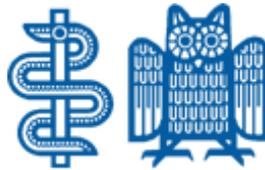


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil S. Becker



**Antigenspezifische und neutralisierende Antikörper bei Patienten
mit *Clostridioides difficile*-Infektion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von Sophie Roth
geboren am 10. Oktober 1990 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 05.07.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Lutz von Müller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Volk

In Liebe und Erinnerung meinen Großeltern Irene und Alfons gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	7
1.1 Zusammenfassung	7
1.2 Summary	9
2 Einleitung	11
2.1 <i>Clostridioides difficile</i>	11
2.1.1 Entdeckungsgeschichte und mikrobiologische Grundlagen	11
2.1.2 Epidemiologie	12
2.1.3 Pathogenese und Klinik	12
2.1.4 Risikofaktoren und Komorbiditäten	13
2.1.5 Diagnostik	14
2.1.6 Therapie	14
2.1.7 Prävention	15
2.2 Virulenzfaktoren	16
2.2.1 Toxine	16
2.2.2 Non-toxigene Virulenzfaktoren	17
2.3 Die Wirtsimmunantwort auf <i>C. difficile</i>	18
2.3.1 Die angeborene Immunantwort	18
2.3.2 Die erworbene Immunantwort	19
2.4 Neue Therapiestrategien	21
2.4.1 Intraluminale passive Immunisierung	21
2.4.2 Parenterale passive Immunisierung	21
2.4.3 Aktive Immunisierung (Impfung)	22
2.5 Zielsetzung	23
3 Material und Methodik	24
3.1 Wachstums- und Toxinkinetik	24
3.1.1 Wachstumskinetik	24
3.1.2 Toxinkinetik	26
3.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit <i>C. difficile</i> -Infektion	31
3.2.1 Klinische Beobachtungsstudie	31
3.2.2 Etablierung eines Neutralisationstests	33
3.2.3 Externe Antikörperbestimmung mittels ELISA (TechLab)	36
3.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung	36

4 Ergebnisse	37
4.1 Wachstums- und Toxinkinetik	37
4.1.1 Wachstumskinetik	37
4.1.2 Toxinkinetik	38
4.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit <i>C. difficile</i> -Infektion	41
4.2.1 Klinische Beobachtungsstudie	41
4.2.2 Antikörperprävalenz und Antikörperverlauf	48
4.2.3 Vergleich zwischen ELISA- und neutralisierenden Antikörpern	51
4.2.4 Die Antikörper und der Krankheitsverlauf	53
5 Diskussion	54
5.1 Wachstums- und Toxinkinetik	54
5.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit <i>C. difficile</i> -Infektion	56
5.2.1 Antikörperprävalenz und Antikörperverlauf	56
5.2.2 Vergleich zwischen ELISA- und neutralisierenden Antikörpern	59
5.2.3 Die Antikörper und der Krankheitsverlauf	60
5.2.4 Limitationen	61
5.2.5 Zusammenfassender Ausblick	62
6 Literaturverzeichnis	64
7 Anhang	74
7.1 Statistische Berechnungen	74
7.2 Fragebogen	84
7.3 Geräte und Reagenzien	86
8 Publikationen	89
9 Danksagung	91
10 Lebenslauf	93

Abkürzungsverzeichnis

Anti-TcdA	Antikörper gegen Toxin A
Anti-TcdB	Antikörper gegen Toxin B
Anti-GDH	Antikörper gegen GDH
Anti-Cwp84	Antikörper gegen Cwp84
ADP	Adenosindiphosphat
BHI-Medium	Brain-Heart-Infusion Medium
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CDI	<i>C. difficile</i> -Infektion
CDT	<i>C. difficile</i> -Transferase
CP	Cystein-Proteinase
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
Cwp	Cell wall protein
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESCMID	The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	U.S. Food & Drug Administration
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GDH EIA	Glutamatdehydrogenase-Enzymimmunoassay
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GT	Glucosyltransferase
i.v.	intravenös
IDSA	The Infectious Diseases Society of America

IL	Interleukin
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
MAP	Mitogen-activated protein
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NT	Neutralisationstest
OD	Optische Dichte
p.o.	per os
PaLoc	Pathogenitätslokus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rcf	Relative centrifugal force
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Ribotyp
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SHEA	The Society for Healthcare Epidemiology of America
SLPs	Surface-Layer-Proteine
TLR	Toll-like-Rezeptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf der Wachstumskinetik	25
Abbildung 2: Herstellung der Dreier-Verdünnungsreihe	28
Abbildung 3: Morphologische Beurteilung mittels Phasenkontrastmikroskopie	29
Abbildung 4: MTT-Assay des Toxinkinetik-Versuches zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h	30
Abbildung 5: Morphologische Beurteilung der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie	35
Abbildung 6: Wachstumskinetik der <i>C. difficile</i> -Stämme RT010, RT014, RT027	38
Abbildung 7: Zytotoxizität der <i>C. difficile</i> -Stämme RT014 und RT027	40
Abbildung 8: Verteilungsmuster der <i>C. difficile</i> -Ribotypen im untersuchten Patientenkollektiv	43
Abbildung 9: Antikörperprävalenz	48
Abbildung 10: Quantitative Werte spezifischer <i>C. difficile</i> -Antikörper während der akuten Krankheitsphase	50
Abbildung 11: Korrelation zwischen antigenspezifischen (ELISA) und neutralisierenden Antikörpern (NT)	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Patienten nach Krankheitsschwere	32
Tabelle 2: Gegenüberstellung der 50%-Zytotoxizität von RT027 und RT014	39
Tabelle 3: Patientencharakteristik (allgemeine Angaben)	45
Tabelle 4: Patientencharakteristik (Symptomatik, Basislabor und Therapie)	46
Tabelle 5: <i>C. difficile</i> -Diagnostik und Ribotypen	47
Tabelle 6: Direkter Vergleich zwischen dem Nachweis von Anti-TcdA bzw. Anti-TcdB und der Toxinneutralisation (RT014 und RT027)	51
Tabelle 7: Wachstumskinetik von klinischen Isolaten der RTs RT010, RT014, RT027 im Vergleich	74
Tabelle 8: Korrelation zwischen der Antikörperprävalenz und dem Auftreten eines Rezidivs	74
Tabelle 9: Korrelation zwischen Patientencharakteristik und Schwere der CDI	75
Tabelle 10: Korrelation zwischen Patientencharakteristik und Therapieansprechen	76
Tabelle 11: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-TcdA und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen	77
Tabelle 12: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-TcdB und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen	78
Tabelle 13: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-GDH und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen	79
Tabelle 14: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-Cwp84 und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen	80
Tabelle 15: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT), allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen	81
Tabelle 16: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT027) und korrespondierenden Ribotypen der Patientenproben	82
Tabelle 17: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT RT014) und korrespondierenden Ribotypen der Patientenproben	83

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Das Bakterium *Clostridioides difficile* hat als weltweit häufigster Erreger einer nosokomialen infektiösen Diarrhoe eine besondere humanmedizinische Bedeutung. Die Inzidenz der Infektion stieg in den letzten zwei Jahrzehnten an und stellt wegen einer erhöhten Morbidität und hoher Behandlungskosten eine Belastung für das Gesundheitswesen dar.

Das klinische Bild einer *C. difficile*-Infektion (CDI) reicht von leichten bis schweren Verläufen, die bis zur Entwicklung eines Megakolons führen können. Dabei liegt das Risiko für ein Rezidiv bei 30% und steigt mit jeder weiteren Krankheitsepisode nochmals an. Die orale Antibiotikatherapie gilt derzeit als Therapie der ersten Wahl, doch birgt gerade auch sie das Risiko einer Rekurrenz, sodass das Bestreben nach neuen präventiven Therapiestrategien wächst.

In der Pathogenese der CDI kommt der Bildung von erregerspezifischen Toxinen eine große Bedeutung zu. In früheren Studien korrelierten nachgewiesene Toxin-Antikörper bei Patienten mit einem geringeren Rezidivrisiko. Daraus haben sich vielversprechende Ansätze für neue präventive Therapieoptionen (z.B. Anti-Toxin-Antikörper Bezlotoxumab oder Impfstoffe) entwickelt. Allerdings ist die natürliche Immunantwort bei einer CDI noch nicht vollumfänglich verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die natürliche Antikörperantwort während einer CDI zu untersuchen und mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren.

Hierfür wurden in der ersten klinischen Studienphase 46 Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes mit diagnostisch gesicherter CDI rekrutiert. Daten zu Anamnese und Klinik wurden mittels Fragebogen und Gesprächen mit Patienten und behandelndem Stationspersonal prospektiv für die Akutphase der Erkrankung ermittelt. An Tag 1, 3 und 6 (± 1 d) nach der CDI-Diagnose erfolgten die Blutabnahmen, um in einer zweiten experimentellen Studienphase die Plasmaproben auf antigenspezifische Antikörper gegen Toxin A (Anti-TcdA), Toxin B (Anti-TcdB), Glutamatdehydrogenase (Anti-GDH) und Cwp84 (Anti-Cwp84) sowie auf neutralisierende Antikörper zu untersuchen. Für den Nachweis der Neutralisation wurde ein

zellkulturbasierter Toxin-Neutralisationstest etabliert. Die Toxine wurden aus konditionierten Medien von klinischen Isolaten der *C. difficile*-Ribotypen (RTs) RT014 und RT027 gewonnen. Zuvor wurde die Wachstums- und Toxinkinetik dieser entsprechenden RTs bewertet, um konditionierte Medien mit hohen Toxingehalten zu gewinnen.

Bei den meisten Patienten waren Antikörper gegen GDH (85%) und Cwp84 (61%) nachweisbar, während Anti-TcdA (11%) und Anti-TcdB (28%) nur bei einer Minderheit zu finden waren. In insgesamt nur geringen Titerstufen ($\leq 1:16$) wiesen 26% der Erkrankten neutralisierende Antikörper gegen die Toxine von RT027 und eine Untergruppe (11%) zusätzlich gegen die von RT014 auf. Neutralisierende Antikörper einzig gegen RT014-Toxine fanden sich nicht. Im Verlauf des einwöchigen Untersuchungszeitraumes wurde unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung keine Serokonversion und kein Antikörperanstieg beobachtet, sodass ein Booster-Effekt ausgeschlossen werden konnte.

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von antigenspezifischen oder neutralisierenden Antikörpern und dem klinischen Verlauf der Krankheit festgestellt. Anti-TcdB-, nicht aber Anti-TcdA-Antikörper, korrelierten mit dem Auftreten neutralisierender Antikörper.

Insgesamt waren die Antikörperprävalenzen und Titer neutralisierender und Toxin-abhängiger Antikörper niedrig; ihr Vorhandensein oder Fehlen stand zudem nicht in Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf. Es wurden sowohl neutralisierende Antikörper mit breitem Spektrum als auch mit stammbeschränkter Neutralisierungskapazität nachgewiesen, was auf unterschiedliche neutralisierende Epitope zurückzuführen sein könnte. Als weiteres Kernergebnis konnte eine enge Korrelation zwischen dem Nachweis von Anti-TcdB und der Fähigkeit zur Neutralisation nachgewiesen werden, was die Annahme bestärkt, dass Anti-TcdB als funktioneller Antikörper für die CDI-Immunantwort sehr bedeutsam zu sein scheint.

Schlussfolgernd sind alternative Therapiestrategien wie z.B. Impfungen nötig, um hohe Titer der nach natürlicher intestinaler Exposition mit *C. difficile* bereits vorhandenen niedrigtitrigen oder gar noch fehlenden neutralisierenden Antikörper zu erzielen.

1.2 Summary

Clostridioides difficile is the most common agent of nosocomial infectious diarrhea, and has therefore considerable medical importance. On a global scale, incidence rates of *C. difficile* infection (CDI) have risen in the course of the last two decades. Thus, for the healthcare system, CDI has been recognized as a large burden leading to high mortality and morbidity.

The clinical spectrum ranges from mild to severe courses (e.g. toxic megacolon). The risk of recurrence is 30% and increases with each additional infection episode. Oral antibiotic therapy is currently considered the treatment of choice. However, even this treatment poses the risk of recurrence; hence, efforts to find new preventive treatment strategies are needed.

Previous studies described the correlation between antibodies and a lower risk of disease recurrence. This finding has led to new promising therapeutic approaches for new therapy concepts like passive immunization (e.g. with the antibody bezlotoxumab) and vaccination. However, the specific CDI immune response is not yet completely understood.

In the present study, the prevalence and the course of antigen-specific and neutralizing *C. difficile* antibodies during CDI and the correlating clinical course were investigated.

For this purpose, in a first study phase, 46 patients of Saarland University Hospital with diagnostically confirmed CDI were recruited. Data on medical history and acute symptoms were prospectively obtained by questionnaire and interviews with patients or attending ward staff. Blood samples were taken on days 1, 3, and 6 (± 1 d) after diagnose.

In the second experimental study phase, patients' plasma samples were tested for the presence of antibodies against toxin A (anti-TcdA), toxin B (anti-TcdB), glutamate-dehydrogenase (anti-GDH) and Cwp84 (anti-Cwp84). Additionally neutralizing antibodies against toxigenic conditioned media generated by clinical isolates of the ribotypes (RT's) RT027 and RT014 was investigated. For this reason, a cell culture-based toxin neutralization assay was established. Previously, the growth and toxin kinetics of these RT's were evaluated to harvest conditioned media with high toxin levels.

Most patients had antibodies against GDH (85%) and Cwp84 (61%), but antibodies against TcdA (11%) and TcdB (28%) were only detected in some patients. Neutralizing antibodies against *C. difficile* toxins generated by RT027 were found in 26% of samples and a subgroup of these samples (11%) could also neutralize toxins from RT014; however, no single sample neutralized RT014 alone. Overall, neutralizing antibody titers were low ($\leq 1:16$).

In a one-week follow-up, neither a seroconversion nor a significant antibody increase was observed, irrespective of disease severity. Consequently, a *C. difficile*-associated booster effect could be ruled out. No correlation was found between the presence of antigen-specific or neutralizing antibodies and the clinical course of disease. Anti-TcdB, but not anti-TcdA antibodies correlated closely with the occurrence of neutralizing antibodies.

In conclusion, the prevalence and titers of detected toxin-related and neutralizing antibodies were low. The presence or absence of specific antibodies was not related to the clinical course of infection. Furthermore, both broad-range and strain-restricted neutralizing antibodies were found, which might be related to different neutralizing epitopes. As another main finding, a close correlation between the detection of anti-TcdB and the capacity for neutralization was demonstrated, strengthening the significance of anti-TcdB as a functional antibody for the immune response of CDI. Thus, alternative therapeutic strategies such as vaccination are needed to achieve protective antibody titers which are not sufficiently generated after natural intestinal exposure to *C. difficile*.

2 Einleitung

2.1 *Clostridioides difficile*

2.1.1 Entdeckungsgeschichte und mikrobiologische Grundlagen

Die Erstbeschreibung von *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole, nachdem das Bakterium zunächst unter der Bezeichnung „*Bacillus difficile*“ aus der Darmflora von gesunden Neugeborenen isoliert wurde⁴⁰. Der Beiname „*difficile*“ (von lateinisch schwierig) sollte dabei die Schwierigkeit der Isolierung und kulturellen Anzucht zum Ausdruck bringen. Nachdem insbesondere bei chirurgischen Patienten unter Clindamycintherapie immer wieder Antibiotika-assoziierte Kolitiden auftraten, wurde das Bakterium schließlich im Jahr 1978 von Bartlett et al.⁵ als kausaler Krankheitserreger beschrieben. Gegenwärtig gilt *C. difficile* als Hauptverursacher nosokomialer infektiöser Diarrhoen^{75,98} und zeigt inzwischen in einigen Gemeinschaftskrankenhäusern vergleichbare Inzidenzen wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Nachweise¹¹⁰.

C. difficile ist ein grampositives, anaerobes, sporenbildendes Stäbchenbakterium, welches fäkal-oral übertragen wird¹²³. Große Mengen Bakterien und Sporen werden über dünnflüssigen Stuhl von Infizierten ausgeschieden. Sporen, als Überdauerungsform der Bakterien resistent gegen Wärme, Austrocknung und zahlreiche Chemikalien, wie auch viele Desinfektionsmittel, können über direkten (z.B. über die Hände) oder indirekten Kontakt (z.B. über Oberflächen) übertragen werden¹²³.

Die *C. difficile*-Infektion (CDI) ist eine toxinbedingte Erkrankung. Bakterienstämme, die keine Toxine bilden, gelten somit als apathogen; doch nicht jedes Individuum, das sich mit einem toxigenen Stamm infiziert, erkrankt.

Es besteht die Annahme, dass neben klassischen Risikofaktoren wie hohem Alter und vorausgegangener Antibiotikatherapie die individuelle Immunantwort eine ganz wesentliche Rolle in der Krankheitsentstehung zu spielen scheint^{54,65,86}.

2.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz stieg Anfang des 21. Jahrhunderts weltweit an^{69,98}. Mc Donald et al.⁸³ zeigten eine Verdopplung der Inzidenz von 31/100 000 im Jahr 1996 auf 61/100 000 im Jahr 2003 in den USA. Eine ähnliche Entwicklung belegen auch Studien in Europa^{3,15}. In Sachsen (Deutschland) stieg die Inzidenz von 1,7-3,8/100 000 in den Jahren 2002 und 2003 auf 14,8/100 000 im Jahr 2006¹⁵. In Spanien stieg die Prävalenz von 3,9/10 000 Patienten im Jahr 1999 auf 12,2/10 000 im Jahr 2007³.

Ursache für den Anstieg der Krankheitsfälle, aber auch für die immer schwerer werdenden Verläufe, war unter anderem das Aufkommen eines „hypervirulenten“ *C. difficile*-Stammes des Ribotyps (RT) 027, der seit 2003 aus immer mehr Proben stationärer Patienten Nordamerikas und Europas isoliert wurde^{7,73,98}.

Auch wenn ältere, hospitalisierte Patienten nach wie vor als Hauptrisikogruppe gelten⁹⁸, sei an dieser Stelle ebenso auf einen Anstieg bei jüngeren Patienten ohne klassische Risikofaktoren^{19,57,98}, bei Kindern⁵⁸ und Schwangeren^{19,97} hingewiesen. Differenzialdiagnostische Bedeutung findet die Infektion nunmehr auch als Ursache einer Reisediarrhoe¹⁰⁹.

2.1.3 Pathogenese und Klinik

Der Gebrauch von Antibiotika gilt als Hauptrisikofaktor einer CDI^{7,41,98}. Entgegen früherer Meinungen sind prinzipiell alle Antibiotikaklassen mit dem Auftreten dieser Infektion assoziiert⁴¹. Insbesondere scheinen jedoch Cephalosporine der zweiten, dritten und vierten Generation, Clindamycin, Carbapeneme, Fluorchinolone und Aminopenicilline mit Betalaktamase-Inhibitor mit einem besonderen Risiko behaftet zu sein¹⁰⁶. Die Gefahr zu erkranken ist im ersten Monat nach Antibiotikagabe am höchsten⁴¹.

Die meist durch Antibiotika geschädigte und in ihrer Homöostase gestörte Darmflora begünstigt die Auskeimung der Sporen, das Wachstum vegetativer Formen sowie die Toxinproduktion des Bakteriums¹¹. Man nimmt hierbei eine strukturelle und funktionelle Schädigung des Mikrobioms durch den Erreger an^{11,111}. Antibiotika zerstören nicht nur

pathogene, sondern auch für das physiologische Gleichgewicht essentielle Bakterien. Diese produzieren zum Beispiel Hydrolase, welches im Darmlumen eine Dekonjugierung der Gallensäure bewirkt und die Umwandlung primärer in sekundärer Gallensalze vermittelt. Fehlen diese physiologischen Vorgänge, resultiert ein Anstieg unkonjugierter und primärer Gallensalze, die die Auskeimung der Sporen begünstigen^{11,34,94,111}. Letztendlich gewinnt *C. difficile* einen Selektionsvorteil und kann sich mit der Expression von Pathogenitätsfaktoren an die Umgebung anpassen.

Patienten leiden typischerweise unter faulig riechenden Diarrhoen¹²³. Dennoch kann das Spektrum der Infektion von asymptomatischer Besiedlung über milde bis hin zu schweren Verläufen mit der Entwicklung einer pseudomembranösen Kolitis, eines toxischen Megakolons, Ileus oder gar einer Darmperforation mit septischem Schock reichen^{81,86}. Extraintestinale Manifestationen hingegen stellen eine Rarität dar^{86,98}. Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, beträgt 10-30% und steigt mit jedem nachfolgenden Rezidiv weiter an^{76,81}.

2.1.4 Risikofaktoren und Komorbiditäten

Neben dem Einsatz von Antibiotika zählen ein höheres Patientenalter (≥ 65 Jahre), Krankenhausaufenthalte in den letzten drei Monaten, das Wohnen in Altenheimen sowie abdominelle, insbesondere kolorektale Operationen als Risikofaktoren^{7,55,72,86,123}. Während der Einsatz von Protonenpumpenhemmern in einigen Studien ebenfalls als Risikofaktor beschrieben wird^{24,64,72}, gilt er in anderen als nicht ausreichend gesichert¹¹².

Vor allem Menschen, die unter chronischen Darm-, Lungen-, Nieren-⁹¹ oder Tumorerkrankungen leiden und/oder immunsuppressiv behandelt werden, weisen ein erhöhtes Risiko für eine schwere Infektion auf^{7,22,98}.

2.1.5 Diagnostik

Zur CDI-Diagnostik ist eine zweistufige Diagnostik symptomatischer Patienten aus Stuhlproben empfohlen²³. Sie soll einen sensitiven Suchtest mit einem spezifischen Test zum Toxinnachweis kombinieren⁷⁵.

Als Screeningtests eignen sich der Glutamatdehydrogenase-Enzymimmunoassay (GDH EIA) oder molekulargenetische Nachweisverfahren²³. Beide Testverfahren weisen eine hohe Sensitivität auf und sollen durch einen Bestätigungstest zum Toxinnachweis ergänzt werden²³. Das Bakterium produziert in 2-5% der Fälle nur Toxin B¹²³; daher sollte die Testung sowohl die Untersuchung auf Toxin A, als auch auf Toxin B umfassen^{23,123}.

Neben der enzymatischen Testung ist ferner die anaerobe kulturelle Anzucht auf Selektivagarmedien empfohlen¹²³. Bei positivem Kulturergebnis wird der molekularbiologische Nachweis der Toxingene und eine Resistenztestung angestrebt^{75,123}.

2.1.6 Therapie

In der US-amerikanischen Leitlinien der IDSA (The Infectious Diseases Society of America) und der SHEA (The Society for Healthcare Epidemiology of America) sowie in der kürzlich aktualisierten europäischen Leitlinie der ESCMID (The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) wird als Erstlinientherapie bei Erwachsenen für eine initiale leichte bis schwere CDI Vancomycin oder Fidaxomicin empfohlen^{81,92}.

Für sehr schwere, fulminante und komplizierte Verläufe besteht die Möglichkeit, zur Standardtherapie Vancomycin zusätzlich über eine Magensonde, als Einlauf von rektal oder über ein Kolostoma und gegebenenfalls in Kombination mit einer intravenösen Gabe von Metronidazol oder Tigecyclin zu ergänzen^{81,92}.

Bei schweren Verläufen, die sich zu einem toxischen Megakolon, einem Ileus oder einer Darmperforation zu entwickeln drohen, sollte stets die viszeralchirurgische Konsultation erfolgen^{123,92}. Während Verzögerungen der chirurgischen Intervention mit einem Anstieg der Mortalität verbunden sind⁶⁷, können Kolektomien, rechtzeitig durchgeführt, das Leben kritisch kranker Patienten retten^{67,86}.

Neu Einzug in die Leitlinien hat die Empfehlung zum Einsatz des monoklonalen Antikörpers Bezlotoxumab gehalten, der bei Rezidivtherapien bzw. bei Behandlungen der Primärinfektionen von Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko eingesetzt werden soll⁹².

Für Patienten, die unter multiplen Rezidiven leiden, kann ferner eine Erhaltungstherapie mit Vancomycin sinnvoll sein⁸¹. Bei fehlendem Ansprechen kann die Stuhltransplantation als weitere Therapieoption diskutiert werden^{75,92}. Ziel dieser Therapie ist, die durch Antibiotika gestörte Darmflora, die den Weg zur CDI förmlich bahnt, wiederherzustellen. Hierfür wird nasogastral oder koloskopisch eine Stuhlsuspension im Darm platziert⁷⁵. In einer Studie von Brandt et al.¹² konnte gezeigt werden, dass die primäre Heilungsrate (kein Krankheitsrückfall innerhalb von 90 Tagen nach Transplantation) 91% und die sekundäre (eine weitere Vancomycintherapie mit oder ohne wiederholte Transplantation) sogar 98% betrug. Zuletzt wies eine kanadische Studie auf die Beobachtung hin, dass die Applikation kryokonservierter Stuhlkapseln der koloskopischen Applikation einer Stuhlsuspension nicht unterlegen ist⁵¹. Gegenwärtig warnt die U.S. Food & Drug Administration (FDA) vor dem Risiko für Infektionen mit multiresistenten Keimen, die durch Stuhltransplantationen verursacht wurden²¹.

2.1.7 Prävention

Essentiell für die Prävention ist der rationale Einsatz von Antibiotika (Antibiotic Stewardship, ABS). Die antibiotische Therapie sollte gemäß der ABS-Vorgaben zurückhaltend und kalkuliert erfolgen. Beispielsweise konnte in einer britischen Studie gezeigt werden, dass der reduzierte Einsatz von Fluorochinolonen zum Rückgang der CDI führte²⁵.

Um Infektionsketten frühmöglich zu unterbrechen, sind schon bei begründetem Verdacht und vor Eintreffen des mikrobiologischen Befundes entsprechende Hygienemaßnahmen einzuleiten¹²³. Neben der Isolierung des Patienten in einem Einzelzimmer mit eigener Toilette sollte das Tragen von Schutzkitteln und Einweghandschuhen bei engem Patientenkontakt erfolgen, die vor Verlassen des Zimmers wieder abzulegen bzw. zu verwerfen sind. Ein Händewaschen zur mechanischen Beseitigung der Erregersporen mit nachfolgender Desinfektion ist empfohlen, ebenso wie die tägliche Reinigung und Desinfektion (z.B. mit Peressigsäure oder Natrium-Hypochlorit) patientennaher Flächen (z.B. Nachttisch)^{75,122,123}.

2.2 Virulenzfaktoren

2.2.1 Toxine

In der Regel bilden toxigene *C. difficile*-Stämme Toxin A (Gen: *tcdA*) und Toxin B (Gen: *tcdB*). Einige Stämme, wie klassischerweise der RT027, sind darüber hinaus in der Lage, das sogenannte binäre Toxin (Gen: *tcdTAB*) zu bilden.

Die Toxine A und B sind große Moleküle und bestehen aus drei funktionellen Domänen. Ein N-Terminus mit katalytischer Glucosyltransferase (GT)- und Cystein-Proteinase (CP)-Aktivität, eine hydrophobe zentrale Domäne in der Mitte, verantwortlich für die Translokation des Toxins in das Zytosol, und aus einem C-Terminus, welcher wichtig für die Bindung an der Zielzelle ist (Rezeptorbindungsdomäne, RBD)^{45,93,108}. Die Toxingene sind auf dem Pathogenitätsloкус (von engl. Pathogenicity Locus, PaLoc) des bakteriellen Chromosoms kodiert¹⁴. Die Bildung der Toxine ist einerseits von dem Bakterienstamm abhängig und wird andererseits auch von Umgebungsfaktoren wie beispielsweise dem Nährstoffgehalt (Glukose, Aminosäuren, Biotin) oder der Temperatur induziert⁹⁸. Ein ganz wesentlicher Pathomechanismus der Toxine A und B liegt in der Glykosylierung von Rho-Proteinen. Dies führt neben der inflammatorischen Wirtsreaktion zur Depolymerisation und somit Zerstörung des Zytoskeletts sowie zum Verlust der Zellintegrität und schließlich zum Zelltod des betroffenen Darmepithels^{46,98}.

Welches Toxin größeren Beitrag an der Pathogenese der CDI leistet, wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Durch Tiermodelle gestützt^{77,85}, wurde jahrelang die Hypothese vertreten, dass Toxin A für die Symptomatik hauptverantwortlich sei⁷⁷. Dieser Annahme widersprüchlich schien das Aufkommen von *C. difficile*-Stämmen zu sein, die nur Toxin B, nicht jedoch Toxin A produzierten und dennoch in gleicher Weise virulent waren²⁹. Anhand eines Tiermodells konnte in einer Studie von Lyras et al.⁷⁹ klar gezeigt werden, dass Toxin B auch alleine vermag, das Vollbild der Erkrankung auszulösen, während Toxin A in Abwesenheit von Toxin B nur in wenigen Fällen Symptome verursachte⁷⁹. Letztendlich kam es in den letzten Jahren hinsichtlich der Bedeutung der beiden Toxine zum Paradigmenwechsel, der durch die Einführung des monoklonalen Antikörpers Bezlotuxumab⁶³ (gegen Toxin B gerichtet und therapeutisch einsetzbar) noch weiter erhärtet wurde.

In Zusammenhang mit vermehrten Krankenhausausbrüchen in Nordamerika wurde der epidemische Stamm RT027 (BI/NAP1) isoliert, der mit besonders schweren Krankheitsverläufen und einer erhöhten Mortalität assoziiert ist^{73,82,117}. Dies ist unter anderem

mit einer vermehrten Bildung von Toxin A und B^{114,117} und der Expression des binären Toxins (CDT)⁸² zu erklären. Das binäre ADP-ribosylierende Toxin, dessen Gen in einer Region außerhalb des PaLoc liegt^{17,32}, induziert neben Schädigungen des Aktinzytoskeletts³² Membranausstülpungen in der Zielzelle und kann somit die bakterielle Adhäsion an den Darmepithelien erhöhen¹⁰².

2.2.2 Non-toxigene Virulenzfaktoren

Auch wenn die Toxine derzeit als Hauptpathogenitätsfaktor gelten^{61,62}, sei wegen ihrer immunogenen Eigenschaften an dieser Stelle auf weitere Virulenzfaktoren wie Geißeln¹²¹, Surface-Layer-Proteine (SLPs)¹⁶ und Zellwandproteine (Cwp66, Cwp84, CwpV)^{88,89} hingewiesen.

Durch die peritrich angeordneten Geißeln besitzt *C. difficile* die Fähigkeit, sich aktiv zu bewegen und sich an Epitheloberflächen zu haften. Im Vergleich zu anderen oberflächenassoziierten Antigenen weisen die Geißelproteine zwar eine geringe Variation auf (FliC und FliD), besitzen jedoch trotzdem stark immunogene Eigenschaften^{108,121}. Beispielsweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Flagellin sowohl die Aktivierung von NFκB via Toll-like-Rezeptor (TLR) in mit TLR-5-transfizierten HEK-Zellen induziert, als auch die Produktion von Interleukin (IL) 8 und dem Zytokin CCL20 in HT29- und Caco-2-Zellen¹²¹.

Die SLPs überdecken die gesamte Oberfläche des Bakteriums und weisen unter den Stämmen eine hohe Variabilität auf^{20,31}. In *in-vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sie an Vero-Zellen (eine kontinuierliche Nierenzelllinie), humanen Epithelzelllinien und an gastrointestinalem Gewebe binden können^{16,80}. Sie werden von dem angeborenen Immunsystem via TLR-4 erkannt und lösen über unterschiedliche Signalwege die Reifung dendritischer Zellen sowie die Stimulierung von Makrophagen aus⁴⁷. Des Weiteren sind sie in der Lage, die spezifische humorale Immunantwort auszulösen²⁷.

Cwp84 ist beispielweise ein oberflächenassoziiertes Protein, das für die Spaltung von SLP-Vorläufern verantwortlich ist⁹⁵ und neben anderen oberflächenassoziierten Proteinen immunogene Eigenschaften besitzen soll^{88,89}.

2.3 Die Wirtsimmunantwort auf *C. difficile*

2.3.1 Die angeborene Immunantwort

Die Pathogenese der CDI ist initial geprägt durch eine akute intestinale Entzündungsreaktion, die durch das angeborene Immunsystem induziert wird.

Die Schleimschicht des Darmes stellt als mechanische Barriere das erste Hindernis für *C. difficile* dar. Das Bakterium hat jedoch Mechanismen entwickelt, die Schleimproduktion zu reduzieren¹³. Branka et al.¹³ zeigten in ihrer Studie, dass durch Toxin A die IL-8-Ausschüttung stimuliert wird, die wiederum mit einer Inhibition der Muzinsekretion einhergeht.

Mit der Freisetzung antimikrobieller Substanzen wie Cathelicidine und Defensine erfüllen Leukozyten und Paneth-Körnerzellen eine weitere wichtige Aufgabe. Diese Peptide reduzieren den durch die Toxine verursachten Schaden und Entzündungsprozess^{35,43,108}. Über einen weiteren Abwehrmechanismus berichten Savidge et al.¹⁰¹. Durch Nitrosylierung des Toxins kommt es zur Abschwächung seiner Aktivität, zur Hemmung der Toxinspaltung und des Zelleintritts¹⁰¹.

Durchdringen die Toxine dennoch die Schleimschicht, wird über ihre GT-Aktivität die angeborene Immunantwort aktiviert⁵⁴. Beispielsweise werden über NFκB- und MAP-Kinase-Signalwege intestinale Makrophagen und Monozyten zur Freisetzung multipler proinflammatorischer Zytokine und Chemokine stimuliert^{49,80,108,115}. Toxin A induziert neben der NFκB vermittelten IL-8 Freisetzung der Monozyten⁴⁹ interessanterweise auch eine neuroinflammatorische Antwort; so stimuliert es die Freisetzung von Neuropeptiden wie Neutensin oder Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)^{2,18}.

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen werden vor allem durch IL-8 angelockt und finden so ihren Weg aus dem Blut ins Gewebe^{71,108}. Die Einwanderung neutrophiler Granulozyten scheint im Krankheitsgeschehen einen wesentlichen Faktor darzustellen. Kelly et al.⁵² konnten diese Annahme mit einem Tiermodell untermauern⁵². Durch Einsatz des inhibierenden monoklonalen Antikörpers CD18 wurde die Einwanderung neutrophiler Granulozyten gehemmt⁵². Unter Exposition mit Toxin A zeigte sich in Kaninchendärmen eine Reduktion der Flüssigkeitssekretion und des histologischen Schadens⁵². Zuletzt sei angemerkt, dass intestinale Epithelien mithilfe spezifischer TLRs ebenfalls in der Lage sind, non-toxigene Antigene zu erkennen^{48,99}.

2.3.2 Die erworbene Immunantwort

2.3.2.1 *C. difficile*-Antikörperprävalenz beim Menschen

Die aktuelle Datenlage erlaubt aufgrund der großen Variabilität der Ergebnisse keine sicheren Angaben zur *C. difficile*-Antikörperprävalenz. In Abwesenheit einer akuten Infektion sind Prävalenzen von 10% bis zu 60% beschrieben^{4,30,54}. Man nimmt an, dass die Antikörperproduktion in der Kindheit stimuliert wird und im Erwachsenenalter durch Kontakt mit *C. difficile* aus der Umwelt oder durch Kreuzreaktionen mit anderen Clostridien-Spezies aufrecht erhalten wird^{53,54,100}.

2.3.2.2 Toxin-Antikörper und der Krankheitsverlauf

In zahlreichen Studien wird zwar ein Zusammenhang zwischen der adaptiven, humoralen Immunantwort und dem klinischen Verlauf der Erkrankung vermutet^{6,44,54,65}, jedoch herrscht bis heute Uneinigkeit darüber, welche und ob Antikörper geeignete Prädiktoren für Krankheitsschwere und Rekurrenz darstellen.

In den meisten älteren Arbeiten wird vorrangig die Meinung vertreten, dass das Vorkommen von Anti-TcdA mit der Schwere und dem Wiederauftreten der Erkrankung assoziiert sei⁵⁴. So berichteten Warny et al.¹¹⁶ bereits 1994, dass die IgG-Serumspiegel von Antikörpern gegen Toxin A bei Patienten mit leichtem Krankheitsverlauf höher als die von schwer erkrankten Patienten waren. Signifikant niedrigere Spiegel von Anti-TcdA wurden ferner auch bei Patienten gemessen, die unter einem Rezidiv litten¹¹⁶. Kyne et al.⁶⁵ untermauerten mit ihrer Studie ebenfalls die Bedeutung von Anti-TcdA für den Krankheitsverlauf. Sie zeigten, dass Patienten mit niedrigen Serumantikörpertitern zum Zeitpunkt der Besiedlung ein höheres Risiko für eine Erkrankung aufwiesen als Patienten mit höherem Titer. Ein Jahr später wies die gleiche Forschergruppe mit einer prospektiven Kohortenstudie auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Anti-TcdA und dem Rekurrenzzisiko hin. Patienten, die im Beobachtungszeitraum nicht erneut erkrankten, wiesen signifikant höhere Antikörpertiter auf⁶⁶.

Jüngere Studien hingegen machen auf die Bedeutung von Anti-TcdB für den Krankheitsverlauf und das Rekurrenzzisiko aufmerksam^{1,3}. So wiesen Islam et al.⁴⁴ einen um den Faktor drei verringerten Anti-TcdB-Titer bei an CDI erkrankten Patienten im Vergleich zu einer nicht

symptomatisch erkrankten Kontrollgruppe nach. Hier waren bei den Titern von Anti-TcdA zwischen Kontroll- und Fallgruppe keine Unterschiede nachweisbar⁴⁴.

In einer Studie aus dem Jahr 2019 konnte gezeigt werden, dass höhere Anti-TcdB-Titer zwar nicht mit der Schwere des akuten Krankheitsverlaufes, jedoch mit einem geringeren Rezidivrisiko assoziiert waren⁵⁰. Demgegenüber steht eine aktuelle Arbeit, in der kein Zusammenhang zwischen Anti-TcdB und dem Rezidivrisiko festgestellt werden konnte³⁶.

Zusammenfassend wird anhand widersprüchlicher Studienergebnisse deutlich, dass die humorale Immunantwort während einer CDI noch nicht in all ihren Facetten verstanden ist.

2.3.2.3 Non-toxigene Antikörper und der Krankheitsverlauf

Neben Antikörpern gegen Toxine sind aufgrund immunogener Eigenschaften und als potenzielle Targets aktiver Immuntherapien auch Antikörper gegen Geißeln, Oberflächen- und Zellwandantigene Gegenstand der Forschung¹⁰⁸.

Kyne et al.⁶⁵ berichteten über einen nicht-signifikant höheren Spiegel non-toxigener Antikörper bei asymptomatischen Trägern im Vergleich zu Erkrankten. Drudy et al.²⁸ konnten keinen signifikanten Unterschied von SLP-Antikörpertitern zwischen Trägern, Erkrankten und Kontrollgruppe feststellen; jedoch belegten sie eine Korrelation zwischen niedrigeren SLP-IgM-Titern und hohem Rezidivrisiko. Péchiné et al.⁸⁸ untersuchten die Rolle der Immunabwehr gegen die Zellwandproteine Cwp66, Cwp84 und die Geißelproteine FliC und FliD. Sie fanden heraus, dass diese Antigene während des Krankheitsverlaufes exprimiert wurden und Antikörper gegen diese mindestens zwei Wochen nach Diagnosestellung nachweisbar waren⁸⁹. Des Weiteren zeigten sie, dass Antikörper gegen die Adhäsine Cwp66 und Fbp68, die Protease Cwp84 und die Geißelproteine FliC und FliD bei Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger waren⁸⁸.

2.4 Neue Therapiestrategien

2.4.1 Intraluminale passive Immunisierung

Die direkte Neutralisierung von Toxinen durch absorbierende Substanzen stellt eine mögliche alternative Therapieoption dar.

In einer großen prospektiven Studie wurde Tolevamer untersucht, ein Polymer, das die Toxine A und B nicht-kovalent chemisch bindet. Im Vergleich zur Therapie mit Vancomycin und Metronidazol zeigte sich jedoch eine schlechtere klinische Ansprechrate¹¹⁸.

Daneben besteht die Möglichkeit, Toxine mittels entsprechender Antikörper zu neutralisieren. In einem Hamstermodell konnte gezeigt werden, dass nach Verabreichung aviärer Antikörper gegen rekombinante Epitope der Toxine A und B die Tiere vor der Erkrankung, der Rekurrenz und Reinfektion geschützt werden konnten⁵⁹. Dies scheint auch beim Menschen der Fall zu sein. In einer Pilotstudie konnten Van Dissel et al.²⁶ zeigen, dass nach oraler Verabreichung von *C. difficile*-Anti-IgA in aufbereiteter Molke von immunisierten Rindern keiner der Patienten während des Beobachtungszeitraumes erneut erkrankte. Insgesamt ist die Wirksamkeit dieser Therapieoption jedoch nicht ausreichend geklärt, da bisher keine größeren Studien durchgeführt wurden¹⁰⁸.

2.4.2 Parenterale passive Immunisierung

Eine weitere Therapiealternative besteht in der Gabe gepoolter intravenöser Immunglobuline (IVIG). Diese sollen das Toxin binden und neutralisieren. In älteren Studien wurde der erfolgreiche Nutzen bei chronisch rekurrenten und refraktären Infektionen beschrieben⁸⁴. Abougergi et al.¹ wiesen in der bisher größten Arbeit zu diesem Thema jedoch darauf hin, dass IVIG nicht für jeden Patienten einen eindeutigen Nutzen zeigten. Neben der Patientenselektion scheint auch der richtige Zeitpunkt der IVIG-Gabe entscheidend^{1,103}. Insgesamt muss in weiteren Studien untersucht werden, welches Patientenkollektiv am ehesten profitiert und zu welchem Zeitpunkt welche Dosis verabreicht werden sollte.

Ein modernerer und spezifischerer Therapieansatz stellt die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern dar. In einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie untersuchten Lowy et al.⁷⁴ das klinische Ansprechen nach Gabe von humanisierten monoklonalen Antikörpern gegen die Toxine A und B. Antibiotisch vorbehandelten Patienten wurde eine Infusion der Antikörper verabreicht. Danach wurden sie über 84 Tage beobachtet. Die Rate der Rekurrenz war in dieser Gruppe signifikant niedriger als in der Placebo Gruppe (7% vs. 25%)⁷⁴. Hinsichtlich der Schwere und der Dauer der akuten Erkrankung zeigten sich keine Unterschiede⁷⁴.

Als erster monoklonaler Antikörper wurde 2017 Bezlotoxumab zugelassen^{50,63}. Es handelt sich um einen spezifischen humanen Antikörper, der mit hoher Affinität an das *C. difficile*-Toxin B bindet, wodurch die Bindung an die Wirtszellen verhindert und dessen Aktivität neutralisiert wird^{63,87}. Indiziert ist er bei Erwachsenen mit hohem Rezidivrisiko zur Vorbeugung wiederauftretender *C. difficile*-Infektionen^{50,63,92}. Da der Antikörper selbst nicht antibakteriell wirkt, darf er nur mit Antibiotika eingesetzt werden¹⁰⁷. In zwei großen Phase 3 Studien konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Gabe von Bezlotoxumab in Kombination mit Antibiotika das Rezurrenzrisiko deutlich senken konnte¹¹⁹. Alle Patienten erhielten eine orale Antibiotika-Therapie und wurden doppelblind-kontrolliert auf vier Gruppen randomisiert. Sie wurden mit Actoxumab (gegen Toxin A gerichtet), Bezlotoxumab, einer Kombination beider Antikörper oder mit Placebo behandelt und über 12 Wochen beobachtet. Die Gruppe mit Bezlotoxumab zeigte eine signifikant geringere Rekurrenzrate als die Placebo-Gruppe (17% vs. 28%). Die Kombination mit Actoxumab konnte die Rezidivrate nur unwesentlich verändern und auch die alleinige Behandlung mit Actoxumab zeigte im Vergleich zu der Placebo-Gruppe keinen signifikanten Unterschied¹¹⁹.

2.4.3 Aktive Immunisierung (Impfung)

Das Bestreben, einen Langzeitschutz mittels aktiver Immunisierung (Impfung) zu etablieren, besteht schon seit über 30 Jahren¹⁰⁸. Ein zentraler Ansatz in der Impfungsentwicklung ist die Beobachtung, dass die GT- und CP-Toxin-Domänen Antikörper induzieren^{70,78}. Nachdem Untersuchungen an Tiermodellen zeigten, dass eine aktive Immunisierung mit Toxoid-Impfstoffen zur Antikörperbildung und zur Verhinderung von Symptomen führten^{33,78}, wird

gegenwärtig in klinischen Studien untersucht, inwiefern toxoidbasierte- bzw. rekombinante Toxin-Peptid-Impfstoffe vor einer Erkrankung schützen^{9,104,105}. Daneben bestehen auch Ansätze der Impfstoffentwicklung gegen Oberflächenproteine, die die Kolonisierungsrate zu beeinflussen versuchen⁸.

2.5 Zielsetzung

Für die weitere Entwicklung neuer Immunisierungsstrategien ist das Verständnis der natürlichen Immunantwort auf CDI unabdingbar; doch obwohl häufig auf die Bedeutung der natürlichen Antikörper für den Krankheitsverlauf hingewiesen wird, gibt es hierfür nicht ausreichend experimentelle Belege.

Ziel dieser Arbeit war daher, die Prävalenz und Dynamik antigenspezifischer Antikörper (Anti-TcdA, Anti-TcdB, Anti-GDH, Anti-Cwp84) und ihren Einfluss auf das akute Krankheitsgeschehen zu untersuchen. Die Funktionalität der Antikörper wurde mit einem zellkulturbasierten Neutralisationstest geprüft. Aufgrund stammspezifischer Toxinunterschiede wurden Toxine zweier verschiedener pathogener Isolate (RT014, RT027) verwendet, die durch die Herstellung konditionierter Medien gewonnen wurden.

3 Material und Methodik

3.1 Wachstums- und Toxinkinetik

Toxigene konditionierte Medien wurden *in-vitro* durch klinische Isolate (institutseigene Sammlung) der *C. difficile*-Stämme RT014 und RT027 erzeugt und für den Toxin-Neutralisationstest verwendet. Zuvor wurde ihre Wachstums- und Toxinkinetik untersucht, um konditionierte Medien mit hohem Toxingehalt zu gewinnen.

Das Wachstumsverhalten sowie die Toxinproduktion der RTs RT010, RT014 und RT027 wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden analysiert und ausgewertet. Als Negativkontrolle diente das konditionierte Medium des non-toxigenen RT010.

Verwendet wurden klinische Isolate, deren RT und Toxinprofil mittels DNA-Sequenzierung bestimmt wurden. Für den zellkulturbasierten Zytotoxizitätstest wurde die Nierenzelllinie Vero B4 (DSMZ ACC 33, Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die Zelllinie wurde kontinuierlich in Kultur gehalten und mittels Mycoplasmen-PCR (Venor[®]GeM Classic, Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland) auf Mycoplasmenfreiheit überprüft.

3.1.1 Wachstumskinetik

Vorbereitend wurden die Bakterienstämme auf Blutagar (BD Biosciences, Kalifornien, USA) ausgestrichen und bei 37 °C in anaerobem Milieu in einer Anaerobierwerkbank (Don Whitley Scientific, Bingley, Vereinigtes Königreich) bebrütet. 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium (Copan, Murrieta, Kalifornien, USA) wurden mit einer Kolonie des entsprechenden Isolates beimpft. Die drei Flüssigmedien wurden mindestens eine Woche in der anaeroben Werkbank bei 37 °C inkubiert und dienten für die weiteren Versuche als Inokulum.

Zum Start der Kinetikversuche wurden 5 ml frische BHI-Flüssigmedien (1) (Abbildung 1) mit je 50 µl des entsprechenden Inokulums beimpft. Sie dienen als „Starterkultur“. Sobald alle Starterkulturen eine Trübung und somit Wachstum aufwiesen, startete der Kinetikversuch:

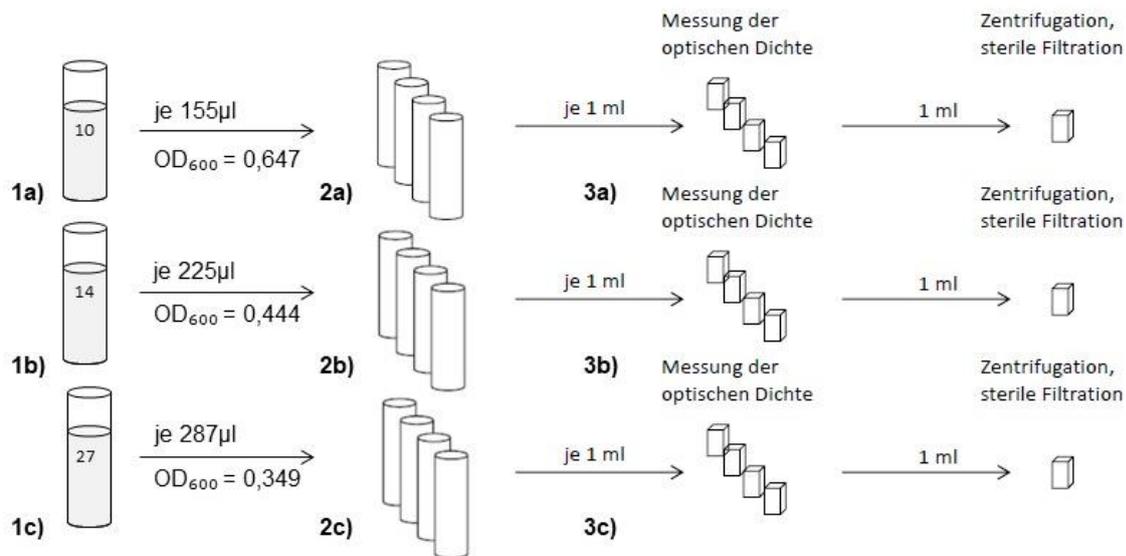


Abbildung 1: Versuchsablauf der Wachstumskinetik. 1a-c zeigt die RTs RT010, RT014, RT027 in Flüssigkultur („Starterkulturen“). Sobald sie eine Trübung zeigten, wurde die OD bestimmt, um mit der Formel $y (ml) = \frac{1}{OD_{600}} * 0,1$ Volumina zu ermitteln, mit der die Quadruplikate (2a-c) beimpft werden sollten. Die ODs und die daraus berechnenden Volumina werden hier beispielhaft aufgeführt. (3) Von den Quadruplikaten (25 ml) wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h die OD ermittelt und für die Toxinkinetik 1 ml zentrifugiert, steril filtriert und aliquotiert.

Pro RT wurde ein Quadruplikat à 25 ml BHI (BD Bacto, BD Biosciences, Kalifornien, USA) (2) mit der „Starterkultur“ (1) beimpft.

Um jede neue Flüssigkultur (2) mit der gleichen Bakterienmenge zu beimpfen, wurde zunächst von 1 ml der Flüssigkultur (1) mittels Photometer die optische Dichte (OD) ermittelt und unter Anwendung der Formel: $y (ml) = \frac{1}{OD_{600}} * 0,1$ das entsprechende Volumen „y“ pro Stamm berechnet.

Sobald die Flüssigkulturen (2) mit den entsprechenden Volumina beimpft wurden, wurden von diesen die ODs zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h gemessen. Hierfür wurde von jeder Flüssigkultur (2) 1 ml entnommen.

Für die nachfolgenden Versuche zur Toxinkinetik wurden Überstände der Bakteriensuspension zu den entsprechenden Zeitpunkten aliquotiert und bei -70 °C eingefroren: Pro RT wurden hierfür 1 ml der Flüssigkultur bei 21,1 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (konditioniertes Medium) wurde abpipettiert und steril filtriert. Verwendet wurden Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm.

Es wurden vier unabhängige Replikate zu je vier technischen Wiederholungen (Quadruplikate) durchgeführt.

3.1.2 Toxinkinetik

Die Zytotoxizität der RT014- und RT027-Toxine (konditionierte Medien) wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden in Zellkultur untersucht. Als Negativkontrolle dienten konditionierte Medien des non-toxigenen RT010.

3.1.2.1 Die Zellkultur

Vero B4 (monkey, African green, kidney) ist eine etablierte Zelllinie, die von Nierenzellen der Grünen Meerkatze stammt. Sie zeigt fibroblastenähnliche Eigenschaften und wächst adhärent in Monolayer. Neben dem häufigen Einsatz für Virusisolationen findet diese Zellkultur auch Anwendung in zahlreichen Plaque-Assays³⁸.

Zur Zellpassage wurde zunächst das Kulturmedium „Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ohne Berührung der am Boden wachsenden Zellen abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit 5 ml auf 37 °C vorgewärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen; dabei sollten vor allem Reste des Fetalen Kälberserums (FCS) entfernt werden, welche das im nächsten Schritt verwendete Trypsin in seiner Wirkung inhibieren würden. Die Pufferlösung PBS enthält 137

mM Natriumchlorid (NaCl), 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl), 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4). 1 ml der auf 37 °C vorgewärmten Trypsin Lösung wurde auf die Zellen gegeben, durch Schwenken der Platte verteilt und bei 37 °C für 10 min inkubiert.

Trypsin ist eine Endopeptidase, welche den Zell-Matrix-Verband andaut und die Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes löst. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) bildet als Komplexbildner besonders stabile 1:1-Komplexe mit Kationen einer Ladungszahl von mindestens +2. Wegen der vier Carboxylgruppen, die neben den beiden freien Elektronenpaaren des Stickstoffatoms ebenfalls für eine Komplexverbindung zur Verfügung stehen, kann sich EDTA auch sechsfach an ein Kation binden. Durch die Komplexierung von Ca^{2+} werden die Zell-Zell-Verbindungen gelöst.

Nach der Inkubation erfolgte die Beobachtung unter dem Lichtmikroskop; die Mehrzahl der Zellen sollte abgerundet und vom Untergrund des Kulturgefäßes abgelöst sein und in der Trypsin-Lösung schwimmen. Um das Ablösen weiterer Zellen zu erleichtern, wurde der Boden des Zellkulturgefäßes vorsichtig beklopft. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 2 ml Medium hinzugegeben (zweifache Menge der Trypsin/EDTA-Lösung). Mittels einer 5 ml-Stabpipette wurden die noch lose anhaftenden Zellen abgespült, mit der Pipette suspendiert und in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1400 rcf (relative centrifugal force) für 5 min. Das Trypsin/EDTA-Medium-Gemisch wurde abpipettiert und das Pellet in 3 ml frischem Medium aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde auf eine Petrischale mit 10 ml frischem Kulturmedium (RPMI 1650 + 10% FCS) gegeben und bis zur nächsten Passage bei 37 °C kultiviert.

Es wurde stets mit Zellsuspensionen gearbeitet, die eine Vitalität von mindestens 95% aufwiesen. Diese wurde mithilfe des TC20™ Automated Cell Counter (Bio RAD, Hercules, Kalifornien, USA) bestimmt.

3.1.2.2. Durchführung und mikroskopische Beurteilung

Die konditionierten Medien, geerntet zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wurden zunächst in einer Dreier-Verdünnungsreihe (1:3 bis 1:2187) auf die Zellen gegeben.

Die Vitalität der Zellen wurde sowohl mikroskopisch beurteilt, als auch mittels MTT-Assay (Sigma, M-2128, St. Louis, Missouri, USA) quantifiziert (siehe Abschnitt 3.1.2.3). Als Negativkontrolle diente der Überstand des non-toxigenen RT010.

Mit einer Mehrkanalpipette wurden aus den Kavitäten der ersten horizontalen Reihe 50 µl Toxin aufgenommen, in die Kavitäten der nächste Reihe gegeben und mit RPMI Medium gemischt (Abbildung 2). Die Verdünnungsreihe wurde analog fortgeführt. Die letzten 50 µl wurden verworfen. Bis auf die Vertiefungen der ersten horizontalen Reihe, die 50 µl Toxin (konditioniertes Medium) enthielten, befanden sich nun in jeder Vertiefung 100 µl Volumen.

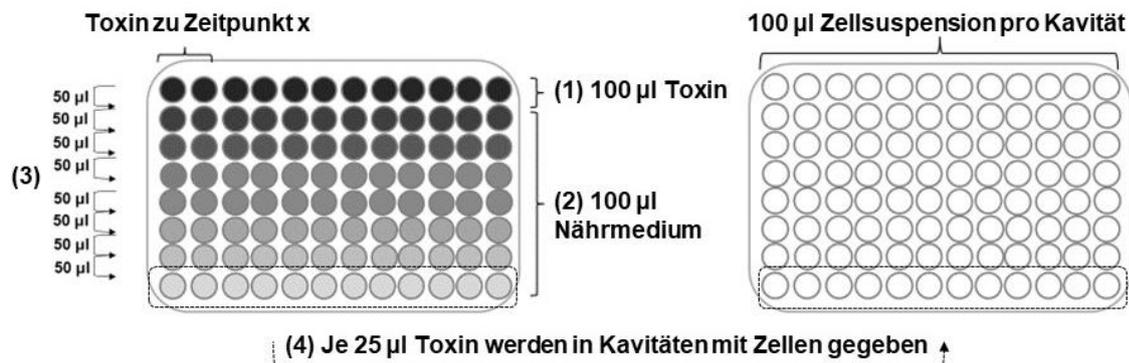


Abbildung 2: Herstellung der Dreier-Verdünnungsreihe. (1) Die Kavitäten der ersten Reihe wurden mit nativem Toxin (konditioniertes Medium), (2) die Kavitäten der übrigen Reihen mit Nährmedium (RPMI) beschickt. (3) Mit einer Mehrkanalpipette wurden aus den Vertiefungen der ersten horizontalen Reihe 50 µl Toxin aufgenommen, in die Vertiefungen der nächsten Reihe gegeben und mit RPMI Medium gemischt. Die Verdünnungsreihe wurde analog fortgeführt. (4) Daraufhin wurde das Toxin (konditioniertes Medium) mit einer Mehrkanalpipette auf die Mikrotiterplatte, beschickt mit Zellen, übertragen. Es wurden stets Doppelansätze angelegt.

Es wurden je 25 µl der verdünnten Toxine (konditionierte Medien) auf die Zellkulturplatte übertragen. Dabei wurden die Toxine in der Reihenfolge von der niedrigsten bis hin zur höchsten Verdünnung pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation (24 h) wurden die zytopathischen Effekte mittels Inversmikroskop beurteilt (Abbildung 3).

Die Dreier-Verdünnungsreihe beginnend mit einer Verdünnung um den Faktor 1000 wurde fortgeführt, wenn bis zu einer Verdünnung um den Faktor 2187 ein zytopathischer Effekt nachweisbar war.



Abbildung 3: Morphologische Beurteilung mittels Phasenkontrastmikroskopie

3.1.2.3 MTT-Assay

Mittels MTT-Assay wurde die Zytotoxizität der RT014- und RT027-Toxine (konditionierte Medien) über einen Zeitraum von 96 Stunden quantitativ erfasst. Als Negativkontrolle dienten konditionierte Medien des non-toxigenen RT010.

Der MTT-Test ist ein quantitativer, kolorimetrischer Test, welcher auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Enzyme in blau-violette Formazane beruht. Diese Formazankristalle werden durch Zugabe von SDS-Puffer (Natriumlaurylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate) aus der Zelle freigesetzt, gelöst und spektrometrisch gemessen. Die Extinktionswerte sind proportional zu dem in den Zellen reduzierten MTT. Da der Vorgang ausschließlich in stoffwechselaktiven, lebenden Zellen abläuft, ist der MTT-Assay ein geeignetes Verfahren, um die metabolische Aktivität von Zellen anzuzeigen³⁸.

2,5 ml des MTT-Pulvers (Sigma, M-2128, St. Louis, Missouri, USA) wurden in 1 ml PBS gelöst. Des Weiteren benötigte man eine SDS/DMF/Essigsäure-Lösung, bestehend aus 100 ml 30% SDS, 50 ml DMF (Dimethylformamid) und 2,6 ml Essigsäure (100%); der pH-Wert wurde auf 4,7 eingestellt.

Pro Well wurden 100 µl MTT-Reagenz hinzugegeben. Die Platte wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, daraufhin wurden 100 µl SDS/DMF/Essigsäure-Lösung dazu pipettiert. Es erfolgte die Inkubation der mit Aluminiumfolie geschützten Platte bei Raumlufttemperatur über Nacht. Am nächsten Tag konnte der Farbumschlag mit einem ELISA Reader (Sunrise, TECAN, Männedorf, Schweiz) bei Wellenlängen von 570 nm Absorption und 630 nm Extinktion gemessen werden (Abbildung 4).

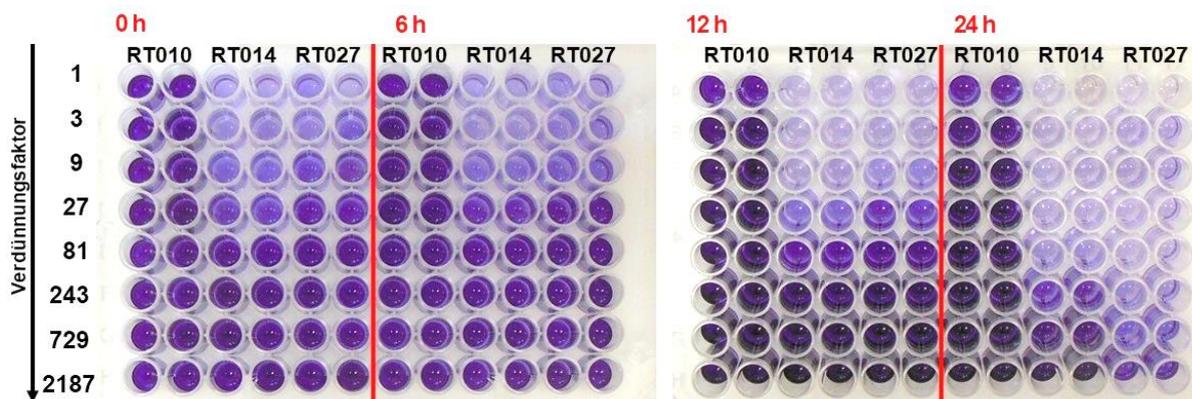


Abbildung 4: MTT-Assay des Toxinkinetik-Versuches zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h. Abgebildet sind zwei Wellplatten nach Durchführung des MTT-Assays für Inkubationszeiten von 0 h bis 24 h. Pro RT wurde ein Doppelansatz angelegt. Die Toxine (konditionierte Medien), gewonnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wurden in einer Dreier-Verdünnungsreihe auf die Zellen gegeben. Die Verminderung der Vitalität bei RT014 und RT027 mit zunehmender Zeit ist anhand der Farbabnahme deutlich zu sehen; erhaltene Vitalität bei dem non-toxischen RT010.

Vitalität und Zytotoxizität wurden prozentual in Relation zu den gemittelten Extinktionswerten nach 96-stündiger Inkubation mit dem konditionierten Medium RT027 (tot) und den Werten unbehandelter Zellen (lebend) bestimmt. 100% wurde hierbei als Differenz dieser Mittelwerte definiert.

Diese Versuchsreihe wurde in drei unabhängigen Wiederholungen in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit *C. difficile*-Infektion

3.2.1 Klinische Beobachtungsstudie

Für die prospektive Beobachtungsstudie wurden volljährige Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes von April 2014 bis Februar 2015 rekrutiert. Einschlusskriterium war das klinische Symptom Diarrhoe nach der WHO-Definition (≥ 3 ungeformter Stuhl/Tag) sowie der mikrobiologische Nachweis eines toxischen *C. difficile*-Isolates aus Stuhl. Dies erfolgte zunächst aus dem Nativmaterial mittels des Schnelltestes C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TechLAB, Blacksburg, Virginia, USA), ein Membranenzymimmunoassay für den Nachweis des *C. difficile*-Antigens GDH sowie der Toxine A und B. Daraufhin erfolgte eine kulturelle Anzucht und die Bestimmung des RT mittels Ribotypisierung nach dem Protokoll von Bidet et al.¹¹⁷.

In der Akutphase der Erkrankung wurde der klinische Verlauf überwacht. Die Zeit bis zum Therapieansprechen (Abnahme der Frequenz bzw. Sistieren der Durchfälle) sowie die Dauer des Fiebers und der Durchfälle wurden dokumentiert. Angaben dazu wurden durch Begutachtung der Patientenakte und durch Gespräche mit den Patienten, den behandelnden Ärzten bzw. dem Pflegepersonal an den Tagen 1, 3 und 6 (± 1 d) nach der Diagnose eruiert.

Unterschieden wurde ferner zwischen einer ambulant erworbenen (Symptombeginn ≤ 48 h nach stationärer Aufnahme) und einer nosokomialen Infektion (Symptombeginn > 48 h nach stationärer Aufnahme).

Daten zu Risikofaktoren (vorausgegangene Antibiose, Krankenhausaufenthalte in den letzten drei Monaten, Unterbringung in einem Pflegeheim), Komorbiditäten (z.B. Tumorerkrankung, chronische Darmerkrankung, Immunsuppression), Symptomatik und der vorausgegangen sowie aktuellen antibiotischen Therapie wurden mithilfe eines standardisierten Fragebogens (Anhang 7.2) erhoben. Des Weiteren wurden aus der digitalen Patientenakte die Laborparameter GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), Leukozytenzahl, Kreatinin, CRP (C-reaktives Protein) für die Tage 1, 3 und 6 (± 1 d) erfasst und der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt.

Anhand der klinischen Symptomatik und der laborchemischen Veränderungen wurde die Schwere der Erkrankung wie nachfolgend klassifiziert:

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Patienten nach Krankheitsschwere

Symptomatik	Erläuterung
transient	passagere Symptomatik (< 24 h)
mild	Durchfall ohne weitere klinische Symptomatik
schwer	Durchfall mit Begleitsymptomatik: Fieber $\geq 38,5$ °C, Leukozytose ($\geq 15\ 000/\mu\text{l}$), Kreatinin ($\geq 1,5$ mg/dl)

Sechs bis 12 Wochen nach Diagnosestellung wurden die Patienten einmalig telefonisch kontaktiert, um sie nach dem Auftreten eines diagnostisch gesicherten Rezidives zu befragen.

Ein positives Ethikvotum sowie die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lagen vor (Ethikvotum der Saarländischen Ärztekammer Nr. 20/14).

Als Vergleichsgruppe diente ein Kollektiv aus 10 gesunden Probanden im Alter von 20 bis 61 Jahren, deren Plasma ebenfalls auf das Vorhandensein antigenspezifischer und neutralisierender Antikörper untersucht wurde.

3.2.2 Etablierung eines Neutralisationstests

3.2.2.1 Konditionierte Medien

Die konditionierten Medien der RTs RT010, RT014 und RT027 wurden analog des Toxinkinetikversuches (Abschnitt 3.1.2) hergestellt und nach 96 Stunden geerntet. Die Flüssigkulturen wurden bei 4500 U/min für 5 min zentrifugiert. Der dadurch entstandene klare Überstand (konditioniertes Medium) wurde ohne Berührung des Pellets abpipettiert. Darauf erfolgte die sterile Filtration des Überstandes mit Vakuumfiltersystem (TPP, Trasadingen, Schweiz) und die Aliquotierung à 1 ml. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Für den Neutralisationstest (NT) wurde in Vorversuchen eine Verdünnung der Toxine (konditionierte Medien) um den Faktor 1:1000 als geeignet ermittelt:

In Vorversuchen wurden analog des Toxinkinetik-Versuches Zellen auf eine 96-Wellplatte ausgesät und mit den RT014- und RT027-Toxinen (konditionierte Medien) in zehnstufiger Verdünnung für 24 Stunden inkubiert. Mikroskopisch zeigten sich bis zu einer Toxin-Verdünnung um den Faktor 1:1000 zytopathische Effekte. Erst bei einer Verdünnung um den Faktor 1:10 000 waren vereinzelt vitale Zellen erkennbar.

Um auch quantitativ Aussagen zur Zytotoxizität treffen zu können, wurde der MTT-Assay durchgeführt. Für RT014- und RT027-Toxine (konditionierte Medien) zeigten sich in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:100 deutlich zytopathische Effekte und eine geringfügige Abnahme der Zytotoxizität bei einer Verdünnung von 1:1000. Ab einer Verdünnung von 1:10 000 zeigte sich kein zytopathischer Effekt mehr.

In einem weiteren Vorversuch wurden die Toxin-Verdünnungen (konditionierte Medien) 1:100 mit 1:1000 verglichen. Sie wurden mit neutralisierendem Plasma in Zellkultur inkubiert. Während mikroskopisch bei Toxin-Verdünnungen um den Faktor 1:1000 vitale Zellen erkennbar waren, zeigten sich bei Verdünnungen um den Faktor 1:100 nur tote Zellen. Für den Neutralisationstest wurde daher Toxin (konditionierte Medien) um den Faktor 1:1000 verdünnt verwendet.

3.2.2.2 Plasmen

Die EDTA-Blutproben wurden bei 2500 g für 15 min zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Aufgrund der Zelltoxizität von EDTA konnten die EDTA-Plasmen nicht nativ in Zellkultur inkubiert werden und es ergab sich die Notwendigkeit einer geeigneten Verdünnung. Theoretisch besteht die Möglichkeit der Rekalzifizierung, die in Vorversuchen jedoch keine Vorteile erbrachte: Wurde rekalzifiziertes Plasma in Zellkultur inkubiert, zeigten sich nach 24 h zwar weiterhin vitale Zellen, diese konnten aber aufgrund von Trübungen und Niederschlägen mikroskopisch nicht ausreichend gut beurteilt werden. Ab einer Verdünnung von 1:4 zeigte sich ein konfluenten Zellrasen, der auch bei unbehandeltem EDTA-Plasma in einer Verdünnung von 1:4 beobachtet wurde.

Die notwendige Verdünnung der Plasmen sollte so gering wie möglich sein, um eine möglichst hohe Konzentration potenziell neutralisierender Antikörper zu wahren. In Vorversuchen wurden analog des Neutralisationstests 25 µl Plasma in einer zweistufigen Verdünnungsreihe mit konfluenten Vero B4 Zellen inkubiert.

Aufgrund des Verdünnungseffektes im finalen Neutralisationstest durch die Zugabe von 25 µl Toxin (konditioniertes Medium) wurde in den Vorversuchen zu 25 µl Plasma zusätzlich 25µl RPMI 1650 gegeben und in Zellkultur inkubiert.

Ab einer Verdünnung des Plasmas um den Faktor 1:2 zeigte sich mikroskopisch ein konfluenten Zellrasen; somit wurde für unseren Neutralisationstest Plasma in einer Verdünnung von 1:2 verwendet.

Im Hinblick auf das verwendete Material wurden in Vorversuchen ausgewählte gepaarte Patientenproben (Serum und Plasma) mit ELISA und Neutralisationstest untersucht. Antikörper waren in Serum und Plasma in nahezu gleichen Titerhöhe nachweisbar.

3.2.2.3 Durchführung

Im ersten Schritt wurden die Patientenplasmen in einer 1:2 Verdünnung und in Anwesenheit der Toxine (konditioniertes Medium) auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gescreent. Wenn sich mikroskopisch ein konfluenter Zellrasen, respektive eine Neutralisation zeigte, wurde in einem zweiten Durchgang eine zweistufige Verdünnungsreihe des entsprechenden Plasmas angefertigt, um den höchsten Titer der neutralisierenden Antikörper zu ermitteln.

100 µl Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen/ml) wurden mit einer Multipette auf je eine Vertiefung einer 96er-Wellplatte mit flachem Boden gegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das zu testende Plasma wurde mit RPMI-Medium um den Faktor 1:2 verdünnt, die konditionierten Medien RT014 und RT027 mit RPMI um den Faktor 1:1000. Pro Well wurden zuerst 25 µl des verdünnten Plasmas und danach 25 µl des verdünnten konditionierten Mediums auf die konfluenten Zellen gegeben. Darauf folgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die zytopathischen Effekte mittels Inversmikroskopie beurteilt (Abbildung 5).

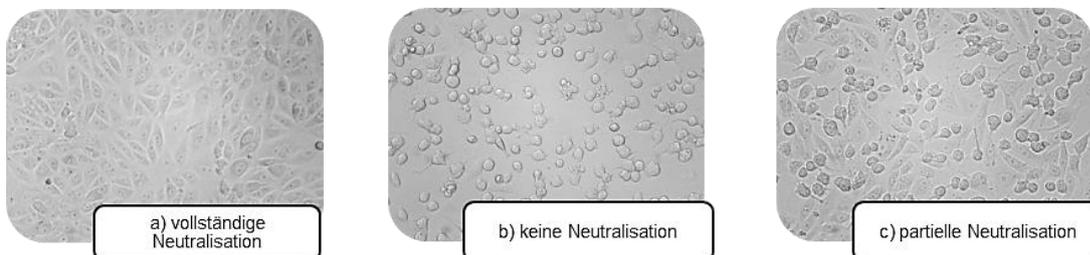


Abbildung 5: Morphologische Beurteilung der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie. a) Vitale Vero B4 Zellen, vollständige Neutralisation der Toxine (konditioniertes Medium). b) Tote Vero B4 Zellen, keine Neutralisation der Toxine (konditioniertes Medium). c) Vereinzelt vitale Zellen, zytopathische Effekte erkennbar, partielle Neutralisation.

Falls sich bei einem Plasma mikroskopisch ein konfluenter Zellrasen zeigte, folgte die Titerbestimmung: Von dem entsprechenden Plasma wurde eine zweistufige Verdünnungsreihe (mit RPMI-Medium 1640) bis zu einem Verdünnungsfaktor 1:256 angefertigt; 25 µl Plasma wurden in entsprechenden Verdünnungen mit 25 µl konditioniertem Medium bei 37 °C in Zellkultur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag

erfolgte die mikroskopische Auswertung mit Inversmikroskopie und die Bestimmung des neutralisierenden Antikörpertiters (Abbildung 5). Für jedes Experiment wurden Positiv- (RPMI anstelle von Toxin für 100% Vitalität) und Negativkontrollen (RPMI anstelle von Plasma für 100 % Zytotoxizität) mitgeführt.

3.2.3 Externe Antikörperbestimmung mittels ELISA (TechLab)

149 Plasmen und 10 Seren wurden zu TechLab (Blacksburg, Virginia, USA) versandt. Mit einem ELISA gegen rekombinante (GDH, Cwp84) und native (TcdA, TcdB) *C. difficile*-spezifische Antigene wurden dort semi-quantitative Antikörperkonzentrationen bestimmt. Die gereinigten Antigene wurden auf einer 96-Well-ELISA-Platte immobilisiert und mit Rinderserumalbumin (BSA) blockiert. Es wurde Anti-Human-Ig-HRP-Konjugat und 1-Step-TMB-Substrat (OD 450/620 nm) verwendet. Die Patientenproben wurden zunächst in einer Anfangsverdünnung von 1:1000 getestet und falls erforderlich (OD >1000) weiter verdünnt. Die OD-Ergebnisse wurden entsprechend korrigiert, indem die Hintergrundsignale abgezogen wurden (Vertiefungen ohne Antigene und mit BSA blockiert). Eine Positivkontrolle wurde mit jedem Testlauf mitgeführt.

3.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung und statistischen Signifikanzanalysen wurde die Software GraphPad Prism Version 6.04 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Zur Berechnung signifikanter Unterschiede kamen der parametrische T-Test, parametrische Varianzanalysen (One Way Anova) sowie der Fisher's Exact Test zum Einsatz. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstums- und Toxinkinetik

4.1.1 Wachstumskinetik

Für einen Zeitraum über 96 h wurde das Wachstumsverhalten der RTs RT010, RT014 und RT027 in BHI-Flüssigkulturen untersucht. Hierfür wurde die OD zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bestimmt (Abbildung 6). Im Nachfolgenden sind die Mittelwerte der ODs aus vier Versuchsreihen aufgeführt.

Die Latenzphase der RTs RT010 und RT014 ging nach 6 h in eine exponentielle Phase über, hinsichtlich ihrer OD wurde nach 12 h das Maximum erreicht (RT010: OD 0,5 und RT014: OD 0,56).

Für RT010 wurde von 12 h bis 24 h eine stationäre Phase beobachtet, gefolgt von einer absteigenden. Für RT014 zeigte sich bereits nach 12 h eine kontinuierliche Abnahme der OD ohne stationäre Phase.

Im Gegensatz zu den RTs RT010 und RT014 begann die exponentielle Phase des RT027 erst nach 12 h mit einem Maximum nach 24 h (OD 0,43); auch hier folgte eine absteigende Phase.

Für alle RTs stellte sich nach 48 h auf unterschiedlichen OD-Niveaus eine stationäre Phase ein. Während für RT027 hier die niedrigste OD gemessen wurde (OD 0,26), wurde für RT010 die höchste (OD 0,4) ermittelt. RT014 lag mit einer OD von 0,35 im mittleren Bereich.

Insbesondere zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h zeigte RT027 eine deutlich reduzierte OD gegenüber RT010 und RT014 (Tabelle 7).

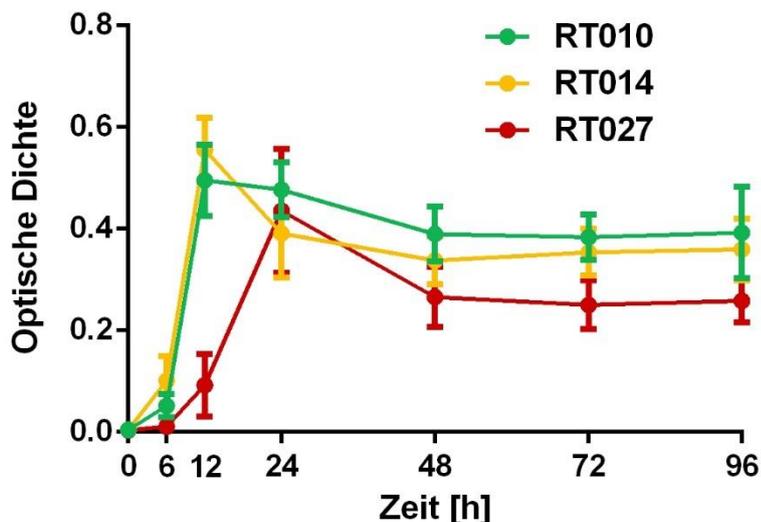


Abbildung 6: Wachstumskinetik der *C. difficile*-Ribotypen RT010, RT014, RT027. Gemessen wurde die optische Dichte (OD_{600} ; $n=16$) zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Dargestellt sind die gemittelten ODs aller 4 Versuchsreihen. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen RT014 und RT027 außer nach 0 h und 24 h zu allen Messzeitpunkten (Tabelle 7). Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

4.1.2 Toxinkinetik

Das Wachstum von RT027 in Flüssigkulturen führte im Vergleich zu RT014 trotz einer verzögerten Wachstumskinetik zu einer höheren Zytotoxizität.

Bereits zu Beginn (0 h), d.h. direkt nach Beimpfung des Flüssigmediums mit den Bakterienstämmen, konnte für RT027 ein zytotoxischer Effekt ermittelt werden. Die Vitalität der Zellen war nach Hinzugabe des unverdünnten konditionierten Mediums von RT027 bereits um 58% und bei RT014 um 45% vermindert.

Nach 24 h konnte eine Zytotoxizität auch in höherer Verdünnung festgestellt werden; so zeigte das Medium von RT027 bzw. RT014 einen zytotoxischen Effekt bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:2187 bzw. von 1:27.

Nach 48 h wurde bis zu einer Verdünnung um den Faktor 1:27 000 ein zytotoxischer Effekt des konditionierten Mediums RT027 beobachtet (Abbildung 7), während die Vitalität der Zellen

zu diesem Zeitpunkt 82% betrug. Das konditionierte Medium von RT014 zeigte nach 48 h bis zu einer Verdünnung um den Faktor 1:81 einen zytotoxischen Effekt, während die Vitalität 81% betrug.

Nach 96 h wurde bis zu einer Verdünnung um den Faktor 1:27 000 des konditionierten Mediums RT027 ein zytotoxischer Effekt detektiert, während der letzte zytotoxische Effekt des konditionierten Mediums RT014 bei einer Verdünnung um den Faktor 1:9000 beobachtet wurde.

Die quantitative zytotoxische Wirkung der konditionierten Medien nach anaerober Kultur wurde durch Analyse der Zytotoxizitätsdosis 50 % bestimmt. Diese war nach 24 h für RT027 24-mal höher, nach 48 h 170-fach, nach 72 h 48-fach und nach 96 h 25-fach höher als die von RT014 (Tabelle 2). Bei RT027 wurde nach 48 h ein Plateau mit der höchsten Zytotoxizität erreicht (maximaler Titer > 1:3000), während sie bei RT014 geringer war und bis zum Ende der Kultivierungszeit stetig zunahm (maximaler Titer 1:195) (Abbildung 7).

Binnen 24 h blieb die Vitalität der Zellen, die mit dem konditionierten Medium des non-toxigenen RT010 behandelt wurden, in jeder Verdünnung vollständig erhalten. Ab 24 h konnte nach Hinzugabe des unverdünnten, nativen Überstandes zu jedem Messzeitpunkt eine um ca. 20% verminderte Vitalität festgestellt werden (Abbildung 7). Dieser Effekt kann sicherlich auch durch Toxin-unabhängige Effekte des unverdünnten, bereits verbrauchten Mediums erklärt werden.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der 50%-Zytotoxizität der konditionierten Medien RT027 und RT014 in Abhängigkeit der Zeit. Gezeigt werden die Verdünnungsstufen der RT014- und RT027-Toxine (konditionierte Medien), bei denen eine 50%-Zytotoxizität erreicht wurde.

Zeitpunkte	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
50%-Zytotoxizität							
RT027	1	2	2	167	3746	3862	4781
RT014	1	1	1	7	22	81	195
$\frac{RT027}{RT014}$	1	2	2	23,9	170,3	47,7	24,5

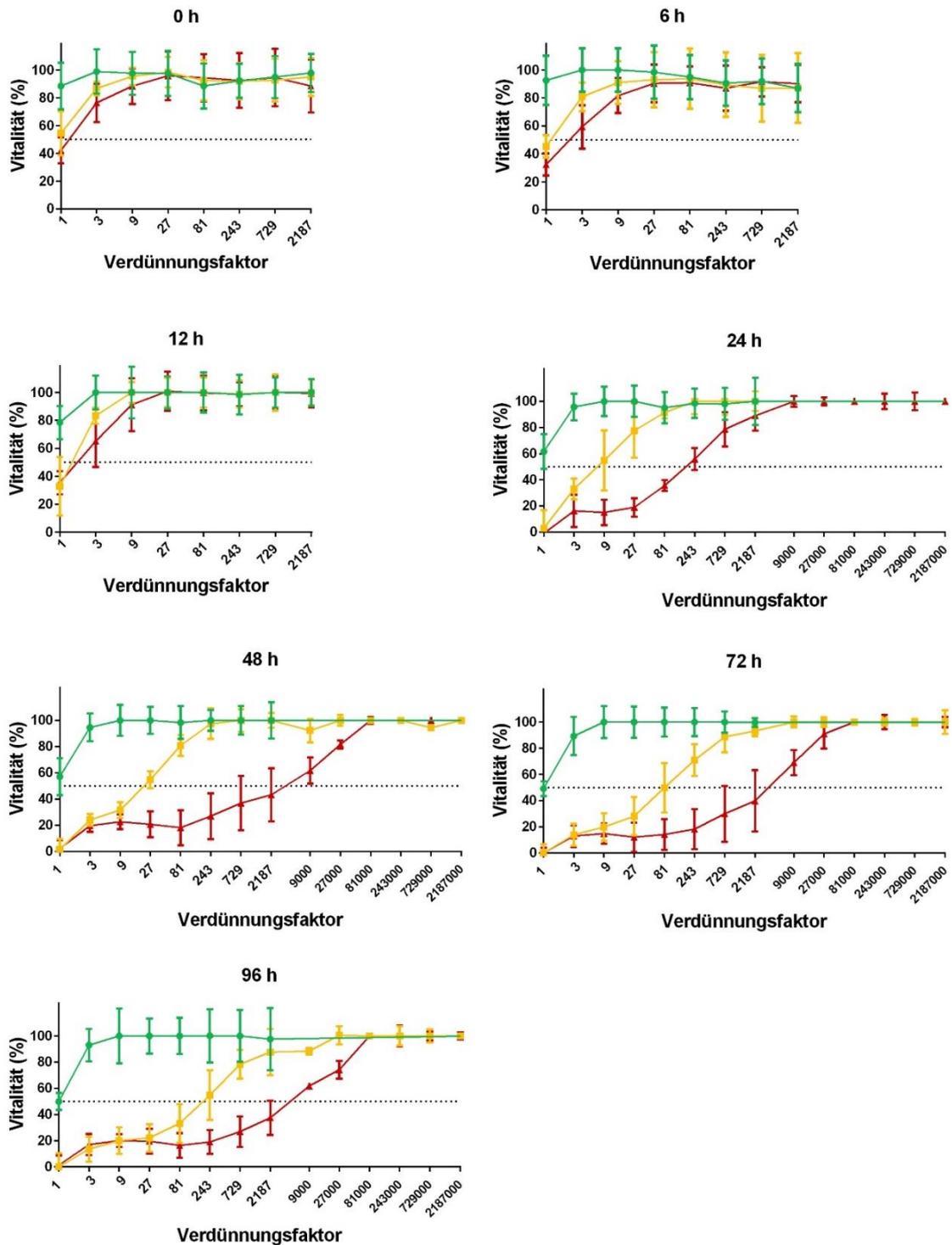


Abbildung 7: Zytotoxizität der *C. difficile*-Ribotypen RT014 und RT027. Konditionierte Medien der *C. difficile*-Stämme RT010 (grün), RT014 (gelb) und RT027 (rot) wurden nach 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h gewonnen. Die Zytotoxizität wurde in serieller Verdünnung mit einem zellkulturbasierten Zytotoxizitätstest (MTT-Assay) bestimmt. Die gepunktete Linie zeigt die 50%-Zytotoxizität. Der non-toxigene RT010 diente als Negativkontrolle. Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

4.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit *C. difficile*-Infektion

4.2.1 Klinische Beobachtungsstudie

4.2.1.1 Allgemeine Angaben und Anamnese

Vom 11.04.2014 bis 24.02.2015 wurden 46 erwachsene Patienten (medianes Alter 68, Range 47–96) des Universitätsklinikums des Saarlandes mit der Diagnose CDI in die Studie eingeschlossen. Hiervon waren 48% (22/46) weiblich und 52% (24/46) männlich. 67% (31/46) der Patienten erkrankten nosokomial (> 3 Tage nach Aufnahme), 33% (15/46) ambulant (\leq 3 Tage nach Aufnahme) (Tabelle 3).

Eine deutliche Mehrheit (76%, 34/45) erhielt in den vorausgegangenen vier Wochen eine antibiotische Therapie. 67% (30/45) der Patienten befand sich in den letzten drei Monaten stationär im Krankenhaus. 9% der Patienten (4/45) lebten in einem Pflegeheim (Tabelle 3). Mehr als die Hälfte (53% , 24/45) wies zwei dieser beschriebenen Risikofaktoren auf; 40% (18/45) einen und die Minderheit drei (2% , 1/45) bzw. keinen (4% , 2/45).

Mit 49% (22/45) litten die meisten Patienten unter einer onkologischen Grunderkrankung, gefolgt von Niereninsuffizienz (29% , 13/45) und einer chronischen Lungenerkrankung (18% , 8/45); 4% (2/45) waren leberinsuffizient. Kein Patient wies eine chronische Darmerkrankung auf. 18% (8/45) des Patientenkollektivs befanden sich zum Zeitpunkt der Infektion unter einer immunsuppressiven Therapie (Tabelle 3). Zusammenfassend wies die Mehrheit (53% , 24/46) eine dieser beschriebenen Komorbiditäten auf; bei 27% (12/45) der Patienten konnten zwei dieser dokumentiert werden, gefolgt von der Gruppe, die keine aufwies (16% , 7/45). Ein kleiner Anteil der Patienten wies drei oder mehr (4% , 2/45) der oben genannten Begleiterkrankungen auf.

4.2.1.2 Symptomatik

Der größte Anteil an Patienten (70% , 32/46) erkrankte erstmalig an einer CDI, in 30% (14/46) der Fälle handelte es sich bereits um eine rezidivierende Erkrankung (Tabelle 4).

Die Mehrheit (54% , 25/46) zeigte ein Beschwerdebild mit Diarrhoeen und einer laborchemischen Infektkonstellation, gefolgt von der Gruppe an Patienten (37% , 17/46), die Diarrhoeen ohne Anstieg des CRP bzw. der Leukozyten entwickelte. Allenfalls unter flüchtigen Beschwerden, die binnen 24 Stunden sistierten, litten 9% (4/46). Schwere Verläufe der CDI, die zu einem Megakolon, Ileus oder gar letal endeten, wurden nicht beobachtet. Im Mittel dauerten die Durchfälle 3,6 Tage, in 12% (5/42) der Fälle war die Infektion einhergehend mit Fieber (Tabelle 4).

4.2.1.3 Laborwerte

Erhöht zeigten sich die Leukozytenwerte mit einem Mittelwert von 13 000/ μ l (Normbereich: 4000 bis 10 000/ μ l) und das CRP mit einem Mittelwert von 81 mg/l (Normbereich: 0 bis 5 mg/dl).

Ebenfalls außerhalb des Normbereiches waren der Kreatininwert mit einem Mittelwert von 1,8 mg/dl (Normbereich: 0,7-1,2 mg/dl) und Albumin mit 27 g/l (Normbereich: 35-52 g/l). GPT mit 41 U/l (Normbereich: 10-50 U/l) lag im Referenzbereich (Tabelle 4).

4.2.1.4 Diagnostik

Die Stuhlproben wurde initial mittels des Schnelltestes C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TechLAB, Blacksburg, Virginia, USA) für den Nachweis des *C. difficile*-Antigens GDH sowie der Toxine A und B untersucht. In 61% (28/46) der Fälle zeigte sich Cytotoxin A/B positiv, in 39% (18/46) negativ (Tabelle 5).

Bei positivem GDH-Nachweis erfolgte eine kulturelle Anlage sowie die Ribotypisierung als Genotypisierungsmethode. Am häufigsten wurden mit 28% (13/46) RT001, mit je 11% (5/46) RT027 und RT014 nachgewiesen. Seltener gefunden wurden RT020 (7% , 3/46), RT078 (4%, 2/46) und RT126 (4% , 2/46). Einzelnachweise stellten die RTs RT159, RT005, RT011, RT012,

RT017, RT023, RT029, RT046, RT053, RT081 dar und in 13% (6/46) der Fälle handelte es sich um unbekannte, nicht epidemische Stämme. Die mittels Ribotypisierung erhaltenen Bandenmuster fanden bei diesen Stämmen keine Entsprechungen mit denen der bekannten Isolate aus der Datenbank (Tabelle 5).

Verteilung der Ribotypen

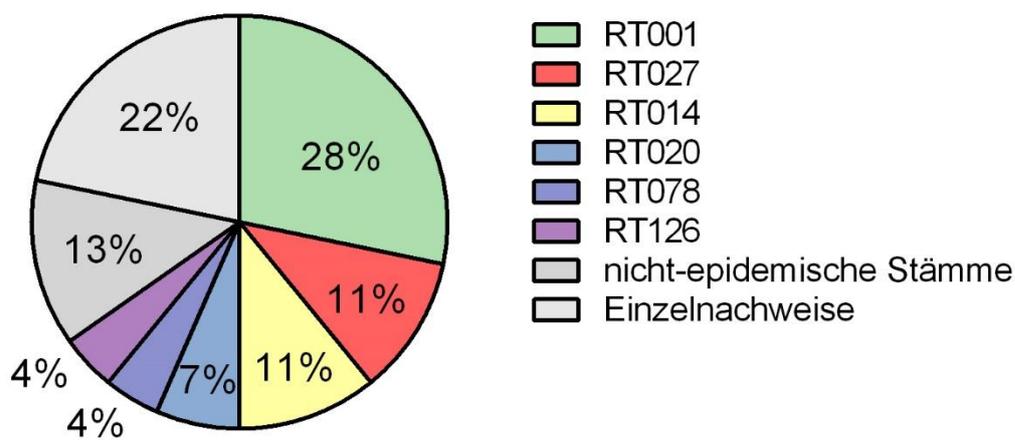


Abbildung 8: Verteilungsmuster der *C. difficile*-Ribotypen im untersuchten Patientenkollektiv (n=46). Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

4.2.1.5 Therapie und Therapieansprechen

Wegen der nachgewiesenen CDI wurden 87% (40/46) der Patienten antibiotisch therapiert; die Mehrzahl (70% , 32/46) mit Metronidazol, 7% (3/46) mit Vancomycin p.o. und 11% (5/46) erhielten eine Kombination aus beiden Substanzen. 13% (6/46) der Patienten erhielten keine gegen *C. difficile* gerichtete antibiotische Therapie, weil die Durchfälle bis zur Diagnosestellung bereits spontan sistiert waren (Tabelle 4).

Bei dem Großteil der Patienten (41% , 15/37) besserte sich die Symptomatik binnen 48 Stunden nach Behandlungsbeginn im Sinne einer Abnahme der Frequenz der Diarrhoe, Festigung der Stuhlkonsistenz oder einer Vollremission. 38% der Patienten (14/37) zeigten ein Therapieansprechen nach 72 Stunden und 11% binnen 72 Stunden (Tabelle 4).

Vier Patienten (11% , 4/37) berichteten auch nach sechs Tagen (± 1 d) von persistierenden Durchfällen ohne erkennbare Besserung. Hiervon litt die erste Patientin unter einem Lymphombefall des Darmtraktes. Bei der zweiten Patientin wurde bei granulomatöser Polyangiitis eine hochdosierte immunsuppressive Therapie eingeleitet. Der dritte Patient war schwerst immunkomprimiert bei Leberzirrhose, Niereninsuffizienz und metastasiertem hepatozellulärem Karzinom. Der vierte Patient befand sich unter einer Hochdosis-Chemotherapie bei Colon-Karzinom. Schlussfolglich konnten die Durchfälle neben der nachgewiesenen CDI auch durch Therapien und Begleiterkrankungen mitbedingt sein, sodass ein selektives Therapieansprechen auf die *C. difficile*-Therapie nicht zu differenzieren war.

Nach sechs bis zwölf Wochen erlitten 19% (6/31) der Patienten ein diagnostisch gesichertes Rezidiv.

Tabelle 3: Patientencharakteristik (allgemeine Angaben). Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

	Patienten (%)	Neutralisation RT027 (NT)	Neutralisation RT027 und RT014 (NT)	keine Neutralisation	Anti-TcdA (EIA)	Anti-TcdB (EIA)	Anti-GDH (EIA)	Anti-Cwp84 (EIA)
Total	46/46 (100)	12/46 (26)	5/46 (11)	34/46 (74)	5/46 (11)	13/46 (28)	39/46 (85)	28/46 (61)
allgemeine Patientenangaben								
weiblich	22/46 (48)	6/12 (50)	1/5 (20)	16/34 (47)	1/5 (20)	6/13 (46)	21/39 (54)	12/28 (43)
männlich	24/46 (52)	6/12 (50)	4/5 (80)	18/34 (53)	4/5 (80)	7/13 (54)	18/39 (46)	16/28 (57)
Alter (Jahre)	69 (±11,3)	68 (±13)	68 (±13)	67 (±13)	67 (±13)	67 (±12)	69 (±11)	70 (±12)
nosokomial	31/46 (67)	7/12 (58)	2/5 (40)	10/33 (29)	2/5 (40)	8/13 (62)	26/39 (67)	19/28 (68)
ambulant	15/46 (33)	5/12 (42)	3/5 (60)	24/33 (71)	3/5 (60)	5/13 (38)	13/39 (33)	9/28 (32)
Risikofaktoren								
vorausgegangene Antibiose	34/45 (76)	8/12 (67)	3/5 (60)	26/33 (79)	2/5 (40)	10/13 (77)	30/39 (77)	20/28 (71)
Krankenhausaufenthalte in den letzten 3 Monaten	30/45 (67)	10/12 (83)	4/5 (80)	20/33 (61)	4/5 (80)	11/13 (85)	26/39 (67)	16/28 (57)
Pflegeheim	4/45 (9)	0/12 (0)	0/5 (0)	4/33 (12)	0/5 (0)	1/13 (8)	4/39 (10)	3/28 (11)
Komorbiditäten								
onkologische Erkrankung	22/45 (49)	7/12 (58)	4/5 (80)	15/33 (45)	1/5 (20)	5/13 (38)	17/39 (44)	12/28 (43)
Leberinsuffizienz	2/45 (4)	2/12 (17)	2/5 (40)	0/33 (0)	1/5 (20)	2/13 (15)	2/39 (5)	2/28 (7)
Niereninsuffizienz	13/45 (29)	4/12 (33)	1/5 (20)	9/33 (27)	2/5 (40)	4/13 (31)	11/39 (28)	8/28 (29)
chronische Lungenerkrankung	8/45 (18)	2/12 (17)	1/5 (20)	6/33 (18)	0/5 (0)	2/13 (15)	8/39 (21)	4/28 (14)
Immunsuppression	8/45 (18)	2/12 (17)	1/5 (20)	6/33 (18)	1/5 (20)	2/13 (15)	7/39 (18)	4/28 (14)
Follow up								
Total	31/31 (100)	7/31 (23)	2/31 (6)	24/31 (77)	3/31 (26)	8/31 (26)	25/31 (81)	16/31 (52)
Recurrenz	6/31 (19)	1/7 (14)	0/2 (0)	5/24 (21)	1/3 (33)	2/8 (25)	5/25 (20)	4/16 (25)

Tabelle 4: Patientencharakteristik (Symptomatik, Basislabor und Therapie). Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

	Patienten (%)	Neutralisation RT027 (NT)	Neutralisation RT027 und RT014 (NT)	keine Neutralisation	Anti-TcdA (EIA)	Anti-TcdB (EIA)	Anti-GDH (EIA)	Anti-Cwp84 (EIA)
Total	46/46 (100)	12/46 (26)	5/46 (11)	34/46 (74)	5/46 (11)	13/46 (28)	39/46 (85)	28/46 (61)
Symptomatik								
Erstmanifestation	32/46 (70)	8/12 (67)	3/5 (60)	24/34 (71)	2/5 (40)	8/13 (62)	27/39 (69)	21/28 (75)
Rezidiv	14/46 (30)	4/12 (33)	2/5 (40)	10/34 (29)	3/5 (60)	5/13 (38)	12/39 (31)	7/28 (25)
Fieber	5/46 (12)	2/12 (17)	1/5 (20)	3/34 (10)	0/5 (0)	1/13 (8)	3/39 (8)	3/28 (12)
Durchfälle	3,6 d (± 2,1)	3,7d (± 2,0)	3,7d (± 2,0)	3,6 d (± 2,1)	3,6 d (± 2,1)	3,7 (± 2,0)	3,6 (± 2,1)	3,6 (± 2,0)
Labor								
GPT (U/l)	41 (± 55)	39 (± 54)	39 (± 54)	42 (± 56)	17 (± 5)	22 (± 14)	49 (± 77)	56 (± 93)
CRP (mg/l)	81 (± 77)	82 (± 79)	82 (± 79)	82 (± 78)	129 (± 118)	130 (± 112)	91 (± 88)	105 (± 98)
Kreatinin (mg/dl)	1,8 (± 2)	1,9 (± 2)	1,9 (± 2)	1,8 (± 2)	2,0 (± 0,9)	1,4 (± 0,9)	1,8 (± 2)	1,8 (± 2)
Leukozyten (Zellen/ μ l)	13 000 (± 17 000)	13 000 (± 17 000)	13 000 (± 17 000)	13 000 (± 17 000)	12 000 (± 7 000)	11 000 (± 6 000)	11 000 (± 6 000)	10 000 (± 5 000)
Albumin (g/l)	27 (± 8)	26 (± 8)	26 (± 8)	27 (± 8)	19 (± 7)	24 (± 6)	29 (± 13)	23 (± 5)
Schwere der Erkrankung								
transient	4/46 (9)	2/12 (17)	1/5 (20)	2/34 (6)	0/5 (0)	0/13 (0)	2/39 (5)	1/28 (4)
leicht	17/46 (37)	3/12 (25)	1/5 (20)	14/34 (41)	2/5 (40)	4/13 (31)	15/39 (38)	13/28 (46)
mild	25/46 (54)	7/12 (58)	3/5 (60)	18/34 (53)	3/5 (60)	9/13 (69)	22/39 (56)	14/28 (50)
C difficile-Therapie								
keine Therapie	6/46 (13)	3/12 (25)	1/5 (20)	3/34 (9)	0/5 (0)	1/13 (8)	4/39 (10)	3/28 (11)
Metronidazol	32/46 (70)	8/12 (67)	4/5 (80)	24/34 (71)	4/5 (80)	10/13 (77)	28/39 (72)	18/28 (64)
Vancomycin	3/46 (7)	1/12 (8)	0/5 (0)	2/34 (6)	1/5 (20)	2/13 (15)	3/39 (8)	3/28 (11)
Vancomycin und Metronidazol	5/46 (11)	0/12 (0)	0/5 (0)	5/34 (15)	0/5 (0)	0/13 (0)	4/39 (10)	4/28 (14)
Therapieansprechen								
< 48h	15/37 (41)	3/9 (33)	1/4 (25)	12/28 (43)	0/5 (0)	5/12 (42)	13/32 (41)	9/23 (39)
< 72h	4/37 (11)	0/9 (0)	0/4 (0)	4/28 (14)	1/5 (20)	0/12 (0)	4/32 (13)	2/23 (9)
≥ 72h	14/37 (38)	4/9 (44)	1/4 (25)	10/28 (36)	4/5 (80)	5/12 (42)	12/32 (38)	10/23 (43)
kein Therapieansprechen	4/37 (11)	2/9 (22)	2/4 (50)	2/28 (7)	0/5 (0)	2/12 (17)	3/32 (9)	2/23 (9)

Tabelle 5: *C. difficile*-Diagnostik und Ribotypen

	Patienten (%)	Neutralisation RT027 (NT)	Neutralisation RT027 und RT014 (NT)	keine Neutralisation	Anti-TcdA (EIA)	Anti-TcdB (EIA)	Anti-GDH (EIA)	Anti-Cwp84 (EIA)
Total	46/46 (100)	12/46 (26)	5/46 (11)	34/46 (74)	5/46 (11)	13/46 (28)	39/46 (85)	28/46 (61)
Screening								
GDH + und Cytotoxin A/B +	28/46 (61)	5/12 (42)	0/5 (0)	23/34 (68)	3/5 (60)	7/13 (54)	26/39 (67)	18/28 (64)
GDH + und Cytotoxin A/B –	18/46 (39)	7/12 (58)	5/5 (100)	11/34 (32)	2/5 (40)	6/13 (46)	13/39 (33)	10/28 (36)
Ribotypisierung								
RT001	13/46 (28)	4/12 (33)	1/5 (20)	9/34 (26)	2/5 (40)	5/13 (38)	10/39 (26)	6/28 (21)
RT027	5/46 (11)	1/12 (8)	0/5 (0)	4/34 (12)	0/5 (0)	1/13 (8)	5/39 (13)	4/28 (14)
RT014	5/46 (11)	0/12 (0)	0/5 (0)	5/34 (15)	1/5 (20)	0/13 (0)	5/39 (13)	2/28 (7)
RT020	3/46 (7)	0/12 (0)	0/5 (0)	3/34 (9)	0/5 (0)	0/13 (0)	2/39 (5)	3/28 (11)
RT078	2/46 (4)	1/12 (8)	1/5 (20)	1/34 (3)	1/5 (20)	1/13 (8)	2/39 (5)	2/28 (7)
RT126	2/46 (4)	0/12 (0)	0/5 (0)	2/34 (6)	0/5 (0)	0/13 (0)	2/39 (5)	0/28 (0)
unbekannte Ribotypen	6/46 (13)	2/12 (17)	1/5 (20)	4/34 (12)	0/5 (0)	2/13 (15)	4/39 (10)	4/28 (14)
RT159	1/46 (2)	1/12 (8)	0/5 (0)	0/34 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT005	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT011	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	1/39 (3)	0/28 (0)
RT012	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT017	1/46 (2)	1/12 (8)	1/5 (20)	0/34 (0)	1/5 (20)	1/13 (8)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT023	1/46 (2)	1/12 (8)	0/5 (0)	0/34 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	1/39 (3)	0/28 (0)
RT029	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT046	1/46 (2)	1/12 (8)	1/5 (20)	0/34 (0)	0/5 (0)	1/13 (8)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT053	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	1/39 (3)	1/28 (4)
RT081	1/46 (2)	0/12 (0)	0/5 (0)	1/34 (3)	0/5 (0)	0/13 (0)	0/39 (0)	0/28 (0)

4.2.2 Antikörperprävalenz und Antikörperverlauf

Während des Beobachtungszeitraums wurden bei 11% (5/46) der Patienten Anti-TcdA und bei 28% (13/46) Anti-TcdB nachgewiesen (Abbildung 9). Im Gegensatz dazu fand man eine deutlich höhere Prävalenz Toxin-unabhängiger Antikörper mit 85% (39/46) für Anti-GDH und 61% (28/46) für Anti-Cwp84. Bei 26% (12/46) der Patienten wurden neutralisierende Antikörper gegen RT027-Toxine und bei fünf von diesen (11%, 5/46) zusätzlich gegen RT014-Toxine gefunden. Auffällig war, dass keine der Plasmaproben ausschließlich RT014-Toxine neutralisieren konnte.

Insgesamt konnten neutralisierende Antikörper nur in geringen Titerstufen nachgewiesen werden (Maximum 1:16) (Abbildung 10).

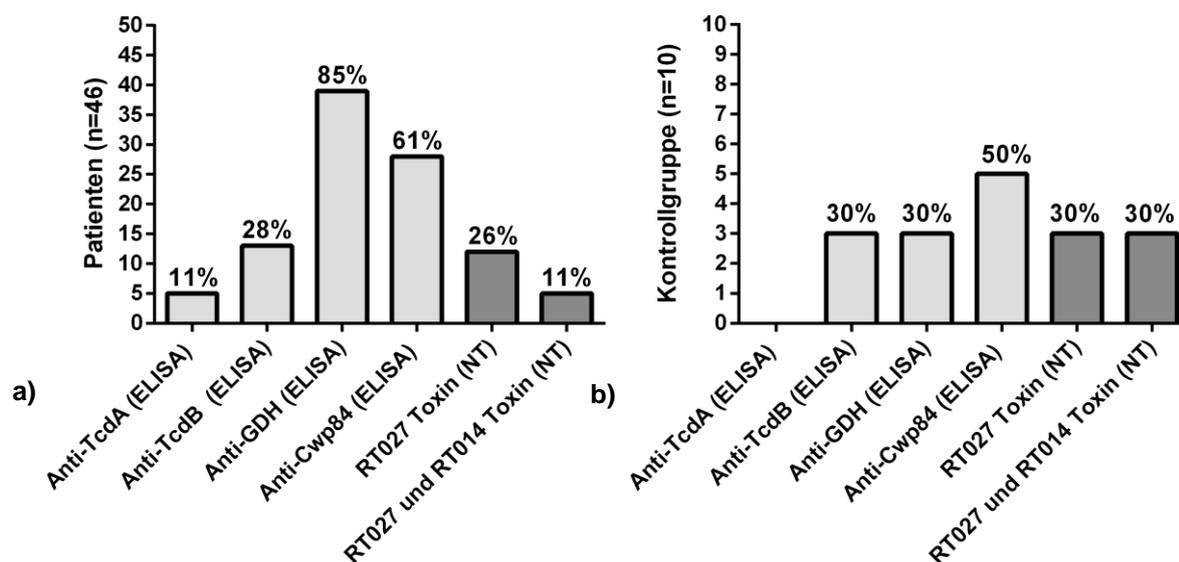


Abbildung 9: Antikörperprävalenz. Verteilung der Antikörperprävalenzen bei a) den Patienten und bei b) einer nicht an CDI erkrankten Vergleichsgruppe. Die antigenspezifischen Antikörper wurden mittels ELISA und die neutralisierenden Antikörper mittels Neutralisationstests (NT) ermittelt. Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

Die Antikörperprävalenz der gesunden Kontrollgruppe (n=10, medianes Alter 29, Range 21-62) war ebenfalls niedrig: Anti-TcdB (30%), Anti-GDH (30%), Anti-Cwp84 (50%). Anti-TcdA wurde bei den gesunden Probanden nicht nachgewiesen; bei 30% fanden sich neutralisierende Antikörper sowohl gegen RT027 als auch gegen RT014 (Abbildung 9).

Während des Krankenhausaufenthaltes wurden zudem die Auswirkungen der symptomatischen CDI auf die Antikörperbildung in Folgeproben (1, 3, 6 Tage nach der Diagnose) untersucht. In dieser frühen Krankheitsphase kam es zu keinem Anstieg der antigenspezifischen (ELISA) oder neutralisierenden (NT) Antikörper, sodass ein früher Booster-Effekt ausgeschlossen werden konnte. Der Antikörpernachweis blieb unabhängig, ob es sich um eine Primärinfektion oder ein Rezidiv handelte, und unabhängig der Schwere der Erkrankung unverändert (Abbildung 10, Tabellen 11-15).

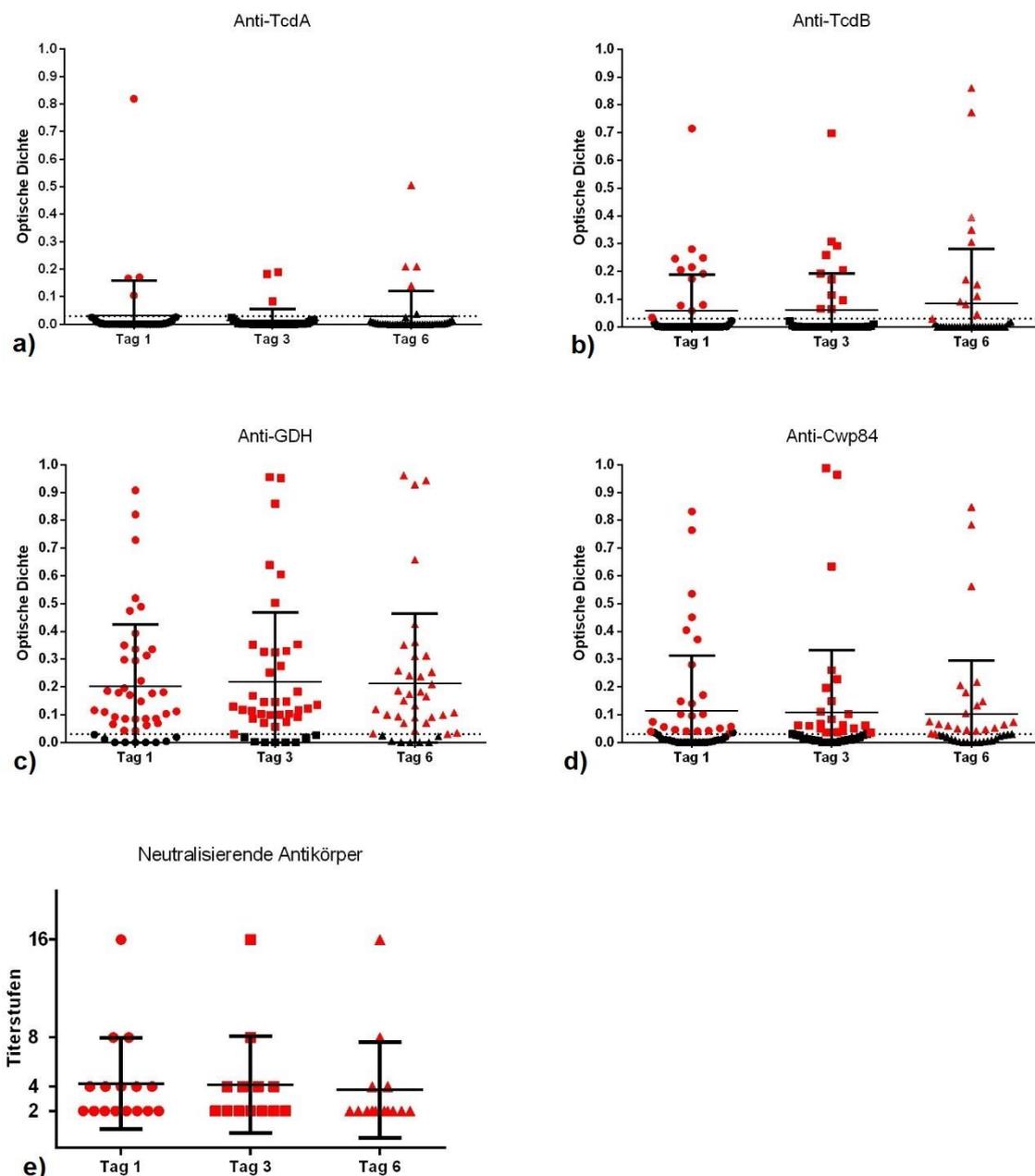


Abbildung 10: Quantitative Werte spezifischer *C. difficile*-Antikörper während der akuten Krankheitsphase. Plasmaproben wurden 1, 3 und 6 Tage nach der Diagnose CDI entnommen. a)-d) Anti-TcdA, Anti-TcdB, Anti-Cwp84 und Anti-GDH wurden mittels ELISA bestimmt. OD-Werte $\geq 0,03$ (gepunktete Linie) wurden als positiv gewertet (rot). e) Neutralisierende Antikörper gegen RT014 und/oder RT027 wurden mittels Neutralisationstest (NT) untersucht. Die Neutralisationstiter wurden durch serielle Verdünnungen bestimmt. Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

4.2.3 Vergleich zwischen ELISA- und neutralisierenden Antikörpern

Der Nachweis von Anti-TcdB (ELISA) korrelierte signifikant mit dem Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern gegen die Toxine RT027 ($p < 0,0001$) und RT014 ($p = 0,018$).

Die Toxine RT027 und RT014 wurden von zehn bzw. vier der Plasmaproben neutralisiert, die ebenfalls positiv für Anti-TcdB waren (Tabelle 6). In Abwesenheit einer Neutralisation waren 31 (RT027) bzw. 32 (RT014) Plasmaproben negativ für Anti-TcdB.

Keine Korrelation bestand zwischen dem Nachweis von Anti-TcdA, Anti-GDH, Anti-Cwp84 und dem Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern (Abbildung 11).

Tabelle 6: Direkter Vergleich zwischen dem Nachweis von Anti-TcdA bzw. Anti-TcdB und der Toxinneutralisation (RT014 und RT027). Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen Anti-TcdB und der Neutralisation von RT027-Toxinen (****, $p < 0,0001$) und der Neutralisation von RT014-Toxinen (*, $p = 0,018$) mit einem zellkulturbasierten Neutralisationstest (NT) festgestellt. Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

	NT positiv (RT027)	NT negativ (RT027)	NT positiv (RT014)	NT negativ (RT014)
Anti-TcdA positiv (ELISA)	3	2	1	4
Anti-TcdA negativ (ELISA)	9	32	4	37
Anti-TcdB positiv (ELISA)	10 ****	3	4 *	9
Anti-TcdB negativ (ELISA)	2	31	1	32

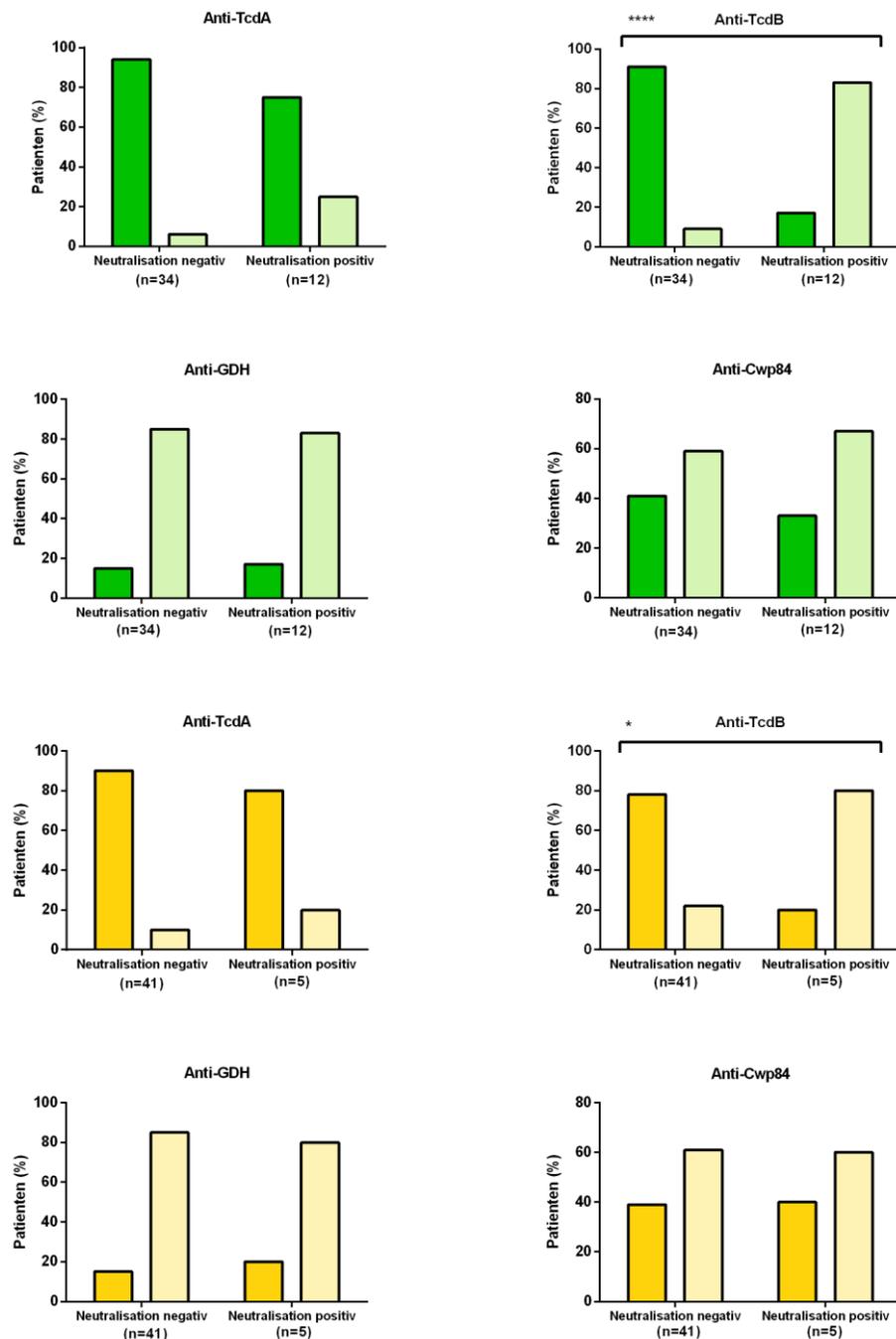


Abbildung 11: Korrelation zwischen antigenspezifischen (ELISA) und neutralisierenden Antikörpern (NT).

Die Balken stellen den prozentualen Anteil der Patienten mit neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern (x-Achse) und positiven (helle Farbe) und negativen (dunkle Farbe) ELISA-Antikörpern dar. Grüne Balken beziehen sich auf Untersuchungen mit dem konditionierten Medium RT027, gelbe auf Untersuchungen mit dem konditioniertem Medium RT014. Dunkelgrün oder dunkelgelb: ELISA-Antikörper negativ; hellgrün oder hellgelb: ELISA-Antikörper positiv. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen Anti-TcdB und neutralisierenden Antikörpern gegen RT027-Toxine (****, $p < 0,0001$) bzw. gegen RT014 -Toxine (*, $p = 0,018$) festgestellt. Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und in vergleichbarer Form bereits veröffentlicht⁹⁶.

4.2.4 Die Antikörper und der Krankheitsverlauf

Zwischen Krankheitsschwere, Therapieansprechen, den allgemeinen Patientenmerkmalen und den Komorbiditäten konnten keine signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden (Tabellen 9 und 10).

Keine Korrelation bestand zwischen dem Nachweis der ELISA- bzw. neutralisierenden Antikörper und den Patientenmerkmalen, der Schwere der Erkrankung, den Komorbiditäten oder dem Auftreten von Fieber (Tabellen 11-15). Darüber hinaus wurde auch kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein neutralisierender Antikörper und einem korrespondierenden RT festgestellt (Tabellen 16 und 17).

Ebenso zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Antikörpernachweis (zum Zeitpunkt der Rekrutierung) und dem Auftreten eines Rezidives (Tabellen 8 und 11-15).

Betrachtete man die Odds Ratio (OR) bestanden unwesentlich erhöhte Chancenverhältnisse trotz des Nachweises von Anti-TcdB bzw. von neutralisierenden Antikörpern zu erkranken (OR 1,7 bzw. OR 1,2).

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und dem GLDH-Antikörpernachweis.

Die Ergebnisse der Signifikanzberechnungen werden in den Tabellen 8-17 im Anhang (Kapitel 7) dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Wachstums- und Toxinkinetik

Ziel dieses Teils der Arbeit war, RT014 und RT027 in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten und ihre Toxinproduktion zu charakterisieren. RT010 diente hier als non-toxischer Kontrollstamm.

Für alle drei in anaerobem Milieu kultivierten RTs RT010, RT014 und RT027 zeigte sich eine Latenz- (Lag-), exponentielle (Log-) und stationäre Phase. Auffällig war die Beobachtung, dass die Medien aller drei RTs makroskopisch mit zunehmender Zeit aufklärten, korrelierend mit der Abnahme und später annähernd gleichbleibenden OD. Ein möglicher Erklärungsansatz scheint hier die zunehmende Sporenbildung über die Zeit zu sein¹¹⁴.

Entgegen der Ergebnisse älterer Studien^{114,117} zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein wesentlicher Unterschied im verzögerten Wachstum und der niedrigeren OD des RT027 im Vergleich zu RT010 und RT014. Binnen des Untersuchungszeitraumes blieb die OD für RT027 stetig unter denen der Vergleichsstämme; auch das Maximum lag mit 0,43 unter dem der anderen RTs (RT010: OD 0,5 und RT014: OD 0,56). Eine frühere und stärkere Sporulation könnte eine Erklärung für die Beobachtung sein, dass RT027 eine geringere Trübheit wie die Vergleichsstämme aufwies¹¹⁴.

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen^{114,117} zum Wachstumsverhalten könnte mit der Auswahl anderer Vergleichs-RTs und dem kürzer gewählten Beobachtungszeitfenster zu erklären sein.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Vohra et al.¹¹⁴ konnte mittels vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass die Kinetik des Wachstums nicht mit der Kinetik der Zytotoxizität (im Überstand) korreliert. Die Tatsache, dass in den meisten Untersuchungen zur Toxinproduktion und -kinetik die Toxinkonzentrationen gemessen und miteinander verglichen wurden, in vorliegender Arbeit jedoch die Zytotoxizität analysiert wurde, erschwert den Vergleich; dennoch weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine stärkere Zytotoxizität des RT027 hin, was frühere Erkenntnisse bestätigt^{114,117}.

RT014 erreichte nach 12 h zwar seinen Wachstumspeak, war in Bezug auf die Zytotoxizität der von RT027, welcher zum gleichen Untersuchungszeitpunkt erst in das exponentielle Wachstum übergang, aber unterlegen. Die 50%-Zytotoxizität von RT027 war hier bereits doppelt so hoch wie die von RT014. Nach 48 h entsprach sie sogar dem 170-fachen der von RT014. Im weiteren Verlauf nahm die Zytotoxizität für RT014 zwar stetig zu, erreichte die von RT027 jedoch nicht. Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse früherer Studien, die eine größere Toxinproduktion des RT027 und somit auch die Hypervirulenz im Vergleich zu Kontrollstämmen zeigten^{114,117}.

Zusammenfassend belegen die durchgeführten Untersuchungen neben dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten der RTs RT010, RT014 und RT027 eine fehlende Korrelation zwischen Wachstums- und Toxinkinetik. Im Einklang mit früheren Studien^{90,117} konnten ferner deutliche Hinweise auf eine größere Potenz der RT027-Toxine beobachtet werden, hier basierend auf der deutlich schnelleren Zunahme der Zytotoxizität. An dieser Stelle sei auf die eingeschränkte Beurteilbarkeit durch die Untersuchung nur eines Isolates pro RT hingewiesen. Für eine bessere Aussagekraft sollten zukünftig unterschiedliche Isolate pro RT sowie gleiche Versuchsabläufe mit mehreren endemischen und epidemischen RTs in Gegenüberstellung untersucht werden.

5.2 Spezifische Antikörper bei Patienten mit *C. difficile*-Infektion

Trotz der häufig zitierten Wichtigkeit von Antikörpern während einer CDI^{30,36,39,56,66,113,120} sind Studien zur natürlichen Immunantwort und das Verständnis hierüber begrenzt. Zudem sind weder kommerzielle standardisierte Assays für die Antikörperdiagnostik verfügbar, noch ist ihre Anwendung Gegenstand aktueller CDI-Leitlinien.

5.2.1 Antikörperprävalenz und Antikörperverlauf

Insgesamt fand sich nur eine niedrige Prävalenz für Toxin-Antikörper. Bei 11% (5/46) des Patientenkollektivs wurden Anti-TcdA und bei 28% (13/46) Anti-TcdB nachgewiesen.

Kelly et al.⁵⁶ fanden in der Akutphase ähnlich niedrige Seroprävalenzen für Toxin-Antikörper bei akut an CDI Erkrankten (ca. 38% Anti-TcdA und Anti-TcdB). Höhere Prävalenzen zeigten sich in Untersuchungen mit längerer Nachbeobachtungszeit. So fanden Eichel-Streiber et al.³⁰ im späteren Krankheitsstadium bei 52% der CDI-Patienten Anti-TcdA und bei 64% Anti-TcdB, während Bacon et al.⁴ bei 20% der Patienten Anti-TcdA und bei 60% Anti-TcdB nachwiesen.

Da die erste Antikörperbestimmung unserer Studie bereits am Tag der Diagnosestellung stattfand, kann sie zu diesem Zeitpunkt nicht als primäre Immunantwort auf das akute Entzündungsgeschehen gewertet werden, sondern scheint eher ein Maß für die Durchseuchung bzw. ein Ausdruck für das B-Zell-Gedächtnis früherer Infektionen zu sein. Unter diesem Aspekt ist der Vergleich mit gesunden Probanden interessant und auch hier zeigten sich nur niedrige Prävalenzen für Toxin-Antikörper. In Untersuchungen von Blutspendern konnten Eichel-Streiber et al.³⁰ bei 22,1% Anti-TcdA und bei 12,8 % Anti-TcdB nachweisen; Bacon et al.⁴ fanden bei 19,4% Anti-TcdA und bei 8,1% Anti-TcdB. Ein möglicher Erklärungsansatz für die niedrigere Prävalenz für Anti-TcdB im Vergleich zu unserer Untersuchung könnte in der Patientencharakteristik liegen. Die Blutspender waren jünger und gesund im Vergleich zu unserem im Mittel 69 Jahre alten und vorerkrankten Patientenkollektiv, welches in der Vorgeschichte zahlreiche Hospitalisierungen aufwies, die ein erhöhtes Besiedlungsrisiko in Bezug auf *C. difficile* mit sich bringen⁸¹.

Bei unserer gesunden, im Mittel 36-jährigen Kontrollgruppe zeigte sich mit 30% eine ähnliche Prävalenz für Anti-TcdB wie für die akut Erkrankten. Anti-TcdA wurde nicht nachgewiesen.

In der akuten Krankheitsphase blieb der Titer der Toxin-Antikörper stabil, sodass ein früher Booster-Effekt ausgeschlossen werden konnte. Ähnliche Beobachtungen machten Wullt et al.¹²⁰, die während ihrer Nachbeobachtungszeit von 40 Tagen keinen signifikanten Anstieg von Anti-TcdA und nur einen moderaten, wenn auch signifikanten, Anstieg von Anti-TcdB zeigten. Kyne et al.⁶⁶ konnten für Patienten mit einer einmaligen Krankheitsepisode einen Anstieg der IgG-Antikörper gegen Toxin A zwischen dem neunten und zwölften Tag nachweisen, entgegen des stabilen Titerverlaufes bei Patienten mit rekurrenter Infektion. Unterschiede in der Antikörperreaktion könnten hier mit einem längeren Beobachtungszeitraum zusammenhängen, der auch einen späteren Antikörperanstieg abbildet.

Die höchste Seroprävalenz zeigte sich für Anti-GDH. Diese Antikörper fanden sich bei 85% unseres Patientenkollektives. Obgleich GDH sehr früh im Krankheitsbeginn sezerniert wird und auch nachgewiesen werden kann³⁷, ist die Prävalenz der Antikörper gegen dieses Enzym in einem solch frühen Krankheitsstadium ebenfalls Ausdruck eines früheren Erregerkontaktes. Studien belegen, dass eine Kolonisierung mit *C. difficile* bei bis zu 26% hospitalisierter Patienten zu finden ist⁸¹. Die hier höhere Nachweisrate könnte mit den häufigen Krankenhausaufenthalten der einzelnen Patienten erklärbar sein. In unserem Patientenkollektiv gaben 65% (30/46) an, in den letzten drei Monaten bereits in einem Krankenhaus behandelt worden zu sein. Von den übrigen zehn Patienten litten sechs unter schweren Komorbiditäten, die einen engen Kontakt zum Gesundheitswesen notwendig machten. Nicht auszuschließen ist darüber hinaus eine Kreuzreaktion mit anderen Clostridienspezies (z.B. *C. clostridioforme*).

Entgegen der Datenlage, die bei Gesunden und Asymptomatischen von einer Kolonisierungsrate von < 2% ausgeht⁸¹, war mit einer Prävalenz von 30% auch in der gesunden Kontrollgruppe eine höhere Nachweisrate für Anti-GDH zu verzeichnen. Diese könnte ebenfalls mit der Exposition zu dem Gesundheitswesen erklärbar sein, in dem über 50% der untersuchten gesunden Probanden tätig waren.

Bedenkt man jedoch, dass GDH ein gemeinsames Antigen aller *C. difficile*-Stämme ist, unabhängig, ob non-toxigen oder toxigen, und dass alle Menschen seit ihrer frühen Kindheit

regelmäßig mit diesem Erreger in Kontakt kommen^{53,54,100}, erscheinen sowohl unsere als auch die bisher publizierten Seroprävalenzen für Anti-GDH gering.

Diese Beobachtung könnte als ein Effekt der intestinalen Immuntoleranz mit geringer Sensibilisierung der B-Zellen für dieses reichlich vorhandene bakterielle Antigen interpretiert werden. Folglich bildet der Körper trotz des regelmäßigen Erregerkontaktes keine ausreichende Immunantwort aus. In Anbetracht dieser Hypothese muss ebenso angemerkt werden, dass sich GDH trotz der Eigenschaft, ein gemeinsames Antigen aller *C. difficile*-Stämme zu sein, als Marker für die allgemeine Seroprävalenz nicht anbietet.

Bislang gibt es keine Untersuchungen bezüglich der Dynamik von Anti-GDH während der akuten Erkrankung. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht und auch hier war der Titer über den Beobachtungszeitraum nahezu gleichbleibend.

Wegen der immunogenen Eigenschaften^{88,89} und hieraus abzuleitender möglicher Targets von Impfungen wurden in der Vergangenheit neben Toxinen auch Toxin-unabhängige Antigene diskutiert; doch Studien zur Immunantwort auf diese sind limitiert. In einer der wenigen Arbeiten zu diesem Thema untersuchten Péchiné et al.⁸⁹ die immunologische Antwort auf Oberflächenantigene wie beispielsweise Cwp84. Mit einem Anti-Cwp84-Nachweis bei 15 von 17 CDI-Patienten kommt die Prävalenz dieser Studie der unseren für die kranke und gesunde Kohorte nahe. Ebenso zeigte sich übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ein stabiler Antikörperverslauf für Anti-Cwp84⁸⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 26% der Patienten neutralisierende Antikörper gegen RT027-Toxine und bei 11% gegen RT014- und RT027-Toxine nachgewiesen. Eine alleinige Neutralisation von RT14-Toxinen fand sich nicht. Zur Prävalenz neutralisierender Antikörper ist nur sehr wenig bekannt. So gibt es nach unserem Kenntnisstand nur eine historische Studie von Viscidi et al¹¹³ aus dem Jahr 1983, die das Vorkommen dieser Antikörper untersuchte¹¹³ und mit einer Gesamtprävalenz neutralisierender Antikörper von 22 % (gegen Toxin B) bzw. von 9% (gegen Toxin A) vergleichbare Ergebnisse zu unseren Daten zeigte.

Ebenso niedrige Seroprävalenzen fanden sich bei unserer gesunden Kontrollgruppe mit 30%. Diese Ergebnisse spiegeln Beobachtungen aktueller Impfstudien wieder, die ebenfalls niedrige Prävalenzen und Titerhöhen neutralisierender Antikörper bei Gesunden nachwiesen⁶⁰.

Die Titer der neutralisierenden Antikörper blieben während des Beobachtungszeitraumes stabil.

Obgleich nicht sicher auszuschließen ist, dass eine verzögerte Stimulation der B-Zell-Antwort zu einem späteren Zeitpunkt der CDI stattfinden könnte, wären niedrige oder fehlende Antikörper- bzw. Neutralisationstiter zu Beginn der Erkrankung in Kombination mit einer fehlenden Dynamik der Antikörperreaktion während der frühen Phase der CDI ein möglicher Erklärungsansatz, warum Antikörper gegen *C. difficile* und seine Toxine den akuten klinischen Verlauf der CDI nicht beeinflussen^{30,56}.

Zusammenfassend waren sowohl Prävalenzen als auch Titer der Toxin-abhängigen und neutralisierenden Antikörper gering. Unter der Annahme, dass die Antikörperproduktion für *C. difficile* in der Kindheit stimuliert und im Erwachsenenalter durch regelmäßigen Erregerkontakt oder Kreuzreaktionen aufrecht erhalten wird^{53,54,100}, ist dies eine ganz wesentliche Erkenntnis der Arbeit; denn sie lässt darauf schließen, dass eine lokale Besiedlung des Darmtraktes bzw. eine lokale Infektionen mit *C. difficile* nicht geeignet ist, hohe Antikörpertiter zu erzeugen und einen systemischen Schutz entstehen zu lassen. Hierfür wären folglich andere Immunstrategien (z.B. Impfungen) nötig, die erhöhte neutralisierende Antikörpertiter erzielen können und somit einen ausreichenden Schutz bewirken. Gegenwärtig wird in klinischen Studien der Phase-3 der Schutz vor CDI durch hochtitrige neutralisierende Antikörper nach Anwendung von Toxoidimpfstoffen untersucht.

5.2.2 Vergleich zwischen ELISA- und neutralisierenden Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein positiver ELISA-Wert für Anti-TcdB eng mit dem Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern gegen die Toxine der RTs RT014 und RT027 korreliert (Fisher's Exact Test: RT027 $p = < 0,0001$ bzw. RT014 $p = 0,018$).

Nach unserem Kenntnisstand gibt es nur eine länger zurückliegende Studie aus dem Jahr 1983, die die Ergebnisse der ELISA-Untersuchung mit denen des Neutralisationstests klar gegenüberstellt¹¹³. Auch hier konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten neutralisierender Antikörper und Anti-TcdB nachgewiesen werden. Entgegen unserer

Ergebnisse fand sich jedoch auch ein Zusammenhang zwischen neutralisierenden Antikörpern und Anti-TcdA, obgleich dieser gering ausfiel. Diese Beobachtung könnte durch Kreuzreaktivitäten von damals verwendeten Antigenpräparaten erklärbar sein, während für unsere Studie hochgereinigte Toxine (TcdA, TcdB) zur Verfügung standen.

Bei zwölf von 46 Patienten fanden sich neutralisierende Antikörper gegen RT027-Toxine (konditioniertes Medium). Hiervon konnte man bei fünf Patienten zusätzlich neutralisierende Antikörper gegen RT014-Toxine (konditioniertes Medium) nachweisen. Eine Neutralisation allein gegen RT014-Toxine fand sich interessanterweise nicht.

In vergangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Unterschiede zwischen Toxinen verschiedener Ribotypen bestehen und toxigene *C. difficile*-Stämme sowohl konservierte als auch stammspezifische neutralisierende TcdB-Epitope exprimieren⁴².

Antikörper gegen konservierte Epitope können folglich potenziell TcdB verschiedener Ribotypen binden und neutralisieren. Dies scheint ein möglicher Erklärungsansatz für die Beobachtung zu sein, dass fünf Patienten neutralisierende Antikörper sowohl gegen RT014-, als auch RT027-Toxine aufwiesen. Demgegenüber wären Antikörper gegen Epitope in variablen Regionen lediglich im Stande, Toxine nur bestimmter Stämme zu neutralisieren.

Zukünftige Studien sind daher erforderlich, um zwischen konservierten und variablen, stammspezifischen neutralisierenden Epitopen für die TcdB-Neutralisierung zu unterscheiden.

5.2.3 Die Antikörper und der Krankheitsverlauf

Im Konsens mit vorangegangenen Studien^{30,56} konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Toxin-Antikörpern und der Krankheitsschwere bzw. dem akuten Krankheitsverlauf beobachtet werden.

Hohe Rezidivraten wurden sowohl bei Anti-TcdB-positiven (38%) als auch bei Patienten mit neutralisierenden Antikörpern (25%) festgestellt und auch eine aktuelle Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Anti-TcdB und dem Rezidenzrisiko belegen³⁶. Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen, die auf die Bedeutung von Anti-TcdB für das Risiko einer rekurrenten Infektion hinweisen^{39,56,68}.

Mutmaßlich tragen nur ausreichend hohe Anti-TcdB-Titer zur Verhinderung eines CDI-Rezidivs bei⁵⁶. Diese Hypothese scheint insbesondere durch die erfolgreiche passive Immunisierung mit monoklonalem Anti-TcdB (Bezlotoxumab) bestärkt¹¹⁹.

In unserer Follow-up-Untersuchung entwickelten 19% der Patienten (6/31) ein Rezidiv. Von diesen sechs Patienten konnte man bei fünf initial keine neutralisierenden Antikörper nachweisen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Ausbilden neutralisierender Antikörper Rezidiven entgegenwirken könnte. Dennoch sollte diese Beobachtung umfangreicher untersucht werden, da aufgrund der begrenzten Patientenzahl hierzu keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und dem GLDH-Antikörpernachweis. Hierbei wird von einer zufälligen Beobachtung ausgegangen.

5.2.4 Limitationen

Die vorliegende Studie hat einige Limitationen. Es handelt sich um eine explorative unizentrische Studie mit einer kleinen Patienten- und Kontrollkohorte. Ferner ist ein „Lost to follow-up“ von ca. 30% der initial eingeschlossenen Patienten zu verzeichnen. Dies ist mutmaßlich bei fast allen Studien mit *C. difficile*, die sich mit einer älteren und multimorbiden Kohorte befassen, kaum zu vermeiden, könnte aber durch größere, prospektive multizentrische Studien ausgeglichen werden.

Frühe Booster-Effekte nach CDI waren für keinen der untersuchten *C. difficile*-Antikörper nachweisbar. Allerdings kann eine spätere Antikörperantwort nicht ausgeschlossen werden, da Proben zu späteren Zeitpunkten im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Auch dies sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Es wurden Gesamt-Antikörper untersucht. Für ein optimales Verständnis des Immungeschehens ist eine Differenzierung der Antikörperklassen sinnvoll. Nahezu unbekannt ist ferner die Bedeutung der Schleimhautimmunität (lokales IgA), die bislang kaum untersucht wurde.

Zur Differenzierung von konservierten und nicht-konservierten Epitopen sollten neutralisierende Antikörper auch gegen konditionierte Medien anderer endemischer und epidemischer Ribotypen (z. B. RT001) getestet werden. Ebenso sollten pro RT mehrere Isolate untersucht werden.

5.2.5. Zusammenfassender Ausblick

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende wichtige Erkenntnisse bezüglich der humoralen Immunantwort während einer akuten CDI gewonnen:

- I. Insgesamt war die Prävalenz und die Titerhöhe von Toxin-Antikörpern und neutralisierenden Antikörpern gering. Booster-Effekte mit Serokonversion waren in der Akutphase der CDI für keinen spezifischen Antikörper erkennbar.
- II. Der Antikörpernachweis stand nicht in Zusammenhang mit Patientenmerkmalen, Symptomen oder der Schwere der Erkrankung.
- III. Zudem konnte eine klare und enge Korrelation zwischen Anti-TcdB und den neutralisierenden Antikörpern gezeigt werden, was die Annahme bestärkt, dass Anti-TcdB die funktionell relevanten Antikörper zu sein scheinen.
- IV. Es wurden außerdem Proben mit breiter und mit stammbeschränkter Neutralisierungskapazität gefunden, was auf unterschiedliche neutralisierende Epitope zurückzuführen sein könnte.
- V. In Vorversuchen konnte zudem eine erhöhte Zytotoxizität von RT027 trotz verzögertem Wachstum im Vergleich zu RT014 belegt werden.

Die Wichtigkeit und Bedeutung der natürlichen Antikörperantwort während einer CDI wird häufig zitiert und ist doch in ihrer Gänze nicht verstanden. Der Einfluss der natürlichen Immunantwort auf das Krankheitsgeschehen der CDI wurde bisher experimentell nicht ausreichend belegt und aktuelle klinische Daten und Studien^{30,36,39,56,66,113,120} bieten ein breites Interpretations- und Ergebnisspektrum.

Niedrige Prävalenzen und Antikörpertiter trotz wiederholtem Erregerkontakt seit dem Säuglingsalter sprechen für eine Immuntoleranz, die eine systemische und schützende Antikörperantwort nicht entstehen lässt. Dies bedeutet, dass für neue präventive Immunisierungsstrategien andere Ansätze erforderlich sein werden, um hohe neutralisierende Antikörperspiegel mit entsprechender Schutzwirkung zu erzielen. Die passive Immunisierung mit Bezlotoxumab und aktive Immunisierung mit Toxoid-Impfstoffen stellen hierbei vielversprechende präventive Konzepte dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Abougergi MS, Broor A, Cui W, Jaar BG. 2010. Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis: an observational study and review of the literature. *J Hosp Med* 5:E1-9.
2. Anton PM, Gay J, Mykoniatis A, Pan A, O'Brien M, Brown D, Karalis K, Pothoulakis C. 2004. Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in *Clostridium difficile* toxin A-mediated intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8503–8508.
3. Asensio A, Vaque-Rafart J, Calbo-Torrecillas F, Gestal-Otero JJ, López-Fernández F, Trilla-Garcia A, Canton R, EPINE Working Group. 2008. Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999-2007. *Euro Surveill* 13.
4. Bacon AE, Fekety R. 1994. Immunoglobulin G directed against toxins A and B of *Clostridium difficile* in the general population and patients with antibiotic-associated diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 18:205–209.
5. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. 1977. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* 136:701–705.
6. Bauer MP, Nibbering PH, Poxton IR, Kuijper EJ, Dissel JT van. 2014. Humoral immune response as predictor of recurrence in *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 20:1323–1328.
7. Bauer MP, Notermans DW, Benthem BH van, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, Dissel JT van, Kuijper EJ. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet* 377:63–73.
8. Bertolo L, Boncheff AG, Ma Z, Chen Y-H, Wakeford T, Friendship RM, Rosseau J, Weese JS, Chu M, Mallozzi M, et al. 2012. *Clostridium difficile* carbohydrates: glucan in spores, PSII common antigen in cells, immunogenicity of PSII in swine and synthesis of a dual *C. difficile*–ETEC conjugate vaccine. *Carbohydrate Research* 354:79–86.
9. Bézay N, Ayad A, Dubischar K, Firbas C, Hochreiter R, Kiermayr S, Kiss I, Pinl F, Jilma B, Westritschnig K. 2016. Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. *Vaccine* 34:2585–2592.
10. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 175:261–266.

11. Blanchi J, Goret J, Mégraud F. 2016. *Clostridium difficile* Infection: A Model for Disruption of the Gut Microbiota Equilibrium. *Dig Dis* 34:217–220.
12. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, Stollman N, Rohlke F, Surawicz C. 2012. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 107:1079–1087.
13. Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Laboisie CL. 1997. Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 112:1887–1894.
14. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, Eichel-Streiber C von. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181:29–38.
15. Burckhardt F, Friedrich A, Beier D, Eckmanns T. 2008. *Clostridium difficile* surveillance trends, Saxony, Germany. *Emerging Infect Dis* 14:691–692.
16. Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF. 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 70:5770–5778.
17. Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI. 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol* 189:7290–7301.
18. Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, Pasha A, Nikulasson S, Carraway RE, Pothoulakis C. 1999. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 103:843–849.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54:1201–1205.
20. Collins LE, Lynch M, Marszalowska I, Kristek M, Rochfort K, O'Connell M, Windle H, Kelleher D, Loscher CE. 2014. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect* 16:391–400.
21. Commissioner O of the. 2019. Fecal Microbiota for Transplantation: Safety Communication- Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms. FDA.
22. Cózar-Llistó A, Ramos-Martinez A, Cobo J. 2016. *Clostridium difficile* Infection in Special High-Risk Populations. *Infect Dis Ther* 5:253–269.
23. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. 2016. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 22:S63–S81.
24. Dial S, Delaney J a. C, Barkun AN, Suissa S. 2005. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* 294:2989–2995.

25. Dingle KE, Didelot X, Quan TP, Eyre DW, Stoesser N, Golubchik T, Harding RM, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, et al. 2017. Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *Lancet Infect Dis* 17:411–421.
26. Dissel JT van, Groot N de, Hensgens CM, Numan S, Kuijper EJ, Veldkamp P, Wout J van 't. 2005. Bovine antibody-enriched whey to aid in the prevention of a relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: preclinical and preliminary clinical data. *J Med Microbiol* 54:197–205.
27. Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP. 2004. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:237–242.
28. Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP. 2004. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:237–242.
29. Drudy D, Fanning S, Kyne L. 2007. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis* 11:5–10.
30. Eichel-Streiber A von, Paik W, Knight K, Gisch K, Nadjafi K, Decker C, Bosnjak O, Cheknis A, Johnson S, Eichel-Streiber C von. 2016. Induction of antitoxin responses in *Clostridium-difficile*-infected patients compared to healthy blood donors. *Anaerobe* 41:91–103.
31. Eidhin DN, Ryan AW, Doyle RM, Walsh JB, Kelleher D. 2006. Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 55:69–83.
32. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes* 5:15–27.
33. Giannasca PJ, Zhang ZX, Lei WD, Boden JA, Giel MA, Monath TP, Thomas WD. 1999. Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. *Infect Immun* 67:527–538.
34. Giel JL, Sorg JA, Sonenshein AL, Zhu J. 2010. Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*. *PLoS ONE* 5:e8740.
35. Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K. 2008. Human alpha-defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B. *Gastroenterology* 134:2049–2058.
36. Gilbert J, Leslie J, Putler R, Weiner S, Standke A, Penkevich A, Keidan M, Young VB, Rao K. 2021. Anti-toxin antibody is not associated with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 67:102299.
37. Girinathan BP, Braun SE, Govind R. 2014. *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H₂O₂. *Microbiology*, 160:47–55.
38. Gstraunthaler G, Lindl T. 2013. Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

39. Gupta SB, Mehta V, Dubberke ER, Zhao X, Dorr MB, Guris D, Molrine D, Leney M, Miller M, Dupin M, Mast TC. 2016. Antibodies to Toxin B Are Protective Against *Clostridium difficile* Infection Recurrence. *Clin Infect Dis* 63:730–734.
40. Hall IC, O'toole E. 1935. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 49:390–402.
41. Hensgens MPM, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. 2012. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 67:742–748.
42. Hernandez LD, Racine F, Xiao L, DiNunzio E, Hairston N, Sheth PR, Murgolo NJ, Therien AG. 2015. Broad coverage of genetically diverse strains of *Clostridium difficile* by Actoxumab and Bezlotoxumab predicted by in vitro neutralization and epitope modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1052–1060. 4
43. Hing TC, Ho S, Shih DQ, Ichikawa R, Cheng M, Chen J, Chen X, Law I, Najarian R, Kelly CP, et al. 2013. The antimicrobial peptide cathelicidin modulates *Clostridium difficile*-associated colitis and toxin A-mediated enteritis in mice. *Gut* 62:1295–1305.
44. Islam J, Taylor AL, Rao K, Huffnagle G, Young VB, Rajkumar C, Cohen J, Papatheodorou P, Aronoff DM, Llewelyn MJ. 2014. The role of the humoral immune response to *Clostridium difficile* toxins A and B in susceptibility to *C. difficile* infection: a case-control study. *Anaerobe* 27:82–86.
45. Jank T, Aktories K. 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol* 16:222–229.
46. Jank T, Giesemann T, Aktories K. 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology* 17:15R-22R.
47. Janoir C. 2016. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37:13–24.
48. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. 2011. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun* 79:1498–1503.
49. Jefferson KK, Smith MF, Bobak DA. 1999. Roles of intracellular calcium and NF-kappa B in the *Clostridium difficile* toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol* 163:5183–5191.
50. Johnson S, Gerding DN. 2019. Bezlotoxumab. *Clin Infect Dis* 68:699–704.
51. Kao D, Roach B, Silva M, Beck P, Rioux K, Kaplan GG, Chang H-J, Coward S, Goodman KJ, Xu H, et al. 2017. Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *JAMA* 318:1985–1993.
52. Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, LaMont JT, Pothoulakis C. 1994. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest* 93:1257–1265.

53. Kelly CP, Pothoulakis C, Orellana J, LaMont JT. 1992. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology* 102:35–40.
54. Kelly CP, Kyne L. 2011. The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 60:1070–1079.
55. Kelly CP, LaMont JT. 2008. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med* 359:1932–1940.
56. Kelly CP, Poxton IR, Shen J, Wilcox MH, Gerding DN, Zhao X, Laterza OF, Railkar R, Guris D, Dorr MB. 2019. Effect of Endogenous *Clostridioides difficile* Toxin Antibodies on Recurrence of *C. difficile* Infection. *Clin Infect Dis*.
57. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR. 2012. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 107:89–95.
58. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. 2008. Epidemiological Features of *Clostridium difficile*-Associated Disease Among Inpatients at Children's Hospitals in the United States, 2001–2006. *Pediatrics* 122:1266–1270.
59. Kink JA, Williams JA. 1998. Antibodies to Recombinant *Clostridium difficile* Toxins A and B Are an Effective Treatment and Prevent Relapse of *C. difficile*-Associated Disease in a Hamster Model of Infection. *Infect Immun* 66:2018–2025.
60. Kitchin N, Remich SA, Peterson J, Peng Y, Gruber WC, Jansen KU, Pride MW, Anderson AS, Knirsch C, Webber C. 2020. A Phase 2 Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Two 3-Dose Regimens of a *Clostridium difficile* Vaccine in Healthy US Adults Aged 65 to 85 Years. *Clin Infect Dis* 70:1–10.
61. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. 2010. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467:711–713.
62. Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP. 2014. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis* 209:83–86.
63. Kufel WD, Devanathan AS, Marx AH, Weber DJ, Daniels LM. 2017. Bezlotoxumab: A Novel Agent for the Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Pharmacotherapy*.
64. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. 2012. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107:1011–1019.
65. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2000. Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *New England Journal of Medicine* 342:390–397.

66. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *The Lancet* 357:189–193.
67. Lamontagne F, Labbé A-C, Haeck O, Lesur O, Lalancette M, Patino C, Leblanc M, Laverdière M, Pépin J. 2007. Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant *Clostridium difficile* colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain. *Ann Surg* 245:267–272.
68. Leav BA, Blair B, Leney M, Knauber M, Reilly C, Lowy I, Gerding DN, Kelly CP, Katchar K, Baxter R, et al. 2010. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). *Vaccine* 28:965–969.
69. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, et al. 2015. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States.
70. Leuzzi R, Spencer J, Buckley A, Brettoni C, Martinelli M, Tulli L, Marchi S, Luzzi E, Irvine J, Candlish D, et al. 2013. Protective Efficacy Induced by Recombinant *Clostridium difficile* Toxin Fragments. *Infection and Immunity* 81:2851–2860.
71. Linevsky JK, Pothoulakis C, Keates S, Warny M, Keates AC, Lamont JT, Kelly CP. 1997. IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. *Am J Physiol* 273:G1333-1340.
72. Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, et al. 2011. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med* 365:1693–1703.
73. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault A-M, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, et al. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353:2442–2449.
74. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas WD, Leney M, Sloan S, et al. 2010. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362:197–205.
75. Lübbert C, John E, Müller L von. 2014. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 111:723–731.
76. Lübbert C, Zimmermann L, Borchert J, Hörner B, Mutters R, Rodloff AC. 2016. Epidemiology and Recurrence Rates of *Clostridium difficile* Infections in Germany: A Secondary Data Analysis. *Infect Dis Ther* 5:545–554.
77. Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 47:349–352.
78. Lyerly DM, Johnson JL, Frey SM, Wilkins TD. 1990. Vaccination against lethal *Clostridium difficile* enterocolitis with a nontoxic recombinant peptide of toxin A. *Current Microbiology* 21:29–32.

79. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, et al. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458:1176–1179.
80. Madan R, Petri WA. 2012. Immune responses to *Clostridium difficile* infection. *Trends Mol Med* 18:658–666.
81. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C, et al. 2018. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66:e1–e48.
82. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433–2441.
83. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. 2006. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging Infect Dis* 12:409–415.
84. McPherson S, Rees CJ, Ellis R, Soo S, Panter SJ. 2006. Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Dis Colon Rectum* 49:640–645.
85. Mitchell TJ, Ketley JM, Haslam SC, Stephen J, Burdon DW, Candy DC, Daniel R. 1986. Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut* 27:78–85.
86. Napolitano LM, Edmiston CE. 2017. *Clostridium difficile* disease: Diagnosis, pathogenesis, and treatment update. *Surgery* 162:325–348.
87. Orth P, Xiao L, Hernandez LD, Reichert P, Sheth PR, Beaumont M, Yang X, Murgolo N, Ermakov G, DiNunzio E, et al. 2014. Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by X-ray crystallography. *J Biol Chem* 289:18008–18021.
88. Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, Collignon A. 2005. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 54:193–196.
89. Péchiné S, Janoir C, Collignon A. 2005. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol* 43:5018–5025.
90. Peng Z, Addisu A, Alrabaa S, Sun X. 2017. Antibiotic Resistance and Toxin Production of *Clostridium difficile* Isolates from the Hospitalized Patients in a Large Hospital in Florida. *Front Microbiol* 8.
91. Phatharacharukul P, Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Edmonds PJ, Mahaparn P, Bruminhent J. 2015. The Risks of Incident and Recurrent *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Chronic Kidney Disease and End-Stage Kidney Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci* 60:2913–2922.

92. Prehn J van, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, Krutova M, Norén T, Allerberger F, Coia J, et al. 2021. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clinical Microbiology and Infection* 27:S1–S21.
93. Pruitt RN, Lacy DB. 2012. Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Front Cell Infect Microbiol* 2.
94. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47:241–259.
95. Riva L de la, Willing SE, Tate EW, Fairweather NF. 2011. Roles of Cysteine Proteases Cwp84 and Cwp13 in Biogenesis of the Cell Wall of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 193:3276–3285.
96. Roth S, Jung P, Boone J, Mellmann A, Nimmesgern A, Becker SL, Berger FK, Müller L von. 2022. Antigen-Specific vs. Neutralizing Antibodies Against Conditioned Media of Patients With *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Exploratory Study. *Front. Microbiol.* 13:859037
97. Roupheal NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, Lewis F, Polgreen PM, Beekmann S, Guarner J, Killgore GE, Coffman B, Campbell J, et al. 2008. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 198:635.e1–6.
98. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:526–536.
99. Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, Dowling JK, Draper E, O'Reilly V, McCarthy C, et al. 2011. A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog* 7:e1002076.
100. Sánchez-Hurtado K, Corretge M, Mutlu E, McIlhagger R, Starr JM, Poxton IR. 2008. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J Med Microbiol* 57:717–724.
101. Savidge TC, Urvil P, Oezguen N, Ali K, Choudhury A, Acharya V, Pinchuk I, Torres AG, English RD, Wiktorowicz JE, et al. 2011. Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nat Med* 17:1136–1141.
102. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, Ham M van, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K. 2009. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 5:e1000626.
103. Shah N, Shaaban H, Spira R, Slim J, Boghossian J. 2014. Intravenous immunoglobulin in the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis. *J Glob Infect Dis* 6:82–85.
104. Sheldon E, Kitchin N, Peng Y, Eiden J, Gruber W, Johnson E, Jansen KU, Pride MW, Pedneault L. 2016. A phase 1, placebo-controlled, randomized study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a *Clostridium difficile* vaccine administered with or without aluminum hydroxide in healthy adults. *Vaccine* 34:2082–2091.

105. Shue YK, Sears PS, Shangle S, Walsh RB, Lee C, Gorbach SL, Okumu F, Preston RA. 2008. Safety, tolerance, and pharmacokinetic studies of OPT-80 in healthy volunteers following single and multiple oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1391–1395.
106. Slimings C, Riley TV. 2014. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 69:881–891.
107. Solbach P, Dersch P, Bachmann O. 2017. [Individualized treatment strategies for *Clostridium difficile* infections]. *Internist (Berl)* 58:675–681.
108. Solomon K. 2013. The host immune response to *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis* 1:19–35.
109. Stevens AM, Esposito DH, Stoney RJ, Hamer DH, Flores-Figueroa J, Bottieau E, Connor BA, Gkrania-Klotsas E, Goorhuis A, Hynes NA, et al. 2017. *Clostridium difficile* infection in returning travellers. *J Travel Med* 24.
110. Sun X, Hirota SA. 2015. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol* 63:193–202.
111. Theriot CM, Young VB. 2015. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annual Review of Microbiology* 69:445–461.
112. Tleyjeh IM, Bin Abdulhak AA, Riaz M, Alasmari FA, Garbati MA, AlGhamdi M, Khan AR, Al Tannir M, Erwin PJ, Ibrahim T, et al. 2012. Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection: a contemporary systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 7:e50836.
113. Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, Bartlett JG. 1983. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 148:93–100.
114. Vohra P, Poxton IR. 2011. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 157:1343–1353.
115. Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP. 2000. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 105:1147–1156.
116. Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M. 1994. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* 62:384–389.
117. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366:1079–1084.
118. Weiss K. 2009. Toxin-binding treatment for *Clostridium difficile*: a review including reports of studies with tolevamer. *Int J Antimicrob Agents* 33:4–7.

119. Wilcox M, Dorr M-B, Pedley A. 2017. Bezlotoxumab and Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 376:1594–1596.
120. Wullt M, Norén T, Ljungh Å, Åkerlund T. 2012. IgG Antibody Response to Toxins A and B in Patients with *Clostridium difficile* Infection. *Clin Vaccine Immunol* 19:1552–1554.
121. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y. 2013. *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci* 92:211–217.
122. Hygienemaßnahmen bei *Clostridioides difficile*-Infektion (CDI). 2019. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 62.
123. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - *Clostridium difficile*.

7 Anhang

7.1 Statistische Berechnungen

Tabelle 7: Wachstumskinetik von klinischen Isolaten der RTs RT010, RT014, RT027 im Vergleich. Übersicht der signifikanten Unterschiede der ODs von RT010, RT014 und RT027. Berechnung mittels parametrischem T-Test.

	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
RT010 vs. RT014	ns	0,008	0,0163	0,0022	0,0071	ns	ns
RT010 vs. RT027	ns	< 0,0001	< 0,0001	ns	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
RT014 vs. RT027	ns	< 0,0001	< 0,0001	ns	0,0007	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 8: Korrelation zwischen der Antikörperprävalenz und dem Auftreten eines Rezidivs (Follow up). Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

Antikörper	p-Wert
Anti-TcdA	0,49
Anti-TcdB	0,63
Anti-GDH	1
Anti-Cwp84	0,65
neutralisierende Antikörper	1

Tabelle 9: Korrelation zwischen Patientencharakteristik und Schwere der CDI. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Schwere der Erkrankung		
		leicht	mittel - schwer	p-Wert
Geschlecht	m	11	13	1
	w	10	12	
Alter	< 65	10	11	1
	> 65	11	14	
Therapieansprechen	< 72h	8	11	0,3
	> 72h	4	14	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	10	11	1
	nein	11	14	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	21	25	
Immunsuppression	ja	4	4	1
	nein	17	21	
Leberinsuffizienz	ja	0	2	0,4928
	nein	21	23	
Niereninsuffizienz	ja	4	9	0,3251
	nein	17	16	
chronische Lungenerkrankung	ja	5	3	0,4390
	nein	16	22	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	7	11	0,4705
	> 72h	4	14	

Tabelle 10: Korrelation zwischen Patientencharakteristik und Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Therapieansprechen		
		< 72h	> 72h	p-Wert
Geschlecht	m	10	10	1
	w	8	8	
Alter	< 65	8	7	1
	> 65	10	11	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	9	9	1
	nein	9	9	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	18	18	
Immunsuppression	ja	3	3	1
	nein	11	15	
Leberinsuffizienz	ja	0	2	0,4857
	nein	18	16	
Niereninsuffizienz	ja	4	6	0,7112
	nein	14	12	
chronische Lungenerkrankung	ja	3	2	1
	nein	15	16	

Tabelle 11: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-TcdA und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Anti-TcdA		
		positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	4	20	0,3488
	w	1	21	
Alter	< 65	1	20	0,3566
	> 65	4	21	
Klinische Angaben				
Schwere der Erkrankung	leicht	2	19	1
	mittel-schwer	3	22	
Fieber	ja	0	5	1
	nein	5	32	
Rezidiv	ja	3	11	0,1565
	nein	2	30	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	1	21	0,3488
	nein	4	20	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	5	41	
Immunsuppression	ja	1	7	1
	nein	4	34	
Leberinsuffizienz	ja	1	1	0,2215
	nein	4	37	
Niereninsuffizienz	ja	2	11	0,6119
	nein	3	30	
chronische Lungenerkrankung	ja	0	8	0,5692
	nein	5	33	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	1	17	0,3377
	> 72h	4	14	

Tabelle 12: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-TcdB und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Anti-TcdB		
		positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	7	13	0,7442
	w	6	15	
Alter	< 65	7	12	0,7374
	> 65	6	16	
Klinische Angaben				
Schwere der Erkrankung	leicht	4	15	0,2
	mittel-schwer	9	13	
Fieber	ja	4	1	1
	nein	22	10	
Rezidiv	ja	5	7	0,4686
	nein	8	21	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	5	13	0,7417
	nein	8	15	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	13	28	
Immunsuppression	ja	2	5	1
	nein	11	23	
Leberinsuffizienz	ja	2	0	0,0951
	nein	11	28	
Niereninsuffizienz	ja	4	22	0,6979
	nein	9	6	
chronische Lungenerkrankung	ja	2	4	1
	nein	11	24	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	5	12	0,2883
	> 72h	7	7	

Tabelle 13: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-GDH und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Anti-GDH		
		positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	17	7	0,0489*
	w	21	1	
Alter	< 65	17	4	1
	> 65	21	4	
Klinische Angaben				
Schwere der Erkrankung	leicht	17	4	1
	mittel-schwer	21	4	
Fieber	ja	3	2	0,1875
	nein	32	5	
Rezidiv	ja	11	3	0,6840
	nein	27	5	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	16	5	0,4390
	nein	22	3	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	38	8	
Immunsuppression	ja	7	1	1
	nein	31	7	
Leberinsuffizienz	ja	2	0	1
	nein	36	8	
Niereninsuffizienz	ja	10	3	0,6689
	nein	28	5	
chronische Lungenerkrankung	ja	7	1	1
	nein	31	7	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	16	2	1
	> 72h	14	4	

Tabelle 14: Korrelation zwischen der Prävalenz von Anti-Cwp84 und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Anti-Cwp84		
		positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	15	9	0,7652
	w	12	10	
Alter	< 65	12	9	1
	> 65	15	10	
Klinische Angaben				
Schwere der Erkrankung	leicht	13	8	0,7687
	mittel-schwer	14	11	
Fieber	ja	3	2	1
	nein	23	14	
Rezidiv	ja	6	8	0,1988
	nein	21	11	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	12	9	1
	nein	15	10	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	27	19	
Immunsuppression	ja	4	4	0,7002
	nein	23	15	
Leberinsuffizienz	ja	2	0	0,5043
	nein	25	19	
Niereninsuffizienz	ja	7	6	0,7463
	nein	20	13	
chronische Lungenerkrankung	ja	3	5	0,2455
	nein	24	14	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	10	8	0,7332
	> 72h	12	6	

Tabelle 15: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT) und allgemeinen Angaben, Krankheitsschwere, Komorbiditäten, Therapieansprechen. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Neutralisationstest		
		positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	6	18	1
	w	6	16	
Alter	< 65	8	13	0,1067
	> 65	4	21	
Klinische Angaben				
Schwere der Erkrankung	leicht	5	16	1
	mittel-schwer	7	18	
Fieber	ja	2	3	0,6134
	nein	10	27	
Rezidiv	ja	4	10	1
	nein	8	24	
Komorbiditäten				
Tumorerkrankung	ja	6	15	0,7486
	nein	6	19	
chronische Darmerkrankung	ja	0	0	1
	nein	12	34	
Immunsuppression	ja	2	6	1
	nein	10	28	
Leberinsuffizienz	ja	2	0	0,0638
	nein	10	34	
Niereninsuffizienz	ja	4	9	0,7165
	nein	8	25	
chronische Lungenerkrankung	ja	2	6	1
	nein	10	28	
Therapie				
Therapieansprechen	< 72h	3	15	0,4430
	> 72h	6	12	

Tabelle 16: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT027) und korrespondierenden Ribotypen der Patientenproben. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

		Neutralisationstest RT027		
		positiv	negativ	p-Wert
RT001	ja	4	9	0,7165
	nein	8	25	
RT027	ja	1	4	1
	nein	11	30	
RT014	ja	0	5	0,3
	nein	12	29	
RT020	ja	0	3	0,5
	nein	12	31	
RT078	ja	1	11	0,48
	nein	11	33	
RT126	nein	0	2	1
	nein	12	32	
unbekannte RTs	ja	2	4	0,643
	nein	10	30	
RT159 RT017 RT046 RT023	ja	1	0	0,26
	nein	11	34	
RT005 RT011 RT012 RT029 RT053 RT081	ja	0	1	1
	nein	12	33	

Tabelle 17: Korrelation zwischen positivem Neutralisationstest (NT014) und korrespondierenden Ribotypen der Patientenproben. Berechnung mittels Fisher's Exact Test.

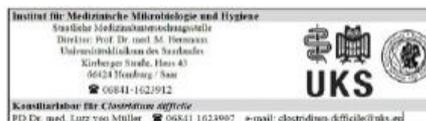
		Neutralisationstest RT014		
		positiv	negativ	p-Wert
RT001	ja	1	12	1
	nein	4	29	
RT027	ja	0	5	1
	nein	5	36	
RT014	ja	0	5	1
	nein	5	36	
RT020	ja	0	3	1
	nein	5	38	
RT078	ja	1	1	0,2
	nein	4	40	
RT126	nein	0	2	1
	nein	5	39	
unbekannte RTs	ja	2	4	0,12
	nein	3	37	
RT159 RT023	ja	0	1	1
	nein	5	40	
RT005 RT011 RT012 RT029 RT053 RT081	ja	0	1	1
	nein	5	40	
RT017 RT046	ja	1	0	0,11
	nein	4	41	

7.2 Fragebogen

Seite 1 von 2

Formular zur Erhebung Klinischer Daten von Patienten mit Clostridium difficile Infektion.

Bitte senden Sie den ausgefüllten Fragebogen per Fax an KH-Hygiene 23994.



Tagesnummer/PNR (wird vom IMMH ausgefüllt)

Tagesnummer	<input type="text"/>
PNR	<input type="text"/>
(bitte nicht ausfüllen)	<input type="radio"/> UKS <input type="radio"/> externer Einsender

Einsender - Institut/Labor/Klinik oder Station

Universitätsklinikum des Saarlandes: Station Ansprechpartner Externer Einsender: Name/Anschrift Ansprechpartner Telefon/Fax/e-mail	<input type="text"/>
Postleitzahl des Einsenders	<input type="text"/>

Material und Untersuchung

Entnahmedatum (TT.MM.JJJJ)	<input type="text"/>
Fragestellung	<input type="text"/>

Patientendaten

Name, Vorname (z. B. Patientenetikett) evtl. Labonummer (ext. Einsender)	<input type="text"/>
Geburtsdatum (TT.MM.JJJJ)	<input type="text"/>
Geschlecht	<input type="radio"/> männlich <input type="radio"/> weiblich

Klinische Angaben

Manifestation	<input type="radio"/> Erstmanifestation <input type="radio"/> 1. Rezidiv <input type="radio"/> 2. Rezidiv und mehr
Durchfälle \geq 3xtgl. (Beginn)	<input type="radio"/> $<$ 3 Tage nach Aufnahme <input type="radio"/> $>$ 3 Tage nach Aufnahme <input type="radio"/> keine Durchfälle <input type="radio"/> nicht bekannt
weitere Symptomatik (Mehrfachantworten möglich.)	<input type="checkbox"/> keine weitere Symptomatik <input type="checkbox"/> Fieber ($>$ 38,5°C) <input type="checkbox"/> Leukozytose ($>$ 15 G/L) <input type="checkbox"/> Kreatininanstieg $>$ 50% oder $>$ 133 μ mol/l <input type="checkbox"/> Ileus <input type="checkbox"/> Megacolon <input type="checkbox"/> Peritonitis <input type="checkbox"/> Beatmung <input type="checkbox"/> Bewusstseinsstörung <input type="checkbox"/> Sepsis <input type="checkbox"/> Intensivtherapie <input type="checkbox"/> Kolektomie (Notfall) <input type="checkbox"/> mit CDI verstorben <input type="checkbox"/> Pseudomembranöse Kolitis (endoskop. gesichert) <input type="checkbox"/> andere _____
Komorbidität (Mehrfachantworten möglich.)	<input type="checkbox"/> keine Komorbidität <input type="checkbox"/> Vorausgegangene Antibiose (letzte 4 Wochen) <input type="checkbox"/> Aktuelle Symptomatik unter laufender Antibiose <input type="checkbox"/> Tumorerkrankung <input type="checkbox"/> Chron. entzündl. Darmerkrankung <input type="checkbox"/> Immunsuppression <input type="checkbox"/> Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> Niereninsuffizienz <input type="checkbox"/> Chron. Lungenerkrankung <input type="checkbox"/> Ernährungs-sonde (z.B. PEG) <input type="checkbox"/> Krankenhausaufenthalte (letzte 3 Monate) <input type="checkbox"/> Pflegeheim <input type="checkbox"/> andere _____
<i>C. difficile</i> Therapie (Mehrfachantworten möglich.)	<input type="checkbox"/> bisher keine Therapie <input type="checkbox"/> Metronidazol p.o. <input type="checkbox"/> Vancomycin p.o. <input type="checkbox"/> Fidaxomycin p.o. <input type="checkbox"/> Probiotika <input type="checkbox"/> andere _____
wenn ja: Therapieansprechen	<input type="radio"/> $<$ 48 Stunden <input type="radio"/> $<$ 72 Stunden <input type="radio"/> \geq 72 Stunden <input type="radio"/> kein Therapieansprechen
vorherige stationäre Therapien	
Postleitzahl der Krankenhäuser	□□□□□□
	□□□□□□
	□□□□□□
Postleitzahl der Pflegeeinrichtungen	□□□□□□
	□□□□□□
	□□□□□□

7.3 Geräte und Reagenzien

Substanzen / Materialien	Hersteller
96-Well-Mikrotiterplatten	Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anaerobiertopf (2,5 l)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion) (5 ml)	Copan, Murrieta, Kalifornien, USA
BHI (Brain Heart Infusion) Trockennährmedium	BD Bacto, BD Biosciences, Kalifornien, USA
Blutagar	BD Biosciences, Kalifornien, USA
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®	TechLAB, Blacksburg, Virginia, USA
DMF	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
EDTA/Serum-Blutabnahmeröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Falcon, Corning, New York, USA
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Filter 0,2 nm	Filtropur 0,2, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
GENbox anaer	BioMérieux, Marcy-L'Étoile, France
GENbox Anaerobiertopf 7,0 l	BioMérieux, Marcy-L'Étoile, France
Impfösen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
MTT Assay	(Sigma, M-2128), St. Louis, Missouri, USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipettenspitzen	Eppendorf, blau (100 µl), Hamburg, Deutschland
Mycolasmen PCR	Venor®GeM Classic, MB minerva biolabs®, Berlin, Deutschland
NaCl	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Na ₂ HPO ₄	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Petrischalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Photometer	Gene Quant Pro Amerham Pharmacia Biotech AB, Lund, Schweden
Pipetten	Research plus, 1-Kanal blau (1000 µl), gelb (200 µl), Research Plus Multichannel gelb (200 µl), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SDS	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Stabpipette	Costar, Corning, New York, USA
Trypsin	TrypLE Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumfiltration	Filteraufsatz 250 "rapid"-Filtermax 0,22 µm TPP, Trasadingen, Schweiz
Vero B4 Zellen	DSMZ ACC 33, Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Deutschland
Zellkultur-Medium	Gibco RPMI 1650 , Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Geräte	Hersteller
Anaerobierwerkbank	Don Whitley Scientific, Bingley, Vereinigtes Königreich
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microplate reader	Sunrise, TECAN, Männedorf, Schweiz
Mikroskope	LEICA DFC 420 C, LEICA, Wetzlar, Deutschland
	ZEISS Axiovert 10, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

TC20™ Automated Cell Counter	Bio RAD, Hercules, Kalifornien, USA
Vakuumfiltersystem	TPP, Trasadingen, Schweiz
Wärmebad	Lauda-GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellkultur-Inkubator	Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkulturwerkbank	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
	Heraeus Pico 21, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Software	Hersteller
----------	------------

GraphPad Prism Version 6.04	GraphPad Software, San Diego, USA
-----------------------------	-----------------------------------

8 Publikationen

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- **Roth S**, Jung P, Boone J, Mellmann A, Nimmesgern A, Becker SL, Berger FK, Müller L von. 2022. Antigen-Specific vs. Neutralizing Antibodies Against Conditioned Media of Patients With *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Exploratory Study. *Front. Microbiol.* 13:859037. doi: 10.3389/fmicb.2022.859037
- **Roth S**, Jäger M, Herrmann M, Boone J, Müller L von. Antibodies against *Clostridium difficile* - Differences between antibodies against recombinant antigens and neutralizing antibodies against conditioned media from ribotype 014 and 027.

Paper Poster Session, 26th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID) 2016, 9 - 12 April 2016, Amsterdam, Netherlands

Publikationsliste (Peer-reviewed Journale):

- **Roth S**, Jung P, Boone J, Mellmann A, Nimmesgern A, Becker SL, Berger FK, Müller L von. 2022. Antigen-Specific vs. Neutralizing Antibodies Against Conditioned Media of Patients With *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Exploratory Study. *Front. Microbiol.* 13:859037
- **Roth S**, Thurner L, Becker SL. 2021. Application of the FilmArray® BioThreat Panel for molecular diagnosis of human tularemia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 12:101792.
- Schneitler S, Gülker J, Alhusein F, Bub F, Halfmann A, Klein L, **Roth S**, Jung P, Becker SL. 2021. Experiences with pre-travel diagnostic PCR testing for SARS-CoV-2: challenges and opportunities. *J Travel Med* 28:taab116.
- Schneitler S, Bub F, Benthien S, Lepper PM, Kurzai O, Becker SL, **Roth S**. 2021. Floating fungus balls in a blood culture bottle. *Clinical Microbiology and Infection* 27:1790–1791.

- **Roth S**, Berger FK, Link A, Nimmesgern A, Lepper PM, Murawski N, Bittenbring JT, Becker SL. 2021. Application and clinical impact of the RESIST-4 O.K.N.V. rapid diagnostic test for carbapenemase detection in blood cultures and clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40:423–428.
- Kühn D, Metz C, Seiler F, Wehrfritz H, **Roth S**, Alqudrah M, Becker A, Bracht H, Wagenpfeil S, Hoffmann M, Bals R, Hübner U, Geisel J, Lepper PM, Becker SL. 2020. Antibiotic therapeutic drug monitoring in intensive care patients treated with different modalities of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and renal replacement therapy: a prospective, observational single-center study. *Crit Care* 24:664.
- Schneitler S, Jung P, Bub F, Alhussein F, Benthien S, Berger FK, Berkó-Göttel B, Eisenbeis J, Hahn D, Halfmann A, Last K, Linxweiler M, Lohse S, Papan C, Pfuhl T, Rissland J, **Roth S**, Schlotthauer U, Utzinger J, Smola S, Gärtner BC, Becker SL. 2020. Simple Questionnaires to Improve Pooling Strategies for SARS-CoV-2 Laboratory Testing. *Annals of Global Health* 86:148.
- Kos I, Balensiefer B, **Roth S**, Ahlgrimm M, Sester M, Schmidt T, Thurner L, Bewarder M, Bals R, Lammert F, Stilgenbauer S, Kaddu-Mulindwa D. 2020. Prolonged Course of COVID-19-Associated Pneumonia in a B-Cell Depleted Patient After Rituximab. *Front Oncol* 10.
- **Roth S**, Ehrlich T, Schäfers H-J, Becker SL. 2020. Late-onset native valve endocarditis caused by *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Int J Infect Dis* 101:1–3.
- Kaddu-Mulindwa D, **Roth S**, Klees-Rollmann A, Fassbender K, Fousse M. 2020. Primary HIV infection presenting with Kaposi sarcoma and limbic encephalitis. *J Neurovirol* 26:292–296.

9 Danksagung

Besonderer Dank an

Meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Lutz von Müller,
für die Ermöglichung, diese Doktorarbeit zu erstellen und seine konstruktive Kritik. Durch diese Arbeit gewann ich nicht nur Freude am experimentellen Arbeiten, sondern auch erste Einblicke und Gefallen an der Medizinischen Mikrobiologie.

Meinen Chef Herrn Prof. Dr. Dr. Sören Becker,
für seine allzeitige Unterstützung und Motivation bei der Finalisierung der Dissertation. Sein großes und stetiges Interesse an meinem beruflichen Weiterkommen sind mir von großem Wert.

Meine betreuende MTA Frau Anna Nimmesgern,
für ihre unablässige Hilfe und Geduld sowie ihre aufbauenden, liebevollen Worte und Gesten.

Großer Dank an

Herrn Dr. rer. nat. Jan Philipp Jung und Herrn Dr. med. Fabian Berger, die mich bei statistischer Auswertung, Ausgestaltung von Graphiken und bei der Fertigstellung der Dissertation sehr unterstützten.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei den restlichen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, die mich von Anfang an mit großer Wärme und Hilfsbereitschaft empfingen.

Mehr als Dank

Gebührt jedoch den Menschen, die mich Dinge lehren, die nicht in Büchern zu finden sind – und das sind meine engsten Freunde und meine Familie, insbesondere meine Mutter Anette. Sie geben mir das Gefühl, gesehen, geschätzt und geliebt zu sein und das ist von größtem und teuerstem Wert!

Die letzten Worte richten sich an meine Großeltern Irene und Alfons. Ihre immerwährende Zuversicht und Unterstützung während meiner ganzen Schul- und Studienzeit bleiben mir eine unvergessliche und kostbare Erinnerung. Dafür sei ihnen diese Arbeit gewidmet!

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

