



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
**WISSENSCHAFTSZENTRUM WEIHENSTEPHAN FÜR ERNÄHRUNG,**  
**LANDNUTZUNG UND UMWELT**  
**Lehrstuhl für Mikrobiologie**

**ANREICHERUNG STAMMSPEZIFISCHER DNS-FRAGMENTE DURCH  
MIKROTITERPLATTEN-AUSSCHLUSSHYBRIDISIERUNG FÜR DIE *IN*  
*VITRO* DIAGNOSTISCHE IDENTIFIZIERUNG VON *CLOSTRIDIUM*  
*DIFFICILE* STÄMMEN MITTELS PCR**

**Anna Christina Geisel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl  
2. apl. Prof. Dr. M. Ehrmann

Die Dissertation wurde am 17.12.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.03.2014 angenommen.







## INHALT

Abbildungen.....	8
Tabellen.....	9
Abkürzungen.....	11
I Einleitung.....	15
I.1 <i>Clostridium difficile</i> .....	15
I.1.1 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren.....	16
I.1.2 Typisierung.....	22
I.1.3 Epidemiologie und klinische Überwachung.....	26
I.1.4 Virulenz.....	29
I.1.5 Detektion und Diagnose.....	30
I.2 Subtraktive Hybridisierung.....	33
I.3 Zielsetzung.....	35
II Material und Methoden.....	37
II.1 Verwendete Mikroorganismen und DNS-Proben.....	37
II.2 Extraktion genomischer DNS nach Wisotzkey <i>et al.</i> (1990, modifiziert) <sup>[134]</sup> .....	40
II.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) <sup>[106]</sup> .....	41
II.3.1 TaKaRa ExTaq™ PCR System.....	41
II.3.2 BIOTAQ™ PCR System.....	42
II.3.3 PCR mit dem Amplex Tth-DNA Polymerase PCR System.....	42
II.3.4 Gradienten-PCR.....	43
II.4 Standard-Agarose-Gelelektrophorese.....	43
II.5 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	44
II.6 Klonierung von PCR-Produkten.....	44
II.6.1 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen nach Inoue <i>et al.</i> (1990, modifiziert) <sup>[58]</sup> .....	44
II.6.2 Vektor-Ligation und -Transformation.....	45
II.6.3 Überprüfung rekombinanter Zellen (Klonscreening).....	46
II.7 Plasmidextraktion.....	46
II.8 Enzymatische DNS-Modifikation.....	46
II.8.1 Restriktionsverdau.....	46
II.8.2 Ligation.....	47
II.9 Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung nach Zwirgmaier <i>et al.</i> (2001, modifiziert) <sup>[137]</sup> .....	47
II.9.1 Herstellung Adaptor-ligierter Tester- und Subtraktor-DNS.....	49
II.9.2 Immobilisierung von Subtraktor-DNS.....	49
II.9.3 Ausschlussybridisierung und Isolierung spezifischer DNS-Fragmente.....	50

---

II.10	DNS-Sequenzierung .....	50
II.11	Vergleichende Sequenzanalyse .....	51
II.12	<i>Primer</i> -und Sonden-Design.....	51
II.13	PCR zur Überprüfung der Stammspezifität neu designer <i>Primer</i> .....	52
II.14	Prototyp „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“(Genspeed®).....	53
III	Ergebnisse .....	57
III.1	Verifikation der Spezies der verwendeten Mikroorganismen .....	57
III.2	Isolierung stammspezifischer DNS-Fragmente und Entwicklung spezifischer <i>Primer</i> paare .....	57
III.2.1	<i>Clostridium difficile</i> 27 als Tester .....	58
III.2.2	<i>Clostridium difficile</i> RK 305 als Tester .....	66
III.2.3	Entwicklung eines spezifischen <i>Primer</i> paares auf Basis mittels <i>in silico</i> BLAST-Analyse identifizierter Ribotyp 001-spezifischer DNS-Fragmente ..	74
III.3	Untersuchung von Diskrepanzen bezüglich der Ribotyp-Zuordnung und Reinheit einiger <i>C. difficile</i> Stämme .....	78
III.3.1	„Ribotyp-PCR“ .....	78
III.3.2	Untersuchungen bezüglich der Reinheit des ursprünglich verfügbaren DNS-Materials.....	80
III.4	Multiplex-PCR zur Überprüfung der Stammspezifität neu designer <i>Primer</i> .....	82
III.4.1	Evaluierung der Multiplex-PCR-Bedingungen .....	82
III.4.2	Diagnostische Multiplex-PCR .....	84
III.5	Hybridisierungsexperimente mit dem Prototyp „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“ (Genspeed®) .....	89
III.5.1	Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen .....	90
III.5.2	Hybridisierung mit dem Prototyp „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“ (Genspeed®).....	102
IV	Diskussion .....	111
IV.1	Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung.....	111
IV.2	Multiplex-PCR und „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“ .....	112
IV.3	Stabilität der Isolierten Fragmente im <i>C. difficile</i> -Genom .....	113
IV.3.1	Stabilität der Fragmente C_diff_27_11 und C_diff_RK305_1 .....	114
IV.3.2	Stabilität des Fragments C_diff_001.....	115
IV.4	Detektion von <i>Clostridium difficile</i> mittels “Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001” .....	116
IV.5	Ausblick.....	120
V	Zusammenfassung .....	122
V.1	Zusammenfassung .....	122
V.2	Summary.....	124
VI	Literatur .....	126

---

---

VII	Anhang.....	134
VII.1	Mittels MASH isolierte DNS-Fragmente.....	134
VII.2	Oligonukleotide.....	136
	Danksagungen .....	141
	Lebenslauf.....	143

---

## ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Pathogenitätslokus (PaLoc) des <i>Clostridium difficile</i> Genoms (modifiziert nach Braun <i>et al.</i> , 1996) <sup>[21]</sup> .....	18
Abbildung 2: CDT kodierende Region auf dem <i>C. difficile</i> Chromosom (CdtLoc) (modifiziert nach Carter <i>et al.</i> , 2007) <sup>[28]</sup> .....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung nach Zwirgmaier <i>et al.</i> (2001, modifiziert) <sup>[137]</sup> .....	34
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte zur Verwendung bei der Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung (MASH) .....	48
Abbildung 5: Genspeed® MRSA Testsystem .....	53
Abbildung 6: Beispiel eines „Live view“ für Hybridisierungen mit dem Genspeed® Testsystem .	55
Abbildung 7: Geldokumentation einer PCR mit dem Primerpaar CDiff_27_11_F1/R1 (58 °C Annealingtemperatur) .....	59
Abbildung 8: Genanordnung des Fragments C_diff_27_11 .....	65
Abbildung 9: Geldokumentation einer diagnostischen PCR mit dem Primerpaar CDiff_RK305_F2/R1 (55 °C Annealingtemperatur) .....	68
Abbildung 10: Schematische Darstellung des als <i>putative conjugal transfer protein</i> annotierten Gens (1782 bp) und darauf bezogene Position des Fragments C_diff_RK305_1 (656 bp) .....	73
Abbildung 11: Anordnung der Gene mit für <i>C. difficile</i> Ribotyp 001 potentiell spezifischer Sequenz.....	75
Abbildung 12: Geldokumentation einer diagnostischen PCR mit dem Primerpaar CDiff_001_F2/R2 (55 °C Annealingtemperatur) .....	76
Abbildung 13: Geldokumentation der „Ribotyp“-PCR mit dem Primerpaar 632v/118R (41 °C Annealingtemperatur) .....	79
Abbildung 14: Primerbindestellen bezüglich des Fragments C_diff_27_11 .....	80
Abbildung 15: Geldokumentationen der PCRs mit unterschiedlichen Primerkombinationen der auf Basis des Fragments C_diff_27_11 entwickelten Primer.....	81
Abbildung 16: Beispiele von Geldokumentationen der „nested“ PCRs mit CDiff_frag27_F/R-PCR-Produkten als Matrize.....	82
Abbildung 17: Geldokumentation der Multiplex-PCR zur Evaluierung der PCR-Bedingungen.....	84
Abbildung 18: Schematische Darstellung des für die Hybridisierungen mit dem „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“ System verwendeten Durchfluss-Chips .....	89
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Q4POC-Hybridisierungsergebnisse mit Singleplex-PCR-Produkten .....	93
Abbildung 20: Beispiele graphischer Darstellungen der Q4POC-Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten .....	109
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Nachweis des Ribotyps 001 mittels des „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“ .....	119



## TABELLEN

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete <i>Clostridium difficile</i> Stämme .....	37
Tabelle 2: In dieser Arbeit zusätzlich zu <i>Clostridium difficile</i> eingesetzte Mikroorganismen .....	40
Tabelle 3: Standard PCR-Programm .....	41
Tabelle 4: PCR-Programm zur Durchführung der „Ribotyp-PCR“ nach Bidet <i>et al.</i> (1999) <sup>[16]</sup> .....	42
Tabelle 5: PCR-Programm für die Amplifikation von DNS-Fragmenten mit der Tth-DNA Polymerase .....	43
Tabelle 6: Für Klonierung benötigte Lösungen und Medien .....	45
Tabelle 7: Für Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung benötigte Puffer .....	48
Tabelle 8: Hybridisierungsbedingungen der MASH-Experimente mit DNS des <i>C. difficile</i> Stammes 27 als Tester .....	58
Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit Primerpaar CDiff_27_11_F1/R1 bei einer <i>Annealing</i> temperatur von 58 °C .....	60
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff_27_11_F1/R1 bei unterschiedlichen <i>Annealing</i> temperaturen .....	62
Tabelle 11: Hybridisierungsbedingungen der MASH-Experimente mit DNS des <i>C. difficile</i> Stammes RK 305 als Tester .....	67
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit Primerpaar CDiff_RK305_F2/R1 bei einer <i>Annealing</i> temperatur von 55 °C .....	69
Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff_RK305_F2/R1 bei unterschiedlichen <i>Annealing</i> temperaturen .....	70
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit Primerpaar CDiff_001_F2/R2 bei einer <i>Annealing</i> temperatur von 55 °C .....	77
Tabelle 15: Für Multiplex-PCR eingesetzte Primerpaare und ihre Abkürzungen .....	83
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen Multiplex- PCRs mit den Primerpaaren 1a bzw. 1b, 2, 3 und 4* (vgl. Tab. 15, S. 83) (55 °C <i>Annealing</i> temperatur) .....	85
Tabelle 17: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Singleplex-PCR-Produkten zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen .....	91
Tabelle 18: Zusammensetzung der für die Multiplex-PCR zur Amplifikation der Zielregionen getesteten Primermixe .....	94
Tabelle 19: Erwartete Q4POC-Hybridisierungs-Ergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten .....	95
Tabelle 20: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Multiplex-PCR-Produkten zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen .....	96
Tabelle 21: Auf Grund von Vorversuchen erwartete Ergebnisse der Hybridisierungen mit Primermix Multi <sup>4</sup> -PCR-Produkten .....	99
Tabelle 22: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Hilfe von Primermix Multi <sup>4</sup> generierter Multiplex-PCR-Produkte zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen .....	100

Tabelle 23: Ergebnisse der Hybridisierungen mit dem Prototyp "Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001" .....	103
Tabelle 24: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer .....	137
Tabelle 25: In dieser Arbeit entwickelte PCR-Primer .....	138
Tabelle 26: In dieser Arbeit entwickelte Fangsonden für das Genspeed® Testsystem .....	139

## ABKÜRZUNGEN

% GC	mol % Guanin + Cytosin
A	Adenin
A	Österreich
Abb.	Abbildung
abs	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AFLP	amplified fragment length polymorphism, Längenpolymorphismus amplifizierter Fragmente
ATCC	American Type Culture Collection
AP-PCR	<i>arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion mit willkürlichem Startpunkt
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CA	Kalifornien
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CA-CDAD	außerhalb des Krankenhauses erworbene ( <i>community acquired</i> ) <i>Clostridium difficile</i> assoziierte Diarrhö
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> assoziierte Diarrhö
<i>cDNA</i>	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS, die durch reverse Transkription aus RNS amplifiziert wurde)
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
CDT	<i>Clostridium difficile</i> Transferase (binäres Toxin)
cm	Zentimeter
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
<i>et al.</i>	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
EtOH <sub>abs</sub>	Ethanol, absolut (99 %)

G	Guanin
g	Gramm
GDH	Glutamatdehydrogenase
GTP	Guanidintriphosphat
GuSCN	Guanidinthiocyanat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	Reinstwasser (Millipore System)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	entionisiertes Wasser
HSP(s)	Hitze-Schock-Protein(e)
IA	Iowa
IL	Illinois
IRD	Infrarotfarbstoff
J	Japan
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria Bertani
LCT	<i>large clostridial toxin</i> (großes clostridiales Toxin)
M	molar
MA	Maine
MASH	Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSo <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min.	Minute(n)
mL	Milliliter
MLST	Multilokus Sequenz-Typisierung
MLVA	<i>multilocus variable-number tandem-repeats</i> , Analyse von sich wiederholenden DNS-Sequenzabschnitten an mehreren Genloki
mM	millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MVP	Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig Maximilians-Universität München
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
μL	Mikroliter

n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
N	A, C, G oder T (IUB Nomenklatur Komitee <sup>[33]</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAP	Nordamerikanischer Pulsotyp
NE	Nevada
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub>	Ammonium
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>xy</sub>	optische Dichte bei xy nm
p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
pA	Picoampère
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pos.	Position
pmol	Picomol
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i> , zufällig vervielfältigte polymorphe DNS
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure (rRNS-Gen)
REA	Restriktionsendonuklease Analyse
rep-PCR	<i>repetitive element sequence-based Polymerase Chain Reaction</i> , PCR basierend auf repetitiven chromosomalen Elementen
RFLP	Restriktions-Fragment Längen Polymorphismus
RKI	Robert Koch Institut
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROK	Südkorea
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Ribotyp
s	Sekunde(n)
S.	Seite
SDS	Natruimdodekylsulfat
SLP(s)	<i>surface layer protein(s)</i> , Protein(e) der Oberflächenschicht
<i>slp</i> AST	Sequenz-Typisierung des Oberflächenprotein A Gens <i>slpA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Polymorphismus einzelner Nukleotide
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
SSC	Standard-Saline-Citrat
SSU	kleine Untereinheit, <i>small subunit</i>

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/HCl Acetat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tcd	Clostridium difficile Toxin
<i>tcdA</i>	Toxin A Gen
<i>tcdB</i>	Toxin B Gen
TRIS/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tth	Thermus thermophilus
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	Uracil
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
VA	Virginia
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WI	Wisconsin
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# I EINLEITUNG

---

## I.1 *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* wurde erstmals im Jahr 1935 von Hall und O`Toole<sup>[52]</sup> als „*Bacillus difficilis*“ beschrieben. Das Bakterium wurde aus dem Darmtrakt gesunder Neugeborener isoliert und aus diesem Grund zunächst als Kommensale eingestuft. Bei *C. difficile* handelt es sich um ein grampositives, anaerobes, sporenformendes Stäbchen und es ist ein typisches Beispiel für ein opportunistisch pathogenes Bakterium.<sup>[83]</sup> Zellen können aus verschiedenen Habitaten isoliert werden, wie zum Beispiel aus Meersediment, Boden, Sand, aus den Faeces verschiedener Säugetiere, aus dem menschlichen Urogenitaltrakt und vor allem aus dem Krankenhausumfeld.<sup>[99]</sup>

Der Darm von ca. 3-7 % der gesunden Bevölkerung, bis zu 50 % der gesunden Neugeborenen und 16-35 % der hospitalisierten Patienten sind von *C. difficile* Stämmen besiedelt.<sup>[83; 111]</sup> Dabei müssen toxigene, d.h. pathogene Stämme, von nicht-toxigenen, also apathogenen Stämmen unterschieden werden.<sup>[34]</sup> Bei Vorhandensein einer normalen, ausgeglichenen Darmflora sind auch die Träger toxigener *C. difficile* meist asymptomatisch. Bei Neugeborenen wird vermutet, dass die entsprechenden Toxin-Rezeptoren im Darm noch nicht vollständig ausgeprägt sind oder ganz fehlen und es somit nicht zur Entwicklung von Symptomen kommt.<sup>[6]</sup> *C. difficile* wird auf fäkal-oralem Weg, z.B. durch Sporen, die lange auf Oberflächen überdauern können, übertragen.<sup>[119]</sup>

Wird die normale intestinale Flora von Erwachsenen z.B. durch Antibiotika- oder Chemotherapie gestört, kann es zu einem übermäßigen Wachstum von neu erworbenen oder von bereits im Darm angesiedelten, gegen das Therapeutikum resistenten *C. difficile* Zellen kommen. Es entwickelt sich meist zunächst eine milde *C. difficile*-assoziierte Diarrhö (CDAD), die bei Absetzen des ursprünglich verabreichten Antibiotikums oft selbstlimitierend ist.<sup>[65]</sup> Es ist allerdings möglich, dass sich die Infektion zu einer schwerwiegenden Diarrhö mit Komplikationen wie pseudomembranöser Kolitis, toxischem Megakolon, Darmperforation oder im schlimmsten Fall Sepsis und Multiorganversagen mit Todesfolge ausweitet.<sup>[6]</sup> Mittlerweile ist *C. difficile* mit 15-25 % der Fälle die häufigste Ursache von nosokomial erworbener bzw. Antibiotika-assoziiertes Diarrhö und verantwortlich für mehr als 95 % der Fälle von pseudomembranöser Kolitis.<sup>[105]</sup>

Außerhalb des Krankenhauses erworbene *C. difficile*-assoziierte Diarrhö (*community-acquired* CDAD; CA-CDAD) ist vergleichsweise selten, tritt allerdings auch immer häufiger auf. CA-CDAD zeichnet sich dadurch aus, dass die Patienten meist jünger sind als solche die die Krankheit nosokomial erworben haben und der Krankheitsverlauf meist weniger schwer ist. Interessanterweise wurde der Großteil der CA-CDAD Patienten vor Auftreten der Infektion nicht mit Antibiotika behandelt<sup>[94]</sup> und es sind meist Personengruppen betroffen,

die mit einem eher geringen Risiko an *C. difficile* Infektion (CDI) zu erkranken assoziiert sind, dazu gehören Kinder und junge Erwachsene<sup>[59]</sup>.

Auch die Infektion anderer Säugetierarten rückt immer mehr in den Fokus. Die Erkrankung verläuft oft ähnlich wie beim Menschen, kann sich jedoch in andere Teile des Darmtrakts ausbreiten und ist nicht, wie meist beim Menschen, auf den Dickdarm beschränkt.<sup>[64]</sup>

Der klinische Verlauf der Krankheit hängt neben dem verursachenden Stamm stark von Patienten-Faktoren ab. Unterschiede in der Immunantwort des Wirtes könnten erklären, warum *C. difficile* Stämme eines bestimmten Genotyps bei unterschiedlichen Patienten verschieden schwere Verläufe der CDI verursachen. Die adaptive Immunantwort auf die Toxine A und B ist zum Beispiel bekannt dafür, den Krankheitsverlauf zu beeinflussen; so kann bei asymptomatischen Trägern oder bei Patienten, die nur eine einzige Episode der Krankheit ohne Rückfall hatten, ein höherer Serum-Titer von Immunglobulin G und Immunglobulin M gegen Toxin A nachgewiesen werden als bei Patienten mit symptomatischer und rezidiver Krankheit.<sup>[10]</sup>

### **I.1.1 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren**

Die beiden Haupt-Pathogenitätsfaktoren von *C. difficile* sind die Toxine A und B. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass beide Toxine produziert werden müssen, um in vollem Ausmaß CDI zu verursachen. Die meisten toxigenen *C. difficile* Stämme produzieren beide Toxine, dennoch sind auch Stämme, die kein Toxin A produzieren (A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>), in der Lage Diarrhö zu verursachen und können sogar pseudomembranöse Kolitis auslösen.<sup>[73]</sup> Stämme, die nur Toxin A produzieren (A<sup>+</sup>B<sup>-</sup>), wurden bisher nicht aus Patienten mit CDI isoliert.<sup>[7]</sup> Unklar ist, warum einige Patienten, die mit einem toxigenen Stamm infiziert sind, nur milde vielleicht selbstlimitierende Diarrhö, andere hingegen fulminante pseudomembranöse Kolitis entwickeln, unabhängig vom Toxin-Status. Die unterschiedliche Menge an produziertem Toxin kann sicherlich nicht der einzige Grund für das breite Spektrum der Krankheit sein.<sup>[73]</sup>

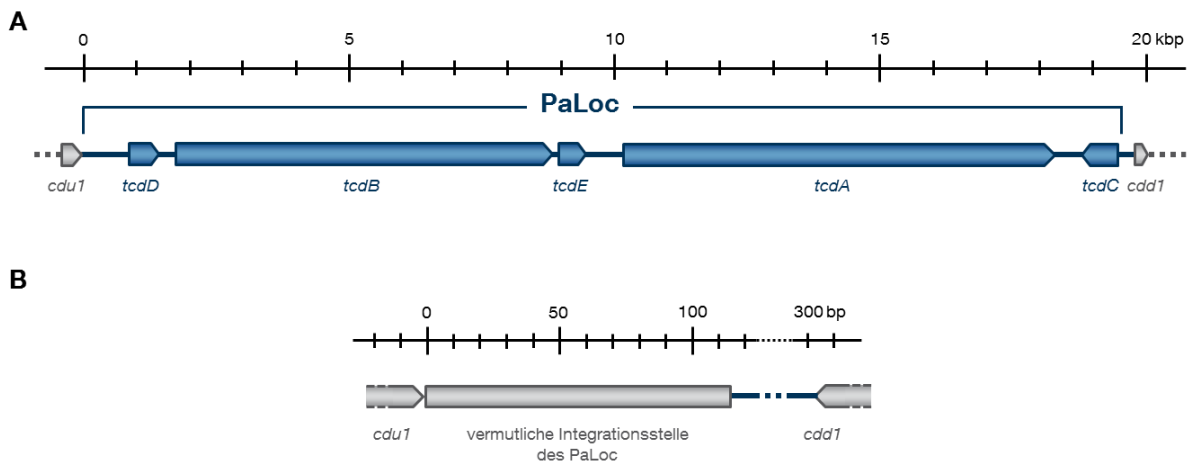
Die Kolonisierung des Darms durch *C. difficile* ist vermutlich ein Prozess, der sich aus zwei Schritten zusammensetzt. Zunächst interagieren die Bakterien wahrscheinlich mit den Mikrovilli der intestinalen Epithelzellen und beginnen die Toxine A und B zu sekretieren, welche das Aktin-Zytoskelett zerstören. Dadurch kann eine große Menge von Bakterien über ihre Oberflächenproteine mit den Wirts-Zellrezeptoren interagieren.<sup>[25; 91]</sup> Die genauen Schritte der Pathogenese sind jedoch noch nicht vollständig erforscht. Die Proteintoxine spielen zweifellos eine Schlüsselrolle beim Voranschreiten von CDI; es ist dennoch sehr wahrscheinlich, dass *C. difficile*, wie andere grampositive Krankheitserreger, eine Reihe von aufeinander abgestimmten Virulenzfaktoren verwendet, zu denen Toxine, Enzyme, Adhäsine sowie Flagellen und Fimbrien gehören, die alle zu unterschiedlichen Zeiten während des Infektionsprozesses zur Etablierung der Krankheit beitragen und eine Immunantwort des Wirtes auslösen.<sup>[7; 68; 91]</sup>



## Toxine

Die Toxine A und B gehören zur Gruppe der großen clostridialen Toxine (*large clostridial toxins*, LCT), bei welchen es sich um Glycosyltransferasen handelt.<sup>[122]</sup> Die Toxine A und B ähneln sich in Struktur und Aktivität und modifizieren GTP-bindende Proteine der Rho- und Ras-Familie.<sup>[92]</sup> Als Folge wird das Aktin-Zytoskelett zerstört, die Zellen runden ab und Zell-Zell-Kanäle (*tight junctions*) des Epithels werden geöffnet; dadurch wird Diarrhö verursacht.<sup>[104]</sup> Toxin A ist ein Enterotoxin, das nur geringe zytopathische Effekte verursacht, jedoch zu Schäden an der Darmschleimhaut führt, wodurch es zu Flüssigkeitsansammlungen kommt; Toxin B hingegen ist ein potentes Zytotoxin.<sup>[18]</sup> Beide werden auf dem Pathogenitätsloкус PaLoc kodiert, ein ca. 19,6 kbp umfassender chromosomaler Abschnitt, der aus insgesamt fünf Genen besteht. Neben den für Toxin A und B kodierenden Genen, *tcdA* und *tcdB*, befinden sich auf dem PaLoc die Gene *tcdD*, *tcdE*, und *tcdC* (vgl. Abb. 1 A, S. 18), die für die entsprechenden Proteine TcdD, TcdE und TcdC kodieren.<sup>[21]</sup> *tcdD* (z.T. auch als *tcdR* oder *txeR* bezeichnet) kodiert für einen RNS-Polymerase Sigma-Faktor, der die Erkennung der Promotoren der Gene *tcdA* und *tcdB* durch die RNS-Polymerase erlaubt und so deren Transkription einleitet.<sup>[79]</sup> *tcdE* kodiert für ein Holin-artiges Protein, das durch Porenbildung in der Zellwand die Abgabe der Toxine in die extrazelluläre Umgebung ermöglicht.<sup>[50; 125]</sup> Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Prophagen, der aus dem lysogenen Zyklus eines Myovirus hervorgegangen ist und in das *C. difficile* Genom integriert wurde.<sup>[48]</sup> TcdC ist ein Membran-assoziiertes Protein, welches vermutlich die Expression von TcdD inhibiert, indem es das TcdD-RNS-Polymerase-Holoenzym destabilisiert.<sup>[82]</sup> In toxigenen Stämmen ist der PaLoc sehr stabil und konserviert, nicht-toxigenen Stämmen fehlt der gesamte Bereich des Chromosoms, in der Insertionsstelle des PaLoc befindet sich dann ein Fragment von 115 bp Länge (vgl. Abb. 1 B, S. 18).<sup>[21; 32]</sup>

Neben TcdR und TcdC ist ein weiteres Protein – CodY – welches außerhalb des PaLoc kodiert ist, an der Regulation der Toxin-Produktion beteiligt. Es wird vermutet, dass CodY über die Interaktion mit TcdR die Expression von *tcdA* und *tcdB* reprimiert.<sup>[42]</sup>



**Abbildung 1: Pathogenitätslokus (PaLoc) des *Clostridium difficile* Genoms (modifiziert nach Braun et al., 1996)<sup>[21]</sup>**

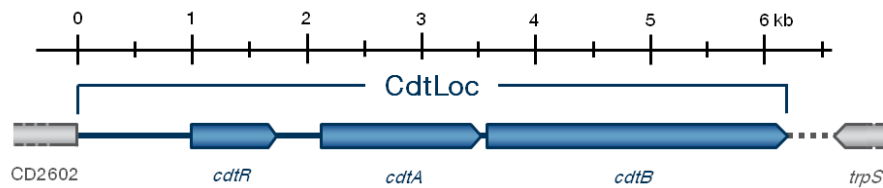
Die Pfeile stellen die offenen Leserahmen mit der entsprechenden Richtung der Gen-Transkription dar. Gestrichelte Linien bedeuten einen unterbrochen dargestellten Abschnitt.

(A) Es sind die fünf zum PaLoc gehörenden Gene *tcdD*, *tcdB*, *tcdE*, *tcdA* und *tcdC* dargestellt (blau), sowie die flankierenden Gene *cdu1* und *cdd1* der Insertionsstelle (grau). *tcdB* und *tcdA* kodieren für die Toxine A und B, *tcdD* für einen ein RNS-Polymerase Sigma-Faktor, der die Toxinproduktion positiv reguliert. *tcdE* kodiert für ein Holin-artiges Protein, das an der Toxin-Sekretion beteiligt ist. *tcdC* ist das Gen für einen potentiellen negativ-Regulator der Toxinproduktion. Cdu1 zeigt Ähnlichkeit zu verschiedenen Antibiotika-Hydrolase-Repressoren, wie zum Beispiel einem  $\beta$ -Lactamase-Repressor (PenI) aus *Bacillus subtilis* oder einem Methicillinase-Repressor (Mecl) aus *Staphylococcus aureus*. Die Funktion von Cdd1 ist bisher unbekannt.<sup>[21]</sup>

(B) Auf dem Chromosom nicht-toxischer Stämme befindet sich an Stelle des PaLoc ein Fragment von 115 bp Länge (vermutliche Integrationsstelle des PaLoc).<sup>[21; 32]</sup>

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist die *Clostridium difficile* Transferase CDT, welche nur von einigen, oft *tcdA* und/oder *tcdB* varianten *C. difficile* Stämmen produziert wird.<sup>[122]</sup> Kodiert wird dieses binäre Toxin von zwei Genen, die sich außerhalb des PaLoc auf dem Chromosom befinden.<sup>[97; 122]</sup> *cdtA* kodiert für die enzymatische Komponente CDTA, *cdtB* für die Bindekomponente CDTb. Beide haben ausgeprägte Ähnlichkeit zu den entsprechenden Komponenten Ia und Ib des  $\epsilon$ -Toxins von *Clostridium perfringens*.<sup>[92]</sup> CDT ist eine Aktin-spezifische ADP-Ribosyltransferase, welche die Organisation des Zytoskeletts des Wirtes stört sowie die Bildung von Mikrotubuli induziert, welche die *C. difficile* Zellen umhüllen. So wird die Anhaftung von *C. difficile* an die Zelloberfläche verstärkt.<sup>[113]</sup> CDT wird von dem Antwortregulator CdtR, der auf dem gleichen Genlokus, dem sogenannten CdtLoc (vgl. Abb. 2, S. 19) kodiert ist, positiv reguliert. CDT-negative Stämme besitzen in der Insertionsstelle des CdtLoc eine konservierte 68 bp lange Sequenz oder verkürzte *cdtA*- und *cdtB*-Genabschnitte („*cdtAB*-Pseudogene“), die jedoch nicht für funktionsfähige Proteine kodieren bzw. nicht exprimiert werden.<sup>[28]</sup>

Allein die Anwesenheit von Toxin A, Toxin B und/oder CDT kann allerdings nicht die Pathogenität von *C. difficile* erklären, zumal pathogene Stämme isoliert wurden, die unterbrochene Versionen von *tcdA* und *tcdB* im Genom tragen, bzw. in deren Genom das CDT-Gen ganz fehlt.<sup>[36]</sup>



**Abbildung 2: CDT kodierende Region auf dem *C. difficile* Chromosom (CdtLoc) (modifiziert nach Carter *et al.*, 2007)<sup>[28]</sup>**

Die Pfeile stellen die offenen Leserahmen mit der entsprechenden Richtung der Gen-Transkription dar. Gestrichelte Linien bedeuten einen unterbrochen dargestellten Abschnitt.

Es ist die Region des Chromosoms dargestellt, auf dem das binäre Toxin CDT kodiert ist sowie die flankierenden Gene. Bei Stämmen, die kein binäres Toxin produzieren, befindet sich an Stelle des CdtLoc ein Fragment von 68 bp Länge oder verkürzte *cdtA*- und *cdtB*-Genabschnitte (Pseudogene), die jedoch nicht für funktionsfähige Proteine kodieren (nicht dargestellt).

### Kolonisierungsfaktoren

Die Adhärenz und Kolonisierung von Wirtszellgewebe durch Bakterien ist ein wichtiger Schritt bei der Etablierung einer Infektion. Möglicherweise wäre *C. difficile* ohne das Anheften an die Darmepithelzellen des Wirtes nicht in der Lage, den Wirt zu kolonisieren und würde schnell von unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes entfernt werden.<sup>[56]</sup> Wie bei vielen pathogenen Bakterien sind bei der Adhäsion von *C. difficile* an Wirtszellen vermutlich verschiedene Faktoren beteiligt.<sup>[25]</sup> Virulenzfaktoren, die eine Rolle bei der Adhärenz und der intestinalen Kolonisierung von *C. difficile* spielen könnten, sind proteolytische Enzyme, wie die Cystein-Protease Cwp84, sowie Adhäsine, die bei der Assoziation an Schleimhaut und Zellen beteiligt sind. Zu letzteren gehören das Zellwandprotein Cwp66, das GroEL Hitzeschock-Protein, ein Fibronectin-bindendes Protein, die Flagellen-Komponenten FliC (Flagellin) und FliD (flagellares Kappen-Protein) sowie die Proteine der Oberflächenschicht (*surface layer*, *S-layer*) P36 und P47.<sup>[40]</sup>

Die gesamte Zelloberfläche von *C. difficile* ist von der *S-layer* bedeckt, deren strukturellen Elemente sich aus zwei Proteinen zusammensetzen, einem hochmolekularen Protein – P47 – und einem niedermolekularen Protein – P36. Beide gehen durch posttranslationale proteolytische Spaltung durch das Oberflächen-assoziierte Protein Cwp84 aus dem Oberflächenprotein A – SlpA (*surface layer protein A*) – hervor<sup>[68]</sup> und formen anschließend ein Netz auf der Zelloberfläche. Dabei geht die Oberflächenprotein (SLP)-vermittelte Bindung von *C. difficile* an Epithelzellen hauptsächlich von P36 aus.<sup>[25; 40]</sup> Cwp84 besitzt außerdem Cystein-Protease-Aktivität gegen verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine. Durch die daraus resultierende Beeinträchtigung der Wirts-Zellstruktur wird vermutet, dass es auch direkt als ein Kolonisierungs-Faktor wirkt. Es nimmt jedoch keine direkte entscheidende Funktion bei der Pathogenese von *C. difficile* ein, da *cwp84*-Deletionsmutanten, die das SlpA-Vorläufer Polypeptid exprimieren, die Krankheit im nahezu selben Ausmaß verursachen wie der Wildtyp.<sup>[68]</sup>

Es wird vermutet, dass die SLP-vermittelte Bindung eine Rolle zu verschiedenen Zeiten der Pathogenese spielt. Zum einen vermittelt es vermutlich die Bindung von *C. difficile* an

die Mikrovilli des Epithels und ermöglicht damit die gezielte Abgabe der Toxine an Enterozyten. Zum anderen trägt, nach der Zerstörung des Epithels durch die Toxine, die Bindung von SLPs an die extrazelluläre Matrix wahrscheinlich maßgeblich dazu bei, dass das Gewebe weiter zerstört wird.<sup>[25]</sup>

Cwp66 hat Ähnlichkeit zu den SLPs und ist ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert.<sup>[25]</sup> Vermutlich handelt es sich dabei um ein Hitze-Schock-Protein, welches offensichtlich zwei Domänen besitzt. Die N-terminale Domäne zeigt ausgeprägte Ähnlichkeit zu der Peptidoglycan-Erkennungsdomäne von CwlB Autolysin aus *Bacillus subtilis*. CwlB ist nach der Sekretion an der Anhaftung des Proteins an der bakteriellen Zellwand beteiligt. Es könnte sein, dass die N-terminale Domäne von Cwp66 dieselbe Funktion einnimmt. Viele bakterielle Proteine, die nach Sekretion an der Zellwand binden, sind bei der Adhäsion an Wirtszellen und bei der Invasion beteiligt. Die Eigenschaften von Cwp66 sprechen dafür, dass es ebenfalls als Adhäsion funktioniert.<sup>[131]</sup>

Bei vielen bakteriellen Pathogenen werden Hitze-Schock-Proteine (HSPs) als die Haupt-Antigene angesehen. Viele Mikroorganismen exprimieren immunogenes GroEL, ein Chaperonin der Hsp60-Familie, welches eine Immunantwort des Wirtes verursacht. Einige Tatsachen sprechen dafür, dass dieses Protein von *C. difficile* ebenfalls ein Adhäsion ist: (i) bei Stress für die Bakterienzelle wird die Zell-Anhaftung von *C. difficile* verstärkt, (ii) GroEL ist auf der bakteriellen Zelloberfläche lokalisiert, (iii) die Adhärenz wird durch die Verwendung von GroEL-spezifischen Antikörpern *in vitro* teilweise inhibiert und (iv) die Expression des Proteins wird durch den Kontakt mit Zielzellen induziert.<sup>[56]</sup>

*C. difficile* ist in der Lage, extrazelluläre Matrixproteine, wie z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Collagen zu binden.<sup>[29]</sup> Es wurde gezeigt, dass SLPs an die extrazellulären Matrixproteine Collagen, Thrombospondin und Vitronectin, dagegen nicht an Fibronectin binden können<sup>[25]</sup>. In *C. difficile* wurde das Fibronectin-bindende Protein (Fbp) Fbp68 identifiziert, welches oberflächenassoziiert und in der Lage ist sowohl Fibronectin, als auch Fibrinogen und Vitronectin zu binden. Wie im Falle von GroEL, führt die Exposition gegenüber Fbp68-spezifischen Antikörpern zu einer verringerten Adhärenz an Zielzellen *in vitro*. *fbp68*-Deletionsmutanten zeigten zwar überraschenderweise *in vitro* eine leicht erhöhte Adhärenz, die Kolonisierung im Mausmodell fand jedoch in einem geringeren Ausmaß statt als durch den Wildtyp. Diese Tatsachen bekräftigen die Annahme, dass die Kolonisierung durch *C. difficile* von mehreren verschiedenen Adhäsionen vermittelt ist. Alles in allem kann davon ausgegangen werden, dass auch Fbp68 ein Adhäsion darstellt.<sup>[11; 55]</sup>

Flagellen sind für viele enteropathogene Bakterien wichtige Kolonisierungsfaktoren, da sie z.B. die Beweglichkeit in einer mukusreichen Umgebung wie dem Darmtrakt erleichtern. Auch *C. difficile* Zellen bilden peritriche Flagellen.<sup>[129]</sup> Abgesehen davon wurde gezeigt, dass Stämme von *C. difficile*, die Flagellen besitzen, *in vivo* besser an Zellen des Maus-Blinddarms binden können, als Stämme, die keine flagellaren Gene exprimieren. Zunächst wurde vermutet, dass die verbesserte Adhärenz durch das Protein FliD (flagellares Kappen-

Protein) vermittelt wird.<sup>[126]</sup> Im Hamstermodell unter Verwendung von *fliC* bzw. *fliD* Deletionsmutanten konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Flagellen spielen also anscheinend, zusätzlich zur verbesserten Beweglichkeit der Zellen, eine Rolle bei der Kolonisierung des Wirtes. Unklar ist allerdings, durch welche Komponenten des Flagellums dies vermittelt wird.<sup>[43]</sup>

Viele Bakterien bilden eine Kapsel, die einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt. Es wurde nachgewiesen, dass auch *C. difficile* Stämme in der Lage sind, eine kohlenhydrathaltige Kapsel zu bilden. Im Fall von *C. difficile* konnte allerdings keine Verbindung zwischen dem Vorhandensein einer Kapsel und dem Virulenz-Status der jeweiligen Stämme festgestellt werden. Es wird aber vermutet, dass die Kapsel Resistenz gegenüber Phagozytose durch polymorphonukleare Leukozyten verursacht.<sup>[35]</sup>

### **Indirekte Virulenzfaktoren**

Selbst wenn nicht direkt an der Pathogenese bzw. Kolonisierung beteiligt, sollten auch die Resistenz von *C. difficile* gegen bestimmte Antibiotika und die Fähigkeit Sporen zu bilden als Virulenzfaktoren angesehen werden, da sie dem Organismus wichtige Selektionsvorteile verschaffen.

Die Fähigkeit Sporen zu bilden, gibt *C. difficile* die Möglichkeit, sehr lange auf Oberflächen zu bestehen, da der sauerstoffempfindliche Organismus dadurch außerhalb des Wirtes in einer oxygenen Umgebung überdauern kann. Die Sporen sind außerdem resistent gegenüber vielen Desinfektionsmitteln und können sehr leicht zwischen Patienten übertragen werden.<sup>[38]</sup> Interessant ist, dass unterschiedliche *C. difficile* Stämme eine unterschiedlich hohe Anzahl an Sporen produzieren.<sup>[36]</sup>

Die Behandlung mit Antibiotika ist der wichtigste Risikofaktor für die Infektion mit *C. difficile*, zumal das Bakterium gegen viele Antibiotika resistent ist. Vor allem die Behandlung mit Breitbandantibiotika, wie Clindamycin, Aminopenicillinen und Cephalosporinen, favorisiert die Ausbreitung von *C. difficile* im Darm des Wirtes nicht zuletzt durch die Störung der normalen gesunden Darmflora.<sup>[36; 104]</sup> Die Resistenz gegenüber Antibiotika ist anscheinend hauptsächlich auf mobilen genetischen Elementen, z.B. auf Transposons, kodiert; dadurch könnten diese Gene leicht zwischen Stämmen übertragen werden. Die Resistenz gegen Fluorochinolone ist vermutlich erst kürzlich entstanden, da sie nur von einigen Stämmen, darunter Ribotyp 027, 106 und 001 sowie einigen Vertretern des Ribotyps 078 exprimiert wird, breitet sich jedoch anscheinend auf weitere Ribotypen aus.<sup>[36]</sup>

Einige Gene, die für potentielle Kolonisierungsfaktoren kodieren, werden durch bestimmte Stresssituationen, wie z.B. Ampicillin- oder Clindamycin-Exposition oder Hyperosmolarität, sogar verstärkt exprimiert. Vermutlich werden die entsprechenden regulatorischen Gene durch die Stresssituation beeinflusst.<sup>[39]</sup>

Vor allem im Krankenhausumfeld, bei Patienten, die mit Antibiotika behandelt wurden ist daher eine Infektion durch *C. difficile* oder deren Sporen ein ernst zu nehmendes Problem.<sup>[38]</sup> Nach derzeitigem Wissensstand sind anscheinend nur Toxin-bildende Stämme von *C. difficile* pathogen. Alle anderen Virulenzfaktoren bleiben rein hypothetisch.<sup>[10]</sup>

### **I.1.2 Typisierung**

Systeme zur epidemiologischen Typisierung pathogener Bakterien werden allgemein verwendet, um Ausbrüche einer Krankheit zu untersuchen, Verbreitungsmuster epidemischer Klone zu bestätigen und abzugrenzen, Hypothesen über die Quelle und den Übertragungsweg einzelner Klone zu überprüfen sowie Reservoirs epidemischer Organismen aufzuzeigen. Eine Typisierungsmethode sollte sechs wichtige Merkmale aufweisen: (i) Typisierbarkeit der Isolate, (ii) Reproduzierbarkeit, (iii) Stabilität der Markerexpression, (iv) diskriminatorisches Potential (der Marker sollte bei einem Isolat genügend Unterschiede zum Marker anderer Isolate aufweisen, um es einem bestimmten Klon zuzuordnen zu können), (v) epidemiologische Übereinstimmung (alle epidemiologisch verwandten Isolate eines beschriebenen Ausbruchs sollten demselben Typ zugeordnet werden können) sowie (vi) Praktikabilität (leichte und schnelle Durchführbarkeit, einfache Interpretation der Ergebnisse, Stabilität gegenüber geringfügigen Modifikationen und Überschaubarkeit der Kosten).<sup>[120]</sup> Die gewissenhafte Typisierung von *C. difficile* Stämmen ist in heutiger Zeit ein wichtiges Instrument, um die sich ständig wandelnde Epidemiologie dieses Organismus zu verstehen und CDI-Ausbrüche in Bezug auf die beteiligten Stämme und deren Zirkulation zu bewerten, wodurch nicht zuletzt die Evaluierung von Kontrollmaßnahmen vereinfacht wird.<sup>[120; 127]</sup>

Die frühen Typisierungsmethoden für *C. difficile* waren auf phänotypischen Merkmalen begründet. So wurden z.B. Antibiogramme verwendet oder verschiedene Methoden, die auf der Untersuchung von Oberflächenantigenen oder von löslichen Proteinen beruhen. Diese Methoden lieferten jedoch eher rudimentäre Ergebnisse und wurden primär dazu verwendet, lokale Ausbrüche hinsichtlich der Epidemiologie der Stämme und der Infektionsquelle zu untersuchen.<sup>[22]</sup> Methoden, die chromosomale DNS-Polymorphismen aufzeigen, werden derzeit als die beste Möglichkeit für die vergleichende Typisierung vieler Bakterien, besonders nosokomial auftretender pathogener Keime, angesehen, um z.B. nosokomiale Ausbrüche zu untersuchen oder um Rückfälle, die durch den selben Stamm verursacht werden, von Neuinfektionen mit einem anderen Typ zu unterscheiden.<sup>[74; 120]</sup>

Beginnend in den 1980er Jahren wurden genotypische Methoden, wie Restriktionsendonuklease-Analyse (REA) des gesamten bakteriellen Genoms<sup>[71]</sup>, PCR mit willkürlichem Startpunkt (*arbitrarily primed PCR*, AP-PCR)<sup>[85]</sup> und Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) nach DNS-Verdau mit Endonukleasen<sup>[62]</sup> für die Typisierung von *C. difficile* entwickelt. Das Aufkommen eines neuen, hoch-endemischen Stammes (PFGE

Typ NAP1, REA Typ BI) hat das Interesse an der Typisierung von *C. difficile* Stämmen noch gesteigert und die Entwicklung weiterer genotypischer Methoden vorangetrieben. So wurden vermehrt Fingerprint-basierte Methoden wie die PCR-Ribotypisierung<sup>[16; 51; 121]</sup>, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP)<sup>[20]</sup> - zu der auch die Toxintypisierung gehört<sup>[103]</sup> - *random amplified polymorphic DNA* (RAPD)<sup>[8]</sup>, *amplified fragment length polymorphism* (AFLP)<sup>[69]</sup> oder *repetitive element sequence-based PCR* (rep-PCR)<sup>[117]</sup> für die Eignung zur Typisierung von *C. difficile* Stämmen getestet. DNS-Sequenz-basierte Methoden wie Multilokus Sequenz-Typisierung (MLST)<sup>[74]</sup>, *multilocus variable-number tandem-repeats analysis* (MLVA)<sup>[81]</sup> sowie Sequenztypisierung des Oberflächenprotein A Gens (*slpAST*)<sup>[63]</sup> finden ebenso Anwendung bei der Typisierung von *C. difficile*.<sup>[67]</sup>

Derzeit werden *C. difficile* Stämme vorwiegend durch Restriktionsendonuklease-Analyse (REA), Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE), Multilokus Sequenz-Typisierung (MLST) und PCR-Ribotypisierung typisiert, doch keine Methode hat sich bisher als Gold-Standard herausgestellt.<sup>[80]</sup> Die hauptsächlich verwendete Typisierungsmethode ist von Land zu Land unterschiedlich; PFGE ist z.B. die Standardmethode in den USA und Canada, in Europa greift man häufiger auf PCR-Ribotypisierung zurück.<sup>[61]</sup>

Bereits im Jahr 1987 wurde die Restriktionsendonuklease-Analyse (REA) für die Typisierung von *C. difficile* Stämmen angewandt. Durch die Verwendung eines häufig schneidenden Restriktionsenzym sind die entstehenden Fragmente genügend klein um sie mittels Standard-Agarose-Gelelektrophorese aufzutrennen und die jeweiligen Bandenmuster zu analysieren.<sup>[71]</sup> Die Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) ist prinzipiell eine Weiterentwicklung der REA und wurde bereits für die Typisierung verschiedener Mikroorganismen verwendet. Die genomische DNS wird mit einem selten schneidenden Restriktionsenzym, z.B. *SmaI* oder *SacII*, verdaut. Die so entstandenen relativ großen DNS-Fragmente können im alternierenden elektrischen Feld der PFGE aufgetrennt und die Polymorphismen der Restriktionsmuster analysiert werden.<sup>[62]</sup>

Bei der Multilokus Sequenz Typisierung (MLST) werden Fragmente verschiedener Gene sequenziert und hinsichtlich Variationen in den einzelnen Allelen untersucht. Hierzu werden beispielsweise verschiedene *housekeeping* Gene (konservative Marker, z.B. *aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk*, und *sodA*)<sup>[74]</sup> oder Virulenz assoziierte Gene (z.B. *cwp66*, *cwp84*, *fbp68*, *fliC*, *fliD*, *groEL*, *slpA*, *tcdA*, *tcdB* und *tcdD*)<sup>[73]</sup> sequenziert, um genetische Polymorphismen aufzuzeigen. MLST wurde bereits für die populationsgenetische und global epidemiologische Untersuchung von z.B. *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oder *Campylobacter jejuni* verwendet.<sup>[74]</sup>

Die Ribotypisierung macht sich zu Nutze, dass *C. difficile* Stämme unterschiedlich viele rDNS-Allele im Genom besitzen, die sich durch verschiedene Längen der 16S-23S rRNS intergenischen *Spacer* Region auszeichnen. Durch PCR-Amplifikation und anschließende Gelelektrophorese der 16S-23S intergenischen *Spacer* ergeben sich für verschiedene

Stämme unterschiedliche Bandenmuster je nach Anzahl vorhandener rDNS-Allele und je nach Länge der jeweiligen *Spacer*.<sup>[51]</sup> PCR-Ribotypisierung ist eine vergleichsweise junge molekulare Typisierungsmethode und wird hauptsächlich für die Definition der Epidemiologie von *C. difficile* Infektionen in Europa, teilweise in Nordamerika und im fernen Osten verwendet.<sup>[127]</sup> Das Anaeroben Referenz Laboratorium (ARL) in Cardiff verfügt über eine PCR-Ribotyp-Datenbank, die derzeit mehr als 300 Ribotypen umfasst.<sup>[15]</sup>

Die Identifizierung von Ausbruch-Stämmen ist gleichermaßen durch REA, PFGE, PCR-Ribotypisierung und Sequenzierungs-basierten Methoden realisierbar. Genotypische Methoden, die auf Fragment- oder Amplifikations-Längenpolymorphismen basieren (z.B. PFGE, REA und PCR-Ribotypisierung), sind als Standard-Methoden in Referenzlaboratorien verschiedener Länder etabliert.<sup>[63]</sup> Methoden wie die REA und PFGE sind jedoch meist sehr arbeitsintensiv und die Ergebnisse oft schwer zu analysieren, wodurch eine laborübergreifende Standardisierung nur schwer zu bewerkstelligen ist.<sup>[63; 67]</sup> Im Gegensatz dazu ist bei der PCR-Ribotypisierung der Arbeitsaufwand vergleichsweise gering, sobald die Reaktionen einmal optimiert wurden; zudem können die Daten einfach zwischen einzelnen Laboren verglichen werden.<sup>[67]</sup> Das Hauptproblem aller drei Methoden ist, dass bereits geringe Veränderungen der DNS großen Einfluss auf das jeweilige Bandenmuster haben können. Beispielsweise können Änderungen in der Anzahl von Wiederholungssequenzen, interchromosomale homologe Rekombination und Veränderungen in der *Primerbindestelle* im Fall von PCR-Ribotypisierung oder Polymorphismen einzelner Basen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) innerhalb von Restriktionsschnittstellen im Fall von PFGE und REA zur Folge haben, dass der jeweilige Stamm einem anderen Typ zugeordnet wird.<sup>[118]</sup>

Auf Sequenzierung basierte Typisierungsmethoden sind sehr leicht zu standardisieren und die Ergebnisse können sehr gut zwischen einzelnen Laboratorien ausgetauscht werden. *slpAST* (*slpA*-Sequenztypisierung) wurde z.B. für die Untersuchung verschiedener lokaler Ausbrüche eingesetzt. Im direkten Vergleich mit den Standard-Typisierungsmethoden (PFGE, REA, PCR-Ribotypisierung) hat sich *slpAST* als eine alternative Methode für die Genotypisierung von *C. difficile* bewiesen.<sup>[61]</sup> Das Oberflächenprotein SlpA variiert bei den unterschiedlichen *C. difficile* Stämmen. Für die *slpAST* wird die variable Region von *slpA* PCR-amplifiziert, direkt sequenziert und die Stämme mittels vergleichender Sequenzanalyse typisiert.<sup>[63]</sup> Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) ist durch die Sequenzierung mehrerer Gen-Loci (z.B. *aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk*, und *sodA*<sup>[74]</sup> oder *cwp66*, *cwp84*, *fbp68*, *fliC*, *fliD*, *groEL*, *slpA*, *tcdA*, *tcdB* und *tcdD*<sup>[73]</sup>) etwas zeitaufwendiger als *slpAST*, bei welcher nur ein Gen sequenziert wird.

Die meisten Methoden, die derzeit angewendet werden, sind geeignet, einen Ausbruch-Stamm innerhalb einer Institution zu identifizieren. Es gibt jedoch momentan vermutlich kein Typisierungssystem, das sowohl ein hohes diskriminatorisches Potential aufweist als auch den einfachen Austausch von reproduzierbaren Ergebnissen zwischen einzelnen Laboratorien ermöglicht, mit welchem also die Unterscheidung von Subtypen und



gleichzeitig die Verfolgung von Stämmen zwischen verschiedenen Institutionen möglich wäre.<sup>[36; 67]</sup> Außerdem lässt sich durch die Verwendung einer Methode zur Typisierung, nur schwer voraussagen, welchen Typ das entsprechende Isolat unter Verwendung einer anderen Methode haben würde. Die Übertragbarkeit von Typisierungsergebnissen zwischen zwei Methoden ist meist nicht uneingeschränkt gegeben, da sie nur in einem geringen Ausmaß miteinander korrelieren. Es gehören z.B. nicht alle Ribotyp 027 Stämme zur REA-Gruppe BI, genauso wenig ist jedes NAP1-Isolat Ribotyp 027.<sup>[127]</sup> Zudem hängt es sehr davon ab, um was für ein Isolat es sich handelt, ob die Einordnung bestimmter Isolate in verschiedene Gruppen durch unterschiedliche Typisierungsmethoden übereinstimmt. Nimmt man z.B. Isolate vom Ribotyp 027 und 001, stimmen die Gruppierungen, die mittels PCR-Ribotypisierung, PFGE-Typisierung und rep-PCR Typisierung vorgenommen werden, weitestgehend überein. Dies trifft jedoch nicht auf alle Ribotypen zu.<sup>[90]</sup>

Sowohl REA als auch PFGE sind sehr arbeitsintensiv und die Ergebnisse sind nur sehr schwer zu analysieren, wenn nicht ein computergestütztes System für die Auswertung der Bandenmuster vorhanden ist. Im Vergleich dazu erfordert die PCR-Ribotypisierung einen geringen Arbeitsaufwand und die Ergebnisse verschiedener Laboratorien sind vergleichbar, sogar wenn verschiedene *Primer* für die PCR-Amplifikation der entsprechenden Fragmente verwendet werden.<sup>[67]</sup> Somit lässt sich die PCR-Ribotypisierung vermutlich am leichtesten umsetzen und bietet vor allem vor dem Hintergrund der vorhandenen PCR-Ribotyp-Datenbanken wahrscheinlich eine bessere Möglichkeit Stämme zu unterscheiden als PFGE und REA. Sowohl PCR-Ribotypisierung als auch REA und PFGE sind dennoch nützliche Anwendungen für die Typisierung von *C. difficile*, selbst wenn jede für sich die Stämme unterschiedlich gruppiert.<sup>[127]</sup> Eine groß angelegte Studie, bei der sieben verschiedene genotypische Methoden zur Typisierung von *C. difficile* miteinander verglichen wurden, zeigte, dass durch vier der überprüften Methoden (MLVA, REA, *slpAST* und PFGE) die Stämme in zusätzliche Subtypen unter den einzelnen primären Typen unterteilt werden konnten; die Einteilung der Isolate in die einzelnen Subtypen war dabei jedoch nicht immer kongruent. Die anderen drei Methoden (PCR-Ribotypisierung, MLST und AFLP), erkannten nur primäre Typen.<sup>[67]</sup> Die Verwendung von mehr als nur einer Typisierungsmethode verbessert also die Differenzierung von Stämmen und erlaubt sicher eine genauere Beschreibung der Epidemiologie von *C. difficile* Stämmen. Es verwenden jedoch nur wenige Labors mehr als nur eine Typisierungsmethode.<sup>[127]</sup>

Die Verteilung der vorherrschend identifizierten Typen von *C. difficile* unterliegt einer deutlichen zeitlichen und lokalen Schwankung. Dies unterstreicht die Notwendigkeit genotypischer Methoden, die verlässlich, leicht durchzuführen und hoch diskriminatorisch sind, um mittels internationaler epidemiologischer Studien und globalen Überwachungsmaßnahmen das Aufkommen klinisch signifikanter *C. difficile* Stämme zu untersuchen und durch entsprechende Maßnahmen einzudämmen.<sup>[80]</sup>

### I.1.3 Epidemiologie und klinische Überwachung

Der Darm von ca. 3-7 % der gesunden Bevölkerung, bis zu 50 % der gesunden Neugeborenen und 16-35 % der Krankenhauspatienten ist von *C. difficile* besiedelt.<sup>[83; 111]</sup> Dabei ist die im Darm der asymptomatischen Träger vorhandene Keimzahl wesentlich geringer als die im Darm der symptomatischen Patienten.<sup>[66]</sup> Die Hauptrisikofaktoren für eine nosokomiale Infektion durch *C. difficile* beim Menschen sind erhöhtes Alter ( $\geq 65$  Jahre), Einnahme von Antibiotika, welche die normale Darmflora beeinflussen (meist Cephalosporine, Fluorochinolone oder Lincosamine), schwere Begleiterkrankungen und längerer Aufenthalt in Gesundheitspflegeeinrichtungen (Krankenhäuser, Altenheime etc.); die Risikofaktoren für eine ambulant erworbene CDI sind weitestgehend nicht bekannt.<sup>[6; 15; 27; 111]</sup> Die Epidemiologie von *C. difficile* bei Kindern ist bisher nur wenig erforscht. Bekannt ist, dass Neugeborene häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* sind; bei Kindern, die mehr als ein Jahr alt sind, sind die Hauptrisikofaktoren für das Entwickeln einer CDI z.B. Organtransplantation, das Vorhandensein einer Magensonde oder von Komorbiditäten wie Krebs.<sup>[75]</sup>

In einigen europäischen Krankenhäusern ist *C. difficile* mittlerweile der häufigste Verursacher nosokomialer Infektionen. Dennoch ist die Erkrankung nicht auf hospitalisierte Patienten beschränkt, sondern es kommt ebenso zunehmend zu ambulant erworbener CDI. Interessanterweise unterscheiden sich die nosokomial erworbenen Stämme von den ambulant erworbenen. Außerdem ist das Durchschnittsalter der infizierten hospitalisierten Patienten in der Regel höher als das von Patienten, die die Infektion außerhalb des Krankenhauses erworben haben.<sup>[15; 19]</sup> Trotz ansteigender Zahlen von CDI auch in (Alten-) Pflegeheimen und in der Öffentlichkeit, ist *C. difficile* immer noch ein typischer Krankenhauskeim. Im Jahr 2010 waren in 89 deutschen Krankenhäusern 65 % der CDI-Fälle im Krankenhaus erworben.<sup>[87]</sup> Eine europaweite Studie aus dem Jahr 2008 kam zu einem ähnlichen Ergebnis (67 %-100 % im Krankenhaus erworben).<sup>[15]</sup>

Seit einigen Jahren steigt die Zahl der nachgewiesenen Fälle von CDI innerhalb und außerhalb Europas stetig an.<sup>[19]</sup> Das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) hat im Jahr 1996 ein nationales Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) für die wichtigsten nosokomialen Infektionen, darunter auch CDAD, ausgearbeitet. Inzwischen nehmen bundesweit über 800 Krankenhäuser an diesem System teil.<sup>[47]</sup> Mittlerweile wurde KISS in mehrere Module untergliedert, die verschiedene Risikogruppen, verschiedene Typen von Versorgungseinrichtungen oder verschiedene pathogene Organismen betreffen. Die beiden Module MRSA-KISS und CDAD-KISS überwachen das Auftreten zweier wichtiger nosokomialer Erreger.<sup>[87]</sup> Heute ist der Erwerb einer CDAD bei Krankenhausaufenthalt wesentlich wahrscheinlicher als eine Infektion mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)<sup>[47]</sup>; die absolute Zahl der im Jahr 2010 gemeldeten nosokomialen CDAD-Fälle war mehr als doppelt so hoch wie die Anzahl der gemeldeten nosokomialen MRSA-Fälle, wengleich – unter Mitberücksichtigung der

ambulanten Fälle – die Gesamtinzidenz der CDI nur halb so groß ist, wie die der MRSA-Infektionen.<sup>[87]</sup>

Der Anstieg der CDI-Fälle ist allerdings nicht einfach ein Effekt, der aus der erhöhten Anzahl an durchgeführten diagnostischen Tests resultiert. In Süddeutschland war beispielsweise der Anstieg der Patientenzahlen, bei denen *Clostridium difficile* Toxin (Tcd) im Stuhl nachgewiesen wurde, in den Jahren 2000-2007 beinahe doppelt so hoch wie der Anstieg der durchgeführten Tests zum Nachweis von Tcd im Stuhl.<sup>[19]</sup> Die Infektion ist immer häufiger durch einen schweren Verlauf und erhöhte Sterblichkeit geprägt und es treten sich endemisch ausbreitende Erkrankungen auf, die durch Stämme verursacht werden, denen erhöhte Virulenz zugesprochen wird (z.B. Ribotyp 001, 027). Zudem wird vermehrt über Infektionen berichtet, für die eine zoonotische Ursache diskutiert wird (z.B. durch Ribotyp 078) und deren verursachende Stämme bislang nur für das Hervorrufen von Durchfallerkrankungen bei Tieren bekannt waren.<sup>[15; 66; 88; 136]</sup> Da bei unterschiedlichen Stämmen verschiedene und neue Multiresistenzen gegenüber Antibiotika festgestellt werden, wird diskutiert, ob dies bedeutsam für die Selektion und Ausbreitung neuer Epidemiestämme ist. Vor allem bei epidemiologisch relevanten Stämmen (Ribotyp 001, 027 und 078) wurden Resistenzen gegen systemisch eingesetzte Antibiotika festgestellt.<sup>[88]</sup> In jedem Fall sind der restriktive Gebrauch von Antibiotika und Vorkehrungen zum Verhindern der Übertragung von *C. difficile* die Hauptmaßnahmen, die getroffen werden sollten, um CDI einzudämmen.<sup>[87]</sup>

In Kanada und den USA werden seit 2003 zunehmende CDI-Fälle mit schwerem Verlauf auf das schnelle Aufkommen und die rasante Ausbreitung des *C. difficile* Klons, der zum Restriktionsendonuklease Analyse (REA) Typ BI, zum Nordamerikanischen Pulsotyp (NAP) 1 bzw. zum PCR-Ribotyp 027 zählt (BI/NAP1/027), zurückgeführt.<sup>[9]</sup> Dieser endemische Stamm des Ribotyps 027 zeichnet sich durch erhöhte Produktion der Toxine A und B, Expression des binären Toxins CDT, erhöhte Virulenz sowie das Verursachen schwerer Infektionen mit erhöhter Sterblichkeitsrate, erhöhtem Rückfallrisiko und häufigem Auftreten von Komplikationen aus. Außerdem ist er unempfindlicher gegenüber Selektionsdruck, z.B. bestimmte Umwelteinflüsse oder Antibiotika.<sup>[9; 15; 19; 133]</sup> Dieser Klon ist resistent gegen Erythromycin und viele Fluorochinolone (z.B. Moxifloxacin, Gatifloxacin und Levofloxacin).<sup>[9]</sup> *C. difficile* Ribotyp 027 hat sich schnell weltweit ausgebreitet und wird ebenfalls für Ausbrüche in verschiedenen europäischen Ländern verantwortlich gemacht. In einer im Jahr 2005 durchgeführten europaweiten Studie lag die Gesamt-Prävalenz des epidemischen Ribotyp 027 Stammes insgesamt bei 6,2 %, in den Niederlanden und Belgien allein bei 40 % bzw. 31,4 %.<sup>[9]</sup> In Deutschland wurde der Ribotyp 027 erstmals im Jahr 2007 in Trier identifiziert.<sup>[19]</sup>

Das Vorkommen von CDI und das Auftreten bestimmter Ribotypen ist innerhalb Europas sehr unterschiedlich.<sup>[9; 15]</sup> Es gibt eine große Diversität von Stämmen, wobei die Verteilung der einzelnen Ribotypen sowohl zwischen den einzelnen Ländern als auch zwischen den

einzelnen Krankenhäusern eines Landes variiert und erheblichen Schwankungen unterliegt.<sup>[9; 19; 80]</sup> In den 90er Jahren war in Großbritannien z.B. Ribotyp 001 der am häufigsten identifizierte Ribotyp, 2005 waren die Typen 001, 106 und 027 gleichermaßen vertreten und zwischen 2007 und 2008 dominierte Typ 027. In einer europaweiten Studie waren im selben Zeitraum die am meisten verbreiteten Ribotypen die Typen 014 und 020, gefolgt von 001 und 078. In Asien hingegen ist Ribotyp 017 vorherrschend, 027 in Nordamerika.<sup>[80]</sup> Auch zwischen den einzelnen europäischen Staaten ist die Inzidenz der CDAD sehr variabel.<sup>[9]</sup> Bei derartigen zeitlichen und lokalen Schwankungen ist es umso wichtiger, dass *C. difficile* Isolate für eine entsprechende Charakterisierung kultiviert und verwahrt werden, um die Verbreitung bzw. Ausbreitung bestimmter, vor allem klinisch signifikanter *C. difficile* Stämme global mittels epidemiologischer Studien zu überwachen. Die kulturelle Anzucht von *C. difficile* aus Patientenproben wird daher ausdrücklich empfohlen, wird jedoch leider nicht in allen europäischen Ländern routinemäßig durchgeführt.<sup>[9; 70; 80]</sup>

Die Ergebnisse der Ribotypisierung in einer Studie von Borgmann *et al.* (2008)<sup>[19]</sup> zeigten, dass Ribotyp 027 in Deutschland nur sporadisch isoliert wurde und dass schwere Fälle von CDI nicht auf Infektionen durch diese Stämme beschränkt waren. Vor allem in Süddeutschland waren sowohl bei hospitalisierten als auch bei ambulanten Patienten Stämme vom Ribotyp 001 vorherrschend.<sup>[19]</sup> Das Auftreten des Ribotyps 001 führte nicht nur zu einem Anstieg der Zahlen Tcd-positiver Patienten, dieser Ribotyp wurde sogar am häufigsten bei schweren bis tödlich endenden CDI Fällen identifiziert, gefolgt von den Ribotypen 078 und 027. In einer weiteren deutschlandweiten Studie aus dem Jahr 2011 waren vor allem im ambulanten Bereich Stämme vom Ribotyp 078 dominierend; es wurden jedoch auch hier häufig Stämme vom Ribotyp 001 isoliert.<sup>[110]</sup> Andere Ribotypen werden meist nur vereinzelt identifiziert.<sup>[19; 136]</sup> Stämme vom Ribotyp 001 sind in Krankenhäusern in ganz Deutschland endemisch, Stämme vom Ribotyp 027 werden hingegen, wenn überhaupt, überwiegend in Süddeutschland isoliert.<sup>[136]</sup> Bei allen diesen drei Typen (001, 027 und 078) treten gehäuft Multiresistenzen gegen Antibiotika auf.<sup>[88]</sup> Vertreter des Ribotyps 001 sind beispielsweise resistent gegen Chinolon-Antibiotika, Erythromycin, Cefoxamin und Clindamycin.<sup>[19]</sup> Gegen die standardmäßig zur Therapie von CDI eingesetzten Antibiotika Metronidazol und Vancomycin wurden bisher glücklicherweise bei keinem *C. difficile* Stamm Resistenzen nachgewiesen.<sup>[88]</sup>

Die Resistenz gegen Fluorochinolone, die durch eine Mutation im Gyrase-Gen *gyr* verursacht wird, wird als ein selektiver Vorteil für die Ausbreitung epidemischer *C. difficile* Stämme angesehen. Die Gyrase-Mutation vermittelte Fluorochinolon-Resistenz hat sich allerdings ebenso bei weniger verbreiteten, nicht epidemischen Stämmen entwickelt und kann deshalb nicht die einzige Erklärung für die Häufigkeit der Ribotypen 001 und 027 sein. Studien in England und Quebec haben gezeigt, dass eine hohe Inzidenz des Ribotyps 001 durch die Verbreitung von Ribotyp 027 abgelöst werden könnte und so zu weiter

ansteigenden CDI-Raten und vermehrter Sterblichkeit führen kann. Umso wichtiger erscheinen gewissenhafte Kontrollmaßnahmen, um die Ausbreitung des Ribotyps 027 in Deutschland einzudämmen.<sup>[136]</sup>

Die Entwicklung neuer Methoden für die Diagnose von *C. difficile* (weg von EIA hin zu PCR, vgl. auch Kap. I.1.5, S. 30) wird wahrscheinlich die Möglichkeit, CDI zu detektieren und zu überwachen wesentlich verbessern; es muss dann allerdings mit einem weiteren Anstieg der diagnostizierten CDI-Fallzahlen gerechnet werden, da die erhöhte Sensitivität der Tests die Anzahl der falsch negativen Testergebnisse reduzieren wird. Dies wird jedoch auch die Überwachung der Inzidenz, der risikobehafteten Bevölkerungsgruppen und der molekularen Epidemiologie verschiedener pathogener Stämme voranbringen können.<sup>[75]</sup>

### **I.1.4 Virulenz**

Es steht fest, dass die beiden Haupt-Toxine von *C. difficile*, Toxin A und Toxin B, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen. Ob andere mikrobiologische Eigenschaften Einfluss auf die Virulenz haben, muss noch weiter erforscht werden. Obwohl lange angenommen wurde, dass eine erhöhte Produktion von Toxin A und/oder B, die Produktion des binären Toxins CDT oder Deletionen bzw. Mutationen im Gen des negativen Toxin-Regulators TcdC Einfluss auf die Virulenz haben, ist dies noch nicht eindeutig bestätigt. Sicherlich muss ebenso anderen, auch indirekten Virulenzfaktoren, wie Adhäsinen oder der Beschaffenheit der produzierten Sporen ein Einfluss auf die Virulenz und die Schwere der Krankheit zugesprochen werden.<sup>[10]</sup>

In einigen Ländern wurde die ansteigende Inzidenz und Schwere der CDI hauptsächlich auf das Aufkommen des hoch virulenten Stammes BI/NAP1/027 zurückgeführt. Dieser Stamm hat einige molekulare sowie phänotypische Charakteristika, die als Ursache dafür angesehen werden, dass er sich schneller ausbreitet, schwerere Verläufe der Infektion verursacht und die Sterblichkeitsrate ansteigen lässt. Dazu gehören Polymorphismen im Gen für den negativen Toxinregulator TcdC, die Anwesenheit der Gene für das binäre Toxin CDT, ausgeprägte Resistenz unter anderem gegen Fluorochinolone und Polymorphismen im TcdB-Gen, die möglicherweise zu einer erhöhten Bindungsfähigkeit des Toxins führen.<sup>[75]</sup>

Stämme mit erhöhter Virulenz könnten sich theoretisch aus jedem bisher bekannten Stamm heraus entwickeln. Ribotyp 027 wurde zum Beispiel schon im Jahr 1985 in Frankreich identifiziert, hat sich hingegen erst im Jahr 2003 in den USA und im Jahr 2006 in Großbritannien zum Problem entwickelt. Ebenso der Ribotyp 023, der sehr große Ähnlichkeit zu Ribotyp 078 aufweist, wurde bereits vor 1985 mittels PCR-Ribotypisierung identifiziert und entwickelt sich gerade zu einem problematischen Stamm.<sup>[118]</sup>

Vor allem die Tatsache, dass auch immer häufiger Personengruppen mit niedrigem Risikopotential an symptomatischer CDI erkranken, zeigt, dass sich *C. difficile* zu einem immer ernstzunehmenderen Krankheitserreger entwickelt. *C. difficile* hat außerdem mit

11 % mobilen genetischen Elementen<sup>[114]</sup> ein sehr variables und mobiles Genom, wodurch sich der Organismus schnell an neue Umweltbedingungen anpassen kann und sich schnell neue epidemische Stämme entwickeln können.<sup>[75]</sup> Andererseits hat sich interessanterweise z.B. der Ribotyp 078 trotz gleichbleibendem Genom-Sequenztyp weltweit ausgebreitet. Nur in Australien bildet das Genom dieses Stammes an bestimmten Positionen anscheinend Polymorphismen einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) aus. Dieser Stamm war bisher eher für die Infektion von Tieren bekannt, breitet sich aber zunehmend auch beim Menschen aus. So passt dieser Stamm seinen Genotyp offensichtlich immer mehr an, um den Menschen als Wirt nutzen zu können.<sup>[118]</sup>

Ferner könnte die Anwesenheit verschiedener temperenter Phagen zur unterschiedlichen Virulenz verschiedener *C. difficile* Isolate beitragen.<sup>[89]</sup> In einer Studie wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Infektion mit einem bestimmten temperenten *C. difficile* Phagen zu einer erhöhten Expression von *tcdA* und *tcdB* führen kann.<sup>[115]</sup> Man vermutet, dass der Phage mit dem PaLoc interagiert und so die Toxinproduktion beeinflusst.<sup>[89]</sup>

### **1.1.5 Detektion und Diagnose**

Aufgrund der steigenden Inzidenz und Verlaufsschwere der CDI innerhalb der letzten Jahre ist eine schnelle und zuverlässige Diagnose sehr wichtig und vor allem entscheidend für die optimale Versorgung sowie einwandfreie Behandlung von Patienten. Zudem unterstützt eine schnelle Diagnose die Kontrolle von Infektionen, d.h. die Übertragung und Ausbreitung der Krankheit innerhalb und außerhalb des Krankenhauses könnte verhindert werden.<sup>[34: 95]</sup> Auch für die effiziente Nachverfolgung von Infektionen, für den Vergleich der Effizienz von Behandlungsplänen verschiedener Krankenhäuser und für die genaue Bestimmung der Effektivität von Interventionen – mit dem Ziel das CDI-Aufkommen zu reduzieren – ist eine korrekte Diagnose unbedingt notwendig.<sup>[95]</sup> Dabei ist wichtig, dass der für Detektion und Diagnose verwendete Test sowohl hoch spezifisch und sensitiv ist als auch hohe negative und positive Vorhersagewerte aufweist. Der positive Vorhersagewert eines Tests ist der Anteil der korrekt positiven Testergebnisse; entsprechend ist der negative Vorhersagewert eines Tests der Anteil der korrekt negativen Testergebnisse.<sup>[34]</sup> Falsch negative Testresultate könnten zu einer falschen Behandlung von Patienten führen, außerdem ist das Risiko einer Übertragung der Krankheit auf andere Patienten im Krankenhaus weitaus höher, wenn mit *C. difficile* infizierte Patienten auf Grund einer falsch negativen Diagnose nicht entsprechend isoliert werden. Ebenso kann eine falsch positive Diagnose zu falschen Behandlungsmaßnahmen führen und die Suche nach anderen Ursachen für eine Infektion verhindern.<sup>[95]</sup>

Vor dem Hintergrund, dass mindestens 16 % der hospitalisierten Patienten asymptomatische Träger von *C. difficile* sind, wird der diagnostische Test auf *C. difficile* Infektion nur bei symptomatischen Patienten empfohlen, bei denen ein anderer Erreger

ausgeschlossen werden kann, oder bei Patienten mit Diarrhö, deren Krankenaufenthalt bereits länger als drei Tage dauert; nach Abklingen der Symptome sollte kein weiterer Test zur Überprüfung der Heilung durchgeführt werden.<sup>[27; 31; 34]</sup> Verdacht auf CDI besteht bei signifikanter Diarrhö, definiert als mindestens drei wässrige Stuhlgänge pro Tag über die Dauer von mindestens ein bis zwei Tagen.<sup>[93]</sup> Für schwer verlaufende *Clostridium difficile* Infektionen besteht in Deutschland eine Meldepflicht. Für das Vorliegen einer schweren CDI muss laut Robert Koch Institut (RKI) mindestens eines der folgenden fünf Kriterien erfüllt sein: (i) Notwendigkeit der Wiederaufnahme ins Krankenhaus auf Grund einer rekurrenten Infektion; (ii) Verlegung auf eine Intensivstation zur Behandlung der CDI oder daraus resultierender Komplikationen; (iii) chirurgischer Eingriff auf Grund eines Megakolon, einer Darmperforation oder einer refraktären Kolitis; (iv) Tod weniger als 30 Tage nach Diagnose und CDI als Ursache oder zum Tod beitragende Erkrankung und/oder (v) Nachweis des Ribotyps 027.<sup>[70]</sup>

Generell können die diagnostischen Tests für CDI in drei Gruppen eingeteilt werden: (i) Tests auf das Vorhandensein von *C. difficile* Produkten, wie der Glutamatdehydrogenase (GDH), aromatischer Fettsäuren oder der Toxine A und/oder B, z.B. mittels Enzymimmunoassay, (ii) Kultivierungsmethoden für die Detektion Toxin-produzierender *C. difficile* Zellen (toxigene Kultur, Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungs-Test) sowie (iii) Tests, die bestimmte *C. difficile* Gene spezifisch nachweisen, z.B. PCR bzw. *Real-Time-PCR* zur Detektion von *tcdA*, *tcdB*, *tcdC* oder GDH-Genen.<sup>[12; 34]</sup>

Die meisten Labors verwenden den Enzymimmunoassay für den Nachweis von Toxin A und/oder B, da er leicht und schnell (innerhalb von 2-6 Stunden) durchzuführen und kostengünstig ist.<sup>[6; 12]</sup> Durch die Verwendung von Antikörpern gegen die Toxine A und B werden diese mit einer hohen Spezifität in Stuhlfiltraten detektiert; da die Sensitivität aber nur zwischen 42 % und 92 % liegt, ist die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Ergebnisses sehr hoch.<sup>[6; 30; 34; 60]</sup> Ein anderer Enzymimmunoassay weist die Anwesenheit des Antigens Glutamat-Dehydrogenase (GDH) im Stuhl nach. GDH ist ein Enzym, das in den meisten Bakterien enthalten ist. Es katalysiert die Umwandlung von Glutamat in  $\alpha$ -Ketoglutarat sowie die Rückumwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat in Glutamat. *C. difficile* bildet keine Stamm-spezifische GDH, es werden also durch den GDH-EIA sowohl toxigene als auch nicht-toxigene Stämme detektiert. Dieser Test eignet sich jedoch wegen einer hohen Sensitivität und dem daraus resultierenden hohen negativen Vorhersagewert als *Screening-Methode*, da ein negatives Testergebnis stark auf Abwesenheit von *C. difficile* im Darm hindeutet.<sup>[6]</sup> Durch den Nachweis der GDH mittels EIA, kann gegebenenfalls innerhalb einer Stunde *C. difficile* als Erreger ausgeschlossen werden.<sup>[111]</sup>

Die anaerobe Kultur von *C. difficile* aus Stuhlproben ist immer noch eine der sensitivsten Methoden für den Erregernachweis.<sup>[6]</sup> Ein großes Problem beim Nachweis des Organismus an Stelle der gebildeten Toxine ist dennoch die Tatsache, dass ca. 16-35 % der hospitalisierten Patienten asymptomatische Träger sind und vermutlich 20-25 % der

*C. difficile* Stämme nicht toxisch sind.<sup>[6; 12]</sup> Deshalb werden der Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungstest (ZZNT) und die toxische Kultur momentan als Referenzmethoden für die Detektion von *C. difficile* angesehen.<sup>[34]</sup>

Der ZZNT detektiert Toxin B aus klinischen Stuhlfiltraten, indem das Filtrat parallel mit und ohne gegen TcdB gerichtetem neutralisierendem Antikörper – meist *Clostridium sordelli* oder *C. difficile* Antitoxin – zu Gewebezellkulturen hinzugefügt wird. Die Gewebezellkulturen ohne Antikörper werden während einer Inkubationszeit von bis zu drei Tagen täglich auf zytopathische Effekte hin untersucht. Die Proben mit dem gegen TcdB gerichteten Antikörper werden hinsichtlich Neutralisierung der zytopathischen Effekte untersucht.<sup>[6; 34]</sup>

Bei der toxischen Kultur werden *C. difficile* Sporen selektiv aus dem Stuhl angereichert, in ein anaerobes Kulturmedium überimpft und nach einigen Tagen Inkubation und phänotypischer Identifikation als *C. difficile* (typische Kolonieform und Geruch) die Bildung von Toxin B mittels Zellkultur Zytotoxizitäts Test, Enzymimmunoassay (EIA) oder PCR nachgewiesen, um zu bestimmen, ob der isolierte Stamm toxisch ist.<sup>[6; 34]</sup> Häufig wird beanstandet, dass die toxische Kultur bei Patienten, die nicht an Diarrhö leiden, eine hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen liefert; dies unterstreicht allerdings nur die Empfehlung, ausschließlich Proben zu testen, die von symptomatischen Patienten stammen.<sup>[6]</sup>

Sowohl der ZZNT als auch die toxische Kultur sind hoch spezifisch und sensitiv, jedoch mit ein bis fünf Tagen bis zur Diagnosestellung sehr arbeitsintensiv; für die Verwendung des ZZNTs ist zudem das Vorhandensein einer Zellkultureinrichtung vorausgesetzt.<sup>[6; 49; 66]</sup>

Zusammengefasst wären wohl die wenigsten momentan auf dem Markt erhältlichen Tests für die alleinige Standard-Anwendung geeignet.<sup>[34]</sup> Der ZZNT und die toxische Kultur sind sowohl sensitiv als auch spezifisch, aber technisch sehr komplex und arbeitsintensiv (1-5 Tage). Der EIA zum Nachweis von Toxin A und/oder B ist spezifisch, schnell durchzuführen und kostengünstig, besitzt allerdings nur geringe Sensitivität, wodurch es häufig zu falsch negativen Ergebnissen kommt. Der EIA zum Nachweis der GDH ist hoch sensitiv, doch nur wenig spezifisch, da auch nicht-toxische *C. difficile* erfasst werden, wodurch es häufig zu falsch positiven Ergebnissen kommt. PCR-basierte Methoden sind sowohl hochgradig sensitiv als auch spezifisch und außerdem schnell durchzuführen, es kommt dessen ungeachtet teilweise zu falsch positiven Ergebnissen. Es wird daher allgemein empfohlen, ein zwei-Schritte-System anzuwenden, bei dem zunächst mittels eines sowohl sensitiven als auch schnell und kostengünstig durchzuführenden Testverfahrens, das außerdem einen hohen negativen Vorhersagewert besitzt – z.B. PCR, *Real Time* PCR oder GDH-EIA – auf die Anwesenheit von *C. difficile* im Darm getestet wird. So müsste im Anschluss nur noch bei positivem Ergebnis, durch die Verwendung eines hoch spezifischen Verfahrens wie toxischer Kultur oder ZZNT, hinsichtlich der Anwesenheit Toxin-produzierender *C. difficile* überprüft werden.<sup>[6; 34; 66]</sup>

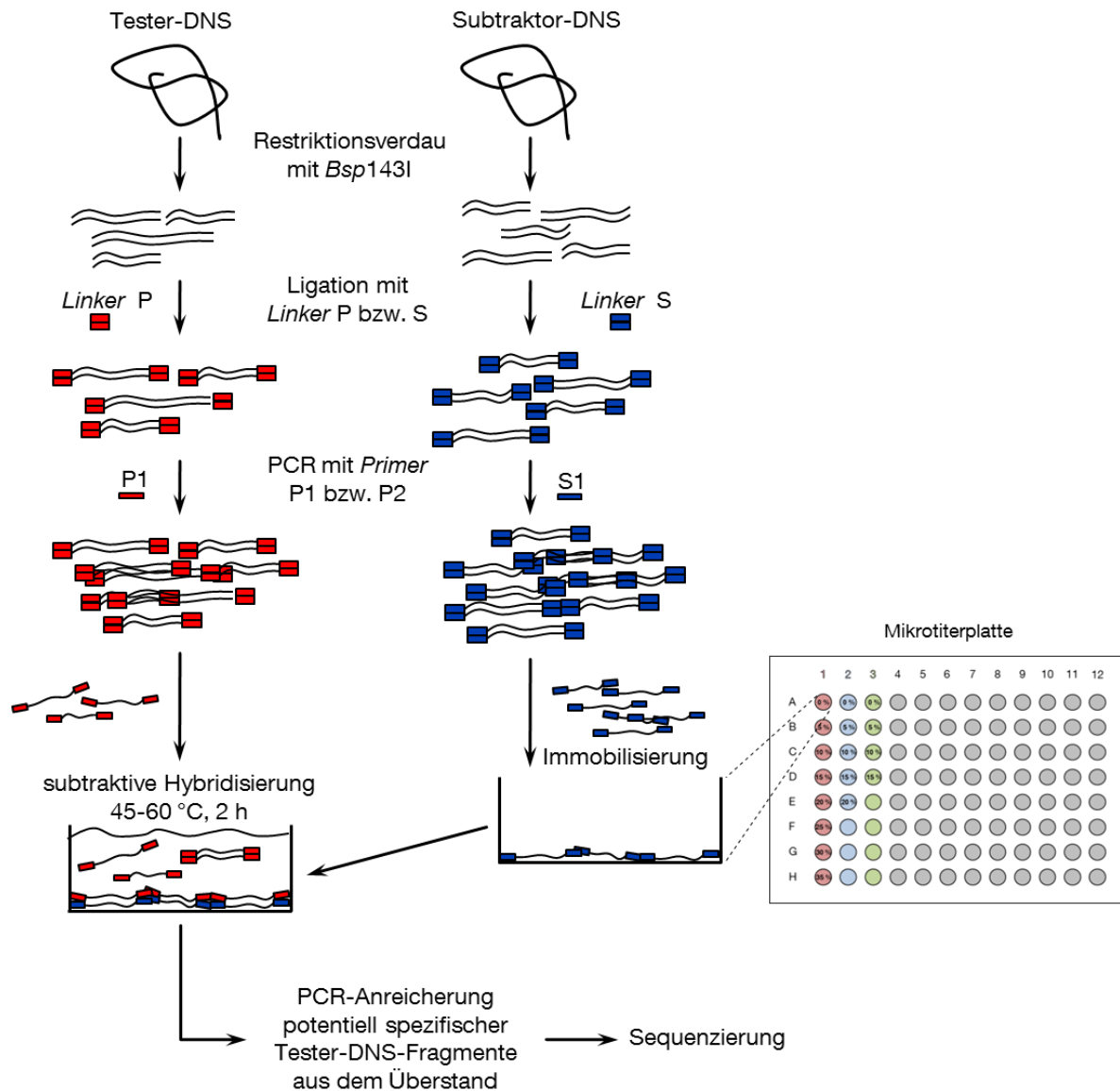


Unabhängig vom verwendeten diagnostischen Test wird grundsätzlich empfohlen, parallel eine Kultur anzulegen, da dadurch ermöglicht wird, die Sensibilität gegenüber Antibiotika zu testen sowie den Erreger zu typisieren, vor allem im Hinblick auf die Identifikation des als hoch virulent angesehenen Stammes NAP1/BI/027.<sup>[111]</sup>

## I.2 Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung erleichtert das Auffinden von DNS-Abschnitten, die im Genom eines Organismus (Tester) vorhanden sind, im Genom eines anderen Organismus (Subtraktor) hingegen fehlen. Ist die Genomsequenz eines der beiden Organismen bekannt, können falsch positive Ergebnisse außerdem durch *in silico* Analysen leicht aussortiert werden.<sup>[1]</sup> Die erste beschriebene Methode zur subtraktiven Hybridisierung wurde für das Auffinden differentiell exprimierter mRNA in Krallenfröschen entwickelt.<sup>[109]</sup> Durch die Verwendung der Gesamt-DNS eines Organismus ist es mit dieser Technik heute möglich, Unterschiede im Genom von nahe verwandten Organismen aufzufinden und diese zum Beispiel für die Entwicklung spezifischer Nukleinsäure-basierter Methoden zur Identifizierung zu verwenden.<sup>[128]</sup> Der Vorteil von durch subtraktive Hybridisierung angereicherten Fragmenten ist, dass die jeweiligen Nukleinsäuresequenzen als diagnostische Marker für DNS-basierte Detektion verwendet werden können, sogar wenn die Funktion der einzelnen Genomabschnitte unbekannt ist.<sup>[1]</sup>

Es sind verschiedene Methoden der subtraktiven Hybridisierung, die unterschiedliche Plattformen verwenden, entwickelt und verwendet worden. Allen heute verwendeten Methoden gemeinsam ist die Denaturierung einer Mischung von Tester- und Subtraktor-DNS-Fragmenten mit anschließender Hybridisierung und Anreicherung der spezifischen Tester-DNS-Fragmente.<sup>[1]</sup> Die genomische DNS der Tester- und Subtraktorstämme wird zunächst mit einem Restriktionsenzym geschnitten, mit unterschiedlichen Adaptor-Oligonukleotiden ligiert, und nach der Hybridisierung können Tester-spezifische Fragmente für die weitere Verwendung selektiv reamplifiziert werden.<sup>[2; 132; 137]</sup> Zur Unterscheidung einzelsträngiger Subtraktor- und Tester-DNS wird bei den meisten Methoden die Subtraktor-DNS vor der Hybridisierung markiert, oftmals mit Biotin, um eine spätere Abtrennung mittels Streptavidin zu ermöglichen.<sup>[137]</sup> Häufig sind zusätzlich mehrere Hybridisierungszyklen bzw. lange Hybridisierungszeiten notwendig, um eine ausreichende Hybridisierung von Tester-DNS-Fragmenten mit Subtraktor-DNS-Fragmenten zu gewährleisten.<sup>[17; 72; 132]</sup>



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung nach Zwirgmaier *et al.* (2001, modifiziert)<sup>[137]</sup>**

Zunächst werden Subtraktor- und Tester-DNS mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Nach Ligation mit den doppelsträngigen Linker-Oligonukleotiden P (Tester) und S (Subtraktor) werden die Fragmente mittels PCR unter Verwendung Linker-spezifischer *Primer* amplifiziert, aufgereinigt und die Subtraktor-DNS-Fragmente im 50-fachen Überschuss verglichen mit der eingesetzten Menge an Tester-DNS auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Während der Hybridisierung binden Tester-DNS-Fragmente mit Sequenzähnlichkeit zu den immobilisierten Subtraktor-DNS-Fragmenten an diese, während Tester-spezifische Fragmente im Hybridisierungspuffer verbleiben. Das Mikrotiterplatten-Format erlaubt die Verwendung von bis zu zwölf verschiedenen Kombinationen von Subtraktor- und Tester-DNS. Durch die Verwendung unterschiedlicher Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer in den Kavitäten der Mikrotiterplatte werden bei gleichbleibender Hybridisierungstemperatur verschieden stringente Bedingungen geschaffen. Abschließend werden die Tester-spezifischen Fragmente aus dem Überstand reamplifiziert, kloniert und sequenziert.

Subtraktive Hybridisierung wurde unter Verwendung verschiedener Modifikationen bereits vielseitig eingesetzt: Z.B. für die Entwicklung von PCR-Systemen, um bestimmte Mikroorganismen-Gruppen oder Stämme bestimmter Spezies zu identifizieren<sup>[1; 13; 17; 41]</sup> sowie

für die Identifizierung von Pathogenitäts- oder Virulenzgenen<sup>[24; 72]</sup> und für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene unter Verwendung von *cDNA* an Stelle von genomischer DNS.<sup>[37; 123]</sup>

In Abbildung 3 (S. 34) ist die in dieser Arbeit verwendete Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung (MASH) nach Zwirgmaier *et al.*<sup>[137]</sup> dargestellt. Bei dieser Methode ist es nicht notwendig, die Subtraktor-DNS-Fragmente vor der Hybridisierung zu markieren, da sie in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Dadurch verbleiben Hybride aus Subtraktor- und Tester-DNS in der Mikrotiterplatte, während Tester-spezifische DNS-Fragmente im Überstand abgenommen werden und durch die Verwendung eines Tester-spezifischen Adaptors spezifisch amplifiziert werden können.

### **I.3 Zielsetzung**

Die in heutiger Zeit für die Routine-Labordiagnostik verwendeten Nachweissysteme sind entweder hoch spezifisch und sensitiv, erfordern aber einen hohen Zeitaufwand bis zur Diagnosestellung und sind meist nicht standardisiert (z.B. Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungs-Test). Oder sie sind zwar schnell und einfach durchzuführen, jedoch meist auf Kosten von Spezifität bzw. Sensitivität (z.B. GDH- bzw. Toxin-EIA) (vgl. auch Kap. I.1.5., S. 30). Zudem ist mit keinem der aktuellen Nachweisverfahren eine Aussage darüber möglich, durch welchen Ribotyp die Infektion verursacht wurde.

Im Zuge dieser Arbeit sollten gezielt Ribotyp-spezifische *C. difficile* DNS-Fragmente isoliert werden, die die Entwicklung eines spezifischen Nachweissystems erlauben. Aktuelle Daten zeigen, dass in Deutschland und vor allem im Süddeutschen Raum (besonders Bayern) bei schwer verlaufenden CDAD-Fällen *C. difficile* Stämme des Ribotyps 001 vorherrschen. Die Ribotypisierung stellt allerdings nur eine Methode dar, *C. difficile* Isolate zu typisieren. Die Ribotyp-definierende 16S-23S intergenische Spacer-Region steht außerdem in keinerlei kausalem Zusammenhang mit der Pathogenität eines Stammes und nimmt somit keinen Einfluss darauf. Es ist also nicht zu erwarten, dass jeweils alle Vertreter eines bestimmten Ribotyps zu einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf führen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Alternativen zur Ribotypisierung existieren, die in der Praxis einfacher anzuwenden sind und gleichzeitig relevant für Entwickler und Anwender sind. Trotz des rapiden Anwachsens der Zahl verfügbarer *C. difficile* Genomsequenzen ist die Datenlage bezüglich verschiedener Stämme bzw. Ribotypen für ein umfassendes *in silico* Design und für die Entwicklung und Evaluierung stammsspezifischer Nachweisverfahren vermutlich nicht ausreichend. Zudem ist die vergleichende Genomsequenzierung trotz neuer Techniken sehr zeitaufwendig. Durch die Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung (MASH) können auf einfache Art und Weise Genomfragmente, die potentiell spezifisch für einen bestimmten Stamm sind, experimentell isoliert und analysiert werden.

Somit sollte überprüft werden, inwieweit es möglich ist, mit Hilfe von MASH-Experimenten gezielt Fragmente zu isolieren, die für Vertreter des Ribotyps 001 spezifisch sind. Im Zweiten Schritt sollten die isolierten Fragmente experimentell und mittels umfassender *in silico* Analysen hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft werden. Auf Basis dessen sollte ein neues schnelles PCR-basiertes Nachweissystem entwickelt und auf eine kommerziell verwertbare Plattform adaptiert werden, welche die verlässliche und schnelle Diagnose von *C. difficile* einerseits und gleichzeitig die Identifizierung bestimmter Ribotypen andererseits ermöglicht.

## II MATERIAL UND METHODEN

### II.1 Verwendete Mikroorganismen und DNS-Proben

In dieser Arbeit wurde genomische DNS von 122 toxischen *Clostridium difficile* Stämmen unterschiedlicher Ribotypen, in deren Genom die Anwesenheit des Toxin B-Gens *tcdB* nachgewiesen wurde, verwendet. Aliquots gelöster genomischer DNS wurden von der AmplexDiagnostics GmbH (Gars Bahnhof, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Eine Liste aller verwendeten Stämme und ihrer Ribotypen ist in Tabelle 1 aufgeführt. Es wurde mit Stämmen von insgesamt 30 verschiedenen Ribotypen gearbeitet. Bei 13 Stämmen war der Ribotyp unbekannt.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *Clostridium difficile* Stämme**

<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>	<b>B19,QCD-63q42</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 006</b>
<i>C. difficile</i> 10 <sup>o</sup>		<i>C. difficile</i> 201*
<i>C. difficile</i> 27 <sup>o</sup>		<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 010</b>
<i>C. difficile</i> RK 305 <sup>-</sup>		<i>C. difficile</i> 213*
<i>C. difficile</i> RK 311 <sup>-</sup>		<i>C. difficile</i> 234*
<i>C. difficile</i> RK 365 <sup>-</sup>		<i>C. difficile</i> 391 <sup>++</sup>
<i>C. difficile</i> RK 379 <sup>-</sup>		<i>C. difficile</i> 399 <sup>++</sup>
<i>C. difficile</i> Ty 859 <sup>-</sup>		<i>C. difficile</i> 614*
<i>C. difficile</i> Landon-1 <sup>-</sup>		<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 012</b>
<i>C. difficile</i> TGC 001-1 <sup>#</sup>		<b>630</b>
<i>C. difficile</i> TGC 001-2 <sup>#</sup>		<i>C. difficile</i> 390 <sup>++</sup>
<i>C. difficile</i> 220*		<i>C. difficile</i> 425*
<i>C. difficile</i> 268*		<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>
<i>C. difficile</i> 351*		<i>C. difficile</i> 163*
<i>C. difficile</i> 422*		<i>C. difficile</i> 393*
<i>C. difficile</i> 433*		<i>C. difficile</i> 394*
<i>C. difficile</i> 472*		<i>C. difficile</i> 398*
<i>C. difficile</i> 612*		<i>C. difficile</i> 400 <sup>++</sup>
<i>C. difficile</i> 903*		<i>C. difficile</i> 418*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 002</b>		<i>C. difficile</i> 421*
<i>C. difficile</i> 384 <sup>++</sup>		<i>C. difficile</i> 423*
<i>C. difficile</i> 416 <sup>++</sup>		<i>C. difficile</i> 475*
<i>C. difficile</i> 420*		<i>C. difficile</i> 521*
<i>C. difficile</i> 480*		<i>C. difficile</i> 523*
<i>C. difficile</i> 526*		<i>C. difficile</i> 527*
<i>C. difficile</i> 554 <sup>++</sup>		<i>C. difficile</i> 558 <sup>++</sup>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 005</b>		<i>C. difficile</i> 628*
<i>C. difficile</i> 436 <sup>++</sup>		<i>C. difficile</i> 523*

Fortsetzung nächste Seite

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *Clostridium difficile* Stämme** (Fortsetzung von Seite 37)

<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 015</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 070</b>
<i>C. difficile</i> 164*	<i>C. difficile</i> 385* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 412* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 072</b>
<i>C. difficile</i> 698* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 328*
<i>C. difficile</i> 808*	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 078</b> QCD-23m63, M120, NAP07, NAP08
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 017</b> CF5, M68	<i>C. difficile</i> 56* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 269*	<i>C. difficile</i> 183* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 435*	<i>C. difficile</i> 196*
<i>C. difficile</i> 604*	<i>C. difficile</i> 200*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 023</b>	<i>C. difficile</i> 240*
<i>C. difficile</i> 34* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 243* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 181* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 372*
<i>C. difficile</i> 403* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 448*
<i>C. difficile</i> 541*	<i>C. difficile</i> 450*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 027</b> CD196, R20291, B11, 2007855, QCD-66c26, QCD-37x79, QCD-32g58, CIP107932, QCD-97b43, QCD-76w55	<i>C. difficile</i> 694*
<i>C. difficile</i> 101 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 754*
<i>C. difficile</i> 102 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 760*
<i>C. difficile</i> 103 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 836*
<i>C. difficile</i> 104 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 855*
<i>C. difficile</i> 105 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 906*
<i>C. difficile</i> 2001*	<i>C. difficile</i> 1018*
<i>C. difficile</i> 2003* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 081</b>
<i>C. difficile</i> 552 (Variation von 027) *	<i>C. difficile</i> 477*
<i>C. difficile</i> 2002 (Variation von 027) *	<i>C. difficile</i> 522*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 029</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 087</b> ATCC 43255
<i>C. difficile</i> 419*	<i>C. difficile</i> 160*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 033</b>	<i>C. difficile</i> 427* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 581* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 090</b>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 035</b>	<i>C. difficile</i> 434* <sup>+</sup>
<i>C. difficile</i> 413* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 094</b>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 045</b>	<i>C. difficile</i> 396*
<i>C. difficile</i> 72* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 103</b>
<i>C. difficile</i> 106* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 161*
<i>C. difficile</i> 119* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 106</b>
<i>C. difficile</i> 476*	<i>C. difficile</i> 2 <sup>◊</sup>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 046</b>	<i>C. difficile</i> 4 <sup>◊</sup>
<i>C. difficile</i> 388* <sup>+</sup>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 135</b>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 049</b>	<i>C. difficile</i> 702*
<i>C. difficile</i> 478*	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 137</b>
<i>C. difficile</i> 387* <sup>+</sup>	<i>C. difficile</i> 424*
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 064</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 149</b>
<i>C. difficile</i> 395*	<i>C. difficile</i> 236* <sup>+</sup>
Fortsetzung nächste Seite	

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *Clostridium difficile* Stämme** (Fortsetzung von Seite 38)

<b><i>Clostridium difficile</i> Stämme unbekanntem Ribotyps</b>	
<i>C. difficile</i> 1 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 262*
<i>C. difficile</i> 16 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 392*
<i>C. difficile</i> 41 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 397*
<i>C. difficile</i> 44 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 479*
<i>C. difficile</i> 45 <sup>◊</sup>	<i>C. difficile</i> 524*
<i>C. difficile</i> 162*	<i>C. difficile</i> 700* <sup>†</sup>
<i>C. difficile</i> 221*	

Die Tabelle listet alle *C. difficile* Stämme auf, die während dieser Arbeit zur Verfügung standen, sowie den deklarierten Ribotyp der jeweiligen Isolate. Genomische DNS aller aufgeführten *C. difficile* Stämme wurde von der AmplexDiagnostics GmbH (Gars Bahnhof am Inn, D) zur Verfügung gestellt.

Mit \* gekennzeichnete Stämme stammen aus dem Konsiliarlaboratorium für gastrointestinale Infektionen (bakteriell) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Universität Freiburg, D, Prof. Dr. med. M. Kist) und wurden dort ribotypisiert.

Mit ~ gekennzeichnete Stämme stammen aus dem Robert Koch Institut Wernigerode und wurden dort ribotypisiert. Genomische DNS der mit # gekennzeichneten Stämme wurde kommerziell von der tgcBIOMICS GmbH (Mainz, D) erworben und wurden dort ribotypisiert.

Bei den mit <sup>◊</sup> gekennzeichneten Stämmen handelt es sich um die ursprünglich verfügbaren *C. difficile* Stämme, die aus dem Queens Medical Center (Nottingham, UK) stammen. Bei diesen Stämmen ist die Ribotyp-Zuordnung nicht eindeutig geklärt.

Genomische DNS der mit <sup>†</sup> gekennzeichneten Stämme wurde ausschließlich für Multiplex PCRs, die für Hybridisierungen mit dem Genspeed® Testsystem (vgl. Kap. II.14, S. 53) durchgeführt wurden, sowie für weitere Multiplex-PCRs, die zur Überprüfung der Stammspezifität neu designter Primer durchgeführt wurden, eingesetzt.

*Clostridium difficile* Stämme, deren Genom bereits sequenziert wurde und in öffentlichen Datenbanken zugänglich ist, sind in die jeweilige Spalte in weiß eingetragen (es handelt sich sowohl um annotierte Genome, als auch um Genomsequenzen, die nur als einzelne Contigs ohne Annotation verfügbar sind).

Zur Überprüfung der Spezifität in dieser Arbeit entwickelter Oligonukleotide wurde zusätzlich genomische DNS der in Tabelle 2 (S. 40) aufgelisteten Mikroorganismen-Stämme als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die genomische DNS dieser Stämme diente als Negativkontrolle für die entwickelten PCR-Assays. Des Weiteren wurde DNS-Material aus Stuhlproben von Patienten aus Bayern, die an symptomatischer CDAD litten verwendet, um die Anwendbarkeit des entwickelten Nachweissystems im klinischen Bereich zu testen. Diese Patientenproben wurden ebenfalls von der AmplexDiagnostics GmbH zur Verfügung gestellt.

Genomische DNS wurde aus Flüssigkulturen unter Verwendung des DNeasy® Tissue Kits von Qiagen® (Hilden, D) nach Herstellerangaben oder nach einem modifizierten Protokoll von Wisotzkey *et al.* (1990)<sup>[134]</sup> extrahiert (vgl. Kap. II.2, S. 40). Eine Kultur von *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* ATCC 29428 wurde von Dr. Sören Schubert (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig Maximilians-Universität München, MVP) zur Verfügung gestellt. Außerdem konnten die Labors des MVP für die Extraktion der genomischen DNS verwendet werden. Extrahierte genomische DNS der Stämme *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus avium* DSM 20679, *Enterococcus dispar* DSM 6630 und *Enterococcus faecalis* ssp. *faecalis* DSM 20380 wurde von Lena Bruder (Doktorandin des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TUM, Weihenstephan, AG Ludwig) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit zusätzlich zu *Clostridium difficile* eingesetzte Mikroorganismen**

<b><i>Escherichia coli</i>*</b>		<b><i>Campylobacter</i> #</b>	
<i>E. coli</i> Serovar O1:K1:H7	ATCC 11775 <sup>T</sup>	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	ATCC 29428
<i>E. coli</i> B	DSM 613	<b><i>Enterococcus</i> ~</b>	
<i>E. coli</i> Serotyp O6	DSM 1103	<i>En. faecalis</i>	ATCC 29212
<b><i>Klebsiella</i> *</b>		<i>En. avium</i>	DSM 20679
<i>K. oxytoca</i>	DSM 5175 <sup>T</sup>	<i>En. dispar</i>	DSM 6630 <sup>T</sup>
<b><i>Listeria</i> *</b>		<i>En. faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i>	DSM 20380
<i>L. monocytogenes</i> RIII			
<b><i>Edwardsiella</i> *</b>			
<i>Ed. tarda</i>	DSM 30052 <sup>T</sup>		

Genomische DNS der aufgelisteten Mikroorganismen wurde zur Überprüfung der Spezifität der entwickelten PCR-Assays eingesetzt.

Mit \* gekennzeichnete Mikroorganismen wurden aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TUM, Weihenstephan entnommen, mit Ausnahme von *E. coli* DSM 1103, von welchem genomische DNS aus der Institutssammlung zur Verfügung stand.

# eine Kultur von *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* ATCC wurde von Dr. Sören Schubert (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

Extrahierte genomische DNS der mit ~ gekennzeichneten Stämme wurde von Lena Bruder (Doktorandin des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TUM, Weihenstephan, AG Ludwig) zur Verfügung gestellt.

**ATCC:** American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; **DSM:** Stammnummer der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D); **NCTC:** National Collection of Type Cultures, Salisbury, UK; **T:** Typstamm

## II.2 Extraktion genomischer DNS nach Wisotzkey *et al.* (1990, modifiziert)<sup>[134]</sup>

Genomische DNS von *Escherichia coli* B, *Listeria monocytogenes* RIII und *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* (vgl. auch Tab. 2) wurde nach dem Protokoll von Wisotzkey *et al.* (1990)<sup>[134]</sup> mit Modifikationen extrahiert.

4 mL Flüssigkultur (OD<sub>600</sub> ca. 1) wurden bei 14000 rpm und 4 °C 5 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zellmaterial von Agarplatten wurden in 500 µL Saline-EDTA resuspendiert und ebenfalls wie oben zentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde einmal mit 500 µL Saline-EDTA gewaschen und anschließend in 500 µL Saline-EDTA mit 20 µL Lysozym (20 mg/mL) resuspendiert und 45 min. bei 37 °C inkubiert. Die Behandlung mit 5 µL RNaseA (Sigma, Steinheim, D) (20mg/mL) bei 55 °C wurde im Anschluss für 15 min. durchgeführt. Nach Zugabe von 10 µL Proteinase K (Roche, Mannheim, D) (10 mg/mL) und Inkubation für 60 min. bei 37 °C wurden 40 µL 25 % (w/v) SDS hinzugefügt und bei 65 °C 10 min. inkubiert. Nach Zugabe von 180 µL 5 M Natriumacetat (pH 5,5) und 755 µL Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) wurden die Komponenten vorsichtig durch Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt und 15 min. bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das doppelte Volumen an eiskaltem EtOH<sub>abs</sub> hinzugefügt und die DNS für mindestens 30 min., besser für 16 h bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNS wurde bei 4 °C und 14000 rpm 15 min. abzentrifugiert, mit 500 µL 70 % (v/v) EtOH gewaschen, erneut bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, der



Überstand entfernt, der DNS Niederschlag 20-30 min. bei 20-25 °C getrocknet und in 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> mindestens 20 min. auf Eis, gelöst.

Aliquots der in H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gelösten genomischen DNS wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose (w/v)) (vgl. Kap. II.4, S. 43) hinsichtlich Reinheit, Qualität und Quantität überprüft.

## II.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)<sup>[106]</sup>

DNS-Fragmente wurden unter Verwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)<sup>[106]</sup> spezifisch vervielfältigt. Ein Standardprogramm ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Die von der Polymerase als Startpunkt benötigten Oligonukleotide (*Primer*) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen. Die Hybridisierungstemperatur zur spezifischen Bindung der verwendeten *Primer* an das zu vervielfältigende DNS-Fragment (*Annealing*temperatur) wurde an Hand der von Eurofins MWG Operon errechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt und gegebenenfalls empirisch optimiert.

**Tabelle 3: Standard PCR-Programm**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen-Anzahl
Anfangs-Denaturierung	94 °C	5 min.	1
Denaturierung	94 °C	30 sec.	
<i>Annealing</i>	x °C *	30-45 sec.	30-35
Elongation	72 °C	y min.*	
finale Elongation	72 °C	10 min.	1

\* x ist abhängig von der Schmelztemperatur  $T_m$  der jeweils verwendeten *Primer* und wurde zum Teil empirisch ermittelt; y ist abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden DNS-Fragments (ca. 1 min. pro 1000 bp)

Für die zyklische Wiederholung der einzelnen Schritte wurden vorwiegend ein Primus 96 plus (MWG Biotech AG, Ebersberg, D) oder ein Mastercycler<sup>®</sup> ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, D) Thermocycler verwendet. Für die Amplifizierung von DNS-Fragmenten mit dem Amplex Tth-DNA Polymerase System wurde ein Sensoquest labcycler (Sensoquest Biomedizinische Elektronik, Göttingen, D) verwendet.

### II.3.1 TaKaRa ExTaq<sup>™</sup> PCR System

Vorwiegend wurde das TaKaRa ExTaq<sup>™</sup> System (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, J) in einem Volumen von 50 µL verwendet. Je Ansatz wurden 5 µL 10x ExTaq Buffer, 5 µL dNTP Mix, je 0,25 µL Vorwärts- und Rückwärts*primer* (verwendete Oligonukleotide vgl. Tab. 24, S. 137 und Tab. 25, S. 138 im Anhang) (50-100 pmol/µL Stammlösung), 0,25 µL ExTaq<sup>™</sup>, sowie ca. 100 ng Matrizen-DNS eingesetzt. Alle Lösungen wurden zunächst in einem PCR-Mastermix gemischt und anschließend der jeweiligen Matrizen-DNS zugefügt. Für die Durchführung der

PCR in kleineren (10-25  $\mu\text{L}$ ) bzw. größeren (100  $\mu\text{L}$ ) Reaktionsvolumina wurden die eingesetzten Mengen entsprechend angepasst.

Zur Durchführung der „Ribotyp-PCR“ (vgl. Kap. I.1.2, S. 22 und Kap. III.3.1, S. 78) wurde das PCR-Programm nach den Angaben von Bidet *et al.* (1999)<sup>[16]</sup> abgeändert (vgl. Tab. 4).

**Tabelle 4: PCR-Programm zur Durchführung der „Ribotyp-PCR“ nach Bidet *et al.* (1999)<sup>[16]</sup>**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen-Anzahl
Anfangs-Denaturierung	94 °C	6 min.	1
Denaturierung	94 °C	1 min.	
Annealing	41 °C	1 min.	35
Elongation	72 °C	1,5 min.	
finale Elongation	72 °C	7 min.	1

### II.3.2 BIOTAQ™ PCR System

Zum Überprüfen der Insertion von DNS-Fragmenten in einem Vektor nach Klonierung (vgl. Kap. II.6, S. 44) wurde das BIOTAQ™ DNA Polymerase System (Bioline, London, UK) mit den mitgelieferten Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers verwendet. Eine dNTP Lösung, die 2,5 mM je dNTP enthält, wurde aus dem Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) hergestellt. Pro 10  $\mu\text{L}$ -Ansatz wurden 1  $\mu\text{L}$  10x  $\text{NH}_4$  Buffer, 1  $\mu\text{L}$  dNTP Lösung, 0,8  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ -Lösung, je 0,1  $\mu\text{L}$  Vektor-spezifische *Primer* (M13 Forward, M13 Reverse; vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang), 0,1  $\mu\text{L}$  BIOTAQ™ DNA Polymerase sowie 0,5  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension als Ausgangsmaterial eingesetzt. Alle Lösungen wurden zunächst in einem PCR-Mastermix gemischt und anschließend der jeweiligen Zellsuspension zugegeben. Durch die Verwendung intakten Zellmaterials anstelle extrahierter DNS als Matrize musste die Anfangs-Denaturierung auf 10 min. verlängert werden. Nach der Amplifikation wurden die Fragmente mittels Standard-Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kap. II.4, S. 43) überprüft.

### II.3.3 PCR mit dem Amplex Tth-DNA Polymerase PCR System

DNS-Fragmente, die für Hybridisierungen mit dem Genspeed® Testsystem (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A) (vgl. Kap. II.14, S. 53) verwendet werden sollten, wurden mit dem Amplex Tth-DNA Polymerase PCR System (Amplex Biosystems GmbH, Gießen, D) amplifiziert. Für einen 20  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz wurden 5  $\mu\text{L}$  DNS-Matrize (extrahierte genomische DNS verschiedener *Clostridium difficile* Stämme bzw. extrahierte DNS aus Patienten-Stuhlproben), 2  $\mu\text{L}$  10x Reaction Buffer, 1  $\mu\text{L}$  dNTP Mix sowie *Primer*lösungen in veränderlichen Volumina (vgl. Kap. III.5.1, S. 90) und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  ad 20  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Alle Lösungen wurden zunächst in einem PCR-Mastermix gemischt und anschließend der jeweiligen Matrizen-DNS hinzugefügt. Zunächst wurden verschiedene PCRs mit jeweils einem *Primer*paar durchgeführt, um die Hybridisierung mit dem Genspeed® Testsystem zu

optimieren. Anschließend wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, die die gleichzeitige Amplifikation aller mit dem Genspeed® Testsystem zu analysierenden Fragmente erlaubt. Die verwendeten Rückwärtsprimer waren am 5'-Ende biotinyliert, um eine spätere Detektion der entsprechenden PCR-Produkte mittels Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zu ermöglichen. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 5 beschrieben, die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 24 (S. 137 im Anhang) aufgeführt.

**Tabelle 5: PCR-Programm für die Amplifikation von DNS-Fragmenten mit der Tth-DNA Polymerase**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen-Anzahl
Anfangs-Denaturierung	96 °C	5 min.	1
Denaturierung	95 °C	10 sec.	
Annealing	x °C *	20 sec.	40
Elongation	72 °C	15 sec. +0,5 sec. pro Zyklus <sup>#</sup>	
finale Elongation	72 °C	1 min.	1

\* x ist abhängig von der Schmelztemperatur  $T_m$  der jeweils verwendeten Primer und wurde empirisch ermittelt;

# die Elongationszeit wurde mit jedem Zyklus um 0,5 sec. verlängert.

### II.3.4 Gradienten-PCR

Für die empirische Ermittlung der optimalen bzw. maximal möglichen Annealingtemperatur neu designter Primer wurde eine Gradienten-PCR verwendet. Dabei werden parallel bis zu zwölf PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen, bei sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Für alle Gradienten-PCRs wurde ein Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, D) mit einem Gradienten von  $T_m \pm 6$  °C verwendet, wobei  $T_m$  dem Mittelwert der Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide entspricht. Die Amplifikate wurden anschließend durch Standard-Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kap. II.4, S. 43) überprüft.

## II.4 Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Verifizierung der Fragmentlängen von PCR-Produkten sowie zur Überprüfung der Reinheit und zur Abschätzung der Konzentration von PCR-Produkten und extrahierter genomischer DNS wurden jeweils 5 µL Aliquots mittels Standard-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für Fragmente bis zu einer Länge von ca. 800 bp wurde 2 % Agarose (w/v) in 1x TAE verwendet. Für PCR-Produkte, die unter Verwendung der Primer P1 bzw. S1 amplifiziert worden waren und für PCR-Produkte, die zum Überprüfen der Insertion von DNS-Fragmenten in einem Vektor nach Klonierung amplifiziert worden waren, wurde 1,5 % Agarose (w/v) in 1x TAE verwendet. Für Fragmente mit einer Länge >800 bp und extrahierte genomische DNS wurde 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Fragmente im Ethidiumbromid-Bad (0,15 µg/mL EtBr in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) gefärbt und anschließend in einem Alphamager® Mini (Alpha Innotec

Corporation, San Leandro, CA, USA) unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Als Größen- und Konzentrationsmarker wurden der 1 Kb DNA Ladder, der 100 bp DNA Ladder oder der 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet.

## **II.5    Aufreinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte wurden vor Weiterverwendung mit dem *AccuPrep*<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Bioneer, Alameda, CA, USA) nach Herstellerangaben von überschüssigen dNTPs, Salzen, Polymerase und Oligonukleotiden befreit. Zum Eluieren der PCR-Produkte aus den Aufreinigungs-Säulchen wurde stets H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> an Stelle des entsprechenden Puffers verwendet. Das Volumen des zum Eluieren verwendeten Wassers entsprach dem ursprünglichen Volumen des PCR-Ansatzes oder wurde gegebenenfalls – zum Erhöhen der Konzentration des PCR-Produktes – verringert.

## **II.6    Klonierung von PCR-Produkten**

### **II.6.1   Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen nach Inoue *et al.* (1990, modifiziert)<sup>[58]</sup>**

Für die Herstellung kompetenter *Escherichia coli* TOP 10 Zellen, wurde Zellmaterial aus einer bei -80 °C gelagerten Glycerinkultur (in LB/25 % Glycerin) auf einer LB-Platte ausgestrichen und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Bewachsene Platten wurden bis zu 3 Monate bei 4 °C gelagert. 30 mL LB-Medium in einem 100 mL Glaskolben wurde mit einigen Kolonien beimpft und bei 37 °C rotierend (200 rpm) für ca. 16 h bebrütet. Aus dieser Vorkultur wurde 1 mL in 50 mL frisches Medium in einem 250 mL Glaskolben überimpft und bei 18-19 °C rotierend (200 rpm) inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,6-0,8 erreicht war. Anschließend wurde der Kolben für 10 min. auf Eis gestellt und die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min. abzentrifugiert und in 16 mL eiskalter TB-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 10 min. auf Eis wurden die Zellen wie oben abzentrifugiert und in 4 mL TB-Lösung mit 7 % (v/v) DMSO resuspendiert. Aliquots von je 100 µL Suspension kompetenter Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen ist in Tabelle 6 (S. 45) aufgelistet.

**Tabelle 6: Für Klonierung benötigte Lösungen und Medien**

SOB-Medium		SOC-Medium	
Trypton	2 % (w/v)	Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM	NaCl	10 mM
KCl *	25 mM	KCl *	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> *	10 mM	MgCl <sub>2</sub> *	10 mM
MgSO <sub>4</sub> *	10 mM	MgSO <sub>4</sub> *	10 mM
TB-Lösung*		Glukose	20 mM
PIPES	10 mM	Luria-Bertani- (LB-) Medium	
CaCl <sub>2</sub>	15 mM	Trypton	1 % (w/v)
KCl	250 mM	NaCl	0,5 % (w/v)
pH mit KOH oder HCl auf 6,7 einstellen		Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
MnCl <sub>2</sub>	55 mM	Agar (nur für Festmedium)	1,5 % (w/v)

Alle Medien wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hergestellt und bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min. autoklaviert; mit \* gekennzeichnete Bestandteile wurden gesondert in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) dem jeweiligen Medium nach dem Autoklavieren hinzugefügt; für die TB-Lösung wurden alle Bestandteile in H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

## II.6.2 Vektor-Ligation und -Transformation

Aufgereinigte PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TA Cloning® Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und unter Verwendung des Vektors pCR® 2.1 kloniert. Dieser enthält für die Selektion auf rekombinante Klone ein Kanamycin- bzw. Ampicillin-Resistenzgen. Außerdem befindet sich innerhalb der multiplen Klonierungsstelle das *lacZ* $\alpha$ -Fragment, welches für die ersten 146 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Nach erfolgter Transformation wird durch  $\alpha$ -Komplementation nur dann eine intakte  $\beta$ -Galaktosidase gebildet, wenn das *lacZ* $\alpha$ -Fragment nicht durch eine in den Vektor klonierte Insertion unterbrochen worden ist und der Vektor nicht durch Selbst-Ligation zyklisiert wurde. Durch Zugabe von X-Gal (Laktose-ähnliches Substrat) zum LB-Medium erscheinen Kolonien, die Bakterien mit aktiver  $\beta$ -Galaktosidase enthalten, blau. Kolonien, die nur rekombinante Bakterienzellen enthalten, erscheinen hingegen weiß.

Als Empfängerorganismen dienten stets kompetente *Escherichia coli* TOP10, die entweder kommerziell von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) bezogen oder nach einem modifizierten Protokoll von Inoue *et al.*<sup>[58]</sup> (vgl. Kap. II.6.1, S. 44) selbst hergestellt wurden. Die Ligation der PCR-Produkte in den linearisierten Vektor sowie die Transformation der chemisch kompetenten Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Inkubation der transformierten Zellen in 250-500 µL SOC-Medium (Zusammensetzung vgl. Tab. 6), um rekombinanten *E. coli* die Expression des Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenzgens zu ermöglichen, wurden 30-80 µL auf LB-Agar-Platten, die 100 ng/µL Ampicillin und 40 ng/µL X-Gal enthielten, ausplattiert und für ca. 16 h bei 37 °C bebrütet.

### II.6.3 Überprüfung rekombinanter Zellen (Klonscreening)

Von bewachsenen LB-Platten wurden zufällig mehrere weiße Kolonien je Klonierungsansatz ausgewählt, in 100 µL LB-Flüssigmedium mit 100 ng/mL Ampicillin resuspendiert und für ca. 1 h bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde, wie in Kapitel II.3.2 (S. 42) beschrieben, eine PCR zur Kontrolle der Insertionen durchgeführt und die Länge der jeweils inserierten DNS-Fragmente mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Relevante rekombinante Klone wurden in 5 mL LB-Flüssigmedium mit 100 ng/mL Ampicillin überimpft und für 16 h bei 37 °C rotierend (150 rpm) bebrütet (Übernachtkultur).

## II.7 Plasmidextraktion

Die Aufreinigung von Plasmid-DNS wurde aus 4 mL Übernachtskultur rekombinanter *E. coli* (vgl. Kap. II.6, S. 44) mit dem *AccuPrep*<sup>®</sup> Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer, Alameda, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. An Stelle des entsprechenden Puffers wurden stets 75 µL H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> zum Eluieren aus den Aufreinigungs-Säulchen verwendet.

## II.8 Enzymatische DNS-Modifikation

Für die Verwendung bei der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH) (vgl. Kap. II.9, S. 47) wurde die genomische DNS zum einen vorher mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bsp143I* (Fermentas, St. Leon-Rot, D) fragmentiert, zum anderen wurden die Fragmente anschließend mit verschiedenen Adaptoren ligiert, die eine spezifische Amplifikation bestimmter Fragmente erlauben.

### II.8.1 Restriktionsverdau

Für die Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH)<sup>[137]</sup> (vgl. Kap. II.9, S. 47) wurde jeweils ca. 1 µg genomische DNS der verwendeten *C. difficile* Stämme mit der Endonuklease *Bsp143I* (Fermentas, St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 40 µL fragmentiert. Dieses Restriktionsenzym erfasst eine 4 bp lange Erkennungssequenz und produziert Fragmente von 100-1500 bp, die sich besser für Hybridisierungen eignen als längere Fragmente. *Bsp143I* erzeugt Fragmente mit 5'-GATC-3'-Überhängen an den Schnittstellen, die eine spätere Ligation mit den *Linkern* P bzw. S erlauben (vgl. Kap. II.8.2, S. 47 sowie Kap. II.9.1, S. 49).

## II.8.2 Ligation

Mit Restriktionsenzymen verdaute DNS wurde ohne Aufreinigung direkt aus den Restriktionsansätzen für die Ligation eingesetzt. Für sämtliche Ligationen wurde die T4 DNA Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben verwendet. *Bsp143I*-verdaute Fragmente wurden mit den *Linkern* P bzw. S<sup>[137]</sup> ligiert, welche *Bsp143I*-kompatible Überhänge besitzen. Die entsprechenden Oligonukleotidsequenzen sind in Kapitel II.9.1 (S. 49) bzw. in Tabelle 24 (S. 137 im Anhang) aufgeführt.

Bei Klonierungen wurde für die Ligation von PCR-Produkten mit dem Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1 ebenfalls eine T4 DNA Ligase, die im TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enthalten ist, nach Herstellerangaben verwendet (vgl. Kap. II.6.2, S. 45).

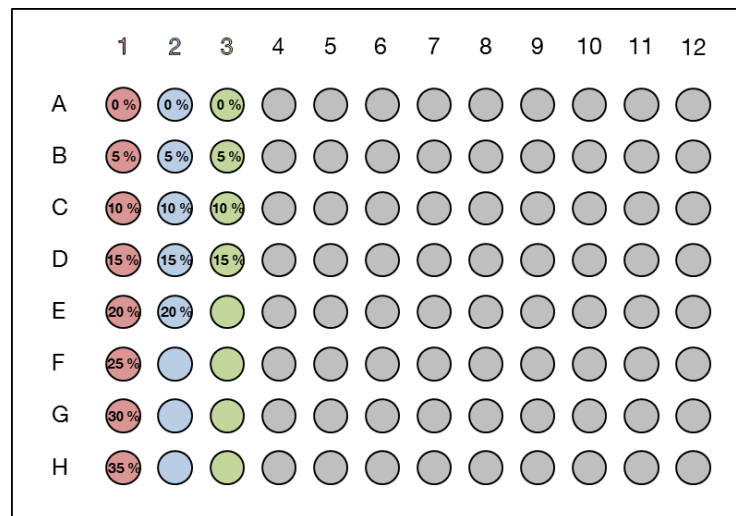
## II.9 Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung nach Zwirgmaier *et al.* (2001, modifiziert)<sup>[137]</sup>

Für die Anreicherung Ribotyp-spezifischer DNS-Fragmente wurde die subtraktive Hybridisierung nach Zwirgmaier *et al.*<sup>[137]</sup> verwendet. Subtraktive Hybridisierungsmethoden ermöglichen den Vergleich ganzer Genome und die Anreicherung spezifischer Fragmente (vgl. Kap. I.2., S.33). So können zum Beispiel – bei Verwendung von *cDNA* – differentiell exprimierte Gene eines Organismus aufgezeigt werden, die nur unter bestimmten Umweltbedingungen abgelesen werden, oder aber auch – bei Verwendung von genomischer DNS – Sequenzunterschiede im Genom zweier nah verwandter Organismen.

Das Prinzip der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH) beruht darauf, dass nach Denaturierung komplementäre DNS-Fragmente mit hoher Sequenzähnlichkeit miteinander hybridisieren und an der Oberfläche einer Mikrotiterplatten-Kavität gebunden sind, wohingegen spezifische Fragmente einzelsträngig in Lösung verbleiben und isoliert werden können. Dabei wird DNS eines Ziel-Stammes (Tester) mit DNS von bis zu acht Referenz-Stämmen (Subtraktor) hybridisiert. Die Subtraktor-DNS wird im Überschuss eingesetzt. Eine schematische Darstellung der Methode ist in Abbildung 3 (S. 34) gezeigt.

Genomische DNS von bis zu acht Subtraktorstämmen wird in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die genomische DNS des jeweiligen Tester-Stammes in Lösung dagegen hybridisiert. Das Mikrotiterplatten-Format erlaubt in einem Arbeitsschritt die simultane Verwendung sowohl von bis zu zwölf Kombinationen von Tester- und Subtraktor-DNS, als auch von bis zu acht verschiedenen Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer (vgl. Abb. 4, S. 48). Tester- und Subtraktor-DNS werden vor der Hybridisierung mit einem Restriktionsenzym, das 3'-CTAG-5'-Überhänge produziert, fragmentiert und anschließend mit verschiedenen Adaptor-Oligonukleotiden (*Linker* P für

Tester-DNS, *Linker S* für Subtraktor-DNS) ligiert, die eine spezifische Amplifikation der jeweiligen Fragmente erlauben.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte zur Verwendung bei der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH)**

Die Ziffern bezeichnen die einzelnen Spalten der Mikrotiterplatte, in denen verschiedene Kombinationen von Tester- und Subtraktor-DNS eingesetzt werden können (dargestellt durch verschiedene Farben). Die Buchstaben bezeichnen die einzelnen Reihen der Mikrotiterplatte, in denen unterschiedliche Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer verwendet werden können (Angabe der Formamid-Konzentrationen in %).

Für die Anreicherung potentiell stammspezifischer *C. difficile* DNS-Fragmente wurde das Protokoll von Zwirgmaier *et al.*<sup>[137]</sup> in einigen Punkten modifiziert. Alle benötigten Puffer sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Für Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung benötigte Puffer**

PBS/MgCl <sub>2</sub>		Hybridisierungspuffer	
NaCl	0,13 M	SSC	5x
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M	Blocking	1 % (w/v) (Roche Diagnostics, Mannheim, D)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 M	N-Laurylsarcosin	1 % (w/v)
pH auf 7,2 einstellen		SDS*	0,02 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub> *	0,1 M	Formamid	0-35 % (v/v)
PBS/MgCl <sub>2</sub> /EDC			
PBS/MgCl <sub>2</sub> angereichert mit EDC* (0,01 M Endkonzentration)			
20x SSC			
NaCl	3 M		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,3 M		
pH auf 7,0 einstellen			

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> hergestellt und bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min. autoklaviert; mit \* gekennzeichnete Bestandteile wurden gesondert in H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) der jeweiligen Lösung nach dem Autoklavieren hinzugefügt; SDS wurde aus einer 25 %igen (w/v) Stammlösung, die ohne Autoklavieren bzw. Sterilfiltration verwendet wurde, zur entsprechenden Endkonzentration verdünnt.



### II.9.1 Herstellung Adaptor-ligierter Tester- und Subtraktor-DNS

Die benötigten Oligonukleotide für die Adaptor-Herstellung<sup>[137]</sup> wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) synthetisiert:

P1: 5'- AGG GGA TAA CCA ATT CAC ACA CCA -3',  
P2: 5'- GAT CTG GTG TGT GAA TTG GTT ATC CCC -3';  
S1: 5'- CGC CAG GGA ACA CCC AGT CAC GAC -3',  
S2: 5'- GAT CGT CGT GAC TGG GTG TTC CCT GGC G -3'

Die *Primerpaare* P1 und P2 sowie S1 und S2 haben jeweils komplementäre Bereiche, wodurch sie sich zu Dimeren zusammenlagern können und *Bsp143I*-kompatible 3'-CTAG-5'-Überhänge bilden. Für die Herstellung der *Linker* wurden je ca. 400 ng (100 pmol) P1 und P2 bzw. S1 und S2 mit 38 µL 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gemischt, bei 65 °C 10 min. inkubiert und bei 20-25 °C abgekühlt.

Die Ligation von 400 ng fragmentierter Tester-DNS mit 3 µL *Linker* P bzw. 400 ng fragmentierter Subtraktor-DNS mit 3 µL *Linker* S erfolgte mit der T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 15 µL.

Die Adaptor-ligierten Fragmente wurden mit Hilfe des TaKaRa ExTaq™ PCR-Systems (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, J) amplifiziert. Tester-DNS-Fragmente wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µL mit 100 pmol *Primer* P1, Subtraktor-DNS-Fragmente in einem Reaktionsvolumen von 50 µL mit 50 pmol *Primer* S1 jeweils unter Verwendung des Standard-PCR-Programms (vgl. Tab. 3, S. 41) amplifiziert (*Annealing*: 30 sec., 55 °C; *Elongation*: 1,5 min.; 35 Zyklen). Die PCR-Produkte wurden mittels 1,5 % Agarose-Gelelektrophorese überprüft und mit dem *AccuPrep*® PCR Purification Kit (Bioneer, Alameda, CA, USA) aufgereinigt (vgl. Kap. II.5, S. 44).

### II.9.2 Immobilisierung von Subtraktor-DNS

Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp oder Nunc ImmunoModule, NalgenNunc, Naperville, IL, USA) mit Subtraktor-DNS wurde pro Kavität 1-2 µg S-ligierte PCR-amplifizierte Subtraktor DNS von bis zu acht Stämmen in 50 µL PBS/MgCl<sub>2</sub>/EDC verwendet. Das jeweilige Gemisch wurde 10 min. bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt, in die Mikrotiterplatte überführt und für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Platte für 1 h bei 60 °C getrocknet. Beschichtete Mikrotiterplatten können bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert werden. Vor der Hybridisierung wurde jede Kavität mit 100 µL PBS/MgCl<sub>2</sub> gewaschen, um eventuell nicht gebundene Subtraktor-DNS zu entfernen.

### II.9.3 Ausschlusshybridisierung und Isolierung spezifischer DNS-Fragmente

Jede Kavität wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Hybridisierungspuffer (0-35 % (v/v) Formamid) bei 45-60  $^{\circ}\text{C}$  – je nach späterer Hybridisierungstemperatur – inkubiert, um nicht belegte Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte zu blockieren.

Je Kavität wurden 50 ng P-ligierte, PCR-amplifizierte Tester-DNS in 50  $\mu\text{L}$  Hybridisierungspuffer (0-35 % (v/v) Formamid) 10 min. bei 95  $^{\circ}\text{C}$  denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die jeweilige Kavität der Mikrotiterplatte überführt. Die Hybridisierung wurde bei 45-60  $^{\circ}\text{C}$  für 2 h durchgeführt.

Nach der ersten Hybridisierung wurden 2  $\mu\text{L}$  jedes Überstandes erneut in 50  $\mu\text{L}$  Hybridisierungspuffer (0-35 % (v/v) Formamid) denaturiert und für eine zusätzliche Hybridisierungsrunde mit DNS weiterer Subtraktor-Stämme eingesetzt. Insgesamt wurden drei Hybridisierungsrunden auf diese Weise durchgeführt. Die DNS-Fragmente aus 10  $\mu\text{L}$  des Überstandes aus jeder Runde wurden durch Ethanol-fällung (90  $\mu\text{L}$  Tris/HCl, pH 7,5; 6  $\mu\text{L}$  Natriumacetat; 200  $\mu\text{L}$  EtOH<sub>abs.</sub>, -20  $^{\circ}\text{C}$ ) von Hybridisierungspuffer gereinigt. Die gefällten Tester-DNS-Fragmente wurden 15 min. bei 14000 rpm und 4  $^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und erneut 15 min. bei 14000 rpm und 4  $^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die getrockneten Tester-DNS-Fragmente wurden in je 10  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gelöst und davon 2  $\mu\text{L}$  als Matrize für eine PCR zur Amplifikation von Tester-DNS-Fragmenten mit *Primer* P1 eingesetzt. Es wurde das TaKaRa ExTaq™ PCR-System (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, J) in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu\text{L}$  mit 10 pmol *Primer* und das Standard-PCR-Programm (vgl. Tab. 3, S. 41) verwendet (*Annealing*: 30 sec., 55  $^{\circ}\text{C}$ ; *Elongation*: 1,5 min.; 35 Zyklen).

Die PCR-Produkte wurden mittels 1,5 % Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Kap. II.4, S. 43) und anschließend gegebenenfalls mit dem *AccuPrep*® PCR Purification Kit (Bioneer, Alameda, CA, USA) aufgereinigt (vgl. Kap. II.5, S. 44). Unter Verwendung des TA Cloning® Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden die potentiellen Tester-spezifischen Fragmente unter Verwendung des Vektors pCR® 2.1 kloniert und in kompetente *Escherichia coli* TOP 10 transformiert (vgl. Kap. II.6, S. 44). Nach Überprüfung der Insertionen mittels PCR (vgl. Kap. II.3.2, S. 42) wurden die Plasmide relevanter rekombinanter *E. coli* extrahiert (vgl. Kap. II.7, S. 46) und das jeweils inserierte Fragment sequenziert (vgl. Kap. II.10, S. 50).

## II.10 DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen nach Sanger *et al.* (1977)<sup>[108]</sup> wurden mit dem SequiTherm Excel™ II DNA Sequencing Kit-LC (for 66-cm Gels) (Epicentre, Madison, WI, USA) und 16S rDNS PCR-Produkten oder extrahierten Plasmiden als Matrize nach Herstellerangaben durchgeführt. Als *Primer* dienen 16S rDNS spezifische Oligonukleotide (97kV, 699RIII, 614V, 609R, 100K) oder die Vektor pCR 2.1-spezifischen Oligonukleotide M13F und M13R

(vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang), die an Bereiche des Plasmids binden, welche die Insertionsstelle flankieren. Um eine spätere Laser-Detektion der amplifizierten Fragmente zu ermöglichen, trugen die verwendeten *Primer* eine IRD-Markierung (Dy682 bzw. Dy782) an ihrem 5'-Ende. Die Fragmente wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem LI-COR Global IR<sup>2</sup> 4200 DNA Sequencer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) nach Herstellerangaben aufgetrennt und detektiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der e-Seq V 2.0 Software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

## II.11 Vergleichende Sequenzanalyse

Die Sequenzdaten der mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung isolierten Fragmente wurden einer BLAST Analyse (blastn; Basic Local Alignment Search Tool<sup>[3]</sup>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen. Sequenzen mit sehr hoher Ähnlichkeit (d.h.  $\geq 98$  %) zu DNS-Abschnitten anderer *C. difficile* Ribotypen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Für Sequenzen, die eine geringere Ähnlichkeit als 98 % zu DNS-Abschnitten anderer Stämme aufwiesen, wurden weiterführende Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit in verschiedenen öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen durchgeführt (blastx; Basic Local Alignment Search Tool<sup>[3]</sup>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Auf Basis der Sequenzdaten des jeweiligen Fragments sowie der BLAST-Ergebnisse wurden potentiell spezifische *Primer* designt (vgl. Kap. II.12, S. 51) und mittels PCR zur Überprüfung der Stammspezifität neu designter *Primer* überprüft (vgl. Kap. II.13, S. 52).

Unter Verwendung der verfügbaren *Clostridium difficile* Genomsequenzen und der gegebenenfalls zusätzlich gefundenen ähnlichen Sequenzen wurde jeweils eine ARB-Datenbank<sup>[78]</sup> (<http://www.arb-home.de>) und sowohl ein entsprechendes Nukleinsäure-Alignment, als auch ein Aminosäure-Alignment für vergleichende Sequenzanalysen und gegebenenfalls zum Designen potentiell spezifischer *Primer* erstellt.

## II.12 *Primer*-und Sonden-Design

Auf Basis der Sequenzdaten einzelner durch MASH isolierter Fragmente und gegebenenfalls der Nukleinsäure-Alignments in den entsprechenden ARB-Datenbanken wurden verschiedene *Primer*paare entwickelt, um die entsprechenden Subfragmente hinsichtlich Stammspezifität mittels PCR (vgl. Kap. II.13, S. 52) zu überprüfen. Außerdem wurden für die Verwendung des Prototyps „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ (vgl. Kap. II.14, S. 53) Oligonukleotidsonden mit Zielregionen innerhalb dieser Subfragmente designt, die auf dem benötigten Durchfluss-Chip immobilisiert wurden. Bei Vorhandensein eines

entsprechenden Nukleinsäure-Alignments wurden zusätzlich die in der ARB-Software implementierten Werkzeuge ARB Probe Design und ARB Probematch<sup>[78]</sup> herangezogen.

Die Spezifität der entwickelten Oligonukleotide wurde zunächst mittels *Primer-BLAST*<sup>[135]</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) *in silico* überprüft und bei potentieller Entstehung unbeabsichtigter PCR-Produkte gegebenenfalls eine andere Zielregion innerhalb der Sequenz des entsprechenden Fragments gewählt.

Die neu designten Oligonukleotide wurden jeweils so gewählt, dass sie bei einer Länge von 18-20 nt einen GC-Gehalt von ca. 50 % aufwiesen, eine Schmelztemperatur von 50-55 °C und nach Möglichkeit nicht mehr als drei identische Nukleotide, die direkt aufeinander folgen. Zusätzlich wurden die *Primerpaare* hinsichtlich ihrer Eignung für PCR mittels dem IDT® Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA; <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) sowie dem Multifunctional Oligo Property Scan (MOPS) von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D; <https://ecom.mwgdna.com/services/webgist/mops.tcl>) überprüft. Die entwickelten Oligonukleotide sind im Ergebnisteil genannt (vgl. Kap. III.2.1, S. 58, Kap. III.2.2, S. 66 und Kap. III.2.3, S. 74) sowie im Anhang aufgelistet (vgl. Tab. 25, S. 138).

## **II.13 PCR zur Überprüfung der Stammspezifität neu designer *Primer***

Zur Ermittlung der optimalen *Annealing*temperatur wurde mit allen als PCR-*Primer* neu designten Oligonukleotiden eine Gradienten-PCR (vgl. Kap. II.3.4, S. 43) durchgeführt. Als Matrize diente jeweils genomische DNS des *C. difficile* Stammes, aus welchem das entsprechende Fragment mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH) isoliert wurde. Die *Annealing*temperaturen wurden nach dem Mittelwert der Schmelztemperaturen  $T_m$  der eingesetzten Oligonukleotide gewählt und betrug  $T_m \pm 6$  °C. Zur Überprüfung der Spezifität und Länge der Amplifikate wurde eine Standard-Agarose-Gelelektrophorese mit 2 % Agarose (w/v) in 1x TAE durchgeführt (vgl. Kap. II.4, S. 43). Anschließend wurde eine PCR (vgl. Kap. II.3.1, S. 41) mit der für die MASH eingesetzten Subtraktor-DNS als Matrize sowie genomischer DNS weiterer Referenzstämme unter Verwendung der ermittelten optimalen *Annealing*temperatur durchgeführt. Des Weiteren wurden die entwickelten *Primerpaare* in Multiplex-PCRs auf Stammspezifität überprüft.

Die PCR-Bedingungen für die einzelnen stammspezifischen *Primerpaare* sind jeweils im Ergebnisteil (vgl. Kap. III.2.1, S. 58, Kap. III.2.2, S. 66 und Kap. III.2.3, S. 74) angegeben.

## II.14 Prototyp „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“(Genspeed®)

Um die Anwendbarkeit des während dieser Arbeit entwickelten Assays zur Diagnose von *Clostridium difficile* Stämmen im klinischen Bereich zu erproben, wurde von der AmplexDiagnostics GmbH (Gars Bahnhof am Inn, D) ein Prototyp eines neuartigen Testsystems zur Verfügung gestellt.

Bei dem Genspeed® Testsystem von Greiner Bio-One (Kremsmünster, A) handelt es sich um eine Testplattform, die für die patientennahe Diagnose, das heißt für den *point-of-care* (POC)-Bereich, entwickelt wurde. Bisher ist dieses Testsystem ausschließlich für die Diagnose von Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) auf dem Markt (vgl. Abb. 5). Das Prinzip der Testplattform beruht auf der Amplifikation der jeweiligen Zielsequenz mit spezifischen *Primern* mittels (Multiplex-) PCR und der anschließenden Überprüfung der Spezifität der amplifizierten Fragmente durch reverse Hybridisierung. Die entsprechenden Fangsonden sind in einem Mikrofluidik-Chip immobilisiert. Die PCR Produkte werden während der PCR durch die Verwendung 5'-biotinylierter *Primer* mit einer Biotin-Markierung versehen. Nach der PCR-Amplifikation werden die PCR-Produkte hitzedenaturiert und mit Guanidinthiocyanat (GuSCN) gemischt, um eine spezifische Hybridisierung bei Raumtemperatur zu ermöglichen. Das Gemisch wird durch Kapillarkräfte durch den Kanal des Chips befördert. Bei erfolgreicher Hybridisierung der PCR-Produkte mit mindestens einer der Fangsonden bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat an die entstandenen Hybride. Die Peroxidase spaltet ein nach zwei Waschschrritten zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat, wodurch Lichtblitze erzeugt werden. Die entsprechenden Lichtsignale werden ortsspezifisch vom Genspeed Reader detektiert und quantifiziert (Photostrom in pA).



**Abbildung 5: Genspeed® MRSA Testsystem**

Die Abbildung zeigt (A) den Genspeed® Reader angeschlossen an ein Notebook für die Verwendung der Genspeed® Report Software sowie (B) einen Genspeed® MRSA Testchip.

Quelle: [http://www.gbo.com/documents/980285\\_GENSPPEED\\_MRSA\\_d\\_rev01\\_0812\\_small.pdf](http://www.gbo.com/documents/980285_GENSPPEED_MRSA_d_rev01_0812_small.pdf)<sup>[138]</sup> (A);  
[http://www.youtube.com/watch?v=0\\_jjolZBug](http://www.youtube.com/watch?v=0_jjolZBug)<sup>[139]</sup> (B)

Die für die PCR benötigten Oligonukleotide wurden von der Amplex Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide sind in Tabelle 25 auf Seite 134 im Anhang aufgelistet. Zusätzlich wurde ein *tcdB* spezifisches *Primerpaar* (CTXB-F/-R) und ein *Primerpaar*, das spezifisch an eine Ribotyp 027 differenzierende Gen-Region bindet (FS-F/-R), verwendet. Diese Oligonukleotide finden bereits Anwendung in kommerziellen Produkten (hyplex® ClosTox / ClosTox 027) der Amplex Diagnostics GmbH und können aus diesem Grund hier nicht näher beschrieben werden.

Auf dem Mikrofluidik-Chip sind entsprechende Fangsonden immobilisiert, die bei Hybridisierung spezifisch an die amplifizierte PCR-Produkte binden. Für die Verwendung als Fangsonde müssen drei Oligonukleotide mit identischer Sequenz zusammenhängend synthetisiert werden, um eine erfolgreiche Hybridisierung zu gewährleisten:

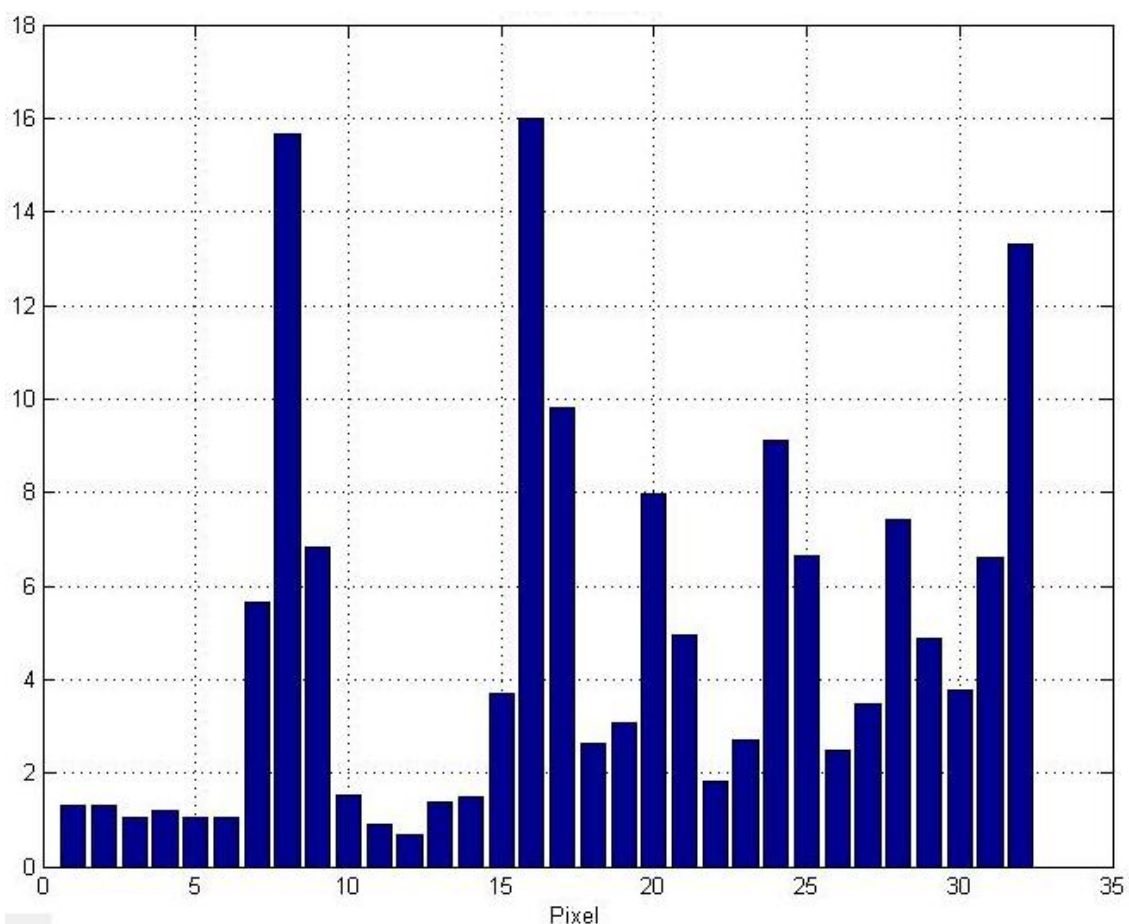
SDE-Pr2:	5'- GTA TTT GTG ATG ATG AAC TGG CAG A-GTA TTT GTG ATG ATG AAC TGG CAG A-3'
F305A:	5'- CTA CGC ACT TTG CGG TGA AGC AAT A-CTA CGC ACT TTG CGG TGA AGC AAT A-3'
F305B:	5'- ATT CTC ATT TCT TGC GGT GCA AGG C-ATT CTC ATT TCT TGC GGT GCA AGG C-3'

Jede der Fangsonden besteht also aus jeweils drei sich wiederholenden, identischen spezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von je 25 Nukleotiden (nt). So ergibt sich für jede Fangsonde eine Gesamtlänge von 75 nt (vgl. auch Tab. 26, S. 139 im Anhang).

Neben diesen in vorliegender Arbeit entwickelten Sonden wurde eine Sonde zum Nachweis des Toxin B-Gens von *C. difficile* (CDTXB) sowie eine Sonde zum Nachweis eines Ribotyp 027 spezifischen Fragments (RT027) auf dem verwendeten Mikrofluidik-Chip immobilisiert. Außerdem befindet sich auf dem Chip jeweils eine Durchflusskontrolle (hybCont) sowie eine Negativkontrolle (negCont) (vgl. Abb. 18, S. 89).

Zunächst wurden PCR-Produkte, die mit nur jeweils einem der *Primerpaare* generiert wurden, eingesetzt, um jede Sonde individuell testen zu können. Anschließend wurde wie in Kapitel II.3.3 (S. 42) beschrieben, eine Multiplex-PCR durchgeführt, wobei verschiedene *Annealing*temperaturen getestet wurden. Je 10 µL der entstandenen PCR-Produkte wurden ohne vorherige Aufreinigung mit 100 µL 2-3 M Guanidinthiocyanat- (GuSCN-) Lösung gemischt, die zudem eine Positivkontrolle als Durchflusskontrolle – das heißt eine „Sonde“ zur Überprüfung des erfolgreichen Transports der Lösungen durch den Mikrofluidik-Chip – enthält. Die Lösungen wurden je 3 min. bei 95 °C im Thermocycler denaturiert und inzwischen ein Chip in das Gerät eingelegt. Für die Q4POC-Hybridisierungen wurden zweimal 10 µL der Probe auf den Chip appliziert und nach 2 min. Hybridisierung wurde ein Tropfen Enzymlösung (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat) mittels Tropffläschchen hinzugegeben und 1 min. inkubiert. Anschließend wurden zweimal je ein Tropfen Waschlösung hinzugefügt und jeweils 1 min. inkubiert. Nach Zugabe eines Tropfens Chemilumineszenz-Substratlösung (Luminata™ HRP Chemiluminescence Detection

Reagent, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) wurde der Deckel des Geräts geschlossen, um die Messung des entstehenden Photostroms, der durch die Spaltung des Substrats erzeugt wird, ortsspezifisch, d.h. individuell für jede Sonde in pA zu ermöglichen. Bei einem Wert über 300 pA wird das Signal als positiv gewertet. Die Messwerte werden durch die Genspeed® Report Software analysiert und automatisch ein Testbericht erstellt. Zusätzlich können die Hybridisierungsereignisse mit Hilfe eines „Live view“, der die Messwerte in Form eines Säulendiagramms in Echtzeit darstellt, verfolgt werden (vgl. Abb. 6). Nach jeder Messung wird zudem eine Graphik erzeugt, welche die entstandenen Lichtblitze graphisch darstellt, wobei die Signalintensität durch die Verwendung verschiedener Farben abgebildet wird (vgl. Abb. 19, S. 93 und Abb. 20, S. 109).



#### Abbildung 6: Beispiel eines „Live view“ für Hybridisierungen mit dem Genspeed® Testsystem

Während der Hybridisierung mit dem Genspeed® Testsystem können die Hybridisierungsereignisse durch Echtzeitmessung des entstehenden Photostroms verfolgt werden.

x-Achse: Pixel = Angabe der Position auf dem Durchfluss-basierten Chip, hier: **Pixel 4**, negCont (Negativkontrolle); **Pixel 8**, CDTXB (Sonde zum Nachweis des Toxin B-Gens); **Pixel 12**, RT27 (Sonde zum Nachweis einer *C. difficile* Ribotyp 027 differenzierenden Region auf dem PaLoc; **Pixel 16**, SDE-Pr2 (Nachweis von mittels Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 amplifizierter PCR-Fragmente; **Pixel 20**, F305A; **Pixel 24**, F305B (Sonden zum Nachweis mittels Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Fragmente); **Pixel 28**, hybCont (Durchflusskontrolle) (vgl. auch Kap. III.5, S. 89)

y-Achse: Messwerte

Bei diesem Beispiel (Multiplex-PCR-Produkt aus genomischer DNS des Ribotyp 001-Stammes *C. difficile* 612) konnten Hybridisierungsereignisse an den Sonden CDTXB (Pixel 8), SDE-Pr2 (Pixel 16), F305A (Pixel 20) und F305B (Pixel 24) detektiert werden (Messwert >3). Auch die Durchflusskontrolle ist positiv.





## III ERGEBNISSE

---

### III.1 Verifikation der Spezies der verwendeten Mikroorganismen

Genomische DNS aller in dieser Arbeit verwendeten *Clostridium difficile* Stämme wurde von der AmplexDiagnostics GmbH (Gars-Bahnhof am Inn, D) zur Verfügung gestellt (vgl. Tab. 1, S. 37). Als Negativkontrolle für die Überprüfung der Spezifität der in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide wurde zusätzlich genomische DNS verschiedener *Enterobacteriaceae*-Stämme sowie genomische DNS von Stämmen der Gattungen *Listeria*, *Campylobacter* und *Enterococcus* verwendet. Genomische DNS dieser Stämme wurde aus Kulturen extrahiert bzw. von Lena Bruder (TUM, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Weihenstephan, D) zur Verfügung gestellt (vgl. Tab. 2, S. 40). Die 16S rRNS-Gene wurden mit den Primern 616v\_alt und 100K (vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang) als Startpunkt für die Polymerase PCR-amplifiziert, aufgereinigt und mit Hilfe der IRD-markierten Primer 97kv, 699RIII, 614v und 609R (vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang) direkt sequenziert (vgl. Kap. II.10, S. 50). Zur Verifikation der entsprechenden Spezies wurden die jeweiligen Sequenzen unter Verwendung des ARB-Software-Pakets<sup>[78]</sup> (<http://www.arb-home.de>) einem bestehenden Alignment der SSU Ref NR (non-redundant) Datenbank der SILVA<sup>®</sup> comprehensive ribosomal RNA database<sup>[98]</sup> (<http://www.arb-silva.de>) hinzugefügt, mit den 16S rRNS-Gensequenzen der entsprechenden Spezies verglichen und alle Spezies als die deklarierten verifiziert.

### III.2 Isolierung stammspezifischer DNS-Fragmente und Entwicklung spezifischer Primerpaare

Unter Verwendung des *Clostridium difficile* DNS-Materials, das von der AmplexDiagnostics GmbH zur Verfügung gestellt wurde (vgl. Tab. 1, S. 37), wurden verschiedene Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierungs-Experimente (MASH-Experimente) durchgeführt (vgl. Kap. III.2.1., S. 58 und Kap. III.2.2, S. 66). Ziel war, potentiell diagnostische DNS-Fragmente zur Differenzierung von Ribotyp 001 und nicht-Ribotyp 001 Stämmen anzureichern. Es stand genomische DNS von 122 toxischen *C. difficile* Stämmen zur Verfügung, die zur Evaluierung der entwickelten Primerpaare verwendet wurde (vgl. Tab. 1, S. 37).

In verschiedenen MASH-Experimenten wurden unterschiedliche Kombinationen von Tester- und Subtraktor-DNS verwendet. DNS von als nicht-Ribotyp 001 deklarierten Stämmen wurde in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und jeweils mit der Tester-DNS eines als Ribotyp 001 deklarierten Stammes hybridisiert. Es wurden jeweils

mehrere Hybridisierungstemperaturen (46-60 °C) ausgetestet. Nach der Hybridisierung wurden potentiell spezifische DNS-Fragmente aus je 10 µL Überstand gefällt, unter Verwendung von *Primer P1* PCR-amplifiziert (vgl. Kap. II.9, S. 47 und Tab. 24, S. 137) und mittels Standard-Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose (w/v) in 1x TAE) aufgetrennt (vgl. Kap. II.9.3, S. 50). Nach Klonierung (vgl. Kap. II.6, S. 44) und Sequenzierung (vgl. Kap. II.10, S. 50) der potentiell stammspezifischen DNS-Fragmente wurde eine BLAST-Analyse (vgl. Kap. II.11, S. 51) durchgeführt und gegebenenfalls potentiell spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation entsprechender Subfragmente in einem stamm-spezifischen PCR-Assay designt (vgl. Kap. II.12, S. 51). Die entwickelten Oligonukleotide wurden zunächst mit einer Auswahl des verfügbaren DNS-Materials hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft (vgl. Kap. II.13, S. 52) und anschließend gegebenenfalls unter Verwendung allen verfügbaren DNS-Materials.

Zusätzlich wurde für die isolierten Fragmente eine vergleichende Sequenzanalyse durchgeführt, um in einem gezielteren Verfahren eventuell weitere *Primerpaare* auf Basis der entsprechenden Fragmente zu designen (vgl. Kap. III.2.1.3, S. 64 und Kap. III.2.2.3, S. 72).

### III.2.1 *Clostridium difficile* 27 als Tester

#### III.2.1.1 Entwicklung von *Primerpaaren* auf Basis von DNS-Fragmenten aus *C. difficile* 27

In Tabelle 8 sind die Hybridisierungsbedingungen aufgeführt, die bei den Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierungs-Experimenten mit *C. difficile* 27 als Tester-Stamm ausgetestet wurden.

**Tabelle 8: Hybridisierungsbedingungen der MASH-Experimente mit DNS des *C. difficile* Stammes 27 als Tester**

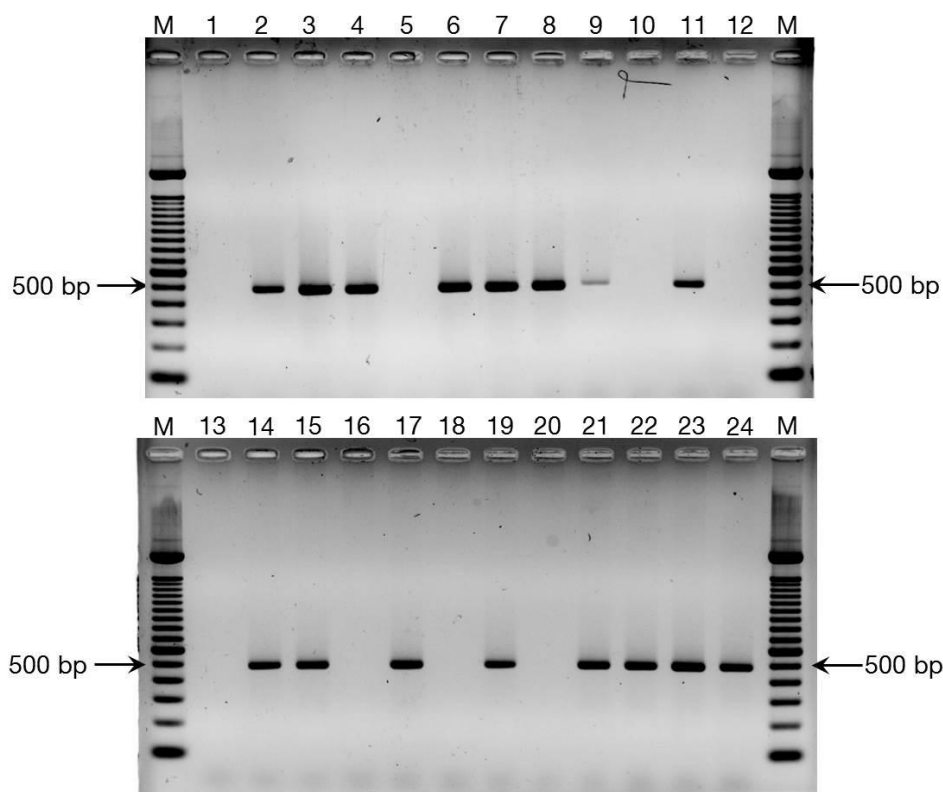
als Subtraktor verwendetes DNS-Material			
Hybridisierungs-Runde 1		Hybridisierungs-Runde 2	
<i>C. difficile</i> 101	RT 027 <sup>◇</sup>	<i>C. difficile</i> 1	RT unbekannt
<i>C. difficile</i> 102	RT 027 <sup>◇</sup>	<i>C. difficile</i> 2	RT 106 <sup>◇</sup>
<i>C. difficile</i> 103	RT 027 <sup>◇</sup>	<i>C. difficile</i> 4	RT 106 <sup>◇</sup>
<i>C. difficile</i> 104	RT 027 <sup>◇</sup>	<i>C. difficile</i> 16	RT unbekannt
<i>C. difficile</i> 105	RT 027 <sup>◇</sup>	<i>C. difficile</i> 41	RT unbekannt
		<i>C. difficile</i> 44	RT unbekannt
		<i>C. difficile</i> 45	RT unbekannt
Hybridisierungsbedingungen			
Hybridisierungstemperatur	Hybridisierungsdauer	Mikrotiterplatte	
45 °C/56 °C/60 °C	2 h	Nunc MaxiSorp	

In jeder Hybridisierungsrunde wurden Formamid-Konzentrationen von 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 % im Hybridisierungspuffer eingesetzt (vgl. Tab. 7, S. 48 und Abb. 4, S. 48). In verschiedenen MASH-Experimenten wurden jeweils unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen ausgetestet.

RT: Ribotyp

Bei den mit <sup>◇</sup> gekennzeichneten Stämmen ist die Ribotyp-Zuordnung nicht eindeutig geklärt.

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 56 °C und 0 % Formamid im Hybridisierungspuffer konnten potentiell spezifische Fragmente für *C. difficile* Stamm 27 isoliert werden. Auf Basis der Sequenzdaten eines Fragments – C\_diff\_27\_11 (1504 Basenpaare) (vgl. Abb. 8, S. 65) – wurden verschiedene *Primerpaare* (CDiff\_27\_11\_F1/R1 und \_F2/R2, Generierung eines PCR-Produkts von 484 bzw. 617 bp, vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang) entwickelt, um die entsprechenden Subfragmente hinsichtlich Stammspezifität mittels PCR zu überprüfen. Die entwickelten *Primerpaare* wurden zunächst in Gradienten-PCRs (vgl. Kap. II.3.4, S. 43) (2 min. Elongation, 35 Zyklen) mit genomischer DNS von *C. difficile* 27 als Matrize eingesetzt, um die maximale *Annealing*temperatur zu ermitteln. Für beide *Primerpaare* wurde eine maximal mögliche *Annealing*temperatur von 63 °C ermittelt.



**Abbildung 7: Geldokumentation einer PCR mit dem *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 (58 °C *Annealing*temperatur)**

1,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M**, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* 104 (Ribotyp (RT) unbekannt); **2**, *C. difficile* 105 (RT unbekannt); **3**, *C. difficile* 16 (RT unbekannt); **4**, *C. difficile* 27 (RT unbekannt); **5**, *C. difficile* RK 305 (RT 001); **6**, *C. difficile* RK 311 (RT 001); **7**, *C. difficile* RK 365 (RT 001); **8**, *C. difficile* RK 379 (RT 001); **9**, *C. difficile* TGC 001-1 (RT 001); **10**, *C. difficile* TGC 001-2 (RT 001); **11**, *C. difficile* 163 (RT 014); **12**, *C. difficile* 422 (RT 001); **13**, *C. difficile* 433 (RT 001); **14**, *C. difficile* 435 (RT 017); **15**, *C. difficile* 448 (RT 078); **16**, *C. difficile* 450 (RT 078); **17**, *C. difficile* 472 ((RT 001); **18**, *C. difficile* 604 (RT 017); **19**, *C. difficile* 612 (RT 001); **20**, *C. difficile* 694 (RT 078); **21**, *C. difficile* 754 (RT 078); **22**, *C. difficile* 760 (RT 078); **23**, *C. difficile* 836 (RT 078); **24**, *C. difficile* 855 (RT 078).

Durch die Geldokumentation wird deutlich, dass Fragmente spezifischer Größe (484 bp) aus genomischer DNS der Stämme 27 und 16 sowie der Stämme RK 311, RK 365, RK 379, TGC 001-1, 472 und 612 (als RT 001 deklariert), des Stammes 163 (als RT 014 deklariert), 105 (des als RT 027 deklariert), des Stammes 435 (als RT 017 deklariert) und der Stämme 448, 754, 760, 836 und 855 (als RT 078 deklariert) amplifiziert werden konnten. Außerdem wurden Fragmente spezifischer Größe aus genomischer DNS der Stämme Ty 859 und Landon-1 (RT 001), 521 (RT 014) sowie 394, 398, 240 und 906 amplifiziert (RT 078) (Daten nicht gezeigt).

Unter Verwendung des *Primer*paares CDiff\_27\_11\_F2/R2 konnte ausschließlich aus genomischer DNS des Stammes *C. difficile* 16 ein Fragment von 617 bp Länge amplifiziert werden. Dieses *Primer*paar wurde demnach nicht weiter verwendet.

Mit *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 wurden verschiedene PCRs mit unterschiedlichen *Annealing*temperaturen (55 °C, 58 °C, 59°C und 63 °C) durchgeführt (vgl. Tab. 10, S. 62). Dabei wurde jeweils genomische DNS einer Auswahl von *C. difficile* Stämmen als Matrize verwendet. Zunächst wurde die Spezifität des *Primer*paares unter Verwendung genomischer DNS einiger *C. difficile* Stämme mit einer *Annealing*temperatur von 58 °C ausgetestet.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 bei einer *Annealing*temperatur von 58 °C**

Isolate, aus deren genomischer DNS Fragmente spezifischer Größe (484 bp) amplifiziert wurden	Ribotyp 001 Stämme, aus deren genomischer DNS kein Amplifikat gebildet wurde
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>	<i>C. difficile</i> 10
<i>C. difficile</i> RK 311	<i>C. difficile</i> RK 305
<i>C. difficile</i> RK 365	<i>C. difficile</i> TGC 001-2
<i>C. difficile</i> RK 379	<i>C. difficile</i> 220
<i>C. difficile</i> Ty 859	<i>C. difficile</i> 268
<i>C. difficile</i> Landon-001	<i>C. difficile</i> 351
<i>C. difficile</i> TGC 001-1	<i>C. difficile</i> 422
<i>C. difficile</i> 472	<i>C. difficile</i> 433
<i>C. difficile</i> 612	<i>C. difficile</i> 903
<i>C. difficile</i> 27	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>	
<i>C. difficile</i> 163	
<i>C. difficile</i> 521	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 017</b>	
<i>C. difficile</i> 435	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 078</b>	
<i>C. difficile</i> 240	
<i>C. difficile</i> 448	
<i>C. difficile</i> 754	
<i>C. difficile</i> 760	
<i>C. difficile</i> 836	
<i>C. difficile</i> 855	
<i>C. difficile</i> 906	
<b><i>Clostridium difficile</i> unbekanntem Ribotyp</b>	
<i>C. difficile</i> 105	
<i>C. difficile</i> 16	

Die Tabelle bietet eine Übersicht der *Clostridium difficile* Stämme, aus deren genomischer DNS ein Fragment spezifischer Größe (484 bp) mittels PCR unter Verwendung des *Primer*paares CDiff\_27\_11\_F1/R1 bei einer *Annealing*temperatur von 58 °C amplifiziert wurde, sowie der Ribotyp 001-Stämme, aus deren genomischer DNS kein Amplifikat gebildet werden konnte.

Während der PCR mit einer *Annealing*temperatur von 58 °C (1 min. Elongation, 35 Zyklen) konnten Fragmente mit 484 bp Länge aus genomischer DNS der Stämme 27 und 16

amplifiziert werden, wie auch aus genomischer DNS von acht (RK 311, RK 365, RK 379, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 472 und 612) der 16 übrigen als Ribotyp 001 deklarierten *C. difficile* Isolate. Außerdem wurde je ein Fragment von 484 bp Länge aus genomischer DNS einiger als Ribotyp 014, 017 und 078 deklarierten *C. difficile* Stämme amplifiziert (vgl. Abb. 7, S. 59, Tab. 9, S. 60 und Tab. 10, S. 62).

### III.2.1.2 Diagnostische PCR mit *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1

Zur Überprüfung der Stammspezifität des entwickelten *Primerpaares* CDiff\_27\_11\_F1/R1 wurden mehrere PCRs mit unterschiedlichen *Annealing*temperaturen (55-63 °C) durchgeführt. Tabelle 10 (S. 62) bietet eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit *Primerpaar* CDiff\_27\_11-F1/R1. Die Ergebnisse der PCR mit einer *Annealing*temperatur von 59 °C stimmen mit den Ergebnissen der PCR mit einer *Annealing*temperatur von 58 °C überein. Eine weitere Erhöhung der *Annealing*temperatur auf 63 °C führte zu einer geringfügigen Verbesserung der Spezifität. Die Verwendung einer *Annealing*temperatur von 63 °C führte jedoch ebenso zu einer Verringerung der Sensitivität. Es konnte aus genomischer DNS der Ribotyp 001-Stämme RK 365, Landon-1 und TGC 001-1, der Ribotyp 014-Stämme 423 und 475 sowie aus genomischer DNS der Stämme 16 und 27 ein Fragment spezifischer Größe amplifiziert werden, doch nicht mehr aus genomischer DNS der Ribotyp 001-Stämme RK 379 und Ty 859. Aus genomischer DNS der übrigen Ribotyp 001-Stämme sowie der anderen Referenzstämme wurde ebenfalls kein Amplifikat gebildet.

Das *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 sollte in Kombination mit weiteren im Laufe dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotiden in Multiplex-PCRs verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die Spezifität zusätzlich bei Verwendung einer *Annealing*temperatur von 55 °C mit genomischer DNS einiger *C. difficile* Stämme überprüft. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der PCR mit einer *Annealing*temperatur von 58 °C überein. Genomische DNS eines Großteils der Stämme wurde bei einer *Annealing*temperatur von 55 °C ausschließlich in der Multiplex-PCR verwendet (vgl. Tab. 10, S. 62 und Kap. III.4, S. 82). Dennoch sind diese in Tabelle 10 (S. 62) mit aufgeführt, um eine Übersicht über die Ergebnisse aller durchgeführten PCRs mit diesem *Primerpaar* zu bieten.

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 bei unterschiedlichen *Annealing*temperaturen**

Probe	Amplifikat bei <i>Annealing</i> temperatur [° C]				Probe	Amplifikat bei <i>Annealing</i> temperatur [° C]			
	55	58	59	63		55	58	59	63
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>					<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 012</b>				
<i>C. difficile</i> RK 305	-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 390*	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> RK 311	+	+	+	-	<i>C. difficile</i> 425*	-*	/	-	-
<i>C. difficile</i> RK 365	+	+	+	+	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>				
<i>C. difficile</i> RK 379	+	+	+	-	<i>C. difficile</i> 163	+	+	-	-
<i>C. difficile</i> Ty 859	+	+	+	-	<i>C. difficile</i> 393	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> Landon-1	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 394	+/-	/	/	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-1	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 398	+/-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-2	-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 400	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 220	-*	-	-	-	<i>C. difficile</i> 418	+/-	/	/	-
<i>C. difficile</i> 268	-*	-	-	/	<i>C. difficile</i> 421	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 351	-*	-	-	-	<i>C. difficile</i> 423	-*	/	/	+
<i>C. difficile</i> 422	-*	-	-	-	<i>C. difficile</i> 475	-	/	/	+
<i>C. difficile</i> 433	-*	-	-	/	<i>C. difficile</i> 521	+	+	-	-
<i>C. difficile</i> 472	+*	+	+	+	<i>C. difficile</i> 523	+*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 612	+*	+	+	/	<i>C. difficile</i> 527	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 903	-*	-	-	/	<i>C. difficile</i> 558	-*	/	/	/
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 002</b>					<i>C. difficile</i> 628	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 384	-*	/	/	/	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 015</b>				
<i>C. difficile</i> 416	-*	/	/	/	<i>C. difficile</i> 164	-*	/	-	-
<i>C. difficile</i> 420	-*	/	/	-	<i>C. difficile</i> 412	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 480	-*	/	/	-	<i>C. difficile</i> 698	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 526	-*	/	/	-	<i>C. difficile</i> 808	-*	/	-	-
<i>C. difficile</i> 554	-*	/	/	/	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 017</b>				
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 005</b>					<i>C. difficile</i> 269	-*	-	-	/
<i>C. difficile</i> 436	-*	/	/	/	<i>C. difficile</i> 435	+*	+	+	+
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 006</b>					<i>C. difficile</i> 604	-*	-	-	/
<i>C. difficile</i> 201	-*	/	/	-	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 023</b>				
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 010</b>					<i>C. difficile</i> 34	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 213	-*	/	/	-	<i>C. difficile</i> 181	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 234	-*	/	/	-	<i>C. difficile</i> 403	-*	/	/	/
<i>C. difficile</i> 391	-*	/	/	/	<i>C. difficile</i> 541	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 399	-*	/	/	/					
<i>C. difficile</i> 614	-*	/	/	-					

Fortsetzung nächste Seite

- , negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;  
 + , positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;  
 +/- , bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 / , mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden *Annealing*temperatur durchgeführt.  
 Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (Fortsetzung von Seite 62)**

Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]				Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]			
	55	58	59	63		55	58	59	63
<b>Clostridium difficile Ribotyp 027</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 078</b>				
C. difficile 2001	-*	/	/	-	C. difficile 56	-*	/	/	/
C. difficile 2003	-*	/	/	/	C. difficile 183	-*	/	/	/
C. difficile 552 (Variation von 027)	-	-	-	-	C. difficile 196	-*	-	-	/
C. difficile 2002 (Variation von 027)	-*	-	/	-	C. difficile 200	-*	-	-	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 029</b>					C. difficile 240	+/-*	+	+	+
C. difficile 419	-*	/	/	-	C. difficile 243	-*	/	-	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 033</b>					C. difficile 372	-*	-	-	/
C. difficile 581	-*	/	/	/	C. difficile 448	+/-*	+	+	+
<b>Clostridium difficile Ribotyp 035</b>					C. difficile 450	-*	-	-	/
C. difficile 413	-*	/	/	/	C. difficile 694	-*	-	-	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 045</b>					C. difficile 754	+	+	+	+
C. difficile 72	-*	/	/	/	C. difficile 760	+	+	+	+
C. difficile 106	-*	/	/	/	C. difficile 836	+	+	+	+
C. difficile 119	-*	/	/	/	C. difficile 855	+	+	+	+
C. difficile 476	-*	/	/	-	C. difficile 906	+	+	+	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 046</b>					C. difficile 1018	-*	-	-	/
C. difficile 388	-*	/	/	/	<b>Clostridium difficile Ribotyp 081</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 049</b>					C. difficile 477	-*	/	/	-
C. difficile 387	-*	/	/	/	C. difficile 522	-*	/	/	-
C. difficile 478	-*	/	/	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 087</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 064</b>					C. difficile 160	-*	/	/	-
C. difficile 395	-	/	/	-	C. difficile 427	-*	/	/	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 070</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 090</b>				
C. difficile 385	-*	/	/	/	C. difficile 434	-*	/	/	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 072</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 094</b>				
C. difficile 328	-*	/	/	-	C. difficile 396	-*	/	/	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 103</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 135</b>				
C. difficile 161	-*	/	/	-	C. difficile 702	-*	/	/	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 137</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 149</b>				
C. difficile 424	-	/	/	-	C. difficile 236	-*	/	/	/

Fortsetzung nächste Seite

- , negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;  
 + , positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;  
 +/- , bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 / , mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden Annealingtemperatur durchgeführt.  
 Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (Fortsetzung von Seite 63)**

Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]				Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]			
	55	58	59	63		55	58	59	63
<b><i>Clostridium difficile</i> Stämme unbekanntener Ribotypen</b>									
<i>C. difficile</i> 1	-	/	-	-	<i>C. difficile</i> 103	-	/	/	-
<i>C. difficile</i> 2	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 104	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 4	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 105	+/-	+	/	-
<i>C. difficile</i> 10	-	/	-	-	<i>C. difficile</i> 162	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 16	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 221	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 27	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 262	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 41	+/-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 392	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 44	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 397	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 45	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 479	-*	/	/	-
<i>C. difficile</i> 101	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 524	-	/	-	-
<i>C. difficile</i> 102	-	/	/	-	<i>C. difficile</i> 700	-*	/	/	/

-, negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;

+, positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet;

+/-, bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (484 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;

/, mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden *Annealingtemperatur* durchgeführt.

Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

Durch die diagnostische PCR mit *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 und einer *Annealingtemperatur* von maximal 59 °C wurden also acht der 16 *C. difficile* Ribotyp 001-Stämme sowie einige Stämme der Ribotypen 014, 017 und 078 erfasst. Mit *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 ist somit kein ausschließlicher und umfassender Nachweis von *C. difficile* Ribotyp 001 möglich. Aus diesem Grund wurde durch weiterführende *in silico*-Analysen überprüft, ob auf Basis des Fragments C\_diff\_27\_11 *Primerpaare* entwickelt werden können, die spezifisch für Ribotyp 001 sind (vgl. Kap. III.2.1.3).

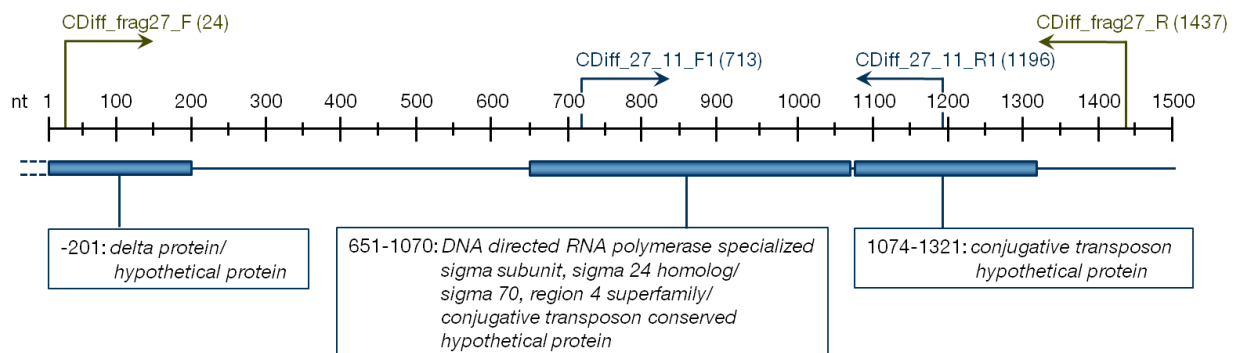
### III.2.1.3 Vergleichende Sequenzanalyse für Fragment C\_diff\_27\_11

Durch die Verwendung des *Primerpaares* CDiff\_27\_11\_F1/R1 konnten PCR-Produkte von 484 bp Länge aus genomischer DNS von acht der 16 als Ribotyp 001 deklarierten Stämme amplifiziert werden. Außerdem wurde je ein Amplifikat von 484 bp Länge aus genomischer DNS einiger als Ribotyp 014, 017 und 078 deklarierten Stämme gebildet. Die Verwendung von ARB-Sequenzdatenbanken ermöglicht ein im Vergleich zur Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung gezielteres *in silico* Vorgehen, um eventuell stammspezifische Oligonukleotide zu designen, mit deren Hilfe *C. difficile* Ribotyp 001 verlässlich und spezifisch nachgewiesen werden könnte. Ferner lässt sich vermutlich davon ausgehen, dass sich Genomabschnitte, die in mehreren Stämmen und Spezies vorhanden sind, im Laufe der Evolution etabliert haben und wohlmöglich stabil und erhalten bleiben.



Somit wurden – auch vor dem Hintergrund des hoch variablen Genoms von *Clostridium difficile*, das sich stetig durch z.B. horizontalen Gentransfer konjugativer Transposons oder homologe Rekombination chromosomaler Bereiche verändert<sup>[54]</sup> – Sequenzvergleiche der mittels Ausschlusshybridisierung isolierten Fragmente mit verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen sowie weiteren in öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen auch anderer Spezies durchgeführt. Unter Verwendung der verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen und der jeweils zusätzlich gefundenen ähnlichen Sequenzen wurden ARB-Datenbanken und sowohl entsprechende Nukleinsäure-Alignments als auch Aminosäure-Alignments erstellt.

Für das Fragment C\_diff\_27\_11 zeigte sich Ähnlichkeit zu als „DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma 24 homolog“ und als „conjugative transposon conserved hypothetical protein“ annotierten Genen. Außerdem zeigten sich Ähnlichkeiten zu nicht annotierten *C. difficile* Genomsequenzen. Durch weiterführende Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit in verschiedenen öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen wurde zusätzlich Ähnlichkeit zu als „delta Protein/hypothetical protein“ annotierten Sequenzen festgestellt. Abbildung 8 zeigt die Anordnung der identifizierten Gene bzw. Genfragmente bezüglich des 1504 bp langen Fragments C\_diff\_27\_11.



**Abbildung 8: Genanordnung des Fragments C\_diff\_27\_11**

Die Grafik zeigt die Gene, zu denen bei Vergleichen der Nukleinsäuresequenz bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Fragments C\_diff\_27\_11 mit in öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen sowie *C. difficile* Genomsequenzen Ähnlichkeiten gefunden wurden. Außerdem ist die Länge und Anordnung der Gene bezüglich des 1504 bp langen Fragments sowie die Bindepositionen der auf Basis des Fragments C\_diff\_27\_11 entwickelten *Primer* angezeigt. Unterbrochene Genabschnitte sind gestrichelt dargestellt.

Basierend auf den Annotationsdaten und unter Verwendung von für die kodierenden Abschnitte erstellten Referenz-ARB-Datenbanken wurde ein *Primer*paar (mit Zielsequenzen in ‚konservierteren‘ Bereichen) entwickelt (CDiff\_frag27\_F/R, vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang), um mit Hilfe dessen entsprechende, die diagnostische Region beinhaltende DNS-Fragmente zusätzlich aus genomischer DNS der übrigen Stämme amplifizieren und sequenzieren zu können. Somit wäre für weitere Entwicklungen ein im Vergleich zum Ausschlusshybridisierungs-Verfahren gezielteres *in silico* Vorgehen möglich.

Unter Verwendung des *Primer*paares CDiff\_frag27\_F/R wurden Fragmente, welche die diagnostische Region enthalten, aus genomischer DNS der Stämme RK 311, RK 365, 472 und 612 (Ribotyp 001), 435 (RT 017), 240, 754, 760, 836, 855 und 906 (RT 078), 4, 10, 16, 27, 41, 44, 45 und 105 (RT unbekannt) amplifiziert und nach Klonierung in den pCR<sup>®</sup> 2.1 Vektor sequenziert. Die entsprechenden Partialsequenzen wurden in die erstellten Referenz-ARB-Datenbanken importiert und den Alignments hinzugefügt. Es war auch *in silico* nicht möglich, auf das Fragment C\_diff\_27\_11 abzielende ausschließlich Ribotyp 001 erfassende spezifische *Primer* bzw. Sonden zu entwickeln. Zudem deuten widersprüchliche Ergebnisse von PCR und Sequenzierung darauf hin, dass einige der zur Verfügung stehenden Isolate eventuell nicht korrekt ribotypisiert bzw. verunreinigt sind (vgl. auch Kap. III.3, S. 78). Eine aktuelle ARB-Datenbank, die die entsprechenden Sequenzen enthält ist am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TUM in Weihenstephan bei Dr. Wolfgang Ludwig hinterlegt.

### **III.2.2 *Clostridium difficile* RK 305 als Tester**

#### **III.2.2.1 Entwicklung von *Primer*paaren auf Basis von DNS-Fragmenten aus *C. difficile* RK 305**

Auf Basis des mittels MASH isolierten Fragments C\_diff\_27\_11 war es nicht möglich, einen PCR-basierten ausschließlichen Nachweis für *C. difficile* Ribotyp 001 zu entwickeln. Das entwickelte *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 erfasst neben einigen Ribotyp 001-Stämmen zusätzlich Stämme der Ribotypen 014, 017 und 078. Auch in einem im Vergleich zur MASH gezielteren *in silico*-Verfahren konnten keine weiteren, spezifischeren Oligonukleotide entwickelt werden. Zudem konnten die sich ergebenden Diskrepanzen bezüglich der Ribotyp Zuordnung einiger Stämme nicht abschließend geklärt werden (vgl. auch Kap. III.3, S. 78). Auf Grund dessen wurden weitere MASH-Experimente durchgeführt. Bei der diagnostischen PCR mit *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 konnte aus genomischer DNS aller vom Robert Koch Institut in Wernigerode als Ribotyp 001 typisierten Stämme mit Ausnahme des Stammes RK 305 ein Amplifikat von 484 bp Länge gebildet werden (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61). Die weiteren MASH Experimente wurden deshalb mit genomischer DNS des Stammes *C. difficile* RK 305 als Tester durchgeführt.

Genomische DNS verschiedener als nicht-Ribotyp 001 deklarierter Stämme wurde als Subtraktor-DNS immobilisiert und DNS des Stammes *C. difficile* RK 305 (Ribotyp 001) als Tester-DNS für die Hybridisierung eingesetzt (vgl. Tab. 11, S. 67). Es sollten weitere Fragmente isoliert werden, auf Basis derer die Entwicklung von *Primer*paaren für die Amplifikation spezifischer PCR-Produkte aus genomischer DNS möglichst aller Ribotyp 001-Stämme möglich wäre, nicht jedoch aus genomischer DNS der als Ribotyp 014, 017 und 078 typisierten Stämme sowie der anderen nicht-Ribotyp 001-Stämme.

In Tabelle 11 sind die verschiedenen getesteten Hybridisierungsbedingungen aufgeführt, die bei den MASH-Experimenten mit *C. difficile* RK 305 als Tester-Stamm verwendet wurden.

**Tabelle 11: Hybridisierungsbedingungen der MASH-Experimente mit DNS des *C. difficile* Stammes RK 305 als Tester**

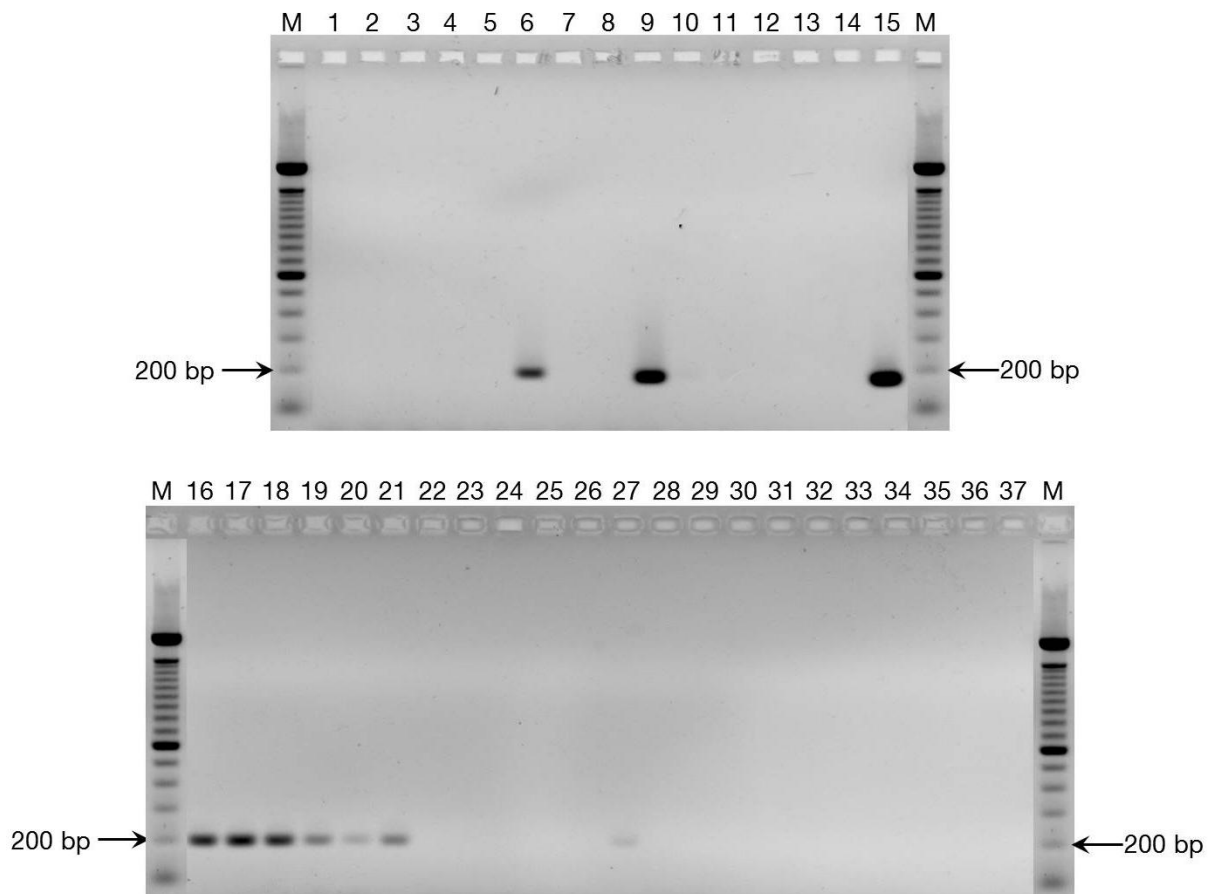
als Subtraktor verwendetes DNS-Material					
Hybridisierungs-Runde 1		Hybridisierungs-Runde 2		Hybridisierungs-Runde 3	
<i>C. difficile</i> 160	RT 087	<i>C. difficile</i> 393	RT 014	<i>C. difficile</i> 418	RT 014
<i>C. difficile</i> 161	RT 103	<i>C. difficile</i> 394	RT 014	<i>C. difficile</i> 419	RT 029
<i>C. difficile</i> 162	RT unbekannt	<i>C. difficile</i> 395	RT 064	<i>C. difficile</i> 420	RT 002
<i>C. difficile</i> 163	RT 014	<i>C. difficile</i> 396	RT 094	<i>C. difficile</i> 421	RT 014
<i>C. difficile</i> 164	RT 015	<i>C. difficile</i> 397	RT unbekannt	<i>C. difficile</i> 433	RT 001
<i>C. difficile</i> 392	RT unbekannt	<i>C. difficile</i> 398	RT 014	<i>C. difficile</i> 423	RT 014
Hybridisierungsbedingungen					
Hybridisierungstemperatur		Hybridisierungsdauer		Mikrotiterplatte	
45 °C/50 °C		2 h		Nunc ImmunoModule	

In jeder Hybridisierungsrunde wurden Formamid-Konzentrationen von 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 % im Hybridisierungspuffer eingesetzt (vgl. Tab. 7, S. 48 und Abb. 4, S. 48). In verschiedenen MASH-Experimenten wurden jeweils unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen ausgetestet.

RT: Ribotyp

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C und 15 % Formamid im Hybridisierungspuffer konnten potentiell spezifische Fragmente für *C. difficile* RK 305 isoliert werden. Auf Basis der Sequenzdaten eines dieser Fragmente – C\_diff\_RK305\_1 (656 bp) – wurden verschiedene *Primer* entwickelt (vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang). Für das *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 (Generierung eines PCR-Produkts von 199 bp Länge) wurde mittels Gradienten-PCR (vgl. Kap. II.3.4, S. 43) mit genomischer DNS von *C. difficile* RK 305 als Matrize eine optimale *Annealing*temperatur von 55 °C und eine maximal mögliche *Annealing*temperatur von 62 °C ermittelt.

Bei PCRs mit einer *Annealing*temperatur von 55 °C (1 min. Elongation, 30 Zyklen) wurde je ein Fragment spezifischer Länge (199 bp) aus genomischer DNS von zwölf der 16 Ribotyp 001-Stämme (RK 305, RK 311, RK 365, RK 379, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 268, 351, 433, 612 und 903) amplifiziert. Zudem wurde je ein Fragment von 199 bp Länge aus genomischer DNS der als Ribotyp 015 typisierten Stämme 164, 412, 698 und 808 sowie aus genomischer DNS der Stämme 1 und 10 amplifiziert (vgl. Abb. 9, S. 68, Tab. 12, S. 69 und Tab. 13, S. 70).



**Abbildung 9: Geldokumentation einer diagnostischen PCR mit dem Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1 (55 °C Annealingtemperatur)**

2 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M**, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* 101 (Ribotyp (RT) unbekannt); **2**, *C. difficile* 102 (RT unbekannt); **3**, *C. difficile* 103 (RT unbekannt); **4**, *C. difficile* 104 (RT unbekannt); **5**, *C. difficile* 105 (RT unbekannt); **6**, *C. difficile* 1 (RT unbekannt); **7**, *C. difficile* 2 (RT unbekannt); **8**, *C. difficile* 4 (RT unbekannt); **9**, *C. difficile* 10 (RT unbekannt); **10**, *C. difficile* 16 (RT unbekannt); **11**, *C. difficile* 27 (RT unbekannt); **12**, *C. difficile* 41 (RT unbekannt); **13**, *C. difficile* 44 (RT unbekannt); **14**, *C. difficile* 45 (RT unbekannt); **15**, *C. difficile* RK 305 (RT 001); **16**, *C. difficile* RK 311 (RT 001); **17**, *C. difficile* RK 365 (RT 001); **18**, *C. difficile* RK 379 (RT 001); **19**, *C. difficile* Ty 859 (RT 001); **20**, *C. difficile* Landon-1 (RT 001); **21**, *C. difficile* TGC 001-1 (RT 001); **22**, *C. difficile* TGC 001-2 (RT 001); **23**, 160 (RT 087); **24**, *C. difficile* 161 (RT 103); **25**, *C. difficile* 162 (RT unbekannt); **26**, *C. difficile* 163 (RT 014); **27**, *C. difficile* 164 (RT 015); **28**, 392 (RT unbekannt); **29**, *C. difficile* 393 (RT 014); **30**, *C. difficile* 394 (RT 014); **31**, *C. difficile* 395 (RT 064); **32**, *C. difficile* 396 (RT 094); **33**, *C. difficile* 397 (RT unbekannt); **34**, *C. difficile* 398 (RT 014); **35**, *C. difficile* 418 (RT 014); **36**, *C. difficile* 419 (RT 029).

Die Geldokumentation zeigt, dass Fragmente spezifischer Größe (199 bp) aus genomischer DNS der als Ribotyp 001 deklarierten Stämme RK 305, RK 311, RK 365, RK 379, Ty 859, Landon-1 und TGC 001-1, der Stämme 1 und 10 sowie des als Ribotyp 015 deklarierten Stammes 164 amplifiziert werden konnten, nicht jedoch aus genomischer DNS des als Ribotyp 001 deklarierten Stammes TGC 001-2 sowie aus genomischer DNS der anderen Referenzstämme. Außerdem wurden Fragmente spezifischer Größe aus genomischer DNS der Stämme 351, 268, 433, 612 und 903 (RT 001), 425 (RT 012) sowie 808 (RT 015) amplifiziert (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit *Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1* bei einer *Annealingtemperatur* von 55 °C**

Isolate aus deren genomischer DNS Fragmente spezifischer Größe (199 bp) amplifiziert wurden	Ribotyp 001 Stämme aus deren genomischer DNS kein Amplifikat gebildet wurde
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>	<i>C. difficile</i> TGC 001-2
<i>C. difficile</i> RK 305	<i>C. difficile</i> 220
<i>C. difficile</i> RK 311	<i>C. difficile</i> 422
<i>C. difficile</i> RK 365	<i>C. difficile</i> 472*
<i>C. difficile</i> RK 379	
<i>C. difficile</i> Ty 859	
<i>C. difficile</i> Landon -001	
<i>C. difficile</i> TGC 001-1	
<i>C. difficile</i> 268*	
<i>C. difficile</i> 351	
<i>C. difficile</i> 433*	
<i>C. difficile</i> 612*	
<i>C. difficile</i> 903*	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 015</b>	
<i>C. difficile</i> 164	
<i>C. difficile</i> 412*	
<i>C. difficile</i> 698*	
<i>C. difficile</i> 808	
<b><i>Clostridium difficile</i> Stämme unbekanntem Ribotyps</b>	
<i>C. difficile</i> 1	
<i>C. difficile</i> 10	

Die Tabelle bietet eine Übersicht der *Clostridium difficile* Stämme, aus deren genomischer DNS ein Fragment spezifischer Größe (199 bp) mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares CDiff\_RK305\_F2/R1 bei einer *Annealingtemperatur* von 55 °C amplifiziert wurde.

Genomische DNS der mit \* gekennzeichneten Stämme wurde für die PCR mit *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 bei einer *Annealingtemperatur* von 55 °C ausschließlich in Multiplex PCRs als Matrize eingesetzt (vgl. Kap. III.4, S. 82).

Jeweils eine Auswahl genomischer DNS verschiedener Ribotypen wurde für diagnostische PCRs mit diesem *Primerpaar* unter Verwendung unterschiedlicher *Annealingtemperaturen* (55 °C und 59 °C) eingesetzt (vgl. Tab. 13, S. 70).

### III.2.2.2 Diagnostische PCR mit *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller PCRs mit *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 ist in Tabelle 13 (S. 70) gegeben. Bis auf wenige Ausnahmen stimmen die Ergebnisse der durchgeführten PCRs bei unterschiedlichen *Annealingtemperaturen* überein. Die Spezifität konnte durch eine Erhöhung der *Annealingtemperatur* nicht verbessert werden. Es wurden bei einer *Annealingtemperatur* von 59 °C – im Gegensatz zu einer *Annealingtemperatur* von 55 °C – jedoch keine Amplifikate aus genomischer DNS der Ribotyp 001-Stämme Landon-1 und TGC 001-1 mehr gebildet.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen**

Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]		Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]	
	55	59		55	59
<b>Clostridium difficile Ribotyp 001</b>			<b>Clostridium difficile Ribotyp 012</b>		
<i>C. difficile</i> RK 305	+	+	<i>C. difficile</i> 390	-*	/
<i>C. difficile</i> RK 311	+	+	<i>C. difficile</i> 425	-	-
<i>C. difficile</i> RK 365	+	+	<b>Clostridium difficile Ribotyp 014</b>		
<i>C. difficile</i> RK 379	+	+	<i>C. difficile</i> 163	-	-
<i>C. difficile</i> Ty 859	+	+	<i>C. difficile</i> 393	-	-
<i>C. difficile</i> Landon-1	+	-	<i>C. difficile</i> 394	-	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-1	+	-	<i>C. difficile</i> 398	-	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-2	-	-	<i>C. difficile</i> 400	-*	-
<i>C. difficile</i> 220	-	-	<i>C. difficile</i> 418	-	-
<i>C. difficile</i> 268	+*	+	<i>C. difficile</i> 421	-	-
<i>C. difficile</i> 351	+	+	<i>C. difficile</i> 423	-	-
<i>C. difficile</i> 422	-	-	<i>C. difficile</i> 475	-	-
<i>C. difficile</i> 433	+*	+	<i>C. difficile</i> 521	-	-
<i>C. difficile</i> 472	-*	-	<i>C. difficile</i> 523	-	-
<i>C. difficile</i> 612	+*	+	<i>C. difficile</i> 527	-	-
<i>C. difficile</i> 903	+/-*	+	<i>C. difficile</i> 558	-*	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 002</b>			<i>C. difficile</i> 628	-	-
<i>C. difficile</i> 384	-*	/	<b>Clostridium difficile Ribotyp 015</b>		
<i>C. difficile</i> 416	-*	/	<i>C. difficile</i> 164	+	+
<i>C. difficile</i> 420	-	-	<i>C. difficile</i> 412	+*	/
<i>C. difficile</i> 480	-	-	<i>C. difficile</i> 698	+*	/
<i>C. difficile</i> 526	-	-	<i>C. difficile</i> 808	+	+
<i>C. difficile</i> 554	-*	/	<b>Clostridium difficile Ribotyp 017</b>		
<b>Clostridium difficile Ribotyp 005</b>			<i>C. difficile</i> 269	-*	-
<i>C. difficile</i> 436	-*	/	<i>C. difficile</i> 435	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 006</b>			<i>C. difficile</i> 604	-*	-
<i>C. difficile</i> 201	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 023</b>		
<b>Clostridium difficile Ribotyp 010</b>			<i>C. difficile</i> 34	-*	/
<i>C. difficile</i> 213	-	-	<i>C. difficile</i> 181	-*	/
<i>C. difficile</i> 234	-	-	<i>C. difficile</i> 403	-*	/
<i>C. difficile</i> 391	-*	/	<i>C. difficile</i> 541	-	-
<i>C. difficile</i> 399	-*	/			
<i>C. difficile</i> 614	-	-			

Fortsetzung nächste Seite

- , negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 + , positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet;  
 +/- , bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 / mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden *Annealingtemperatur* durchgeführt.  
 Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (Fortsetzung von Seite 70)**

Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]		Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]	
	55	59		55	59
<b>Clostridium difficile Ribotyp 027</b>			<b>Clostridium difficile Ribotyp 078</b>		
<i>C. difficile</i> 2001	-	-	<i>C. difficile</i> 56	-*	/
<i>C. difficile</i> 2003	-*	/	<i>C. difficile</i> 183	-*	/
<i>C. difficile</i> 552 (Variation von 027)	-	-	<i>C. difficile</i> 196	-*	-
<i>C. difficile</i> 2002 (Variation von 027)	-	-	<i>C. difficile</i> 200	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 029</b>			<i>C. difficile</i> 240	-*	-
<i>C. difficile</i> 419	-	-	<i>C. difficile</i> 243	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 033</b>			<i>C. difficile</i> 372	-*	-
<i>C. difficile</i> 581	-*	/	<i>C. difficile</i> 448	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 035</b>			<i>C. difficile</i> 450	-*	-
<i>C. difficile</i> 413	-*	/	<i>C. difficile</i> 694	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 045</b>			<i>C. difficile</i> 754	-*	-
<i>C. difficile</i> 72	-*	/	<i>C. difficile</i> 760	-*	-
<i>C. difficile</i> 106	-*	/	<i>C. difficile</i> 836	-*	-
<i>C. difficile</i> 119	-*	/	<i>C. difficile</i> 855	-*	-
<i>C. difficile</i> 476	-*	/	<i>C. difficile</i> 906	-*	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 046</b>			<i>C. difficile</i> 1018	-*	-
<i>C. difficile</i> 388	-*	/	<b>Clostridium difficile Ribotyp 081</b>		
<b>Clostridium difficile Ribotyp 049</b>			<i>C. difficile</i> 477	-	-
<i>C. difficile</i> 387	-*	/	<i>C. difficile</i> 522	-	-
<i>C. difficile</i> 478	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 087</b>		
<b>Clostridium difficile Ribotyp 064</b>			<i>C. difficile</i> 160	-	-
<i>C. difficile</i> 395	-	-	<i>C. difficile</i> 427	-*	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 070</b>			<b>Clostridium difficile Ribotyp 090</b>		
<i>C. difficile</i> 385	-*	/	<i>C. difficile</i> 434	-*	/
<b>Clostridium difficile Ribotyp 072</b>			<b>Clostridium difficile Ribotyp 094</b>		
<i>C. difficile</i> 328	-	-	<i>C. difficile</i> 396	-	-
			<b>Clostridium difficile Ribotyp 103</b>		
			<i>C. difficile</i> 161	-	-
			<b>Clostridium difficile Ribotyp 135</b>		
			<i>C. difficile</i> 702	-	-
			<b>Clostridium difficile Ribotyp 137</b>		
			<i>C. difficile</i> 424	-	-
			<b>Clostridium difficile Ribotyp 149</b>		
			<i>C. difficile</i> 236	-*	/

Fortsetzung nächste Seite

- , negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 + , positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet;  
 +/- , bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;  
 / mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden *Annealing*temperatur durchgeführt.  
 Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen PCRs mit Primerpaar CDiff\_RK305\_F2/R1 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (Fortsetzung von Seite 71)**

Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]		Probe	Amplifikat bei Annealingtemperatur [° C]	
	55	59		55	59
<b><i>Clostridium difficile</i> Stämme unbekanntem Ribotyps</b>					
<i>C. difficile</i> 1	+	+	<i>C. difficile</i> 103	-	-
<i>C. difficile</i> 2	-	-	<i>C. difficile</i> 104	-	-
<i>C. difficile</i> 4	-	-	<i>C. difficile</i> 105	-	-
<i>C. difficile</i> 10	+	+	<i>C. difficile</i> 162	-	-
<i>C. difficile</i> 16	-	-	<i>C. difficile</i> 221	-	-
<i>C. difficile</i> 27	-	-	<i>C. difficile</i> 262	-	-
<i>C. difficile</i> 41	-	-	<i>C. difficile</i> 392	-	-
<i>C. difficile</i> 44	-	-	<i>C. difficile</i> 397	-	-
<i>C. difficile</i> 45	-	-	<i>C. difficile</i> 479	-	-
<i>C. difficile</i> 101	-	-	<i>C. difficile</i> 524	-	-
<i>C. difficile</i> 102	-	-	<i>C. difficile</i> 700	-*	/

-, negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;

+, positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet;

+/-, bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe (199 bp) gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;

/ mit diesem *Template* wurde keine PCR bei der entsprechenden *Annealingtemperatur* durchgeführt.

Bei den mit \* gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um Ergebnisse, die ausschließlich in Form von Multiplex-PCRs (vgl. Kap. III.4, S. 82) generiert wurden.

Wie das *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61) wurde auch das *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 in Multiplex-PCRs verwendet. Einige der in Tabelle 13 (S. 70) aufgeführten Ergebnisse stammen ausschließlich aus den Multiplex-PCRs mit einer *Annealingtemperatur* von 55 °C.

Durch die diagnostische PCR mit *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 wurden zwölf der 16 *C. difficile* Ribotyp 001-Stämme erfasst, sowie die Stämme des Ribotyps 015. Mit *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 ist demnach ebenfalls kein ausschließlicher und umfassender Nachweis von *C. difficile* Ribotyp 001 möglich. Aus diesem Grund wurde auch für das Fragment C\_diff\_RK305\_1 durch weiterführende *in silico*-Analysen überprüft, ob *Primerpaare* entwickelt werden können, die spezifisch ausschließlich und umfassend an genomische DNS der Ribotyp 001-Stämme binden (vgl. Kap. III.2.2.3).

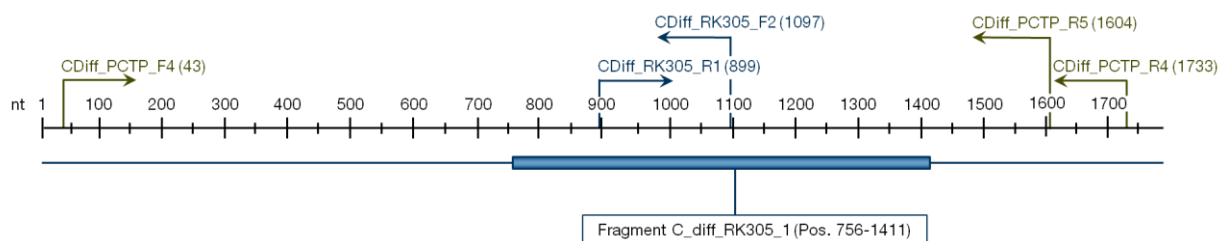
### III.2.2.3 Vergleichende Sequenzanalyse für Fragment C\_diff\_RK305\_1

Durch die Verwendung des *Primerpaares* CDiff\_RK305\_F2/R1 konnte aus genomischer DNS von zwölf der 16 als Ribotyp 001 deklarierten Stämme je ein Fragment von 199 bp generiert werden. Zusätzlich wurde je ein Fragment von 199 bp Länge aus genomischer DNS der vier als Ribotyp 015 deklarierten Stämme amplifiziert. Wie für das Fragment C\_diff\_27\_11 (vgl. Kap. III.2.1.3, S. 64) wurden deshalb ebenso für das Fragment C\_diff\_RK305\_1 Sequenzvergleiche mit verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen sowie



weiteren in öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen auch anderer Spezies durchgeführt und eine ARB-Datenbank sowie sowohl entsprechende Nukleinsäure-Alignments als auch Aminosäure-Alignments erstellt.

Für das Fragment C\_diff\_RK305\_1 (656 bp) zeigte sich Ähnlichkeit zu einem Gen, das im Genom von z.B. *C. difficile* 630 und R20291 sowie unter anderem einiger *Streptococcus* Spezies als „putative conjugal transfer protein“ (1782 bp) annotiert ist. Unter Verwendung der verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen und der zusätzlich gefundenen ähnlichen Sequenzen wurde eine ARB-Datenbank und sowohl ein entsprechendes Nukleinsäure- als auch ein Aminosäure-Alignment erstellt. Auf Basis der Sequenzvergleiche wurden weitere Primer (CDiff\_PCTP\_F4, \_R4 und \_R5; vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang) mit Zielsequenzen in ‚konservierteren‘ Bereichen entwickelt, welche die Amplifikation eines größeren Fragments erlauben, das über die 3‘- und 5‘-Enden des Fragments C\_diff\_RK305\_1 hinausgeht (vgl. Abb. 10). Unter Verwendung des Primerpaares CDiff\_PCTP\_F4/R4 konnte je ein Fragment von 1691 bp Länge aus genomischer DNS der Stämme RK 305, RK 311, RK 365, Ty 859, 351, 433, 612 und 903 (Ribotyp 001), 164 (Ribotyp 015), 435 und 604 (Ribotyp 017) sowie 1, 16 und 27 (Ribotyp unbekannt) amplifiziert und nach Klonierung in den pCR® 2.1 Vektor sequenziert werden. Unter Verwendung des Primerpaares CDiff\_PCTP\_F4/R5 konnte je ein Fragment von 1562 bp Länge aus genomischer DNS der Stämme 2001 (Ribotyp 027), 101, 102, 103, 104 und 105 (Ribotyp unbekannt) amplifiziert und nach Klonierung in den pCR® 2.1 Vektor sequenziert werden.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des als *putative conjugal transfer protein* annotierten Gens (1782 bp) und darauf bezogene Position des Fragments C\_diff\_RK305\_1 (656 bp)**

Die Grafik zeigt schematisch das als *putative conjugal transfer protein* annotierte Gen, zu welchem bei Vergleichen der Nukleinsäuresequenz bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Fragments C\_diff\_RK305\_1 mit in öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen sowie *C. difficile* Genomsequenzen Ähnlichkeiten gefunden wurden. Außerdem ist die Länge und Anordnung des Fragments C\_diff\_RK305\_1 bezüglich des 1782 bp langen Gens (Pos. 756-1411) sowie die Bindepositionen der Primer, die auf Basis des Fragments C\_diff\_RK305\_1 bzw. auf Basis des als *putative conjugal transfer protein* annotierten Gens entwickelt wurden, angezeigt.

Nach Sequenzierung der amplifizierten DNS wurden bei weiterführenden Vergleichen der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit in öffentlichen Datenbanken zugänglichen Sequenzen verschiedenster Spezies Ähnlichkeiten zu Proteinen festgestellt, die ebenfalls am konjugativen Transfer von DNS beteiligt sind (z.B. TraG *family protein* aus *Peptostreptococcus stomatis*). Die Sequenzen der amplifizierten DNS-Fragmente sowie der

aus verschiedenen öffentlich zugänglichen Datenbanken extrahierten ähnlichen Sequenzen wurden in die ARB-Datenbank importiert und den erstellten Alignments hinzugefügt.

Die *in silico* Analysen bestätigten jedoch, dass auch unter Verwendung des Fragments CDiff\_RK305\_1 die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Systems zum umfassenden Nachweis aller als Ribotyp 001 deklarierten *Clostridium difficile* Stämme bei gleichzeitigem Ausschluss aller als nicht-Ribotyp 001 deklarierten Stämme nicht möglich ist. Eine aktuelle ARB-Datenbank, die die entsprechenden Sequenzen enthält ist am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TUM in Weihenstephan bei Dr. Wolfgang Ludwig hinterlegt.

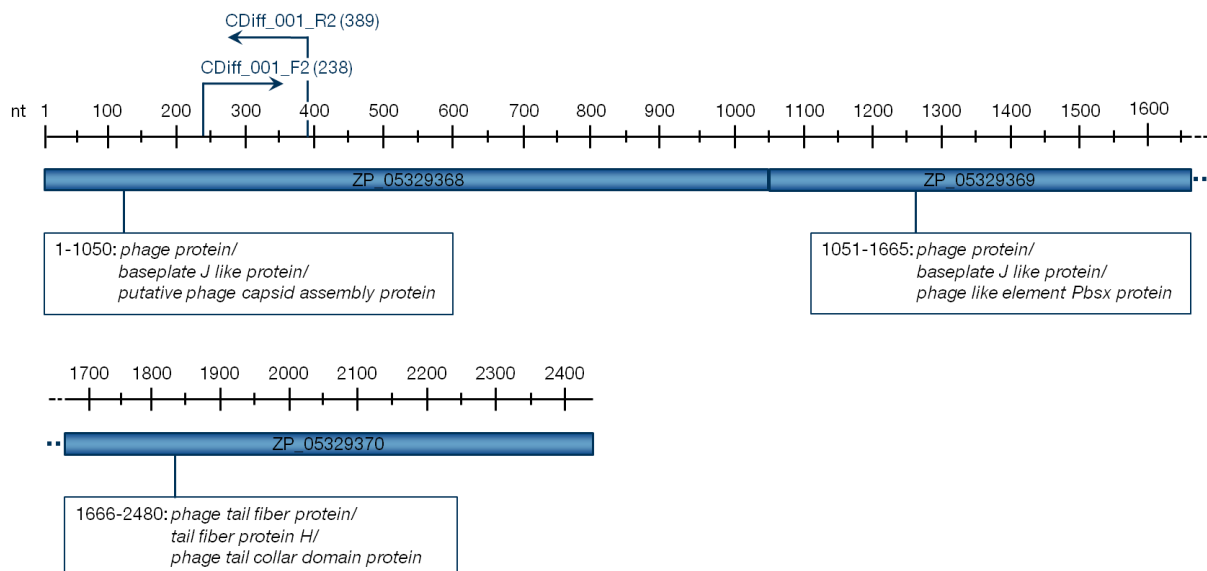
### **III.2.3 Entwicklung eines spezifischen *Primer*paares auf Basis mittels *in silico* BLAST-Analyse identifizierter Ribotyp 001-spezifischer DNS-Fragmente**

Mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung war es nicht gelungen Fragmente zu isolieren, auf Basis derer spezifische Oligonukleotide für den ausschließlichen Nachweis von *C. difficile* Ribotyp 001 entwickelt werden konnten. Deshalb wurde ein *in silico* Verfahren angewandt, mit Hilfe dessen Ribotyp 001-spezifische Sequenzabschnitte gesucht wurden.

In öffentlich zugänglichen Sequenz-Datenbanken sind momentan Genomsequenzen von 25 verschiedenen *C. difficile* Stämmen verfügbar. Bei dreien handelt es sich um annotierte Genome (630, Ribotyp 012 sowie CD196 und R20291, Ribotyp 027); die übrigen Genomsequenzen sind nur als einzelne Contigs, die nicht oder nicht vollständig annotiert sind, verfügbar. Unter den Stämmen, deren Genomsequenzen veröffentlicht sind, befinden sich zwei Ribotyp 001-Stämme (BI9, GenBank Accession FN668944 und QCD-63q42, GenBank Accession CM000637). Für eine umfassende *in silico* Analyse zum Design spezifischer *Primer*paare ist diese Datenlage dennoch nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden weitere *C. difficile* Genomsequenzen von Hedwig Kurka (TUM, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Dr. Armin Ehrenreich) zur Verfügung gestellt.

Die in öffentlichen Datenbanken verfügbaren *C. difficile* Ribotyp 001-Genomsequenzen (BI9 und QCD-63q42) und eine weitere *C. difficile* Ribotyp 001-Genomsequenz, die von Hedwig Kurka (TUM, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Dr. Armin Ehrenreich) zur Verfügung gestellt wurde, wurden mit den Genomsequenzen aller anderen öffentlich verfügbaren *C. difficile* Stämme sowie Genomsequenzen 23 weiterer *C. difficile* Stämme, die ebenfalls von Hedwig Kurka zur Verfügung gestellt wurden, verglichen. Mit Hilfe eines BLAST-Algorithmus<sup>[4]</sup> wurden *C. difficile* Ribotyp 001 DNS-Sequenzen ausgegeben, die maximal 80 % Ähnlichkeit zu Genomabschnitten anderer Ribotypen aufweisen und gleichzeitig mindestens 80 % der Länge des Treffers mit der längsten Sequenz haben. Mit Hilfe dieser „*in silico* Ausschlusshybridisierung“ konnten drei im Genom der Ribotyp 001-Stämme aufeinanderfolgende Gene identifiziert werden, deren Sequenz offensichtlich für Ribotyp 001-Stämme spezifisch ist. Im Genom des Stammes *C. difficile* QCD-63q42 sind

zwei dieser Gene als „*phage protein*“ (NCBI Accession Nr. ZP\_05329368 und ZP\_05329369) annotiert, das dritte als „*putative phage tail fiber protein*“ (NCBI Accession Nr. ZP\_05329370). Die Genomabschnitte ZP\_05329368 bis ZP\_05329370 wurden für den weiteren Verlauf als „Fragment C\_diff\_001“ bezeichnet. Bei weiterführenden Vergleichen der entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde zusätzlich Ähnlichkeit von ZP\_05329368 zu als „*baseplate J like protein*“ und „*putative phage capsid assembly protein*“ annotierten Genen, von ZP\_05329369 ebenfalls zu als „*baseplate J like protein*“ sowie als „*phage like element Pbsx protein*“ annotierten Genen und von ZP\_05329370 als „*tail fiber protein H*“ sowie als „*phage tail collar domain protein*“ annotierten Genen festgestellt (vgl. Abb. 11). Unter Verwendung der verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen und der jeweils zusätzlich gefundenen ähnlichen Sequenzen wurde eine ARB-Datenbank und sowohl entsprechende Nukleinsäure-Alignments als auch Aminosäure-Alignments erstellt.

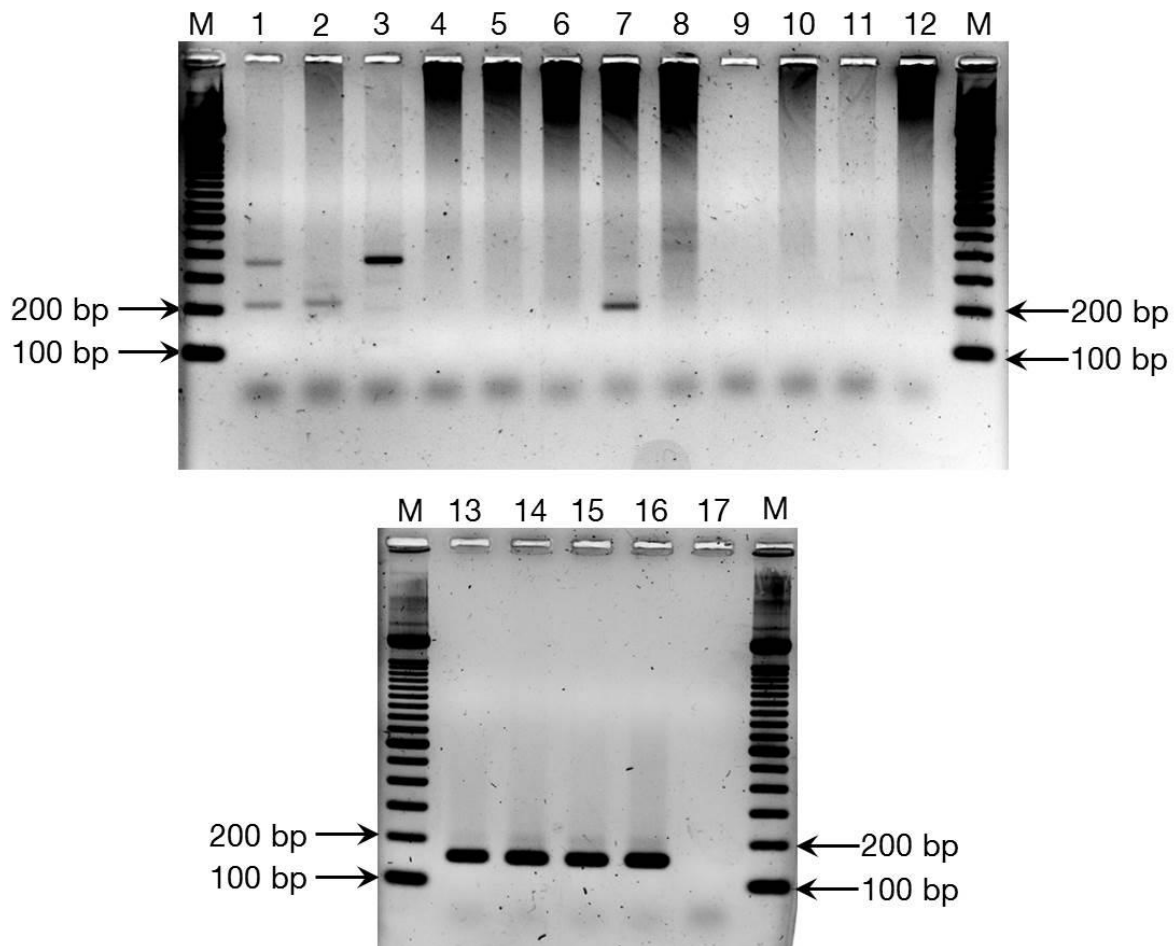


**Abbildung 11: Anordnung der Gene mit für *C. difficile* Ribotyp 001 potentiell spezifischer Sequenz**

Die Grafik zeigt schematisch die als *phage protein* und *putative phage tail fiber protein* annotierten Gene, deren Sequenz laut BLAST-Analyse im Rahmen der verfügbaren Genomsequenzen spezifisch für *C. difficile* Ribotyp 001-Stämme ist. Außerdem sind die Bindepotionen der auf Basis des Fragments C\_diff\_001\_1 entwickelten *Primer* angezeigt.

Auf Basis des Gens mit der Accession Nr. ZP\_05329368 wurde unter Verwendung der in ARB integrierten Software-Werkzeuge „ARB Probe Design“ und „ARB Probe Match“ ein *Primer*paar – Cdiff\_001\_F2/R2 (Generierung eines PCR-Produktes von 151 bp, vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang) – entwickelt, um die entsprechenden Subfragmente hinsichtlich Stammspezifität zu überprüfen. Abbildung 11 zeigt schematisch die im Genom von *C. difficile* QCD-63q42 aufeinanderfolgenden Gene, sowie die Annotationsdaten, die für die jeweiligen Abschnitte gefunden wurden. Außerdem sind die Bindestellen der auf Basis des Gens ZP\_05329368 entwickelten *Primer* CDiff\_001\_F2 und \_R2 angezeigt.

Beide neu entwickelten *Primer* haben eine Schmelztemperatur von  $T_m = 54 \text{ }^\circ\text{C}$ . Das *Primer*paar wurde unter Verwendung von DNS-Material einer Auswahl von Stämmen unterschiedlicher Ribotypen mittels PCR mit einer *Annealing*temperatur von  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  hinsichtlich Spezifität überprüft (vgl. Abb. 12).



**Abbildung 12: Geldokumentation einer diagnostischen PCR mit dem *Primer*paar CDiff\_001\_F2/R2 ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$  *Annealing*temperatur)**

2 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M**, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* 213 (Ribotyp (RT) 010); **2**, *C. difficile* 552 (Variation von RT 027); **3**, *C. difficile* 702 (RT 135); **4**, *C. difficile* 372 (RT 078); **5**, *C. difficile* 435 ((RT 017); **6**, *C. difficile* 604 (RT 017); **7**, *C. difficile* 754 (RT 078); **8**, *C. difficile* 855 (RT 078); **9**, *C. difficile* 1018 (RT 078); **10**, *C. difficile* 425 (RT 012); **11**, *C. difficile* 475 (RT 014); **12**, *C. difficile* 424 (RT 137); **13**, *C. difficile* 422 (RT 001); **14**, *C. difficile* RK 305 (RT 001); **15**, *C. difficile* RK 365 (RT 001); **16**, *C. difficile* TGC 001-2 (RT 001); **17**, Negativkontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

Durch die Geldokumentation wird deutlich, dass Fragmente spezifischer Größe (151 bp) aus genomischer DNS der als Ribotyp 001 deklarierten Stämme 422, RK 305, RK 365 und TGC 001-2 amplifiziert werden konnten, jedoch nicht aus genomischer DNS der übrigen Referenzstämme.

Es wurde ausschließlich aus genomischer DNS der Ribotyp 001-Stämme 422, RK 305, RK 365 und TGC 001-2 je ein Fragment spezifischer Größe gebildet. Aus genomischer DNS des Ribotyp 001-Stammes 220 sowie der anderen Referenzstämme wurde kein Amplifikat spezifischer (151 bp) Größe gebildet. Aus genomischer DNS der Stämme 213 (Ribotyp 010),

394 und 398 (RT 014), 552 (Variation von RT 027), 754 (RT 078) sowie 702 (RT 135) wurden Fragmente gebildet, deren Größe von 151 bp abweicht (vgl. Tab. 14). Das *Primerpaar* CDiff\_001\_F2/R2 erfasste im Rahmen der getesteten Stämme also nur Isolate des Ribotyps 001.

**Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen PCR mit *Primerpaar* CDiff\_001\_F2/R2 bei einer *Annealingtemperatur* von 55 °C**

Isolate aus deren genomischer DNS Fragmente spezifischer Größe (151 bp) amplifiziert wurden	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>	
<i>C. difficile</i> RK 305	<i>C. difficile</i> TGC 001-2
<i>C. difficile</i> RK 365	<i>C. difficile</i> 422
Isolate aus deren genomischer DNS ein Fragment mit einer von 151 bp abweichenden Größe amplifiziert wurde	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 010</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 027</b>
<i>C. difficile</i> 213 (ca. 210 und 390 bp)	<i>C. difficile</i> 552 (Variation von 027) (ca. 210 bp)
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 078</b>
<i>C. difficile</i> 394 (ca. 800 bp)	<i>C. difficile</i> 754 (ca. 210 bp)
<i>C. difficile</i> 398 (ca. 390 bp)	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 135</b>
	<i>C. difficile</i> 702 (ca. 390 bp)
Isolate aus deren genomischer DNS kein Fragment amplifiziert wurde	
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 049</b>
<i>C. difficile</i> 220	<i>C. difficile</i> 478
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 002</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 064</b>
<i>C. difficile</i> 420	<i>C. difficile</i> 395
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 006</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 078</b>
<i>C. difficile</i> 201	<i>C. difficile</i> 372
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 012</b>	<i>C. difficile</i> 855
<i>C. difficile</i> 425	<i>C. difficile</i> 1018
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 081</b>
<i>C. difficile</i> 163	<i>C. difficile</i> 477
<i>C. difficile</i> 393	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 087</b>
<i>C. difficile</i> 418	<i>C. difficile</i> 160
<i>C. difficile</i> 421	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 094</b>
<i>C. difficile</i> 423	<i>C. difficile</i> 396
<i>C. difficile</i> 475	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 103</b>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 015</b>	<i>C. difficile</i> 161
<i>C. difficile</i> 164	<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 137</b>
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 017</b>	<i>C. difficile</i> 424
<i>C. difficile</i> 435	<b><i>Clostridium difficile</i> unbekanntem Ribotyp</b>
<i>C. difficile</i> 604	<i>C. difficile</i> 162
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 029</b>	<i>C. difficile</i> 392
<i>C. difficile</i> 419	<i>C. difficile</i> 397
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 045</b>	
<i>C. difficile</i> 476	

Die Tabelle bietet eine Übersicht der *Clostridium difficile* Stämme, aus deren genomischer DNS ein Fragment spezifischer Größe (151 bp) mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares CDiff\_001\_F2/R2 bei einer *Annealingtemperatur* von 55 °C amplifiziert wurde sowie der Stämme, aus deren genomischer DNS Amplifikate gebildet wurden, welche in der Größe von 151 bp abweichen. Die jeweilige Länge des gebildeten Amplifikats ist in Klammern angegeben. Außerdem sind die Stämme angegeben, aus deren genomischer DNS kein Amplifikat gebildet werden konnte.

### III.3 Untersuchung von Diskrepanzen bezüglich der Ribotyp-Zuordnung und Reinheit einiger *C. difficile* Stämme

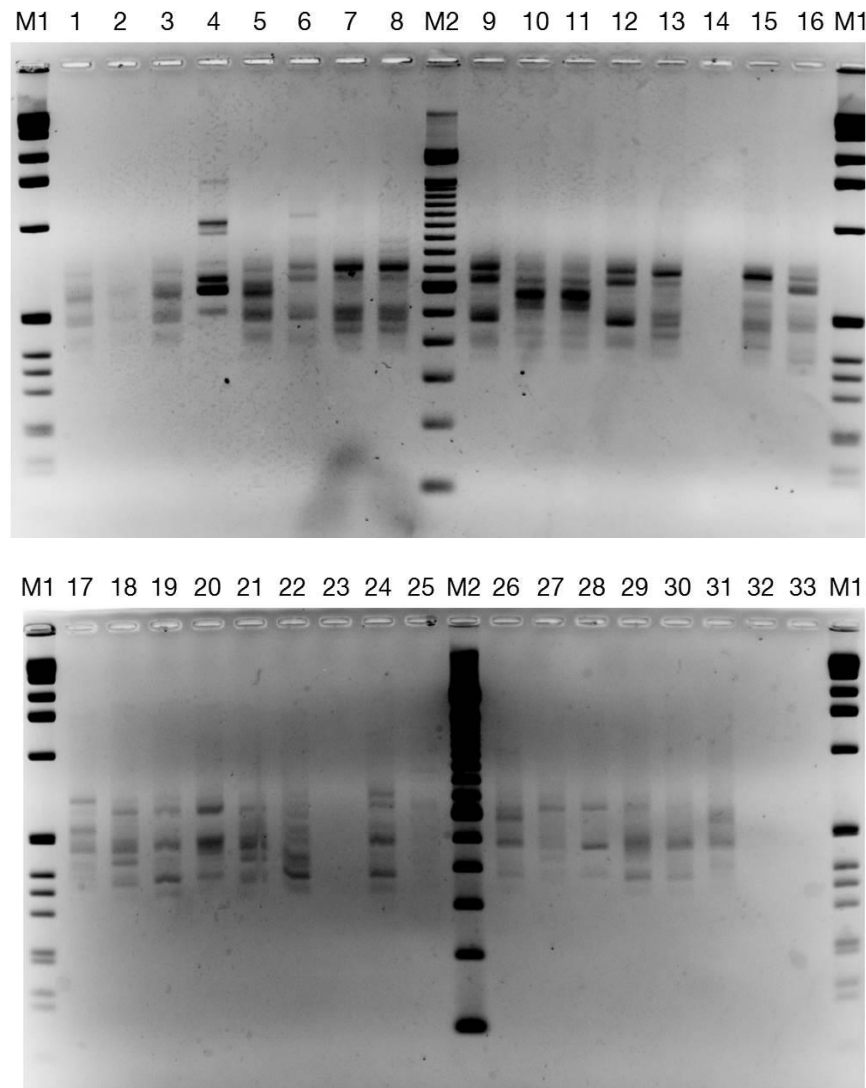
Ursprünglich stand genomische DNS von nur 14 verschiedenen *C. difficile* Stämmen zur Verfügung – zwei als Ribotyp 001, fünf als Ribotyp 027 und zwei als Ribotyp 106 deklariert sowie fünf mit unbekanntem Ribotyp (vgl. Tab. 1, S. 37). Unter Verwendung des zur Verfügung stehenden DNS-Materials konnte das potentiell Ribotyp 001-spezifische Fragment C\_diff\_27\_11 mittels MASH isoliert werden. Bei der anschließenden Überprüfung der Stammspezifität des darauf basierend entwickelten *Primer*paars CDiff\_27\_11\_F1/R1 wurden jedoch einige Unstimmigkeiten bezüglich der Ribotyp-Zuordnung einiger Stämme festgestellt. Es konnte aus genomischer DNS des als Ribotyp 001 deklarierten Stammes *C. difficile* 27, hingegen nicht aus genomischer DNS des ebenfalls als Ribotyp 001 deklarierten Stammes 10 ein Amplifikat von 484 bp generiert werden (vgl. Kap. III.2.1.1, S. 58).

Zudem stellte sich heraus, dass die Ergebnisse von diagnostischer PCR mit *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61) und vergleichender Sequenzanalyse für Fragment C\_diff\_27\_11 (vgl. Kap. III.2.1.3, S. 64) zum Teil widersprüchlich sind, sodass die Ribotyp-Zuordnung der ursprünglich verfügbaren Stämme angezweifelt werden musste.

Auf Grund dessen wurde weiteres *C. difficile* DNS-Material aus verlässlichen Quellen angefordert und zur Verfügung gestellt. Darunter war genomische DNS definierter, vom Robert Koch Institut Wernigerode ribotypisierter *C. difficile* Ribotyp 001 Stämme (RK 305, RK 311, RK 365, RK 379, Ty 859 und Landon-1), von der tgcBIOMICS GmbH (Mainz, D) kommerziell erworbene genomische DNS zweier Ribotyp 001-Stämme (TGC 001-1 und TGC 001-2) sowie DNS von Stämmen, die aus dem Konsiliarlaboratorium für gastrointestinale Infektionen (bakteriell) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Universität Freiburg, D, Prof. Dr. med. M. Kist) stammen und dort ribotypisiert wurden (vgl. Tab. 1, S. 37).

#### III.3.1 „Ribotyp-PCR“

Zur Klärung der Unstimmigkeiten bezüglich der Ribotyp-Zuordnung wurde mit DNS-Material einer Auswahl von Stämmen eine „Ribotyp PCR“ durchgeführt. Dabei werden die intergenischen *Spacer* zwischen 16S-rRNS- und 23S-rRNS-Gen mit einem 16S rDNS-gerichteten Vorwärts*primer* (hier: 632v, vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang) sowie einem 23S rDNS-gerichteten Rückwärts*primer* (hier: 118R, vgl. Tab. 24, S. 137 im Anhang) amplifiziert (vgl. Kap. I.1.2, S. 22 und Kap. II.3.1, S. 41).



**Abbildung 13: Geldokumentation der „Ribotyp“-PCR mit dem Primerpaar 632v/118R (41 °C Annealingtemperatur)**

3 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M1**, 1kb DNA Ladder; **M2**, 100 bp DNA Ladder (beide von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

**1**, *C. difficile* 101; **2**, *C. difficile* 102; **3**, *C. difficile* 103; **4**, *C. difficile* 104; **5**, *C. difficile* 105; **6**, *C. difficile* 1 ;  
**7**, *C. difficile* 2; **8**, *C. difficile* 4; **9**, *C. difficile* 10; **10**, *C. difficile* 16; **11**, *C. difficile* 27; **12**, *C. difficile* 41; **13**, *C. difficile* 44;  
**14**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); **15**, *C. difficile* 45; **16**, *C. difficile* TGC 001-2; **17**, *C. difficile* 201; **18**, *C. difficile* 213;  
**19**, *C. difficile* 220; **20**, *C. difficile* 221; **21**, *C. difficile* 234; **22**, *C. difficile* 262; **23**, *C. difficile* 328; **24**, *C. difficile* 351;  
**25**, *C. difficile* 541; **26**, *C. difficile* 552; **27**, *C. difficile* 614; **28**, *C. difficile* 628; **29**, *C. difficile* 702; **30**, *C. difficile* 808;  
**31**, *C. difficile* 2001; **32**, *C. difficile* 2002; **33**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

Die Geldokumentation lässt erkennen, dass die aus genomischer DNS der Stämme *C. difficile* 10 und 27 (als Ribotyp 001 deklariert) (Spur 9 bzw. 11) generierten Bandenmuster deutliche Unterschiede aufweisen. Dennoch lässt sich nicht abschließend klären, bei welchem der beiden Stammpaare es sich um Ribotyp 001-Stämme handelt.

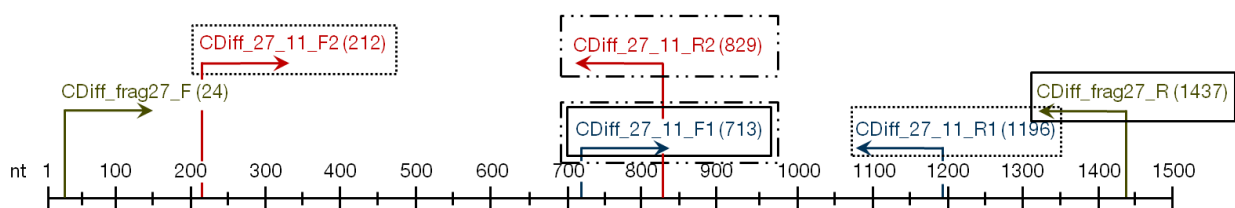
Beim Vergleich der nach anschließender Gelelektrophorese erhaltenen Bandenmuster mussten hinsichtlich der Stämme 10 und 27 (als Ribotyp 001 deklariert) deutliche Unterschiede festgestellt werden. Offenbar handelt es sich also nicht um Stämme des gleichen Ribotyps. Hingegen waren die Bandenmuster bei den Stammpaaren 16 (Ribotyp unbekannt) und 27 sowie 10 und 41 (RT unbekannt) anscheinend jeweils identisch. Diese Ergebnisse legen nahe, dass wohl jeweils die Stämme 16 und 27 bzw. 10 und 41 vom

gleichen Ribotyp sind (vgl. Abb. 13, S. 79). Beim Vergleich der entsprechenden Bandenmuster dieser Stammpaare mit dem Bandenmuster beim Ribotyp 001 Stamm TGC 001-2, der von der tgcBIOMICS GmbH typisiert wurde, sowie beim Ribotyp 001-Stamm 351, der im Konsiliarlaboratorium für gastrointestinale Infektionen (bakteriell) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Universität Freiburg, D, Prof. Dr. med. M. Kist) typisiert wurde, mussten auch hier Unterschiede festgestellt werden.

Es war somit nicht möglich, die Zweifel an der Ribotypisierung der ursprünglich verfügbaren Stämme auszuräumen, zumal die den Ribotyp bestimmenden Bandenmuster sich teilweise nur in einer Bande unterscheiden bzw. die Konzentrationen der Fragmente bei den einzelnen Isolaten sehr unterschiedlich waren.

### III.3.2 Untersuchungen bezüglich der Reinheit des ursprünglich verfügbaren DNS-Materials

Bei der vergleichenden Sequenzanalyse für Fragment C\_diff\_27\_11 (vgl. Kap. III.2.1.3, S. 64) wurden im Vergleich zur diagnostischen PCR mit *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 widersprüchliche Ergebnisse für die ursprünglich verfügbaren *C. difficile* Stämme 1, 4, 10, 16, 27, 41, 44, 45 und 101 bis 105 verzeichnet. Zusätzlich zur Ribotyp-PCR wurden weitere Untersuchungen zur Klärung der Inkonsistenzen bezüglich der ursprünglich verfügbaren Isolate (1, 4, 10, 16, 27, 41, 44, 45, 101 bis 105) durchgeführt. Es wurden zum einen PCRs mit unterschiedlichen *Primerkombinationen* der auf Basis des Fragments C\_diff\_27\_11 entwickelten *Primer* durchgeführt (vgl. Abb. 14, Tab. 25, S. 138 im Anhang sowie Abb. 15, S. 81). Zum anderen wurden ebenfalls mit unterschiedlichen *Primerkombinationen* „nested“ PCRs durchgeführt, bei welchen die mittels *Primerpaar* CDiff\_frag\_27\_F/R amplifizierten PCR-Produkte als Matrize eingesetzt wurden (vgl. Abb. 16 S. 82).



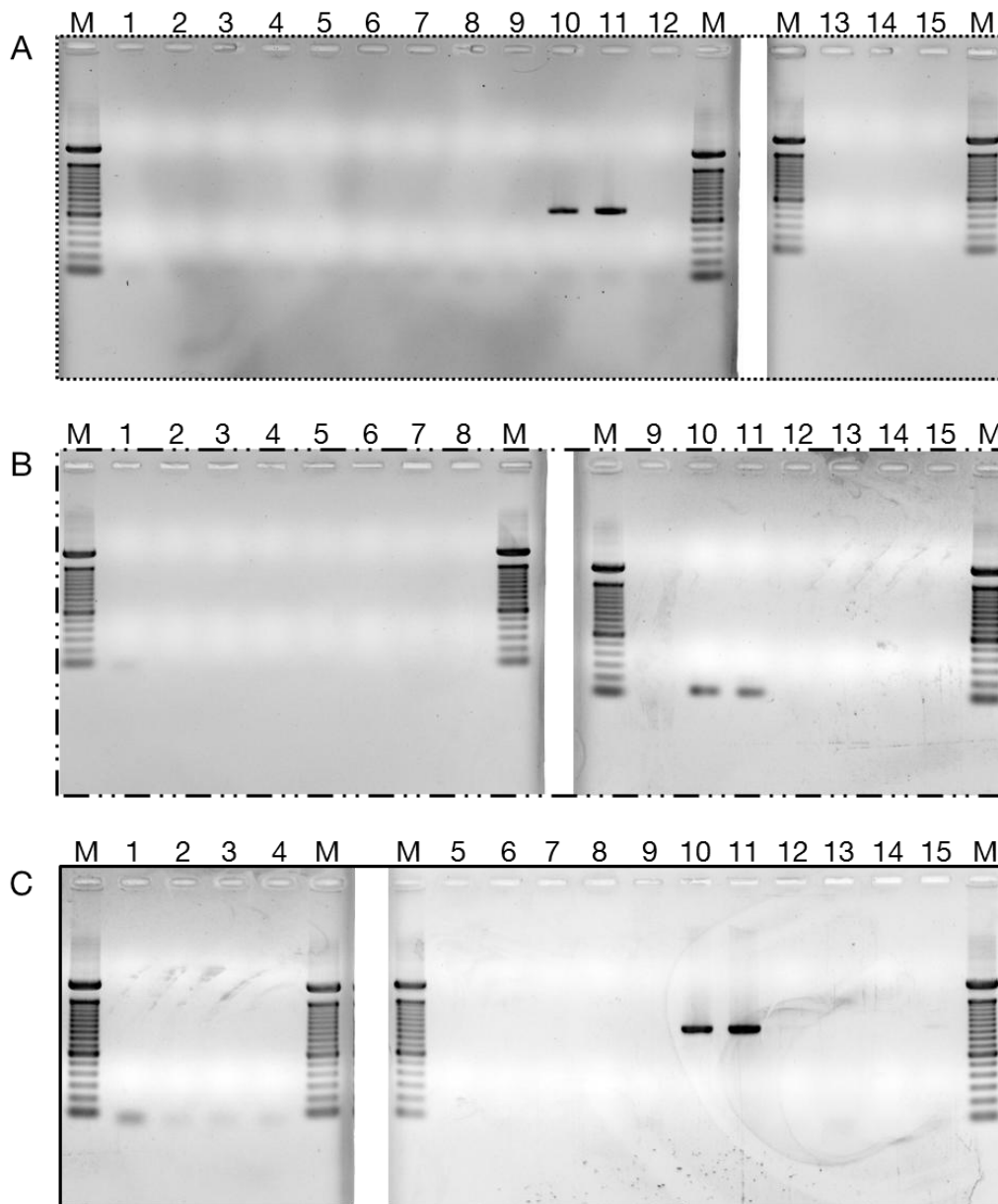
**Abbildung 14: Primerbindestellen bezüglich des Fragments C\_diff\_27\_11**

Die Abbildung zeigt schematisch das 1504 bp lange Fragment C\_diff\_27\_11 sowie die Bindestellen der *Primer* die auf Basis dieses Fragments entwickelt wurden. Die Bindestellen der jeweiligen Oligonukleotide sind in Klammern angegeben. Die Rahmen verdeutlichen die unterschiedlichen *Primerkombinationen*, die für die PCR zur Überprüfung der Spezifität und für die „nested“ PCRs verwendet wurden (vgl. auch Abb. 15, S. 81 und Abb. 16, S. 82).

Aus genomischer DNS der Stämme 4, 10, 41, 44, 45 und 101 bis 105 ist es nicht gelungen, Fragmente während der PCRs mit einer der verschiedenen *Primerkombinationen*



zu amplifizieren (vgl. Abb. 15). Dagegen wurden bei der PCR unter Verwendung der CDiff\_frag27\_F/R-PCR-Produkte aller sechs Stämme als Matrize, unter Einsatz unterschiedlicher *Primerkombinationen* PCR-Produkte gebildet (vgl. Abb. 16, S. 82). Es konnte nicht geklärt werden, aus welchem Grund dieses Phänomen aufgetreten ist.

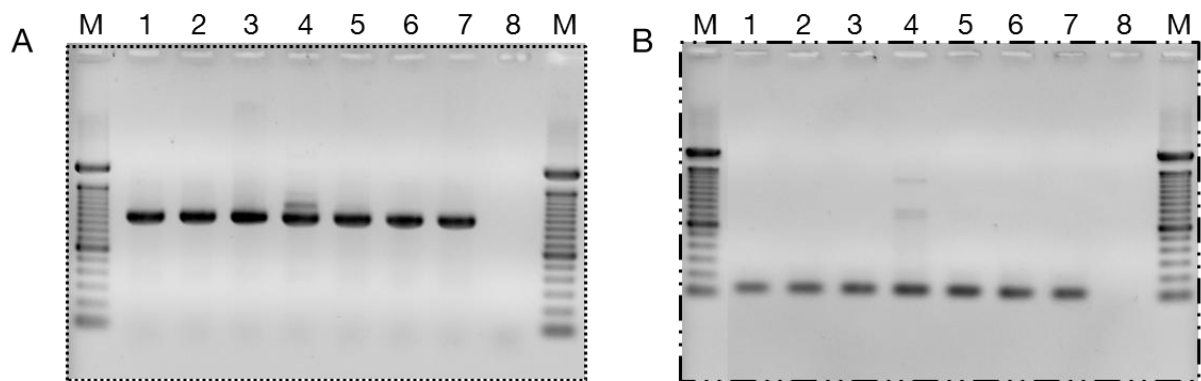


**Abbildung 15: Geldokumentationen der PCRs mit unterschiedlichen *Primerkombinationen* der auf Basis des Fragments C\_diff\_27\_11 entwickelten *Primer***

1,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M**, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* 101; **2**, *C. difficile* 102; **3**, *C. difficile* 103; **4**, *C. difficile* 104; **5**, *C. difficile* 105; **6**, *C. difficile* 1; **7**, *C. difficile* 2; **8**, *C. difficile* 4; **9**, *C. difficile* 10; **10**, *C. difficile* 16; **11**, *C. difficile* 27; **12**, *C. difficile* 41; **13**, *C. difficile* 44; **14**, *C. difficile* 45; **15**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).

(A) PCR mit *Primern* CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_frag27\_R; (B) PCR mit *Primern* CDiff\_27\_11\_F1 und CDif\_27\_11\_R2 (C) PCR mit *Primern* CDiff\_27\_11\_F2 und CDiff\_27\_11\_R1 (vgl. auch Abb. 14, S. 80).



**Abbildung 16: Beispiele von Geldokumentationen der „nested“ PCR mit CDiff\_frag27\_F/R-PCR-Produkten als Matrize**

1,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M**, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* 105; **2**, *C. difficile* 4; **3**, *C. difficile* 10; **4**, *C. difficile* 27; **5**, *C. difficile* 41; **6**, *C. difficile* 44; **7**, *C. difficile* 45; **8**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).

(A) „nested“ PCR mit Primern CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R2; (B) „nested“ PCR mit Primern CDiff\_27\_11\_F2 und CDiff\_27\_11\_R1 (vgl. auch Abb. 14, S. 80)

Da es weder gelungen ist, die ursprüngliche Ribotyp-Zuordnung verlässlich zu überprüfen, noch die widersprüchlichen Ergebnisse von PCR und Sequenzierung zu klären, wurde entschieden, die ursprünglich verfügbare genomische DNS der 14 Stämme nicht in weitere Untersuchungen einzubeziehen und nur noch genomische DNS aus den verlässlichen Quellen zu verwenden. Da das Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 jedoch einen gewissen diagnostischen Wert aufweist, wurde dieses dennoch weiter verwendet.

### III.4 Multiplex-PCR zur Überprüfung der Stammspezifität neu designer Primer

Zusätzlich zu den PCRs zur Überprüfung der Spezifität einzelner neu designer Primerpaare (vgl. Kap. III.2.1.1, S. 58, Kap. III.2.2.1, S. 66 und Kap. III.2.3 S. 74) wurden diese in einem Multiplex-PCR-System verwendet und erneut hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die in dieser Arbeit entwickelten Primerpaare auf eine neue Plattform zur Detektion von *C. difficile* adaptiert werden sollten, die auf Multiplex-PCR und Sondenhybridisierung basiert (Prototyp „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ vgl. Kap. III.5, S. 89).

#### III.4.1 Evaluierung der Multiplex-PCR-Bedingungen

Um die PCR-Bedingungen zu testen, wurde die Multiplex-PCR zunächst mit genomischer DNS des Stammes *C. difficile* 365 (Ribotyp 001) und des Stammes 398 (Ribotyp 014) sowie genomischer DNS der als Negativkontrolle verwendeten Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775, *Klebsiella oxytoca* DSM 5175, *Edwardsiella tarda* LMG 2793, *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* ATCC 29428, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *En. avium* DSM 20679

und *En. dispar* DSM 6630 durchgeführt. Die verwendeten *Primer* wurden isomolar mit einer Konzentration von je 100 pmol/μL eingesetzt, die *Annealing*temperatur betrag 55 °C, die Elongationszeit 1,5 min.. Bei den eingesetzten *Primerpaaren* handelte es sich um die in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotidpaare CDiff\_001\_F2/R2 („*Primerpaar 2*“, Generierung eines PCR-Produkts von 151 bp Länge), CDiff\_27\_11\_F1/R1 („*Primerpaar 3*“, Generierung eines PCR-Produkts von 484 bp Länge) und CDiff\_RK305\_F2/R1 („*Primerpaar 4*“, Generierung eines PCR-Produkts von 199 bp Länge). Außerdem wurde ein *Primerpaar* zur Amplifikation des 16S rRNS-Gens (616v\_alt/100K „*Primerpaar 1a*, Generierung eines PCR-Produkts von ca. 1500 bp Länge) als Positivkontrolle für die PCR verwendet.

Die jeweiligen Nukleotid-Sequenzen und Abkürzungen für die in der Multiplex-PCR verwendeten *Primerpaare* sind nochmals in Tabelle 15 bzw. Tabelle 34 auf Seite 136 und Tabelle 25 auf Seite 137 im Anhang aufgelistet.

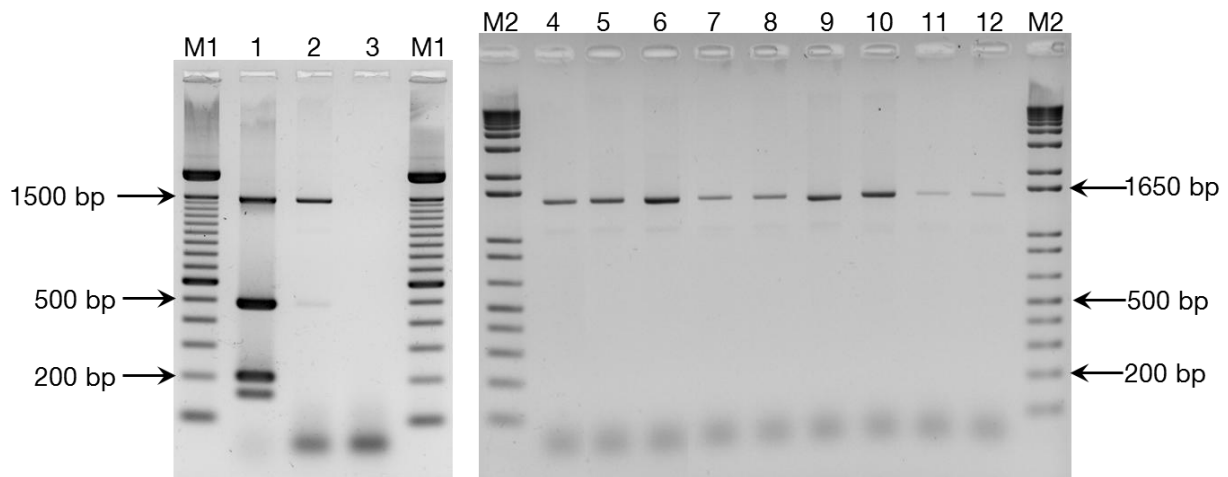
**Tabelle 15: Für Multiplex-PCR eingesetzte *Primerpaare* und ihre Abkürzungen**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Abkürzung	
100K	GGT TAC CTT CTT ACG ACT T	<i>Primer 1Ra</i>	<i>Primerpaar 1a</i> (ca. 1500 bp)
616v_alt	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	<i>Primer 1F</i>	
609RII	ACT ACY VGG GTA TCT AAK CC	<i>Primer 1Rb</i>	<i>Primerpaar 1b</i> (ca. 800 bp)
CDiff_001_F	ACT GAG GCT ACT GGA GAA	<i>Primer 2F</i>	<i>Primerpaar 2</i> (151 bp)
CDiff_001_R	AGT GCT TCG ACT GGA CTT	<i>Primer 2R</i>	
CDiff_27_11_F1	TGT CCG ACA TGT TGT TAA GG	<i>Primer 3F</i>	<i>Primerpaar 3</i> (484 bp)
CDiff_27_11_R1	GTC GTA GCA GCA CTT TGA TA	<i>Primer 3R</i>	
CDiff_RK305_F2	CCA AGA GTA TCA AGT TCC AG	<i>Primer 4F</i>	<i>Primerpaar 4</i> (199 bp)
CDiff_RK305_R1	CAA TAG ATA GAC TCT TTG AAG CC	<i>Primer 4R</i>	

Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide, deren Spezifität in Multiplex-PCRs überprüft wurde, sowie die 16S rDNS-gerichteten *Primerpaare*, die als Positivkontrolle für die PCR verwendet wurden. Es ist die jeweilige Sequenz und die im Text verwendete Abkürzung für jedes *Primerpaar* sowie in Klammern die Länge des amplifizierten PCR-Produkts angegeben.

Die Geldokumentation der anschließenden Gelelektrophorese ist in Abbildung 17 (S. 84) dargestellt. Aus genomischer DNS des Ribotyp 001-Stammes *C. difficile* RK 365 wurden mit Hilfe aller vier *Primerpaare* Fragmente spezifischer Länge (ca. 1500 bp, 151 bp, 484 bp und 199 bp) amplifiziert. Aus genomischer DNS des Ribotyp 014-Stammes *C. difficile* 398 wurde nur ein Fragment von ca. 1500 bp Länge und ein Fragment von 484 bp Länge amplifiziert, die aus der spezifischen Bindung der *Primerpaare* 1a (616v\_alt/100K) bzw. 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) an die entsprechenden Regionen der genomischen Matrizen-DNS resultieren. Aus genomischer DNS der übrigen Stämme wurde nur je ein Fragment von ca. 1500 bp Länge, resultierend aus der Bindung des *Primerpaares* 1a, amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen wurden für die Multiplex-PCR zur Überprüfung der in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide ohne Veränderung übernommen.



**Abbildung 17: Geldokumentation der Multiplex-PCR zur Evaluierung der PCR-Bedingungen**

2 % (w/v) Agarose in 1x TAE, gefärbt in Ethidiumbromid und photographisch dokumentiert.

Spurenbelegung: **M1**, 100 bp DNA Ladder; **M2**, 1 Kb plus DNA Ladder (beide Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); **1**, *C. difficile* RK 365 (Ribotyp (RT) 001); **2**, *C. difficile* 398 (RT 014); **3**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); **4**, *Escherichia coli* ATCC 11775; **5**, *Klebsiella oxytoca* DSM 5175; **6**, *K. terrigena* DSM 2687; **7**, *Edwardsiella tarda* LMG 2793; **8**, *Yersinia ruckeri* LMG 3279; **9**, *Campylobacter jejuni* ATCC 29428; **10**, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; **11**, *En. avium* DSM 20679; **12**, *En. dispar* DSM 6630

Die Geldokumentation zeigt, dass je ein aus Amplifikation mit dem 16S rDNS gerichteten Primerpaar 616v\_alt 100K resultierendes Fragment (ca. 1500 bp) aus genomischer DNS aller verwendeten Stämme generiert werden konnte. Ein aus Amplifikation mit dem gegen das Fragment C\_diff\_27\_11 gerichteten Primerpaar CDiff\_27\_11\_F1/R1 resultierendes Fragment (484 bp) wurde nur aus genomischer DNS der beiden *C. difficile* Stämme amplifiziert, aus genomischer DNS des Stammes RK 365 allerdings in wesentlich höherer Konzentration. PCR-Produkte, die aus Amplifikation mit den gegen das Fragment C\_diff\_RK305 bzw. das Fragment ZP\_05329368 (*C. difficile* QCD-63q42) gerichteten Primerpaaren CDiff\_RK305\_F2/R1 bzw. CDiff\_001\_F2/R2 resultieren (199 bp bzw. 151 bp), konnten nur aus genomischer DNS des Stammes RK 365 generiert werden.

### III.4.2 Diagnostische Multiplex-PCR

In mehreren Multiplex-PCRs mit einer *Annealing*temperatur von 55 °C wurde genomische DNS aller verfügbaren *C. difficile* Stämme als Matrize verwendet sowie Aliquots extrahierter DNS aus Stuhlproben von Patienten aus Bayern mit *Clostridium difficile* assoziierter Diarrhö, die von der AmplexDiagnostics GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Genomische DNS der in Tabelle 2 (S. 40) aufgelisteten Mikroorganismen diente als Negativkontrolle für die diagnostischen PCRs mit den in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotiden.

Die Ergebnisse der Multiplex-PCRs mit genomischer DNS aller verfügbaren *C. difficile* Stämme, extrahierter DNS aus Patienten-Stuhlproben sowie der als Negativkontrolle dienenden genomischen DNS sind in Tabelle 16 (S. 85) zusammengefasst.

Durch Verwendung eines als Positivkontrolle eingesetzten 16S rDNS-gerichteten Primerpaares (616v\_alt/100K oder 616v\_alt/609RII, Primerpaar 1a bzw. b) konnte je ein Fragment spezifischer Größe (ca. 1500 bzw. 800 bp) aus genomischer DNS von 96 der 106 verwendeten *C. difficile* Stämme, aus genomischer DNS aller 24 Patientenstuhlproben sowie aus genomischer DNS von zehn der elf als Negativkontrolle eingesetzten Mikroorganismen generiert werden.

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen Multiplex-PCRs mit den Primerpaaren 1a bzw. 1b, 2, 3 und 4\* (vgl. Tab. 15, S. 83) (55 °C Annealingtemperatur)**

Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*				Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*			
	1	2	3	4		1	2	3	4
<b>Clostridium difficile Ribotyp 001</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 014</b>				
<i>C. difficile</i> RK 305	+	+	-	+	<i>C. difficile</i> 163	+	-	+	-
<i>C. difficile</i> RK 311	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 393	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> RK 365	+	+	+	+	<i>C. difficile</i> 394	+	-	+	-
<i>C. difficile</i> Ty 859	+	-	+	+	<i>C. difficile</i> 398	+	-	+/-	-
<i>C. difficile</i> Landon-1	+	-	+	+	<i>C. difficile</i> 400	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-1	-	-	+	+	<i>C. difficile</i> 418	+	-	+	-
<i>C. difficile</i> TGC 001-2	+	+	-	-	<i>C. difficile</i> 421	+/-	-	+/-	-
<i>C. difficile</i> 220	+/-	+	-	-	<i>C. difficile</i> 423	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 268	-	+/-	-	+	<i>C. difficile</i> 475	+	-	-	+/-
<i>C. difficile</i> 351	+/-	+	-	+	<i>C. difficile</i> 521	+	-	+	-
<i>C. difficile</i> 422	+	+	-	-	<i>C. difficile</i> 523	+	-	+	-
<i>C. difficile</i> 433	+/-	+	-	+	<i>C. difficile</i> 527	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 472	+/-	+	+/-	-	<i>C. difficile</i> 558	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 612	+/-	+/-	+/-	+	<i>C. difficile</i> 628	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 903	+/-	-	-	+/-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 015</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 002</b>					<i>C. difficile</i> 164	+	-	-	+
<i>C. difficile</i> 384	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 412	+	-	-	+
<i>C. difficile</i> 416	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 698	+	-	-	+
<i>C. difficile</i> 420	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 808	+/-	-	-	+
<i>C. difficile</i> 480	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 017</b>				
<i>C. difficile</i> 526	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 269	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 554	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 435	+/-	-	+	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 005</b>					<i>C. difficile</i> 604	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 436	+	+/-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 023</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 006</b>					<i>C. difficile</i> 34	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 201	+/-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 181	+	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 010</b>					<i>C. difficile</i> 403	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 213	+/-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 541	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 234	+/-	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 027</b>				
<i>C. difficile</i> 391	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 2001	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 399	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 2003	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 614	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 552 (Variation von 027)	+	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 012</b>					<i>C. difficile</i> 2002 (Variation von 027)	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 390	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 029</b>				
<i>C. difficile</i> 425	+/-	-	-	+/-	<i>C. difficile</i> 419	+	-	-	-

Fortsetzung nächste Seite

\* verwendete Primerpaare: 1, 616v\_alt/100K bzw. 616v\_alt/609RII; 2, CDiff\_001\_F2/R2; 3, CDiff\_27\_11\_F1/R1; 4, CDiff\_RK305\_F2/R1

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen Multiplex-PCRs mit den Primerpaaren 1a bzw. 1b, 2, 3 und 4\* (vgl. Tab. 15, S. 83) (55 °C Annealingtemperatur) (Fortsetzung von S. 85)**

Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*				Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*			
	1	2	3	4		1	2	3	4
<b>Clostridium difficile Ribotyp 033</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 081</b>				
<i>C. difficile</i> 581	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 477	+	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 035</b>					<i>C. difficile</i> 522				
<i>C. difficile</i> 413	-	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 087</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 045</b>					<i>C. difficile</i> 160				
<i>C. difficile</i> 72	-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 427	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 106	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 090</b>				
<i>C. difficile</i> 119	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 434	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 476	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 094</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 046</b>					<i>C. difficile</i> 396				
<i>C. difficile</i> 388	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 103</b>				
<b>Clostridium difficile Ribotyp 049</b>					<i>C. difficile</i> 161				
<i>C. difficile</i> 387	+	-	-	-	<b>Clostridium difficile Ribotyp 135</b>				
<i>C. difficile</i> 478	+	-	-	+/-	<i>C. difficile</i> 702	+/-	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 064</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 137</b>				
<i>C. difficile</i> 395	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 424	+	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 070</b>					<b>Clostridium difficile Ribotyp 149</b>				
<i>C. difficile</i> 385	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 236	-	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 072</b>					<b>Clostridium difficile Stämme unbekanntem Ribotyps</b>				
<i>C. difficile</i> 328	-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 162	+/-	-	-	-
<b>Clostridium difficile Ribotyp 078</b>					<i>C. difficile</i> 221				
<i>C. difficile</i> 56	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 262	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 183	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 392	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 196	+	-	-	-	<i>C. difficile</i> 397	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 200	+/-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 479	+/-	-	-	-
<i>C. difficile</i> 240	+/-	-	+	-	<i>C. difficile</i> 524	+/-	+/-	-	-
<i>C. difficile</i> 243	-	-	-	-	<i>C. difficile</i> 700	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 372	+/-	-	-	-					
<i>C. difficile</i> 448	+/-	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 450	+/-	-	-	-					
<i>C. difficile</i> 694	+/-	-	-	-					
<i>C. difficile</i> 754	+/-	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 760	+/-	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 836	+	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 855	+/-	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 906	+	-	+	-					
<i>C. difficile</i> 1018	+/-	-	-	-					

Fortsetzung nächste Seite

\* verwendete Primerpaare: 1, 616v\_alt/100K bzw. 616v\_alt/609RII; 2, CDiff\_001\_F2/R2; 3, CDiff\_27\_11\_F1/R1; 4, CDiff\_RK305\_F2/R1

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten diagnostischen Multiplex-PCRs mit den Primerpaaren 1a bzw. 1b, 2, 3 und 4\* (vgl. Tab. 15, S. 83) (55 °C Annealingtemperatur) (Fortsetzung von S. 86)**

Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*				Probe	Ergebnis der PCR mit Primerpaar*			
	1	2	3	4		1	2	3	4
<b>extrahierte DNS aus Patienten-Stuhlproben</b>					<b>Negativkontrollen</b>				
P14	+	-	+	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	+	-	-	-
P25	+	-	-	-	<i>Escherichia coli</i> DSM 613	+	-	-	-
P36	+	-	-	-	<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	-	-	-	-
P44	+	-	-	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 5175	+	-	-	-
P47	+	-	+	-	<i>Listeria monocytogenes</i> RIII	+	-	-	-
P48	+	-	-	-	<i>Edwardsiella tarda</i> LMG 2793	+	-	-	-
P50	+	-	-	-	<i>Campylobacter jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> ATCC 29428	+	-	-	-
P51	+	-	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	-	-	-
P52	+	-	-	-	<i>Enterococcus avium</i> DSM 20679	+	-	-	-
P53	+	-	-	-	<i>Enterococcus dispar</i> DSM 6630	+	-	-	-
P54	+	-	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> DSM 20380	+	-	-	-
P55	+	-	+	+					
P56	+	-	-	-					
P57	+	-	-	-					
P58	+	-	-	-					
P59	+	-	+	+					
P61	+	-	-	-					
P65	+	-	-	-					
P66	+	-	-	-					
P76	+	-	-	-					
P78	+	-	-	+					
P79	+	-	-	-					
P80	+	-	-	-					
P81	+	-	-	-					

\* verwendete Primerpaare: 1, 616v\_alt/100K bzw. 616v\_alt/609RII; 2, CDiff\_001\_F2/R2; 3, CDiff\_27\_11\_F1/R1; 4, CDiff\_RK305\_F2/R1

-, negativ, es wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;

+, positiv, es wurde ein Amplifikat spezifischer Größe gebildet;

+/-, bei einer Wiederholung der PCR mit diesem *Template* wurde mindestens einmal ein Amplifikat spezifischer Größe gebildet, mindestens einmal wurde kein Amplifikat spezifischer Größe gebildet.

Fragmente von 151 bp Länge (resultierend aus Bindung des Primerpaares 2, CDiff\_001\_F2/R2) wurden aus genomischer DNS von elf der 15 verwendeten als Ribotyp 001 deklarierten *C. difficile* Stämme (RK 305, RK311, RK365, TGC 001-2, 220, 268, 351, 422, 433, 472 und 612) sowie aus genomischer DNS des als Ribotyp 005 deklarierten *C. difficile* Stammes 436 und den *C. difficile* Stämmen 221 und 524 unbekanntem Ribotyps gebildet. Durch Primerpaar 2 (CDiff\_001\_F2/R2) werden demnach fast ausschließlich *C. difficile* Stämme vom Ribotyp 001 erfasst, auch wenn nicht alle verwendeten Vertreter umfassend nachgewiesen werden konnten (11 von 15).

Fragmente von 484 bp Länge (resultierend aus Bindung des Primerpaares 3, CDiff\_27\_11\_F1/R1) wurden aus genomischer DNS von sieben der 15 verwendeten als

Ribotyp 001 deklarierten *C. difficile* Stämme (RK 311, RK 365, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 472 und 612), aus genomischer DNS einiger als Ribotyp 014 deklarierten *C. difficile* Stämme (163, 394, 398, 418, 421, 521 und 523), des als Ribotyp 017 deklarierten *C. difficile* Stammes 435 sowie einiger als Ribotyp 078 deklarierten *C. difficile* Stämme (240, 448, 754, 760, 836, 855 und 906) gebildet. Diese Ergebnisse korrelieren, soweit vorhanden, mit den Sequenzdaten aus der vergleichenden Sequenzanalyse (vgl. Kap. III.2.1.3, S. 64). Außerdem wurden mit *Primerpaar 3* Fragmente von 484 bp Länge aus extrahierter DNS der Patienten-Stuhlproben P14, P47, P55 und P59 generiert. Mit *Primerpaar 3* ist demnach kein ausschließlicher und umfassender Nachweis des Ribotyps 001 möglich. Dennoch sind alle erfassten Ribotypen von klinischer Relevanz und werden vermehrt in Krankenhäusern oder im ambulanten Bereich bei schweren *C. difficile* Infektionen isoliert (vgl. Kap. IV.4, S. 116).

Fragmente von 199 bp Länge (resultierend aus Bindung des *Primerpaares 4*, CDiff\_RK305\_F2/R1) wurden aus genomischer DNS von elf der 15 verwendeten als Ribotyp 001 deklarierten *C. difficile* Stämme (RK 305, RK 311, RK 365, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 268, 351, 433, 612 und 903), aus genomischer DNS des als Ribotyp 012 deklarierten *C. difficile* Stammes 425, des als Ribotyp 014 deklarierten *C. difficile* Stammes 475, der als Ribotyp 015 deklarierten *C. difficile* Stämme 164, 412, 698 und 808 sowie des als Ribotyp 049 deklarierten Stammes 478 gebildet. Diese Ergebnisse korrelieren, soweit vorhanden, mit den Sequenzdaten aus der vergleichenden Sequenzanalyse (vgl. Kap. III.2.2.3, S. 72). Zudem wurden Fragmente von 199 bp Länge aus extrahierter DNS der Patienten-Stuhlproben P55 und P59 amplifiziert. Auch mit *Primerpaar 4* ist also kein ausschließlicher und umfassender Nachweis des Ribotyps 001 möglich. Ebenso wie die mit *Primerpaar 3* erfassten Ribotypen sind jedoch die mit *Primerpaar 4* erfassten Ribotypen von klinischer Relevanz (vgl. Kap. IV.4, S. 116).

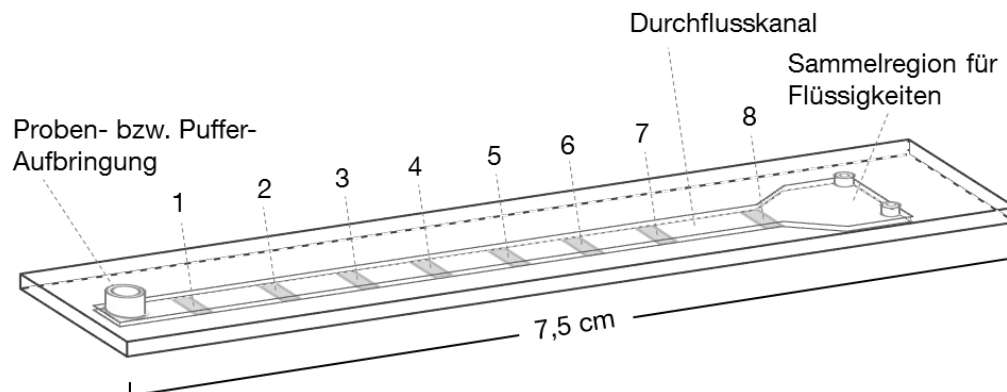
Es wurde keinerlei Fragment aus genomischer DNS der elf als Negativkontrolle eingesetzten Mikroorganismen, das aus Bindung eines der *Primerpaare 2-4* resultiert, gebildet. Alle in dieser Arbeit entwickelten *Primerpaare* sind somit im Rahmen der getesteten Spezies spezifisch für *C. difficile*.

Zwar erfassen die drei in dieser Arbeit entwickelten *Primerpaare* jeweils nicht alle als Ribotyp 001 deklarierten Stämme, es sind allerdings nicht alle Vertreter dieses Ribotyps mit erhöhter Virulenz und schwerem Krankheitsverlauf zu verbinden. Zudem ist keines der in dieser Arbeit entwickelten *Primerpaare* ausschließlich spezifisch für Isolate des Ribotyps 001. Die Ribotyp-bestimmende 16S-23S-*Spacer*-Sequenz steht allerdings weder in Zusammenhang mit der Pathogenität des jeweiligen Stammes noch nimmt sie Einfluss auf andere Genomabschnitte. Alle erfassten Ribotypen sind von klinischer Relevanz; die Verwendung dieser *Primerpaare*, weist demnach durchaus einen diagnostischen Wert auf, vor allem, wenn sie in Kombination in Form von einer Multiplex-PCR eingesetzt werden (vgl. auch Kap. IV.4, S. 116).



### III.5 Hybridisierungsexperimente mit dem Prototyp „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ (Genspeed®)

Die entwickelten PCR-Systeme sollten auf einer neuen Plattform Anwendung finden, die für den patientennahen Einsatz, d.h. für den *point-of-care* (POC)-Bereich entwickelt wurde. Das Nachweissystem besteht aus Multiplex-PCR und anschließender Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte mittels reverser Sondenhybridisierung mit dem Prototyp eines neu entwickelten, Durchfluss-basierten Chip-Systems (Prototyp „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“). Der Test wurde ursprünglich so ausgelegt, dass in einem Arbeitsschritt der Nachweis Toxin-produzierender *Clostridium difficile* Stämme sowie die Charakterisierung dieser in hochpathogene (Ribotyp 027) bzw. pathogene (mittels auf Fragment C\_diff\_27\_11 basierender *Primer* und Sonden) und Ribotyp 001 (mittels auf Fragment C\_diff\_RK305 basierender *Primer* und Sonden) möglich wäre.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung des für die Hybridisierungen mit dem „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ System verwendeten Durchfluss-Chips**

**1:** negCont, Negativkontrolle; **2:** CDTXB, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paars amplifiziert wurden; **3:** RT027, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paars amplifiziert wurden; **4:** SDE-Pr2, Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 („*Primer*paar 3“) generierter PCR-Produkte; **5:** F305A **und 6:** F305B, Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 („*Primer*paar 4“) amplifizierter PCR-Produkte; **7:** hybCont, Positivkontrolle/Durchflusskontrolle; **8:** Waste.

Basierend auf den Sequenzdaten der mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung isolierten Fragmente C\_diff\_27\_11 und C\_diff\_RK305\_1 wurden Fangsonden entwickelt, die jeweils innerhalb der durch die spezifischen *Primer* amplifizierten Fragmente binden. Diese wurden auf dem Durchfluss-basierten Chip immobilisiert (vgl. Abb. 18). Auf Basis des Fragments C\_diff\_27\_11 wurde die Sonde SDE-Pr2 designt („SDE“ für Süddeutscher Epidemie-Stamm). Auf Basis des Fragments C\_diff\_RK305\_1 wurden zwei unterschiedliche Fangsonden – F305A und F305B - entwickelt (vgl. Tab. 26, S. 139 im Anhang und Kap. II.14, S. 53). Zusätzlich wurde eine Sonde zum Nachweis des Toxin B-Gens von *C. difficile* (CDTXB) als Positivkontrolle sowie eine Sonde zum Nachweis des Ribotyp 027 (RT27) auf dem Chip inkludiert, deren Sequenzen jedoch nicht veröffentlicht werden können, da sie

bereits Anwendung in von der AmplexDiagnostics GmbH entwickelten Nachweissystem (hyplex® ClosTox bzw. ClosTox 027) für *C. difficile* finden. Das Fragment C\_diff\_001 wurde zeitlich erst nach Abschluss der Hybridisierungsversuche mit dem Q4POC-System identifiziert. Auf Grund dessen wurden keine Sonden auf Basis dieses Genomabschnittes entwickelt und ausgetestet. Eine schematische Darstellung des verwendeten Durchfluss-Chips ist in Abbildung 18 (S. 89) gezeigt.

Die entsprechenden Zielfragmente wurden mittels PCR (vgl. Kap. II.3.3, S. 42) unter Verwendung von *C. difficile* DNS-Material sowie extrahierter DNS aus Patienten-Stuhlproben und den für die Fragmente C\_diff\_27\_11 und C\_diff\_RK305\_1 spezifischen *Primerpaaren* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) bzw. 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) (vgl. Tab. 25, S. 138 im Anhang) sowie zwei von der AmplexDiagnostics GmbH entwickelten *Primerpaaren*, die spezifisch an das Toxin B-Gen von *C. difficile* (CTXB-F/R) bzw. an eine den Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc (FS-F/R) binden, amplifiziert. Die *Rückwärtsprimer* sind jeweils am 5'-Ende biotinyliert, um eine spätere Detektion der PCR-Produkte mittels Streptavidin-AP-Konjugat und Chemilumineszenz-Substrat zu ermöglichen. Die Hybridisierungen wurden wie in Kapitel II.14 (S. 53) beschrieben mit 2-3 M Guanidinthiocyanat (GuSCN) durchgeführt und zum Nachweis der entstandenen Hybride von Sonde und PCR-Produkt der emittierte Photostrom nach Zugabe von Streptavidin-AP-Konjugat und Chemilumineszenz-Substrat ortsspezifisch für jede einzelne Sonde gemessen. Ein Signal wird als positiv gewertet, wenn ein Photostrom von über 300 pA entsteht, der aus Hybridisierung der entsprechenden PCR-Produkte mit der jeweiligen Sonde resultiert.

### III.5.1 Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen

Beim Q4POC-System handelt es sich um ein völlig neuartiges Testsystem, das derzeit nur für den Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Anwendung findet. Aus diesem Grund sollten für die Verwendung von *C. difficile* DNS-Material zunächst die optimalen Bedingungen für PCR und anschließende Hybridisierung evaluiert werden. Zunächst wurden PCR-Produkte, die mit jeweils einem der *Primerpaare* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) bzw. 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) generiert wurden, eingesetzt, um die optimalen Bedingungen von PCR und Hybridisierung für jedes *Primerpaar* individuell testen zu können. Anschließend wurden die Bedingungen für die Multiplex-PCR optimiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Optimierung der Zusammensetzung des *Primermixes*, der für die Multiplex-PCR verwendet werden sollte. Eine Übersicht der getesteten *Primermixe* sowie ihre jeweilige Zusammensetzung ist in Tabelle 18 (S. 94) gegeben. Zusätzlich wurden mit einzelnen Proben verschiedene *Annealing*temperaturen für die Single- und Multiplex-PCR und verschiedene GuSCN-Konzentrationen für die anschließende Hybridisierung der PCR-Produkte ausgetestet, um die Bedingungen eventuell weiter zu verbessern.

### III.5.1.1 Versuche zur Optimierung mit Singleplex-PCR-Produkten

Als Matrize für die Singleplex-PCRs wurde genomische DNS der Ribotyp 001 Stämme RK 311 und RK 379, des Ribotyp 027 Stammes 216 sowie des Stammes 131 unbekanntes Ribotyps, der bei Vorversuchen der AmplexDiagnostics GmbH positiv auf Toxin B und negativ auf SDE und RT027 getestet wurde (persönliche Mitteilung), eingesetzt. Genomische DNS der Stämme 216 und 131 wurde ausschließlich für die Evaluierung der optimalen Bedingungen für die Hybridisierungen mit dem Q4POC-System verwendet und fand keine weitere Anwendung im Laufe dieser Arbeit. Auf Grund der Schmelztemperatur des *Primer*paars FS-F/R wurde zunächst für die PCR eine *Annealing*temperatur von 48 °C verwendet. Je *Primer* wurden 2 µL einer 7,5 pmol/µL Lösung pro 20 µL PCR-Ansatz eingesetzt. Die Messungs-Ergebnisse der Hybridisierungen mit den Singleplex-PCR-Produkten, die mit Hilfe des *Primer*paars 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) bzw. des *Primer*paars 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) generiert wurden, sind in Tabelle 17 aufgelistet, eine graphische Darstellung der Hybridisierungsereignisse ist in Abbildung 19 (S. 93) abgebildet.

**Tabelle 17: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Singleplex-PCR-Produkten zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen**

Proben-Nr.	Ergebnis [pA]						hybCont
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	
<b>mit <i>Primer</i>paar 3 (CDiff_27_11_F1/R1) generierte PCR-Produkte; 48 °C <i>Annealing</i>temperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK311 (RT 001)	14	31	210	6.705	174	24	1.062
<i>C. difficile</i> RK379 (RT 001)	76	81	268	8.229	314	56	1.373
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	15	78	167	218	110	22	1.315
<i>C. difficile</i> 131 (RT unbekannt)	16	17	119	5.695	130	36	1.130
<b>mit <i>Primer</i>paar 4 (CDiff_RK305_F2/R1) generierte PCR-Produkte; 48 °C <i>Annealing</i>temperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK311 (RT 001)	5	14	10	1	3.273	2.962	846
<i>C. difficile</i> RK379 (RT 001)	145	10	35	63	4.596	3.472	983
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	55	8	46	2.599	4.832	393	1.070
<i>C. difficile</i> 216* (RT 027)	116	6	35	512	4.016	30	1.018
<i>C. difficile</i> 131 (RT unbekannt)	194	158	435	538	254	55	1.260
<b>mit <i>Primer</i>paar 4 (CDiff_RK305_F2/R1) generierte PCR-Produkte; 52 °C <i>Annealing</i>temperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK311 (RT 001)	105	5	24	36	2.270	1.885	632
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	43	47	122	332	297	38	2.269
<i>C. difficile</i> 216* (RT 027)	179	199	73	219	106	26	1.337
<i>C. difficile</i> 131 (RT unbekannt)	18	62	142	165	115	31	1.344

**negCont:** Negativkontrolle; **CDTXB:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paars amplifiziert wurden; **RT027:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paars amplifiziert wurden; **SDE-Pr2:** Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B:** Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont:** Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

RT: Ribotyp

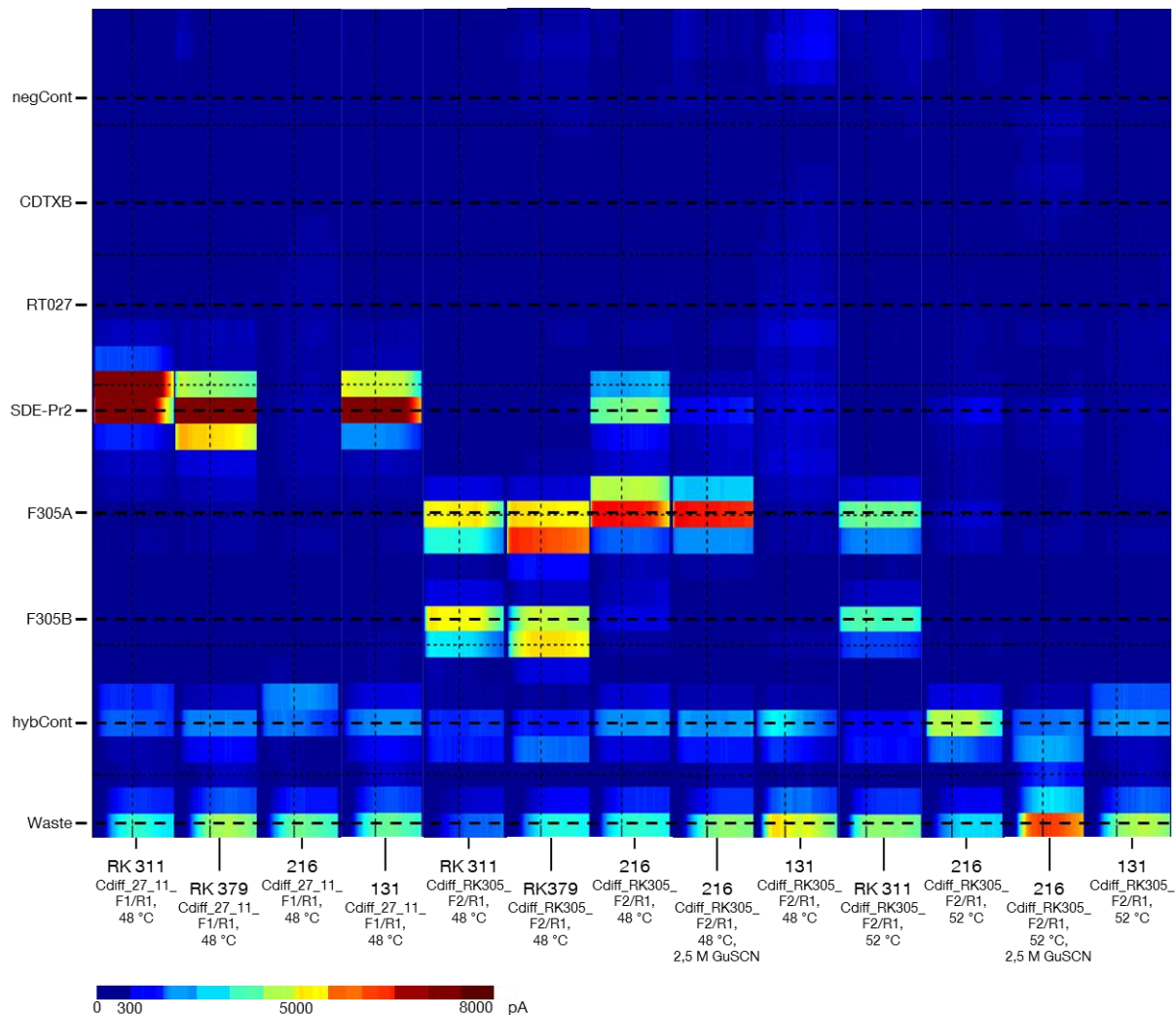
\*: Hybridisierung mit 2,5 M Guanidinthiocyanat (GuSCN)

■: stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■: positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Hybridisierungsergebnisse, die mit den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) übereinstimmen sind fett gedruckt.

Auf Grund der Ergebnisse der während dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche (diagnostische Single- und Multiplex-PCRs vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61 und Kap. III.4.2, S. 84) sowie der von der AmplexDiagnostics GmbH durchgeführten Vorversuche (persönliche Mitteilung) wurde erwartet, dass unter Verwendung des *Primerpaares* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 gebildet und bei der anschließenden Hybridisierung durch Sonde SDE-Pr2 nachgewiesen werden, nicht jedoch aus genomischer DNS der Stämme 216 und 131. Bei Hybridisierung der mit *Primerpaar* 3 und einer *Annealing*temperatur von 48 °C generierten PCR-Produkte wurden an Sonde SDE-Pr2 Hybride mit genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 korrekt positiv nachgewiesen. Außerdem wurde ein falsch positives Signal, das aus Hybridisierung eines PCR-Produkts aus genomischer DNS des Stammes 131 mit Sonde SDE-Pr2 resultiert, gemessen. Des Weiteren wurde ein schwaches, falsch positives Signal an Sonde F305A gemessen, das aus Hybridisierung eines PCR-Produktes aus genomischer DNS des Stammes RK 379 resultiert (vgl. Tab. 17, S. 91 und Abb. 19, S. 93).

Laut der während dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche (diagnostische Single- und Multiplex-PCRs vgl. Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) sowie der von der AmplexDiagnostics GmbH durchgeführten Vorversuche (persönliche Mitteilung) sollten unter Verwendung des *Primerpaares* 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) ebenfalls PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379, hingegen nicht aus genomischer DNS der Stämme 216 und 131 gebildet werden. Bei Hybridisierung der entsprechenden PCR-Produkte wurden an den Sonden F305A und F305B PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 korrekt positiv nachgewiesen. Zusätzlich wurde ein PCR-Produkt aus genomischer DNS des Stammes 216 falsch positiv an Sonde F305A und F305B nachgewiesen. Zudem wurden an Sonde SDE-Pr2 positive Signale gemessen, die aus Hybridisierung von PCR-Produkten aus genomischer DNS der Stämme 131 und 216 resultieren (vgl. Tab. 17, S. 91 und Abb. 19, S. 93).

Aus diesem Grund wurde eine weitere Singleplex-PCR mit *Primerpaar* 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) mit einer höheren *Annealing*temperatur von 52 °C unter Verwendung von DNS-Material der Stämme RK 311, 216 und 131 durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend hybridisiert. An Sonde F305A und F305B wurde in diesem Fall ausschließlich ein PCR-Produkt aus genomischer DNS des Stammes RK 311 nachgewiesen, nicht jedoch aus genomischer DNS der Stämme 216 und 131. An Sonde SDE-Pr2 wurde zwar weiterhin ein aus Hybridisierung eines PCR-Produkts aus genomischer DNS des Stammes 216 resultierendes Signal detektiert, die Signalstärke konnte dennoch deutlich reduziert werden (332 pA im Vergleich zu 2.599 pA). Durch Erhöhung der *Annealing*temperatur konnte die Spezifität demnach verbessert werden (vgl. Tab 17, S. 91).



**Abbildung 19: Graphische Darstellung der Q4POC-Hybridisierungsergebnisse mit Singleplex-PCR-Produkten**

Nach jeder Hybridisierung mit dem Genspeed®-Testsystem werden die an jeder Sonde gemessenen Signalintensitäten in Form einer Graphik farblich dargestellt.

Die Graphik zeigt die Hybridisierungen mit Singleplex-PCR-Produkten, die zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen durchgeführt wurden. Auf der linken Bildseite sind die auf dem Chip befindlichen Sonden von oben nach unten angezeigt: **negCont**, Negativkontrolle; **CDTXB**, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027**, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2**, Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A und F305B**, Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont**, Positivkontrolle/Durchflusskontrolle; **Waste**, Signale der überschüssigen Flüssigkeiten. Auf der unteren Bildseite ist das jeweilige PCR-Produkt mit *C. difficile* Probennummer, verwendetem *Primer*paar und der *Annealing*temperatur angegeben.

Bei einem Photostrom von > 300 pA wird ein Signal als positiv gewertet.

Die PCR-Produkte der Singleplex-PCR mit *Annealing*temperaturen von 48 °C und 52 °C mit *Primer*paar 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) aus genomischer DNS des Stammes 216 wurden zusätzlich unter Verwendung von 2,5 M GuSCN für die Hybridisierung eingesetzt. Die Erhöhung der GuSCN-Konzentration führte zu einer leichten Verbesserung der Spezifität, dennoch wurden PCR-Produkte, die mit einer *Annealing*temperatur von 48 °C generiert wurden, an Sonde SDE-Pr2 und F305A nachgewiesen. Die Erhöhung der

*Annealing*temperatur auf 52 °C führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Spezifität, sodass für die PCR zur Amplifikation der Zielfragmente eine optimale *Annealing*temperatur von mindestens 52 °C evaluiert und für die weiteren Versuche verwendet wurde.

### III.5.1.2 Versuche zur Optimierung mit Multiplex-PCR-Produkten

Zur Optimierung der Multiplex-PCR zur Amplifikation der Zielregionen sowie der Hybridisierungsbedingungen mit Multiplex-PCR-Produkten wurde ebenfalls zunächst genomische DNS der Ribotyp 001-Stämme RK 311 und RK 379, des Ribotyp 027-Stammes 216 und des Stammes 131 unbekanntes Ribotyps sowie zusätzlich des Ribotyp 078-Stammes 855 als Matrize verwendet. In Tabelle 18 sind alle getesteten *Primer*kombinationen sowie die jeweils für die PCR eingesetzte Menge jedes *Primer*mixes aufgelistet.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der für die Multiplex-PCR zur Amplifikation der Zielregionen getesteten *Primer*mixe**

<i>Primer</i>	eingesetzte Konzentration des <i>Primers</i> in <i>Primer</i> mix			
	Multi <sup>1</sup>	Multi <sup>2</sup>	Multi <sup>3</sup>	Multi <sup>4</sup>
CTXB-F	7,5 pmol/μL	5 pmol/μL	5 pmol/μL	7,5 pmol/μL
CTXB-R	7,5 pmol/μL	5 pmol/μL	5 pmol/μL	7,5 pmol/μL
FS-F	7,5 pmol/μL	/	/	/
FS-R	7,5 pmol/μL	/	/	/
CDiff_27_11_F1	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	/	7,5 pmol/μL
CDiff_27_11_R1	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	/	7,5 pmol/μL
Cdiff_RK305_F2	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	15 pmol/μL
Cdiff_RK305_R1	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	7,5 pmol/μL	15 pmol/μL
<b>für 20 μL PCR-Ansatz eingesetzte Menge des <i>Primer</i>mixes</b>				
	2 μL Mix	2 μL Mix	2 μL Mix	1 μL jedes <i>Primer</i> s*

Zur Optimierung der Multiplex-PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Zielregionen für die Q4POC-Hybridisierungen wurden vier verschiedene *Primer*mixe ausgetestet. Die Tabelle enthält eine Übersicht über die jeweils im *Primer*mix verwendeten *Primer*konzentrationen. Außerdem ist die für die Multiplex-PCR eingesetzte Menge des jeweiligen *Primer*mixes pro 20 μL Ansatz angegeben.

\**Primer*mix Multi<sup>4</sup> wurde nicht in Form einer vorgefertigten Mischung der jeweiligen *Primer* dem PCR-Mastermix zugegeben, sondern die *Primer* wurden einzeln dem PCR-Mastermix hinzu pipettiert.

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten *C. difficile* Isolaten handelt es sich um toxische Stämme, d.h. sie produzieren zumindest das Toxin B, das entsprechende Gen *tcdB* befindet sich also auf dem Genom. Aus genomischer DNS aller Stämme sollte demnach ein PCR-Produkt mittels *Primer*paar CTXB-F/R gebildet werden und an der entsprechenden Sonde CDTXB nachweisbar sein. Laut der in dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche (diagnostische Single- und Multiplex-PCRs vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) sowie der von der AmplexDiagnostics GmbH durchgeführten Vorversuche (persönliche Mitteilung) sollten aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 (Ribotyp 001) zusätzlich mittels der *Primer*paare 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) und 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) Amplifikate gebildet und an den entsprechenden Sonden SDE-Pr2,

F305A und F305B nachgewiesen werden. Aus genomischer DNS des Stammes 855 (Ribotyp 078) sollte zusätzlich mittels des *Primer*paares CDiff\_27\_11\_F1/R1 (*Primer*paar 3) ein PCR-Produkt gebildet werden und an der entsprechenden Sonde SDE-Pr2 nachweisbar sein. Aus genomischer DNS des Stammes 216 (Ribotyp 027) sollte mittels des *Primer*paares FS-F/R ein Amplifikat gebildet und an der entsprechenden Sonde RT27 nachgewiesen werden. Außerdem sollte aus genomischer DNS des Stammes 131 mittels der *Primer*paare FS-F/R und CDiff\_27\_11\_F1/R1 (*Primer*paar 3) kein Amplifikat gebildet werden und demnach nicht an den entsprechenden Sonden nachweisbar sein (vgl. Tab. 19). Die Ergebnisse aller zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen durchgeführten Q4POC-Hybridisierungen mit Multiplex-PCR-Produkten sind in Tabelle 20 (S. 96) und 21 (S. 99) zusammengefasst.

**Tabelle 19: Erwartete Q4POC-Hybridisierungs-Ergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten**

Proben-Nr.	Ribotyp	Erwartetes Hybridisierungsergebnis an Sonde				
		CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B
<i>C. difficile</i> RK311*	001	+	-	+	+	+
<i>C. difficile</i> RK379		+	-	+	+	+
<i>C. difficile</i> 855	078	+	-	+	-	-
<i>C. difficile</i> 216	027	+	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 131	unbekannt	+	-	-	unbekannt	unbekannt

+, laut Vorversuchen sollte an der Sonde ein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar sein;  
 -, laut Vorversuchen sollte an der Sonde kein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar sein.

### Optimierungsversuche mit den *Primer*mixen „Multi<sup>1</sup>“ bis „Multi<sup>3</sup>“

Zur Amplifikation der Zielfragmente wurde zunächst ein *Primer*mix („Multi<sup>1</sup>“) hergestellt, der die *Primer* CTXB-F und CTXB-R (*Primer*paar zur Amplifikation des Toxin B-Gens von *C. difficile*), CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 (*Primer*paar 3), FS-F und FS-R (*Primer*paar zur Amplifikation einer Ribotyp 027 differenzierenden Region auf dem *C. difficile* PaLoc) sowie CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 (*Primer*paar 4) isomolar in einer Konzentration von je 7,5 pmol/μL enthielt. Pro 20 μL PCR-Ansatz wurden 2 μL dieses *Primer*mixes verwendet, sodass von jedem *Primer* 15 pmol für die Amplifikation eingesetzt wurden (vgl. Tab. 18, S. 94). Die PCR mit dem *Primer*mix Multi<sup>1</sup> wurde bei *Annealing*temperaturen von 56 °C und 54 °C durchgeführt und die entstandenen PCR-Produkte für die Hybridisierung mit dem „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ Prototyp mit 2 M GuSCN verwendet.

Bei den Hybridisierungsversuchen mit PCR-Produkten, die mit *Primer*mix Multi<sup>1</sup> und einer *Annealing*temperatur von 56 °C generiert wurden, konnten nur aus genomischer DNS von *C. difficile* RK 311 generierte PCR-Produkte an Sonde CDTXB, F305A und F305B korrekt positiv nachgewiesen werden. Aus genomischer DNS der Stämme 216 und 131 wurden keinerlei Amplifikate nachgewiesen. Zudem wurde kein PCR-Produkt an Sonde SDE-Pr2 detektiert, auch nicht aus genomischer DNS von *C. difficile* RK 311.

**Tabelle 20: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Multiplex-PCR-Produkten zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen**

Proben-Nr.	Ergebnis [pA]						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b>mit Primermix Multi<sup>1</sup> generierte PCR-Produkte; 56 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311 (RT 001)	69	601	20	20	1.187	1.046	666
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	34	22	68	63	52	40	2.029
<i>C. difficile</i> 131 (RT unbekannt)	20	55	145	152	99	30	2.007
<b>mit Primermix Multi<sup>1</sup> generierte PCR-Produkte; 54 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311 (RT 001)	44	4.612	51	35	428	1.064	1.606
<i>C. difficile</i> RK 379 (RT 001)	60	2.731	75	154	211	462	545
<i>C. difficile</i> 855 (RT 078)	31	1.509	86	475	109	41	1.019
<i>C. difficile</i> 855* (RT 078)	86	206	118	638	161	37	1.327
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	67	1.752	223	406	137	148	1.151
<b>mit Primermix Multi<sup>2</sup> generierte PCR-Produkte; 52 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311 (RT 001)	73	4.929	27	6	1.523	1.572	1.146
<i>C. difficile</i> RK 311 <sup>◇</sup> (RT 001)	137	8.185	171	5.257	484	1.076	1.196
<i>C. difficile</i> RK 379 (RT 001)	36	5.103	40	10	1.008	2.716	1.795
<i>C. difficile</i> 855 (RT 078)	47	6.315	255	272	97	68	2.350
<i>C. difficile</i> 216 (RT 027)	64	6.429	70	38	44	35	1.475
<b>mit Primermix Multi<sup>3</sup> generierte PCR-Produkte; 52 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> Ty 859 (RT 001)	71	108	214	183	47	76	903
<i>C. difficile</i> Landon-1 (RT 001)	14	28	88	81	74	29	1.356
<i>C. difficile</i> TGC 001-1 (RT 001)	10	63	170	163	115	33	1.168

~: **Primermix Multi<sup>1</sup>**: CTXB\_F und CTXB\_R (*Primerpaar* zur Amplifikation des Toxin B-Gens von *C. difficile*), CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 (*Primerpaar* 3), FS-F und FS-R (*Primerpaar* zur Amplifikation einer Ribotyp 027 differenzierenden Region auf dem *C. difficile* PaLoc) sowie CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 (*Primerpaar* 4) isomolar in einer Konzentration von je 15 pmol/20 µL PCR-Ansatz; **Primermix Multi<sup>2</sup>**: je 10 pmol/20 µL PCR-Ansatz CTXB\_F und CTXB\_R (*Primerpaar* zur Amplifikation des Toxin B-Gens von *C. difficile*) sowie CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 (*Primerpaar* 3) und CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 (*Primerpaar* 4) isomolar in einer Konzentration von je 15 pmol/ 20 µL PCR-Ansatz; **Primermix Multi<sup>3</sup>**: CTXB-F und CTXB-R je 10 pmol/20 µL PCR-Ansatz sowie CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 (*Primerpaar* 4) je 15 pmol/20 µL PCR-Ansatz.

**negCont**: Negativkontrolle; **CDTXB**: : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primerpaares* (CTXB-F/R) amplifiziert wurden; **RT027**: Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primerpaares* (FS-F/R) amplifiziert wurden; **SDE-Pr2**: Sonde zum Nachweis mittels *Primerpaar* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B**: Sonden zum Nachweis mittels *Primerpaar* 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont**: Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

**RT**: Ribotyp; \*: Hybridisierung mit 3 M Guanidinthiocyanat (GuSCN); <sup>◇</sup>: Wiederholung der PCR mit *Primermix Multi<sup>2</sup>*, wobei die *Primerlösungen* einzeln dem PCR-Ansatz hinzugefügt und nicht im Vorfeld gemischt wurden.

■: stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■: positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Mit den Ergebnissen der Vorversuche übereinstimmende Hybridisierungsergebnisse sind fett dargestellt.

Aus diesem Grund wurde die *Annealingtemperatur* für die PCR mit *Primerpaar Multi<sup>1</sup>* auf 54 °C gesenkt. Es konnten aus genomischer DNS aller Stämme PCR-Produkte an Sonde CDTXB nachgewiesen werden. An Sonde RT27 konnte wiederum kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. An Sonde SDE-Pr2 wurden PCR-Produkte nachgewiesen, die aus genomischer DNS der Stämme 855 (korrekt positiv) und 216 (falsch positiv) generiert wurden, hingegen nicht aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 (falsch



negativ). Diese konnten jedoch bei der Hybridisierung der Singleplex-PCR-Produkte nachgewiesen werden (vgl. Tab. 17, S. 91). An Sonde F305A wurde ausschließlich ein PCR-Produkt aus genomischer DNS von *C. difficile* RK 311 nachgewiesen, an Sonde F305B sowohl aus genomischer DNS von *C. difficile* RK 311 als auch aus genomischer DNS von *C. difficile* RK 379.

Die Hybridisierung des PCR-Produktes der Multiplex-PCR mit *Primermix* Multi<sup>1</sup> aus genomischer DNS des Stammes 855 wurde zusätzlich mit 3 M GuSCN getestet. Hierbei konnte kein PCR-Produkt an Sonde CDTXB mehr nachgewiesen werden, dennoch wurde ein Signal von 638 pA an Sonde SDE-Pr2 gemessen. Durch die Erhöhung der Stringenz bei der Hybridisierung wurde demnach die Sensitivität verringert, die Spezifität des *Primer*paares 3 in Kombination mit Sonde SDE-Pr2 für Isolate des Ribotyps 001 konnte jedoch nicht verbessert werden. (vgl. Tab. 20, S. 96).

Die Bedingungen sollten durch die Verwendung zusätzlicher *Primer*mixe zur Amplifikation der Zielregionen für die Q4POC-Hybridisierungen weiter optimiert werden. Auf Grund der wesentlich geringeren Schmelztemperatur des *Primer*paares FS-F/R ( $T_m = 44\text{ °C}$ ) im Vergleich zur Schmelztemperatur der anderen *Primer*paare ( $53\text{ °C}$ - $57\text{ °C}$ ) kann vermutlich kein Amplifikat mit diesem *Primer*paar bei den verwendeten *Annealing*temperaturen gebildet werden. Um aber einen Spezifitätsverlust des PCR-Systems durch weitere Absenkung der *Annealing*temperatur zu vermeiden, wurde entschieden, weitere Tests ohne die Verwendung des *Primer*paares FS-F/R durchzuführen.

Der an Sonde CDTXB gemessene Photostrom, der aus Hybridisierungen von Multi<sup>1</sup>-PCR-Produkten mit dieser Sonde resultiert, wies im Vergleich zu dem an den anderen Sonden gemessenen Photostrom besonders hohe Werte auf. Dies lässt darauf schließen, dass PCR-Fragmente, die aus der Bindung des *Primer*paares CTXB-F/R an die entsprechenden Zielregionen genomischer DNS resultieren, in einer wesentlich höheren Konzentration amplifiziert wurden, als die Fragmente, die aus Bindung der anderen *Primer*paare resultieren. Für *Primermix* „Multi<sup>2</sup>“ wurde eine geringere Konzentration des *Primer*paares CTXB-F/R gewählt; er enthält also die *Primer* CDiff\_27\_11\_F1, CDiff\_27\_11\_R1, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 isomolar in einer Konzentration von 7,5 pmol/μL sowie CTXB-F und CTXB-R in einer Konzentration von 5 pmol/μL. Zur Amplifikation der Zielregionen aus genomischer DNS der *C. difficile* Stämme RK 311, RK 379, 855 und 216 wurden pro 20 μL PCR-Ansatz je 2 μL *Primermix* Multi<sup>2</sup> verwendet, sodass für die Amplifikation je PCR-Ansatz 15 pmol der *Primer* CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 sowie CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 und 10 pmol der *Primer* CTXB-F und CTXB-R eingesetzt wurden (vgl. Tab. 18, S. 94). Es wurde eine *Annealing*temperatur von 52 °C verwendet; die anschließenden Hybridisierungen wurden mit einer GuSCN-Konzentration von 2 M durchgeführt.

Wie in Tabelle 20 (S. 96) ersichtlich, konnten an Sonde CDTXB PCR-Produkte aus genomischer DNS aller verwendeten Stämme nachgewiesen werden. An den Sonden

F305A und F305B wurden ausschließlich PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379 korrekt positiv nachgewiesen, was den Ergebnissen der Vorversuche entspricht (vgl. Tab. 19, S. 95). An Sonde SDE-Pr2 konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden, wiederum auch nicht aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und RK 379.

Nach Wiederholung der PCR mit genomischer DNS des Stammes RK 311, einer *Annealing*temperatur von 52 °C und *Primermix* Multi<sup>2</sup>, bei der die *Primer*lösungen hingegen einzeln dem PCR-Mastermix hinzugefügt wurden und nicht in Form eines vorgefertigten *Primermixes*, konnten allerdings PCR-Produkte an den Sonden CDTXB, SDE-Pr2, F305A und F305B nachgewiesen werden, was sowohl den Hybridisierungsergebnissen mit PCR-Produkten der Singleplex-PCRs wie auch den Ergebnissen der PCRs zur Überprüfung der Spezifität neu entwickelter *Primer*paare (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61 und Kap. III.2.2.2, S. 69) und der diagnostischen Multiplex-PCRs (vgl. Kap. III.4.2, S. 84) entspricht.

Auf Grund der weiterhin wesentlich höheren an Sonde CDTXB gemessenen Werte und um mögliche inhibitorische Wirkungen bzw. Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde ein dritter *Primermix* („Multi<sup>3</sup>“) getestet, der CTXB-F und CTXB-R in einer Konzentration von je 5 pmol/μL sowie CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 in einer Konzentration von je 7,5 pmol/μL enthält, jedoch nicht die *Primer* CDiff\_27\_11\_F1 und \_R1. Unter Verwendung von je 2 μL dieses *Primermixes* pro 20 μL PCR-Ansatz und einer *Annealing*temperatur von 52 °C konnten keinerlei PCR-Produkte aus der verwendeten genomischen DNS nachgewiesen werden (vgl. Tab. 20, S. 96). Deshalb wurde dieser *Primermix* nicht weiter verwendet und stattdessen ein vierter *Primermix* („Multi<sup>4</sup>“) ausgetestet.

#### **Optimierungsversuche mit *Primermix* „Multi<sup>4</sup>“**

Für den *Primermix* Multi<sup>4</sup> wurden die *Primer*lösungen einzeln dem PCR-Mastermix hinzugefügt und nicht in Form einer vorgefertigten Mischung, da durch dieses Vorgehen beim *Primermix* Multi<sup>2</sup> bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, als bei Verwendung eines vorgefertigten *Primermixes*. Es wurden die *Primer* CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 in einer Konzentration von je 7,5 pmol/μL, die *Primer* CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 in einer Konzentration von je 15 pmol/μL verwendet und je 1 μL pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die geringeren Konzentrationen der *Primer* CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 wurde auf Grund der hohen Signalstärke an den entsprechenden Sonden bei Hybridisierung der Multi<sup>2</sup>-PCR-Produkte gewählt. Zunächst wurden die PCR-Produkte mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C aus genomischer DNS von 17 Stämmen unterschiedlicher Ribotypen generiert: Der Ribotyp 001-Stämme RK 311, Ty 859, Landon-1, 351, 433, 612 und 903, des Stammes 391 (RT 010) des Stammes 390 (RT 012), des Stammes 163 (RT 014), der Stämme 164 und 808 (RT 015), des Stammes 387 (RT 049), des Stammes 385 (RT 070), des Stammes 56 (RT 078), des Stammes 236 (RT 149) sowie des Stammes 392 (RT unbekannt). Die Q4POC-Hybridisierungen wurden mit 2 M GuSCN durchgeführt. Die auf Grund der durchgeführten Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2,

S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) erwarteten Ergebnisse für jeden Stamm und jede Sonde sind in Tabelle 21 zusammengefasst, die Ergebnisse der zur Optimierung mit *Primermix Multi<sup>4</sup>*-PCR-Produkten durchgeführten Hybridisierungsversuche sind in Tabelle 22 (S. 100) aufgelistet.

**Tabelle 21: Auf Grund von Vorversuchen erwartete Ergebnisse der Hybridisierungen mit *Primermix Multi<sup>4</sup>*-PCR-Produkten**

Proben-Nr.	Ribotyp	CDTXB	SDE-Pr2	F305A	F305B
<i>C. difficile</i> RK 311		+	+	+	+
<i>C. difficile</i> Ty 859		+	+	+	+
<i>C. difficile</i> Landon-1		+	+	+	+
<i>C. difficile</i> 351	001	+	-	+	+
<i>C. difficile</i> 433		+	-	+	+
<i>C. difficile</i> 612		+	+	+	+
<i>C. difficile</i> 903		+	-	+	+
<i>C. difficile</i> 391	010	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 390	012	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 163	014	+	+	-	-
<i>C. difficile</i> 164		+	-	+	+
<i>C. difficile</i> 808	015	+	-	+	+
<i>C. difficile</i> 387	049	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 385	070	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 56	078	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 236	149	+	-	-	-
<i>C. difficile</i> 392	unbekannt	+	-	-	-

+, laut Vorversuchen sollte an der Sonde ein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar sein;  
 -, laut Vorversuchen sollte an der Sonde kein entsprechendes PCR-Produkt nachweisbar sein.

An Sonde CDTXB konnten PCR-Produkte aus genomischer DNS jedes verwendeten Stammes außer Stamm 56 nachgewiesen werden (94 % korrekt positiv).

Zusammenfassend stimmten bei Verwendung des *Primermix Multi<sup>4</sup>* und einer *Annealing*temperatur von 52 °C 88 % der an Sonde SDE-Pr2 gemessenen Ergebnisse, 59 % der an Sonde F305A gemessenen und 71 % der an Sonde F305B gemessenen Ergebnisse mit den jeweiligen Ergebnissen der Single- und Multiplex-PCRs zur Überprüfung der Stammspezifität neu designer *Primer* (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84 sowie Tab. 22, S. 100) überein. An Sonde SDE-Pr2 wurden fünf korrekt positive Signale (29 %), zehn korrekt negative Ergebnisse (59 %) und zwei falsch positive (12 %) detektiert. An Sonde F305A ergaben sich neun korrekt positive (53 %) sowie ein korrekt negatives (6 %) und sieben falsch positive (41 %) Ergebnisse. An Sonde F305B wurden ebenfalls neun korrekt positive (53 %) Ergebnisse detektiert sowie drei korrekt negative (18 %) und fünf falsch positive (29 %). Falsch negative Ergebnisse wurden an keiner der drei Sonden verzeichnet.

**Tabelle 22: Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit Hilfe von *Primermix Multi*<sup>4</sup> generierter Multiplex-PCR-Produkte zur Optimierung der PCR- und Hybridisierungsbedingungen**

Proben-Nr.	Ergebnis [pA]						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b>mit <i>Primermix Multi</i><sup>4</sup> generierte PCR-Produkte; 52 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311 (RT 001)	100	5.910	69	3.981	665	1.023	187
<i>C. difficile</i> Ty 859 (RT 001)	65	5.193	75	5.386	1.936	2.941	951
<i>C. difficile</i> Landon-1 (RT 001)	77	6.406	93	4.939	1.644	3.098	733
<i>C. difficile</i> 351 (RT 001)	176	4.594	25	12	2.275	2.175	950
<i>C. difficile</i> 433 (RT 001)	82	4.969	50	18	1.559	1.188	392
<i>C. difficile</i> 612 (RT 001)	36	4.521	72	2.773	504	583	938
<i>C. difficile</i> 903 (RT 001)	50	3.256	34	11	2.026	1.828	500
<i>C. difficile</i> 391 (RT 010)	60	4.659	28	946	2.152	1.017	930
<i>C. difficile</i> 390 (RT 012)	30	759	32	133	591	267	1.154
<i>C. difficile</i> 163 (RT 014)	31	800	73	1.634	574	110	827
<i>C. difficile</i> 164 (RT 015)	80	6.203	86	13	2.650	3.626	1.445
<i>C. difficile</i> 808 (RT 015)	62	4.787	34	45	1.880	1.580	508
<i>C. difficile</i> 387 (RT 049)	31	2.604	60	236	1.146	775	638
<i>C. difficile</i> 385 (RT 070)	44	1.810	64	154	954	503	747
<i>C. difficile</i> 56 (RT 078)	18	131	69	56	661	466	958
<i>C. difficile</i> 236 (RT 149)	143	7.007	76	117	120	27	1.137
<i>C. difficile</i> 392 (RT unbekannt)	21	1.996	36	432	1.840	726	1.103
<b>mit <i>Primermix Multi</i><sup>4</sup> generierte PCR-Produkte; 54 °C Annealingtemperatur; 2 M GuSCN</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311 (RT 001)	30	3.400	92	3.126	555	299	526
<i>C. difficile</i> 351 (RT 001)	25	2.538	40	46	1.512	988	531
<i>C. difficile</i> 433 (RT 001)	39	3.628	49	64	1.406	1.573	776
<i>C. difficile</i> 612 (RT 001)	62	3.158	169	2.240	152	31	926
<i>C. difficile</i> 391 (RT 012)	60	42	150	156	243	64	1.565
<i>C. difficile</i> 163 (RT 014)	86	4.359	72	188	131	156	1.636
<i>C. difficile</i> 385 (RT 070)	55	5.255	68	19	88	33	1.350
<i>C. difficile</i> 56 (RT 078)	118	279	148	155	127	24	732
<i>C. difficile</i> 392 (RT unbekannt)	28	1.735	48	57	31	44	531

<sup>4</sup>*Primermix Multi*: CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/20 µL PCR-Ansatz, die *Primer* CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 in einer Konzentration von 15 pmol/20 µL PCR-Ansatz; *Primer*lösungen einzeln dem PCR-Mastermix hinzugefügt.

**negCont**: Negativkontrolle; **CDTXB**: : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027**: Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2**: Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B**: Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont**: Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

RT: Ribotyp

■: stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■: positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Mit den Ergebnissen der Vorversuche übereinstimmende Hybridisierungsergebnisse sind fett dargestellt.

Im Einzelnen wurden korrekt positive Signale an Sonde SDE-Pr2 für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311, Ty 859, Landon-1 und 612 (Ribotyp 001) sowie Stamm 163 (RT 014) gemessen. Korrekt negative Ergebnisse ergaben sich für die Stämme

351, 433 und 903 (RT 001), 390 (RT 012), 164 und 808 (RT 014), 387 (RT 049), 385 (RT 070), 56 (RT 078) sowie 236 (RT 149). Falsch negative Signale an Sonde SDE-Pr2 sind nicht aufgetreten, es wurden jedoch falsch positive Signale für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme 391 (RT 010) und 392 (RT unbekannt) gemessen.

An den Sonden F305A und F305B wurden im Einzelnen PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311, Ty 859, Landon-1, 351, 433, 612 und 903 (Ribotyp 001) sowie 164 und 808 (RT 015) korrekt nachgewiesen. Ein korrekt negatives Ergebnis ergab sich für Stamm 236 (RT 149). Korrekt negative Ergebnisse ergaben sich an Sonde F305B zusätzlich für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme 390 (RT 012), 163 (RT 014) und 236 (RT 149). Falsch positive Signale wurden an Sonde F305A für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme 391 (RT 012), 390 (RT 012), 163 (RT 014), 387 (RT 049), 385 (RT 070), 56 (RT 078) und 392 (RT unbekannt) gemessen, an Sonde F305B für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme 391, 387, 385, 56 und 392 (vgl. Tab. 22, S. 100).

Die PCR zur Amplifikation der Zielregionen für die Q4POC-Hybridisierung mit *Primermix Multi<sup>4</sup>* wurde mit einer *Annealing*temperatur von 54 °C und genomischer DNS von neun Stämmen wiederholt, um zu überprüfen, ob dadurch die Anzahl der falsch positiven Hybridisierungsereignisse reduziert werden kann. Es wurde genomische DNS der Stämme RK 311, 351, 433 und 612 (Ribotyp 001), 391 (RT 010), 163 (RT 014), 385 (RT 070), 56 (RT 078) und 392 (RT unbekannt) als Matrize eingesetzt. Die Q4POC-Hybridisierungen wurden mit 2 M GuSCN durchgeführt.

Die Hybridisierungsergebnisse der Sonden SDE-Pr2 und F305A bzw. F305B wurden wiederum mit den Ergebnissen der Single- und Multiplex-PCRs zur Überprüfung der Stammspezifität neu designter *Primer* (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) verglichen und außerdem mit den Ergebnissen der Q4POC-Hybridisierungen mit den PCR-Produkten, die mit Hilfe des *Primermix Multi<sup>4</sup>* und mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C amplifiziert wurden (vgl. Tab. 22, S. 100).

An Sonde CDTXB konnten PCR-Produkte aus genomischer DNS jedes verwendeten Stammes außer Stamm 391 und 56 nachgewiesen werden (78 %).

Zusammenfassend stimmen 89 % der an Sonde SDE-Pr2 gemessenen Ergebnisse, 89 % der an Sonde F305A gemessenen und 78 % der an Sonde F305B gemessenen Ergebnisse mit den jeweiligen Ergebnissen der Single- und Multiplex-PCRs zur Überprüfung der Stammspezifität neu designter *Primer* (vgl. Kap. III.2, S. 57 und Kap. III.4, S. 82) überein. An Sonde SDE-Pr2 wurden zwei korrekt positive (22 %) und keine falsch positiven (0 %) Signale gemessen. Zudem ergaben sich sechs korrekt negative Ergebnisse (67 %), sowie ein falsch negatives (11 %). An Sonde F305A wurden drei korrekt positive (33 %) Hybridisierungsereignisse detektiert und es ergaben sich fünf korrekt negative Ergebnisse (56 %) sowie ein falsch positives Signal (11 %). An Sonde F305B wurden zwei (22 %)

korrekt positive und keine falsch positiven Signale detektiert. Ferner ergaben sich fünf korrekt negative Ergebnisse (56 %) und zwei falsch negative (22 %).

Im Einzelnen wurden an Sonde SDE-Pr2 korrekt positive Hybridisierungsereignisse für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme RK 311 und 612 detektiert, korrekt negative Ergebnisse ergaben sich für die Stämme 351, 433, 391, 385, 56 und 392. Es traten keine falsch positiven Hybridisierungsereignisse an Sonde SDE-Pr2 auf, es ergab sich jedoch ein falsch negatives Ergebnis für Stamm 163.

An den Sonden F305A und F305B wurden keine falsch positiven Hybridisierungsereignisse mehr detektiert, korrekt positive Signale wurden für PCR-Produkte aus genomischer DNS der Stämme 351 und 433 an beiden Sonden gemessen. Korrekt negative Ergebnisse wurden an beiden Sonden für die Stämme 391, 163, 385, 56 und 392 verzeichnet, falsch negative an beiden Sonden für Stamm 612 sowie an Sonde F305B für Stamm RK 311 (vgl. Tab. 22, S. 100).

Im Vergleich zu den Hybridisierungen mit PCR-Produkten, die mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert wurden, konnte die Spezifität bei Verwendung einer *Annealing*temperatur von 54 °C vor allem an den Sonden F305A und F305B deutlich verbessert werden. Somit wurden alle weiteren Multiplex-PCRs zur Amplifikation der Zielregionen für Q4POC-Hybridisierungen mit *Primermix Multi*<sup>4</sup> und einer *Annealing*temperatur von 54 °C durchgeführt.

### III.5.2 Hybridisierung mit dem Prototyp „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ (Genspeed®)

Insgesamt wurden Multiplex-PCR-Produkte aus genomischer DNS von 69 *C. difficile* Stämmen und aus extrahierter DNS von 24 Patientenstuhlproben mit Hilfe des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ Systems getestet. Sämtliche Multiplex-PCRs zur Amplifikation der Zielregionen wurden mit dem Amplex Tth-DNA Polymerase PCR System mit 5 µL DNS-Lösung des jeweiligen Stammes bzw. der jeweiligen Patientenprobe als Matrize in einem Reaktionsvolumen von 20 µL und bis auf sechs Ausnahmen (*Annealing*temperatur von 52 °C, vgl. Tab. 23, S. 103) mit einer *Annealing*temperatur von 54 °C durchgeführt. Jeweils 1 µL jeder *Primer*lösung (CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/µL, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 je 15 pmol/µL) wurde pro PCR-Ansatz dem Mastermix zugegeben. Die Hybridisierungen mit dem „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ (Q4POC-Hybridisierungen) wurden wie in Kapitel II.14 (S. 53) beschrieben mit 2,5 M Guanidinthiocyanat (GuSCN) im Hybridisierungspuffer durchgeführt.

Alle Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit PCR-Produkten, die mit Hilfe des *Primermix Multi*<sup>4</sup> und einer *Annealing*temperatur von 54 °C generiert wurden sowie den sechs Multiplex-PCR-Produkten, die mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert wurden, sind in Tabelle 23 (S. 103) aufgelistet. In Abbildung 20 (S. 109) sind Beispiele der

nach der Hybridisierung erstellten Graphiken dargestellt, welche die Signalintensitäten der einzelnen Hybridisierungsereignisse farblich darstellt.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Hybridisierungen mit dem Prototyp "Q4POC *C. difficile* Ribotyp 001"**

Proben-Nr.	Ergebnis (Sonde)						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001</b>							
<i>C. difficile</i> RK 311	22	2.226	69	4.394	432	334	526
<i>C. difficile</i> RK 379	22	1.609	80	4.771	499	642	550
<i>C. difficile</i> Ty859*	65	5.193	75	5.386	1.936	2.941	951
<i>C. difficile</i> Landon 001	24	1.595	57	2.871	531	440	239
<i>C. difficile</i> TGC-001-1	32	2.949	47	4.852	778	720	802
<i>C. difficile</i> 220	27	448	58	46	698	313	873
<i>C. difficile</i> 268	60	4.280	16	70	2.714	2.337	968
<i>C. difficile</i> 351	25	2.538	40	46	1.512	988	534
<i>C. difficile</i> 433	39	3.628	49	64	1.406	1.573	776
<i>C. difficile</i> 472	35	2.405	91	5.234	219	27	925
<i>C. difficile</i> 612	98	4.000	81	3.943	1.604	1.694	917
<i>C. difficile</i> 903*	50	3.256	34	11	2.026	1.828	500
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 002</b>							
<i>C. difficile</i> 384*	31	2.363	62	61	56	151	1.909
<i>C. difficile</i> 416	43	3.527	23	12	16	29	1.196
<i>C. difficile</i> 420	34	564	44	43	235	101	953
<i>C. difficile</i> 554	42	2.772	89	62	22	36	1.125
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 005</b>							
<i>C. difficile</i> 436	44	2.049	51	62	236	41	436
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 012</b>							
<i>C. difficile</i> 390	32	1.359	80	64	148	44	546
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 014</b>							
<i>C. difficile</i> 163	86	4.359	72	188	131	156	1.636
<i>C. difficile</i> 393	36	460	43	76	878	346	939
<i>C. difficile</i> 400	100	6.091	25	1.371	292	185	955
<i>C. difficile</i> 418	37	1.022	102	1.969	261	65	856
<i>C. difficile</i> 421	36	1.069	23	481	66	25	264
<i>C. difficile</i> 558	35	2.818	62	94	88	27	790

Fortsetzung nächste Seite

**negCont:** Negativkontrolle; **CDTXB:** : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2:** Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B:** Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont:** Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

Es handelt sich um die Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten, die mit *Primer*mix „Multi4“ (CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/μL, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 je 15 pmol/μL) und einer *Annealing*temperatur von 54 °C generiert wurden. Multiplex-PCR-Produkte aus genomischer DNS der mit \* gekennzeichneten Stämme wurden mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert.

■ : stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■ : positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Hybridisierungsergebnisse, die mit den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) übereinstimmen sind fett dargestellt.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Hybridisierungen mit dem Prototyp "Q4POC *C. difficile* Ribotyp 001"**  
(Fortsetzung von Seite 103)

Proben-Nr.	Ergebnis (Sonde)						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 015</b>							
<i>C. difficile</i> 164*	80	6.203	86	13	2.650	3.626	1.445
<i>C. difficile</i> 412	59	4.072	42	4	956	1.224	841
<i>C. difficile</i> 698	14	2.642	30	52	806	1.872	1.105
<i>C. difficile</i> 808*	62	4.787	34	45	1.180	1.580	508
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 017</b>							
<i>C. difficile</i> 269	18	2.602	62	73	482	267	806
<i>C. difficile</i> 435	1.041	6.042	203	3.251	119	56	1.355
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 023</b>							
<i>C. difficile</i> 181	41	1.711	59	128	254	70	1.096
<i>C. difficile</i> 403	25	2.154	63	71	50	21	806
<i>C. difficile</i> 541	23	1.868	107	93	35	35	989
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 027</b>							
<i>C. difficile</i> 2003	89	3.009	60	29	264	195	1.267
<i>C. difficile</i> 2001	45	3.203	34	52	33	77	905
<i>C. difficile</i> 552	12	2.527	48	33	46	16	398
<i>C. difficile</i> 2002	23	2.100	55	71	1.149	1.227	813
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 029</b>							
<i>C. difficile</i> 419	35	1.956	55	36	123	59	1.208
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 035</b>							
<i>C. difficile</i> 413	31	2.055	75	767	94	67	910
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 045</b>							
<i>C. difficile</i> 72*	107	7.071	67	42	410	62	1.385
<i>C. difficile</i> 106	55	480	20	8	300	287	658
<i>C. difficile</i> 119	141	1.239	207	222	313	85	1.139
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 046</b>							
<i>C. difficile</i> 388	31	1.045	95	556	486	462	931
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 049</b>							
<i>C. difficile</i> 387	16	1.370	91	94	201	94	1.296
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 064</b>							
<i>C. difficile</i> 395	49	930	39	40	1.023	609	536

Fortsetzung nächste Seite

**negCont:** Negativkontrolle; **CDTXB:** : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2:** Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B:** Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont:** Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

Es handelt sich um die Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten, die mit *Primer*mix „Multi4“ (CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/μL, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 je 15 pmol/μL) und einer *Annealing*temperatur von 54 °C generiert wurden. Multiplex-PCR-Produkte aus genomischer DNS der mit \* gekennzeichneten Stämme wurden mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert.

■ : stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■ : positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Hybridisierungsergebnisse, die mit den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) übereinstimmen sind fett dargestellt.



**Tabelle 23: Ergebnisse der Hybridisierungen mit dem Prototyp "Q4POC *C. difficile* Ribotype 001"**  
(Fortsetzung von Seite 104)

Proben-Nr.	Ergebnis (Sonde)						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 070</b>							
<i>C. difficile</i> 385	55	5.255	68	19	88	33	1.350
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 078</b>							
<i>C. difficile</i> 183	17	522	98	85	206	65	703
<i>C. difficile</i> 200	15	900	61	55	43	13	542
<i>C. difficile</i> 240	20	940	42	1.783	332	56	503
<i>C. difficile</i> 243	27	1.816	33	31	44	33	1.369
<i>C. difficile</i> 754	17	1.355	18	4.457	222	212	949
<i>C. difficile</i> 906	9	1.474	83	5.857	290	28	1.158
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 087</b>							
<i>C. difficile</i> 160	20	1.321	7	13	2.332	2.435	1.055
<i>C. difficile</i> 427	46	4.037	70	79	34	23	979
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 090</b>							
<i>C. difficile</i> 434	37	1.423	108	83	40	77	644
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 094</b>							
<i>C. difficile</i> 396	53	1.015	53	205	609	320	280
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 103</b>							
<i>C. difficile</i> 161	38	864	56	44	350	94	732
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 115</b>							
<i>C. difficile</i> 702	53	3.833	33	48	62	34	688
<b><i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 149</b>							
<i>C. difficile</i> 236	26	2.555	121	328	117	24	1.078
<b><i>Clostridium difficile</i> Stämme unbekanntem Ribotyps</b>							
<i>C. difficile</i> 162	30	1.855	20	13	202	48	253
<i>C. difficile</i> 392	28	1.735	48	57	31	44	513
<i>C. difficile</i> 397	29	1.383	48	446	894	482	957
<i>C. difficile</i> 700	67	1.232	37	415	1.367	1.060	1.026

Fortsetzung nächste Seite

**negCont:** Negativkontrolle; **CDTXB:** : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2:** Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B:** Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont:** Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

Es handelt sich um die Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten, die mit *Primer*mix „Multi4“ (CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/μL, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 je 15 pmol/μL) und einer *Annealing*temperatur von 54 °C generiert wurden. Multiplex-PCR-Produkte aus genomischer DNS der mit \* gekennzeichneten Stämme wurden mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert.

■: stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■: positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Hybridisierungsergebnisse, die mit den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) übereinstimmen sind fett dargestellt.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Hybridisierungen mit dem Prototyp "Q4POC *C. difficile* Ribotype 001"**  
(Fortsetzung von Seite 105)

Proben-Nr.	Ergebnis (Sonde)						
	negCont	CDTXB	RT27	SDE-Pr2	F305A	F305B	hybCont
<b>extrahierte DNS aus Patienten- Stuhlproben</b>							
P14	38	3.892	69	5.090	861	413	398
P25	24	4.657	97	172	50	52	819
P36	28	3.810	92	3.385	80	33	950
P44	15	3.068	73	3.853	161	37	1.261
P47	53	701	133	4.022	112	22	765
P48	8	5.327	51	688	99	22	1.277
P50	44	1.925	46	2.996	118	35	1.107
P51	56	2.583	61	286	49	33	1.268
P52	50	4.350	92	130	56	29	249
P53	37	4.715	85	87	93	39	1.471
P54	63	645	92	1.430	136	17	996
P55	738	3.364	83	4.956	955	614	605
P56	54	5.347	216	614	46	41	1.070
P57	14	4.667	58	2.521	49	21	783
P59	67	3.949	77	6.091	1.254	1.096	986
P61	36	5.281	102	4.184	87	19	847
P65	25	3.633	158	338	89	38	1.433
P66	128	6.723	45	962	36	37	801
P76	69	5.869	109	51	24	23	1.057
P78	32	4.057	353	3.273	376	21	606
P79	87	4.476	23	33	59	36	1.062
P80	66	5.540	130	3.873	86	82	625
P81	21	1.490	104	5.361	207	34	792

**negCont:** Negativkontrolle; **CDTXB:** : Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **RT027:** Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primer*paares amplifiziert wurden; **SDE-Pr2:** Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A, F305B:** Sonden zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont:** Positivkontrolle/Durchflusskontrolle.

Es handelt sich um die Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten, die mit *Primer*mix „Multi<sup>4</sup>“ (CTXB-F, CTXB-R, CDiff\_27\_11\_F1 und CDiff\_27\_11\_R1 je 7,5 pmol/μL, CDiff\_RK305\_F2 und CDiff\_RK305\_R1 je 15 pmol/μL) und einer *Annealing*temperatur von 54 °C generiert wurden. Multiplex-PCR-Produkte aus genomischer DNS der mit \* gekennzeichneten Stämme wurden mit einer *Annealing*temperatur von 52 °C generiert.

■: stark positives Signal mit einem Photostrom über 500 pA; ■: positives Signal mit einem Photostrom zwischen 300 und 500 pA. Hybridisierungsergebnisse, die mit den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) übereinstimmen sind fett dargestellt.

An Sonde CDTXB, die als Positivkontrolle für die Amplifikation von PCR-Fragmenten mittels Multiplex-PCR mit *Primer*mix Multi<sup>4</sup> eingesetzt wurde, konnten bis auf sieben Ausnahmen (*C. difficile* 391, 399, 34, 581, 56, 196, P58) PCR-Produkte aus genomischer DNS aller verwendeten Stämme und Patientenproben nachgewiesen werden (92 %). Diese Ausnahmen wurden von der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen, sodass Hybridisierungen von 86 Proben ausgewertet wurden (PCR-Produkte aus genomischer DNS von 63 *C. difficile* Reinkulturen und aus 23 Patientenstuhlproben).

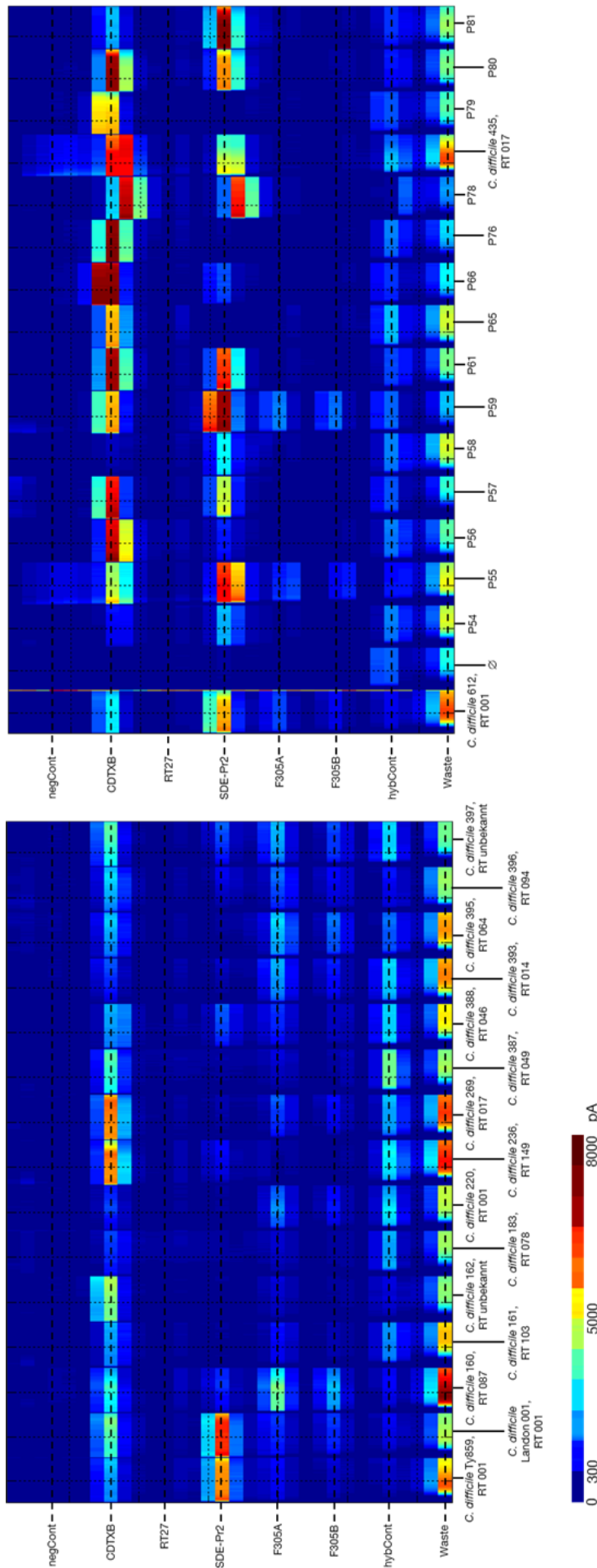
Zusammenfassend stimmten – wenn man die Ergebnisse der Q4POC-Hybridisierungen mit den Ergebnissen der diagnostischen Single- und Multiplex-PCRs vergleicht (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap. III.4.2, S. 84) – 77 % (66 von 86) der mit Sonde SDE-Pr2 generierten Ergebnisse und 81 % (70 von 86) der mit Sonde F305A generierten Ergebnisse sowie 87 % (75 von 86) der mit Sonde F305B generierten Ergebnisse mit den Ergebnissen der diagnostischen PCRs überein. An Sonde SDE-Pr2 wurden PCR-Produkte von 17 Proben (genomische DNS von *C. difficile* Stämmen und aus Patientenstuhlproben) korrekt positiv detektiert (20 %). Zudem ergaben sich 49 korrekt negative (57 %) Ergebnisse. 19 Hybridisierungsergebnisse waren falsch positiv (22 %) sowie eines falsch negativ (1 %). An beiden F305-Sonden wurden PCR-Produkte von 16 Proben korrekt positiv detektiert (je 19 %) und es ergaben sich an Sonde F305B 59, an Sonde F305A 53 korrekt negative Ergebnisse (68 % bzw. 62 %). An Sonde F305A wurde eine Probe (1 %) zusätzlich korrekt positiv detektiert. Außerdem wurden an beiden Sonden zehn PCR-Produkte falsch positiv (je 12 %) registriert. An Sonde F305B ergab sich zusätzlich ein falsch negatives Ergebnis (1 %), an Sonde F305A 6 falsch positive (7 %) Ergebnisse.

Im Einzelnen wurden an Sonde SDE-Pr2 PCR-Produkte aus genomischer DNS der *C. difficile* Stämme RK 311, RK 379, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 472 und 612 (Ribotyp 001), 418 und 421 (RT 014), 435 (RT 017) sowie 240, 754 und 906 (RT 078) und aus genomischer DNS der Patientenstuhlproben P14, P47, P55 und P59 korrekt positiv nachgewiesen. Korrekt negative Ergebnisse ergaben sich für 43 *C. difficile* Stämme sowie 6 Patientenstuhlproben. Aus genomischer DNS der *C. difficile* Stämme 400 (Ribotyp 014), 413 (RT 035), 388, (RT 046), 236 (RT 149) sowie 397 und 700 (RT unbekannt) wurden PCR-Produkte an Sonde SDE-Pr2 falsch positiv nachgewiesen. Außerdem ergaben sich für 13 Patientenstuhlproben falsch positive Ergebnisse. Ein falsch negatives Ergebnis wurde an Sonde SDE-Pr2 für PCR-Produkte aus genomischer DNS des Stammes 163 (RT 014) verzeichnet.

An den Sonden F305A und F305B wurden im Einzelnen PCR-Produkte aus genomischer DNS von 14 *C. difficile* Stämmen sowie zwei Patienten-Stuhlproben korrekt positiv nachgewiesen: RK 311, RK 379, Ty 859, Landon-1, TGC 001-1, 268, 351, 433, 612 und 903 (Ribotyp 001), 164, 412, 698 und 808 (RT 015) sowie P55 und P59 (Patientenstuhlproben). Korrekt negative Ergebnisse an beiden Sonden ergaben sich für 34 *C. difficile* Stämme sowie 19 Patientenstuhlproben. Aus genomischer DNS der *C. difficile* Stämme 220 (RT 001), 393 (RT 014), 2002 (Variation von RT 027), 388 (RT 046), 395 (RT 064), 160 (RT 087), 396 (RT 094) sowie 397 und 700 (RT unbekannt) sowie der Patientenstuhlprobe P14 wurden an beiden F305-Sonden falsch positive Signale detektiert. Es wurden keine falsch negativen Ergebnisse an Sonde F305A, jedoch an Sonde F305B für Patientenstuhlprobe P78 verzeichnet. Falsch positive Ergebnisse ergaben sich zudem an Sonde F305A für die *C. difficile* Stämme 269 (RT 017), 72, 106 und 119 (RT 045), 240 (RT 078) sowie 161 (RT 103).

Mit Hilfe der Sonde CDTXB wurden 92 % der in dieser Arbeit verwendeten toxischen *C. difficile* Stämme erfolgreich detektiert. Die an Sonde SDE-Pr2 detektierten Ergebnisse für Isolate des Ribotyps 001 stimmen zu 100 % mit den Ergebnissen der diagnostischen Single- und Multiplex-PCRs überein. Ebenfalls die an beiden F305-Sonden generierten Hybridisierungsergebnisse stimmen für Isolate des Ribotyps 001 bis auf eine Ausnahme (*C. difficile* 220) mit den Ergebnissen der diagnostischen Single- und Multiplex-PCRs überein. Bis auf fünf Ausnahmen – *C. difficile* 388 (RT 046), *C. difficile* 160 (RT 087), *C. difficile* 397 und 700 (RT unbekannt) sowie P14 (Patientenstuhlprobe) – wurden keine nicht-Ribotyp 001-Stämme gleichzeitig sowohl von Sonde SDE-Pr2 als auch beiden F305-Sonden erfasst. Somit lässt sich sagen, dass mit Hilfe des Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ Testsystems einerseits toxische *C. difficile* Stämme identifiziert werden können, andererseits mit ziemlicher Sicherheit der Ribotyp 001 identifiziert werden kann, wenn gleichzeitig an allen drei Sonden SDE-Pr2, F305A und F305B ein positives Signal detektiert wird.

Zumal beide Sonden F305A und F305B auf das gleiche Zielfragment (*C\_diff\_RK305\_1*) abzielen, lässt sich davon ausgehen, dass die Ursache der an jeweils nur einer der beiden Sonden falsch positiv und falsch negativ verzeichneten Ergebnissen entweder bei der Hybridisierung liegt oder dass durch unspezifische Bindung des *Primerpaares* 4 (*CDiff\_RK305\_F2/R1*) an genomische DNS der entsprechenden Stämme Fragmente amplifiziert wurden, die jeweils die Zielregion nur einer der beiden Sonden enthalten.



**Abbildung 20: Beispiele graphischer Darstellungen der Q4POC-Hybridisierungsergebnisse mit Multiplex-PCR-Produkten**

Nach jeder Hybridisierung mit dem Genspeed®-Testsystem werden die an jeder Sonde gemessenen Signalintensitäten in Form einer Graphik farblich dargestellt. Die Graphik zeigt Beispiele diagnostischer Q4POC-Hybridisierungen mit Multiplex-PCR-Produkten. Die PCR-Produkte wurden mit *Primermix Multi*<sup>4</sup> und einer *Annealingtemperatur* von 54 °C generiert.

Auf der linken Bildseite sind die auf dem Chip befindlichen Sonden von oben nach unten angezeigt: **negCont**, Negativkontrolle; **CDTXB**, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primerpaares* amplifiziert wurden; **RT027**, Sonde zum Nachweis von PCR-Produkten, die mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primerpaares* amplifiziert wurden; **SDE-Pr-2**, Sonde zum Nachweis mittels *Primerpaar* CDiff\_27\_11\_F1/R1 generierter PCR-Produkte; **F305A und F305B**, Sonden zum Nachweis mittels *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte; **hybCont**, Positivkontrolle/Durchflusskontrolle; **Waste**, Restsignale der überschüssigen Flüssigkeiten.

Auf der unteren Bildseite ist die jeweilige *C. difficile* Probennummer sowie der Ribotyp (RT) angegeben; **Ø**, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O). Ein Signal wird ab einem Photostrom von 300 pA als positiv gewertet.



## IV DISKUSSION

---

### IV.1 Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung

Die Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung (MASH) wurde bereits erfolgreich zur Isolierung stammspezifischer Fragmente und zur Entwicklung spezifischer Nachweissysteme für zum Beispiel *Streptomyces*-, *Xanthomonas*-, *Listeria*-, *Lactococcus*- und *Escherichia coli* Stämme angewandt.<sup>[14; 86; 132; 137]</sup> Vorteil der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung im Vergleich zu anderen subtraktiven Hybridisierungsmethoden ist, dass nur eine geringe Menge an Subtraktor-DNS eingesetzt werden muss bzw. die Hybridisierungszeit weitaus geringer ausfällt. Bei der Biotin-Streptavidin Methode nach Wassil *et al.* (1998)<sup>[132]</sup> beispielsweise werden 10 µg Subtraktor-DNS pro Reaktion verwendet, bei der Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung hingegen nur 1 µg. Auf Grund der begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden DNS-Materials, wurde die Biotin-Streptavidin Methode nicht im Zuge dieser Arbeit angewendet. Bei der *Genome Subtraction* nach Apokyants *et al.* (1998)<sup>[2]</sup> wird nur ca. 600 ng Subtraktor-DNS pro Reaktion verwendet, diese Methode benötigt jedoch sehr lange Hybridisierungszeiten (ca. 18 h). Die *Genome Subtraction* wurde im Zuge dieser Arbeit ausgetestet, führte allerdings zu keinerlei Ergebnissen, d.h. es konnten keinerlei Amplifikate nach der Hybridisierung detektiert werden, und wurde aus diesem Grund nicht weiter angewandt.

Trotz einer kurzen Hybridisierungszeit von nur 2 h handelt es sich bei der MASH dennoch um eine sehr zeitaufwendige Methode. Häufig wurden im Laufe dieser Arbeit rDNS-Fragmente oder Fragmente, die außer im Tester-Stamm ebenso in anderen Stämmen vorhanden sind, isoliert. Somit musste eine Vielzahl von Fragmenten sequenziert werden, um ein potentiell spezifisches zu erhalten.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Genome von vier *Clostridium difficile* Stämmen vollständig sequenziert und bereits veröffentlicht (*C. difficile* 630, Ribotyp 012; *C. difficile* QCD-66c26 und QCD-32g58, Ribotyp 027; *C. difficile* ATCC 43255, Ribotyp 087). Im Laufe der Arbeit wurden die Genomsequenzen von 21 weiteren Stämmen sechs verschiedener Ribotypen veröffentlicht, darunter zwei Ribotyp 001-Stämme. Dies hat die Auswertung der Sequenzdaten erheblich erleichtert, da durch *in silico* Analysen eine weitaus gezieltere Auswahl von Zielregionen spezifischer Oligonukleotide möglich ist. Für ein reines *in silico* Design und die Entwicklung und Evaluierung umfassender stammspezifischer Nachweisverfahren ist die Datenlage dennoch nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurde die Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung einer reinen *in silico* Analyse vorgezogen. Nichtsdestotrotz ist die *in silico* Analyse im Anschluss an die Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung hilfreich, um zu überprüfen, ob die isolierten Fragmente auch im Genom anderer Stämme und Spezies vorkommen bzw. um eine Aussage über den genetischen Informationsgehalt der isolierten Fragmente zu treffen.

## IV.2 Multiplex-PCR und „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“

Die Kombination von Multiplex-PCR mit der Chip-basierte Hybridisierungstechnik bietet den Vorteil, dass in einem Experiment gleichzeitig verschiedene *Primer* zur Amplifikation der Zielsequenzen und verschiedene Sonden zur Detektion der PCR-Produkte eingesetzt werden können. Das Problem hierbei ist jedoch, dass es kaum möglich ist, *Primer* bzw. Sonden zu designen, die bei identischen Versuchsbedingungen alle denselben Grad an Spezifität und Sensitivität besitzen.<sup>[76]</sup> Zudem werden beim Q4POC-Hybridisierungssystem für die Detektion von Multiplex-PCR-Produkten Fangsonden mit einer Gesamtlänge von jeweils 75 Nukleotiden (nt) eingesetzt, die aus jeweils drei sich wiederholenden, identischen spezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 25 nt bestehen (vgl. Kap. II.14, S. 53), um die Zugänglichkeit für die PCR-Produkte und die Sensitivität bei der kurzen Hybridisierungszeit von nur zwei Minuten zu gewährleisten. Ein potentiell Spezifitätsproblem könnte daraus resultieren, dass sich durch die Verwendung dieser aus drei identischen Oligonukleotiden „zusammengesetzten“ Fangsonden an den Übergängen von jeweils einem Oligonukleotid zum anderen gewissermaßen versetzte „neue“ Oligonukleotidsequenzen ergeben, deren Zielsequenz von der eigentlichen Bindestelle abweicht. Dem Problem der unterschiedlichen Sensitivität der verwendeten Oligonukleotide konnte dahingehend entgegengewirkt werden, dass die *Primer* und Sonden – mit Ausnahme des *Primer*paars FS-F/R und der RT027-Sonde – mit ähnlichem GC-Gehalt, ähnlicher Länge und damit einer ähnlichen Schmelztemperatur designiert wurden. Die Spezifität der Fangsonden wurde mittels *in silico* Analyse unter Verwendung des *Primer*-BLAST<sup>[135]</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) sowie BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool<sup>[9]</sup>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) vorab verifiziert. Zusätzlich wird dem Spezifitätsproblem dadurch entgegengewirkt, dass für die Amplifikation der Zielfragmente für die Hybridisierungen mit dem „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“, *Primer*paare verwendet werden, die für die jeweilige diagnostische Region spezifisch sind.

Im Vergleich zur Detektion von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Visualisierung der aufgetrennten Fragmente durch Ethidiumbromid-Färbung bietet die auf Sonden-Hybridisierung basierte DNS-Detektion außerdem den Vorteil der Sequenz-Spezifität und der wesentlich geringeren Detektionsgrenzen für amplifizierte PCR-Produkte. Hierdurch wird sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Systems zusätzlich erhöht.<sup>[84; 124]</sup>

In verschiedenen Studien wurden Toxin A/B-Enzymimmunoassay (-EIA) und PCR-basierte Methoden zum Nachweis von *C. difficile* im Stuhl miteinander verglichen. Die Sensitivität der PCR-basierten Methoden lag in diesen Studien meist bei 100 %, die der Toxin A/B-EIAs nur zwischen 42 und 70 %. Der positive Vorhersagewert (*positive predictive value*, PPV) PCR-basierter Methoden lag bei 94-100 %, der negative Vorhersagewert (*negative predictive value*, NPV) bei 95-100 %. Der PPV der EIAs belief sich auf 63-100 %, der NPV hingegen nur auf 79-94 %.<sup>[30; 60]</sup> So bieten, bezogen auf den Nachweis toxigener *Clostridium difficile*



Zellen im Stuhl, molekulare Assays für die Detektion weitaus bessere Sensitivität und Spezifität verglichen mit den EIAs. PCR-basierte Tests gewinnen daher immer mehr Akzeptanz. Nichtsdestotrotz werden durch diese Tests nur Gensequenzen nachgewiesen, nicht jedoch die Anwesenheit aktiver Zyto- bzw. Enterotoxine. Aus diesem Grund wird häufig daran gezweifelt, ob sie eine aktive, durch Toxin-bildende Zellen verursachte Infektion detektieren. Es wurde andererseits gezeigt, dass der Nachweis der Gene für Toxin A und/oder B mittels PCR in hohem Maße mit dem Nachweis toxigener *C. difficile* durch EIA korreliert.<sup>[46]</sup> Werden nur Proben von Patienten getestet, die klinische Symptome einer CDI aufweisen, ist die Spezifität bei beiden Methoden absolut vergleichbar (94-100 %).<sup>[30; 60]</sup>

Vor dem Hintergrund, dass ca. 3-7 % der Bevölkerung asymptomatische Träger von *Clostridium difficile* sind<sup>[111]</sup>, ist es in jedem Fall wichtig zu beachten, dass nur Patienten auf *C. difficile* Infektion getestet werden, die an klinisch signifikanter Diarrhö leiden und bei denen kein anderes enteropathogenes Bakterium als Verursacher nachgewiesen werden konnte. Dies wird sowohl vom Robert Koch Institut als auch von der Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) sowie der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) empfohlen, da der Nachweis des Erregers bzw. der Toxine bei asymptomatischen Patienten keine Bedeutung hat.<sup>[31; 34; 101]</sup> Wird das Testen auf Anwesenheit von *C. difficile* im Stuhl auf ungeformte oder flüssige Stuhlproben von Patienten mit Risikofaktoren für CDI beschränkt, kann das Problem Kolonisierung von Infektion unterscheiden zu müssen, minimiert werden.<sup>[23]</sup>

Auf Grund vergleichbarer Spezifität und positiver Vorhersagewerte von EIA und PCR, allerdings höherer Sensitivität und negativer Vorhersagewerte der PCR-basierten Methoden bei symptomatischen Patienten wäre es absolut denkbar, die derzeit standardmäßig für die Diagnose von CDI eingesetzte Methode abzulösen, vor allem im Hinblick auf einen Einsatz im patientennahen (point-of-care) Bereich. Durch die Tatsache, dass ohnehin nur symptomatische Patienten mit Verdacht auf CDI getestet werden sollten, verliert das Argument, dass durch PCR-basierte Methoden nicht zwischen Patienten mit CDI und asymptomatischen Trägern unterschieden werden kann, zudem an Wert.

### **IV.3 Stabilität der Isolierten Fragmente im *C. difficile*-Genom**

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Genome verschiedener *C. difficile* Stämme sich in ihrer Größe unterscheiden können. Dies wird darauf zurückgeführt, dass etwa 11 % des *C. difficile* Genoms aus mobilen genetischen Elementen besteht, hauptsächlich aus konjugativen Transposons und Prophagen. Es wird vermutet, dass diese konjugativen Transposons entscheidend an der Aufnahme von Genen beteiligt sind, welche z.B. Antibiotika-Resistenzen, Virulenz, Interaktion mit dem Wirt und Bildung von Oberflächenstrukturen bedingen, die also verschiedene Virulenzfaktoren tragen.<sup>[45; 54; 114]</sup> Hinzu kommt, dass für verschiedene *C. difficile* Stämme ein hoher Grad an horizontalem

Gentransfer und homologer Rekombination ermittelt wurde, wodurch bestätigt wird, dass *C. difficile* im Allgemeinen ein sehr dynamisches Genom besitzt.<sup>[54]</sup> Vor dem Hintergrund dieses hoch variablen Genoms, das sich stetig durch horizontalen Gentransfer konjugativer Transposons oder homologe Rekombination größerer chromosomaler Bereiche verändert, ist es wichtig, stabile genetische Abschnitte für die Diagnose mittels PCR und Hybridisierung zu wählen. Es lässt sich vermutlich davon ausgehen, dass sich Genomabschnitte, die im Genom verschiedener Stämme und sogar Spezies vorhanden sind, im Laufe der Evolution etabliert haben und somit wohlmöglich stabil und erhalten bleiben.

Durch die Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung werden mehr oder weniger willkürlich Genomabschnitte aus einem Tester isoliert, die nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu den verwendeten Subtraktor-DNS-Fragmenten aufweist. Hierbei lässt sich jedoch keinerlei Rückschluss auf die jeweilige Funktion der isolierten Fragmente ziehen. Aus diesem Grund wurden für alle mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung isolierten Fragmente, für welche spezifische Oligonukleotide designt wurden, vergleichende Sequenzanalysen mit in verschiedenen öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich um kodierende Sequenzabschnitte handelt, welche genetische Information sie enthalten und ob sie eventuell in anderen Stämmen und Spezies vorkommen. Hierbei wurden sowohl Vergleiche der Nukleinsäuresequenz als auch der abgeleiteten Aminosäuresequenz angestellt.

#### **IV.3.1 Stabilität der Fragmente C\_diff\_27\_11 und C\_diff\_RK305\_1**

Mittels Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung konnten zwei Fragmente isoliert werden, auf deren Basis *Primerpaare* für diagnostische PCRs und Fangsonden für den „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ entwickelt wurden (vgl. Kap. III.2, S. 57 und Kap. III.5, S. 89). Das Fragment C\_diff\_27\_11 zeigte Ähnlichkeit zu als „*DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma 24 homolog*“, zu als „*conjugative transposon conserved hypothetical protein*“ annotierten Genen sowie zu bisher nicht annotierten *C. difficile* Genomabschnitten (vgl. Kap. III.2.1.3., S. 64, Abb. 8, S. 65). Für das Fragment C\_diff\_RK305\_1 zeigte sich Ähnlichkeit zu einem Gen, das im Genom von z.B. *C. difficile* 630 und R20291 sowie unter anderem einiger *Streptococcus* Spezies als „*putative conjugal transfer protein*“ annotiert ist (vgl. Kap. III.2.2.3, S. 72, Abb. 10, S. 73).

Konjugative Transposons sind eigenständige DNS-Elemente, die in der Regel im bakteriellen Genom integriert sind und die für den Transfer verschiedener Gene – häufig Antibiotika-Resistenzgene oder andere Virulenzfaktoren – verantwortlich sind. Sie können innerhalb einer Zelle an anderer Stelle im Chromosom integrieren, zwischen den Zellen einer Spezies übertragen werden sowie zwischen den Zellen verschiedener Spezies und Gattungen. Sie sind im Genom verschiedener *C. difficile* Stämme sehr verbreitet.<sup>[107; 114]</sup> Konjugative Transfer-Proteine, wie z.B. Proteine der TraG-Familie, sind dabei essentiell für

den DNS-Transfer während der bakteriellen Konjugation.<sup>[112]</sup> Konjugative Transposons sowie Proteine, die für den konjugativen Transfer von DNS verantwortlich sind, sind häufig am Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen bzw. anderer Virulenzfaktoren beteiligt und können somit zu einem Vorteil gegenüber Selektionsdruck beitragen. Einmal im Chromosom integriert, lässt sich also annehmen, dass derartige Fragmente erhalten bleiben.

Die Sigma-Untereinheiten der RNS-Polymerase vermitteln die spezifische Bindung der RNS-Polymerase an bestimmte Promotoren und sind damit die Schlüsselfaktoren der bakteriellen Transkription.<sup>[26; 53]</sup> Es ist daher wahrscheinlich, dass entsprechende kodierende Genomabschnitte ebenfalls stabil bleiben.

Für welche Elemente das Fragment C\_diff\_27\_11 letztendlich kodiert konnte nicht abschließend geklärt werden. Es ist aber offensichtlich, dass es sich bei dem Fragment zumindest partiell um kodierende Genomabschnitte handelt, die auch in anderen *C. difficile* Stämmen und anderen Spezies in ähnlicher Form vorkommen.

#### IV.3.2 Stabilität des Fragments C\_diff\_001

Mit Hilfe einer Art „*in silico* Ausschlussybridisierung“ (vgl. Kap. III.2.3, S. 74) konnten drei Gene identifiziert werden, deren Sequenz offensichtlich, zumindest jedoch im Rahmen der begrenzten Anzahl der verfügbaren *C. difficile* Genomsequenzen, für Ribotyp 001-Stämme spezifisch ist. Im Genom des Stammes *C. difficile* QCD-63q42 sind zwei dieser Gene als „*phage protein*“ (NCBI Accession Nr. ZP\_05329368 und ZP\_05329369) annotiert, das dritte als „*putative phage tail fiber protein*“ (NCBI Accession Nr. ZP\_05329370). Die Genomabschnitte ZP\_05329368 bis ZP\_05329370 wurden in dieser Arbeit als „Fragment C\_diff\_001“ bezeichnet. Bei weiterführenden Vergleichen der entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde zusätzlich Ähnlichkeit von ZP\_05329368 zu als „*baseplate J like protein*“ und „*putative phage capsid assembly protein*“ annotierten Genen, von ZP\_05329369 ebenfalls zu als „*baseplate J like protein*“ sowie als „*phage like element Pbsx protein*“ annotierten Genen und von ZP\_05329370 als „*tail fiber protein H*“ sowie als „*phage tail collar domain protein*“ annotierten Genen festgestellt. Offensichtlich handelt es sich also beim Fragment C\_diff\_001 um Phagen DNS, die in das Bakteriengenom integriert wurde (Prophage).

In den meisten *C. difficile* Stämmen, deren Genom bereits vollständig sequenziert ist, wurden Prophagen identifiziert. Es wurde gezeigt, dass temperente Bakteriophagen Schlüsselrollen bei der Evolution pathogener Bakterien einnehmen, indem sie beispielsweise die Toxinproduktion entweder unterstützen oder modifizieren.<sup>[89]</sup> Die Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass verschiedene Ribotypen von *C. difficile* unterschiedliche Prophagen beherbergen bzw. dass sich die DNS-Sequenzen der Prophagen in unterschiedlichen Ribotypen unterscheiden. Dadurch wird eine Korrelation zwischen Ribotyp und Prophagen-Typ vermutet, das Vorhandensein von Prophagen könnte also zur Diversität von *C. difficile* Stämmen beitragen. Zudem wurde von einigen Autoren

angeregt, dass bestimmte Phagen-Gene als diagnostische Marker für die Detektion von *C. difficile* verwendet werden könnten.<sup>[89; 116]</sup> Auch beim Fragment C\_diff\_001 handelt es sich also höchstwahrscheinlich um einen Genomabschnitt, der sich im Laufe der Evolution etabliert hat.

#### **IV.4 Detektion von *Clostridium difficile* mittels “Q4POC *C. difficile* Ribotype 001”**

In den meisten Laboratorien wird der Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A und/oder B für die Routinediagnostik von *C. difficile* assoziierter Diarrhö angewandt.<sup>[101]</sup> Dieser Test ist sowohl einfach und schnell durchzuführen (2-6 Stunden) als auch kostengünstig. Da der Toxin-EIA zwar eine hohe Spezifität aufweist, aber nur eine Sensitivität von 42 - 92 %<sup>[6; 30; 60]</sup>, ist der negative Vorhersagewert dieses Nachweissystems sehr gering, d.h. es kommt häufig zu falsch negativen Ergebnissen.<sup>[6]</sup> Durch die Testung mehrerer Proben eines Patienten kann die Sensitivität erhöht werden. Daher werden häufig pro Patient drei Proben getestet.<sup>[101]</sup> Im Gegensatz dazu sind EIAs, die die Glutamat-Dehydrogenase nachweisen, schnell und hochsensitiv, hingegen wenig spezifisch, da zum einen nicht zwischen Toxin-bildenden und nicht-Toxin-bildenden Stämmen unterschieden werden kann, zum anderen auch andere Clostridien erfasst werden können. Deshalb ist bei diesem Test der positive Vorhersagewert sehr gering, er besitzt jedoch einen hohen negativen Vorhersagewert. Der GDH-EIA eignet sich somit eher als Screening-Methode, um eine CDI auszuschließen.<sup>[101]</sup>

Es existiert momentan kein *C. difficile* Nachweissystem auf dem Markt, mit dem sowohl der schnelle *C. difficile* Nachweis möglich wäre – sei es generell oder stammspezifisch – und das gleichzeitig eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist. PCR-Systeme bieten auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Schnelligkeit eine hervorragende Basis. Ferner kann die bei Verwendung geeigneter spezies- oder stammspezifischer *Primerpaare* ohnehin schon hohe Spezifität von PCR-Systemen zusätzlich verbessert werden, indem gebildete Amplifikate durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung ist es gelungen, zwei Fragmente aus unterschiedlichen *C. difficile* Isolaten anzureichern, auf Basis derer diagnostische PCR-*Primer* und Oligonukleotidsonden für die Detektion von *C. difficile* Ribotyp 001 entwickelt wurden. Die entwickelten *Primerpaare* und Sonden wurden auf eine neue Testplattform, die auf Multiplex-PCR und Sonden-Hybridisierung basiert, adaptiert und mit genomischer DNS von Referenzstämmen unterschiedlicher Ribotypen sowie Patientenproben getestet.

Während der Optimierung und Evaluierung wurden die entwickelten *Primerpaare* zunächst in Single- und Multiplex-PCRs hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für die spezifische Detektion von *C. difficile* Ribotyp 001 überprüft (vgl. Kap. III.2.1.2, S. 61, Kap. III.2.2.2, S. 69 und Kap.

III.4.2, S. 84). Zur Evaluierung des diagnostischen Potentials des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“-Chipsystems wurden die Hybridisierungsergebnisse mit den Ergebnissen der diagnostischen Single- und Multiplex-PCRs verglichen. Zusammenfassend stimmen 77 % der mit Sonde SDE-Pr2 generierten Ergebnisse mit den Ergebnissen der diagnostischen PCRs überein (17 Proben korrekt positiv detektiert, 49 Proben korrekt negativ detektiert). Die mit Sonde F305A generierten Ergebnisse stimmen zu 81 % (17 Proben korrekt positiv detektiert, 59 Proben korrekt negativ detektiert) mit den Ergebnissen der diagnostischen PCRs überein, die mit Sonde F305B generierten Ergebnisse zu 87% (16 Proben korrekt positiv, 53 Proben korrekt negativ). Diskrepanzen ergaben sich hauptsächlich durch im Vergleich zu den diagnostischen PCRs „falsch positive“ Messungen an den unterschiedlichen Sonden. Insgesamt wurden nur 2 „falsch negative“ Ergebnisse verzeichnet. Ersteres lässt sich eventuell darauf zurückführen, dass die Sonden-Hybridisierung eine weitaus höhere Sensitivität für die Detektion von PCR-Produkten besitzt als die Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Detektion der DNS-Fragmente mittels Ethidiumbromid-Färbung.<sup>[84]</sup> Somit wurden bei den diagnostischen Single- und Multiplex-PCRs eventuell durch die entsprechenden *Primer*paare zwar Amplifikate gebildet, dies jedoch in so geringer Konzentration, dass sie mittels Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromid-Färbung und anschließender Visualisierung durch UV-Licht nicht detektiert werden konnten, wohl aber durch Hybridisierung mit den entsprechenden Fangsonden und anschließendem Nachweis der Hybride mittels Chemilumineszenz.

Ferner fällt auf, dass viele der „falsch positiv“ detektierten PCR-Produkte bei der Q4POC-Hybridisierung eine nur geringe Signalstärke von 300-500 pA des emittierten Photostroms aufweisen. Diese Signale sollten als grenzwertig angesehen werden, d.h. nur Signale unter 300 pA sollten als eindeutig negativ gewertet werden und nur Signale über 500 pA als eindeutig positiv. Proben, die Signalwerte zwischen 300 und 500 pA generieren, sollten durch erneute Testung überprüft werden.

Zwar ist keines der entwickelten *Primer*paare ausschließlich und umfassend spezifisch für Ribotyp 001. Dennoch bieten alle in dieser Arbeit entwickelten *Primer*paare und Sonden ein diagnostisches Potential.

Beim Nachweis des Fragments C\_diff\_27\_11 durch Amplifikation mit *Primer*paar 3 (CDiff\_27\_11\_F1R1) und Detektion durch Sonde SDE-Pr2 werden neben Isolaten des Ribotyps 001 zusätzlich Isolate der Ribotypen 014, 017 und 078 erfasst. Alle diese Ribotypen sind von klinischer Relevanz und treten gehäuft in Deutschland auf. Mehrere Studien haben belegt, dass Vertreter des Ribotyps 001 in Deutschland am häufigsten und in Europa gehäuft bei schwerwiegenden Infektionen, auch mit erhöhter Sterblichkeitsrate isoliert werden. Ribotyp 001 ist zusammen mit Ribotyp 027 der häufigste Epidemie-Stamm in Deutschland. Zudem wird in ganz Europa eine steigende Inzidenz des Ribotyps 078 beobachtet, wofür eine zoonotische Ursache diskutiert wird. Ebenso der Ribotyp 014 findet sich bei mehreren Studien unter den am häufigsten vertretenen Ribotypen. Somit sind die

prädominanten Ribotypen bei schwerwiegenden und rekurrenten Infektionen die Ribotypen 001, 027, 014 und 078.<sup>[9; 15; 19; 102; 110; 136]</sup> Doch auch dem Ribotyp 017 sollte eine klinische Bedeutung zugewiesen werden, zumal Isolate dieses Ribotyps in Deutschland bereits mit schwerwiegenden *C. difficile* Infektionen mit Todesfolge in Verbindung gebracht wurden.<sup>[5]</sup> Außerdem ist Ribotyp 017 beispielweise in Asien der am häufigsten identifizierte Ribotyp<sup>[80]</sup> und befand sich in einer europaweiten von Bauer *et al.* in Kooperation mit dem European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) durchgeführten Studie unter den zehn häufigsten isolierten Ribotypen<sup>[15]</sup> und ist daher durchaus von klinischer Relevanz.

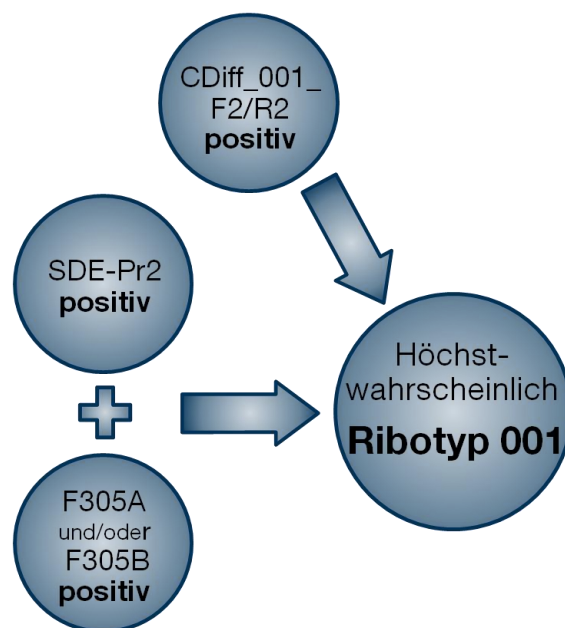
Das zum Nachweis des Fragments C\_diff\_RK305\_1 entwickelte *Primerpaar* 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) erfasst durch Detektion mit den Sonden F305A und F305B neben Isolaten des Ribotyps 001 außerdem Isolate des Ribotyps 015. Zwar ist Ribotyp 015 in Deutschland weniger häufig vertreten, auch dieser Ribotyp befindet sich jedoch in der Studie von Bauer *et al.*, die mit Isolaten aus 97 Krankenhäusern in 34 europäischen Ländern durchgeführt wurde, unter den zehn häufigsten Ribotypen.<sup>[15]</sup> Zudem wird Ribotyp 015 bei zwei in England durchgeführten Studien als viert- bzw. fünfhäufigster Ribotyp genannt.<sup>[57; 133]</sup>

Der Nachweis von *C. difficile* Stämmen mittels *Primerpaaren* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) bzw. 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) und Detektion der entsprechenden Amplifikate mit den Sonden SDE-Pr2 bzw. F305A und F305B ist somit zwar nicht spezifisch für Ribotyp 001 und es werden auch nicht alle Vertreter der jeweils erfassten Ribotypen nachgewiesen, dennoch werden *C. difficile* Stämme detektiert, denen erhöhte Virulenz zugesprochen wird und/oder die stark verbreitet sind. Alle mit den in dieser Arbeit entwickelten PCR-Systemen erfassten Stämme sind von klinischer Bedeutung. Es ist außerdem zu bedenken, dass sich die Ribotyp-Zuordnung in einigen Fällen als unzuverlässig erwies (vgl. Kap. III.3, S. 78). Zudem ist nicht zu erwarten, dass jeweils alle Vertreter eines bestimmten Ribotyps einen schwerwiegenden komplikationsbehafteten Krankheitsverlauf bedingen, zumal die Ribotyp-definierende DNS-Sequenz keinerlei kausalen Zusammenhang mit der Pathogenität eines Stammes hat und damit keinen Einfluss darauf nimmt.

Mit *Primerpaar* 2 (CDiff\_001\_F2/R2) wurden hingegen fast ausschließlich Isolate des Ribotyps 001 erfasst. Bei Inkludierung des *Primerpaares* 2 in der diagnostischen Multiplex-PCR sowie einer entsprechenden Sonde, die auf dem Mikrofluidik-Chip des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ verwendet wird, könnte die Spezifität des Systems damit noch weitaus verbessert werden.

Die *Primerpaare* 3 (CDiff\_27\_11\_F1/R1) und 4 (CDiff\_RK305\_F2/R1) erfassen, abgesehen von Isolaten des Ribotyps 001, keine identischen Ribotypen: *Primerpaar* 3 erfasst neben Isolaten des Ribotyps 001 Isolate der Ribotypen 014, 017 und 078, *Primerpaar* 4 erfasst zusätzlich Isolate des Ribotyps 015. Demnach werden ausschließlich aus genomischer DNS einiger Isolate des Ribotyps 001 sowohl durch *Primerpaar* 3 als auch durch *Primerpaar* 4 entsprechende Amplifikate gebildet und durch die Sonden SDE-PR2 bzw. F305A und

F305B detektiert. Durch *Primerpaar 2* (CDiff\_001\_F2/R2) wurde in der Multiplex-PCR nur ein weiteres nicht-Ribotyp 001 Isolat erfasst. Somit ließe sich durch Kombination dieser drei *Primerpaare* und der jeweiligen Sonden der Ribotyp 001 verlässlich identifizieren. Denn es kann davon ausgegangen werden, dass es sich höchstwahrscheinlich um ein Isolat des Ribotyps 001 handelt, wenn aus der entsprechenden genomischen DNS sowohl durch *Primerpaar 3* (CDiff\_27\_11\_F1/R1) als auch *Primerpaar 4* (CDiff\_RK305\_F2/R1) Amplifikate gebildet und durch die Sonden SDE-Pr2 sowie F305A bzw. F305B nachgewiesen werden und/oder Amplifikate durch *Primerpaar 2* (CDiff\_001\_F2/R2) gebildet und durch eine entsprechende Sonde nachgewiesen werden (vgl. Abb. 21).



**Abbildung 21: Schematische Darstellung des Nachweises des Ribotyps 001 mittels des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“**

Die Graphik stellt dar, dass es sich bei einer Probe höchstwahrscheinlich um ein *C. difficile* Isolat des Ribotyps 001 handelt, wenn entweder positive Signale sowohl an Sonde SDE-Pr2 als auch an Sonde F305A bzw. F305B gemessen werden, die aus Hybridisierung mit einem entsprechenden PCR-Amplifikat resultieren, und/oder ein positives Signal an einer Sonde gemessen wird, deren Zielregion sich innerhalb eines mittels *Primerpaar* CDiff\_001\_F1/R1 amplifizierten Fragments befindet. Somit könnte der Ribotyp 001 verlässlich nachgewiesen werden.

Durch die Inkludierung des *Primerpaares* CTXB-F/R sowie der Sonde CDTXB zum Nachweis des *C. difficile* Toxin B Gens ist ferner die Detektion aller Toxin-bildenden *C. difficile* Stämme möglich. Da bisher keine *C. difficile* Stämme identifiziert wurden, die ausschließlich das Toxin A bilden ( $A^+B^-$ ), sehr wohl aber Stämme, die ausschließlich das Toxin B bilden ( $A^-B^+$ )<sup>[7]</sup>, ist für den Nachweis der Anwesenheit von *C. difficile* Stämmen, die in der Lage sind Toxin zu bilden, die Detektion des Toxins B bzw. des entsprechenden Gens *tcdB* ausreichend.

Barbut und Rupnik<sup>[10]</sup> vertreten die Auffassung, dass es besser wäre, sich darauf zu konzentrieren, eine schnelle, sensitive und spezifische Methode für die Detektion aller *C. difficile* Stämme zu entwickeln, als darauf, Methoden zu suchen, die nur einen

bestimmten, sogenannten hypervirulenten Stamm nachweisen. Durch die Verwendung des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ wäre in einem Arbeitsschritt beides gegeben. In dieser Arbeit wurde ein Nachweissystem entwickelt und teilweise ausgetestet, das schnell und einfach durchzuführen ist und gleichzeitig eine hohe Sensitivität sowie eine hohe Spezifität sowohl für *C. difficile* allgemein als auch für bestimmte *C. difficile* Ribotypen aufweist. Die PCR-Technik ist für ihre hohe Sensitivität und Spezifität bekannt. Durch die anschließende Hybridisierung mit für die amplifizierten Fragmente spezifischen Oligonukleotiden wird die Spezifität zusätzlich erhöht. Somit wäre mit dem „Q4OPC *C. difficile* Ribotype 001“ sowohl der verlässliche Nachweis aller toxischen *C. difficile* Stämme durch die CDTXB-Sonde, als auch möglicherweise die Einteilung in Stämme mit erhöhter Virulenz bzw. starker Verbreitung und Stämme, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Ribotyp 001 handelt, möglich.

Leider konnte dies nicht abschließend bestätigt werden, da eine in Zusammenarbeit mit Referenzlaboratorien geplante klinische Studie unter Berücksichtigung genauer Hintergrunddaten zum Krankheitsverlauf der CDI-Patienten auf Grund von extern bedingten Verzögerungen beim Studienpartner nicht zustande kam.

Es wurde jedoch gezeigt, dass die Verwendung einer einfachen molekularbiologischen Testplattform für die Diagnose von *C. difficile* möglich ist. Durch die einfache Handhabung des Systems wäre ein Einsatz dieses Schnelltests sogar im Bereich von (Alten-) Pflegeheimen oder kleinen Krankenhäusern ohne mikrobiologischem Labor denkbar. Es ist beispielsweise gelungen, direkt aus Patientenmaterial Toxin-produzierende *C. difficile* Stämme nachzuweisen und gleichzeitig weitergehend zu charakterisieren. Bei den Patientenproben P14, P55 und P59 wurde z.B. höchstwahrscheinlich *C. difficile* Ribotyp 001 nachgewiesen (vgl. Kap. III.5.2, S. 102 sowie Tab. 23, S. 103), da bei diesen Proben sowohl ein hohes Signal an Sonde SDE-Pr2 als auch an den Sonden F305A und F305B gemessen wurde. Der Nachweis des Ribotyps 001 würde mit momentan verwendeten Techniken drei bis sieben Tage in Anspruch nehmen (selektive Anzucht von *C. difficile* aus der Stuhlprobe, Toxin-Nachweis mittels Enzymimmunoassay oder Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungstest sowie anschließende Ribotypisierung). Mit dem Q4POC-Hybridisierungssystem dauert dies inklusive DNS-Isolierung nur etwa drei Stunden.

## **IV.5 Ausblick**

Das in dieser Arbeit entwickelte Nachweissystem zeigt durchaus Potential zu einem kommerziell verwertbaren molekularen Diagnostikum. Dennoch besteht ein gewisses Verbesserungspotential des verwendeten Chip-Designs. Auf dem in dieser Arbeit verwendeten Mikrofluidik-Chip befinden sich eine Sonde zur Detektion von PCR-Produkten, die mittels des *C. difficile* Toxin B-Gen spezifischen *Primer*paars CTXB-F/R amplifiziert wurden (CDTXB), eine Sonde zum Nachweis mittels *Primer*paar CDiff\_27\_11\_F1/R1



generierter PCR-Produkte (SDE-Pr2) sowie zwei Sonden zum Nachweis mittels *Primerpaar* CDiff\_RK305\_F2/R1 amplifizierter PCR-Produkte (F305A und F305B). Eventuell könnte eine der zwei F305-Sonden vom Chip entfernt werden, zumal beide gegen das gleiche Zielfragment gerichtet sind. Auf Grund der besseren Ergebnisse der Sonde F305B sollte in Erwägung gezogen werden, die Sonde F305A zu entfernen. Außerdem war eine Sonde (RT027) auf dem Chip immobilisiert, die zum Nachweis von PCR-Produkten dienen sollte, welche mittels eines für die Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem *C. difficile* PaLoc spezifischen *Primerpaares* (FS-F/R) amplifiziert worden waren (vgl. Abb. 18, S. 89). Die Schmelztemperatur der *Primer* FS-F und FS-R ist jedoch geringer als die Schmelztemperatur der übrigen verwendeten *Primer*, wodurch eine Verwendung in dem entwickelten Multiplex-PCR-System mit einer *Annealing*temperatur von 54 °C nicht möglich war (vgl. Kap. III.5.1.2, S. 94). Durch eine Modifikation des *Primerpaares* FS-F/R (z.B. durch Verlängerung des Oligonukleotids in 5'- und/oder 3'-Richtung) könnte die Schmelztemperatur eventuell erhöht werden, um mit Hilfe der Sonde RT027 entsprechende Fragmente nachweisen zu können. Somit wäre mit Hilfe des „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ der ursprünglich geplante simultane Nachweis von Toxin-produzierenden *C. difficile* Stämmen (mittels CDTXB) sowie die weitere Charakterisierung dieser in Ribotyp 027-Stämme (mittels RT027) und Ribotyp 001-Stämme bzw. Stämme, die einen schweren Krankheitsverlauf bedingen könnten (mittels SDE-Pr2, F305A bzw. F305B), möglich. Ferner sollte in Erwägung gezogen werden, eine Positivkontrolle für die PCR zu inkludieren, z.B. in Form von 16S rDNS-gerichteten *Primern* und Sonden, zumal durch die Verwendung von Lysaten aus Stuhlproben eine Inhibition der PCR-Reaktion nicht ausgeschlossen werden kann. Proben, die bei der Detektion mit dem Q4POC-System einen Photostrom zwischen 300 und 500 pA erzeugen, sollten erneut getestet werden, um falsch positive Resultate zu minimieren. Zudem könnte durch die zusätzliche Verwendung des *Primerpaares* CDiff\_001\_F2/R2 und einer für die damit amplifizierten Fragmente spezifischen Sonde die Spezifität für Ribotyp 001 verbessert werden.

Seitens des Industriepartners und dessen medizinischer Partner besteht Interesse, das System weiter zu testen, vor allem in Form klinischer Studien mit Hintergrundinformationen zum Krankheitsverlauf der Patienten.

# V ZUSAMMENFASSUNG

---

## V.1 Zusammenfassung

*Clostridium difficile* - mit 15-25 % der Fälle Hauptverursacher der Antibiotika-assoziierten Diarrhö - ist neben Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) einer der wichtigsten und bedeutendsten Krankenhauskeime weltweit.<sup>[47; 105]</sup> Das Krankheitsbild der *C. difficile* Infektion reicht von milder, oft selbstlimitierender Diarrhö, über schwerwiegende Diarrhö mit Komplikationen wie pseudomembranöser Kolitis, Darmperforation oder toxischem Megakolon bis hin zu Sepsis mit Todesfolge.<sup>[6]</sup> Die beiden Hauptpathogenitätsfaktoren von *C. difficile* sind die Toxine A – ein Enterotoxin – und B – ein potentes Zytotoxin. Es werden jedoch nicht von allen Stämmen beide Toxine produziert. Es sind Fälle schwerwiegender Diarrhö bekannt, die durch Stämme verursacht wurden, welche nur das Toxin B produzieren; Stämme, die nur Toxin A produzieren sind bisher nicht bekannt.<sup>[7; 73]</sup> Nicht-toxigene Stämme, d.h. Stämme, die keines der beiden Toxine produzieren, gelten als apathogen.<sup>[34]</sup>

Seit einigen Jahren werden innerhalb und außerhalb Europas stetig ansteigende Fallzahlen von *C. difficile* Infektionen (CDIs) verzeichnet.<sup>[19]</sup> Die Krankheit zeichnet sich zudem immer häufiger durch einen schweren Verlauf und eine erhöhte Sterblichkeitsrate aus und es treten sich endemisch ausbreitende Erkrankungen auf.<sup>[9; 15; 66; 88; 136]</sup> Das Vorkommen von CDI und das Auftreten bestimmter Ribotypen ist unterschiedlich in verschiedenen Ländern. Es gibt eine große Diversität an Stämmen und die Verteilung einzelner Ribotypen variiert sowohl zwischen einzelnen Ländern als auch zwischen den einzelnen Krankenhäusern eines Landes.<sup>[9; 15; 19; 80]</sup> Vor allem in Süddeutschland, wie in anderen europäischen Ländern, wird bei schweren bis fatalen CDI Fällen am häufigsten der Ribotyp 001, gefolgt von den Ribotypen 078 und 027, identifiziert.<sup>[19; 102; 110]</sup> Bei allen drei Typen wurden Multiresistenzen gegen verschiedene Antibiotika (z.B. Chinolon-Antibiotika und Erythromycin) nachgewiesen, was einen wichtigen selektiven Vorteil bei der Ausbreitung endemischer *C. difficile* Stämme darstellt.<sup>[88]</sup> Umso wichtiger erscheinen verlässliche und schnelle diagnostische Methoden, die das zeitnahe Ergreifen bestimmter Vorsichtsmaßnahmen (z.B. Isolation des Patienten und Tragen geeigneter Schutzkleidung durch das Pflegepersonal) erlauben, um eine schnelle Ausbreitung des Krankheitserregers zu vermeiden.

Die in heutiger Zeit für die Routine-Labordiagnostik verwendeten Nachweissysteme sind entweder hoch spezifisch und sensitiv, erfordern hingegen einen hohen Zeitaufwand bis zur Diagnosestellung und sind meist nicht standardisiert (z.B. Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungs-Test) oder sie sind zwar schnell und einfach durchzuführen, jedoch meist auf Kosten von Spezifität bzw. Sensitivität (z.B. GDH- bzw. Toxin-EIA). Zudem ist mit keinem der aktuellen Nachweisverfahren eine Aussage darüber möglich, durch welchen Ribotyp die Infektion verursacht wurde.

Die Diagnose von *C. difficile* Infektionen erfolgt in den meisten Labors durch den Enzymimmunoassay für den Nachweis von Toxin A und/oder Toxin B (Toxin A/B-EIA), da er leicht und schnell (innerhalb von 2-6 Stunden) durchzuführen und kostengünstig ist.<sup>[6; 12]</sup> Die Sensitivität dieses Tests liegt jedoch nur zwischen 42 und 92 % und es kommt somit häufig zu falsch negativen Ergebnissen.<sup>[6; 30; 34; 60]</sup> Allgemein wird daher ein zwei-Schritte System empfohlen, bei dem zunächst mittels eines sensitiven und sowohl schnell als auch kostengünstig durchzuführenden Testverfahrens, das zudem einen hohen negativen Vorhersagewert besitzt – z.B. PCR, *Real Time* PCR oder GDH-EIA –, auf die Anwesenheit von *C. difficile* im Darm getestet wird. So müsste im Anschluss nur noch bei positivem Ergebnis durch die Verwendung eines hoch spezifischen Verfahrens wie Toxigener Kultur oder Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungs-Test (ZZNT) hinsichtlich der Anwesenheit Toxin-produzierender *C. difficile* überprüft werden.<sup>[6; 34; 66]</sup>

In vorliegender Arbeit wurden mit Hilfe von Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierungs-Experimenten gezielt DNS-Fragmente gesucht, die für Vertreter des Ribotyps 001 spezifisch sind. Es sollte überprüft werden, inwieweit eine Ribotyp-spezifische Diagnose von *C. difficile* mit Hilfe alternativer genomischer Zielregionen, d. h. unabhängig von der Ribotyp-definierenden 16S-23S intergenischen Spacer-Region, möglich ist. Die isolierten DNS-Fragmente wurden experimentell und mittels umfassender *in silico* Analysen hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft. Auf Basis dessen wurde ein neues, schnelles, auf Multiplex-PCR und Sonden-Hybridisierung basiertes Nachweissystem entwickelt und auf eine kommerziell verwertbare Plattform adaptiert („Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“). Die Untersuchungen haben gezeigt, dass (i) die Ribotypisierung teilweise fraglich sein kann und (ii) ein genereller Nachweis des Ribotyps 001 vermutlich nicht möglich ist. Dennoch ist der neu entwickelte Test von klinischer Relevanz, da er zum einen die verlässliche und schnelle Diagnose einer *C. difficile* Infektion bei symptomatischen Patienten mit Verdacht auf CDI mittels Toxin B-Gen spezifischer PCR-*Primer* und Sonden erlaubt. Zum anderen wird gleichzeitig die weitergehende Einteilung von Stämmen aus Probenmaterial hinsichtlich erhöhter Virulenz bzw. starker Verbreitung ermöglicht und Stämme, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Ribotyp 001 handelt, können identifiziert werden. Die klinische Relevanz des entwickelten Nachweissystems wird durch das Interesse des Industriepartners und dessen medizinischer Partner, das „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“-System weiter in Form von klinischen Studien unter Einbezug von Daten zum Krankheitsverlauf zu testen, unterstrichen.

Der Nachweis des Ribotyps 001 würde mit momentan verwendeten Techniken drei bis sieben Tage in Anspruch nehmen (selektive Anzucht von *C. difficile* aus der Stuhlprobe, Toxin-Nachweis mittels Enzymimmunoassay oder Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisierungs-Test sowie anschließende Ribotypisierung). Mit dem Q4POC-Hybridisierungssystem dauert dies inklusive DNS-Isolierung nur etwa drei Stunden. Durch die einfache Handhabung des Systems wäre zudem der Einsatz sogar in (Alten-) Pflegeheimen oder kleineren Krankenhäusern ohne eigenes diagnostisches Labor möglich. Somit wäre es denkbar, das

derzeit empfohlene Zwei-Schritte-System durch den in dieser Arbeit entwickelten „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ abzulösen.

## V.2 Summary

*Clostridium difficile* is the main cause of antibiotic-associated diarrhea being responsible for 15-25 % of all cases. It is one of the most important nosocomial pathogens worldwide and is considered to be at least as important as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).<sup>[47; 105]</sup> The clinical manifestation of *C. difficile* infection (CDI) ranges between mild, often self-limiting diarrhea, severe diarrhea with complications like pseudomembranous colitis, bowel perforation or toxic megacolon and lethal sepsis.<sup>[6]</sup> The major pathogenicity factors of *C. difficile* are toxins A and B, an enterotoxin and a potent cytotoxin, respectively. Some strains of *C. difficile* only produce toxin B, which is sufficient for causing severe diarrhea; strains only producing toxin A have not been isolated so far.<sup>[7; 73]</sup> Non-toxigenic strains, i.e. strains that produce neither toxin, are considered to be apathogenic.<sup>[34]</sup>

In many countries, the incidence of CDI has been continuously increasing during the last years and infection is characterized by enhanced morbidity, mortality and endemic transmissibility.<sup>[9; 15; 66; 88; 136]</sup> However, incidence of CDI as well as the distribution of certain ribotypes is variable in different countries and even in different hospitals of one country.<sup>[9; 15; 19; 80]</sup> Especially in southern Germany as well as in other European countries, ribotype 001 – followed by ribotypes 078 and 027 – is most frequently identified in severe to fatal cases of CDI.<sup>[19; 102; 110]</sup> All three types exhibit multi-resistances against various antibiotics (e.g. different quinolone antibiotics and erythromycin) providing important selective advantage during the spread of endemic *C. difficile* strains.<sup>[88]</sup> This shows the importance of reliable and rapid diagnostic methods that allow precautionary measures (e.g. patient isolation or protective clothing for personnel) promptly to be taken in order to avoid the fast spread of the pathogen.

Routine laboratory diagnostic methods mostly offer either both high specificity and sensitivity but are very time consuming and are hardly standardized (e.g. cell culture cytotoxicity neutralization assay (CCNT)) or they are fast and easily to perform though lacking specificity and sensitivity (e.g. GDH EIA or toxin A/B EIA). Further, none of the currently available diagnostic assays provide the possibility to simultaneously define which ribotype is underlying infection. In most laboratories, diagnosis of CDI is realized by enzyme immunoassay that detects toxin A and/or toxin B (toxin A/B EIA). This inexpensive assay can easily be performed and results can quickly be obtained (during 2-6 hours).<sup>[6; 12]</sup> However, sensitivity of toxin A/B EIA only ranges from 42 to 93 %, frequently causing false negative test results.<sup>[6; 30; 34; 60]</sup> Hence, a two-step algorithm is recommended including the detection of *C. difficile* in the gut by a sensitive, fast and inexpensive test that offers a high negative predictive value (e.g. PCR, real time PCR or GDH-EIA) and subsequently –

provided that the initial test result is positive – detection of active toxin in stool by a highly specific assay (e.g. CCNT or toxigenic culture). Negative initial test results then do not have to be verified.<sup>[6; 34; 66]</sup>

During the present study, we searched for ribotype 001 specific DNA fragments applying microplate subtraction hybridization (MASH). It was to be investigated to what extent ribotype specific diagnosis of *C. difficile* is possible by dint of alternative target sequences, i.e. targets other than ribotype defining 16S-23S intergenic spacer region. Specificity of isolated DNA fragments was assessed experimentally and via extensive *in silico* analyses. A multiplex PCR- and hybridization-based diagnostic assay was developed using appropriate DNA fragments and was adapted for a commercially applicable platform (“Q4POC *C. difficile* Ribotype 001”). Investigations indicated (i) that ribotyping can be doubtful to some extent and (ii) that general detection of ribotype 001 does not seem to be possible. Nevertheless, the novel diagnostic test is clinically relevant allowing not only accurate and fast diagnosis of *C. difficile* infection in symptomatic patients by means of toxin B gene specific PCR primers and hybridization probes. In addition, causative strains can further be classified regarding increased virulence or incidence, respectively, and strains that are most likely ribotype 001 can be identified. The interest of our industrial partner as well as his medical partners to further investigate the novel test in the form of clinical studies that include data concerning course of disease provides emphasis to the clinical relevance of “Q4POC *C. difficile* Ribotype 001”.

Currently used assays could identify *C. difficile* ribotype 001 within three to seven days (selective cultivation of *C. difficile* out of stool samples, toxin detection using EIA or CCNT as well as subsequent ribotyping). Applying the Q4POC hybridization system, identification of ribotype 001 could be performed in approximately three hours (including DNA extraction). Furthermore, the application of the system is very facile and thus could be used for diagnosis of CDI even in nursing homes and small hospitals lacking a diagnostic laboratory.

## VI LITERATUR

---

- [1] AGRON, P.G.; MACHT, M.; RADNEDGE, L.; SKOWRONSKI, E.W.; MILLER, W. & ANDERSEN, G.L.: Use of subtractive hybridization for comprehensive surveys of prokaryotic genome differences. *FEMS Microbiol Lett* (2002); 211 (2), S. 175–182
- [2] AKOPYANTS, N.S.; FRADKOV, A.; DIATCHENKO, L.; HILL, J.E.; SIEBERT, P.D.; LUKYANOV, S.A.; SVERDLOV, E.D. & BERG, D.E.: PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998); 95 (22), S. 13108–13113
- [3] ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (1990); 215 (3), S. 403–410
- [4] ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* (1997); 25 (17), S. 3389–3402
- [5] ARVAND, M.; HAURI, A.M.; ZAISS, N.H.; WITTE, W. & BETTGE-WELLER, G.: *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill* (2009); 14 (45)
- [6] BADGER, V.O.; LEDEBOER, N.A.; GRAHAM, M.B. & EDMISTON, C.E., JR.: *Clostridium difficile*: Epidemiology, Pathogenesis, Management, and Prevention of a Recalcitrant Healthcare-Associated Pathogen. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* (2012)
- [7] BALASSIANO, I.T.; YATES, E.A.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, E.O.: *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol* (2012); 61 (2), S. 169–179
- [8] BARBUT, F.; MARIO, N.; DELMÉE, M.; GOZIAN, J. & PETIT, J.C.: Genomic fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *FEMS Microbiol Lett.* (1993); 114 (2), S. 161–166
- [9] BARBUT, F.; MASTRANTONIO, P.; DELMÉE, M.; BRAZIER, J.; KUIJPER, E. & POXTON, I.: Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* (2007); 13 (11), S. 1048–1057
- [10] BARBUT, F. UND RUPNIK, M.: 027, 078, and Others: Going Beyond the Numbers (and Away From the Hypervirulence). *Clin Infect Dis* (2012); 55 (12), S. 1669–1672
- [11] BARKETI-KLAI, A.; HOYS, S.; LAMBERT-BORDES, S.; COLLIGNON, A. & KANSAU, I.: Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *J Med Microbiol* (2011); 60 (8), S. 1155–1161
- [12] BARTLETT, J.G.: Narrative Review: The New Epidemic of *Clostridium difficile*–Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* (2006); 145 (10), S. 758–764
- [13] BAUER, A.P.; DIECKMANN, S.M.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H.: Rapid identification of *Escherichia coli* safety and laboratory strain lineages based on Multiplex-PCR. *FEMS Microbiol Lett* (2007); 269 (1), S. 36–40
- [14] BAUER, A.P.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H.: A novel DNA microarray design for accurate and straightforward identification of *Escherichia coli* safety and laboratory strains. *Syst Appl Microbiol* (2008); 31 (1), S. 50–61
- [15] BAUER, M.P.; NOTERMANS, D.W.; VAN BENTHEM, B.H.B.; BRAZIER, J.S.; WILCOX, M.H.; RUPNIK, M.; MONNET, D.L.; VAN DISSEL, J.T. & KUIJPER, E.J.: *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet* (2011); 377 (9759), S. 63–73
- [16] BIDE, P.; BARBUT, F.; LALANDE, V.; BURGHOFFER, B. & PETIT, J.-C.: Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters* (1999); 175 (2), S. 261–266
- [17] BJORNSON, A.J. UND COOPER, J.E.: Isolation of *Rhizobium loti* Strain-Specific DNA Sequences by Subtraction Hybridization. *Appl Environ Microbiol* (1988); 54 (11), S. 2852–2855
- [18] BONGAERTS, G.P. UND LYERLY, D.M.: Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. *Microb Pathog* (1994); 17 (1), S. 1–12

- [19] BORGMANN, S.; KIST, M.; JAKOBIAK, T.; REIL, M.; SCHOLZ, E.; EICHEL-STREIBER, C. v.; GRUBER, H.; BRAZIER, J.S. & SCHULTE, B.: Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. *Euro Surveill* (2008); 13 (49)
- [20] BOWMAN, R.A.; O'NEILL, G.L. & RILEY, T.V.: Non-radioactive restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters* (1991); 79 (2-3), S. 269–272
- [21] BRAUN, V.; HUNDSBERGER, T.; LEUKEL, P.; SAUERBORN, M. & EICHEL-STREIBER, C. v.: Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* (1996); 181 (1-2), S. 29-38
- [22] BRAZIER, J.S.: Typing of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* (2001); 7 (8), S. 428–431
- [23] BRECHER, S.M.; NOVAK-WEEKLEY, S.M. & NAGY, E.: Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections: A Practical Guide for Clinicians: There Is Light at the End of the Colon. *Clin Infect Dis* (2013)
- [24] BROWN, P.K. UND CURTISS, R.: Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996); 93 (20), S. 11149–11154
- [25] CALABI, E.; CALABI, F.; PHILLIPS, A.D. & FAIRWEATHER, N.F.: Binding of *Clostridium difficile* Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues. *Infect Immun* (2002); 70 (10), S. 5770–5778
- [26] CAMPBELL, E.A.; MUZZIN, O.; CHLENOV, M.; SUN, J.L.; OLSON, C.A.; WEINMAN, O.; TRESTER-ZEDLITZ, M.L. & DARST, S.A.: Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* (2002); 9 (3), S. 527–539
- [27] CARROLL, K.C. UND BARTLETT, J.G.: Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annu Rev Microbiol* (2011); 65 (1), S. 501-521
- [28] CARTER, G.P.; LYRAS, D.; ALLEN, D.L.; MACKIN, K.E.; HOWARTH, P.M.; O'CONNOR, J.R. & ROOD, J.I.: Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. *J Bacteriol* (2007); 189 (20), S. 7290-7301
- [29] CERQUETTI, M.; SERAFINO, A.; SEBASTIANELLI, A. & MASTRANTONIO, P.: Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2002); 32 (3), S. 211–218
- [30] CHAPIN, K.C.; DICKENSON, R.A.; WU, F. & ANDREA, S.B.: Comparison of Five Assays for Detection of *Clostridium difficile* Toxin. *J Mol Diagn* (2011); 13 (4), S. 395–400
- [31] COHEN, S.H.; GERDING, D.N.; JOHNSON, S.; KELLY, C.P.; LOO, V.G.; McDONALD, L.C.; PEPIN, J. & WILCOX, M.H.: Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* (2010); 31 (5), S. 431–455
- [32] COHEN, S.H.; TANG, Y.J. & SILVA, J., JR.: Analysis of the Pathogenicity Locus in *Clostridium difficile* Strains. *J Infect Dis* (2000); 181 (2), S. 659-663
- [33] CORNISH-BOWDEN A.: Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Res* (1985); 13 (9), S. 3021-3030
- [34] CROBACH, M.J.T.; DEKKERS, O.M.; WILCOX, M.H. & KUIJPER, E.J.: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* -infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* (2009); 15 (12), S. 1053–1066
- [35] DAVIES, H. UND BORRIELLO, S.: Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microb Pathog* (1990); 9 (2), S. 141–146
- [36] DAWSON, L.F.; VALIENTE, E. & WREN, B.W.: *Clostridium difficile* - A continually evolving and problematic pathogen. *Infect Genet Evol* (2009); 9 (6), S. 1410–1417
- [37] DE LONG, S.K.; KINNEY, K.A. & KIRISITS, M.J.: Prokaryotic Suppression Subtractive Hybridization PCR cDNA Subtraction, a Targeted Method To Identify Differentially Expressed Genes. *Appl Environ Microbiol* (2007); 74 (1), S. 225–232
- [38] DEAKIN, L.J.; CLARE, S.; FAGAN, R.P.; DAWSON, L.F.; PICKARD, D.J.; WEST, M.R.; WREN, B.W.; FAIRWEATHER, N.F.; DOUGAN, G. & LAWLEY, T.D.: The *Clostridium difficile* *spo0A* Gene Is a Persistence and Transmission Factor. *Infect Immun* (2012); 80 (8), S. 2704–2711

- [39] DENÈVE, C.; DELOMÉNE, C.; BARC, M.-C.; COLLIGNON, A. & JANOIR, C.: Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *J Med Microbiol* (2008); 57 (6), S. 732–738
- [40] DENÈVE, C.; JANOIR, C.; POILANE, I.; FANTINATO, C. & COLLIGNON, A.: New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents* (2009); 33 (1), S. 24–28
- [41] DICK, L.K.; SIMONICH, M.T. & FIELD, K.G.: Microplate Subtractive Hybridization To Enrich for *Bacteroidales* Genetic Markers for Fecal Source Identification. *Appl Environ Microbiol* (2005); 71 (6), S. 3179–3183
- [42] DINEEN, S.S.; VILLAPAKKAM, A.C.; NORDMAN, J.T. & SONENSHEIN, A.L.: Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol Microbiol* (2007); 66 (1), S. 206–219
- [43] DINGLE, T.C.; MULVEY, G.L. & ARMSTRONG, G.D.: Mutagenic Analysis of the *Clostridium difficile* Flagellar Proteins, FliC and FliD, and Their Contribution to Virulence in Hamsters. *Infect Immun* (2011); 79 (10), S. 4061–4067
- [44] DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (Hg.): *The Prokaryotes*, Springer US, New York and NY (2006)
- [45] FORGETTA, V.; OUGHTON, M.T.; MARQUIS, P.; BRUKNER, I.; BLANCHETTE, R.; HAUB, K.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GERDING, D.N.; LOO, V.G.; MILLER, M.A.; MULVEY, M.R.; RUPNIK, M.; DASCAL, A. & DEWAR, K.: Fourteen-genome comparison identifies DNA markers for severe-disease-associated strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* (2011); 49 (6), S. 2230–2238
- [46] FREIFELD, A.G.; SIMONSEN, K.A.; BOOTH, C.S.; ZHAO, X.; WHITNEY, S.E.; KARRE, T.; IWEN, P.C. & VILJOEN, H.J.: A New Rapid Method for *Clostridium difficile* DNA Extraction and Detection in Stool. *J Mol Diagn* (2012); 14 (3), S. 274–279
- [47] GEFFERS, C. UND GASTMEIER, P.: Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* (2011); 108 (6), S. 87–93
- [48] GOH, S.; CHANG, B.J. & RILEY, T.V.: Effect of phage infection on toxin production by *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* (2005); 54 (2), S. 129–135
- [49] GOULD, C.V. UND McDONALD, L.C.: Bench-to-bedside review: *Clostridium difficile* colitis. *Crit Care* (2007); 12 (1), S. 203
- [50] GOVIND, R. UND DUPUY, B.: Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLoS Pathog* (2012); 8 (6), S. e1002727
- [51] GÜRTLER, V.: Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbiol* (1993); 139 (12), S. 3089–3097
- [52] HALL, J.C. UND O'TOOLE, E.: Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* (1935); 49 (2), S. 390–402
- [53] HEIMANN, J.D.: The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In: Poole, R.K. (Hg.): *Advances in microbial physiology*, Bd. 46. 1. Aufl.; Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Boston (2012), S. 47–110
- [54] HE, M.; SEBAIHIA, M.; LAWLEY, T.D.; STABLER, R.A.; DAWSON, L.F.; MARTIN, M.J.; HOLT, K.E.; SETH-SMITH, H.M.B.; QUAIL, M.A.; RANCE, R.; BROOKS, K.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; BENTLEY, S.D.; BURROWS, C.; CLARK, L.; CORTON, C.; MURRAY, V.; ROSE, G.; THURSTON, S.; VAN TONDER, A.; WALKER, D.; WREN, B.W.; DOUGAN, G. & PARKHILL, J.: Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010); 107 (16), S. 7527–7532
- [55] HENNEQUIN, C.; JANOIR, C.; BARC, M.-C.; COLLIGNON, A. & KARJALAINEN, T.: Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* (2003); 149 (10), S. 2779–2787
- [56] HENNEQUIN, C.; PORCHERAY, F.; WALIGORA-DUPRIET, A.; COLLIGNON, A.; BARC, M.; BOURLIOUX, P. & KARJALAINEN, T.: GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* (2001); 147 (Pt 1), S. 87–96
- [57] INNS, T.; GORTON, R.; BERRINGTON, A.; SAILS, A.; LAMAGNI, T.; COLLINS, J.; PERRY, J.; HILL, K.; MAGEE, J. & GOULD, K.: Effect of ribotype on all-cause mortality following *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* (2013); 84 (3), S. 235–241



- [58] INOUE, H.; NOJIMA, H. & OKAYAMA, H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* (1990); 96 (1), S. 23-28
- [59] JAWA, R.S. UND MERCER, D.W.: *Clostridium difficile*-associated infection: a disease of varying severity: Thomas G. Orr lecture. *Am J Surg* (2012)
- [60] JONG, E. DE; JONG, A.S. DE; BARTELS, C.J.M.; VAN DER RIJT-VAN DEN BIGGELAAR, C.; MELCHERS, W.J.G. & STURM, P.D.J.: Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2012); 31 (9), S. 2219–2225
- [61] JOOST, I.; SPECK, K.; HERRMANN, M. & MÜLLER, L. V.: Characterisation of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int J Antimicrob Agents* (2009); 33, S. S13
- [62] KATO, H.; KATO, N.; WATANABE, K.; UENO, K.; USHIJIMA, H.; HASHIRA, S. & ABE, T.: Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* (1994); 32 (9), S. 2067–2070
- [63] KATO, H.; YOKOYAMA, T. & ARAKAWA, Y.: Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *Journal of Medical Microbiology* (2005); 54 (2), S. 167–171
- [64] KEEL, M.K. UND SONGER, J.G.: The Comparative Pathology of *Clostridium difficile*-associated Disease. *Vet Pathol* (2006); 43 (3), S. 225–240
- [65] KELLY, C.P.; POTHOUKAKIS, C. & LAMONT, J.T.: *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* (1994); 330 (4), S. 257-262
- [66] KERN, W.V.: Was gibt es Neues in den neuen Leitlinien zur *Clostridium difficile*-Infektion? *Krankenhaushygiene up2date* (2010); 5 (03), S. 213–222
- [67] KILLGORE, G.; THOMPSON, A.; JOHNSON, S.; BRAZIER, J.; KUIJPER, E.; PEPIN, J.; FROST, E.H.; SAVALKOUL, P.; NICHOLSON, B.; VAN DEN BERG, R.J.; KATO, H.; SAMBOL, S.P.; ZUKOWSKI, W.; WOODS, C.; LIMBAGO, B.; GERDING, D.N. & McDONALD, L.C.: Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PCR-Ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Surface Layer Protein A Gene Sequence Typing. *J Clin Microbiol* (2008); 46 (2), S. 431–437
- [68] KIRBY, J.M.; AHERN, H.; ROBERTS, A.K.; KUMAR, V.; FREEMAN, Z.; ACHARYA, K.R. & SHONE, C.C.: Cwp84, a Surface-associated Cysteine Protease, Plays a Role in the Maturation of the Surface Layer of *Clostridium difficile*. *J Biol Chem* (2009); 284 (50), S. 34666–34673
- [69] KLAASSEN, C.H.W.; VAN HAREN, H.A. & HORREVORTS, A.M.: Molecular Fingerprinting of *Clostridium difficile* Isolates: Pulsed-Field Gel Electrophoresis versus Amplified Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol* (2002); 40 (1), S. 101–104
- [70] KLEINKAUF, N. UND ECKMANN, T.: Zum Stand der Meldungen schwer verlaufender *Clostridium-difficile*-Infektionen in Deutschland. *Hygiene & Medizin* (2008); 33 (9), S. 379–381
- [71] KUIJPER, E.J.; OUDBIER, J.H.; STUIFBERGEN, W.N.; JANSZ, A. & ZANEN, H.C.: Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *J Clin Microbiol* (1987); 25 (4), S. 751–753
- [72] KUMAR, P. UND VIRDI, J.: Identification and distribution of putative virulence genes in clinical strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A by suppression subtractive hybridization. *J Appl Microbiol* (2012); 113 (5), S. 1263–1272
- [73] LEMÉE, L.; BOURGEOIS, I.; RUFFIN, E.; COLLIGNON, A.; LEMELAND, J.-F. & PONS, J.-L.: Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology* (2005); 151 (10), S. 3171–3180
- [74] LEMÉE, L.; DHALLUIN, A.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J.-F. & PONS, J.-L.: Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol* (2004); 42 (6), S. 2609–2617
- [75] LESSA, F.C.; GOULD, C.V. & McDONALD, L.C.: Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology. *Clin Infect Dis* (2012); 55 (suppl 2), S. S65
- [76] LUDWIG, W.: Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology* (2007); 120 (3), S. 225–236

- [77] LUDWIG, W.; OLIVER GLÖCKNER, F. & YILMAZ, P.: The Use of rRNA Gene Sequence Data in the Classification and Identification of Prokaryotes. In: Rainey, F.A. & Oren, A. (Hg.): *Taxonomy of prokaryotes*, Bd. 38. 1. Aufl.; Academic Press, Amsterdam ;, Boston (2011), S. 349–384
- [78] LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜBMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A. & SCHLEIFER, K.-H.: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* (2004); 32 (4), S. 1363–1371
- [79] MANI, N. UND DUPUY, B.: Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98 (10), S. 5844-5849
- [80] MANZOOR, S.E.; TANNER, H.E.; MARRIOTT, C.L.; BRAZIER, J.S.; HARDY, K.J.; PLATT, S. & HAWKEY, P.M.: Extended Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of *Clostridium difficile* Correlates Exactly with Ribotyping and Enables Identification of Hospital Transmission. *J Clin Microbiol* (2011); 49 (10), S. 3523–3530
- [81] MARSH, J.W.; O'LEARY, M.M.; SHUTT, K.A.; PASCULLE, A.W.; JOHNSON, S.; GERDING, D.N.; MUTO, C.A. & HARRISON, L.H.: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J Clin Microbiol* (2006); 44 (7), S. 2558–2566
- [82] MATAMOUIROS, S.; ENGLAND, P. & DUPUY, B.: *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* (2007); 64 (5), S. 1274-1288
- [83] MCCLANE, B.A.; UZAL, F.A.; FERNANDEZ MIYAKAWA, M.E.; LYERLY, D. & WILKINS, T.: The Enterotoxic *Clostridia*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (Hg.): *The Prokaryotes*, Bd. 4; Springer US, New York and NY (2006), S. 698-752
- [84] MCCLATCHEY, K.D.: Clinical laboratory medicine. 2. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2002)
- [85] MCMILLIN, D.E. UND MULDROW, L.L.: Typing of toxic strains of *Clostridium difficile* using DNA fingerprints generated with arbitrary polymerase chain reaction primers. *FEMS Microbiology Letters* (1992); 92 (1), S. 5–9
- [86] MEHLEN, A.: Stammspezifische Identifizierung pathogener und biotechnologisch relevanter Bakterien durch *in vitro* Amplifikation und Detektion charakteristischer Genfragmente. Dissertation; Technische Universität München (2003), München. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan. <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss2003090810826>
- [87] MEYER, E.; GASTMEIER, P.; WEIZEL-KAGE, D. & SCHWAB, F.: Associations between nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in 89 German hospitals. *J Hosp Infect* (2012); 82 (3), S. 181–186
- [88] MÜLLER, L.; HALFMANN, A. & HERRMANN, M.: Aktuelle Daten und Trends zur Antibiotikaresistenzentwicklung von *Clostridium difficile*. *Bundesgesundheitsbl* (2012); 55 (11-12), S. 1410–1417
- [89] NALE, J.Y.; SHAN, J.; HICKENBOTHAM, P.T.; FAWLEY, W.N.; WILCOX, M.H.; CLOKIE, M.R.J. & POPOFF, M.R.: Diverse Temperate Bacteriophage Carriage in *Clostridium difficile* 027 Strains. *PLoS One* (2012); 7 (5), S. e37263
- [90] NORTHEY, G.: Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 by REP-PCR and PFGE. *J Med Microbiol* (2005); 54 (6), S. 543–547
- [91] PÉCHINÉ, S.; JANOIR, C. & COLLIGNON, A.: Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol* (2005); 43 (10), S. 5018–5025
- [92] PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOURLIOUX, P.; CORTIER, G. & POPOFF, M.R.: Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* (1997); 65 (4), S. 1402-1407
- [93] PETERSON, L.R.; MEHTA, M.S.; PATEL, P.A.; HACEK, D.M.; HARAZIN, M.; NAGWEKAR, P.P.; THOMSON, R.B. & ROBICSEK, A.: Laboratory Testing for *Clostridium difficile* Infection - Light at the End of the Tunnel. *Am J Clin Pathol* (2011); 136 (3), S. 372–380
- [94] PITUCH, H.: *Clostridium difficile* is no longer just a nosocomial infection or an infection of adults. *Int J Antimicrob Agents* (2009); 33 (1), S. 42-45

- [95] PLANCHE, T. UND WILCOX, M.: Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? *J Clin Pathol* (2010); 64 (1), S. 1–5
- [96] POOLE, R.K. (Hg.): Advances in microbial physiology. 1. Aufl., Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Boston (2012)
- [97] POPOFF, M.R.; RUBIN, E.J.; GILL, D.M. & BOQUET, P.: Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* (1988); 56 (9), S. 2299-2306
- [98] QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J. & GLOCKNER, F.O.: The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* (2012); 41 (D1), S. D590
- [99] RAINEY, F.A.; HOLLEN, B.J. & SMALL, A.: Genus I. - *Clostridium*, Prazmowski 1880. In: Vos, P. de; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B. (Hg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Bd. 2; Williams & Wilkins and Springer, Baltimore and Md (2009)
- [100] RAINEY, F.A. & OREN, A. (Hg.): Taxonomy of prokaryotes. 1. Aufl., Academic Press, Amsterdam ;, Boston (2011)
- [101] ROBERT KOCH INSTITUT (RKI) (Hg.): RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte - *Clostridium difficile*, Berlin (2009) (24).  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/Ausgaben/24\\_09.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/Ausgaben/24_09.pdf?__blob=publicationFile)
- [102] ROBERT KOCH-INSTITUT (RKI) (Hg.): Aktuelles zur Epidemiologie von *Clostridium difficile* - Bericht aus dem Konsiliarlabor *C. difficile*, Berlin (2013) (26).  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/26\\_13.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/26_13.pdf?__blob=publicationFile)
- [103] RUPNIK, M.: Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev* (2008); 32 (3), S. 541–555
- [104] RUPNIK, M.; WILCOX, M.H. & GERDING, D.N.: *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* (2009); 7 (7), S. 526-536
- [105] RUSSELLO, G.; RUSSO, A.; SISTO, F.; SCALTRITO, M.M. & FARINA, C.: Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea and molecular characterization of clinical isolates. *New Microbiol* (2012); 35 (3), S. 307–316
- [106] SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K. & ERLICH, H.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (1988); 239 (4839), S. 487-491
- [107] SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M. & LI, L.Y.: Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* (1995); 59 (4), S. 579–590
- [108] SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977); 74 (12), S. 5463-5467
- [109] SARGENT, T.D. UND DAWID, I.B.: Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* (1983); 222 (4620), S. 135–139
- [110] SCHMIDT, A.; ACKERMANN, G.; HILLERT, R.; WITTE, W. & ZAIß, N.H.: *Clostridium difficile* - Epidemiologie und Charakteristik ambulant erworbener Infektionen. *Mikrobiologie* (2011) (4), S. 115–124
- [111] SCHNEIDER, T.; ECKMANNS, T.; IGNATIUS, R.; WEIST, K. & LIESENFELD, O.: *Clostridium-difficile*-assoziierte Diarrhö - Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger. *Dtsch Arztebl* (2007); 104 (22), S. 1588-1594
- [112] SCHRÖDER, G.; KRAUSE, S.; ZECHNER, E.L.; TRAXLER, B.; YEO, H.-J.; LURZ, R.; WAKSMAN, G. & LANKA, E.: TraG-Like Proteins of DNA Transfer Systems and of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System: Inner Membrane Gate for Exported Substrates? *Journal of Bacteriology* (2002); 184 (10), S. 2767–2779
- [113] SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T.; VAN HAM, M.; ROHDE, M.; HARDT, W.-D.; WEHLAND, J.; AKTORIES, K. & BLANKE, S.R.: *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLoS Pathog* (2009); 5 (10), S. e1000626

- [114] SEBAIHIA, M.; WREN, B.W.; MULLANY, P.; FAIRWEATHER, N.F.; MINTON, N.; STABLER, R.; THOMSON, N.R.; ROBERTS, A.P.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; WANG, H.; HOLDEN, M.T.G.; WRIGHT, A.; CHURCHER, C.; QUAIL, M.A.; BAKER, S.; BASON, N.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DOWD, L.; FRASER, A.; FELTWELL, T.; HANCE, Z.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; STEVENS, K.; UNWIN, L.; WHITHEAD, S.; DUPUY, B.; DOUGAN, G.; BARRELL, B. & PARKHILL, J.: The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet* (2006); 38 (7), S. 779-786
- [115] SEKULOVIC, O.; MEESSEN-PINARD, M. & FORTIER, L.-C.: Prophage-Stimulated Toxin Production in *Clostridium difficile* NAP1/027 Lysogens. *J Bacteriol* (2011); 193 (11), S. 2726–2734
- [116] SHAN, J.; PATEL, K.V.; HICKENBOTHAM, P.T.; NALE, J.Y.; HARGREAVES, K.R. & CLOKIE, M.R.J.: Prophage Carriage and Diversity within Clinically Relevant Strains of *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology* (2012); 78 (17), S. 6027–6034
- [117] SPIGAGLIA, P.UND MASTRANTONIO, P.: Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* (2003); 41 (6), S. 2454–2457
- [118] STABLER, R.A.; DAWSON, L.F.; VALIENTE, E.; CAIRNS, M.D.; MARTIN, M.J.; DONAHUE, E.H.; RILEY, T.V.; SONGER, J.G.; KUIJPER, E.J.; DINGLE, K.E.; WREN, B.W. & AHMED, N.: Macro and Micro Diversity of *Clostridium difficile* Isolates from Diverse Sources and Geographical Locations. *PLoS One* (2012); 7 (3), S. e31559
- [119] STARR, J.: *Clostridium difficile* associated diarrhoea: diagnosis and treatment. *BMJ* (2005); 331 (7515), S. 498–501
- [120] STRUELENS, M.J.: Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1998); 93 (5), S. 581–585
- [121] STUBBS, S.L.; BRAZIER, J.S.; O'NEILL, G.L. & DUERDEN, B.I.: PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* (1999); 37 (2), S. 461–463
- [122] STUBBS, S.; RUPNIK, M.; GIBERT, M.; BRAZIER, J.; DUERDEN, B. & POPOFF, M.: Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* (2000); 186 (2), S. 307-312
- [123] SUGIMOTO, M.; SAIKI, Y.; ZHANG, D. & KAWAI, F.: Cloning and characterization of preferentially expressed genes in an aluminum-tolerant mutant derived from *Penicillium chrysogenum* IFO4626. *FEMS Microbiol Lett* (2004); 230 (1), S. 137–142
- [124] TANG, Y.W.; PROCOP, G.W. & PERSING, D.H.: Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin. Chem.* (1997); 43 (11), S. 2021–2038
- [125] TAN, K.S.; WEE, B.Y. & SONG, K.P.: Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* (2001); 50 (7), S. 613-619
- [126] TASTEYRE, A.; BARC, M.C.; COLLIGNON, A.; BOUREAU, H. & KARJALAINEN, T.: Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* (2001); 69 (12), S. 7937–7940
- [127] TENOVER, F.C.; AKERLUND, T.; GERDING, D.N.; GOERING, R.V.; BOSTROM, T.; JONSSON, A.-M.; WONG, E.; WORTMAN, A.T. & PERSING, D.H.: Comparison of Strain Typing Results for *Clostridium difficile* Isolates from North America. *J Clin Microbiol* (2011); 49 (5), S. 1831–1837
- [128] TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; LEE, C.W.; PAPADIMITRIOU, J.M. & DAWKINS, H.J.: Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* (1998); 36 (4), S. 1096–1100
- [129] VEDANTAM, G.; CLARK, A.; CHU, M.; MCQUADE, R.; MALLOZZI, M. & VISWANATHAN, V.: *Clostridium difficile* infection: Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes* (2012); 3 (2), S. 22–35
- [130] VOS, P. DE; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.-H. & WHITMAN, W.B. (Hg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins and Springer, Baltimore and Md (2009)
- [131] WALIGORA, A.-J.; HENNEQUIN, C.; MULLANY, P.; BOURLIOUX, P.; COLLIGNON, A. & KARJALAINEN, T.: Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with Adhesive Properties. *Infect Immun* (2001); 69 (4), S. 2144–2153

- [132] WASSILL, L.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H.: Development of a modified subtraction hybridization technique and its application for the design of strain specific PCR systems for lactococci. *FEMS Microbiol Lett* (1998); 166 (1), S. 63–70
- [133] WILCOX, M.H.; SHETTY, N.; FAWLEY, W.N.; SHEMKO, M.; COEN, P.; BIRTLES, A.; CAIRNS, M.; CURRAN, M.D.; DODGSON, K.J.; GREEN, S.M.; HARDY, K.J.; HAWKEY, P.M.; MAGEE, J.G.; SAILS, A.D. & WREN, M.W.D.: Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection Following the Introduction of a National Ribotyping-Based Surveillance Scheme in England. *Clin Infect Dis* (2012); 55 (8), S. 1056–1063
- [134] WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P. & FOX, G.E.: PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. *Curr Microbiol* (1990); 21, S. 325-327
- [135] YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S. & MADDEN, T.: Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* (2012); 13 (1)
- [136] ZAIß, N.H.; WITTE, W. & NÜBEL, U.: Fluoroquinolone Resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerg Infect Dis* (2010); 16 (4), S. 675-677
- [137] ZWIRGLMAIER, K.; WASSILL, L.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.: Subtraction Hybridization in Microplates: An Improved Method to Generate Strain-specific PCR Primers. *Syst Appl Microbiol* (2001); 24 (1), S. 108-115

### INTERNETQUELLEN:

- [138] GREINER BIO-ONE IN KOOPERATION MIT AMPLEXDIAGNOSTICS (Hg.): GENSPEED® MRSA Test System - Jetzt beginnt eine neue Zeitrechnung – MRSA Ergebnisse schon nach 75 Minuten. [http://www.gbo.com/documents/980285\\_GENSPEED\\_MRSA\\_d\\_rev01\\_0812\\_small.pdf](http://www.gbo.com/documents/980285_GENSPEED_MRSA_d_rev01_0812_small.pdf) (zuletzt aktualisiert am 15.11.2012, zuletzt geprüft am 02.12.2013)
- [139] GBOMKTG (Hg.): GENSPEED® MRSA Test System Animation. [http://www.youtube.com/watch?v=0\\_\\_JjolZBug](http://www.youtube.com/watch?v=0__JjolZBug), (zuletzt aktualisiert am 15.11.2012, zuletzt geprüft am 02.12.2013)

## VII ANHANG

---

### VII.1 Mittels MASH isolierte DNS-Fragmente

Im Folgenden sind die in mittels Ausschlusshybridisierung (experimentell oder *in silico*) isolierten DNS-Fragmente, auf Basis derer spezifische *Primer* und Sonden designt wurden, unter Angabe der jeweiligen Hybridisierungsbedingungen und der verwendeten Subtraktoren aufgelistet. Unterstrichene Sequenzbereiche dienten zur Konstruktion der spezifischen *Primer* und Sonden. Die jeweiligen Sequenzen sind in den Tabellen 25 (S. 138) und 26 (S. 139) aufgelistet.

**Isolat:** *C. difficile* 27

**Fragment:** C\_diff\_27\_11 (1504 bp)

**Subtraktoren:** *C. difficile* 101, 102, 103, 104, 105, 1, 2, 4, 16, 41, 44, 45

**Hybridisierungsbedingungen:** 56 °C, 2 h, 0 % Formamid im Hybridisierungspuffer

AGCACACGATAAAAATCAATNTGGAAGAACTGTACAAGCAACATAAAGAAGATAAAGTGGTATTCCAAAAATATTA  
TCAAGCGAAGTAATAAAGTAAGTACCTGGTCTAAAAACGGCATTACAGAACACAAAAGGCTATGACAAAAAAGTTT  
TATCTATGTATGABAACGTATTTTTTGAATGCTTGCATATAGTATGCAGTAATAATTCAAAAAGCTGTTATCGTG  
TGCGGTAAATAAANNNACCGGTTCCTAGATAATACACTTTTGTGCGTCTTGAAAAATAACGGGACGGTTTTGGAT  
ATAACCAGAAGTGTCTTTTTTCTTAGGAGTAAATAAGGCATAGCTCTGGTTAAAGGGGGCTATAACCATGATTGC  
ATACGGAAGAACGTTCTGCCGTTCTCAACTGAATAAATATTTTCAGTCCACTATTACAATCATTACACCCTTTACA  
AGAATTAATAATTCATATCAATAGAATTTATAAAAACAGTCTGTTTGTGTAATTACACATTATCGGGCTGTTTTG  
TTTTGTTAAAAATTTTTTCAACTTTTTTCGGTTTTCAACTTAGCAAATCACACCTGTCGTTCCCTATATGGTGCG  
AAAGAGGGATAACCACTTTTCATATCGTAACGGAAAAGGGGTGAGATTGATGAAACCATCTGACTTCCAGAAAAC  
AGTTCAATGCCGTTTTGAAAGTTGTTTGAAGAAAAGTTGTCCGACATGTTGTTAAGGACTATCAGAAGAAAATTA  
GCGACGACAAAAGGGAGAAAACGCTTTTTTGTGAACTTCCAGAAATCGTTGTAGAAAAATCTGGCTGTCTGGGACGA  
CTATGATACGGGCTATACGATTTTTCAATGTATGTGGTAGTGATATYCGTATTTGTGATGATGAACTGGCAGAAGC  
CTTGAAACATTTGTCTGAGCGTAATCGAGAAAATTTGTTGATGTATTATTTCTTGAAATGAGCGATACCGAGAT  
TGCAAAAAGACAAAATATTTCAAGAAGTGGTGTTTTTCAAACCGACACAATCACTAGAGCTTATGARARAAAT  
ACTAAAGGAGAAATGATAGCAAATGAAACACACAATGAAGAAGCCGTCCTACTACTTGCTTTCGCAGGCAATGGA  
CGGGGACGAAAAGCGATTGAAAAGATACTGGCATTATGACCCCTTACATATCAAAGTGCTGCTACGACCCTC  
TATGATGAATACGGCAATGTCTATATTGTTGTAGATATGGAATTAAGGGACTTATCAGAGAAGCACTTATTAAA  
ATGATTTTAGGGTTTGATATTGCCTTAGAAATCGGAGAAGAATAACAAGCAGTAACCGCAGAGCATGAKTTGRTC  
AATCCCCTCTTTCTGCTCTGCCCTGNNNTTATATGAAAGCAACACGTWTTCCGCCACAGCTCTTTGACAACTGA  
ATAAAGCAGACAKATGTATWTGTGAGATAKCGATTYACTGTAAGTGTACKCCAYGATCCTTTTCAAAGAAAAGCC  
WGC

**Entwickelte Primer:** CDiff\_257\_11\_F1, CDiff\_27\_11\_R1, CDiff\_27\_11\_F2, CDiff\_27\_11\_R2

**Entwickelte Sonde:** SDE-Pr2

**Isolat:** *C. difficile* RK 305

**Fragment:** C\_diff\_RK305\_1 (656 bp)

**Subtraktoren:** *C. difficile* 160, 161, 162, 163, 164, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 418, 419, 420, 421, 433, 423

**Hybridisierungsbedingungen:** 50 °C, 2 h, 15 % Formamid im Hybridisierungspuffer

GATCACAATTACCTACAATGGTATCTGCATTATCTTTGTAGATTGCTTTTAACTGAGATTGTGCTTGAAGTATTA  
TACTTGCTGAAATCTCTCTTGAACGGATTGTTGCAATTAACCTTCTCAAACCTTAGGAATTAAGCCGATATTAGCGA  
ACTCATCAAGTAGACACCTCACATGGACAGATAATCGTCCGCCATATACATCATCCGCCTTATCACATAAGAGAT  
TAAATAACTGCGAATACATAATAGACACTACAAAGTTAAAGGTATCATCGGTATCGGAGATAATGACAAAAGAGTG  
CTGCCTTTCTATCTCCAAGAGTATCAAGTTCAGTTCATCTTCTTTTCATCAAATCTCTCAATTCTTGAATATCAA  
ATGGAGCAAGCCTTGCACCGCAAGAAATGAGAATAGATTTTGCTGTTTTTCCGGCAGCAAGTTTATATTTTTTA  
ATTGCTTCACCGCAAAGTGCGTAGGCTCTCTTTTTTCTAAGGCTTCAAAGAGTCTATCTATTGGATTCATATAGG  
TTTCATCATCTTCTCTAACTTCTGAAGCATCTATCATATCAAGGAGTGTTGCAAAGTTCTTTCTCCCTTGGAG  
CTTCATAGAAGATATATCCAATCAGAGCTGTATAGTAGAGTTTTTTCGGCTTTGATA

**Entwickelte Primer:** Cdiff\_RK305\_F1, CDiff\_RK305\_F2, CDiff\_RK305\_R2

Entwickelte Sonden: F305A, F305B

**Stamm:** *C. difficile* QCD-63q42

**Fragment:** C\_diff\_001

isoliert mittels „*in silico* Ausschlusshybridisierung“ (BLAST Analyse)

TGTATAGTAATCAAACCTTATGAAACAATAAAAAATAGAACCCTTAAAAATATAAAATTTAGATGTGTATAAAGGAG  
 AAGGTTCTTTTCTAAATGATATGGTTTCTGGAAATACCTTTGAACTTTCAAAAATGTATGTTGAACTTTCTAACA  
 TATATAAAATGGCTTTTATTGAAGACACTTATAATCAATTATTAGATAAGAGAGTGAATGAATTTGGTGATATA  
 GAAAATTTGGGTACTGAGGCTACTGGAGAAAGTAGAATTTATAGGTGAAAATGGTGTGAAAATATCAAATGGAACAA  
 TTATATCCTATAAAGATTTATCATTGTGGTAATAAAGGATATTGTCATTGGTGGTGAAGAAGGAAAATATAAAGTC  
 CAGTCGAAGCACTAGAAAATTGGAAGTACTAGATATAATTTACCATCTGATTGTGAATTTAAGGTAAATGATAATATAT  
 TTGGAATTGAAAAGATAACAAATATAAATAAATTTTCAGGTGGTACAGAAAATTGAACTGATGAAGAAGTGGAG  
 AAAGTTTTTTAGAGTACAAAAAATCAAGCAACAAGTGGGAATAAAGCACATTATGAAGAATGGGCTTTAGAAG  
 TTGATGGTGTATATAATGCAAAAAGTATATCCAAGATGGAATGGAGCAGGGACAGTTAAGGTTTTATTGTTGGAC  
 AAAATAATCAAGCGTTGAAGAAGAAAATAAATAACTAAGTGTAGAGAACATATTGAGGAAGAAATGCCAATAGGAG  
 CTACACTAACAGTAACTACTCCAATCCCCTAAATATAAATAAGTGCATCTATGGAGCTAGAAAAGTGATATA  
 CCTTAGATATGGTAAAAAATAGTTTTATAGAAAATATAAATCAATATTTTAGAAGTATAACAGGAGAAAATGTAT  
 ACACGAAAATCATGGGGATTCTAATAAGTACTTCTGGAGTCCATGATTTAAGCAATTTACTTGTCAATAACTCAA  
 CAGACAATATAACTATTGAAGATGATAAAAATACCTAGTGTACAACCTTTAGATTTTAGTGAGGTGGAGGTTTAAAT  
 GAAATTAATTGATAAACTACCATCATTTTATAAAAATTATATGGTTGAAGCAATACAAGATTTCTTATGATAGTGA  
 ATTATCTTCATTAAGAAAATATAGATGATACTATAAATCAAATGTTTGTCAATACATCCACATGGGGTCTTGA  
 TATGTGGGAAAGTATATTGTGTATTCAAATAATGAAGATTTAAATTATGAGACTAGAAGAAGCAATATAAAGGC  
 TAAAATGAGAAGTTTAGGAACAACATAAATTGAAGGTTATAAAAAACATTTGTGAAGCTTATACAAAGACTGATGT  
 TGAAGTAACAGTACTCAGCAATGAATTTATATTTATATTAGAGTTTATAGTTAATAATTGTAGTTATAAATCTAT  
 TGTAGAGTTGGATAAAGTATTAGAAAATGTAAAGCCATGTCATCTGGAACATAAATTTAAAAATGATTTTGTAA  
 TAAAAATGAACTATTTTGTGGAAGTCTATAAATACAGGAGAAAAGTACTGTACTGTATATCCGTGGACACCATCAA  
 TATAGAGATATTTGGAGAGATAACCATTTCTACAGGAAATGATAGAAGTATGGAAAAAGTAATCTTATATCCTAA  
 ACAGGAGGCGATATAAATTGGCAGAACAATAACTATAACTTTTAACTAAAAGCAGGTAAAAGCATCTATTGCAA  
 ATGCAACTGCTCTTGGTAAAAAAGTAGATTTAGTTAACTACAACCTGGAGATGGTGGAGGAAGTGAGTATAGTC  
 CTACAGAAGAACAACATCTCTTAAAGAAGTTGTCTGGGAAGGCAATATAAGTAATGTAAAAATAGATGATGACA  
 ACTCTAACTGGATAGTTATAGAAAAGTGTAAATACCAGGTAGTATTGGCGGTTTTATGATAAGAGAAGTTGGTATAT  
 TTGATTCAGAAAATAAGCTTATAGCTATATCTAAATATCCAGAACTTATAACCAACTGCTGATTTCTGGAAGTG  
 TAAAAGATTTAATTATAAGAATTATATTGGTAGTTTCTAATACTTCAAGTGTAATTTAAAAGTTGACCCAAGTG  
 TCATCTTGGCAACTTTAAAAGATATACAAGAGTTAGATAAAAAAATAGATACAACATAAATAACATTAACAAGTG  
 GTATAGAACTACTAAAATAGAGTTAAAATACTAAAATAGATAATACTAAGACAGATGTCAGTACTAGTAAAATAGGAG  
 ATACAACCTACTCAATACAACGATAAAAACAAGTCTTGTAAATGCAGTCAATGAGGTAAAAGAAAGGCTTTGATA  
 GCATAGAAAACAACAGCAGAGAAAACAAGTTATGATAATACAGTAAAGTAACTTGCTGCTACAAATGTTCAAGGAG  
 CTATAGATGAGTTATGTACTAGTGTAAATACTGCTAGAATTAGTTTGTATTAATGATATAAAAAGATATGTTACCAA  
 TATAA

**Entwickelte Primer:** CDiff\_001\_F1, CDiff\_001\_R2

## VII.2 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten inklusive der in dieser Arbeit entwickelten Oligonukleotide aufgelistet. Es sind die jeweilige Bezeichnung, die Sequenz in 5'-3'-Richtung, die Anwendung bzw. das Ziel-Fragment, der %GC-Gehalt sowie die Schmelztemperatur angegeben. Bei PCR- und Sequenzierprimern ist zusätzlich die jeweilige Orientierung angegeben, bei den in dieser Arbeit entwickelten PCR-Primerpaaren die Länge des entsprechenden PCR-Produkts.



**Tabelle 24: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3' <sup>#</sup>	Orientierung <sup>~</sup>	Anwendung <sup>†</sup>	% GC	T <sub>m</sub> [4GC+2AT]	Referenz	
100K	GGT TAC CTT CTT ACG ACT T	rückwärts	(a)	45 %	55 °C	[77], modifiziert	
616v_alt	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	vorwärts	(a) „Primer- paar 1a“	42 %	54 °C		
609RII	ACT ACY VGG GTA TCT AAK CC	rückwärts	(a)			TUM; Oligonukleotid-Sammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie, AG Ludwig (persönliche Mitteilung)	
632v	TKA AGT CGT AAC AAG G	vorwärts	(b)	41 %	45 °C		
118R	GTT BCC CCA TTC GG	rückwärts	(b)	60 %	45 °C		
97kV*	TAC GGG AGG CAG CAG	vorwärts	(c)	67 %	53 °C		
699RIII*	GGG TTG HGC TCG TT	rückwärts	(c)	60 %	45 °C		
614V*	GCY GTC GTC AGC TCG T	vorwärts	(c)	66 %	46 °C		
609R*	ACT ACY AGG GTA TCT AA	rückwärts	(c)	38 %	47 °C		
100K*	GGT TAC CTT GTT ACG ACT	rückwärts	(c)	44 %	51 °C		
M13 Forward	GTA AAA CGA CGG CCA	vorwärts	(d)	53%	46 °C		Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	rückwärts	(d)	47%	50 °C		
M13F*	GTA AAA CGA CGG CCA	vorwärts	(e)	53%	46 °C		
M13R*	CAG GAA ACA GCT ATG AC	rückwärts	(e)	47%	50 °C		
P1	AGG GGA TAA CCA ATT CAC ACA CCA		(f) Linker P (vgl. Kap. II.9.1, Seite 49),	46 %	61 °C	[137]	
P2	CCC CTA TTG GTT AAG TGT GTG GTC TAG			46 %	65 °C		
S1	CGC CAG GGA ACA CCC AGT CAC GAC		(g) Linker S (vgl. Kap. II.9.1, Seite 49)	67 %	70 °C		
S2	GCG GTC CCT TGT GGG TCA GTG CTG CTA G			64 %	65 °C		
FS-F	◇	vorwärts	(h)	21 %	44 °C	◇	
FS-R	◇	rückwärts	(h)	21 %	44 °C		
CTXB-F	◇	vorwärts	(i)	42 %	53 °C		
CTXB-R	◇	rückwärts	(i)	42 %	53 °C		

Aufgelistet sind alle verwendeten Oligonukleotidprimer, die nicht im Zuge dieser Arbeit entwickelt wurden. Es ist die jeweilige Bezeichnung des Oligonukleotids, die Sequenz in 5'-3'-Richtung, die Orientierung, der %GC, die Schmelztemperatur sowie das Anwendungsgebiet angegeben.

Mit \* gekennzeichnete Oligonukleotide wurden für Sequenzierungen (vgl. Kap. II.10, S. 50) eingesetzt und tragen eine IRD-Markierung am 5'-Ende.

<sup>#</sup> IUPAC-Codes<sup>[33]</sup>: **Y**, C oder T; **M**, C oder A; **B**, C, G oder T) **K**, G oder T; **H**, A, C oder T.

<sup>~</sup> Orientierung: **vorwärts**: Primer bindet am Minusstrang, Plusstrangsynthese; **rückwärts**: Primer bindet am Plusstrang, Minusstrangsynthese.

<sup>†</sup> Anwendung: **(a)** 16S rDNS-gerichteter Primer, Anwendung bei PCR (vgl. Kap. II.3.1, S. 41, Kap. III.4, S. 82); **(b)** 16S rDNS-gerichteter Primer, Anwendung bei „Ribotyp-PCR“ (vgl. Kap. III.3.1, S. 78); **(c)** 16S rDNS-gerichteter Primer, Anwendung bei Sequenzierung von 16S-PCR-Produkten (vgl. Kap. II.10, S. 50); **(d)** Vektor pCR 2.1-spezifischer Primer, Anwendung bei PCR zur Überprüfung rekombinanter Zellen (Klonscreening) (vgl. Kap. II.3.2, S. 42 und Kap. II.6.3, S. 46); **(e)** Vektor pCR 2.1-spezifischer Primer, Anwendung bei Sequenzierung der Insertionsstelle nach Klonierungen (vgl. Kap. II.10, S. 50); **(f)** Linker P-spezifischer Primer, Anwendung zur PCR-Amplifikation P-ligierter DNS-Fragmente (vgl. Kap. II.3.1, S.41 und Kap. II.9, S. 47); **(g)** Linker S-spezifischer Primer, Anwendung zur PCR-Amplifikation S-ligierter DNS-Fragmente (vgl. Kap. II.3.1, S. 41 und Kap. II.9, S. 47); **(h)** Amplifikation einer Ribotyp 027 differenzierenden Region auf dem *C. difficile* PaLoc für Hybridisierungen mit dem „Q4POC *C. difficile* Ribotype 001“ Prototyp (vgl. Kap. II.14, S. 53); **(i)** Amplifikation des TcdB-Gens von *C. difficile*.

◇: die Primerpaare FS-F/R und CTXB-F/R wurden von der AmplexDiagnostics GmbH entwickelt und finden bereits in kommerziellen Produkten (hyplex® ClosTox/ClosTox 027) Anwendung und können hier nicht näher beschrieben werden..

Tabelle 25: In dieser Arbeit entwickelte PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Orientierung <sup>~</sup>	Ziel-Fragment	Länge des PCR-Produkts [bp]	% GC	T <sub>m</sub> [4GC+2AT]
<b>PCR-Primer zur Überprüfung der Spezifität der Subfragmente mittels Ausschlusshybridisierung isolierter stammspezifischer <i>Clostridium difficile</i> Ribotyp 001 DNS-Fragmente</b>						
CDiff_27_11_F1	„Primerpaar 3“ (vgl. Kap. III.4 S. 82)	TGT CCG ACA TGT TGT TAA GG	vorwärts	Fragment CDiff_27_11	484	55 °C
CDiff_27_11_R1		GTC GTA GCA GCA CTT TGA TA	rückwärts	Fragment CDiff_27_11		55 °C
CDiff_27_11_F2*	„Primerpaar 4“ (vgl. Kap. III.4 S. 82)	AAG CTG TTA TCG TGT GCG GT	vorwärts	Fragment CDiff_27_11	617	57 °C
CDiff_27_11_R2*		TAG TCG TCC CAG ACA GCC AG	rückwärts	Fragment CDiff_27_11		61 °C
CDiff_RK305_F1*		CAT CGG TAT CGG AGA TAA TG	vorwärts	Fragment CDiff_RK305_1	243	55 °C
CDiff_RK305_R1		CAA TAG ATA GAC TCT TTG AAG CC	rückwärts	Fragment CDiff_RK305_1		57 °C
CDiff_RK305_F2	CCA AGA GTA TCA AGT TCC AG	vorwärts	Fragment CDiff_RK305_1	199	55 °C	
<b>PCR-Primer zur Überprüfung der Spezifität des mittels <i>in silico</i> Analyse identifizierten <i>C. difficile</i> Ribotyp 001-spezifischen Genomabschnitts</b>						
CDiff_001 F2	„Primerpaar 2“ (vgl. Kap. III.4 S. 82)	ACT GAG GCT ACT GGA GAA	vorwärts	NCBI Accession <sup>§</sup> : ZP_05329368	151	54 °C
CDiff_001 R2		AGT GCT TCG ACT GGA CTT	rückwärts	NCBI Accession <sup>§</sup> : ZP_05329368		54 °C
<b>PCR-Primer zur Amplifikation von Fragmenten aus genomischer DNS als Nicht-Ribotyp-001 deklarerter <i>C. difficile</i> Stämme, welche die diagnostische Region enthalten</b>						
CDiff_frag_27_F	„Primerpaar 4“ (vgl. Kap. III.4 S. 82)	GAA GAA CTG TAC AAG CAA CA	vorwärts	Fragment CDiff_27_11	1413	53 °C
CDiff_frag_27_R		GTC TGC TTT ATT CAG TTG TC	rückwärts	Fragment CDiff_27_11		53 °C
CDiff_PCTP_R4		CGC TTA ATG TAG CTC TC	rückwärts	Fragment CDiff_RK305_1	1691	50 °C
CDiff_PCTP_F4		GTG CAA GAT AAG GCA AAG	vorwärts	Fragment CDiff_RK305_1		51 °C
CDiff_PCTP_R5		GTG AAA TTC AAG GCA ACT G	rückwärts	Fragment CDiff_RK305_1	1562	52 °C
						42 %

Es sind in dieser Arbeit entwickelte spezifische Oligonukleotide sowie das jeweilige Zielfragment aufgelistet. Angegeben ist die jeweilige Bezeichnung des Oligonukleotids, die Sequenz in 5'-3'-Richtung, die Orientierung, der %GC, die Schmelztemperatur sowie das jeweilige Zielfragment und die Länge des generierten PCR-Produkts des jeweiligen Primerpaares.

~ Orientierung: vorwärts: *Primer* bindet am Minusstrang, Plusstrangsynthese; rückwärts: *Primer* bindet am Plusstrang, Minusstrangsynthese.

§ Zugriffsnummer des National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Die mit \* gekennzeichneten *Primer* zeigten keine ausreichende Spezifität bezüglich *C. difficile* Ribotyp 001. Diese Oligonukleotide wurden nicht weiter verwendet.

**Tabelle 26: In dieser Arbeit entwickelte Fangsonden für das Genspeed® Testsystem**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'*	Ziel-Fragment	% GC	T <sub>m</sub> [4GC+2AT]
<b>Für „Q4POC <i>C. difficile</i> Ribotype 001“-Hybridisierungen verwendete DNS-Fangsonden</b>				
SDE-Pr2	GTA TTT GTG ATG ATG AAC TGG CAG A*	mittels CDiff_27_11_F1/R1 amplifizierte PCR-Produkte	40 %	60 °C
F305A	CTA CGC ACT TTG CGG TGA AGC AAT A*	mittels CDiff_RK305_F2/R1 amplifizierte PCR-Produkte	48 %	63 °C
F305B	ATT CTC ATT TCT TGC GGT GCA AGG C*	mittels CDiff_RK305_F2/R1 amplifizierte PCR-Produkte	48 %	63 °C
CDTXB	†	<i>C. difficile</i> Toxin B-Gen	30 %	57 °C
RT027	†	Ribotyp 027 differenzierende Region auf dem <i>C. difficile</i> PaLoc	24 %	53 °C

\* Die Fangsonden, die für die Verwendung der Q4POC-Plattform entwickelt wurden, bestehen jeweils aus drei sich wiederholenden identischen Oligonukleotiden (Gesamtlänge von je 75 nt); hier ist jeweils nur die einfache Sequenz angegeben (25 nt).

†: bei den Sonden CDTXB und RT027 handelt es sich um Oligonukleotidsonden, die von der AmplexDiagnostics GmbH entwickelt wurden und die bereits in kommerziellen Produkten (hyplex® ClosTox/ ClosTox 027) der AmplexDiagnostics GmbH Anwendung finden; aus diesem Grund können sie hier nicht näher beschrieben werden.



## DANKSAGUNGEN

**An dieser Stelle möchte ich allen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Liebl für die Möglichkeit dieses interessante und in meinen Augen wichtige Thema an seinem Lehrstuhl in Form dieser Dissertation zu bearbeiten.

Danke an apl. Prof. Ehrmann und Prof. Grill als Mitglieder meiner Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Wolfgang Ludwig für die Auswahl dieses Themas, für die langjährige kompetente Betreuung und Zusammenarbeit, für die Möglichkeit selbständig zu arbeiten und eigene Ideen umzusetzen und nicht zuletzt für das angenehme Arbeitsklima und die netten Gespräche, die nicht immer unbedingt wissenschaftlicher Natur waren.

Dr. Lars Wassill und Dr. Dirk Ganghofner von der AmplexDiagnostics GmbH möchte ich herzlich für das Bereitstellen der *C. difficile* DNS-Proben und des Genspeed®-Testsystems danken sowie für die Möglichkeit, diverse Versuchsreihen in ihren Labors durchzuführen. Danke für eure Unterstützung, die Zusammenarbeit und die angenehme, lockere Atmosphäre bei euch.

Danke an Dr. Sören Schubert vom Max von Pettenkofer-Institut für das Bereitstellen von *Campylobacter* Reinkulturen und die Möglichkeit, seine Labors für DNS-Extraktionen und Klonierungen zu verwenden.

Vielen Dank an Hedwig Kurka, die immer mal wieder ein paar BLASTs für mich hat laufen lassen und die mir *C. difficile* Genomsequenzen zur Verfügung gestellt hat und mit der man sich auch so herrlich über die verschiedensten Dinge lustig machen konnte.

Danke an alle (auch ehemaligen) TAs und Mitarbeiter, die den Lehrstuhl am Laufen halten und ohne die nichts geht:

Danke vor allem an Sibylle, die immer mit einer oder auch zwei helfenden Händen und Rat und Tat zur Seite stand und frei heraus sagt, was sie denkt. Bei dir weiß man immer woran man ist.

Danke auch an Konny, die immer eine Lösung parat hat, wenn man bestimmtes Equipment braucht, die immer noch irgendetwas aus den dunkelsten Ecken hervor ziehen kann und ohne die, meiner Meinung nach, der Lehrstuhl sowieso zusammenbrechen würde. Danke auch für die vielen Gespräche in den Pausen oder auch Nicht-Pausen – ein ordentlicher Schnack macht doch das Arbeiten wesentlich angenehmer.

Vielen, vielen, viiiiielen Dank an alle Mit-(leidenden) Doktoranden, die den Laboralltag mit Leben, Freude und Spaß gefüllt haben und mit denen man auch außerhalb der Arbeitszeit und außerhalb des Instituts immer wieder unterhaltsame Stunden verbringen konnte.

Besonderer Dank gilt Nina, die schon seit meiner Masterarbeit meine Laborpartnerin und Mentorin war, für die rigorose Einhaltung der Mittags- und Kaffeepause-Zeiten, aber auch für die Hilfe und Unterstützung und die lustigen Arbeitsstunden, die wir zusammen verbracht haben.

Besonderer Dank gilt auch Lena, die im letzten Jahr meiner Diss. meine Laborpartnerin war, die zwar nicht so akribisch auf die Einhaltung der Pausen geachtet hat, aber dennoch das zeitweilig recht einsame Labor wieder mit Leben gefüllt hat und mit der man sowohl innerhalb als auch außerhalb der Instituts-Mauern riesen Spaß haben kann (auch wenn man zusammen als 5. und 6. Rad am Wagen unterwegs ist und dann auch noch der Wagen nicht dahin fährt, wo man eigentlich hin will ;-))

Vielen Dank auch an alle anderen Chaoten, mit denen man wunderbar über die verschiedensten Dinge philosophieren kann, sei es wissenschaftlich oder nicht, mit denen man manchmal auch „seeeeehr wissenschaftlich“ (Zitat Wolfgang) die Zeit verbringen kann und wegen der ich immer wieder gerne (auch jetzt noch) nach Freising fahre: Bene, David, Claudia, Angel, Björn, Justyna, Markus, Vladimir, Hedwig, Daniel, Trang und, und, und. Es sei mir von denen verziehen, die ich hier vergessen habe zu erwähnen, fühlt euch trotzdem gerne angesprochen.

Ohne die vielen derzeitigen und ehemaligen Angehörigen des Lehrstuhls für Mikrobiologie, wäre es sicher nicht möglich gewesen, diese Arbeit (dann doch endlich mal) fertig zu stellen (aber ich habe ja nur solange gebraucht, weil es mir so schwer fällt, euch alle zu verlassen☺).

Von Herzen danken möchte ich natürlich meinen Eltern, die mich immer und in jeder Lebenslage auf jede nur erdenkliche Weise unterstützt haben, die mir das Studium erst ermöglicht haben und die schon wissen, dass es einem nicht so gut geht, wenn man es selbst noch gar nicht bemerkt hat; und meinen beiden Brüdern Arne und Henning, mit denen der Kontakt zwar meist leider nicht so rege ist, wie wir drei das eigentlich gerne hätten, die aber trotzdem zur Seite stehen, wenn es notwendig ist.

Ich hoffe nun, ich habe niemanden vergessen. Falls doch...nicht beleidigt sein! Irgendwann ist man einfach nur noch froh, wenn das letzte Wort geschrieben ist und die letzte Formatierung so will wie ich!

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Anna Christina Geisel

geboren am 25.10.1983  
in Bremen



## BERUFSERFAHRUNG UND WEITERBILDUNG

---

- 10/2008-05/2014      **Promotion** an der TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. Wolfgang Liebl, Arbeitsgruppe Dr. Wolfgang Ludwig  
Anreicherung stammspezifischer DNS-Fragmente durch Mikrotiterplatten-Ausschluss-Hybridisierung für die *in vitro* diagnostische Identifizierung von *Clostridium difficile* Stämmen  
Durchführung mehrerer Versuchsreihen bei einem Biotechnologie-Unternehmen in einem nach **EN ISO 13485 zertifizierten Labor**
- 11/2012-04/2013      **Weiterbildung** bei ATV – Ausbildung Training Vernetzung GmbH
- **Pharma-Management** (Gesundheitspolitische Grundlagen, AMG, regulatory affairs, Klinische Studien, Pharma-Vertrieb)
  - **Wirtschaftliche Grundlagen** (BWL, Marketing, Pharma-Marketing, Projektmanagement, Qualitätsmanagement)

## NEBENTÄTIGKEITEN

---

- 10-11/2009      **Lehrkraft** beim mikrobiologischen Praktikum zur Vorlesung Mikrobiologie an der FH Weihenstephan, Lehrstuhl für Gartenbau und Lebensmitteltechnologie, Prof. Dr. Marion Stoffels-Schmid
- seit 04/2002      **Aushilfskraft** an der Aral Tankstelle später Agip Service-Station Erding, Knuth Heitmann

## STUDIUM

---

- 04/ 2007-09/2008      **Master-Studium** an der TU München im Fach Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern medizinische Virologie und Humanbiologie  
**Masterarbeit** an der TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer, Arbeitsgruppe Dr. Wolfgang Ludwig  
*Acetobacteraceae*: Comparative Sequence Analyses of rRNA-Genes and Development of Specific rRNA-Targeted Oligonucleotides for Differentiation
- 10/2003-01/2007      **Bachelor-Studium** an der TU München im Fach Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie  
**Bachelorarbeit** an der TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer, Arbeitsgruppe Dr. Natuschka Lee  
Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft des Grundwassers einer TCE kontaminierten Deponie in Erding
- absolvierte Praktika      **Virologisches Praktikum** am Institut für Virologie der TU München und in der Abteilung Virusforschung des MPI für Biochemie in Martinsried  
**Humanbiologisches Praktikum**, Modul Humanphysiologie am Lehrstuhl für Humanbiologie der TU München

**SCHULAU SBILDUNG**

---

09/1996- 06/2003	Gymnasium Erding Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
09/1994- 06/1996	Orientierungsstufe Moordeich
08/1990- 07/1994	Grundschule Moordeich

**LEHRTÄTIGKEIT**

---

- Mitorganisation und Betreuung einer Bachelorarbeit
- Mitorganisation und Betreuung mehrerer mikrobiologischer Grund-, Groß- und Forschungspraktika für die Studiengänge Biologie, molekulare Biotechnologie und Biologie Lehramt am Gymnasium

**SPRACHKENNTNISSE**

---

- Englisch sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
- Französisch Grundkenntnisse in Wort und Schrift

**EDV-KENNTNISSE**

---

- MS Office
  - Power Point
  - Word
  - Excel
- ARB-Softwarepaket (Software zum Erstellen von Sequenzdatenbanken für vergleichende Analyse von Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen, Stammbaumberechnung und Sonden- und Primerdesign)
- Citavi
- MS Project

**MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

---

- PCR
  - Kolonie-PCR
  - Amplifikation aus Stuhlproben
  - (semi-) nested PCR
  - Multiplex PCR
- Klonierung
  - TA Cloning® Kit, Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*
- Sequenzierung
  - LI-COR System (Sanger Sequenzierung)
  - Bioinformatische Auswertung von Sequenzdaten
- Hybridisierung
  - reverse Sonden-Hybridisierung mit dem GENSPEED® Test System
  - Mikrotiterplatten-Ausschluss hybridisierung
  - „konventionelle“ reverse DNS-Sonden-Hybridisierung auf Glas-Objektträgern
  - reverse DNS-Sonden-Hybridisierung auf Glas-Objektträgern in einem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp
  - FISH
  - Southern-Blot