/0,04 %) in einem Volumen von 4,5 – 22,5 µl mit einer sterilen Impfnadel der exponentiell wachsenden Kultur zugefügt und für weitere 7 h bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten t<sub>1</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>5</sub> und t<sub>7</sub> wurden erneut

200 µl Probe der Kultur entnommen, entsprechend erhitzt und Sporenassays angefertigt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Auszählung der CFU/ml nach 24 h.

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Wellplattenexperimente und der Sporulationsassays von *C.-difficile* wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Ergebnisse der Wachstumskurven wurden übersichtshalber als Mittelwerte ohne Standardabweichung angegeben. Mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, VA, USA) und SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) wurden die Daten ausgewertet. Die GLM-Regressionsmodelle wurden auf logarithmischen Werten aufgebaut, weil diese zum Vergleich aller Gruppen untereinander (Kladen, Gallensalze, Dosen) besser geeignet waren. Das Problem des multiplen Testens wurde mithilfe der Tukey-Methode adjustiert. Als statistisch signifikant galten p-Werte kleiner oder gleich 0,05.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Keimungsverhalten von *Clostridioides-difficile*-Sporen

Im Rahmen von Vorversuchen wurden 23 klinische Isolate und Referenzstämme von *C.-difficile* (Tabelle 2.7) mit unterschiedlichen Gallensalzen (Tabelle 2.6) für 24 h inkubiert, um das Auskeimungsverhalten von Sporen unter verschiedenen Gallensalzkonzentration zu untersuchen. *C.-difficile* wird in fünf Kladen subklassifiziert. Um zu untersuchen ob sich stamm- oder kladenspezifische Unterschiede im Keimungs-/Sporulationsverhalten zeigen, wurden mindestens drei Isolate aus jeder Klade getestet (Tabelle 2.7): zwei Referenzstämme (RT 012, RT 027), der prävalenteste Stamm in Deutschland (RT 001), sowie epidemische Stämme (vier RT 027 und ein RT 078) aus Deutschland (12), Großbritannien (1), Ghana (4) und Indonesien (6). Zwei Stämme darunter sind bekannt für Zoonosen (RT 017; 078). Weiterhin wurden die Stämme in toxisch produzierende (Toxin A (TcdA; Enterotoxin), Toxin B (TcdB; Zytotoxin), binäres Toxin (CDT), und nicht-toxische Stämme eingeteilt und getestet.

Zu jeder Messung wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, die die Inkubation der *C.-difficile*-Stämme in nur reinem BHIS-Medium ohne Zugabe von Gallensalzen beinhaltete. Dies war notwendig, da gezeigt werden konnte, dass einige klinische Isolate in der Lage sind in reinem BHIS-Medium auszukeimen (Garneau et al. 2014).

Das Wachstum der Stämme wurde nach 24 h Inkubation durch die Messung der optischen Dichte bei einer Lichtabsorption von 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt. Zur optimalen Darstellung des Wachstums entsprechend ihrer  $OD_{600}$ -Werte wurden  $OD_{600}$ -Grenzwerte definiert. Bei Zugabe von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml zeigten die Grund- $OD_{600}$ -Werte bei  $t_0$  eine Spannbreite zwischen 0 und 0,02. Das Wachstum nach 24 h ( $t_{24}$ ) wurde wie in Tabelle 3.1 dargestellt, so definiert: Sehr starkes Wachstum ( $OD_{600}$ -Anstieg  $\geq 0,2$ ; dunkelgrün), starkes Wachstum ( $OD_{600}$ -Anstieg  $\geq 0,1$ ; hellgrün), geringes Wachstum ( $OD_{600}$ -Anstieg  $\geq 0,05$ ; orange) und kein relevantes Wachstum ( $OD_{600}$ -Anstieg  $\leq 0,049$ ; rot). Zudem wurden die Werte in den Tabellen und Diagrammen zur Orientierung farblich markiert.

Tabelle 3.1 Definierte Grenzwerte, Definition und farbliche Markierung der  $OD_{600}$ -Werte zur optimierten Darstellung des Auskeimungs- und Wachstumsverhaltens (siehe Abbildung 3.1).

<b><math>OD_{600}</math>-Wertegrenze</b>	<b>Definition</b>	<b>farbliche Markierung</b>
$\geq 0,2$	sehr starkes Wachstum	dunkelgrün
$\geq 0,1$	starkes Wachstum	hellgrün
$\geq 0,05$	geringes Wachstum	orange
$\leq 0,049$	kein Wachstum	rot

### 3.1.1 Keimungsverhalten in reinem BHIS-Medium

Die Untersuchung des Auskeimungsverhaltens der *C.-difficile*-Sporen in reinem BHIS-Medium zeigt Abbildung 3.1. Die Ribotypen 001/071 (Klade 1), sowie alle Stämme der Klade 3 und 5 präsentierten ein deutliches Wachstum, während die meisten Stämme der Klade 2 und 4 kein Wachstum vorwiesen. Insgesamt erfolgte bei neun Stämmen kein Wachstum im BHIS-Medium (RT 011/049 (1), 053 (1), 005(1), 027 (2), 017 (4), SLO091(4), SLO235 (4)). Es lässt sich demnach ein stamm-spezifisches Wachstumsverhalten erkennen, auch in reinem BHIS-Medium ohne Gallensalzeinfluss. Um zu untersuchen, ob sich ein kladenspezifisches Wachstumsverhalten zeigt, wurden die zusammengefassten OD<sub>600</sub>-Mittelwerte jeder Klade in der Negativkontrolle miteinander verglichen. Wie in der Abbildung 3.2 und der Tabelle 3.2 zu sehen ist, unterscheiden sich die Mittelwerte der Klade 3 und 5 signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,001$ ) zu den restlichen Klade, ebenso unterscheiden sich die Klade 1 und 4 ( $p$ -Wert 0,0041). Die Klade 1/2 und 2/4 unterscheiden sich dabei nicht voneinander. Die einzelnen *C.-difficile*-Stämme können mit Ausnahme von Klade 2 durch ihre Auskeimungsraten in BHIS spezifischen Klade zugeteilt werden.

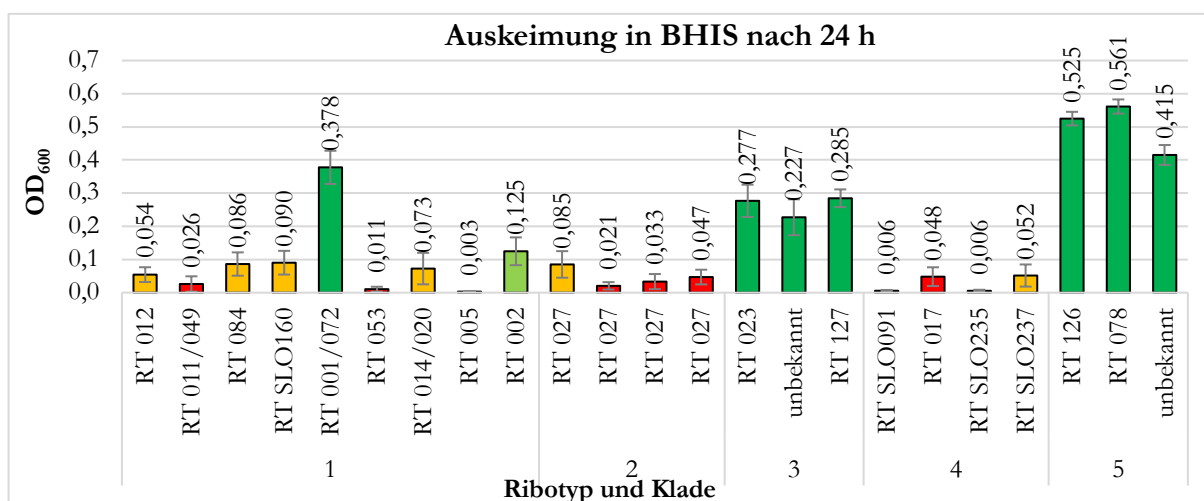


Abbildung 3.1 OD<sub>600</sub>-Mittelwerte aller *C.-difficile*-Stämme nach 24 h Inkubation in BHIS-Medium. N = 14.

### 3.1.2 Vergleich des Einflusses aller Gallensalze auf die Auskeimung von *Clostridioides-difficile*

Zur Überprüfung der Hypothese, dass einige Gallensalze (TCA, GCA, CA) aktivierend und andere Gallensalze wiederum wachstumsinhibierend (CDCA, DCA, LCA) auf Sporen von *C.-difficile* wirken, wurde das Wachstum (OD<sub>600</sub>) aller Stämme innerhalb der getesteten Gallensalze verglichen. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 2.6 einsehbar. Die signifikant höheren OD<sub>600</sub>-Werte unter TCA, GCA und CA ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ ) in Abbildung 3.3 bestätigen einen wachstumsaktivierenden Einfluss verglichen zu den wachstumshemmenden Gallensalzen CDCA, DCA, LCA und UDCA. Bei Betrachtung der wachstumsaktivierenden Wirkung unterschieden sich TCA und GCA nicht voneinander. Cholat zeigte hier im Vergleich zu TCA/GCA einen signifikant geringe-

ren wachstumsfördernden Effekt (p-Wert 0,0127 bzw. 0,0001). Unter den wachstumshemmenden Gallensalzen unterscheiden sich nur UDCA und CDCA signifikant (p-Wert 0,0003) voneinander, die restlichen Gallensalze (CDCA, DCA und LCA) sind nicht signifikant. Diese Ergebnisse bestätigten, dass CA, GCA und TCA die Auskeimung und das Wachstum fördern und CDCA, UDCA, DCA und LCA wachstumshemmend auf *C.-difficile* wirken.

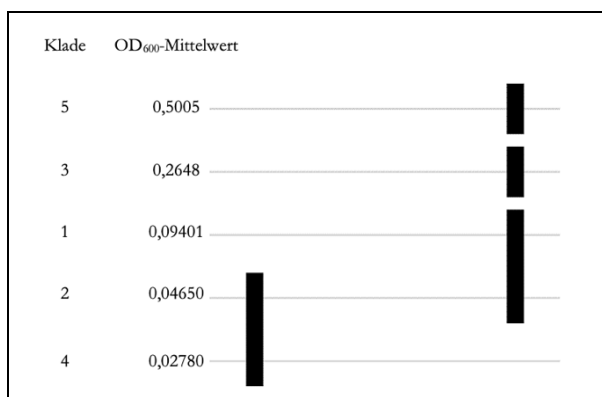


Abbildung 3.2 Vergleich des Wachstumsverhaltens als Mittelwert ihrer Klade in BHIS. Aufgelistet sind die fünf Klade und OD<sub>600</sub>-Mittelwerte links.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Klade  
Pr > |t| für H<sub>0</sub>: LS<sub>Mean</sub>(i) = LS<sub>Mean</sub>(j)  
Abhängige Variable: gemessene Werte

i/j	1	2	3	4	5
1	-	0,0797	<,0001	0,0041	<,0001
2	0,0797	-	<,0001	0,9075	<,0001
3	<,0001	<,0001	-	<,0001	<,0001
4	0,0041	0,9075	<,0001	-	<,0001
5	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	-

Tabelle 3.2 Signifikanzniveaus der Klade.

Mittelwerte innerhalb eines Balkens zeigen keinen signifikanten Unterschied. Höchste Wachstumsraten zeigen Klade-5-Stämme (OD<sub>600</sub> 0,5005), niedrigste Wachstumsraten Klade-4-Stämme (OD<sub>600</sub> 0,02780).

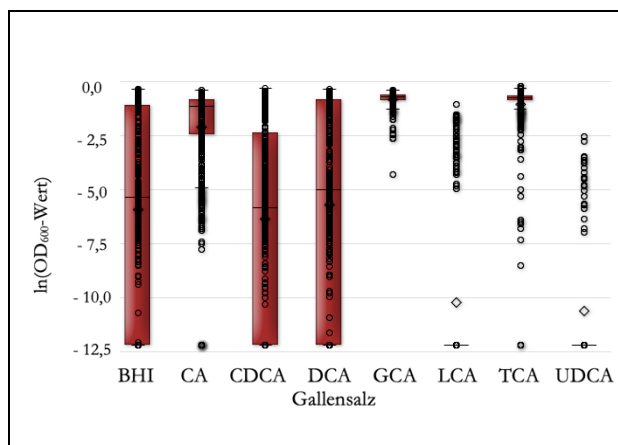


Abbildung 3.3 Auskeimung und Wachstum von 23 *C.-difficile*-Stämmen unter den Gallensalzen TCA, CA, GCA, CDCA, UDCA, DCA und LCA. Dargestellt sind die OD<sub>600</sub>-Mittelwerte unter den getesteten Konzentrationen (vgl. Tabelle 2.6), zusammengefasst pro Gallensalz.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Gallensalz  
Pr > |t| für H<sub>0</sub>: LS<sub>Mean</sub>(i) = LS<sub>Mean</sub>(j)  
Abhängige Variable: ln\_Werte

i/j	CA	CDCA	DCA	GCA	LCA	TCA	UDCA
CA	-	<,0001	<,0001	0,0001	<,0001	0,0127	<,0001
CDCA	<,0001	-	0,1807	<,0001	0,3799	<,0001	0,0003
DCA	<,0001	0,1807	-	<,0001	0,9997	<,0001	0,4958
GCA	0,0001	<,0001	<,0001	-	<,0001	0,8970	<,0001
LCA	<,0001	0,3799	0,9997	<,0001	-	<,0001	0,2641
TCA	0,0127	<,0001	<,0001	0,8970	<,0001	-	<,0001
UDCA	<,0001	0,0003	0,4958	<,0001	0,2641	<,0001	-

Tabelle 3.3 Signifikanzniveaus aller Gallensalze im Vergleich.

### 3.1.3 Keimungsverhalten bei Anwesenheit von keimungsaktivierenden Gallensalzen

Zur Untersuchung ob sich innerhalb der Gallensalze TCA, GCA und CA Unterschiede in der Keimungsaktivierung innerhalb der Stämme/Klode oder in Abhängigkeit von den getesteten Konzentrationen zeigen, wurden die Mittelwerte der OD<sub>600</sub> aller Stämme (Tabelle 3.4) ermittelt.

Unter TCA und GCA sind alle Stämme ausgekeimt. Unter den getesteten CA-Konzentrationen zeigten sich dosisabhängig unterschiedliche Wachstumsaktivierungen innerhalb der Stämme.

Dann wurde untersucht, ob sich die intestinalen Konzentrationen der wachstumsaktivierenden Gallensalze TCA, GCA und CA im Vergleich zur Standardkonzentration von 0,1 % oder zu den Stuhlkonzentrationen hinsichtlich der Sporenauskeimung unterscheiden. Für die Ermittlung der dosisspezifischen Auskeimungsrate unter einem Gallensalz wurden die Wachstumsmittelwerte aller Stämme unter den verschiedenen Gallensalzkonzentrationen miteinander verglichen. Wie in den Abbildungen 3.5 – 3.7 zu sehen ist, zeigte die Sporenauskeimung bei TCA unter den getesteten Stuhl- (0,03 %) und Intestinalkonzentration (0,26 u. 0,05 %), sowie der Standardkonzentration (Abbildung 3.4) keine Unterschiede. Die Sporenauskeimung ist unter der intestinalen GCA-Konzentration (0,02 %) signifikant geringer ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ ) als in der Standard-Konzentration (0,1 %) (Abbildung 3.5). Ebenso zeigen sich signifikante Unterschiede der Keimungsaktivierung unter den CA-Konzentrationen. Es fällt auf, dass CA eine dosisabhängige Wirkung zeigt (Abbildung 3.6). In einer zu geringen Konzentration (0,000249 %, intestinal) hat es keinen Einfluss auf die Sporenauskeimung. Ab einer erhöhten Dosis (0,00124 – 0,06 %) erfolgt eine Initiation der Keimung, wobei 0,00124 % optimal und 0,06 % moderat ist. Überschreitet man die Konzentration von 0,06 %, in diesem Fall 0,1 %, wirkt CA inhibierend. Eine wachstumsaktivierende Wirkung der Gallensalzen TCA, GCA und CA konnte bestätigt werden. Es zeigten sich jedoch keine stamm- oder kladenspezifischen Unterschiede in der Keimungsaktivierung.

Tabelle 3.4 Auskeimung und Wachstum von *C. difficile*-Isolaten nach 24 h Inkubation unter TCA, GCA und CA. Getestete Ribotypen mit entsprechender Klade und Gallensalzkonzentrationen (Angabe in Prozent und Milimolar) sind aufgelistet.

Gallensalz		TCA				GCA		CA			
Herkunft der Konzentrationen		Standard	Intestinal hoch	Intestinal niedrig	Stuhl CDI	Standard	Intestinal	Standard	Intestinal hoch	Intestinal niedrig	Stuhl CDI
		0,1 %	0,26 %	0,05 %	0,03 %	0,1 %	0,02 %	0,1 %	0,001 %	0,0003 %	0,06 %
Klade	Ribotyp	1,86 mM	4,85 mM	0,84 mM	0,55 mM	2,05 mM	0,32 mM	2,32 mM	0,03 mM	0,01 mM	1,45 mM
1	012	0,198	0,400	0,450	0,459	0,339	0,397	0,144	0,437	0,380	0,346
	011/049	0,500	0,487	0,415	0,439	0,472	0,308	0,172	0,286	0,190	0,245
	084 (CE)	0,380	0,438	0,470	0,446	0,537	0,486	0,090	0,450	0,470	0,344
	SLO 160	0,245	0,466	0,469	0,485	0,488	0,473	0,243	0,485	0,455	0,370
	001/72	0,543	0,497	0,523	0,523	0,552	0,511	0,191	0,535	0,501	0,345
	053	0,514	0,478	0,418	0,480	0,508	0,469	0,226	0,431	0,202	0,327
	014/020	0,516	0,507	0,286	0,351	0,551	0,351	0,222	0,164	0,277	0,218
	005	0,523	0,503	0,482	0,444	0,560	0,476	0,241	0,354	0,163	0,207
002	0,419	0,425	0,453	0,456	0,464	0,474	0,174	0,467	0,492	0,187	
2	027	0,500	0,504	0,428	0,478	0,587	0,382	0,168	0,276	0,154	0,227
	027	0,261	0,413	0,417	0,435	0,370	0,403	0,123	0,416	0,095	0,297
	027	0,380	0,485	0,523	0,525	0,535	0,508	0,191	0,489	0,451	0,426
	027	0,378	0,450	0,423	0,483	0,545	0,396	0,232	0,375	0,235	0,330
3	023	0,515	0,461	0,472	0,501	0,542	0,530	0,179	0,479	0,459	0,390
	unbekannt	0,548	0,433	0,464	0,389	0,580	0,514	0,215	0,504	0,468	0,174
	127	0,331	0,437	0,357	0,365	0,496	0,375	0,203	0,385	0,296	0,206
4	SLO 091	0,322	0,219	0,274	0,322	0,323	0,293	0,278	0,191	0,147	0,217
	017	0,552	0,416	0,329	0,543	0,567	0,358	0,339	0,227	0,003	0,234
	SLO 235	0,386	0,447	0,356	0,535	0,497	0,323	0,296	0,232	0,020	0,197
	SLO 237	0,453	0,450	0,446	0,327	0,489	0,381	0,141	0,248	0,072	0,085
5	126	0,747	0,607	0,459	0,565	0,545	0,514	0,334	0,523	0,473	0,293
	078	0,432	0,570	0,403	0,462	0,594	0,501	0,196	0,486	0,625	0,152
	unbekannt	0,494	0,535	0,351	0,127	0,603	0,428	0,216	0,503	0,473	0,076



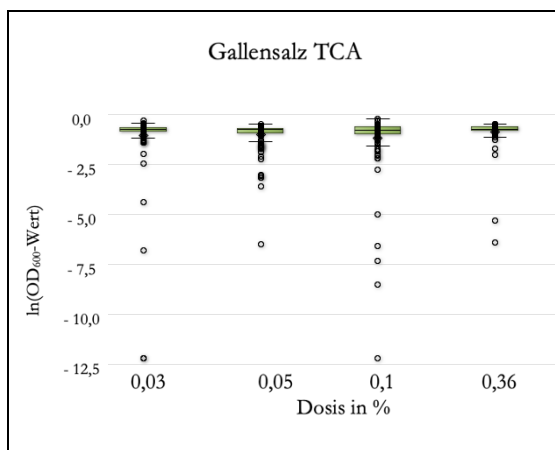


Abbildung 3.4 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter TCA. Dosisangabe in %.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Dosis TCA  
 $Pr > |t|$  für  $H_0: LS\text{Mean}(i) = LS\text{Mean}(j)$   
 Abhängige Variable: ln\_Werte

i/j	0,03	0,05	0,26	0,1
0,03	-	0,9807	0,7192	0,7457
0,05	0,9807	-	0,9011	0,5206
0,26	0,7192	0,9011	-	0,2090
0,1	0,7457	0,5206	0,2090	-

Tabelle 3.5 Signifikanzniveaus unter TCA.

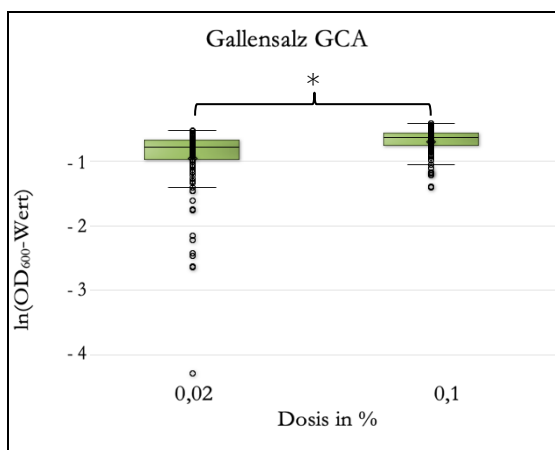


Abbildung 3.5 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter GCA. Dosisangabe in %.

Dosis GCA	Mittelwerte	$H_0: LS\text{Mean}1 = LS\text{Mean}2$
		$Pr >  t $
0,02	-0,9359156	<,0001
0,1	-0,6901539	

Tabelle 3.6 Signifikanzniveaus unter GCA.

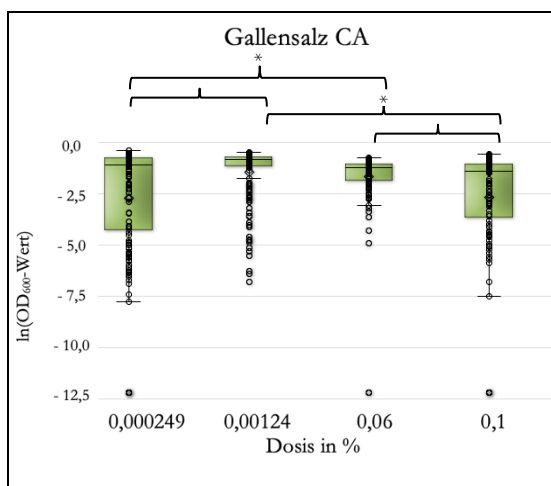


Abbildung 3.6 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter CA. Dosisangabe in %.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Dosis CA  
 $Pr > |t|$  für  $H_0: LS\text{Mean}(i) = LS\text{Mean}(j)$   
 Abhängige Variable: ln Werte

i/j	0,06	0,00124	0,000249	0,1
0,06	-	0,3545	0,0040	0,0021
0,00124	0,3545	-	<,0001	<,0001
0,000249	0,0040	<,0001	-	0,9863
0,1	0,0021	<,0001	0,9863	-

Tabelle 3.7 Signifikanzniveaus unter CA.

Links Abbildung 3.4 – Abbildung 3.6 mit OD<sub>600</sub>-Mittelwerte aller Stämme nach 24 h Inkubation unter den getesteten Konzentrationen von TCA, GCA, CA und rechts Tabellen 3.5 – 3.7 mit den zugehörigen Signifikanzniveaus. Signifikante Gruppen ( $p$ -Wert < 0,0001) wurden mit \* markiert.

### 3.1.4 Keimungsverhalten bei Anwesenheit von wachstumsinhibierenden Gallensalzen

Der wachstumsinhibierende Einfluss von CDCA, LCA, DCA und UDCA auf *C.-difficile* zeigt sich in den ermittelten OD<sub>600</sub>-Mittelwerten in Tabelle 3.8. Unter der Standardkonzentration von 0,1 % und den jeweiligen Stuhlkonzentrationen wirkten die Gallensalze CDCA, LCA, DCA und UDCA inhibitorisch auf die Auskeimung und das Wachstum. Im Vergleich dazu zeigten die intestinalen Konzentrationen, dass eine Auskeimung der Sporen nicht suffizient unterdrückt werden konnte. Dabei sind alle Isolate der Klade 3 und 5 unter CDCA und DCA gekeimt und gewachsen; während die Klade-4-Isolate unter den intestinalen CDCA-Konzentrationen nicht auskeimten.

Tabelle 3.8 Messung der OD<sub>600</sub> der *C.-difficile*-Isolate nach 24 h Inkubation unter den keimungsinhibierenden Gallensalzen CDCA, LCA und DCA. Getestete Ribotypen mit Kladen sowie getestete Gallensalzkonzentrationen (Angabe in Prozent und Milimolar) sind aufgelistet.

Gallensalz		CDCA					LCA		DCA				
Herkunft der Konzentrationen		Standard	Intestinal hoch	Intestinal medium	Intestinal niedrig	Stuhl CDI	Standard	Stuhl gesund	Standard	Stuhl gesund	Intestinal hoch	Intestinal medium	Intestinal niedrig
		0,1 %	0,001 %	0,0004 %	0,0001 %	0,02 %	0,1 %	0,04 %	0,1 %	0,05 %	0,001 %	0,0003 %	0,00007 %
Klade	Ribotyp	2,41 mM	0,03 mM	0,01 mM	0,002 mM	0,37 mM	2,65 mM	0,95 mM	2,41 mM	1,24 mM	0,03 mM	0,008 mM	0,002 mM
1	012	0,000	0,007	0,123	0,115	0,002	0,017	0,013	0,002	0,000	0,399	0,380	0,304
	011/049	0,033	0,056	0,003	0,002	0,001	0,091	0,009	0,001	0,001	0,495	0,254	0,091
	084 (CE)	0,001	0,138	0,167	0,315	0,002	0,038	0,061	0,019	0,000	0,439	0,486	0,439
	SLO 160	0,005	0,004	0,114	0,105	0,001	0,012	0,037	0,021	0,000	0,392	0,426	0,340
	001/72	0,093	0,465	0,528	0,531	0,000	0,025	0,030	0,000	0,000	0,487	0,558	0,544
	053	0,042	0,210	0,057	0,005	0,003	0,081	0,006	0,003	0,001	0,551	0,283	0,189
	014/020	0,014	0,007	0,003	0,003	0,002	0,000	0,000	0,002	0,002	0,541	0,028	0,004
	005	0,017	0,513	0,002	0,002	0,001	0,092	0,004	0,000	0,001	0,509	0,039	0,006
	002	0,009	0,331	0,187	0,244	0,000	0,053	0,002	0,003	0,000	0,439	0,425	0,255
2	027	0,017	0,198	0,173	0,071	0,004	0,054	0,014	0,004	0,004	0,501	0,250	0,152
	027	0,078	0,048	0,075	0,083	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,242	0,090	0,075
	027	0,030	0,059	0,107	0,053	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,358	0,306	0,088
	027	0,005	0,004	0,040	0,026	0,001	0,006	0,054	0,022	0,000	0,324	0,160	0,099
3	023	0,164	0,276	0,406	0,330	0,008	0,008	0,024	0,001	0,006	0,458	0,467	0,476
	unbekannt	0,007	0,152	0,306	0,331	0,003	0,000	0,000	0,001	0,001	0,462	0,465	0,391
	127	0,085	0,281	0,334	0,354	0,004	0,028	0,008	0,004	0,004	0,372	0,360	0,379
4	SLO 091	0,007	0,003	0,016	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,284	0,114	0,012
	017	0,000	0,065	0,005	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,456	0,012	0,003
	SLO 235	0,008	0,001	0,013	0,007	0,000	0,007	0,000	0,001	0,000	0,448	0,139	0,018
	SLO 237	0,000	0,005	0,001	0,001	0,001	0,076	0,000	0,005	0,000	0,274	0,003	0,002
5	126	0,009	0,475	0,540	0,515	0,000	0,088	0,000	0,000	0,000	0,595	0,571	0,521
	078	0,000	0,491	0,526	0,549	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,580	0,589	0,595
	unbekannt	0,062	0,396	0,486	0,475	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,559	0,486	0,517

Zur Untersuchung der unterschiedlichen wachstumsinhibierenden Wirkung von CDCA, DCA und LCA in Abhängigkeit von der Konzentration, wurden die Auskeimungsraten unter den intestinalen Konzentrationen im Vergleich zu den Standardkonzentrationen von 0,1 % ermittelt. Die dosis-spezifischen Auskeimungsraten unter den jeweiligen Konzentrationen in den Abbildungen 3.7 – 3.9 zeigten, dass eine Sporenkeimung unter den CDCA- und DCA Konzentrationen im Stuhl- (CDCA 0,02 %; DCA 0,05 %) oder der Standardkonzentration (0,1 %) signifikant stärker inhibiert wurde ( $p$ -Wert < 0,0001) als im Intestinum (CDCA 0,00008 – 0,00112 %; DCA 0,001052 %; 0,00034 %; 0,000068 %). Während bei Anwesenheit der Gallensäuren unter den Bedingungen der Stuhlkonzentrationen alle Stämme inhibiert wurden, konnte bei intestinalen Gallensalzkonzentrationen die Sporenkeimung weniger bis gar nicht inhibiert werden. Die wachstumsinhibierende Wirkung von LCA bei Konzentrationen, die denen des Stuhls (0,04 %) und des Standard (0,1 %) entsprechen,

war identisch. Somit konnten bei CDCA und DCA lediglich die Konzentrationen, die denen im Stuhl entsprechen, eine Auskeimung der Sporen und das Wachstum inhibieren.

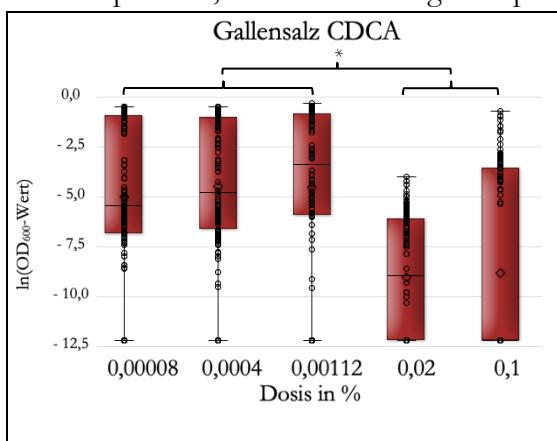


Abbildung 3.7 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter CDCA. Dosisangabe in %.

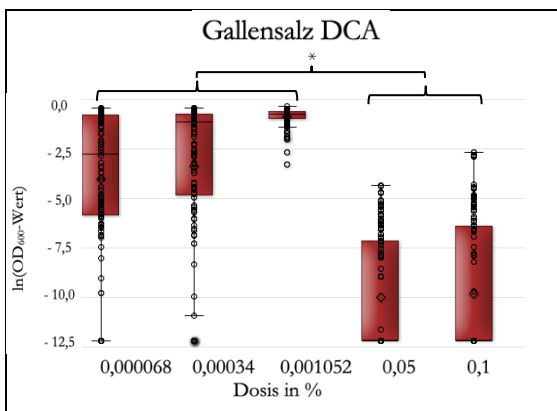


Abbildung 3.8 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter DCA. Dosisangabe in %.

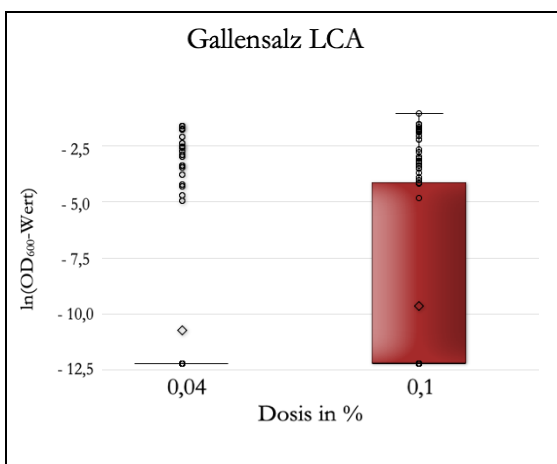


Abbildung 3.9 Dosisabhängige OD<sub>600</sub>-Mittelwerte nach 24 h Inkubation unter LCA. Dosisangabe in %.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Dosis CDCA  
 $Pr > |t|$  für  $H_0: LS\text{Mean}(i) = LS\text{Mean}(j)$   
 Abhängige Variable: ln\_Werte

i/j	0.02	0.00008	0.00112	0.000401	0.1
0.02		<.0001	<.0001	<.0001	0.9668
0.00008	<.0001		0.9801	0.7305	<.0001
0.00112	<.0001	0.9801		0.9828	<.0001
0.000401	<.0001	0.7305	0.9828		<.0001
0.1	0.9668	<.0001	<.0001	<.0001	

Tabelle 3.9 Signifikanzniveaus unter CDCA.

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte für Effekt Dosis DCA  
 $Pr > |t|$  für  $H_0: LS\text{Mean}(i) = LS\text{Mean}(j)$   
 Abhängige Variable: ln\_Werte

i/j	0.05	0.00034	0.000068	0.001052	0.1
0.05		<.0001	<.0001	<.0001	0.9966
0.00034	<.0001		0.3371	<.0001	<.0001
0.000068	<.0001	0.3371		<.0001	<.0001
0.001052	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001
0.1	0.9966	<.0001	<.0001	<.0001	

Tabelle 3.10 Signifikanzniveaus unter DCA.

$H_0: LS\text{Mean}1 = LS\text{Mean}2$   
 Dosis LCA Mittelwert  
 $Pr > |t|$

0.04	-10.9810375	0.0595
0.1	-10.0797737	

Tabelle 3.11 Signifikanzniveaus unter LCA.

Links Abbildung 3.7 – 3.9 OD<sub>600</sub>-Mittelwerte unter CDCA, DCA, LCA und rechts zugehörige Tabellen 3.8 – 3.11 mit den zugehörigen Signifikanzniveaus. Signifikante Gruppen ( $p$ -Wert < 0,0001) wurden mit \* markiert.

## 3.2 Bestimmung der Wachstumsraten von *Clostridioides-difficile*

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss intestinale Gallensalzkonzentrationen auf das Wachstum der vegetativen *C.-difficile*-Isolate haben und ob sich stammspezifische Unterschiede zeigen. Dazu wurde der Verlauf des vegetativen Wachstums der *C.-difficile*-Sporen mittels Wachstumskurven analysiert. Der Beginn des exponentiellen Wachstums wurde als Verdoppelung der OD<sub>600</sub>, bzw. eine Zunahme auf eine OD<sub>600</sub> von  $\geq 0,1$  definiert. Zugunsten der Übersicht sind alle Daten in den Abbildungen als Mittelwerte, ohne Standardabweichungen angegeben. Die Wachstumskurven der Stämme innerhalb einer Klade wurden zur besseren Orientierung in einem Farbton gehalten:

- Klade 1 – grau/schwarz
- Klade 2 – blau
- Klade 3 – rot
- Klade 4 – braun
- Klade 5 – grün

### 3.2.1 Wachstumsraten in reinem BHIS-Medium

Als Negativkontrolle diente die Wachstumskinetik der *C.-difficile*-Stämme ohne Gallensalzeinfluss. Dazu wurden Wachstumskurven in reinem BHIS-Medium ermittelt. Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, zeigten fünf von 23 Stämmen ein bakterielles Wachstum innerhalb des gemessenen Zeitfensters. Alle Isolate der Klade 5 (grüne Kurven, RT 126, 078, unbekannt), der in Deutschland prävalenteste Ribotyp 001/072 (Klade 1, schwarze Kurve) und ein virulenter Ribotyp 127 (Klade 3, rote Kurve) zeigten ein exponentielles Wachstum. Der Klade-5-Ribotyp 078 (hellgrün) und der Klade-1-Ribotyp 001/072 (grau) zeigten dabei ein schnelleres Wachstumsverhalten, mit Beginn des exponentiellen Wachstums nach bereits 5 h, bzw. nach 6 h. Der Referenzstamm 012 (Klade 1, schwarze Kurve), ein Laborstamm, zeigte im Verlauf die geringsten OD<sub>600</sub>-Werte. Insgesamt erfolgte bei 18 der 23 Stämme kein Wachstum ohne Gallensalze statt. Wobei eine Messung der OD<sub>600</sub> nach 24 h zeigte, dass alle Stämme innerhalb dieses Zeitfensters ein bakterielles Wachstum abgeschlossen hatten.

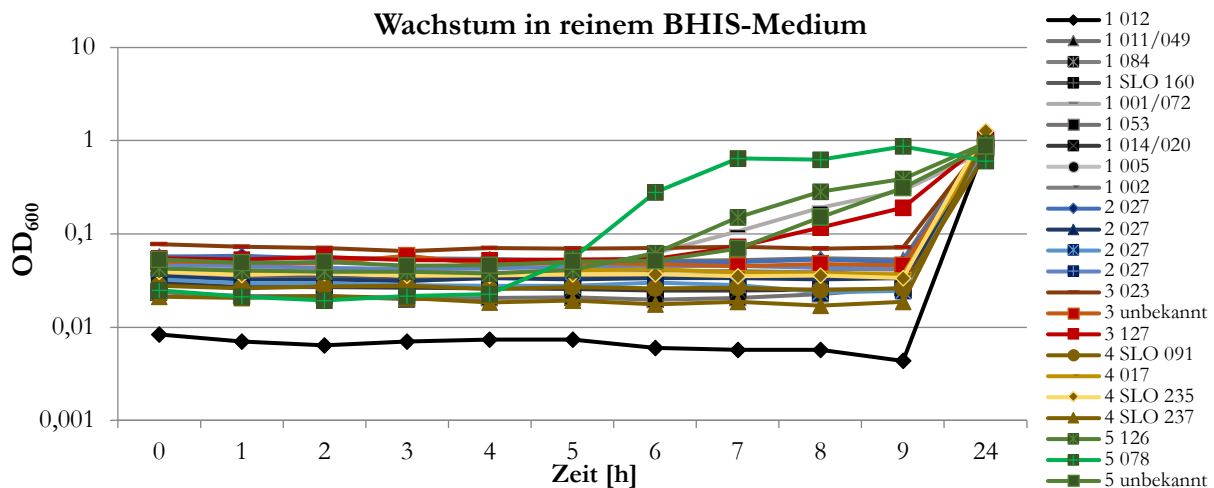


Abbildung 3.10 Wachstumskurven aller Stämme als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h in reinem BHIS-Medium. N = 3.

### 3.2.2 Wachstumsraten bei Anwesenheit von wachstumsaktivierenden Gallensalzen

Die Untersuchung des Einflusses von keimungsaktivierenden Gallensalzen auf das Wachstum zeigen die Wachstumskurven in den Abbildungen 3.11 – 3.13 unter den physiologisch hohen duodenalen Konzentrationen von TCA, GCA und CA. Bei Anwesenheit von 4,19 mM TCA traten alle Stämme innerhalb von 3 – 5 h in die exponentielle Wachstumsphase ein. Hier zeigten sich keine stammspezifischen Unterschiede im Wachstumsverhalten. Bei Anwesenheit von CA (29 µM) zeigte ein Klade-5-Stamm, Ribotyp 078 eine schnellere Auskeimung, während drei Klade-1-Stämme (RT 011/049, 012, 014/020) und ein Klade-4-Ribotyp SLO 237 keine Auskeimung innerhalb des experimentell gesetzten 9 h-Zeitfensters zeigten. Die vegetativen Zellen traten im Durchschnitt etwas später (im Mittel nach 5 – 7 h) in die exponentielle Wachstumsphase ein. Auch bei Anwesenheit von GCA (1,56 mM) erfolgte bei fünf Klade-1-Ribotypen (005, 011/049, 012, 014/020, 053) keine Auskeimung. Ebenfalls konnte ein verzögerter Beginn der Wachstumsphase im Durchschnitt nach ca. 7 h beobachtet werden. Die keimungsaktivierenden Gallensalze zeigten demnach unterschiedlich starke Einflüsse auf das Wachstumsverhalten von *C. difficile*. Im Vergleich dazu wurde das Wachstum der vegetativen Zellen bei Anwesenheit von TCA am effektivsten gefördert, während CA und GCA ein verzögertes exponentielles Wachstum (CA 5 – 7 h, GCA nach 7 h) und keine Auskeimung bei vier (CA) bzw. fünf (GCA) Stämmen innerhalb des Zeitfensters bewirkten.

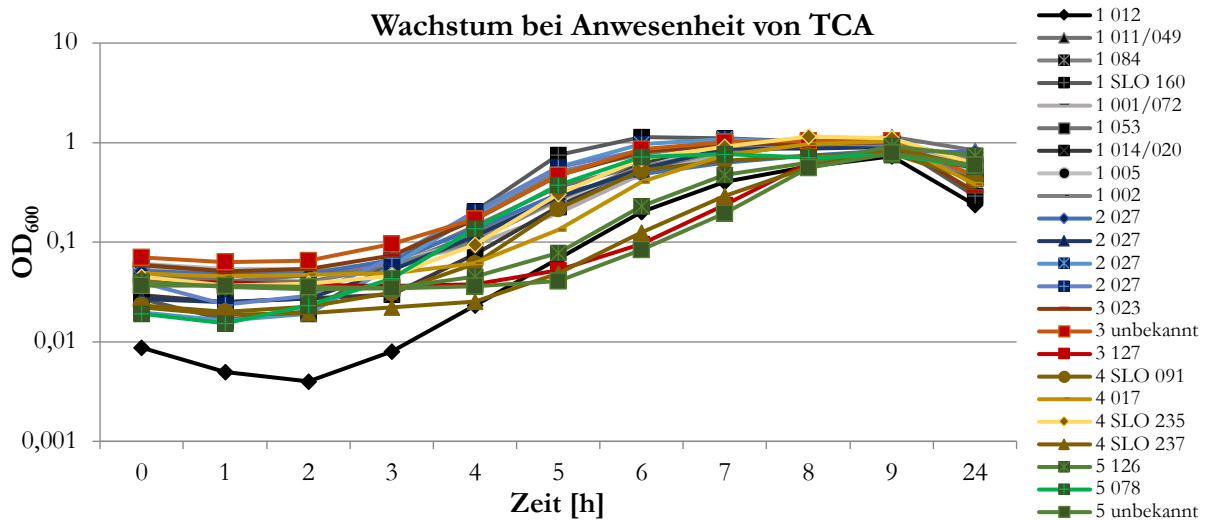


Abbildung 3.11 Wachstumskurven aller Stämme als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von TCA (4,19 mM, hohe duodenale Konzentration). N = 3.

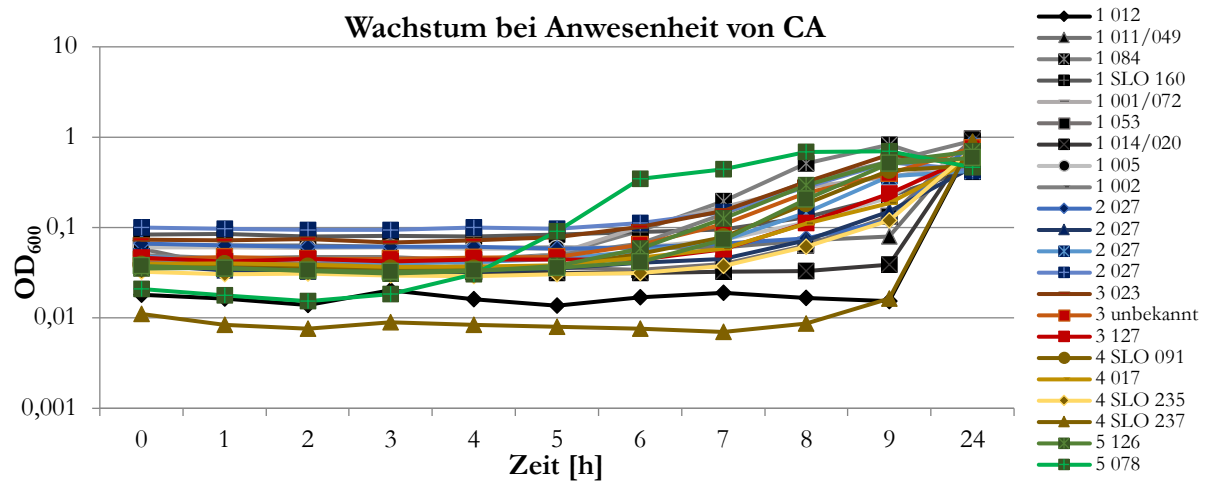


Abbildung 3.12 Wachstumskurven aller Stämme als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von CA (29 μM, hohe duodenale Konzentration). N = 3.

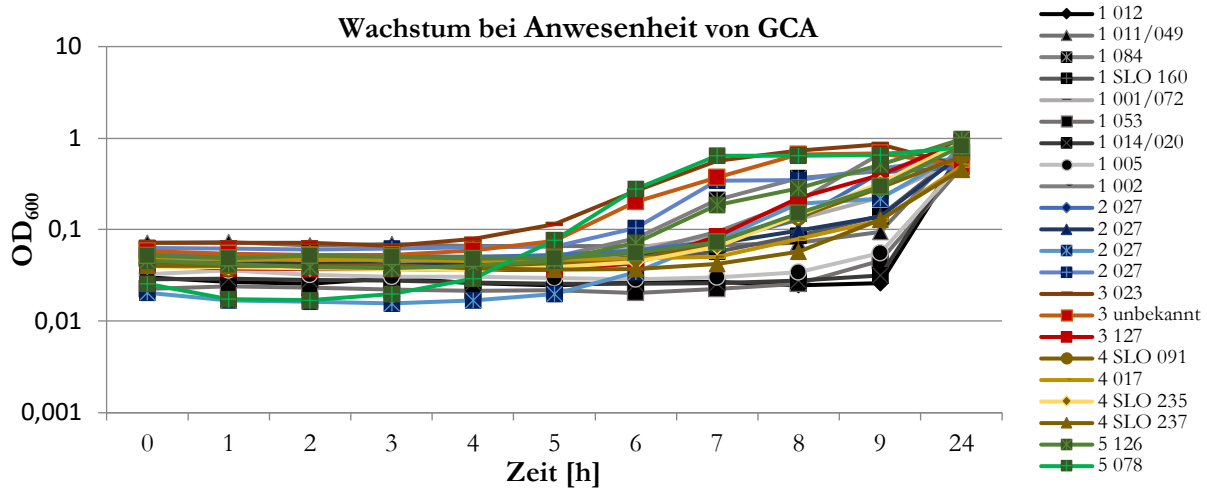
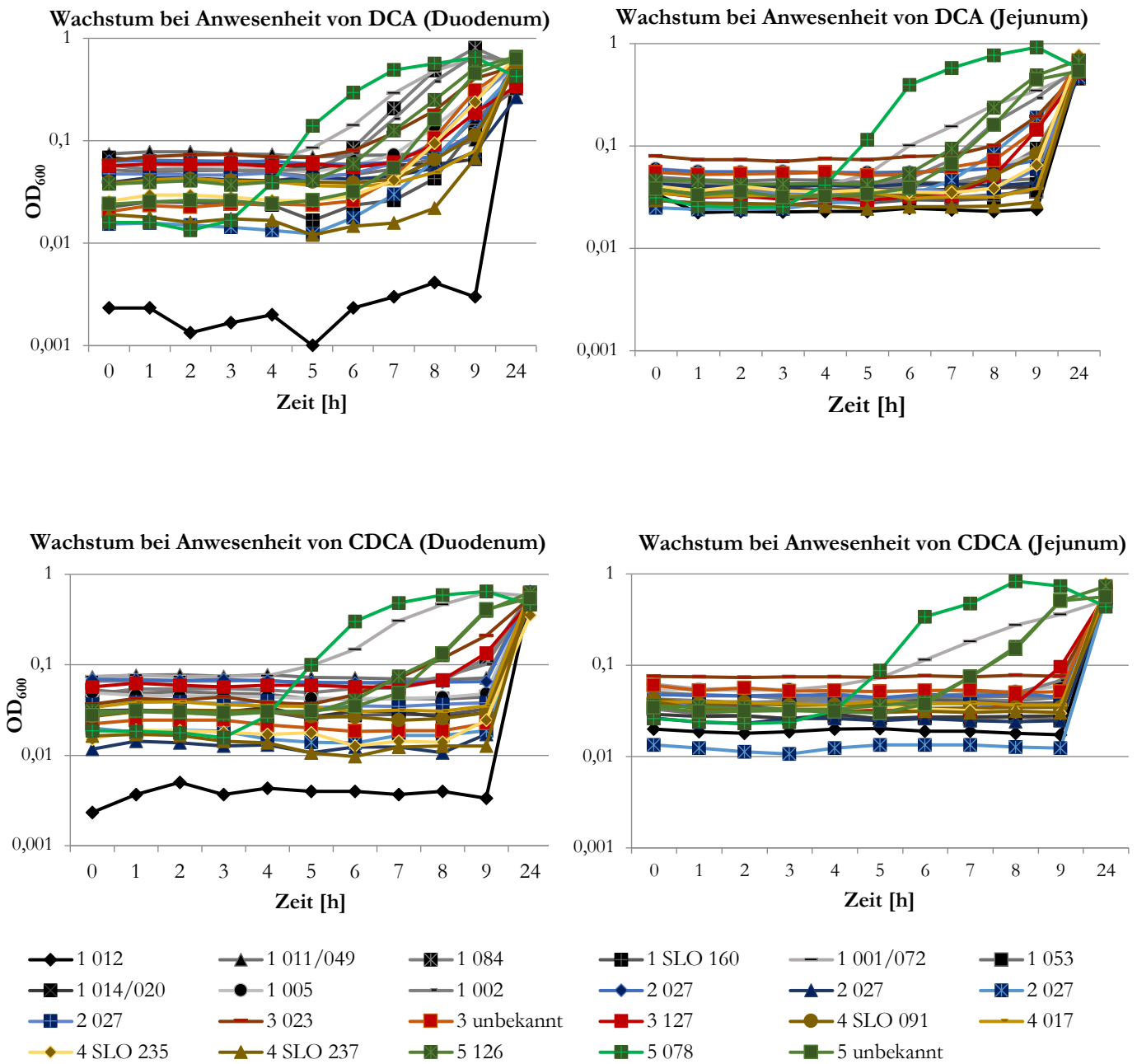


Abbildung 3.13 Wachstumskurven aller Stämme als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von GCA (1,56 mM, hohe duodenale Konzentration). N = 3.

### 3.2.3 Wachstumsraten bei Anwesenheit von wachstumshemmenden Gallensalzen



Links oben bis rechts unten Abbildungen 3.14, 3.15, 3.16, 3.17: Wachstum bei Anwesenheit von CDCA und DCA. Wachstumskurven aller Stämme als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h unter Inkubation von DCA 25,4 µM (hohe duodenale Konzentration, links oben), DCA 8,2 µM (hohe jejunale Konzentration, rechts oben), CDCA 27,14 µM (hohe duodenale Konzentration, links unten) und CDCA 9,67 µM (hohe jejunale Konzentration, rechts unten). N = 3.

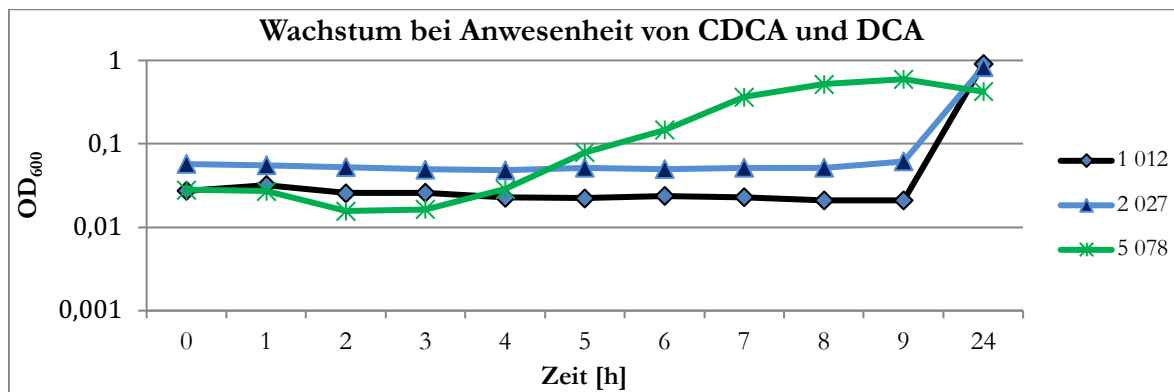


Abbildung 3.18 Wachstumskurven als OD<sub>600</sub>-Mittelwerte innerhalb von 9 h und nach 24 h in CDCA und DCA (27,14  $\mu$ M, hohe duodenale Konzentration). N = 3.

Das Wachstumsverhalten bei Anwesenheit der wachstumshemmenden Gallensalze CDCA und DCA (LCA-Konzentrationen waren zu gering um detektiert zu werden), die den physiologischen Konzentrationen im Intestinaltrakt entsprechen, zeigen die Abbildungen 3.14 – 3.17. Sobald die Zellen in das vegetative Wachstum eintreten, beginnt das exponentielle Wachstum. Es kommt zu einer bakteriellen Zellverdopplung und somit zu einer OD-Zunahme. Bei Anwesenheit jejunaler Konzentrationen der beiden Gallensalze traten weniger *C. difficile*-Stämme in die exponentielle Wachstumsphase ein. Im Vergleich dazu begannen bei duodenaler Konzentration von DCA (25,4  $\mu$ M, links oben, Abbildung 3.14) 14/23 Stämme, und unter der jejunalen Konzentration (8,2  $\mu$ M, rechts oben, Abbildung 3.15) 6/23 Stämme das exponentielle Wachstum.

Bei Anwesenheit duodenaler (27,14  $\mu$ M, links unten, Abbildung 3.16) bzw. jejunaler CDCA-Konzentrationen (9,67  $\mu$ M, rechts unten, Abbildung 3.17) erfolgte bei 18 bzw. 19 Ribotypen kein vegetatives Wachstum. Hier begann bei 4 Stämmen (RT 002 (1), RT 084 (1), RT 127 (3), RT SLO 237 (4)) unter duodenaler CDCA-Konzentration (27,14  $\mu$ M) erst nach neunstündiger Inkubation die Wachstumsphase. Das Gleiche galt für RT 127 (3) bei Anwesenheit einer jejunalen CDCA-Konzentration (9,67  $\mu$ M). Einige *C. difficile*-Stämme sind durch ihr Wachstumsverhalten in den Vordergrund getreten: Analog zu den Ergebnissen der Anzucht in reinem BHIS und in DCA, sind bei Anwesenheit der beiden CDCA-Konzentrationen alle Klade-5-Ribotypen (078 (5 h, schnellster), 126 (7 h) und unbekannt (7 h)) der RT 001/072 (1), nach 6 h und zusätzlich ein Klade-3-Ribotyp 023 nach 7 h (lediglich unter der duodenalen CDCA-Konzentration) in die exponentielle Wachstumsphase eingetreten. Alle Klade-2 und Klade-4-Stämme sind nicht in die exponentielle Wachstumsphase eingetreten.

Schließlich wurde untersucht, ob bei Anwesenheit von zwei inhibierenden Gallensalzen das vegetative Wachstum stärker beeinflusst werden kann. In Abbildung 3.18 wurden drei Stämme (RT 012 (1), 027 (2), 078 (5)) unter hohen duodenalen CDCA und DCA-Konzentrationen inkubiert. Im Vergleich zu den Wachstumskurven unter reinem CDCA oder DCA (Abbildung 3.14 und 3.16), zeigte sich kein Unterschied im Wachstumsverhalten.



### 3.3 Untersuchung des Sporulationsverhaltens von vegetativen

#### *Clostridioides-difficile*

Mittels Sporen-Assays wurde untersucht, ob Gallensalze die Sporulation beeinflussen können. Dazu wurden repräsentative und exponentiell wachsende Bakterien wachstumshemmenden Gallensalzen ausgesetzt. Der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wurde mit Erreichen einer  $OD_{600}$  0,5 definiert. Die Wachstumsphase wurde in 20-minütigen Takt für eine Stunde verfolgt, und entsprechend zu jedem Sporen-Assay (nach 1 h, 3 h, 5 h und 7 h) die  $OD_{600}$  gemessen. Um die Sporenbildung zu ermitteln, wurde mithilfe von Sporen-Assays die CFU (colony forming units) auf ChromID-Platten ausgezählt. Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden jeweils zwei inhibierende Gallensalzkonzentrationen von CDCA und DCA (intestinal: CDCA 0,027 mM/0,001 %; DCA 0,0254 mM/0,001 % und Stuhl: CDCA 0,37 mM/0,02 %; DCA 1,24 mM/0,05 %) und die Stuhlkonzentration von LCA (0,95 mM/0,04 %) der exponentiell wachsenden Kultur (acht Stämme insgesamt) zugefügt und für 7 h bei 37 °C inkubiert. Eine gallensalzinduzierte Sporulation wäre in diesen 7 h nachweisbar. Zu den Zeitpunkten  $t_1$ ,  $t_3$ ,  $t_5$  und  $t_7$  wurden jeweilige Sporen-Assays angefertigt. Zur besseren Orientierung wurden die Konzentrationsangaben in Tabelle 2.6 hier erneut aufgelistet.

Kopie Tabelle 2.6 Gallensalzkonzentrationen, Angabe in Mol (mM) und Prozent (%).

D: Duodenum, J: Jejunum, die höchste und niedrigste intestinale Konzentration fett hervorgehoben. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde in dieser Tabelle auf das Komma als Dezimaltrennzeichen verzichtet. (s. S. 13)

Gallen- salz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration			
		Intestinal (Moreno et. al 2006)		Stuhl (Weingarden 2016)	Standard (Sorg u. Sonenshein 2010) [mM, %]
		Niedrig [mM, %]	Hoch [mM, %]	Median [mM, %]	
<b>TCA</b>	537.68	D: <b>0.8388, 0.05</b> J: 0.9694, 0.052	D: 4.194, 0.22 J: <b>4.847, 0.26</b>	0.55, 0.03	1.86, 0.1
<b>CA</b>	430.55	D: <b>0.0058, 0.00025</b> J: 0.0066, 0.00028	D: 0.029, 0.0012 J: <b>0.033, 0.0014</b>	1.45, 0.06	2.32, 0.1
<b>GCA</b>	487.6	D: 0.3126, 0.01524 J: <b>0.381, 0.0185</b>	D: <b>1.563, 0.076</b> J: 1.905, 0.0929	nicht nachweisbar	2.05, 0.1
<b>CDCA</b>	414.55	D: 0.005428, 0.0002	D: <b>0.027, 0.0011</b>	0.37, 0.02	2.41, 0.1

Kopie Tabelle 2.6 Gallensalzkonzentrationen, Angabe in Mol (mM) und Prozent (%).

D: Duodenum, J: Jejunum, die höchste und niedrigste intestinale Konzentration fett hervorgehoben. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde in dieser Tabelle auf das Komma als Dezimaltrennzeichen verzichtet.( s. S. 13)

		J: <b>0.0019, 0.00008</b>	J: 0.00967, 0.0004		
<b>DCA</b>	414.55	D: 0.00508, 0.0002	D: <b>0.0254, 0.0011</b>	1.24, 0.05	2.41, 0.1
		J: <b>0.0016, 0.00007</b>	J: 0.0082, 0.00034		
<b>LCA</b>	376.57	nicht nachweisbar		0.95, 0.04	2.66, 0.1
<b>UDCA</b>	392.57	nicht nachweisbar		2.54, 0.1	

### 3.3.1 Einfluss von Gallensalzen in der Wachstumsphase von *Clostridioides-difficile*

In einer wachsenden Bakterienpopulation wird bei einem Teil der Bakterien die Sporulation eingeleitet. Bei *C.-difficile* kann die Sporulation auch eingeleitet werden, sobald schlechte Umweltbedingungen wahrgenommen werden. Hierzu wurde untersucht, ob wachstumsinhibierende Gallensalze ebenso die Sporulation initiieren können. Für die Interpretation des Sporulationsverhaltens von *C.-difficile* ist der Einfluss von Gallensalzen auf die Wachstumsphase nötig. Der inhibierender Einfluss der Gallensalze CDCA, DCA und LCA auf die Auskeimung, bzw. das Auswachsen von *C.-difficile*-Sporen in ihre vegetative Form wurde in den vorherigen Versuchen gezeigt. Hier wurde folglich der Einfluss von Gallensalzen auf das Wachstumsverhalten ermittelt. Der Verlauf des exponentiellen Wachstums erfolgte durch OD<sub>600</sub>-Messungen und anhand von Wachstumskurven. Nach Zugabe des Gallensalzes LCA zum Kultur-Hungate, kam es zu einer flockigen Ausfällung, wodurch der Verlauf des Wachstums nicht messbar war. Als Negativkontrolle diente das Wachstum in nur reinem BHIS-Medium. Wie oben beschrieben, wurde der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase ab Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 definiert. Wie in den folgenden Abbildungen (3.27 – 3.41) zu sehen ist, dauerte die Wachstumsphase in nur reinem BHIS zwischen 60 – 180 Minuten bis die Plateauphase bei einer OD<sub>600</sub> von 1 erreicht wurde. Der Klade-5-Stamm SC052 (RT 078) erreichte die Plateauphase bereits nach 60 Minuten. Der Verlauf der Wachstumskurven unter intestinalen Konzentrationen unterscheidete sich nicht von den Negativkontrollen. Dementsprechend, hatten intestinale Konzentrationen von CDCA und DCA (jeweils 0,001 %) keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit oder den Verlauf des Wachstums. Stuhlkonzentrationen von CDCA und DCA (0,02 % bzw. 0,05 %) inhibierten das exponentielle Wachstum aller Stämme.

### 3.3.2 Einfluss von intestinalen Gallensalzkonzentrationen auf das Sporulationsverhalten von *Clostridioides-difficile*

Zur weiteren Orientierung wurden die Sporulationsergebnisse in reinem BHIS-Medium und unter den jeweiligen Gallensalzen in den Abbildungen (3.19 – 3.24) zusammengefasst. Zu Beginn des exponentiellen Wachstums, also zum Zeitpunkt  $t_0$ , zeigten sich keine Sporen. Als Negativkontrolle diente die Sporulation in nur reinem BHIS-Medium. Bis auf einen Klade-3-Stamm (RT 127), bildeten alle Stämme Sporen aus. Hier sporulierten fünf von acht Stämmen nach 1 h (RT 001 (1), 027 (2), 027 (2), 023 (3), 126 (5)) und zwei Stämme nach 3 h (012 (1), 078 (5)). Es zeigte sich keine steigende Tendenz auf die Sporenanzahl im Verlauf der Zeit. Analog zum reinem BHIS, erfolgte bei Anwesenheit der intestinalen Konzentration von DCA, eine Sporenbildung bei sieben der acht getesteten Stämme (exklusiv RT 127 (3)), mit gleichem Sporulationsbeginn nach 1 h bzw. nach 3 h (Stämme s. o.). Keine Zunahme von Sporen im weiteren Verlauf konnte beobachtet werden. Bei Anwesenheit der intestinalen CDCA-Konzentration sporulierten alle Stämme. Der Sporulationsbeginn gleicht dem von reinem BHIS, mit der Ausnahme, dass die Ribotypen 078 (5) und 127 (3) nach 7 h Sporen ausgebildet haben. Auch hier konnte keine zeitlich-abhängige Zunahme der Sporen beobachtet werden.

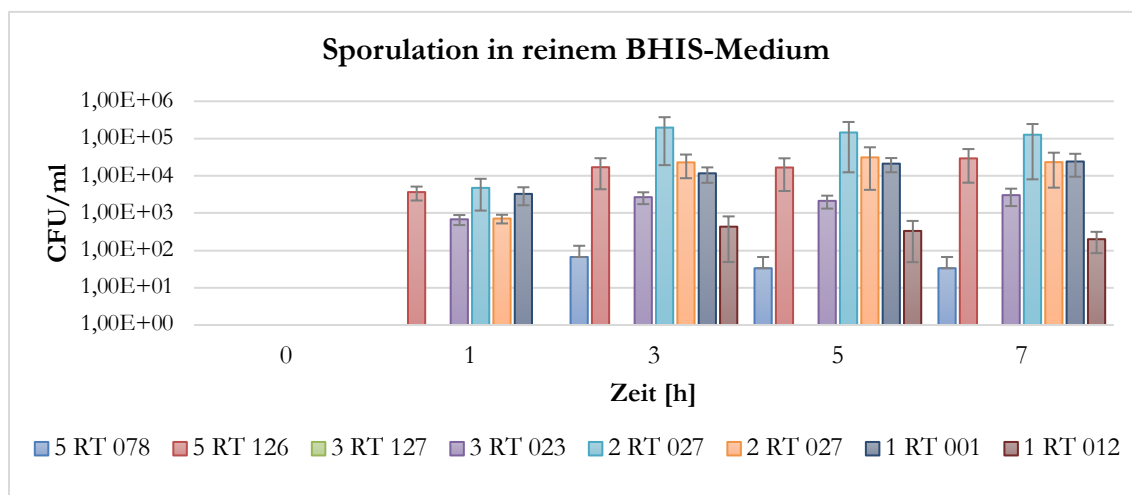


Abbildung 3.19 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten  $t_0$ , 1, 3, 5, 7 h aller Stämme in reinem BHIS-Medium.

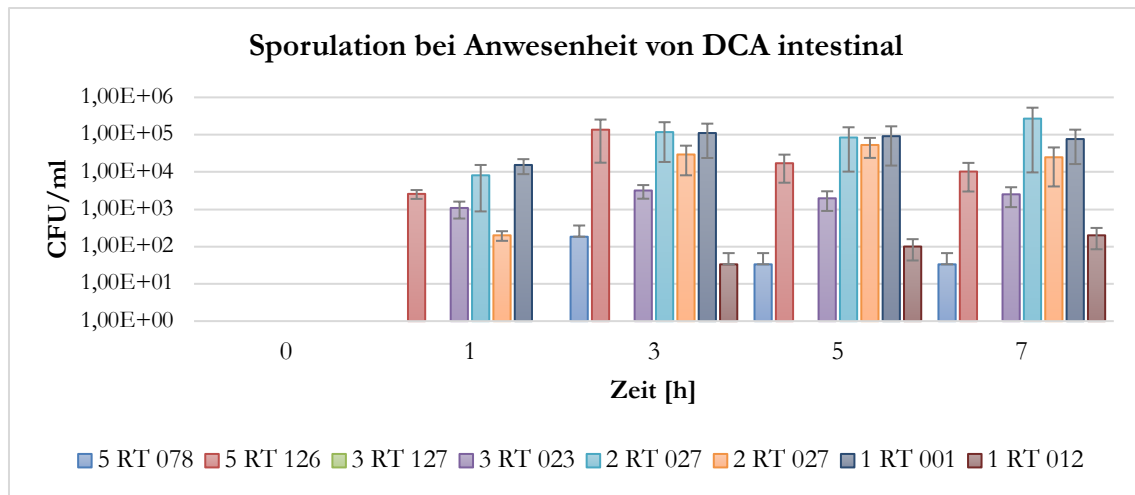


Abbildung 3.20 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t<sub>0</sub>, 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter intestinaler DCA Konzentration.

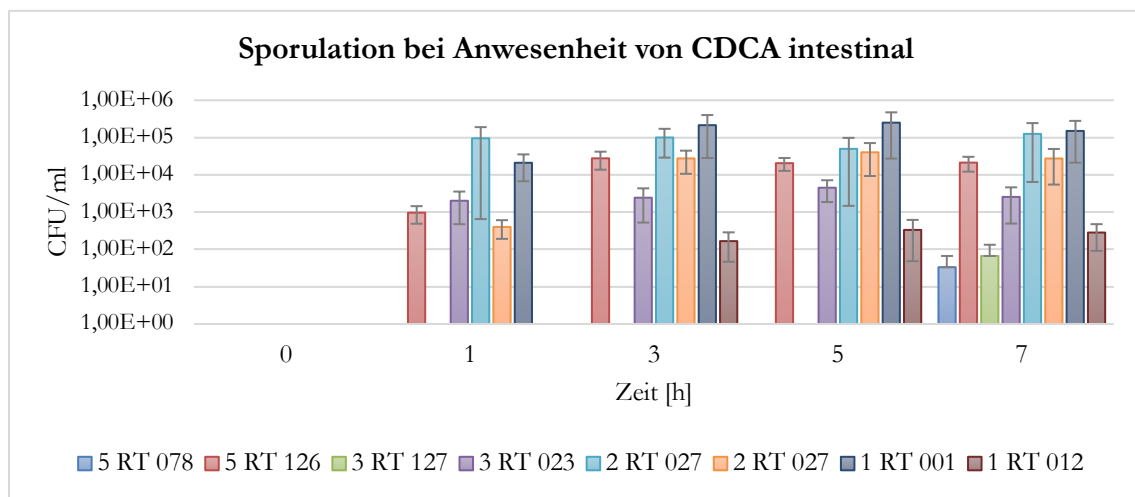


Abbildung 3.21 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t<sub>0</sub>, 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter intestinaler CDCA-Konzentration.

### 3.3.3 Einfluss von Stuhlkonzentrationen der Gallensalze auf das Sporulationsverhalten von *Clostridioides-difficile*

Die Ergebnisse zum Sporulationsverhalten unter dem Einfluss von Stuhlkonzentrationen der Gallensalze (Abbildung 3.22 – 3.24) zeigen einen deutlichen Trend. Das Gallensalz spielte dabei eine eher geringere Rolle, als die jeweilige Gallensalzkonzentration, da erhöhte Konzentrationen, in diesem Falle die Stuhlkonzentration, zur Wachstumsinhibierung führten, und somit auch die Sporulation inhibiert wurde. Unter den Stuhlkonzentrationen von CDCA, DCA und LCA konnten die Stämme weniger und langsamer Sporen bilden: Unter CDCA 5/8 Stämme (t<sub>1</sub>: RT 023 (3), 027 (2); t<sub>3</sub>: RT 001 (1), 027 (2), 078 (5)), unter LCA 3/8 Stämme (t<sub>1</sub>: RT 027 (2), 126 (5); t<sub>3</sub>: 027 (2)) und unter DCA 2/8 Stämme (t<sub>1</sub>: RT 027 (2); t<sub>7</sub>: 078 (5)). Also ist der Einfluss der Konzentration größer, als das inhibierende Gallensalz an sich. Analog zu den Ergebnissen in nur reinem BHIS und unter intestinalen Konzentrationen, konnte sich kein zeitlicher Verlauf der Sporenanzahl zeigen.

Es zeigte sich, dass intestinale Konzentrationen der Gallensalze CDCA und DCA keinen oder einen geringen Einfluss auf das Wachstum oder die Sporulation der exponentiell wachsenden Kultur haben, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gallensalzexposition. Jedoch inhibierten die erhöhten Stuhlkonzentrationen von CDCA, DCA und LCA mehrheitlich das exponentielle Wachstum und somit auch die Sporulation. Folglich reichen hohe Stuhlkonzentrationen aus, um die Sporulation zu inhibieren.

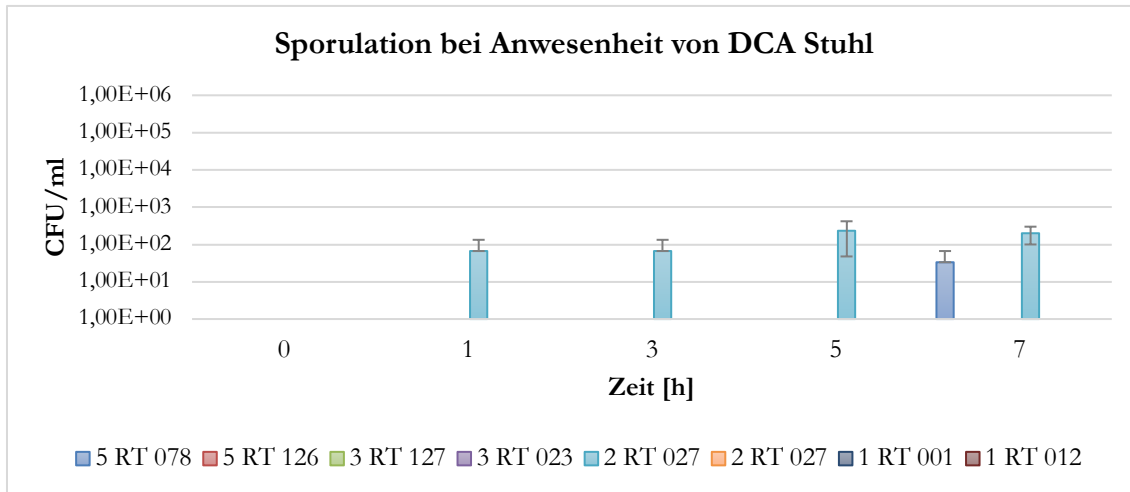


Abbildung 3.22 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t0, 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter DCA-Stuhlkonzentration.

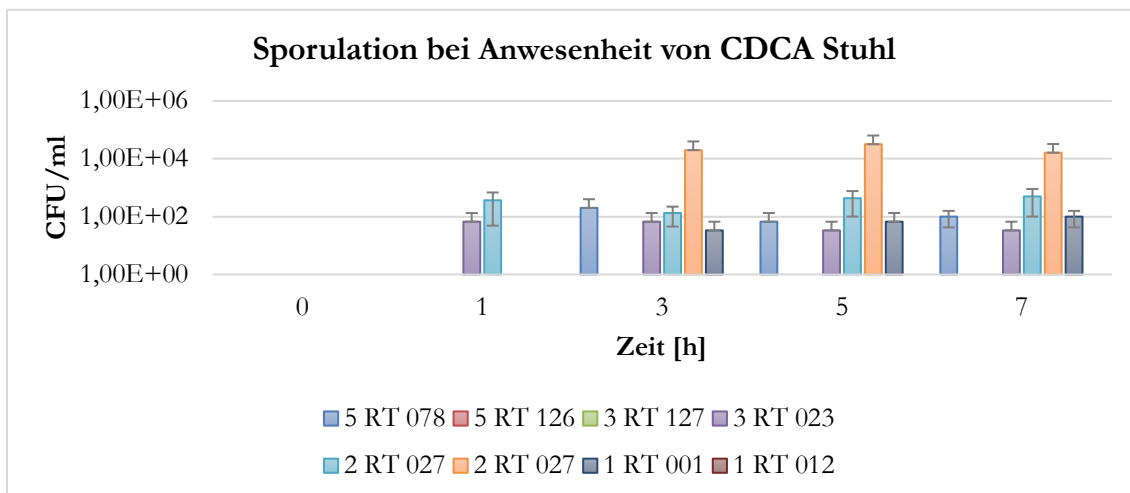


Abbildung 3.23 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t0, 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter CDCA-Stuhlkonzentration.

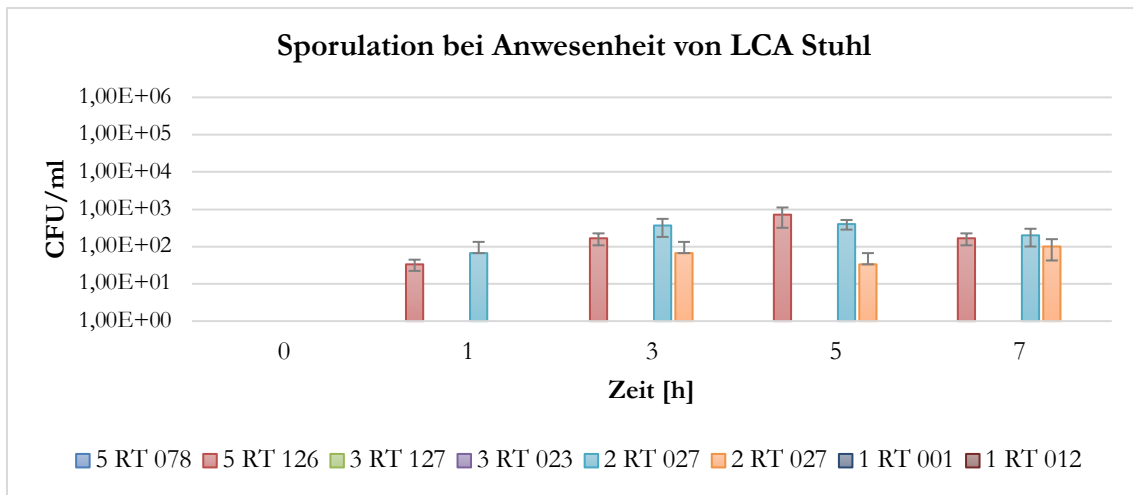


Abbildung 3.24 Anzahl der Sporen als CFU/ml zu den Zeitpunkten t0, 1, 3, 5, 7 h aller Stämme unter LCA-Stuhlkonzentration.

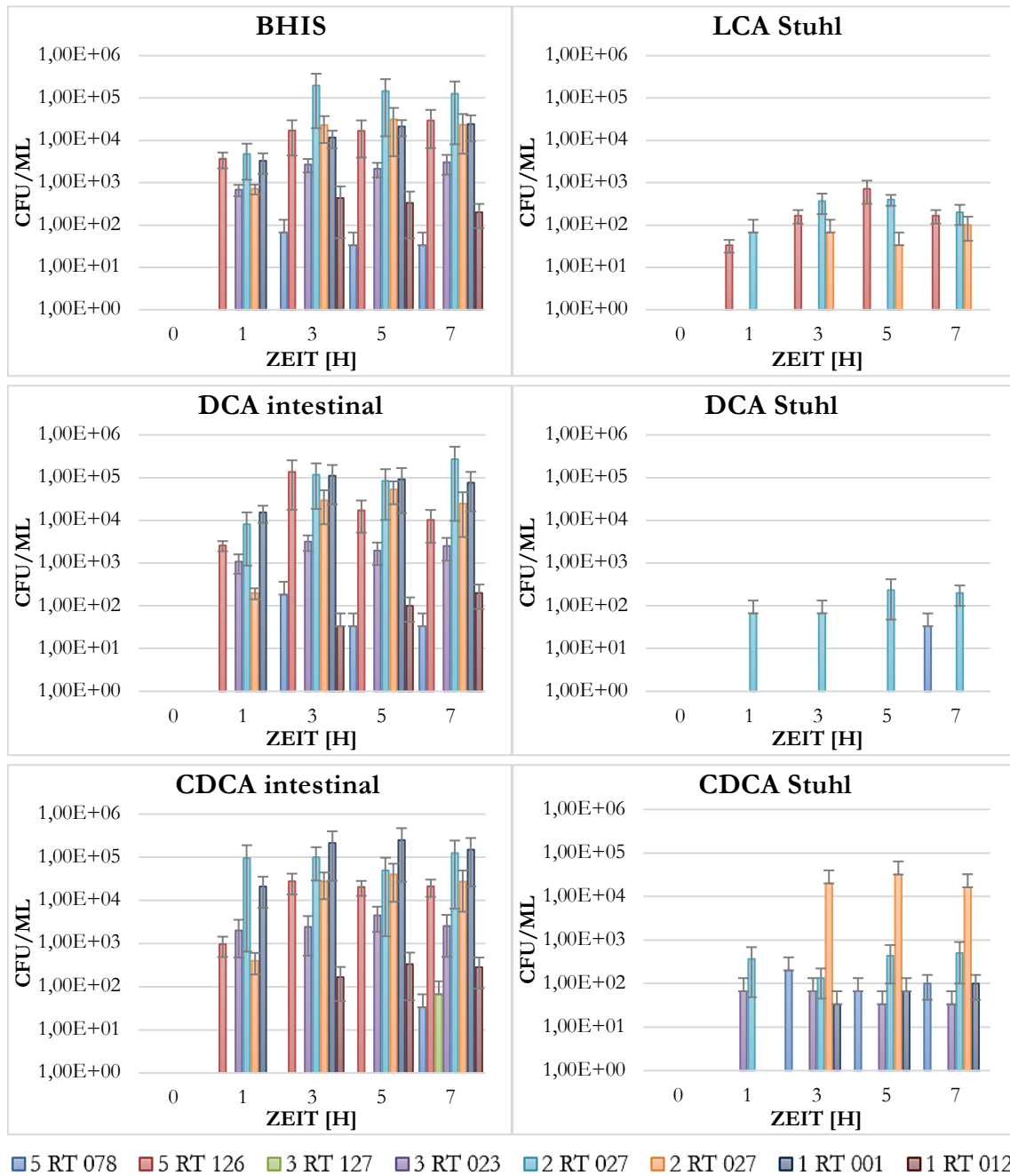


Abbildung 3.25 Überblick: Zusammenfassung der Sporentests aller getesteten Ribotypen und Gallensalze.

### 3.3.4 Wachstums- und Sporulationsverhalten der einzelnen Stämme

## 3.3.4.1 Klade 1 – RT 012

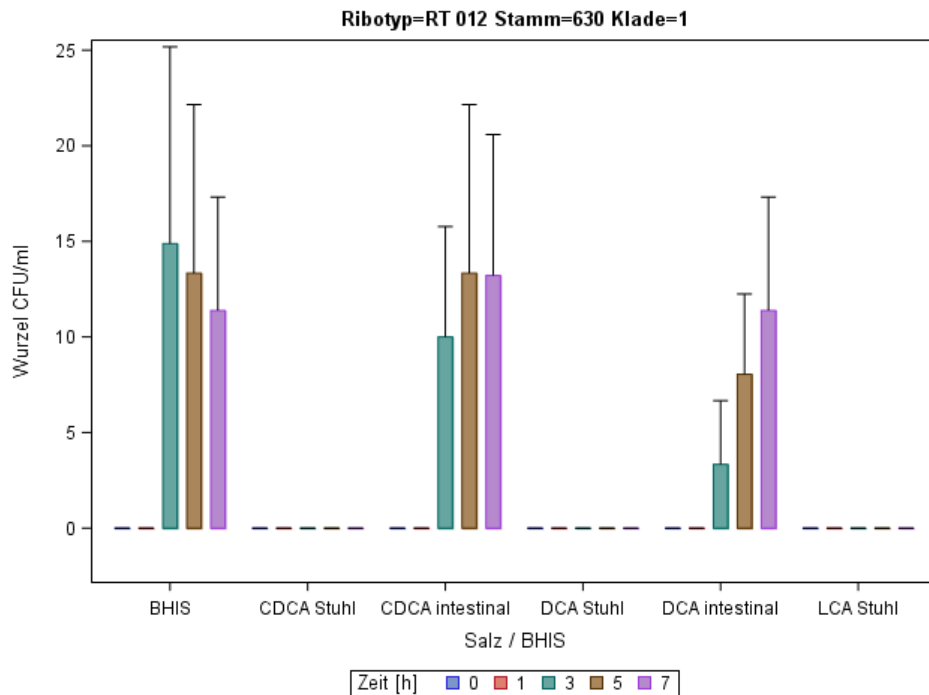


Abbildung 3.26 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes 630 (RT 012, Klade 1) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

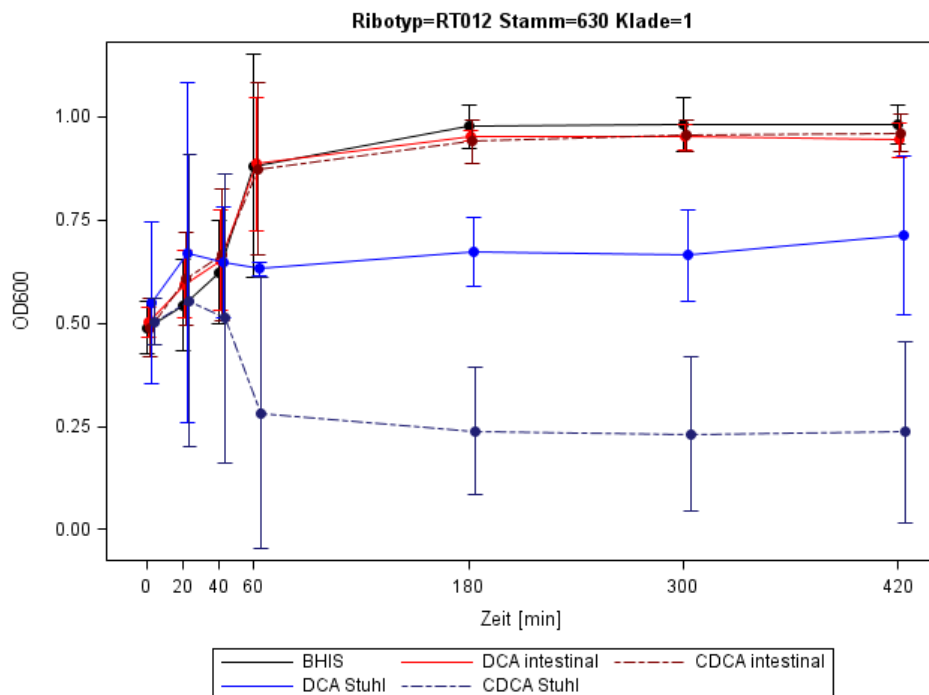


Abbildung 3.27 Wachstumskurven von 630 (RT 012, Klade 1) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn ( $t_0$ ) bei einer  $OD_{600}$  von 0,5.



3.3.4.2 Klade 1 – RT 001

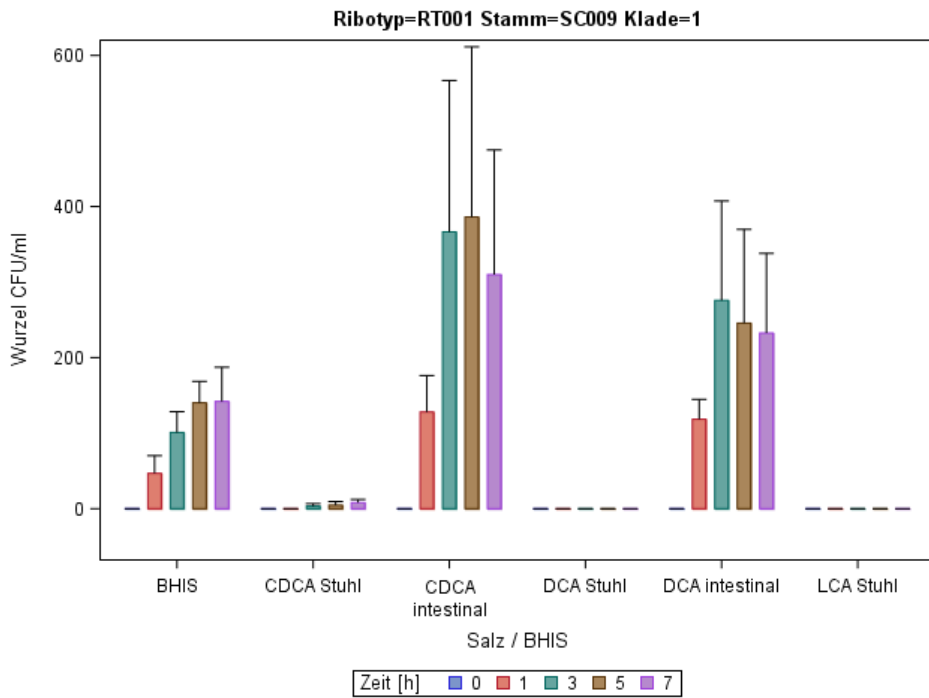


Abbildung 3.28 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes SC009 (RT 001, Klade 1) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

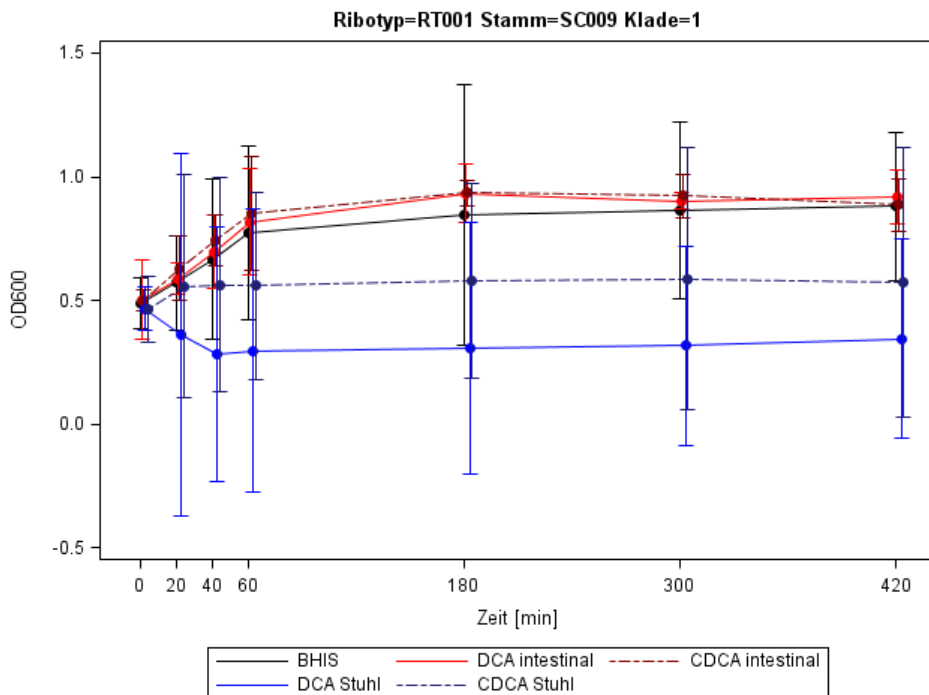


Abbildung 3.29 Wachstumskurven von SC009 (RT 001, Klade 1) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn (t<sub>0</sub>) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5.

#### Klade 1 – RT 012

Wie in den Abbildung 3.26 und 3.27 zu sehen ist, zeigte der Referenzstamm 630, RT 012, Klade 1, dass CDCA, DCA und LCA in höheren Konzentrationen inhibitorisch auf vegetative Zellen wirken. Hier erfolgte in dem gemessen Zeitraum von sieben Stunden bei Anwesenheit der Stuhlkonzentrationen von CDCA, DCA und LCA keine Sporulation. Ebenso wurde das exponentielle Wachstum unter DCA und CDCA inhibiert. In der Negativkontrolle zeigte sich eine leicht verspätete Sporulation, da Sporen erstmalig nach 3 h nachweisbar waren. Unter intestinalen Konzentrationen von CDCA und DCA konnte die Sporulation und das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden. Erste Sporen waren auch hier nach 3 h nachweisbar. Unter intestinaler DCA-Konzentration zeigte sich jedoch eine geringere Sporenbildung. Im Vergleich zur Negativkontrolle bei Anwesenheit der intestinalen Konzentrationen von CDCA zeigte sich bezüglich der Sporenbildung kein Unterschied.

#### Klade 1 – RT 001

Die vegetativen *C.-difficile* des prävalenten Ribotyps 001, Stamm SC009, Klade 1 wurden durch hohe CDCA-, DCA- und LCA-Konzentrationen inhibiert (vgl. Abbildung 3.28 und 3.29). So wurde das exponentielle Wachstum unter der Stuhlkonzentration von DCA und CDCA inhibiert und es bildeten sich bei Anwesenheit der Stuhlkonzentration von DCA und LCA keine Sporen. Die Sporulation von RT 001 konnte jedoch bei Anwesenheit der Stuhlkonzentration von CDCA nicht vollständig inhibiert werden. Auch wenn sich im Vergleich zur intestinalen Konzentration einen geringere und verspätete Sporulation (nach 3 h statt 1 h) zeigte. Beide Gallensalze konnten mit ihren intestinalen Konzentrationen weder die Sporulation, noch das exponentielle Wachstum inhibieren. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Sporenbildung im Vergleich zur Negativkontrolle. In der Negativkontrolle in reinem BHIS-Medium bildeten sich Sporen nach bereits 1 h.

3.3.4.3 Klade 2 – RT 027

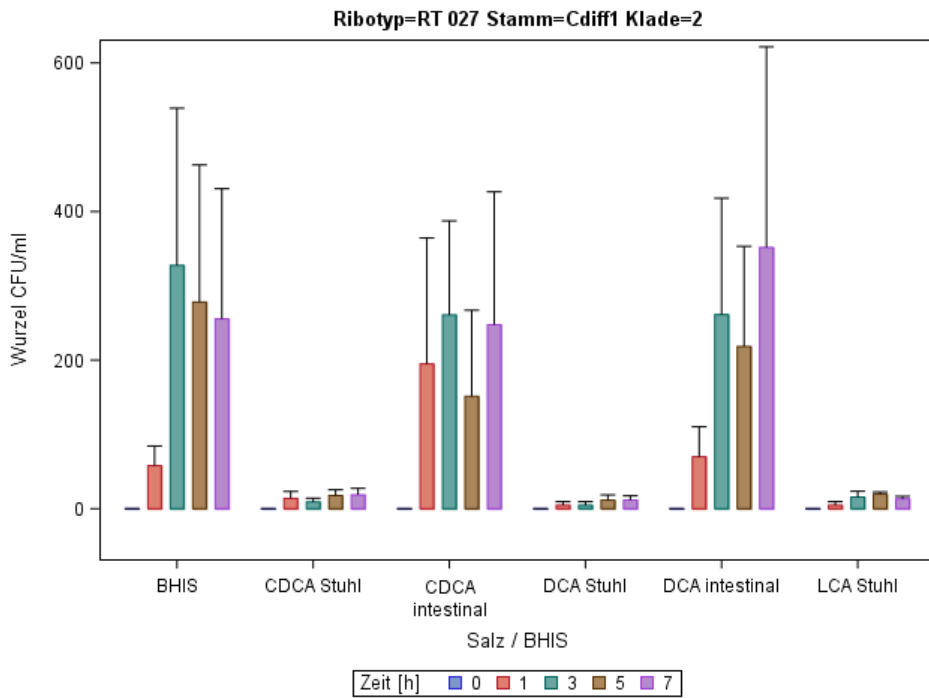


Abbildung 3.30 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes Cdiff 1 (RT 027, Klade 2) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

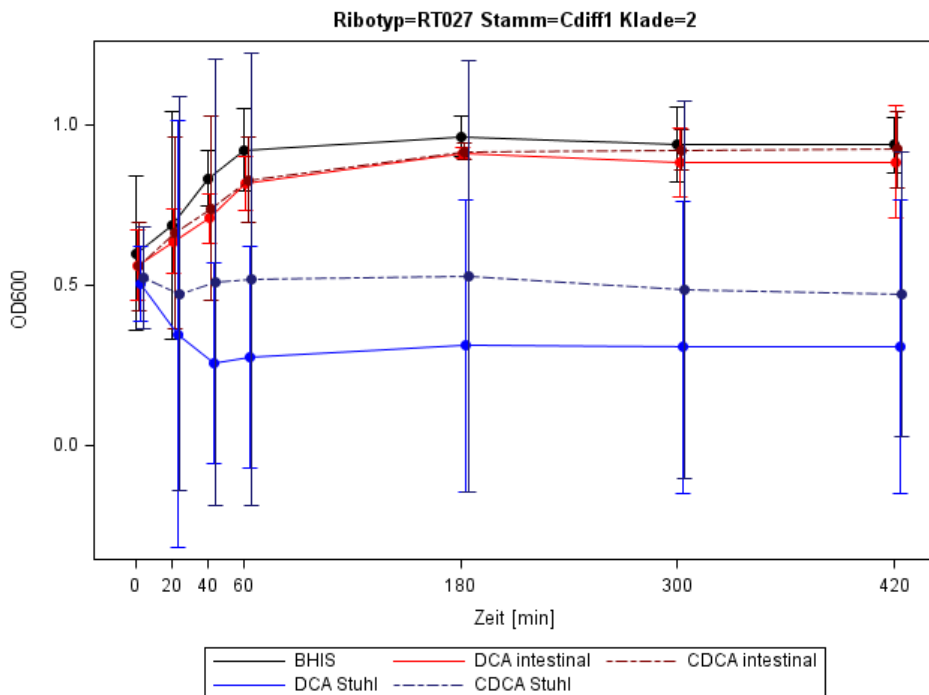


Abbildung 3.31 Wachstumskurven von Cdiff 1 (RT 027, Klade 2) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn (t<sub>0</sub>) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5.

## 3.3.4.4 Klade 2 – RT 027

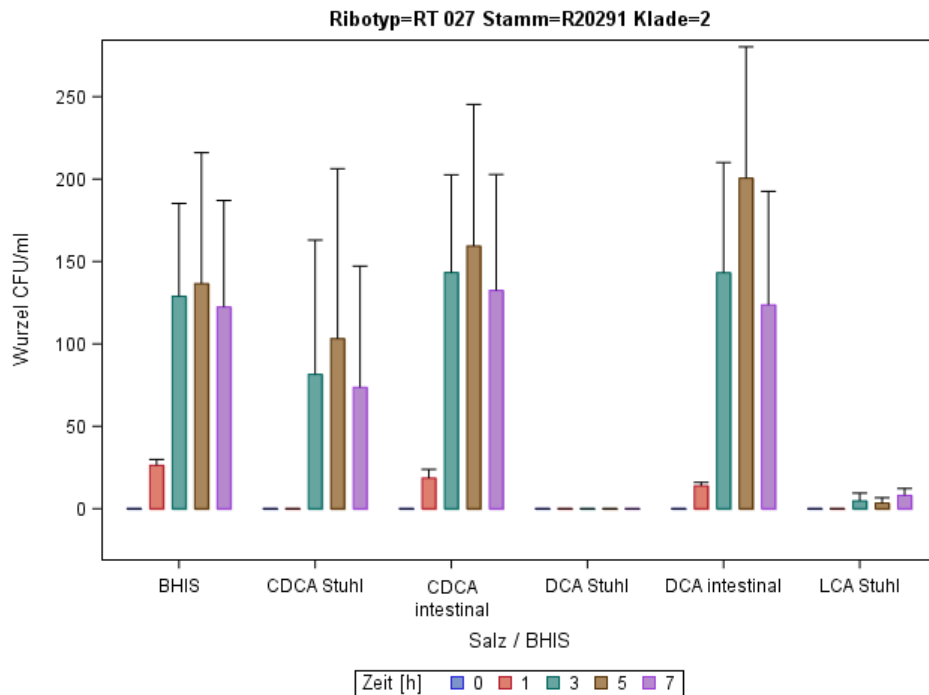


Abbildung 3.32 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes R20291 (RT 027, Klade 2) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

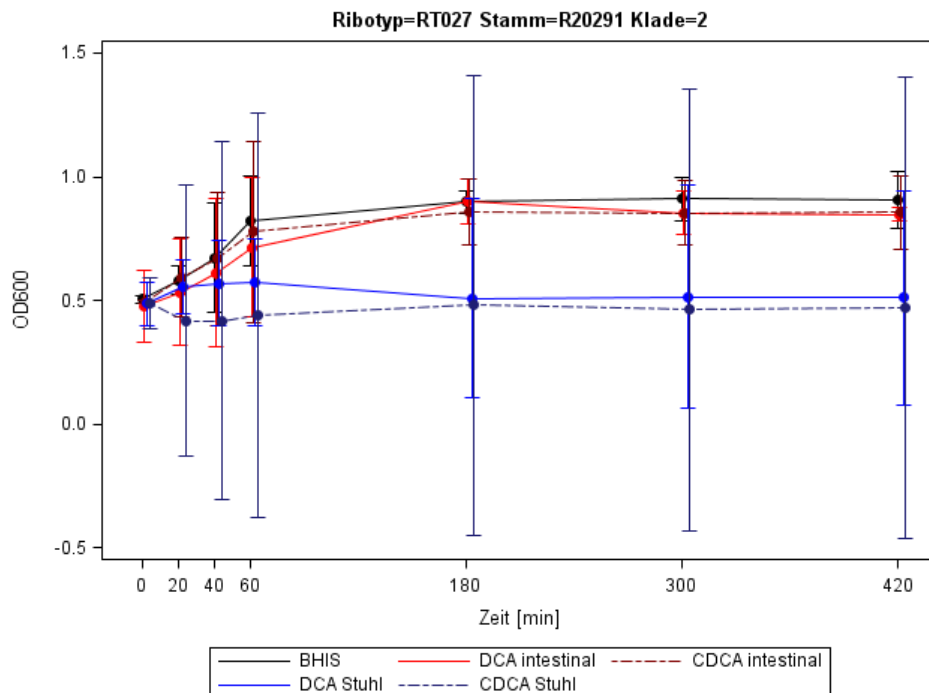


Abbildung 3.33 Wachstumskurven von R20291 (RT 027, Klade 2) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn ( $t_0$ ) bei einer  $OD_{600}$  von 0,5.

#### Klade 2 – RT 027

Der Klade-2-Stamm Cdiff1, mit dem hypervirulenten Ribotyp 027 wurde bei Anwesenheit der Stuhlkonzentrationen von CDCA, DCA und LCA gehemmt. Die Sporulation wurde allerdings im Vergleich zu den Stämmen der Klade 1 nicht vollständig inhibiert (vgl. Abbildung 3.30), auch wenn sich im Vergleich zur intestinalen Konzentration der Gallensalze nur eine minimale Sporenbildung zeigte. Das exponentielle Wachstum wurde hier durch die Stuhlkonzentration von DCA und CDCA inhibiert. Bei Anwesenheit intestinaler Konzentrationen von CDCA und DCA konnte erneut weder die Sporulation, noch das exponentielle Wachstum inhibiert werden (vgl. Abbildung 3.31). In der Negativkontrolle zeigte sich bezüglich der Sporenbildung kein wesentlicher Unterschied. Hier erfolgte eine schnelle Sporenbildung nach einer Stunde.

#### Klade 2 – RT 027

Die Sporulation von R20291, ein weiterer Klade-2-Stamm mit dem hypervirulenten Ribotyp 027 wurde durch die Stuhlkonzentrationen von drei Gallensalze gehemmt (vgl. Abbildung 3.32). Hier zeigte sich keine (DCA) bzw. eine geringere und verspätete Sporenbildung (nach 3 h, LCA). Bei Anwesenheit von der Stuhlkonzentration von CDCA zeigte sich ebenfalls eine verzögerte Sporenbildung nach 3 h. Die Anzahl der Sporen war hier höher als bei Anwesenheit anderer Stuhlkonzentrationen, jedoch geringer als in der Negativkontrolle. Das exponentielle Wachstum wurde unter der Stuhlkonzentration von DCA und CDCA inhibiert (vgl. Abbildung 3.33). Durch die intestinalen Konzentrationen von CDCA und DCA konnte die Sporulation und das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle, zeigte sich erneut eine vermehrte Sporulation. Die Negativkontrolle bildete Sporen bereits nach einer Stunde.

## 3.3.4.5 Klade 3 – RT 023

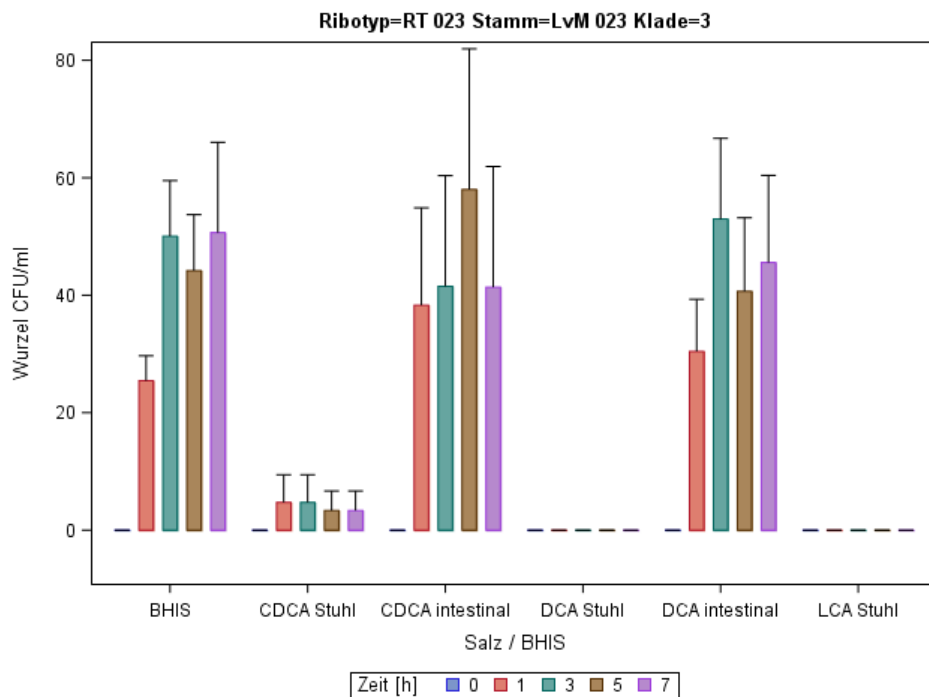


Abbildung 3.34 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes LvM 023 (RT 023, Klade 3) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

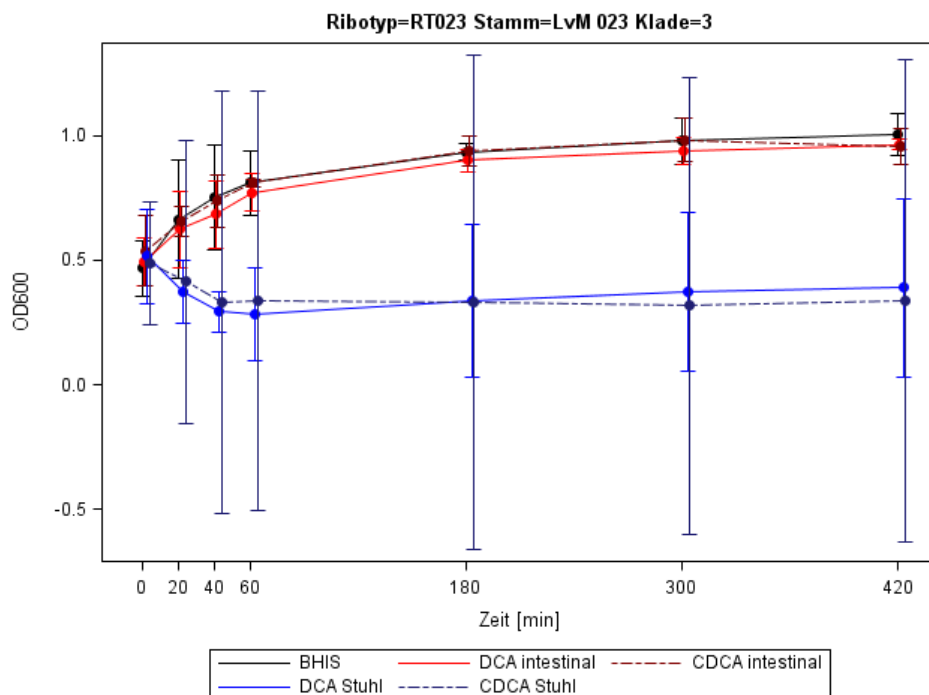


Abbildung 3.35 Wachstumskurven von LvM 023 (RT 023, Klade 3) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn ( $t_0$ ) bei einer  $OD_{600}$  von 0,5.

3.3.4.6 Klade 3 – RT 127

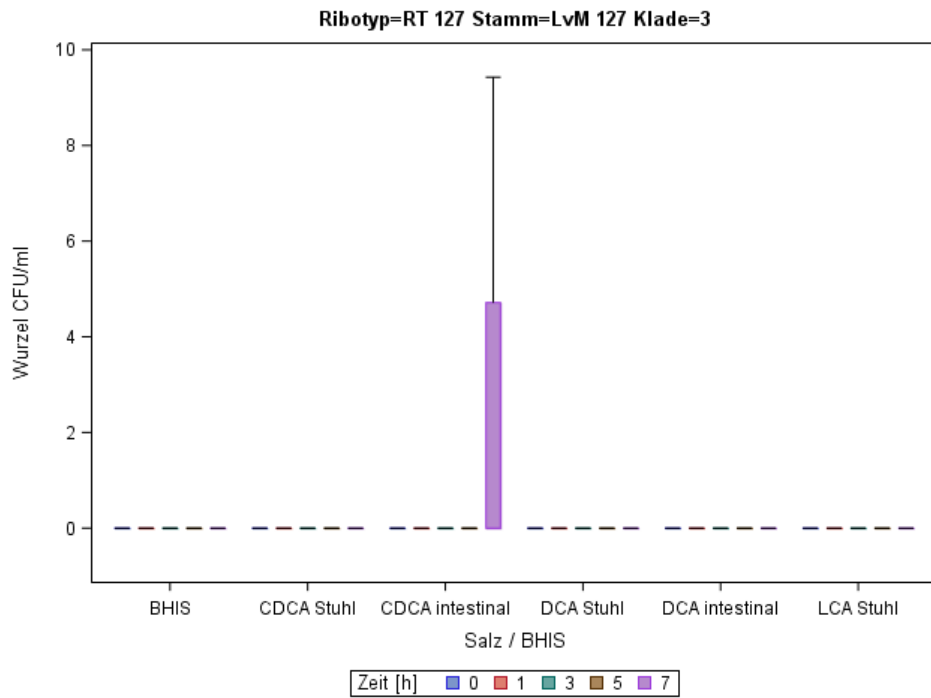


Abbildung 3.36 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes Cdiff XII (RT 127, Klade 3) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

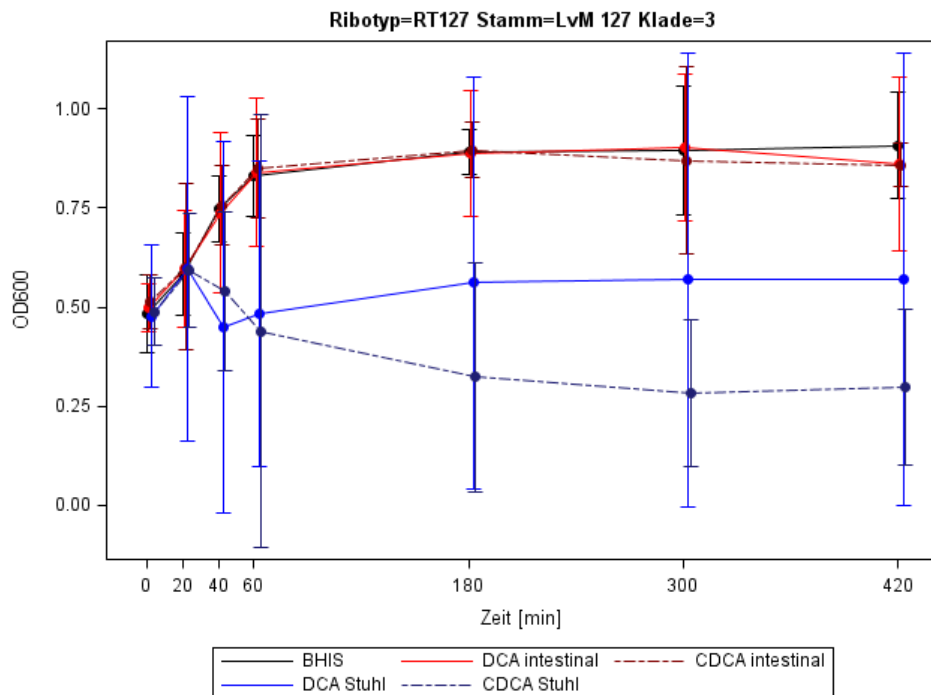


Abbildung 3.37 Wachstumskurven von Cdiff XII (RT 127, Klade 3) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn (t<sub>0</sub>) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5.

### Klade 3 – RT 023

Wie in den Abbildung 3.34 und 3.35 zu sehen ist, wirken DCA und LCA in ihren Stuhlkonzentrationen inhibitorisch auf vegetative Zellen des Stammes LvM023, Ribotyp 023, Klade 3. Unter den Stuhlkonzentrationen zeigten sich keine (DCA, LCA) bzw. eine geringere Sporenbildung (CDCA) verglichen mit der Sporenbildung unter intestinalen Konzentrationen/reinem BHIS. Auch das exponentielle Wachstum wurde bei Anwesenheit der Stuhlkonzentration von DCA und CDCA inhibiert. Die Negativkontrolle in reinem BHIS-Medium zeigt eine schnelle Sporenbildung nach einer Stunde. Durch die intestinalen Konzentrationen von CDCA und DCA konnte die Sporulation und das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich bezüglich der Sporenbildung kein Unterschied.

### Klade 3 – RT 127

Wie in der Abbildung 3.36 zu sehen ist, zeigte der Stamm Cdiff XII, Ribotyp 127, Klade 3 eine sehr späte Sporulation. Hier erfolgte innerhalb der getesteten sieben Stunden keine Sporulation in der Negativkontrolle in nur reinem BHIS-Medium, oder bei Inkubation mit inhibierenden Gallensalzen. Lediglich die Inkubation unter intestinaler CDCA-Konzentration führte zur Sporenbildung nach 7 h. Analog zu den anderen Stämmen wurde das vegetative Wachstum in seiner exponentiellen Phase unter den Stuhlkonzentrationen von CDCA und DCA inhibiert. Die Wachstumskurven in nur reinem BHIS, bzw. unter Inkubation von intestinalen CDCA und DCA-Konzentrationen zeigten ein exponentielles Wachstum bis zum Erreichen der Plateauphase nach 60 – 180 Minuten (s. Abbildung 3.37).



## 3.3.4.7 Klade 5 – RT 126

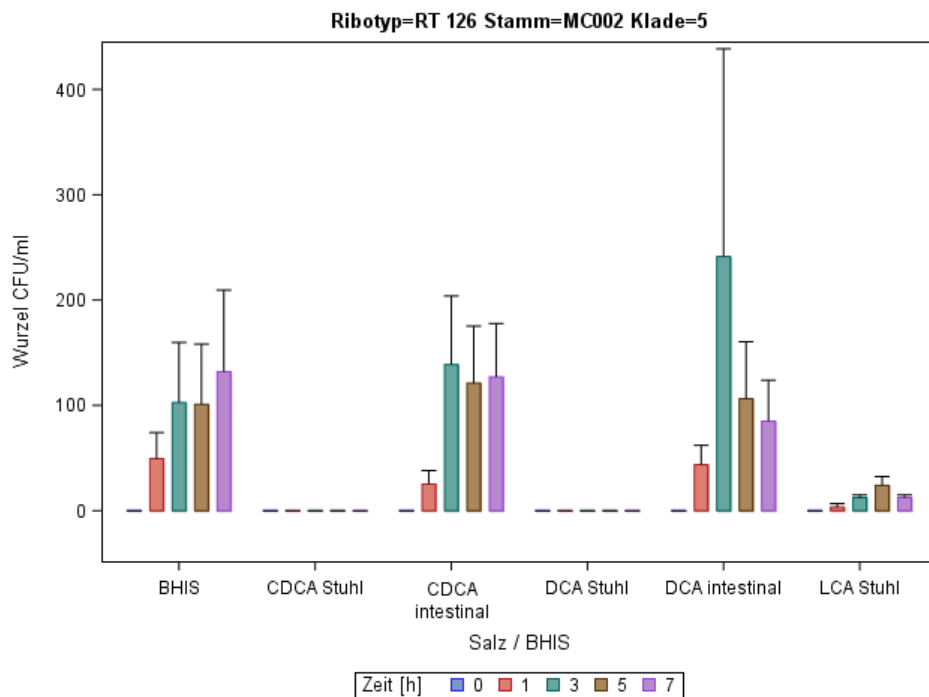


Abbildung 3.38 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes MC002 (RT 126, Klade 5) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

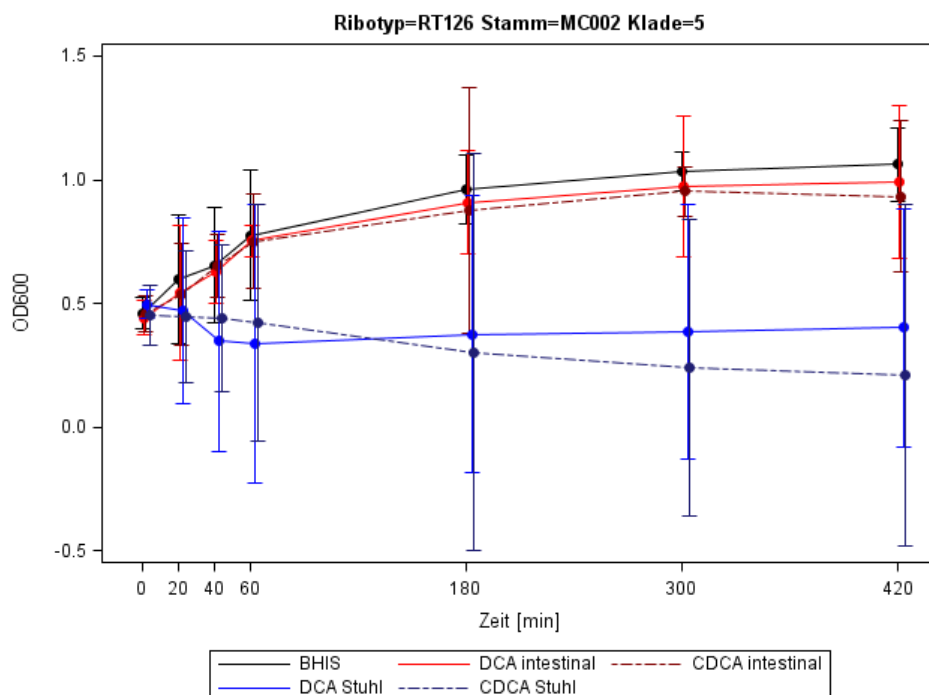


Abbildung 3.39 Wachstumskurven von MC002 (RT 126, Klade 5) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn ( $t_0$ ) bei einer  $OD_{600}$  von 0,5.

3.3.4.8 Klade 5 – RT 078

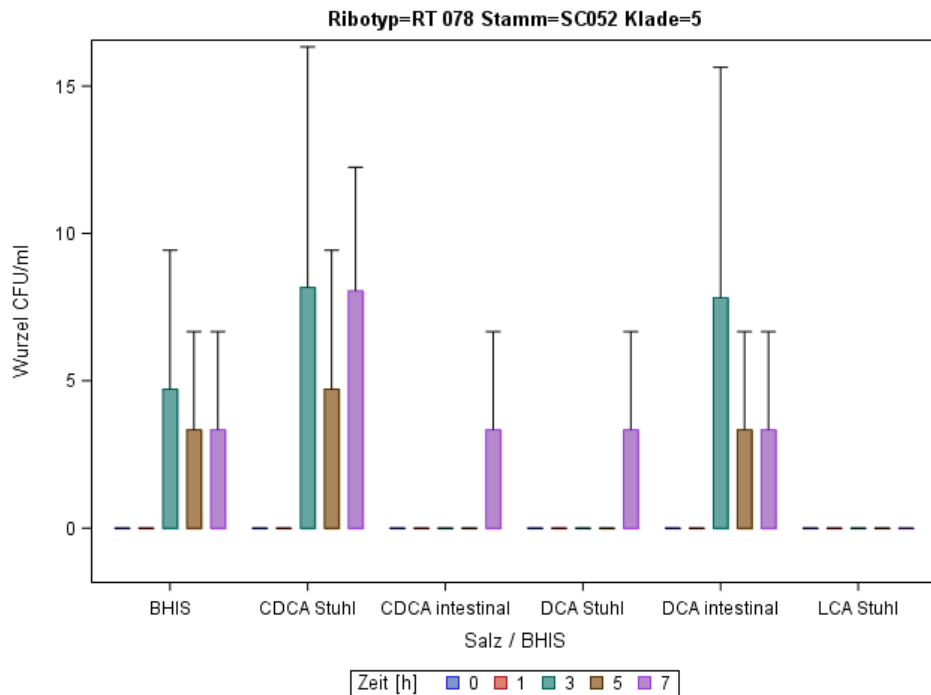


Abbildung 3.40 Anzahl der Sporen als CFU/ml zum Zeitpunkt 0, 3, 5 und 7 h als Sporulationsverhalten des Stammes SC052 (RT 078, Klade 5) nach Inkubation in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen.

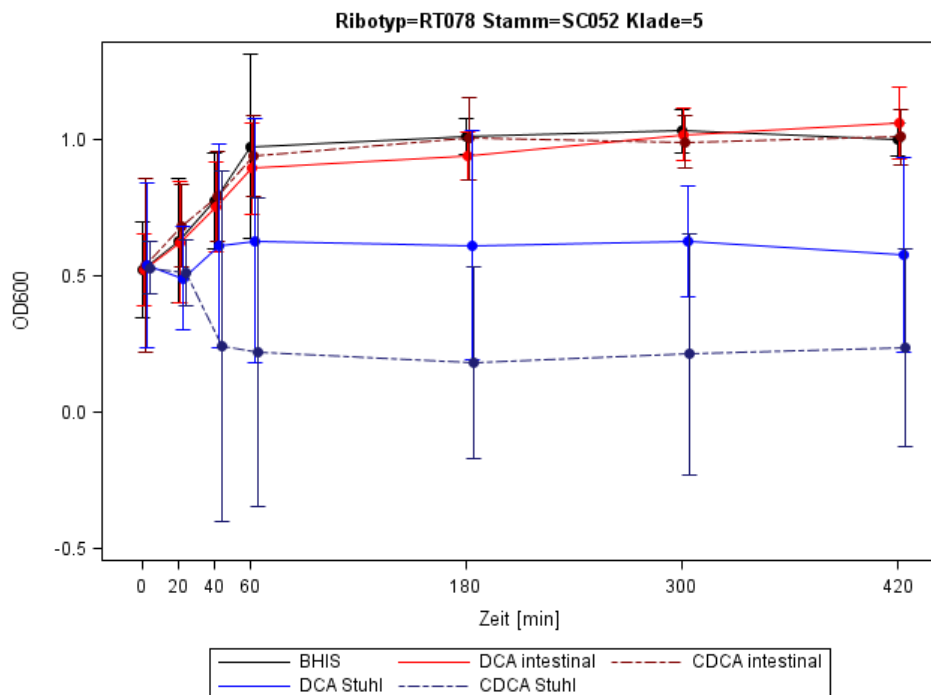


Abbildung 3.41 Wachstumskurven von SC052 (RT 078, Klade 5) in BHIS, CDCA, DCA oder LCA mit ihren intestinalen und Stuhlkonzentrationen. Beginn (t<sub>0</sub>) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5.

## Klade 5 – RT 126

Die vegetativen Zellen des Klade-5-Stammes MC002, Ribotyp 126, werden lediglich bei Anwesenheit von DCA und CDCA in höheren Konzentrationen inhibiert (vgl. Abbildung 3.38 und 3.39). Hier zeigten sich unter den Stuhlkonzentrationen keine (CDCA, DCA) bzw. eine geringere Sporenbildung (LCA), und eine Hemmung des exponentiellen Wachstums unter der Stuhlkonzentration von DCA und CDCA. Die Negativkontrolle in reinem BHIS-Medium zeigte eine schnelle Sporenbildung nach einer Stunde. Bei Anwesenheit von intestinalen Konzentrationen von CDCA und DCA konnte die Sporulation und das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden. Es zeigten sich höhere Sporenraten verglichen mit der Sporulation unter den Stuhlkonzentrationen, aber kein Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle in reinem BHIS.

## Klade 5 – RT 078

Die Abbildung 3.40 und 3.41 zeigen den Klade-5-Stamm SC052 mit dem virulenten Ribotyp 078. Hier fällt eine verspätete Sporulation nach 3 h (BHIS, CDCA Stuhl, DCA intestinal), bzw. nach 7 h (CDCA intestinal, DCA Stuhl) auf. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen, wurde die Sporulation von diesem Stamm nur durch LCA in Stuhlkonzentrationen inhibiert, während unter DCA sich eine geringere Sporenbildung, verglichen mit der Sporenbildung unter intestinalen Konzentrationen/reinem BHIS, zeigte. Das exponentielle Wachstum wurde durch die Stuhlkonzentration von DCA und CDCA inhibiert. Interessanterweise bildeten sich Sporen bei der Stuhlkonzentration von CDCA, aber nicht bei Anwesenheit der intestinalen Konzentration von CDCA. Die Negativkontrolle in reinem BHIS-Medium zeigte ein exponentielles Wachstum bis zum Erreichen der Plateauphase bei einer  $OD_{600}$  von ca. 1 innerhalb von 60 Minuten mit einer verspäteten Sporenbildung nach 3 h. Unter intestinalen Konzentrationen von CDCA und DCA konnte die Sporulation und das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden.

## 4 Diskussion

Die Empfänglichkeit für CDI wird durch eine Antibiose beeinflusst, da diese die Darmflora beeinträchtigt und dadurch die Umwandlung in sekundäre Gallensalze gestört wird (Theriot et al. 2014; Buffie et al. 2015; Koenigsknecht et al. 2015; Theriot et al. 2016; Kochan et al. 2018a). *C.-difficile* zeigte höhere Auskeimungsraten in Nährmedien bestehend aus Dünndarminhalten von antibiotikabehandelter Mäusedarmflora als in solchen von physiologischer Darmflora (Giel et al. 2010; Koenigsknecht et al. 2015). Außerdem zeigten sich in einem antibiotikabehandeltem Darm geringere 7-Dehydroxylase-Aktivitäten (Northfield und McColl 1973) und erhöhte Konzentrationen an TCA im Colon (Theriot et al. 2014; Buffie et al. 2015). Eine Antibiotika-exponierte Darmflora vereinfacht dadurch die Entwicklung einer CDI: Einerseits minimiert die Antibiose die Darmflora, welche normalerweise das Wachstum von *C.-difficile* verhindert. Andererseits verhindert eine erhöhte TCA-Konzentration die Erholung der Darmflora, da TCA keimungsaktivierend auf *C.-difficile*, aber wachstumsinhibierend auf andere Darmbakterien wirkt (Ridlon et al. 2006). Analog zu antibiotikabehandelten Darminhalten zeigten sich auch erhöhte Konzentrationen von primären, d.h. wachstumsaktivierenden Gallensalzen und reduzierte Konzentrationen von sekundären, wachstumsinhibierenden Gallensalzen bei rezidivierenden CDI (Weingarden et al. 2014; Allegretti et al. 2016). Deshalb, wird die Effektivität einer Behandlung mit Stuhltransplantationen damit begründet, dass sich mit der Wiederherstellung der physiologische Darmflora und ihrer enzymatischen Aktivitäten, auch die Gallensalzkompositionen regenerieren (Weingarden et al. 2014; 2016). Eine aktuelle Studie von Kang et al. konnte zeigen, dass die Bakterienspezies mit 7-alpha-dehydroxylierende Aktivität zusätzlich antibiotisch-wirksame Moleküle (1-acetyl- $\beta$ -carboline und Turbomycin A) sezernieren. Hier verstärkt sich die auf *C.-difficile* wachstumsinhibierende Wirkung durch die Kombination von sekundären Gallensalzen und diesen Antibiotika (2019).

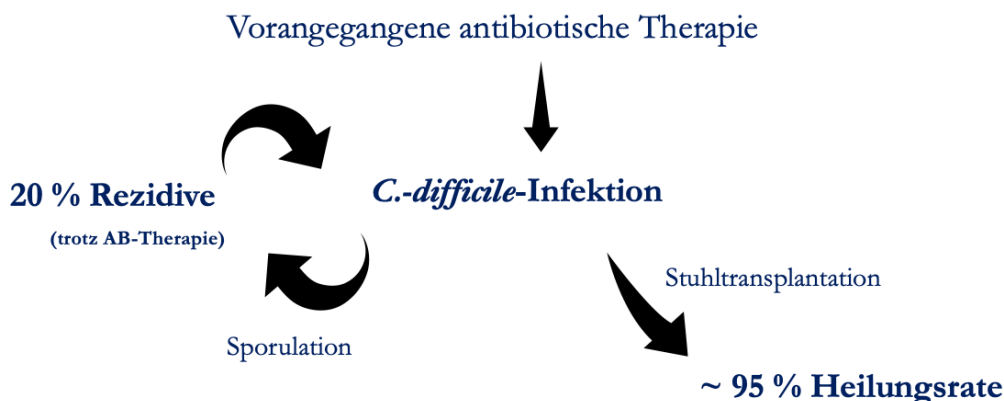


Abbildung 4.1 Teufelskreis in der Behandlung einer CDI: Eine antibiotische Therapie eröffnet den Weg zur CDI (Buffie et al. 2012; Bassis et al. 2014; Chakra et al. 2014; Tartof et al. 2015). Die anschließende antibiotische Therapie einer CDI führt zu einer hohen Rezidivrate (Debast et al. 2014), während Stuhltransplantationen eine hohe Heilungsrate aufweisen (Borody und Khoruts 2011; Gough et al. 2011; van Nood et al. 2013; Quraishi et al. 2017).

Zur Evaluierung des Gallensalzeinflusses auf *C.-difficile* ist ein Verständnis der unterschiedlichen Konzentrationen in den Darmabschnitten, sowie im Stuhl von gesunden, als auch von CDI Patienten notwendig. Frühere Versuche zu Gallensalzwirkungen auf *C.-difficile* wurden mit standardisierten Konzentrationen von 0,1 % (Sorg und Sonenshein 2010) und mit Stuhlkonzentrationen vor und nach einer Stuhltransplantation durchgeführt (Weingarden et al. 2014; 2016). Die Studien mit der standardisierten Konzentration von 0,1 % zeigten die o.g. Wirkung der Gallensalze: CA, GCA und TCA sind aktivierend, während CDCA, LCA und teils DCA inhibierend auf die Auskeimung und/oder das Wachstum von *C.-difficile* wirken. Die Messungen der Stuhlkonzentrationen von Gallensalzen waren abhängig davon, ob es Stuhlproben von gesunden Menschen oder von CDI-erkrankten Patienten waren. So zeigten sich in Stuhlproben von CDI-positiven Patienten höhere Konzentrationen der primären Gallensalze TCA (0,55 +/- 0,25 mM), CA (1,45 +/- 0,29 mM) und CDCA (0,37 +/- 0,09 mM). Nach einer Behandlung mittels Stuhltransplantation, also in der Annahme, dass eine CDI ausgeheilt war, zeigten sich höhere Konzentration der sekundären Gallensalze DCA (1,24 +/- 0,24 mM) und LCA (0,95 +/- 0,15 mM). Während Stuhlkonzentration der primären Gallensalze von CDI-Patienten *in vitro* keimungsaktivierend auf Sporen wirken, wurde die Sporenkeimung und das Wachstum nach einer Stuhltransplantation eher gehemmt (Weingarden et al. 2016). Um die Gallensalzwirkung im Darm zu untersuchen, wurden Studien mit intestinalen Konzentrationen in Abhängigkeit von antibiotisch behandelten Mäusen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Konzentration sekundärer Gallensalze vor einer Antibiose ausreicht, um die Auskeimung und das Wachstum von *C.-difficile* zu verhindern (Giel et al. 2010; Theriot et al. 2014; 2016; Koenigsknecht et al. 2015). Nach einer antibiotischen Behandlung zeigten sich höhere Konzentrationen der primären Gallensalze TCA und CA, welche das Wachstum von *C.-difficile* promovierten (Theriot et al. 2014; 2016).

Ob die früheren Studien zu intestinalen Gallensalzkonzentrationen auf den Menschen übertragbar sind, bleibt zu hinterfragen. Hierzu sollten die Konzentrationen und Zusammensetzung der Gallensalze, mit denen im menschlichen Darm verglichen werden. Die in vorherigen Studien benutzten Werte waren postprandiale Gallensalzkonzentrationen im Ileum und umfassten Konzentrationen von 10 mM (ca. 0,47 %) im oberen Ileum, bis 2 mM (ca. 0,091 %) im unteren Ileum (Northfield und McColl 1973; Sorg und Sonenshein 2008). Gallensalze unterliegen einem kontinuierlichen Kreislauf aus postprandialer Sekretion und schneller Reabsorption, daher sind diese Werte vermutlich als zu hoch anzusehen. Perez der la Cruz Moreno et al. haben die Gallensalzkonzentrationen bei sechs fastenden Menschen im Duodenum und Jejunum mithilfe von endoskopischen Untersuchungen gemessen: Wie in Abbildung 4.2 dargestellt ist, zeigte sich unter den physiologischen Konzentrationen ein Gradient der Gallensalzgesamtkonzentration von ca. 2,6 mM im Duodenum und 3,5 mM im Jejunum (2006). Die Zusammensetzung der Gallensalze ist nicht gleichmäßig verteilt und verändert sich im Verlauf des Darms: Im Duodenum herrschen 0,26 % TCA und 0,09 % GCA, während die Konzentration von CA, CDCA, DCA zwischen 0,0011 – 0,0014 % liegt. Die Konzentration jedes Gallensalzes sinkt im Verlauf des Darms, bis zu Konzentrationen von 0,05 % TCA, 0,02 % GCA; CA, CDCA, DCA zwischen 0,0002 – 0,0008 % im Jejunum. LCA ist im Darm

nicht detektierbar (Perez de la Cruz Moreno et al. 2006). Das Ileum mit seinen niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird als Auskeimungsort betrachtet, da *ex vivo* Studien zeigen konnten, dass eine Auskeimung eher im Ileum, statt im Cäcum erfolgt (Giel et al. 2010; Theriot et al. 2014; 2016; Koenigskecht et al. 2015).

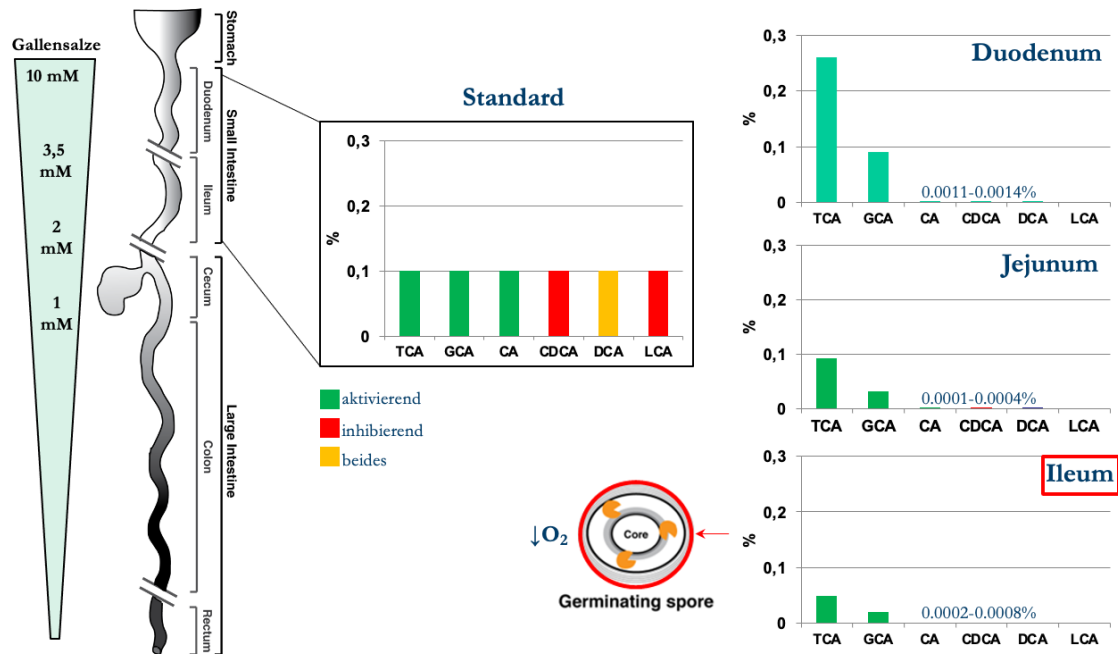


Abbildung 4.2 Physiologische Gallensalzkonzentrationen entlang des Darmverlaufs. Von links nach rechts: Angabe der Gesamtkonzentration, der Standard-0,1 %-Konzentration und jedes Gallensalzes im Duodenum, Jejunum und Ileum (mod. nach Shen 2015, mit freundlicher Genehmigung der Autorin).

Mit meiner Arbeit zum Einfluss von Gallensalzen auf das Keimungs-, Wachstums- und Sporulationsverhalten klinischer *C.-difficile*-Isolate wurde erstmals untersucht welche Relevanz die physiologische Gallensalzkonzentration im menschlichen Darm auf den Lebenszyklus von *C.-difficile* haben. Mit der Fragestellung, ob sich stammspezifische Unterschiede zeigen, wurden insgesamt 23 klinische *C.-difficile*-Isolate, mit mindestens drei Exemplaren aus jedem der fünf existierenden Kladen getestet. Zum Vergleich der Wirkung verschiedener Konzentrationen wurden die sieben Gallensalze (TCA, GCA, CA und DCA, CDCA, LCA, UDCA) mit verschiedenen Konzentrationen (Standard 0,1 %, intestinal hohe und niedrige Konzentrationen aus dem Duodenum und Jejunum, sowie Stuhlkonzentrationen gesunder, als auch CDI erkrankter Patienten) getestet. Unter intestinalen Gallensalzkonzentrationen zeigte sich, dass sich die Wirkung der wachstumsaktivierenden Gallensalze (TCA, GCA, CA) im Vergleich zu den 0,1 %-Standardkonzentrationen nicht unterscheidet. Im Vergleich dazu konnten die wachstumsinhibierenden Gallensalze (CDCA, DCA, LCA) die Auskeimung, das vegetative Wachstum, sowie die Sporulation von *C.-difficile* unter intestinalen Konzentrationen signifikant schlechter unterdrücken, als unter den Standard- oder Stuhlkonzentrationen. Es werden also insbesondere für die wachstumsinhibierenden Gallensalze höhere Konzentrationen, als die im menschlichen Gastrointestinaltrakt physiologisch detektierbaren benötigt, um das Wachstum von *C.-difficile* zu hemmen und so einen effektiven Schutz gegenüber einer CDI bieten zu können.

## 4.1 Sporenkeimung

Ähnlich zu bisherigen Studien bestätigte sich in meiner Arbeit, dass TCA, GCA und CA dosisunabhängig keimungsaktivierend auf *C. difficile*-Sporen sind. Im Vergleich dazu reichte die intestinale Konzentration wachstumsinhibierender Gallensalze nicht aus, um die Auskeimung zu verhindern. Erst höhere Konzentrationen der Gallensalze CDCA, LCA und DCA (bspw. Stuhl- oder 0,1-%-Standard) konnten die Auskeimung suffizient unterdrücken, dabei unterschieden sich die Wirkung von der Stuhl- und Standardkonzentration nicht.

Bei Betrachtung der Auskeimungsraten unter intestinalen Konzentrationen der wachstumsinhibierenden Gallensalzen fällt auf, dass unter abnehmenden Konzentrationen von intestinalem DCA, gleichermaßen die Anzahl der auskeimenden Stämme abnimmt. Die Isolate keimten damit dosisabhängig aus (Tabelle 3.8: Ausgekeimte Stämme anteilig unter DCA: intestinal hoch 23/23, medium 19/23, niedrig 17/23 Stämme). Hier scheint eine Schwellenkonzentration für Keimungsinduktion und Keimungsinhibition vorzuliegen. Im Vergleich keimten nur 14 Stämme in der Negativkontrolle, also reinem BHIS-Medium, aus. Auch wenn die Konzentration von DCA mit einem Wert von 0,0016 mM, 0,00007 % intestinal sehr niedrig erscheint, ist sie ausreichend um sogar eine Auskeimung zu unterstützen. Unter einer intestinal hohen Konzentration (0,001 %) sind sogar alle Stämme ausgekeimt. Damit können die keimungsaktivierende Wirkung von DCA vorheriger Studien bestätigt werden (Sorg und Sonenshein 2008). Steigen allerdings die DCA-Konzentrationen weiter an (z. B. 0,1 % Standard oder 0,05 % Stuhl) wird die Auskeimung vollständig inhibiert. Ein ähnliches Ergebnis spiegelt sich bei der Auskeimungsrate unter intestinaler CDCA-Konzentration. Hier keimten intestinal hoch 15/23, medium 15/23, niedrig 14/23 Stämme aus (Tabelle 3.8). Dabei sind alle Isolate der Klade 3 und 5 unter intestinalen CDCA Konzentrationen ausgekeimt; alle Klade-4-Isolate jedoch nicht. In den Kladen 1 und 2 traten dabei Variationen aus Keimung und Inhibition auf. Eine Studie von Sorg und Sonenshein (2009) zeigte eine keimungsinhibierende Wirkung von CDCA bei einer Konzentration von 0,1 %, jedoch keimten in dieser Studie 5/23 Stämme (u. a. der endemische Ribotyp 001 (1)) aus, lediglich die Stuhlkonzentration (0,2 %) inhibierte tatsächlich die Auskeimung bei allen Stämmen. Ob die erhöhten Auskeimungsraten rein zufällig entstanden sind oder ob eine wachstums- bzw. keimungsaktivierende Wirkung der inhibierenden Gallensalze unter intestinalen Konzentrationen bei bestimmten Stämmen vorliegt, ist damit zu diskutieren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich die Stämme gleichen, welche in nur BHIS-Medium (Abbildung 3.1) und unter intestinalen CDCA-Konzentrationen (Tabelle 3.8) auskeimten. Eine Rolle der inhibierenden Gallensalze als Protektoren gegenüber einer CDI scheint daher nicht so hoch zu sein, wie bisher angenommen.

## 4.2 Wachstumsverhalten

Den Einfluss intestinaler Gallensalzkonzentrationen auf das Wachstumsverhalten klinischer *C. difficile*-Isolate zeigt sich in den Wachstumskurven der vegetativen Zellen in einem Zeitraum von 9 h. Hier zeigten sich stammspezifische und gallensalzabhängige Unterschiede.

Mithilfe der Wachstumskurven dieser Arbeit konnte neben einer keimungsaktivierenden Wirkung ebenso ein wachstumsaktivierender Einfluss der Gallensalze CA, TCA und GCA auf das vegetative Wachstum der *C. difficile* gezeigt werden. Dabei wirkte TCA am effektivsten auf das exponentielle Wachstum der vegetativen Zellen: Innerhalb von 3 – 5 h sind alle Stämme in die exponentielle Wachstumsphase eingetreten. Die anderen aktivierenden Gallensalze CA, GCA und DCA waren weniger effizient und langsamer in der Aktivierung des Wachstums mit einer Wachstumsrate anteilig bei CA/DCA (20/23 Stämme) und GCA (18/23 Stämmen) und einem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach 5 – 8 h. Es fällt auf, dass einige Ribotypen (v. a. Klade-1-Stämme (RT 011, 012, 014)) innerhalb der 9 h sowohl unter keimungsaktivierenden Gallensalzen (CA und GCA), als auch unter dem keimungsaktivierenden aber wachstumsinhibierenden Gallensalz DCA kein Wachstum zeigten (Francis et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2014; Theriot und Young 2015).

Im Gegensatz zu anderen Studien, zeigten jedoch die Ergebnisse meiner Arbeit, dass DCA in seiner intestinalen Konzentration wachstumsaktivierend ist. In der Negativkontrolle (reines BHIS-Medium, Abbildung 3.10) sind lediglich 5/23 Stämme in die Wachstumsphase eingetreten. Wie bei den Wachstumsraten unter reinem BHIS-Medium, konnte dabei unter den intestinalen DCA-Konzentrationen bei allen Klade-5-Stämmen (RT 078, 126 und unbekannt), dem prävalenten RT 001/072 und einem Klade 3 RT 127, das exponentielle Wachstum nicht inhibiert werden. Unter der höheren duodenalen Konzentration von DCA (25,4  $\mu\text{M}$ ) zeigten mehr Stämme (acht Ribotypen 011/049 (1), 014/020 (1), SLO160 (1), 053 (1), 027 (2), 027 (2), 017 (4), SLO237(4)) eine Zunahme der optische Dichte nach 9 h und damit den Beginn des vegetativen Wachstums, wengleich die jejunal niedrigere DCA-Konzentration (8,2  $\mu\text{M}$ ) mit einem gewachsenen Anteil von 6 Ribotypen (084 (1), 023 (3), unbekannt (3), 127 (3), SLO 091 (4), SLO 235 (4)) erneut im Vergleich zu reinem BHIS keinen Unterschied auf die vegetativen *C. difficile*-Zellen erkennen ließ. Da mit den Ergebnissen meiner Studie ein wachstumsaktivierender Einfluss von DCA auf das bakterielle Wachstum unter intestinaler Konzentration nach 9 h gezeigt werden konnte, ist die wachstumsinhibierende Wirkung von DCA vorheriger Studien (Sorg und Sonenshein 2008) zu diskutieren.

Analog zu den Auskeimungsversuchen zeigte sich bei CDCA erneut ein geringgradig aktivierender Einfluss auf das vegetative Wachstum: Nach 5 – 8 h traten 7/23 Stämme in das exponentielle Wachstum ein, während in der Kontrollgruppe ohne Gallensalzzugabe nur 5/23 Stämmen nach 5 – 8 h ein exponentielles Wachstum aufwiesen. Auffällig war, dass sehr virulente Stämme 078 (5) und 127 (3) und der endemische RT 001 (1) sowohl unter hoher intestinaler CDCA-Konzentration, als auch in nur reinem BHIS ein exponentielles Wachstum zeigten. Der Klade-5-Stamm des virulenten Ribotyps 078 zeigte hier das schnellste Wachstum unter CA, GCA, DCA, CDCA und nur reinem BHIS. Die Ergebnisse zeigten dabei eine höhere Wachstumsrate unter CDCA als in der Negativkontrolle. Da es jedoch häufig dieselben Stämme sind, die in reinem BHIS und/oder CDCA auskeimten und wuchsen, bleibt es zu diskutieren, ob die intestinale Konzentration von CDCA lediglich zu niedrig war, um die natürliche Auskeimung und das Wachstum der Stämme zu inhibieren.



### 4.3 Sporulation

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass intestinale Gallensalzkonzentrationen in der Keimungs- und Wachstumshemmung von klinischen *C.-difficile*-Isolaten eine untergeordnete Rolle spielen, sollte in Hinblick auf die Prävention und Heilung einer CDI der Einfluss von Gallensalzen auf die Sporulation untersucht werden. Die Sporulation von *C.-difficile* ist noch wenig erforscht. Die Bedeutung der Sporulation auf die Persistenz einer CDI trotz antibiotischer Therapie und erneuter Virulenz eines Ribotyps könnte hier größer sein als bisher angenommen. In der Wachstumsphase einer *C.-difficile*-Kultur leitet ein Teil unwillkürlich die Sporulation ein (Howerton et al. 2013a; Konigsknecht et al. 2015). Dadurch dürfte in einer wachsenden Kultur die Sporulation unter dem Einfluss wachstumsaktivierender Gallensalze nicht beeinflusst werden. Daneben kann die Sporulation auch unter schlechten Umweltbedingungen ausgelöst werden (Burbulys et al. 1991; Underwood et al. 2009; Higgins und Dworkin 2012). Wenn unsichere Umweltbedingungen jedoch die Sporulation einleiten, liegt die Vermutung nahe, dass es unter dem Einfluss wachstumshemmender Gallensalze zu einer verstärkten Sporeninduktion kommen könnte. Hier zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle, dass intestinale Konzentrationen der wachstumshemmenden Gallensalze CDCA und DCA weder das exponentielle Wachstum der vegetativen *C.-difficile*-Zellen, noch die Sporulation der exponentiell wachsenden Kultur beeinflussen. Eventuell ist die Konzentration zu niedrig um einen hemmenden/aktivierenden Einfluss auszuüben. Die höheren Konzentrationen von CDCA, DCA und LCA zeigten gegensätzliche Ergebnisse: Unter Stuhlkonzentrationen inhibierten sie das exponentielle Wachstum und die Sporulation. Somit führen die physiologisch hohen Konzentrationen im Stuhl zu einer Sporulationshemmung. Eventuell ist dieser Mechanismus durch einen inhibierenden Einfluss auf den Bakterienstoffwechsel durch die wachstumshemmenden Gallensalze erklärbar. Dadurch ist weder ein Wachstum, noch eine Sporulation möglich. Unter diesem Aspekt erscheint die Wirkung von aktivierenden Gallensalzen auf die Sporulation umso wichtiger. Wenn das Wachstum aktiviert wird, wird ebenso die Sporulation induziert. Eine hohe Sporenzahl im menschlichen Darm könnte somit einen Erklärungsansatz für die hohen Rezidivraten einer CDI darstellen. Die stoffwechsellinaktiven Sporen überdauern eine antibiotische Therapie während sich der Gallensalzmetabolismus durch die angegriffene Darmflora verändert. Die resultierende Gallensalzverschiebung in Richtung höherer Konzentrationen von primären Gallensalzen erleichtert die Auskeimung der Sporen, welche zu Toxin-produzierenden vegetativen Zellen auswachsen und anschließend erneut Sporen ausbilden können.

Sobald die Sporulation eingeleitet wird, müsste die Anzahl der Sporen als CFU/ml pro Zeiteinheit zunehmen oder konstant bleiben. Zweifelhaft sind die teils schwankenden Sporenzahlen in den Ergebnissen der Sporenassays (vgl. Abbildung 3.26: RT012, BHI; außerdem s. Abbildung 3.28 – 3.40). Dieser Trend kann durch Fehler im Aufbau des Experiments, wie z. B. unterschiedliche Vortexzeiten, Pipettierfehler und/oder durch Verdünnungsfehler im Experiment entstanden sein. Weiterhin zeigten sich stammspezifische Unterschiede. Der virulente Ribotyp 078, ein Klade-5-Stamm (SC052), zeigte in den Wachstumsversuchen ein schnelleres Wachstum (s. Abbildung 3.10). In der Sporulation zeigt dieser Stamm eine verspätete und langsamere Sporulation (nach 3

h, s. Abbildung 3.40), ebenso wie der Laborstamm 630 (RT 012, Klade 1) (nach 3 h, s. Abbildung 3.26). Die anderen virulenten Ribotypen 027, beide Klade-2-Stämme, und der endemische Ribotyp 001 (Klade 1) sporulierten bereits nach 1 h (Abbildung 3.30 und 3.32). Es ergibt sich die Frage, ob und wie effektiv die Sporulationsfähigkeit eines Stammes einen Einfluss auf die Persistenz hat. Hierzu wäre die Ermittlung der Sporulation von mehr als acht Stämmen aus allen Kladen nötig, um stammspezifischen Unterschiede aufzuzeigen, und Messungen der gebildeten Toxine sollten vergleichend dazu ebenfalls vorgenommen werden.

#### 4.4 Therapiealternativen im Rahmen einer CDI

Während die Effektivität einer Stuhltransplantation zur Behandlung einer CDI lange ungeklärt war, stellte die Rekolonisierung der physiologischen bakteriellen Flora einen Erklärungsansatz dar (s. Kapitel 1.2.3 Therapie und Prognose). Eine aktuelle Studie von Mullish et al. begründet den Erfolg einer Stuhltransplantation durch die Wiederherstellung der bakteriellen Hydrolasen, welche die primären Gallensalze (v. a. TCA) zu CA dekonjugieren (2019). Durch diese enzymatische Aktivität verschwindet TCA als Keimungsaktivator und eine Auskeimung der Sporen findet nicht statt. Die Wiederherstellung der physiologischen Gallensalzkomposition mit einem Überwiegen der sekundären Gallensalze erklärt demnach den Ausbruchswiderstand einer CDI. Die Ergebnisse dieser Studie konnten allerdings zeigen, dass die intestinalen Konzentrationen sekundärer Gallensalze zu niedrig sind, um eine Auskeimung oder das Wachstum aller getesteten Stämme effektiv zu verhindern.

Zur Behandlung verschiedener gastrointestinaler Krankheitsbilder, wie z. B. einer primär-sklerosierenden Cholangitis, wird das Gallensalz UDCA therapeutisch eingesetzt. Im Bezug auf eine CDI wurde in vorherigen Versuchen, sowie in den Versuchen zur Auskeimung dieser Arbeit eine auskeimungsinhibierende Wirkung von UDCA (s. Abbildung 3.3) nachgewiesen. Dabei reichten Konzentrationen von 0,1 % (2,54 mM) aus, um eine Auskeimung zu verhindern (Giel et al. 2010; Sorg und Sonenshein 2010). Als Therapiealternative zur Behandlung einer CDI eröffnet sich daher die Möglichkeit die Behandlung mit UDCA, wie sie beispielweise bei Gallenwegserkrankungen angewendet wird (Poupon 2012). Jedoch ist die Verwendung von Gallensalzen, insbesondere sekundärer Gallensalze kritisch zu sehen. Sehr hohe Konzentrationen sekundärer Gallensalze verursachen oxidativen Stress an der intestinalen Mukosa und Entzündungsreaktionen (Stadler et al. 1988; Vaughn et al. 2019), während sie unter niedrigeren Konzentrationen die Zytokinproduktion reduzieren (Ward et al. 2017) und damit anti-inflammatorisch wirken. Andere wachstumsinhibierende Gallensalze, wie CDCA, DCA und LCA führten bei langfristiger Einnahme zu einer erhöhten Rate vom kolorektalen Karzinom (Reddy et al. 1977; Kulkarni et al. 1982; Kandell und Bernstein 1991; Bernstein et al. 1999). Außerdem gibt es Hinweise, dass Gallensalzmetabolite einen Einfluss auf intestinale Immunreaktionen haben können. So können Gallensalzderivate die Sekretion eines Interleukins (IL-18) induzieren und damit das Pyrininflammosoms aktivieren (Alimov et al. 2019). Interleukine sind von Leukozyten (weiße Blutzellen, Immunzellen) sezernierte Botenstoffe, welche

helfen zellvermittelte Immunreaktionen auszulösen. Alimov et al. diskutieren hierbei, dass eine pathologische Pyrininflammosomaktivierung, welche zu Autoimmunreaktionen (Hoffman et al. 2001) und überschießenden Entzündungsreaktionen (Xu et al. 2014) führen kann, durch Gallensalze koordiniert werden.

## 5 Zusammenfassung

*Clostridioides-difficile* spielt als häufigster Erreger nosokomial erworbener Diarrhoen weltweit eine zunehmende Rolle: Seit Jahren werden zunehmende Inzidenz-, Morbiditäts- und Mortalitätsraten von *C.-difficile*-Infektionen (CDI) beobachtet.

Als obligat-anaerobes Bakterium ist *C.-difficile* in der Lage umweltresistente Sporen auszubilden und somit seine Verbreitung zu sichern. Nach fäkal-oraler Aufnahme der Sporen aktivieren Gallensalze im Darm des Wirts die Keimung und das vegetative Wachstum des Bakteriums. Die intakte Darmflora bildet durch ihren Einfluss auf die physiologische Gallensalzkonzentration einen Kolonisationswiderstand gegen *C.-difficile*. Eine vorausgegangene orale antibiotische Therapie begünstigt die Entwicklung einer CDI, da diese die Darmflora und folglich die physiologischen Gallensalzkonzentrationen im Darm verändert. Bisherige Studien zeigten, dass bei einer artifiziellen Konzentration von 0,1 % die Gallensalze Taurocholat (TCA), Cholat (CA), Deoxycholat (DCA) und Glykocholat (GCA) die Sporenkeimung von *C.-difficile* aktivieren, während die Auskeimung durch Chenodeoxycholat (CDCA) und das Wachstum vegetativer Zellen durch Deoxycholat (DCA) und Lithocholat (LCA) gehemmt wird. In diesen Studien wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass die physiologische Konzentration der Gallensalze im Darm nicht der bisher standardmäßig verwendeten, artifiziellen Konzentration von 0,1 % entspricht. Somit ergibt sich die Frage, ob eine veränderte Darmflora und die daraus resultierende Verschiebung der Gallensalzzusammensetzung ursächlich für eine akute Infektion oder einen chronischen Verlauf der CDI sein können. Ebenso ist bisher unklar, ob die Wiederherstellung der physiologischen Gallensalzkonzentration ein möglicher Therapieansatz für eine CDI darstellen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der physiologischen Gallensalzkonzentrationen auf das Keimungs- und Wachstumsverhalten von *C.-difficile*, also auch auf eine erneute Sporeninduktion zu untersuchen. Um stammspezifische Unterschiede zu ermitteln, wurden 23 klinische Isolate von CDI-Patienten aus den fünf existierenden Kläden von *C.-difficile* mit unterschiedlicher Toxin-ausstattung und Herkunft untersucht. Zur Beurteilung des Gallensalzeinflusses auf die Sporenkeimung und das Wachstumsverhalten von *C.-difficile* wurden die Stämme unter der bisherigen Standard-, aber auch unter der physiologischen intestinalen und der im Stuhl vorhandenen Konzentration verschiedener Gallensalze inkubiert und das bakterielle Wachstum durch Messung der optischen Dichte in Wellplatten, bzw. Kultur-Hungates ermittelt. Die Induktion der Sporulation wurde anhand von acht Stämmen durch Auszählen der CFU/ml in Sporenassays untersucht.

Wenn auch geringfügige stammspezifische Unterschiede festgestellt wurden, konnten folgende Ergebnisse erzielt werden: Die Gallensalze CDCA, LCA und DCA, welche unter der Standardkonzentration von 0,1 % sowohl die Auskeimung als auch das Wachstum von *C.-difficile* inhibierten, konnten hingegen bei Einsatz physiologischer intestinaler Konzentrationen weder die Auskeimung noch das Wachstumsverhalten hemmen. Lediglich die physiologischen Konzentrationen von CDCA, DCA und LCA im Stuhl konnten die Auskeimung, das Wachstum, als auch die Sporulation von *C.-difficile* inhibieren. Im Hinblick auf die Wachstums- und Keimungsaktivierung zeigte sich

kein Unterschied zwischen der artifiziellen und der intestinalen Konzentration durch die Gallensalze TCA und GCA. Bei CA und DCA zeigte sich dosisabhängig eine unterschiedliche Wachstumsaktivierung.

Der therapeutische Effekt einer Stuhltransplantation wird durch eine Rekolonisierung physiologischer Flora und folglich einer Reduktion hoher aktivierender Gallensalzkonzentrationen erklärt. Die zusätzliche Gabe inhibierender Gallensalze als Therapiealternative ist jedoch kritisch zu sehen, da es zu einer Schädigung der intestinalen Mukosa, Auslösung von Autoimmunerkrankungen, bis zur Entwicklung von kolorektalen Karzinomen kommen kann.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einfluss intestinaler Konzentrationen der inhibierenden Gallensalze auf die Sporenauskeimung, das vegetative Wachstum und die Sporulation nur sehr gering ist. Daher muss die bisherige Annahme, dass das Missverhältnis der Gallensalzkonzentrationen ursächlich für einen chronischen Verlauf einer CDI ist, hinterfragt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ali S, Moore G, Wilson APR (2011): Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *J Hosp Infect* **79**, 97–98
- Alimov I, Menon S, Cochran N, Maher R, Wang Q, Alford J, Concannon JB, Yang Z, Harrington E, Llamas L et al. (2019): Bile acid analogues are activators of pyrin inflammasome. *J Biol Chem* **294**, 3359–3366
- Allegretti JR, Kearney S, Li N, Bogart E, Bullock K, Gerber GK, Bry L, Clish CB, Alm E, Korzenik JR (2016): Recurrent *Clostridium difficile* infection associates with distinct bile acid and microbiome profiles. *Aliment Pharmacol Ther* **43**, 1142–1153
- 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, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2007): Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* **13**, 1048–1057
- Bassis CM, Theriot CM, Young VB (2014): Alteration of the murine gastrointestinal microbiota by tigecycline leads to increased susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 2767–2774
- Bauer MP, Goorhuis A, Koster T, Numan-Ruberg SC, Hagen EC, Debast SB, Kuijper EJ, van Dissel JT (2008): Community-onset *Clostridium difficile*-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Neth J Med* **66**, 207–211
- Berger F, Mellmann A, Müller L von, Gärtner B (2018): Ausbruchsuntersuchungen bei *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile*.
- Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Dinning P, Jabi R, Sampliner RE, McCuskey MK, Panda M, Roe DJ, L'Heureux L et al. (1999): A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Res* **59**, 2353–2357
- Borody TJ, Khoruts A (2011): Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 88–96
- Borriello SP, Barclay FE (1986): An in-vitro model of colonisation resistance to *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* **21**, 299–309
- Britton RA, Young VB (2012): Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends Microbiol* **20**, 313–319
- Brown JRM, Flemer B, Joyce SA, Zulquernain A, Sheehan D, Shanahan F, O'Toole PW (2018): Changes in microbiota composition, bile and fatty acid metabolism, in successful faecal microbiota transplantation for *Clostridioides difficile* infection. *BMC Gastroenterol* **18**, 131
- Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Ubeda C, Xavier J, Pamer EG (2012): Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect Immun* **80**, 62–73

- 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 restoration of bile acid-mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205–208
- Burbulys D, Trach KA, Hoch JA (1991): Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multi-component phosphorelay. *Cell* 64, 545–552
- Carey JB, Watson CJ (1955): Isolation of deoxycholic acid from normal human feces. *J Biol Chem* 216, 847–850
- Carroll KC, Bartlett JG (2011): Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol* 65, 501–521
- Carter GP, Rood JI, Lyras D (2012): The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 20, 21–29
- Chakra CNA, Pepin J, Sirard S, Valiquette L (2014): Risk Factors for Recurrence, Complications and Mortality in *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. *PLoS One* 9, e98400
- Chiang JYL (2009): Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50, 1955–1966
- Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, Wren BW, Fairweather NF, Dougan G, Lawley TD (2012): The *Clostridium difficile* *spo0A* gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun* 80, 2704–2711
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ (2014): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20, 1–26
- Dembek M, Stabler RA, Witney AA, Wren BW, Fairweather NF (2013): Transcriptional analysis of temporal gene expression in germinating *Clostridium difficile* 630 endospores. *PLoS One* 8, e64011
- DGHM (2015): *C. difficile*-Infektion (Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Mikrobiologie). S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53, 418–459
- Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J, Thompson A, Killgore G, Mayfield J, Camins B, Woeltje K, McDonald JR, McDonald LC et al (2007): Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control* 35, 315–318
- Edwards AN, McBride SM (2016): Isolating and purifying *Clostridium difficile* spores. *Methods Mol Biol* 1476, 117–128
- Fekety R, Shah AB (1993): Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 269, 71–75
- Fimlaid KA, Shen A (2015): Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Curr Opin Microbiol* 24, 88–95
- Francis MB, Allen CA, Shrestha R, Sorg JA (2013): Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog* 9, e1003356
- Freedberg DE, Lebowitz B, Abrams JA (2014): The impact of proton pump inhibitors on the human gastrointestinal microbiome. *Clin Lab Med* 34, 771–785
- Freeman J, O'Neill FJ, Wilcox MH (2003): Effects of cefotaxime and desacetylcefotaxime upon *Clostridium difficile* proliferation and toxin production in a triple-stage chemostat model of the human gut. *J Antimicrob Chemother* 52, 96–102

- Garneau JR, Valiquette L, Fortier LC (2014): Prevention of *Clostridium difficile* spore formation by sub-inhibitory concentrations of tigecycline and piperacillin/tazobactam. *BMC Infect Dis* **14**, 29
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014): *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* **5**, 15–27
- Giel JL, Sorg JA, Sonenshein AL, Zhu J (2010): Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*. *PLoS One* **5**, e8740
- Goldenberg SD, French GL (2011): Lack of association of *tcdC* type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *J Infect* **62**, 355–362
- Gough E, Shaikh H, Manges AR (2011): Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* **53**, 994–1002
- Hall IC, O’toole E (1935): Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerob, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* **49**, 390–402
- Heeg D, Burns DA, Cartman ST, Minton NP (2012): Spores of *Clostridium difficile* clinical isolates display a Diverse Germination Response to Bile Salts. *PLoS One* **7**, e32381
- Hensgens MPM, Goorhuis A, van Kinschot CMJ, Crobach MJT, Harmanus C, Kuijper EJ (2011): *Clostridium difficile* infection in an endemic setting in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**, 587–593
- Higgins D, Dworkin J (2012): Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 131–148
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD (2001): Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* **29**, 301–305
- Hofmann AF (2009): The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 2584–2598
- Horvat S, Rupnik M (2018): Interactions between *Clostridioides difficile* and fecal microbiota in in vitro batch model: Growth, sporulation, and microbiota changes. *Front Microbiol* **9**, 1633
- Howerton A, Patra M, Abel-Santos E (2013a): A new strategy for the prevention of *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis* **207**, 1498–1504
- Howerton A, Patra M, Abel-Santos E (2013b): Fate of ingested *Clostridium difficile* spores in mice. *PLoS One* **8**, e72620
- Hungate RE (1950): The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria 1. *Bacteriol Rev* **14**, 1–49
- Hurley BW, Nguyen CC (2002): The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med* **162**, 2177–2184
- Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH (2013): *Clostridium difficile*: A European perspective. *J Infect* **66**, 115–128
- Joyce SA, Gahan CGM (2016): Bile acid modifications at the microbe-host interface: Potential for nutraceutical and pharmaceutical interventions in host health. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**, 313–333



- Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, Takei H, Muto A, Nittono H, Ridlon JM et al. (2013): Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* **58**, 949–955
- Kandell RL, Bernstein C (1991): Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. *Nutr Cancer* **16**, 227–238
- Kang JD, Myers CJ, Harris SC, Kakiyama G, Lee I-K, Yun B-S, Matsuzaki K, Furukawa M, Min H-K, Bajaj JS et al. (2019): Bile Acid 7 $\alpha$ -Dehydroxylating gut bacteria secrete antibiotics that inhibit *Clostridium difficile*: Role of secondary bile acids. *Cell Chem Biol* **26**, 27–34.e4
- Kelly CP (2012): Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clin Microbiol Infect* **18 Suppl 6**, 21–27
- Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, Shoshiev MS, Hagan AK, Hastie JL, Giordano NP, Smith AD, Schubert AM, Jr PEC et al. (2017): Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLOS Pathogens* **13**, e1006443
- Kochan TJ, Shoshiev MS, Hastie JL, Somers MJ, Plotnick YM, Gutierrez-Munoz DF, Foss ED, Schubert AM, Smith AD, Zimmerman SK et al. (2018a): Germinant synergy facilitates *Clostridium difficile* spore germination under physiological conditions. *mSphere* **3**, e00335-18
- Kochan TJ, Foley MH, Shoshiev MS, Somers MJ, Carlson PE, Hanna PC (2018b): Updates to *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol* **200**, e00218-18
- Kociolek LK, Gerding DN (2016): Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 150–160
- 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
- Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, Drudy D, Fitzpatrick F, Wiuff C, Brown DJ et al. (2008): Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* **13**, 18942
- Kulkarni MS, Cox BA, Yielding KL (1982): Requirements for induction of DNA strand breaks by lithocholic acid. *Cancer Res* **42**, 2792–2795
- Lawley TD, Walker AW (2013): Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**, 1–11
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016): Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* **40**, 95–99
- Le Monnier A, Zahar JR, Barbut F (2014): Update on *Clostridium difficile* infections. *Med Mal Infect* **44**, 354–365
- Leitlinie *C. difficile*-Infektion: siehe DGHM (2015)
- 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
- Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue Y-K, OPT-80-003 Clinical Study Group (2011): Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* **364**, 422–431

- Miller M, Gravel D, Mulvey M, Taylor G, Boyd D, Simor A, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D et al. (2010): Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. *Clin Infect Dis* 50, 194–201
- Mullish BH, McDonald JAK, Pechlivanis A, Allegretti JR, Kao D, Barker GF, Kapila D, Petrof EO, Joyce SA, Gahan CGM et al. (2019): Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut* 68, 1791–1800
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000): Resistance of bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 548–572
- Norddeutsches Zentrum für Mikrobielle Genomforschung. <http://www.nzmg.de/index.php?sec=cdiff>; Zugriff am 03.10.2020
- Northfield TC, McColl I (1973): Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut* 14, 513–518
- Ozaki E, Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Matsumoto K, Takada T, Nomoto K, Tanaka R et al. (2004): *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. *J Med Microbiol*, 53, 167–172
- Paredes-Sabja D, Sarker MR (2012): Interactions between *Clostridium perfringens* spores and Raw 264.7 macrophages. *Anaerobe* 18, 148–156
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014): *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 22, 406–416
- Pepin J (2004): *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 171, 466–472
- 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
- Perez de la Cruz Moreno M, Oth M, Deferme S, Lammert F, Tack J, Dressman J, Augustijns P (2006): Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. *J Pharm Pharmacol* 58, 1079–1089
- Poupon R (2012): Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36 Suppl 1, S3-12
- Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, Iqbal TH (2017): Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 46, 479–493
- Rao A, Jump RLP, Pultz NJ, Pultz MJ, Donskey CJ (2006): In vitro killing of nosocomial pathogens by acid and acidified nitrite. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3901–3904
- Rea MC, O’Sullivan O, Shanahan F, O’Toole PW, Stanton C, Ross RP, Hill C (2012): *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *J Clin Microbiol* 50, 867–875
- Reddy BS, Watanabe K, Weisburger JH, Wynder EL (1977): Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res* 37, 3238–3242

- Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB (2011): The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* Infection. *Gut Microbes* 2, 145–158
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006): Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47, 241–259
- RKI - RKI-Ratgeber - Clostridioides (früher *Clostridium*) *difficile*. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Clostridium.html;jsessionid=F6250B6564F5BAF2EB2A75BCF0284100.internet051#doc2393684bodyText16](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html;jsessionid=F6250B6564F5BAF2EB2A75BCF0284100.internet051#doc2393684bodyText16); Zugriff am 03.10.2020
- Saujet L, Pereira FC, Henriques AO, Martin-Verstraete I (2014): The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 358, 1–10
- Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F (2013): Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 17, 225–235
- Schwan C, Kruppke AS, Nölke T, Schumacher L, Koch-Nolte F, Kudryashev M, Stahlberg H, Aktories K (2014): *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 2313–2318
- Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeño-Tárraga AM, Wang H et al. (2006): The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics* 38, 779–786
- Setlow P (2003): Spore germination. *Curr Opin Microbiol* 6, 550–556
- Setlow P (2006): Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101, 514–525
- Setlow P, Johnson EA (2013): Spores and their significance. *Food Microbiology* 2, 45–79
- Setlow P (2014): Spore resistance properties. *Microbiol Spectr* 2, 5
- Shen A (2015): A Gut Odyssey: The impact of the microbiota on *clostridium difficile* spore formation and germination. *PLOS Pathogens* 11, e1005157
- Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016): *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16020
- Sorg JA (2014): Microbial bile acid metabolic clusters: the bouncers at the bar. *Cell Host Microbe* 16, 551–552
- Sorg JA, Sonenshein AL (2008): Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol* 190, 2505–2512
- Sorg JA, Sonenshein AL (2009): Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol* 191, 1115–1117
- Sorg JA, Sonenshein AL (2010): Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol* 192, 4983–4990
- Stadler J, Stern HS, Yeung KS, McGuire V, Furrer R, Marcon N, Bruce WR (1988): Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 29, 1326–1331

- Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ (2017): Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 47–64
- Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M, Zuckerbraun BS (2013): Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol* 108, 478–498
- Tartof SY, Rieg GK, Wei R, Tseng HF, Jacobsen SJ, Yu KC (2015): A comprehensive assessment across the healthcare continuum: risk of hospital-associated *Clostridium difficile* infection due to outpatient and inpatient antibiotic exposure. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36, 1409–1416
- Theriot CM, Koenigskecht MJ, Carlson PE, Hatton GE, Nelson AM, Li B, Huffnagle GB, Z Li J, Young VB (2014): Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 5, 3114
- Theriot CM, Young VB (2015): Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 69, 445–461
- Theriot CM, Bowman AA, Young VB (2016): Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. *mSphere* 1, e00045
- Thomas LA, Veysey MJ, French G, Hylemon PB, Murphy GM, Dowling RH (2001): Bile acid metabolism by fresh human colonic contents: a comparison of caecal versus faecal samples. *Gut* 49, 835–842
- Trifan A, Stanciu C, Girleanu I, Stoica OC, Singeap AM, Maxim R, Chiriac SA, Ciobica A, Boiculescu L (2017): Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 23, 6500–6515
- Underwood S, Guan S, Vijayasubhash V, Baines SD, Graham L, Lewis RJ, Wilcox MH, Stephenson K (2009): Characterization of the sporulation initiation pathway of *clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol* 191, 7296–7305
- van den Berg, RJ Claas ECJ, Oyib DH, Klaassen CHW, Dijkshoorn L, Brazier JS, Kuijper EJ (2004): Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *J Clin Microbiol* 42, 1035–1041
- van Nood E, Vriee A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JFWM, Tijssen JGP et al. (2013): Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 368, 407–415
- Vaughn BP, Kaiser T, Staley C, Hamilton MJ, Reich J, Graiziger C, Singroy S, Kabage AJ, Sadowsky MJ, Khoruts A (2019): A pilot study of fecal bile acid and microbiota profiles in inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Gastroenterol* 12, 9–19
- Vollaard EJ, Clasener HA (1994): Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 409–414
- Voth DE, Ballard JD (2005): *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18, 247–263
- Ward JBJ, Lajczak NK, Kelly OB, O'Dwyer AM, Giddam AK, Ní Gabhann J, Franco P, Tambuwala MM, Jefferies CA, Keely S et al. (2017): Ursodeoxycholic acid and lithocholic acid exert anti-inflammatory actions in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312, G550–G558
- Weingarden AR, Chen C, Bobr A, Yao D, Lu Y, Nelson VM, Sadowsky MJ, Khoruts A (2014): Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G310–319

- Weingarden AR, Dosa PI, DeWinter E, Steer CJ, Shaughnessy MK, Johnson JR, Khoruts A, Sadowsky MJ (2016): Changes in colonic bile acid composition following fecal microbiota transplantation are sufficient to control *Clostridium difficile* germination and growth. *PLoS One* 11, e0147210
- 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
- Wilson KH, Sheagren JN, Freter R (1985): Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the syrian hamster. *J Infect Dis* 151, 355–361
- Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong Y-N, Peng X, Xi JJ, Chen S, et al. (2014): Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the pyrin inflammasome. *Nature* 513, 237–241

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Uwe Groß für die Möglichkeit als ein Teil der *C.-difficile*-Arbeitsgruppe, dieses Promotionsthema erarbeiten zu können und für seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft während der experimentellen Arbeit sowie bei der kritischen Durchsicht dieser Dissertation. Ich danke ihm zudem für die Teilnahme zum Clothpath-Kongress in Leiden 2019.

Ich bedanke mich bei den sehr hilfsbereiten und freundlichen Kollegen im Labor und besonders Ines Öhmig für eine immer nette Atmosphäre im Labor und ihre fachliche Unterstützung.

Ich möchte mich bei Frau Ortrud Zimmermann, Prof. Dr. Maja Rupnik und Prof. Dr. Lutz von Müller für die Ribotypisierung der genutzten *C.-difficile*-Stämme und für das Bereitstellen der vielen Stämme bedanken.

Ich danke Dr. Albert Rosenberger für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und Dr. Ute Sandholzer für die gute Beratung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Daniela Wetzel für die kompetente fachliche Unterstützung bei der Erarbeitung der Thematik, das Erlernen der Laborarbeit, der präzisen Vermittlung der Methodik, der Auswertung und Interpretation aller Ergebnisse.