

**Molekulare Charakterisierung klinischer**

***Clostridium difficile-***

**Isolate am Münchner Universitätsklinikum,**

**2005-2007**



Miriam Partilla

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Molekulare Charakterisierung klinischer**  
***Clostridium difficile-***  
**Isolate am Münchner Universitätsklinikum,**  
**2005-2007**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Miriam Partilla

aus  
Hall in Tirol, Österreich

Jahr  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Rüssmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Raphaela Waidelich  
Prof. Dr. Josef Briegel  
Prof. Dr. Thomas Löscher

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. K. Panthel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR,FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2013

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Erkenntnisse aus dem Schrifttum, die ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet und wurden nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Ferner erkläre ich, dass ich an keiner Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, den 04.12.2012.

An all die Menschen, die mir zur Seite standen, stehen und stehen werden.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Charakterisierung von <i>Clostridium difficile</i>	8
1.2 Epidemiologie	8
1.3 CDI - <i>Clostridium difficile</i> -Infektion	9
1.4 Diagnostik	9
1.5 Stämme	9
1.6 Toxine als Virulenzfaktoren	10
1.7 Struktur und Funktion der Toxine	10
1.8 Neuer Epidemiestamm Ribotyp 027	11
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Geräte und Laborbedarf	15
3.2 Chemikalien und kommerzielle Kits	16
3.3 Isolate: Herkunft und Geschlechtsverteilung	16
3.4 Nährmedien und -suspensionen	22
3.5 ELISA	23
3.6 Kultivierung und Aufbewahrung	24
3.7 DNA-Isolierung	24
3.8 PCR	24
3.9 Agarosegelelektrophorese	27
3.10 E-Test	28
3.11 Gelextraktion und Sequenzierung	29
3.12 Ribotypisierung	30

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1 Stuhl-ELISA	31
4.2 Betroffene Fachgebiete	31
4.3 Altersspezifische Verteilung	34
4.4 Reihenfolge der Versuche	34
4.5 PCR: genotypische Ausstattung	35
4.6 Vergleich ELISA-PCR	39
4.7 E-Test	40
4.8 Ribotypisierung und Sequenzierung selektierter Stämme	43
<b>5. Diskussion</b>	<b>57</b>
5.1 Stuhl-ELISA	57
5.2 Betroffene Fachgebiete	57
5.3 Altersspezifische Verteilung und E-Test	58
5.4 PCR: genotypische Ausstattung	59
5.5 Vergleich ELISA-PCR	60
5.6 Ribotypisierung und Sequenzierung selektierter Stämme	62
5.7 Fazit und Ausblick	69
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7. Summary</b>	<b>74</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>10. Curriculum vitae</b>	<b>82</b>
<b>11. Anhang</b>	<b>83</b>
Abbildungsverzeichnis	83
Tabellenverzeichnis	85
Abkürzungsverzeichnis	86
Ausführliche Liste der Isolate	88

# 1. Einleitung

## 1.1 Charakterisierung von *Clostridium difficile*

Das Bakterium *Clostridium difficile* ist ein grampositives Stäbchen. Als Anaerobier ist es in der physiologischen Darmflora des Menschen zu finden.

1935 wurde das Bakterium das erste Mal aus dem Darm eines Menschen isoliert [23, 27, 29]. Bedeutung erlangte das Bakterium als entdeckt wurde, dass *C. difficile* der Erreger der pseudomembranösen Colitis (kurz: PMC) ist [3]. Neben dieser gefürchteten Komplikation kann ein toxisches Megacolon auftreten. Als Sporenbildner wird *C. difficile* immer stärker zum Hygieneproblem in Krankenhäusern.

## 1.2 Epidemiologie

Bei bis zu 65 % der asymptomatischen Neugeborenen ist *C. difficile* im Stuhl nachweisbar [53]. Etwa 5 % beschwerdefreier Erwachsener tragen den Keim in sich [53]. Bei Patienten im Krankenhaus ist *C. difficile* bei etwa 20 % nachweisbar [33]. Mit der Dauer des Aufenthaltes steigt die Prävalenz: von ca. 4 % in der ersten Woche auf ca. 9 % in der dritten Woche [20]. Dies kann auf die extrem umweltresistenten Sporen dieses Bakteriums zurückgeführt werden, die mit alkoholischen Desinfektionsmitteln nicht eliminierbar sind und so teilweise über Monate in der Krankenhausumgebung persistieren können [3, 52, 55].

Das Management von stationären *Clostridium difficile*-Infektionen (CDI)-Fällen kostet viel Geld: Hygienemaßnahmen wie Isolierung der Patienten und Dekontamination von Krankenzimmern verursachen hohe Kosten. Im Jahr 2007 betrugen die durch *C. difficile* verursachten Kosten in Europa etwa drei Milliarden Euro [58]. Mit einem weiteren Anstieg der Kosten ist aufgrund der steigenden Zahl älterer Menschen und hypervirulenter Erreger zu rechnen [58]. Dies ist eine nicht zu unterschätzende Gefahr für Kliniken sowie für Pflege-/Altenheime, da diese Institutionen bereits jetzt finanzielle Engpässe haben.

### 1.3 CDI - *Clostridium difficile*-Infektion

Zu Beginn dieses Unterpunktes ein kurzer Hinweis: Der frühere Begriff *Clostridium difficile*-assoziierte Diarrhoe (CDAD) wurde in der jüngeren internationalen Literatur durch den Begriff *Clostridium difficile*-Infektion (CDI) ersetzt [56].

Bei Antibiotikabehandlung wird die physiologische Darmflora unterdrückt, was zu einer Überwucherung mit *C. difficile* führen kann. Dies ist häufig bei der Behandlung mit Chinolonen, wie beispielsweise Moxifloxacin, der Fall. Es kommt zur Antibiotika-assoziierten Diarrhoe (kurz: AAD). 20 % dieser Fälle sind auf *C. difficile* zurückzuführen. Falls sich der Zustand der Patienten verschlechtert und es zur Ausbildung einer PMC kommt, ist *C. difficile* in nahezu 100 % der Fälle die Ursache. Die steigende Mortalitätsrate (von ca. 7 % 2000 auf ca. 24 % 2004 in den USA) stellt ein großes Problem für die Kliniker dar [35, 38, 51]. Hier scheint vor allem ein neuer, hypervirulenter Stamm eine Rolle zu spielen: die Mortalitätsrate dieses Stammes beträgt 16,7 % und führt zu einer durchschnittlich um 10,7 Tage verlängerten Liegedauer der betroffenen Patienten [47]. Solch ein verlängerter Aufenthalt ist kostspielig und für die betroffenen Patienten unangenehm.

### 1.4 Diagnostik

Der Nachweis erfolgt mittels Stuhlkultur, wobei eine positive Stuhlkultur zwar ein Nachweis für *C. difficile*, aber kein Beweis einer Erkrankung ist. Daher wird ein Stuhl-ELISA verwendet, mit dem Toxine nachweisbar sind.

### 1.5 Stämme

Bei den Stämmen muss zwischen atoxischen und toxischen Stämmen unterschieden werden. In 25 % der Fälle handelt es sich um atoxische Stämme, die ungefährlich sind. In 75 % der Fälle jedoch sind toxische Stämme zu finden, die fakultativ pathogen sind und damit zu einer Erkrankung der Patienten führen können [12].

## 1.6 Toxine als Virulenzfaktoren

Bei den Toxinen sind zuallererst die zwei Haupttoxine zu erwähnen: **Toxin A** und **Toxin B** (=TcdA und TcdB). Diese Haupttoxine können in aufgereinigter Form in Tiermodellen (Hamster, Mäuse und Ratten) bei intragastraler Verabreichung einige Symptome (intestinale Flüssigkeitsansammlung, Entzündungszeichen der Mukosa, Hämorrhagie sowie Durchfall) verursachen [39]. Als Regulatoren sind TcdD und **TcdC** zu erwähnen, wobei ersteres als positiver und letzteres als negativer Regulator der Toxinproduktion anzusehen sind [41]. Die für die beiden erwähnten Toxine sowie die für die Regulatorproteine kodierenden Gene sind auf dem so genannten **Pathogenitäts-Lokus** (PaLoc) lokalisiert [6]. Neben Toxin A und Toxin B gibt es das **binäre Toxin** (=Cdt A/B), eine ADP-Ribosyltransferase. Die Gene für das binäre Toxin sind außerhalb dieses PaLoc zu finden [42, 49]:

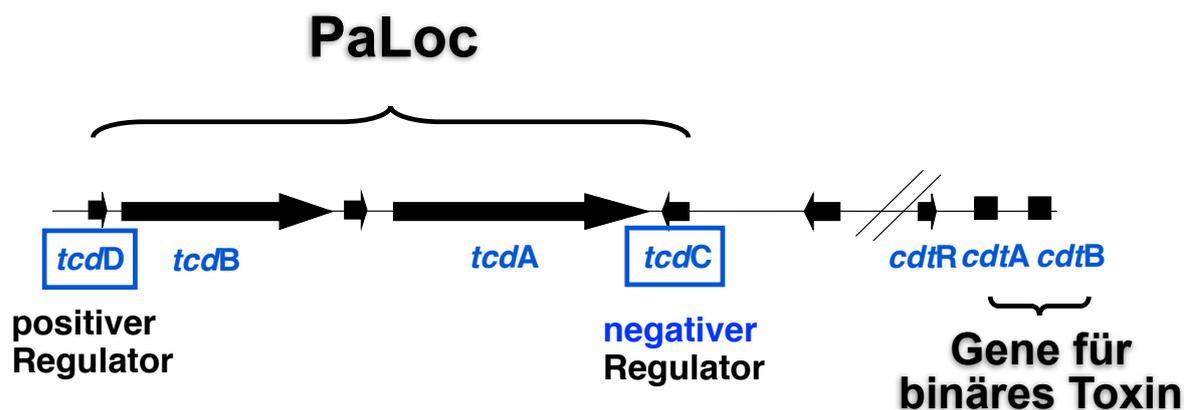


Abb. 1: PaLoc und Gene für das binäre Toxin (abgewandelt nach [42] )

## 1.7 Struktur und Funktion der Toxine

Toxin A und Toxin B sind große clostridiale Zytotoxine (=GCT). Bei Toxin A handelt es sich um ein Entero- und bei Toxin B um ein Zytotoxin. Beide Toxine zerstören das Aktin-Zytoskelett der intestinalen Epithelzellen durch die UDP-Glukose-abhängige Glykosylierung von Proteinen der Rho- und Ras-Unterfamilie, was zur Apoptose der Zelle führt [66]. Bei *tcdC* wurde vermutet, dass Polymorphismus, partielle Deletionen oder eine Trunkation zu einer unregulierten Produktion der Toxine A und B führen können [11].

Das binäre Toxin hat die folgende biologische Aktivität: CdtB führt zur Zell-Oberflächenbindung und intrazellulären Translokation, woraufhin CdtA den Einbau von Aktin-Filamenten durch Ribosylierung von Adenosin-Diphosphat stört, was zum Zelltod führt. Reguliert wird das binäre Toxin über das Gen *cdtR*.

### 1.8 Neuer Epidemiestamm Ribotyp 027

Im Jahr 2003 gab es erstmalig Meldungen aus Nordamerika über einen neuen, hypervirulenten epidemischen *C. difficile*-Stamm PCR-Ribotyp 027, der mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden ist [52].

In den **USA** gab es einen enormen Anstieg der nosokomialen *C. difficile*-Infektionen von 98000 (1996) auf 178000 (2003) [43]. Sowohl die Inzidenz als auch die Letalität stiegen: Beispielsweise erhöhte sich die Inzidenz von CDI im Universitätsklinikum Pittsburgh, Pennsylvania, von 0,74 % (1999) auf 1,2 % (2000). Ebenso wurde von einer Erhöhung der Letalität von 0,5 % auf 2,0 % berichtet. Für einen Ausbruch (April 2001 bis März 2002) wurde in 87,5 % der schweren CDI-Fälle der neue PCR-Ribotyp 027 als ursächlich betrachtet [42].

Aus **Kanada** folgten 2003 ebenfalls Berichte über schwere nosokomiale Ausbrüche in Quebec (12 betroffene Krankenhäuser) eines klonal verwandten Stammes. Hierbei betrug die Letalität 6,9 %. In einer der betroffenen Kliniken (Sherbrooke) lag die Letalität sogar bei 13,8 %. Im Vergleich lag die Letalität in den Jahren 1991/92 noch bei 4,7 % [38, 47, 67].

Nach den Ausbrüchen in den USA und in Kanada folgten auch Berichte über erhöhte CDI-Inzidenz und das Auftreten des Ribotyps 027 in **Europa**:

In **England** fiel Ende 2003/Anfang 2004 ebenfalls eine Zunahme der CDI-Fälle im Rahmen eines Ausbruchs in einem Krankenhaus im Südosten Englands auf. Auch hier wurden schwerere Krankheitsverläufe beobachtet, wobei die Letalität bei 8 % lag. Für viele dieser Verläufe konnte der Ribotyp 027 verantwortlich gemacht werden [52].

In den **Niederlanden** trat der Ribotyp 027 erstmals Mitte 2005 im Universitätsklinikum Leiden auf. Die CDI-Inzidenz war von 0,04 % auf 0,83 % gestiegen [65].

In **Belgien** wurde neben einer steigenden Inzidenz im September 2005 (von 0,10 % auf 0,33 %) der Ribotyp 027 bei einer retrospektiven Untersuchung von CDI-Ausbrüchen 2003 und 2004 ebenfalls gefunden [31].

In **Frankreich** gab es von Januar bis April 2006 einen CDI-Ausbruch. Bei den Typisierungsergebnissen trat der Ribotyp 027 gehäuft auf (81 von 144 untersuchten *C. difficile*-Stämmen).

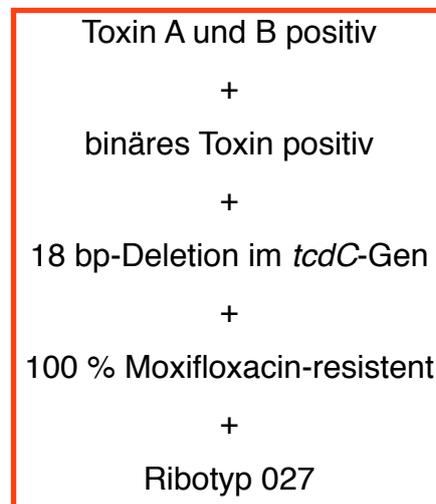
Aus **Österreich** folgte 2006 die erste Meldung eines *C. difficile*-Ribotyps 027 einer Touristin aus Großbritannien [26].

Insgesamt fiel neben der erhöhten Inzidenz eine Erhöhung der Schwere der Erkrankung auf [34].

Aufgrund der geographischen Nähe war es eine Frage der Zeit, wann in **Deutschland** der erste schwere CDI-Fall mit Ribotyp 027 auftreten würde. Im März 2007 kam es dann in Trier zu einem schweren CDI-Fall mit Nachweis des Ribotyps 027. Bis zum 31. Januar 2008 konnten insgesamt 27 schwere CDI ohne Ribotypisierung und 21 bestätigte Fälle von *C. difficile*-Ribotyp 027-Infektionen in der Region Trier identifiziert werden. Es kam zu neun Todesfällen (19 %) [28]. Kurz darauf wurde der Meldetatbestand eingeführt: namentliche Meldung an das Gesundheitsamt (§ 6, Abs. Nr. 5a IfSG). Hierbei ist es äusserst wichtig, dass Isolate für eine spätere Typisierung zur Verfügung stehen [13].

Nach der Schilderung der Situation in Amerika und in Europa soll nun näher auf die Eigenschaften dieses neuen Stammes eingegangen werden.

Der neue **Epidemiestamm** zeichnet sich durch folgende Merkmale aus [42]:



**Abb. 2: Merkmale des hypervirulenten Epidemiestammes, Ribotyp 027**

Neben diesen Merkmalen wird dieser Stamm in der Restriktions-Endonukleasen-Analyse (REA) als Typ B1, im Toxinotyp als Typ III und in der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese als North American Profile 1 (NAP1) charakterisiert [42]. In dieser Arbeit wird auf diese Begriffe nicht näher eingegangen, sondern der Schwerpunkt auf die in Abbildung 2 dargestellten Merkmale gelegt.

Es wurde vermutet, dass die Hypervirulenz des oben dargestellten Phänotyps mit der ***tcdC*-Deletion** und einer damit verbundenen Überproduktion der Toxine A und B zusammenhängt [67]. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde jedoch gezeigt, dass nicht Toxin A, sondern Toxin B essentiell für die Virulenz von *C.difficile* ist [40].

Unter den Patienten, die mit diesem Epidemiestamm infiziert waren, waren zunehmend auch jüngere Patienten zu finden [64].

## 2. Zielsetzung

Nach den Meldungen aus Europa über das Neuauftreten eines hypervirulenten *C. difficile*-Stammes, stellte sich die Frage, wie sich die Situation in Deutschland darstellt. Das Augenmerk der vorliegenden experimentellen Arbeit lag auf den Standorten des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Hierfür wurden 330 *C. difficile*-Stämme aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe und Verdacht auf CDI im Zeitraum 2005 - 2007 retrospektiv betrachtet.

Durch mehrere Experimente sollte untersucht werden, ob der oben genannte hypervirulente Stamm am Universitätsklinikum bereits aufgetreten ist. Das Vorgehen schloss dabei kulturelle Anzucht der Isolate, ELISA, PCR und E-Test (für den Nachweis einer möglichen Moxifloxacin-Resistenz) mit ein.

So konnten Stämme, die die oben genannten Merkmale des neuen Stammes erfüllten, sukzessive herausgefiltert werden. Anschließend wurden selektierte Stämme sequenziert und ribotypisiert. Das genaue Vorgehen im Labor ist im folgenden Abschnitt dargelegt.

### 3. Material und Methoden

Alle zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie der gesamte Laborbedarf sind im Folgenden aufgeführt.

#### 3.1 Geräte und Laborbedarf

**Tabelle 1: Geräte und Laborbedarf**

Gerät/Laborbedarf	Typ	Firma
Agarose	SeaKemLE-Agarose	bmaproducts
Anaerobier-Topf	luftdicht verschließbar	bioMérieux sa, Frankreich
Anaerobiose-Indikator	96118	bioMérieux sa, Lyon, Frankreich
Anaerobisches Milieu	Genbox Anaer	bioMérieux sa, Frankreich
Brutschrank	Function Line	Heraus Instruments, Hanau, Germany
DNA-Leiter	100 bp DNA Ladder	BioLabs, New England
DNA-Leiter	100 bp DNA Ladder, peqGOLD O'range	peqLab, Erlangen, Deutschland
E-Test	Moxifloxacin	AB BIODISK, Solna, Schweden
ELISA	RIDASCREEN® C. difficile Toxin A/B	r-biopharm
Hitzeblock	TR-L 288	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikrowelle		LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, Deutschland
Pipette	10, 100 & 1000 µl Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	20 und 200µl	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Plattenphotometer	Sunrise Magellan™	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung	Cryobank	Mast, Reinfeld, Deutschland
Tiefkühlschrank	Profi Line	Liebherr, Bulle, Schweiz

Gerät/Laborbedarf	Typ	Firma
Thermocycler(=PCR-Maschine)	Gene Amp System 9700	Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Vortex Apparat	Vortex-2 Genie G-560 E	Scientific industries si, Bohemia, N.Y., USA
Zentrifuge	Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.2 Chemikalien und kommerzielle Kits

Reagenzien wurden von den nachfolgend aufgeführten Firmen bezogen:

Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Biozym (Hameln, Deutschland), Boehringer (Mannheim, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Gibco (Gaitersburg, USA), Merck (Deutschland), PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland), ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA).

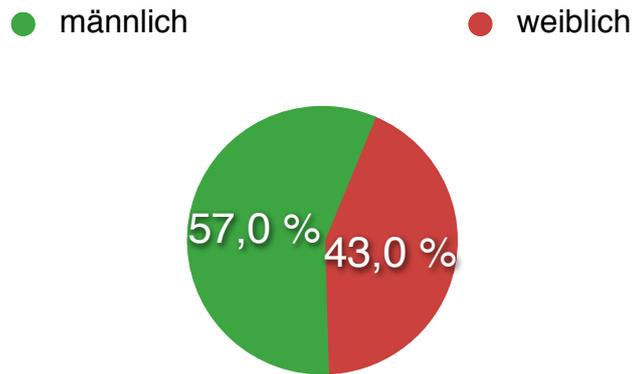
Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden verwendet:

**Tabelle 2: Kits**

Kit	Firma
DNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mini-Prep Plasmid-DNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning®Kit	invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.3 Isolate: Herkunft und Geschlechtsverteilung

Alle im Zeitraum 2005 bis 2007 gesammelten 330 untersuchten Stämme waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits isoliert und wurden hier nun retrospektiv betrachtet. Alle Isolate stammten von Patienten der Universitätskliniken München: 188 (57,0 %) der Proben von männlichen Patienten und 142 (43,0 %) von weiblichen Patientinnen:



**Abb. 3: Geschlechtsverteilung**

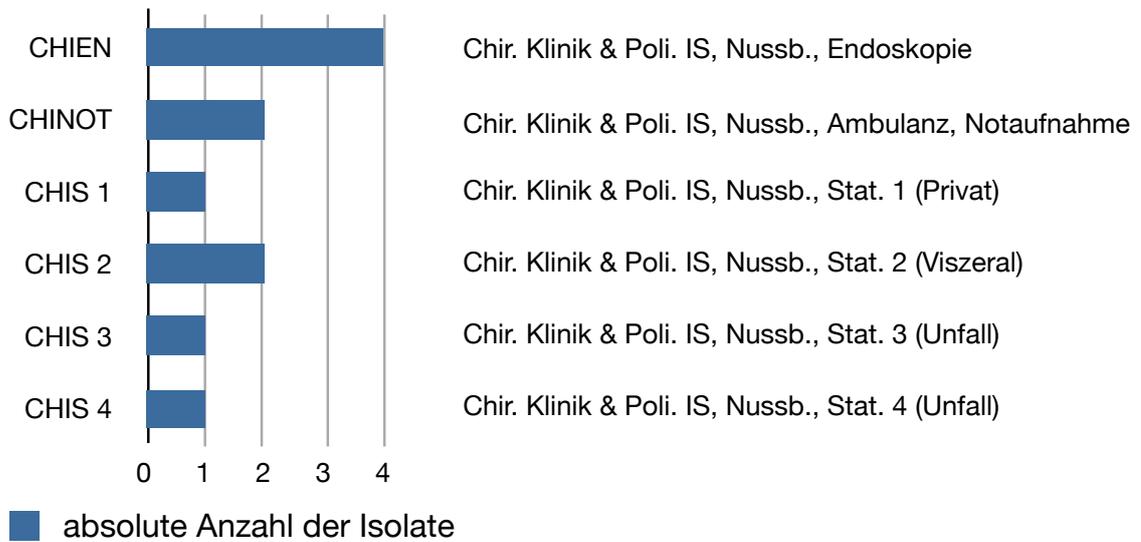
Alle Isolate stammten von Patient/innen mit Diarrhoe und Verdacht auf CDI. Die jeweiligen Proben wurden von den betroffenen Kliniken zur Abklärung bzw. zum Ausschluss von *Clostridium difficile* an das zum Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie gehörende Stuhllabor gesandt. Nähere klinische Angaben waren nicht zu eruieren.

Bei allen 330 Isolaten wurde nachverfolgt, von welchen Kliniken sie stammten. Die exakte Herkunft sämtlicher Isolate ist im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

Betroffen waren folgende Kliniken des Klinikums der Universität München:

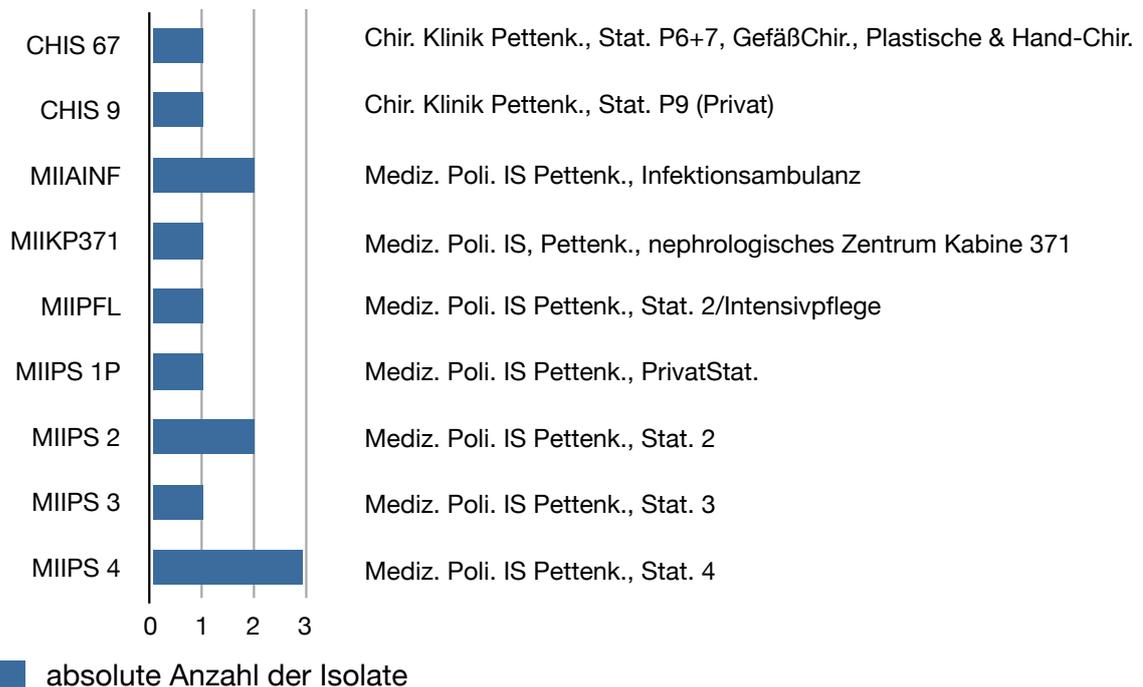
- Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt Nussbaumstraße (Chir. Klinik & Poli IS Nussb.)
- Chirurgische Klinik & Medizinische Poliklinik Innenstadt Pettenkoferstraße (Chir. Klinik Pettenk. & Mediz. Poli. IS Pettenk.)
- Dr. von Haunersches Kinderspital (HK)
- Frauenklinik Innenstadt Maistraße
- Psychiatrische Klinik Nussbaumstraße (Psych. Klinik Nussb.)
- Medizinische Klinik Innenstadt Ziemssenstraße (Mediz. Klinik IS Ziemssen)
- sonstige Kliniken (Kinderzentrum Heiglhofstraße, Städtisches Krankenhaus Thalkirchen)
- Campus Großhadern (GH)

### Chirurgische Klinik Nussbaumstraße

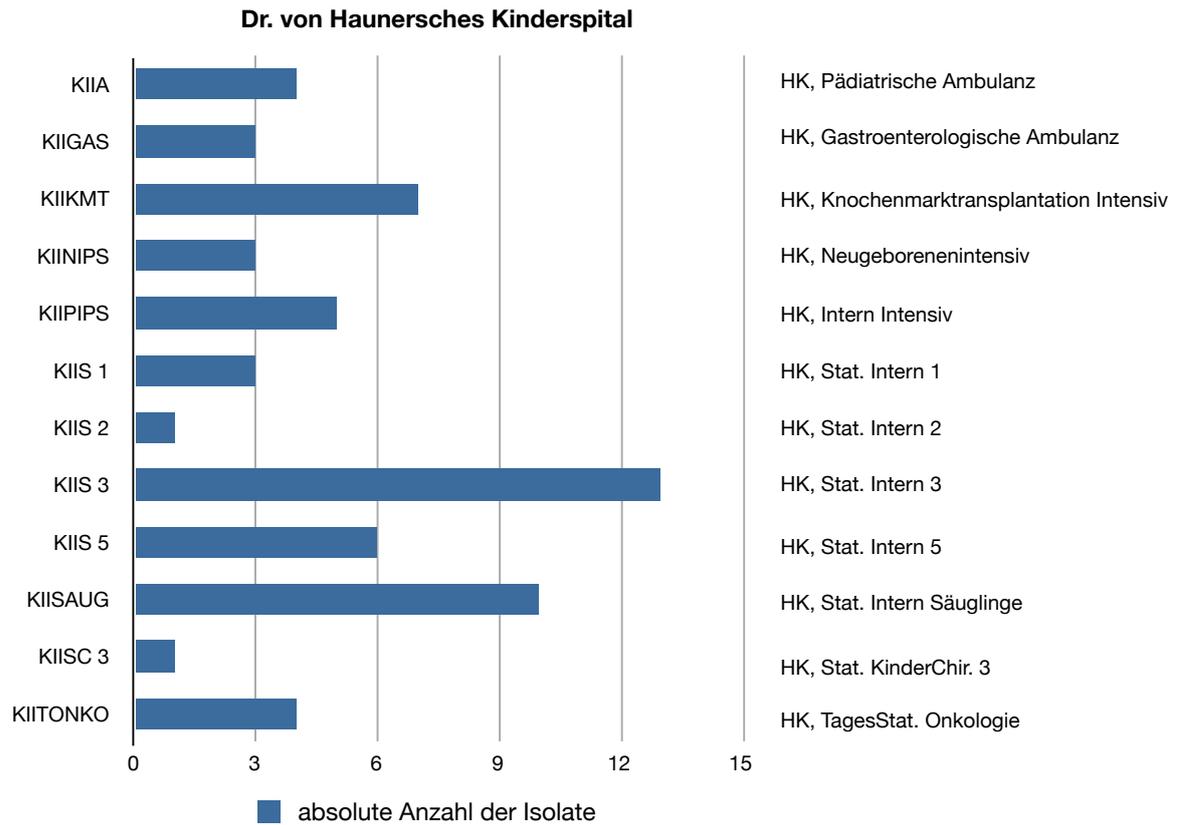


**Abb. 4: Isolate der Chirurgischen Klinik Nussbaumstraße**

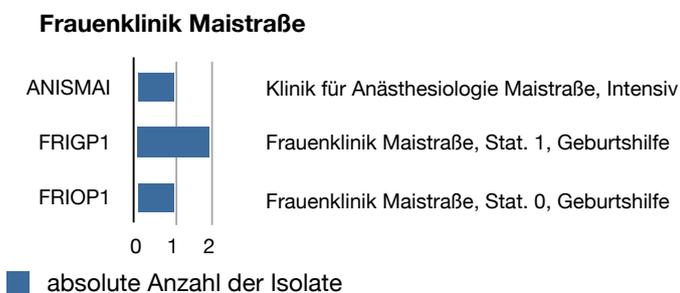
### Chirurgische Klinik & Medizinische Poliklinik Innenstadt Pettenkoferstraße



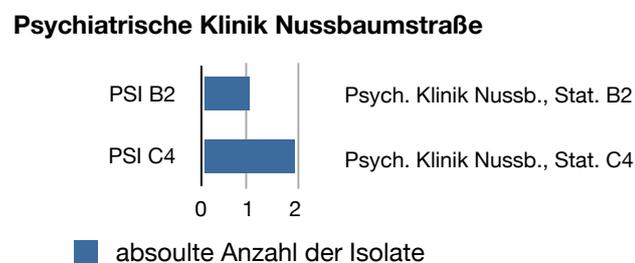
**Abb. 5: Isolate der Chirurgischen Klinik & Medizinischen Poliklinik  
Innenstadt Pettenkoferstraße**



**Abb. 6: Isolate des Dr. von Hauerschen Kinderspitals**

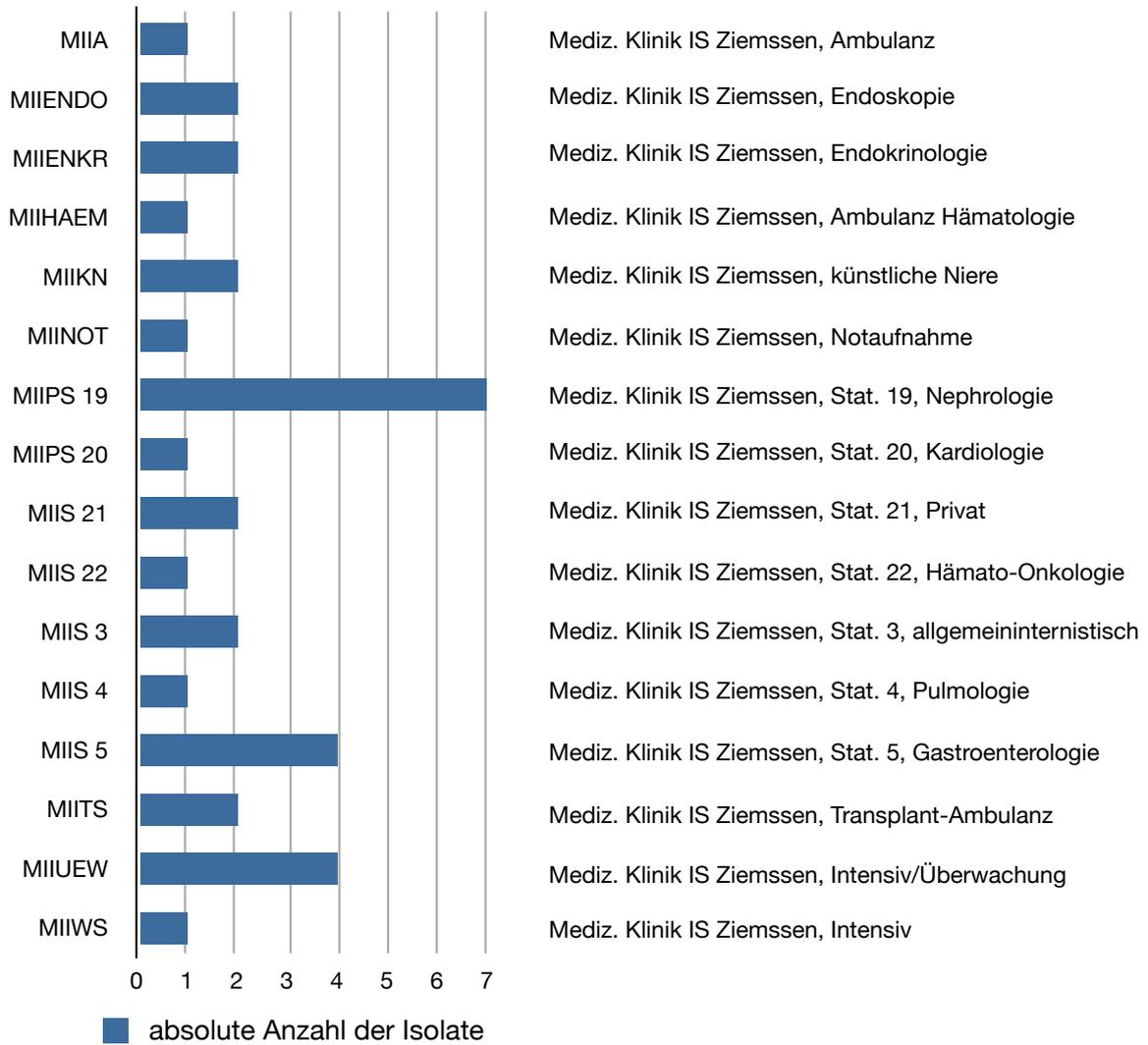


**Abb. 7: Isolate der Frauenklinik Maistraße**

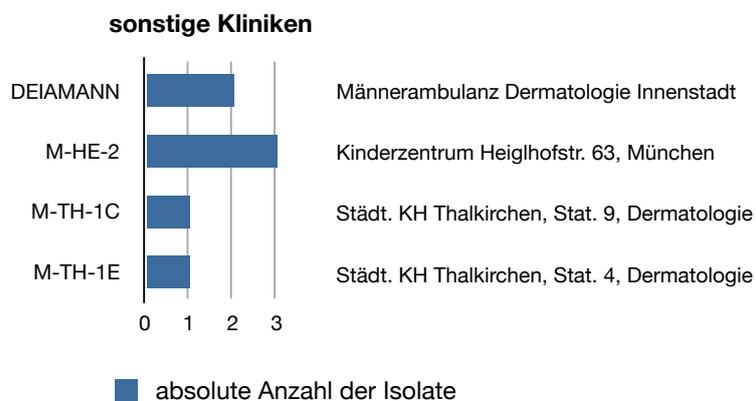


**Abb. 8: Isolate der Psychiatrischen Klinik Nussbaumstraße**

**Medizinische Klinik Innenstadt Ziemssenstraße**

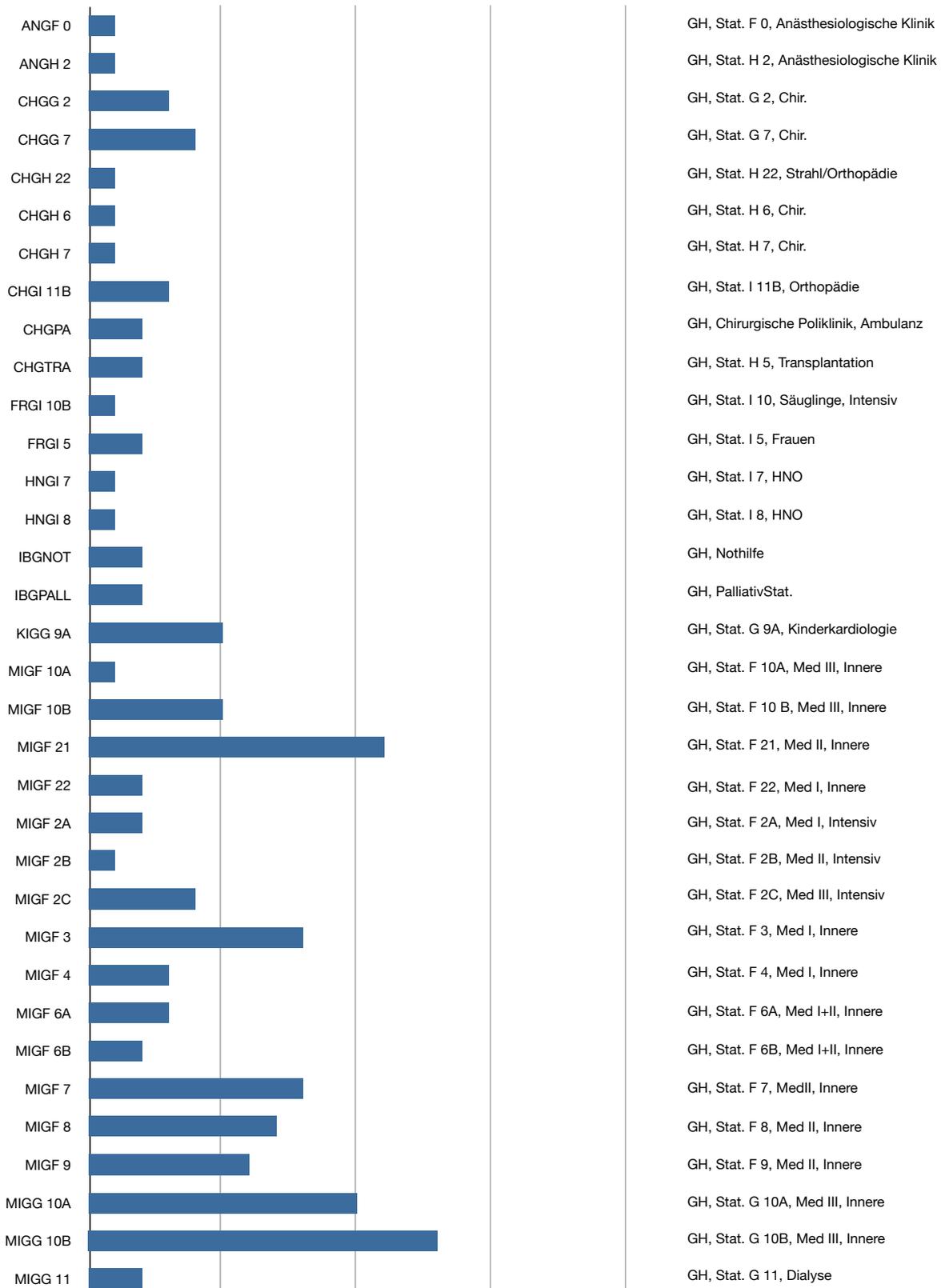


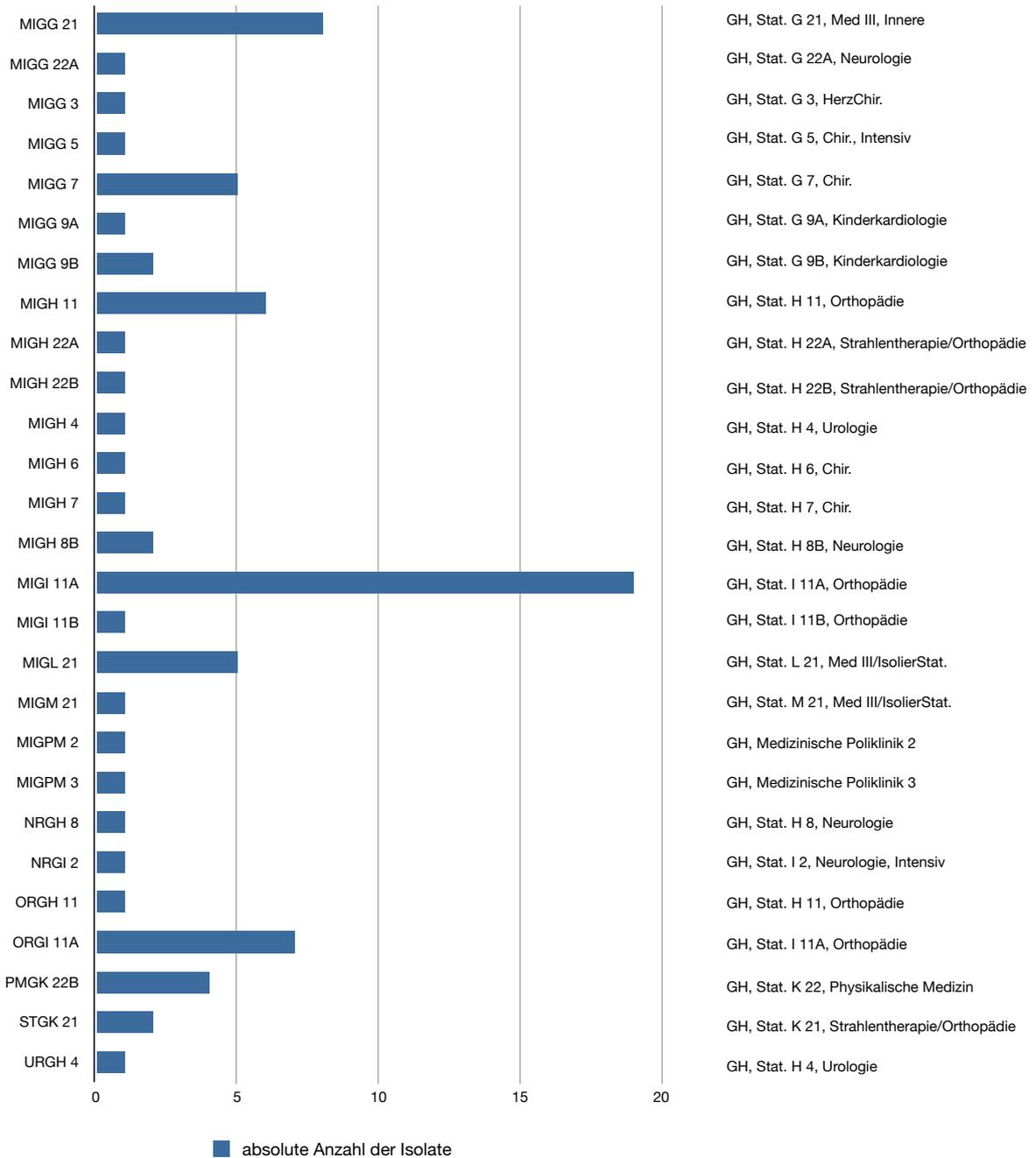
**Abb. 9: Isolate der Medizinischen Klinik Innenstadt Ziemssenstraße**



**Abb. 10: Isolate sonstiger Kliniken**

## Universitätsklinikum München, Standort Großhadern





**Abb. 11: Isolate des Universitätsklinikums München, Standort Großhadern**

### 3.4 Nährmedien und -suspensionen

Alle verwendeten Nährmedien und -suspensionen sind als Standard im Stuhllabor des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie etabliert und im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 3: Nährmedien und -suspension

Nährmedium/-suspension	Bestandteile	Hersteller
Blutplatte	Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
<i>Clostridium difficile</i> -Selektivmedium	s. Produktinformation zum Product Code PB5xxxA	Oxoid, Wesel, Deutschland
<i>Clostridium difficile</i> -Agar (=CNF-Agar)	69 g <i>Clostridium difficile</i> Agar Base 500 mg Cysteinhydrochlorid 3 ml 1 % alkoholische Neutralrotlösung 16 mg Cefoxitin 12 mg Norfloxacin (in wenig 0,1nNaOH gelöst) 50 ml Eidotter-NaCl-Gemisch (1:1) Aqua dest.	
<i>Clostridium difficile</i> -Bouillon	40 g Proteose Pepton Nr. 2 5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g NaCl 6 g Fructose 0,1 g MgSO <sub>4</sub> 0,5 g Cystein.HCl 3 ml 1 % alkoholische Neutralrotlösung 1000ml Aqua dest. 16 mg Cefoxitin 12 mg Norfloxacin (in wenig 0,1nNaOH gelöst) 50 ml Eidotter-NaCl-Gemisch (1:1)	Stuhllabor Großhadern, München, Deutschland

### 3.5 ELISA

Der *C. difficile* Toxin A/B-Antigennachweis basiert auf dem Prinzip des Enzym-Linked-Immunsorbent Assay (ELISA). Dabei handelt es sich um einen qualitativen Test zum Nachweis von Toxin A und Toxin B, die einzeln oder in Kombination bei einer Antibiotika-assoziierten Colitis (AAC) bzw. bei einer PMC von toxischen *C. difficile* gebildet werden.

In dieser Arbeit wurden die aus der Routine-Diagnostik stammenden ELISA-Ergebnisse des zu den Unikliniken gehörenden Stuhllabors retrospektiv betrachtet.

### 3.6 Kultivierung und Aufbewahrung

Die Kultivierung der 330 Stämme erfolgte im Rahmen der Routine-Diagnostik des zum Max von Pettenkofer-Institut gehörenden Stuhllabors Großhadern. Anschließend wurden diese Stämme in Cryobank-Röhrchen gegeben und bei -80 °C aufbewahrt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde retrospektiv auf diese Stammsammlung zurückgegriffen. Hierfür wurden sämtliche Isolate aufgetaut und angezüchtet.

Das Anzüchten der Stämme erfolgte auf Blutplatten und CNFA-Platten. Das anaerobe Milieu wurde durch eine „Genbox Anaer“ gewährleistet. Der hinzugefügte Indikator zeigte ein anaerobes Milieu an. Nach 48 Stunden Bebrütungsdauer bei 37 °C waren auf den Platten gelbe, flache, häufig ausgefrante Kolonien sichtbar, wobei auch der charakteristische Geruch der Kolonien (nach Kresol: „Pferde- oder Raubtierstall“-geruch) wahrnehmbar war. Die Kolonien wurden auf einer Blutplatte ausgestrichen und ebenfalls 48 Stunden bebrütet. Aus diesem bakteriellen Wachstum wurde anschließend *C. difficile*-DNA isoliert.

### 3.7 DNA-Isolierung

Die Isolierung der *C. difficile*-DNA erfolgte mittels einfacher genomischer DNA-Präparation: fünf Einzelkolonien wurden in 100 µl Ampuwa gelöst. Nach zehnminütiger Inkubation bei 95 °C wurden die Eppendorf-Tubes drei Minuten bei 14000 U zentrifugiert. Die aus diesem Überstand gewonnene DNA wurde für die PCR verwendet.

Diese Methode hatte sich in den Experimenten im Vergleich zur DNA-Isolierung mittels DNeasy kit als gleichwertig erwiesen.

### 3.8 PCR

Es wurden drei verschiedene PCR-Zusammensetzungen verwendet:

Für die Gene ***cdd3***, ***cdtA*** und ***cdtB*** sah der 20 µl-Ansatz jeweils wie folgt aus:

- 4 µl der gewonnenen DNA
- 2 µl Reaktionspuffer

- 2 µl dNTP-Mix
- 1 µl Primer 1 (Tim 6/*cdt A* for/*cdt B* for) [18, 61]
- 1 µl Primer 2 (Struppi 6/*cdt A* rev/*cdt B* rev) [18, 61]
- 9,75 µl Ampuwa
- 0,25 µl Taq-Polymerase

Für die Gene ***tpi***, ***tcdA*** und ***tcdB*** wurden folgende 20 µl-Ansätze für eine multiplex-PCR verwendet:

20 µl-Ansatz Kontroll-DNA:

- 0,5 µl Kontroll-DNA (Isolat 331 oder Isolat 332)
- 6 µl Primer (6 x 1µl: *tpi*-F, *tpi*-R, *tcd A*-F, *tcd A*-R, *tcd B*-F, *tcd B*-R) [36]
- 2 µl dNTP
- 2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl Puffer Takara
- 7,3 µl H<sub>2</sub>O
- 0,2 µl Taq Takara

20 µl-Ansatz *C.difficile*-DNA:

- 4 µl DNA von Bakterienpräparation
- 6 µl Primer (6 x 1µl: *tpi*-F, *tpi*-R, *tcd A*-F, *tcd A*-R, *tcd B*-F, *tcd B*-R) [36]
- 2 µl dNTP
- 2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl Puffer Takara
- 3,8 µl H<sub>2</sub>O
- 0,2 µl Taq Takara

Für das *tcdC*-Gen diene folgender 50 µl-Ansatz als Grundlage für die spätere Sequenzierung dieses Gens:

- 1 µl DNA(von DNeasy kit)
- 1 µl Primer C1 [61]
- 1 µl Primer C2 [61]
- 5 µl dNTP
- 5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl Taq Takara
- 36,5 µl H<sub>2</sub>O

Alle verwendeten Primer sind in folgender Tabelle dargestellt [18, 36, 61]:

**Tabelle 4: Primer - inkl. Bindungsstellen, Gen und Produktgröße**

Primer	Bindungsstelle	Gen	Produkt
Tim 6	5'-TCCAATATAATAAATTAGCATTCCA-3'	<i>cdd-3</i>	622 bp
Struppi 6	5'-GGCTATTACACGTAATCCAGATA-3'		
cdt A for	5'-TGAACGTGGAAAAGGTGATG-3'	<i>cdtA</i>	350 bp
cdt A rev	5'-AGGATTATTTACTGGACCATTTG-3'		
cdt B for	5'-CTTAATGCAAGTAAATACTGAG-3'	<i>cdtB</i>	490 bp
cdt B rev	5'-AACGGATCTCTTGCTTCAGCT-3'		
tpi-F	5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'	<i>tpi</i>	230 bp
tpi-R	5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3'		
tcd B-F	5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3'	<i>tcdB</i>	160 bp
tcd B-R	5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3'		
tcd A-F	5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3'	<i>tcdA</i>	370 bp
tcd A-R	5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3'		
C1	5'-TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCC-3'	<i>tcdC</i>	720 bp
C2	5'-TCTAATAAAAGGGAGATTGTATTATG-3'		

Folgendes PCR-Thermocyclerprogramm wurde gewählt:

- 94 °C 1 min                      Standard
- 94 °C 50 s
- 51 °C 1 min                    } spezielle Einstellung, 35 Zyklen
- 73 °C 1 min                    }
- 72 °C 5 min                    Standard

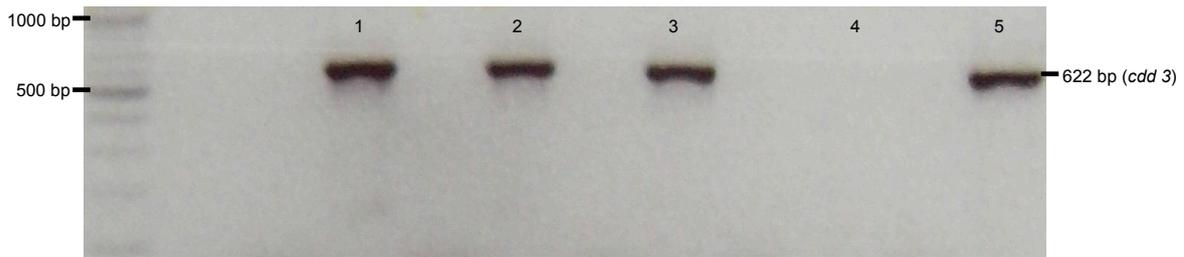
### 3.9 Agarosegelelektrophorese

Jede Probe wurde in Probenauftragspuffer (7 Teile Ampuwa, 3 Teile Glycerin, 0,1 % Xylencyanol) gelöst und in eine Tasche eines 2,2 %igen Agarosegels gefüllt. Zur Herstellung und für die Überschichtung des Gels wurde 1 %iger TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung enthielt das Gel 2 µl Ethidiumbromid. Als Marker diente ein 100 bp-Marker. Nach 60 Minuten bei 100 V wurden die gesuchten Banden unter UV-Licht betrachtet.

Als Kontrolle, ob es sich tatsächlich um *C. difficile*-Stämme handelt, wurden alle Isolate auf *cdd 3* und ein Species-spezifisches Fragment von *tpi* untersucht [36, 61]: *cdd 3* ist ein Teil der Nukleotidsequenz von *C. difficile*. Es ist eines von insgesamt sieben sowohl bei toxinogenen als auch bei nicht-toxinogenen *C. difficile*-Stämmen nachweisbaren offenen Leserastern [6]. Bei *tpi* handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Triosephosphat-Gen [36].

Als **Negativ**kontrolle diente bei jedem Versuch eine Probe, die statt DNA Wasser enthielt.

Als **Positiv**kontrolle dienten zwei von Herrn Prof. Kist (Deutsches Konsiliarlabor für gastrointestinale Infektionen, Universität Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Kontrollstämme und *C. difficile*-DNA von ATCC (BAA-1382D-5 *C. difficile*) mit folgenden Eigenschaften: positive Gene für Toxin A und B sowie positive Gene für das binäre Toxin.



**Abb. 12: *cdd 3*-Nachweis** inklusive Wasser- und DNA-Kontrolle.

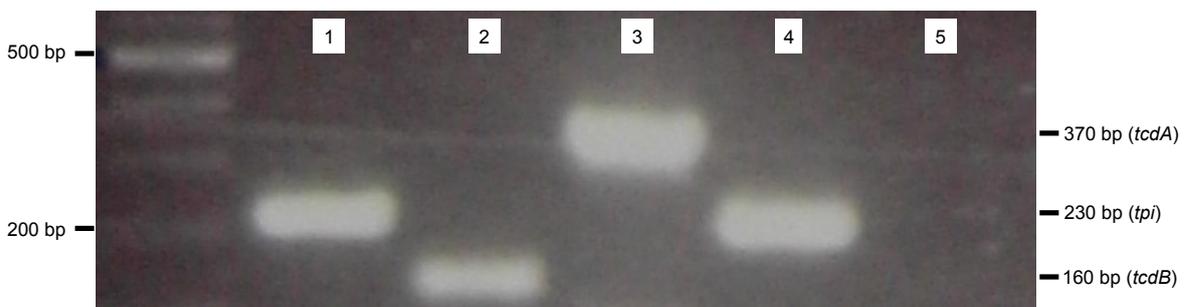
Spur 1: Isolat 26

Spur 2: Isolat 27

Spur 3: Isolat 28

Spur 4: Wasser

Spur 5: Isolat 331 (Kontrollstamm)



**Abb. 13: *tpi*-Nachweis** inklusive DNA- und Wasser-Kontrolle.

Spur 1: Isolat 331 (Kontrollstamm)

Spur 2: Isolat 331 (Kontrollstamm)

Spur 3: Isolat 331 (Kontrollstamm)

Spur 4: Isolat 42

Spur 5: Wasser

### 3.10 E-Test

Die Moxifloxacin-Empfindlichkeit wurde mittels E-Test von AB Biodisk bestimmt. Dieser Test diente bei den Versuchen dazu, die minimale Hemmkonzentration (MHK) von *C. difficile* gegenüber dem Antibiotikum Moxifloxacin zu bestimmen. Dazu wurde jeweils eine Blutplatte mit in Nährbouillon gelösten *C. difficile*-Kolonien gleichmäßig in drei Richtungen überstrichen. Nach 10-minütiger Trocknungszeit wurde der E-Teststreifen aufgebracht. Nach 48 h Inkubationszeit

konnte das E-Test-Ergebnis abgelesen werden. Ab einer MHK von 8 µg/ml galt ein Stamm als resistent laut dem Institut für Standards in Klinik und Labor (ISKL) [68].

### 3.11 Gelextraktion und Sequenzierung

Um eine mögliche 18 bp-Deletion im *tcdC*-Gen nachweisen zu können, sequenzierten wir bei einigen Stämmen die 720 bp große *tcdC*-Region.

Hierfür wurde zunächst eine DNA-Isolierung mittels Quiagen DNeasy kit durchgeführt.

Für die sich daran anschließende PCR wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

50 µl-Ansatz:

1 µl DNA (von Quiagen DNeasy kit)

1 µl Primer C1 (5'-TTAATTAATTTCTCTACAGCTATCC-3')

1 µl Primer C2 (5'-TCTAATAAAAGGGAGATTGTATTATG-3')

5 µl dNTP

5 µl MgCl<sub>2</sub>

0,5 µl Taq Takara

36,5 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR-Maschinen-Einstellung war dieselbe wie in Abschnitt 3.8 (S. 27).

Für die Agarosegelelektrophorese wurden folgende Materialien verwendet:

Puffer: 7 Teile Ampuwa, 3 Teile Glycerin, 2 µl Xylencyanol

Gel: 2,2 %iges Agarosegel (1 %iger TAE-Puffer)

2 µl Ethidiumpromid

100 bp-Marker (BioLabs, N 3231S)

Die Einstellung war 60 Minuten bei 100 Volt.

Die in diesem Gel entstandenen Banden wurden mit dem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten. Mittels Gelextraktionskit von Quiagen fand die DNA-Extraktion der isolierten Bande statt. So erhielt man das gewünschte DNA-Fragment (720 bp *tcdC*-Gen) für die sich daran anschließende **Ligation**:

3 µl dieses DNA-Fragments wurden mittels TOPO TA cloning® kit von invitrogen in den Vektor pCR®2.1-TOPO®3.9kb kloniert. So entstand ein rekombiniertes DNA-Molekül, das nun für die **Transformation** verwendet werden konnte:

4 µl dieses rekombinierten DNA-Moleküls (Vektor + 720 bp *tcdC*-Gen) wurden mittels Elektroporation in *Escherichia coli* transformiert, auf X-Gal-beschichteten LB-Agar-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Es folgte die Selektion transformierter Zellen: durch das in der Beschichtung der Platten enthaltene Enzym β-Galaktosidase war eine Unterscheidung der normalen Vektormoleküle (blaue Kolonien) im Gegensatz zu rekombinierten Molekülen (weisse Kolonien) möglich. Die Produktisolierung fand mit dem Mini-Prep Plasmid-DNA Kit von Quiagen statt.

Die so gewonnene DNA wurde dann zur Sequenzierung über den Primer M13 forward zu GATC Biotech, Konstanz, Deutschland geschickt.

### **3.12 Ribotypisierung**

Die Ribotypisierung wurde vom Deutschen Konsiliarlabor für gastrointestinale Infektionen, Universität Freiburg, unter Leitung von Herrn Prof. Kist in Anlehnung an das Protokoll von Bidet [4] übernommen. Zusätzlich wurden die Stämme ans Referenzlabor für Anaerobier in Cardiff geschickt, um die Freiburger Ribotypen mit den üblicherweise verwendeten Ribotypen nach Stubbs vergleichen zu können [62, 63].

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Stuhl-ELISA

Im routinemäßig durch das Stuhllabor Großhadern durchgeführten Toxin A/B-ELISA waren 29,4 % (n=97) der Stämme Toxin-**negativ** und 70,6 % (n=233) Toxin-**positiv**:

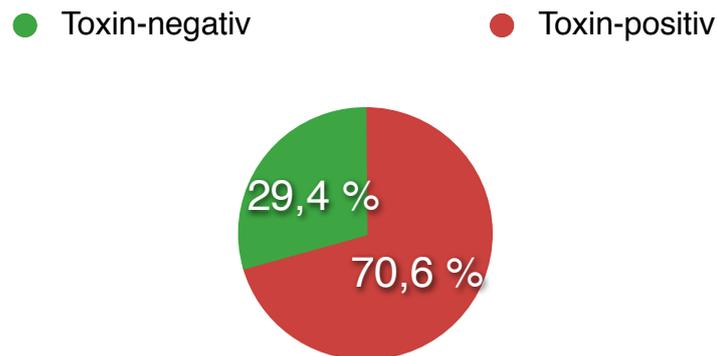
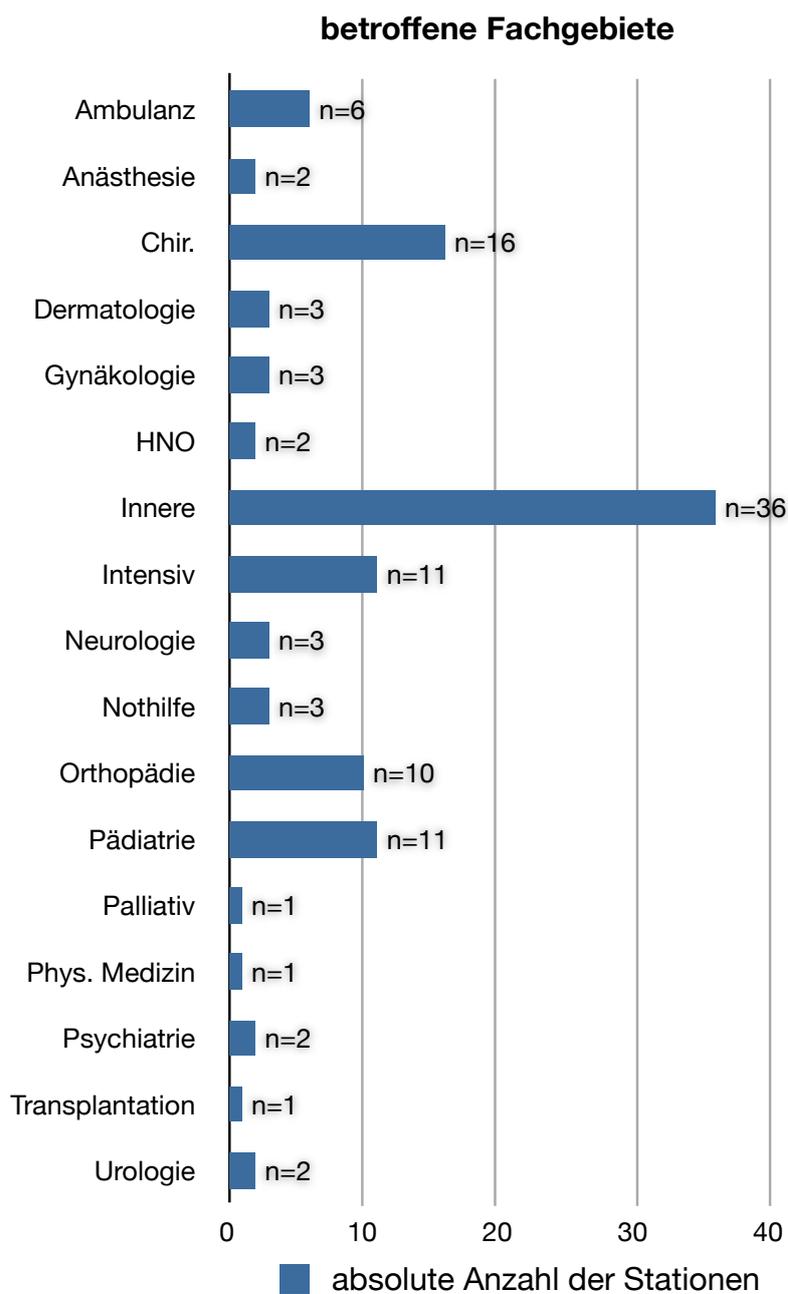


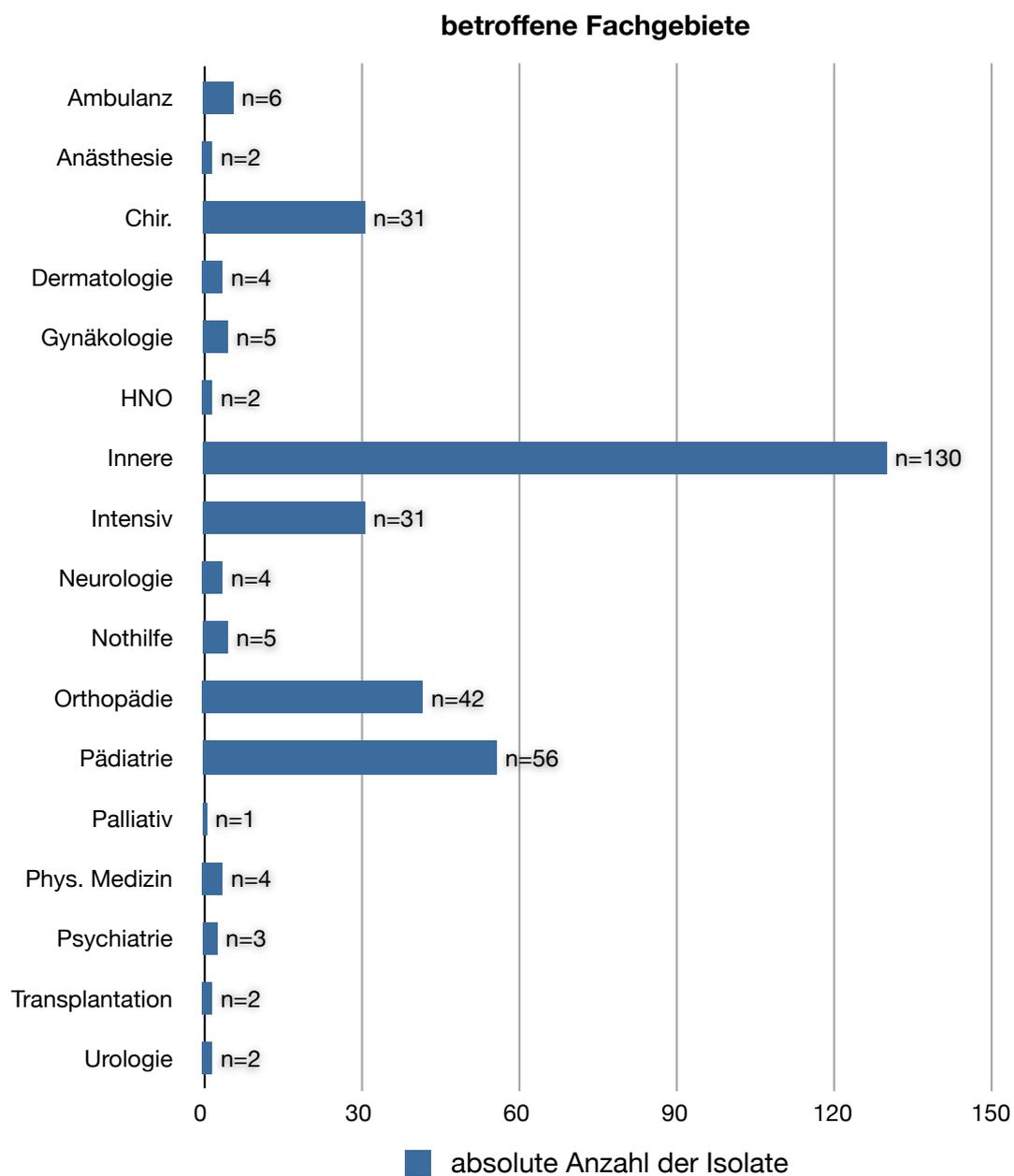
Abb. 14: Toxin A/B-ELISA

### 4.2 Betroffene Fachgebiete

39,4 % aller Isolate stammten von Stationen der **Inneren Medizin** (130 von 330). Das am zweithäufigsten betroffene Fachgebiet war mit 16,9 % die **Pädiatrie** (56 von 330). Weitere häufig betroffene Fachgebiete waren **Orthopädie-, Chirurgie- und Intensivstationen**: 12,7 % (42 von 330) und je 9,4 % (31 von 330). In den nachfolgenden Abbildungen ist zuerst die absolute Anzahl der betroffenen **Stationen** dargestellt und daran anschließend die absolute Anzahl der **Isolate** - jeweils aufgeteilt nach Fachgebieten:



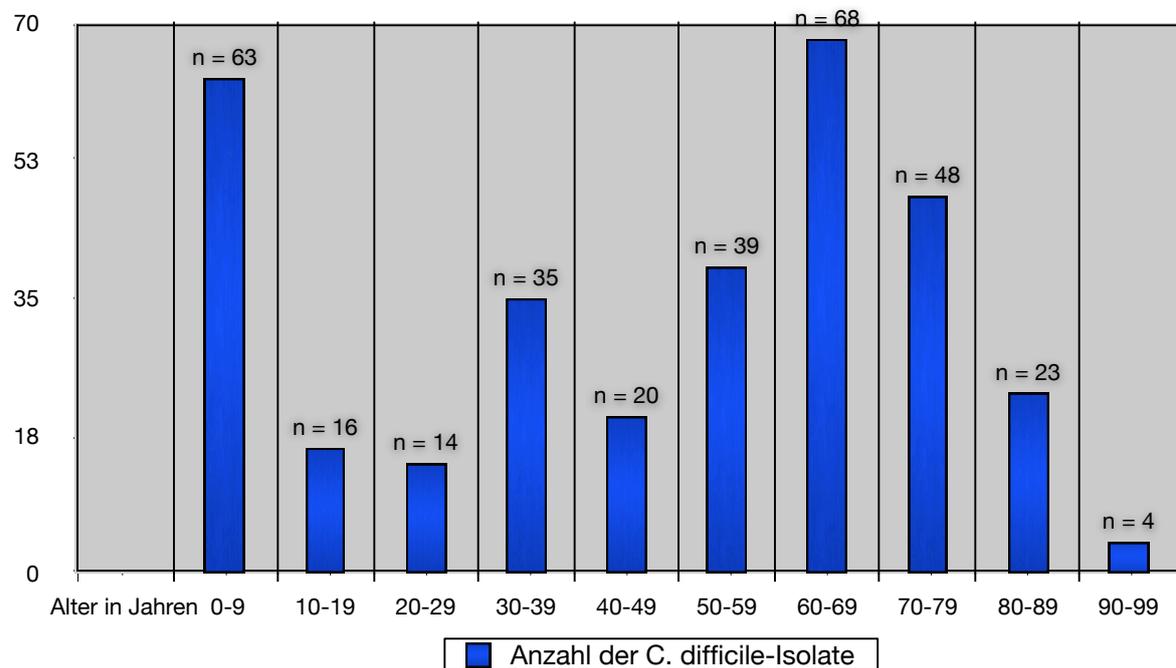
**Abb. 15: Betroffene Fachgebiete - absolute Anzahl der Stationen**



**Abb. 16: Betroffene Fachgebiete - absolute Anzahl der Isolate**

### 4.3 Altersspezifische Verteilung

Alle 330 Isolate sind nach Altersgruppen aufgeteilt in Abbildung 17 dargestellt:

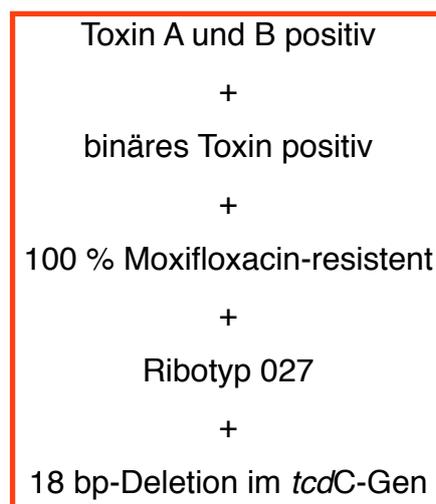


**Abb. 17: Verteilung der Isolate nach Altersgruppen**

In der Altersgruppe 0-9 fanden sich 19,1 % (= 63 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 10-19 fanden sich 4,9 % (= 16 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 20-29 fanden sich 4,2 % (= 14 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 30-39 fanden sich 10,6 % (= 35 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 40-49 fanden sich 6,1 % (= 20 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 50-59 fanden sich 11,8 % (= 39 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 60-69 fanden sich 20,6 % (= 68 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 70-79 fanden sich 14,6 % (= 48 von 330) der Isolate, in der Altersgruppe 80-89 fanden sich 6,9 % (= 23 von 330) der Isolate und in der Altersgruppe 90-99 fanden sich 1,2 % (= 4 von 330) der Isolate.

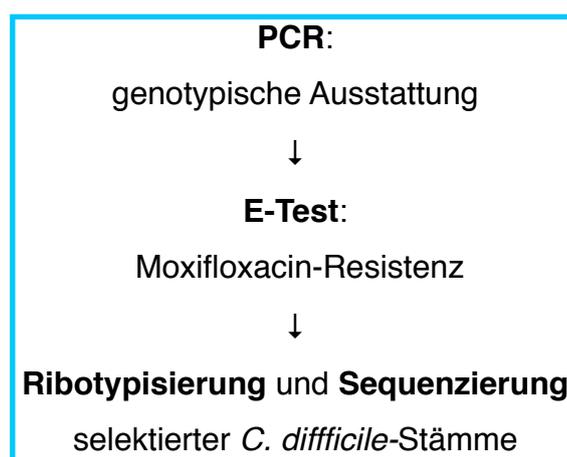
### 4.4 Reihenfolge der Versuche

Alle Versuche wurden im Hinblick auf das mögliche Auftreten des hypervirulenten Epidemiestammes NAPI/O27 durchgeführt. Dieser zeigt folgende Merkmale (Abb. 18) [42]:



**Abb. 18: Merkmale des hypervirulenten Epidemiestammes, Ribotyp 027**

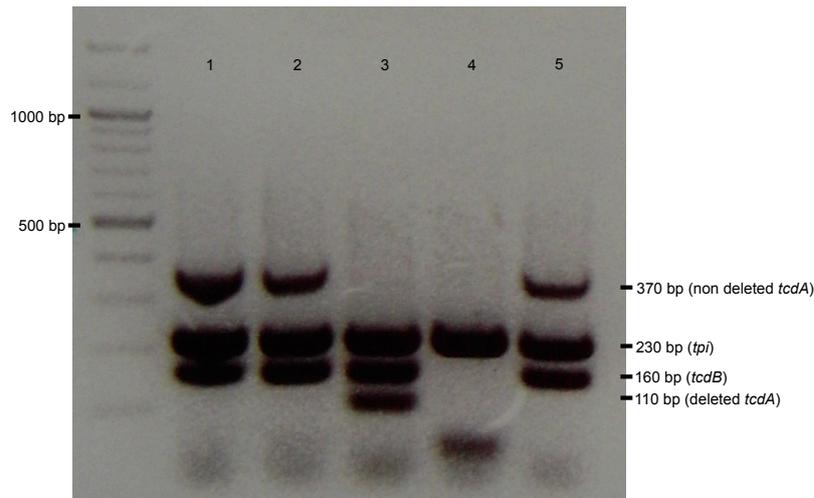
Die Reihenfolge der Versuche dieser Arbeit sah wie folgt aus:



**Abb. 19: Reihenfolge der Versuche**

#### 4.5 PCR: genotypische Ausstattung

Mit der aus den 330 Isolaten gewonnenen *C. difficile*-DNA wurde eine PCR durchgeführt, um die für die Toxine A und B kodierenden Gene nachzuweisen. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um *C. difficile*-Stämme handelt, wurde ein Species-spezifisches Fragment (*tpi* = Triose-Phosphat-Isomerase) verwendet [36]. Die daraus resultierenden Banden sind in Abbildung 20 dargestellt:



**Abb. 20: Charakterisierung von vier *C. difficile*-Stämmen (multiplex PCR).**

Spur 1: *tcdA* + & *tcdB* +, Kontrollstamm 331

Spur 2: *tcdA* + & *tcdB* +, Isolat 36

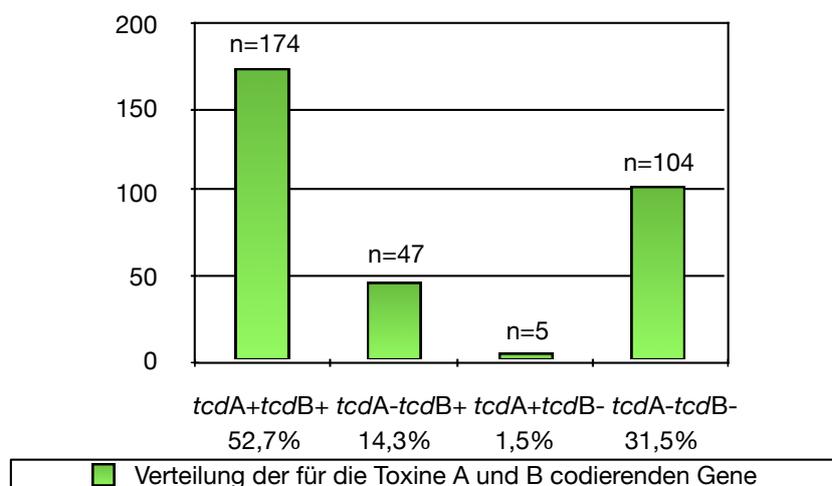
Spur 3: *tcdA* - & *tcdB* +, Isolat 37

Spur 4: *tcdA* - & *tcdB* -, Isolat 38

Spur 5: *tcdA* + & *tcdB* +, Isolat 39

Alle 330 mittels multiplex PCR untersuchten Stämme enthielten das für *C. difficile* spezifische *tpi*-Gen.

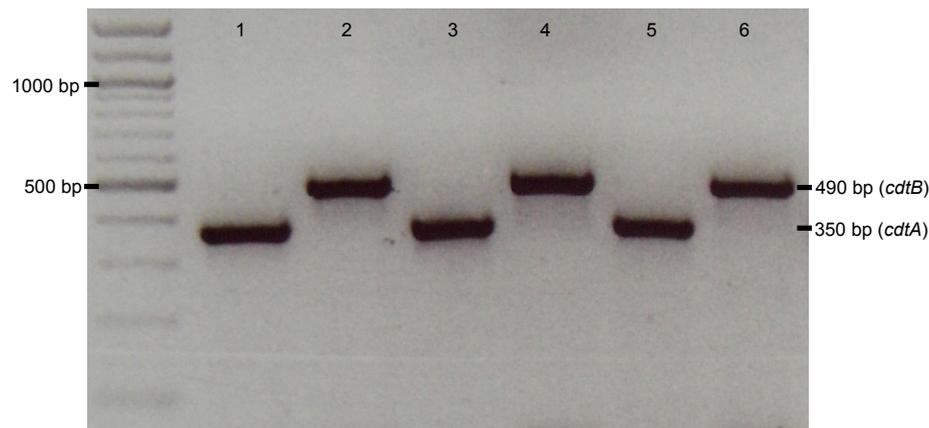
Die Ergebnisse der Toxinverteilung aller 330 Isolate sind in Abbildung 21 dargestellt:



**Abb. 21: Genotypen - absolute & prozentuale Verteilung**

So war eine Genotypisierung der *C. difficile*-Stämme möglich, nachdem der Stuhl-ELISA eine erste Information über das Vorhandensein von Toxin A und/oder B geliefert hatte. Damit erfüllen 52,7 % unserer Stämme das erste Merkmal des hypervirulenten *C. difficile*-Stammes.

Zusätzlich wurden bei allen 330 Isolaten die für das binäre Toxin (bi) kodierenden Gene *cdtA* und *cdtB* mittels PCR gesucht (Abb. 22):



**Abb. 22: *C. difficile*-Stämme, bei denen die für das binäre Toxin codierenden Gene *cdtA* und *cdtB* vorhanden sind.**

Spur 1: Isolat 276, *cdtA*+

Spur 4: Isolat 303, *cdtB*+

Spur 2: Isolat 276, *cdtB*+

Spur 5: Isolat 332 (Kontrollstamm) *cdtA*+

Spur 3: Isolat 303, *cdtA*+

Spur 6: Isolat 332 (Kontrollstamm) *cdtB*+

Die genaue genotypische Ausstattung aller 330 Stämme ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 23) dargestellt, wobei die **blauen** Säulen (= linker Teil der Graphik) diejenigen Stämme darstellen, die *cdtA* und *cdtB* negativ sind. Die **roten** Säulen (= rechter Teil der Graphik) stellen diejenigen Stämme dar, die *cdtA* und *cdtB* positiv sind. Von den 330 untersuchten Stämmen tragen insgesamt 26 Isolate (7,9 %) die Gene für das binäre Toxin. Hinsichtlich der Merkmale des hypervirulenten Stammes sind die durch einen Kreis gekennzeichneten fünf Stämme (1,5 % der 330 Stämme) besonders verdächtig, da diese Stämme sowohl die Gene für die Toxine A und B, als auch die Gene für das binäre Toxin tragen:

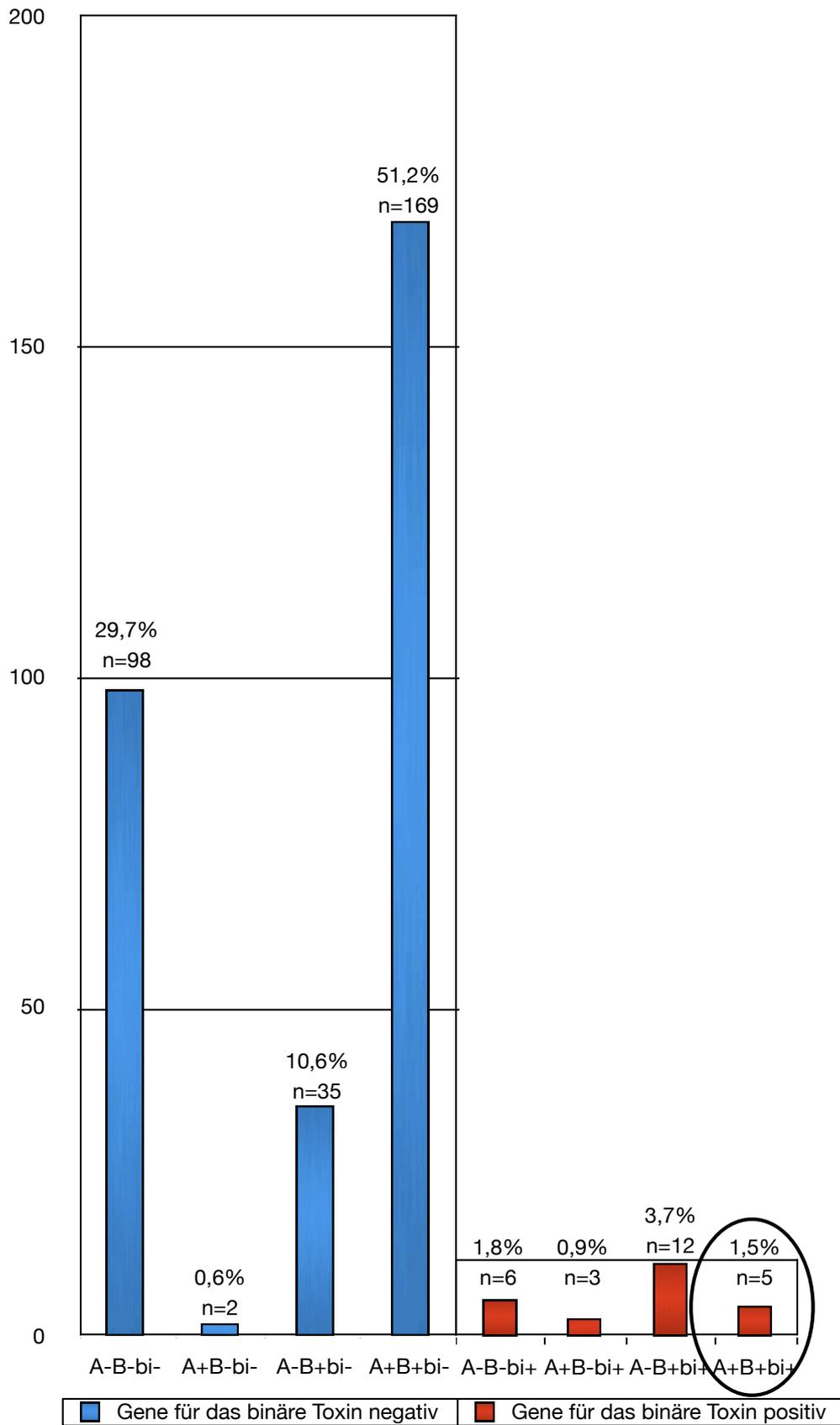
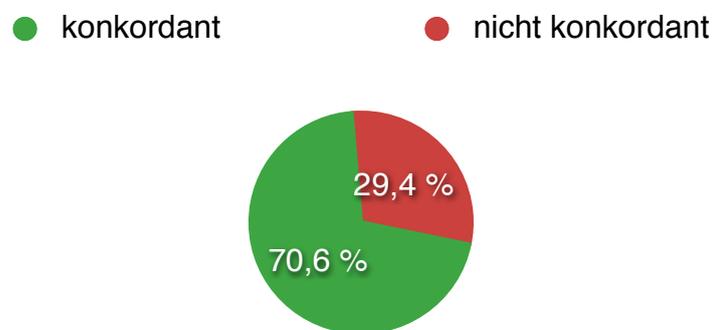


Abb. 23: Vollständige genotypische Ausstattung aller 330 Stämme

#### 4.6 Vergleich ELISA-PCR

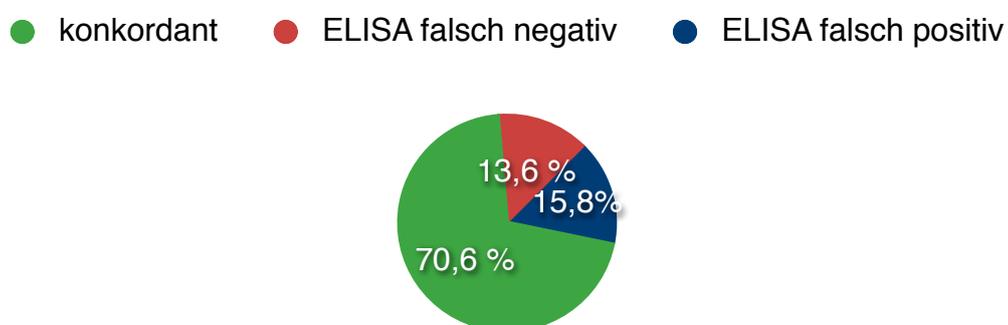
Ergänzend zu den Experimenten wurden die Ergebnisse des Toxin-ELISA mit den genotypischen Ergebnissen der PCR verglichen: Im ELISA waren 97 Isolate Toxin-negativ. In der PCR zeigten sich 104 Toxin-negative Ergebnisse. Das ergibt eine Differenz von sieben vom ELISA als **falsch-positiv** erkannten Ergebnissen.

Daher wurde jedes ELISA-Ergebnis mit dem jeweiligen PCR-Ergebnis verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse häufig **nicht konkordant** waren: In 29,4 % (= 97 von 330) der Fälle stimmten die ELISA-Ergebnisse nicht mit den PCR-Ergebnissen überein. In 70,6 % (= 233 von 330) der Fälle waren die Ergebnisse **konkordant**:



**Abb. 24: Vergleich ELISA-PCR: konkordante vs. nicht-konkordante Ergebnisse**

In 13,6 % (= 45 von 330) der Fälle ergab der ELISA ein **falsch-negatives** Ergebnis, in 15,8 % (= 52 von 330) der Fälle ergab der ELISA ein **falsch-positives Ergebnis**:



**Abb. 25: Vergleich ELISA-PCR: konkordante vs. falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse**

Als positives PCR-Ergebnis wurden hierbei folgende *tcdA/tcdB*-Kombinationen gewertet: *tcdA+tcdB+*, *tcdA+tcdB-* sowie *tcdA-tcdB+*. Als negatives PCR-Ergebnis wurde die Kombination *tcdA-tcdB-* gewertet.

Beim ELISA war eine solche Einteilung nicht möglich, da der ELISA nur negativ oder positiv sein kann.

Die **Sensitivität** des ELISA beträgt 79,7 % und die **Spezifität** 50,0 %:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{als Toxin-positiv Erkannte (aus ELISA)}}{\text{alle Toxin-Positive (aus PCR)}} = \frac{180}{266} = 79,7 \%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{als Toxin-negativ Erkannte (aus ELISA)}}{\text{alle Toxin-Negative (aus PCR)}} = \frac{52}{104} = 50,0 \%$$

#### 4.7 E-Test

Bei allen 330 Isolaten wurde die Empfindlichkeit gegenüber dem Fluorchinolon Moxifloxacin getestet. 36,7 % (= 121 von 330) der Stämme waren resistent. In Tab. 5 sind alle gegenüber Moxifloxacin resistenten (= Moxi-R) Isolate aufgeführt, deren Gene für das binäre Toxin **negativ** sind. In Tab. 6 sind alle gegenüber Moxifloxacin resistenten Isolate aufgeführt, deren Gene für das binäre Toxin **positiv** sind:

**Tab. 5: Genotypen und Moxifloxacin-Resistenz (cdtA/B-)**

Genotyp	<i>tcdA-tcdB-</i>	<i>tcdA+tcdB-</i>	<i>tcdA-tcdB+</i>	<i>tcdA+tcdB+</i>	<b>cdtA/B-</b>
Moxi-R	n=25	n=0	n=13	n=73	
	25,5 %	0 %	37,1 %	43,2 %	

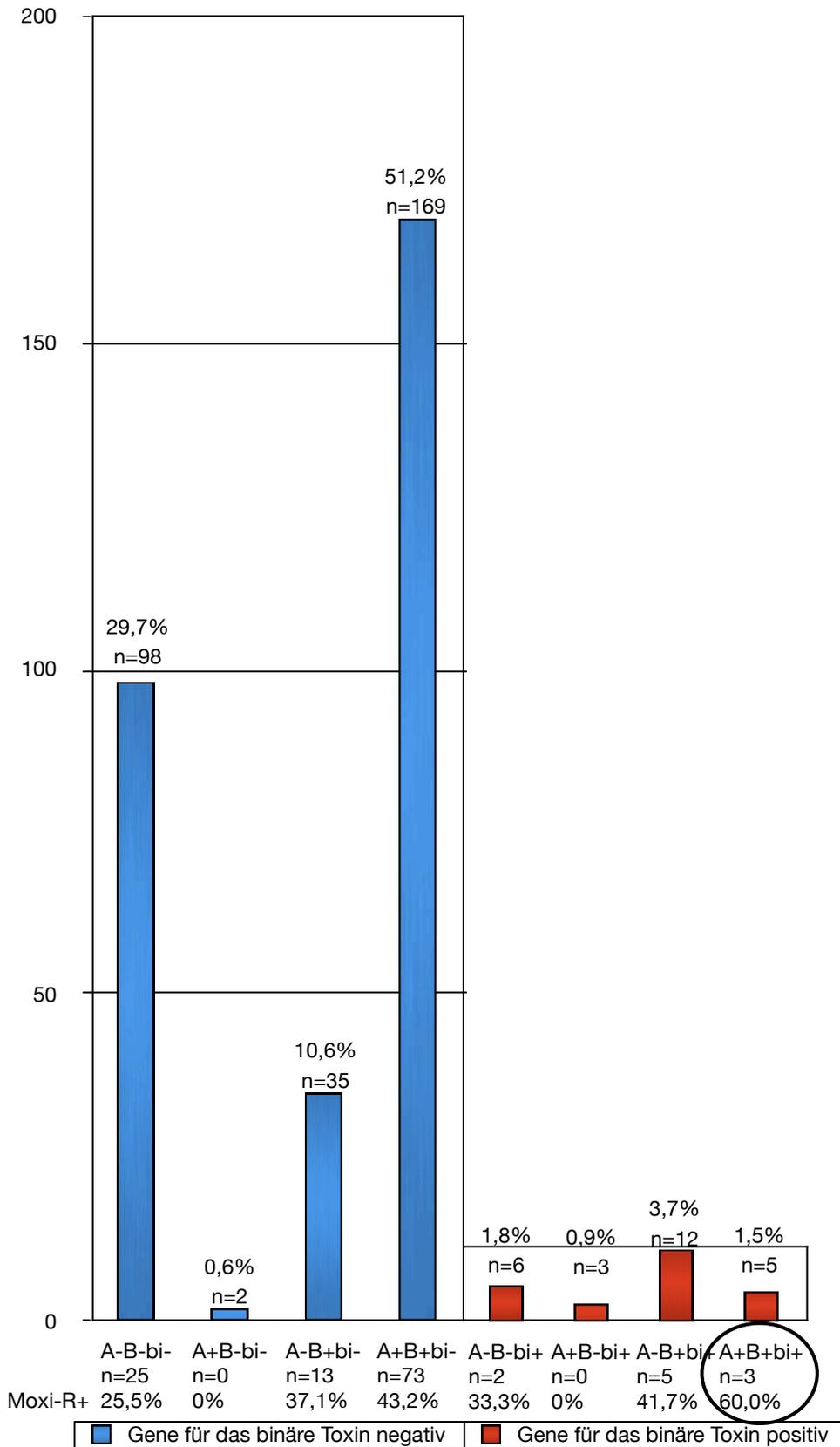
**Tab. 6: Genotypen und Moxifloxacin-Resistenz (cdtA/B+)**

Genotyp	<i>tcdA-tcdB-</i>	<i>tcdA+tcdB-</i>	<i>tcdA-tcdB+</i>	<i>tcdA+tcdB+</i>	<b>cdtA/B+</b>
Moxi-R	n=2	n=0	n=5	n=3	
	33,3 %	0 %	41,7 %	60,0 %	

Bezüglich unserer Suche nach dem hypervirulenten Stamm bleiben von den ursprünglich fünf verdächtigen Stämmen noch drei, die bisher alle Merkmale des

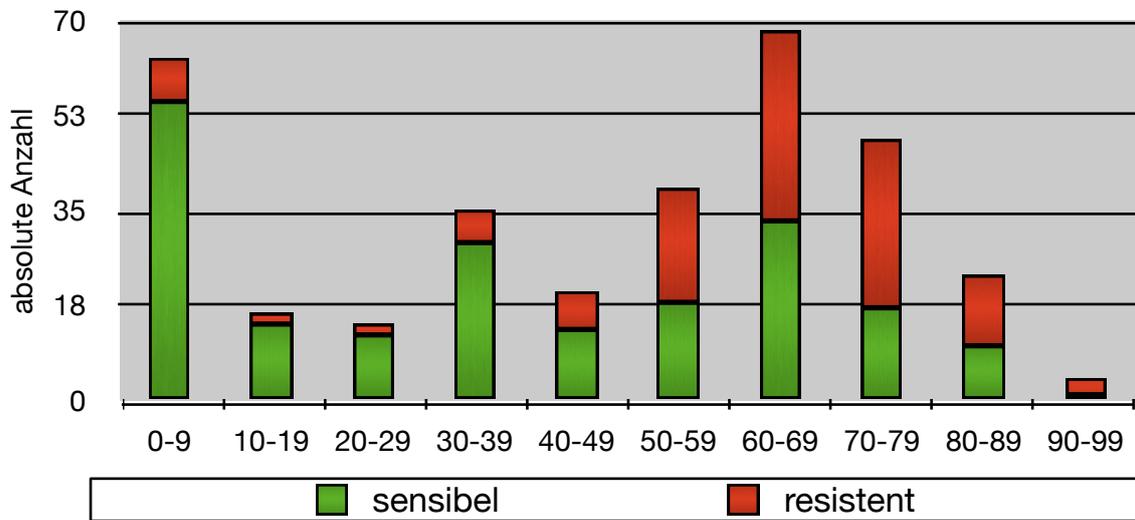
Epidemiestammes erfüllen (sie sind in Tab. 6 durch einen roten Kasten graphisch hervorgehoben): *tcdA+*, *tcdB+*, *cdtA/B+* und Moxifloxacin-resistent.

In Abbildung 26 ist nun die gesamte genotypische Ausstattung sowie die Verteilung der Moxifloxacin-Resistenz aller 330 Isolate dargestellt. Durch einen Kreis sind die verbliebenen drei höchstverdächtigen Stämme graphisch hervorgehoben:



**Abb. 26: Genotypische Ausstattung inkl. Moxifloxacin-Resistenz aller *C. difficile* -Stämme**

Ergänzend wurde die Resistenzrate in Bezug auf das Alter untersucht (Abb. 27).



**Abb. 27: Moxifloxacin-Sensibilität vs. -Resistenz**

In der Altersgruppe 0-9 sind 12,7 % (8 von 63) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 10-19 sind 12,5 % (2 von 16) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 20-29 sind 14,3 % (2 von 14) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 30-39 sind 17,1 % (6 von 35) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 40-49 sind 35,0 % (7 von 20) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 50-59 sind 53,8 % (21 von 39) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 60-69 sind 51,5 % (35 von 68) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 70-79 sind 64,6 % (31 von 48) der untersuchten Isolate, in der Altersgruppe 80-89 sind 56,5 % (13 von 23) der untersuchten Isolate und in der Altersgruppe 90-99 sind 75,0 % (3 von 4) der untersuchten Isolate **Moxifloxacin-resistent (=Moxi-R)**.

#### 4.8 Ribotypisierung und Sequenzierung selektierter Stämme

Um endgültig festzustellen, ob der hypervirulente Stamm 027 in dem untersuchten Kollektiv vorhanden ist, wurden die **drei höchstverdächtigsten Stämme (A+B+bi+ und Moxi-R)** zur **Ribotypisierung** in das unter der Leitung von Herrn Prof. Kist

stehende Deutsche Konsiliarlabor für gastrointestinale Infektionen in Freiburg geschickt.

**Tab. 7: Ribotypisierung der drei höchstverdächtigen Stämme**

Isolat Nr.	Genotyp	MHK für Moxifloxacin in µg/ml	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
276	A+B+bi+	> 32	n.t.	n.t.
303	A+B+bi+	> 32	94	-
330	A+B+bi+	> 32	94	-

(n.t. = nicht typisierbar)

Hierbei trat der Ribotyp Freiburg 94 (keine Entsprechung in der UK-Nomenklatur) zweimal auf. Der dritte Stamm konnte keinem Ribotypen zugeordnet werden.

**Somit fand sich der epidemische hypervirulente Stamm NAPI/027 in keinem der 330 untersuchten Isolate.**

Zusätzlich wurden die **zwei A+B+bi+ Moxifloxacin-sensiblen (= Moxi-S)-** Stämme zur Ribotypisierung geschickt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt:

**Tab. 8: Ribotypen der zwei A+B+bi+ (Moxi-S) Stämme**

Isolat Nr.	Genotyp	MHK für Moxifloxacin in µg/ml	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
72	A+B+bi+	1,5	28	023
305	A+B+bi+	1,5	n.t.	n.t.

Bei Isolat Nr. 72 fand sich der Ribotyp Freiburg 28 (= Ribotyp UK 023). Das zweite Isolat konnte keinem Ribotypen zugeordnet werden.

Zusätzlich wurden **14 weitere** (zufällig ausgewählte) Stämme zur Ribotypisierung geschickt (Tab. 9):

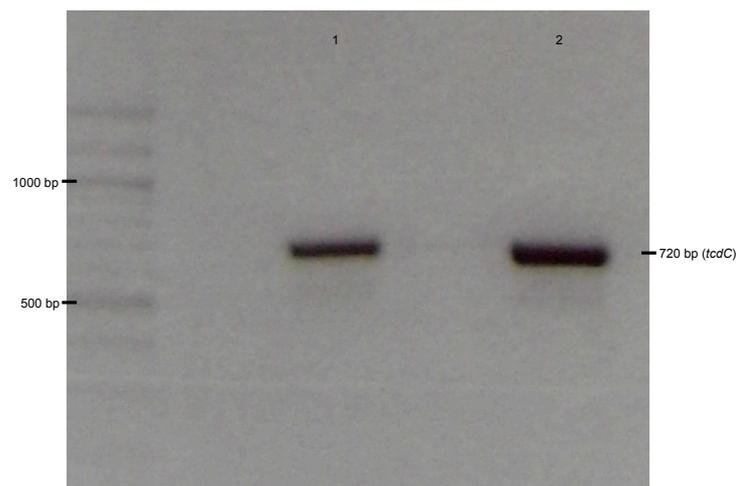
Tab. 9: Ribotypisierung 14 zufällig ausgewählter Stämme

Isolat Nr.	Genotyp	E-Test in µg/ml	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
14	A-B+bi+	> 32	40	078
137	A-B-bi+	1,5	40	078
143	A-B+bi+	1	40	078
150	A-B+bi+	> 32	40	078
179	A-B-bi+	> 32	n.t.	-
187	A-B+bi+	1,5	40	078
188	A-B+bi+	1,5	94	-
240	A-B+bi+	> 32	40	078
290	A-B-	> 32	45	001
296	A-B-	> 32	45	001
324	A+B+	1,5	22	94
327	A+B+	> 32	45	001
328	A+B+	> 32	45	001
329	A+B+	> 32	45	001

(n.t. = nicht typisierbar)

Der Ribotyp Freiburg 40 (= Ribotyp UK 078) fand sich bei sechs der 14 Isolate. Der Ribotyp Freiburg 45 (= Ribotyp UK 001) zeigte sich bei fünf der 14 Stämme. Die Ribotypen Freiburg 94 (keine Entsprechung bei UK-Nomenklatur) sowie 22 (= Ribotyp UK 94) traten jeweils einmal auf. Ein Isolat konnte keinem Ribotypen zugeordnet werden.

Um einen Eindruck zu gewinnen, welche **tcdC-Sequenzen** es in den Stämmen gibt, wurde bei einem der zwei **A+B+bi+ Moxi-S** Stämme, zwei der drei höchstverdächtigen **A+B+bi+ Moxi-R** Stämme und 13 der 14 zufällig gewählten Isolate die *tcdC*-Region des Pathogenitäts-Lokus sequenziert. Um das dafür nötige Material zu gewinnen, wurde eine PCR durchgeführt:



**Abb. 28: PCR von *tcdC***

Spur 1: Isolat 303, *tcdC*+

Spur 2: Isolat 330, *tcdC*+

Die Ergebnisse der sich an die PCR anschließenden Sequenzierung sind in Tab. 10 dargestellt:

**Tab. 10: Sequenzierung 19 ausgewählter Stämme**

Isolat Nr.	Genotyp	MHK für Moxifloxacin in µg/ml	Sequenzierung der <i>tcdC</i> - Region
290	A-B-	> 32	sc 3
296	A-B-	> 32	sc 3
137	A-B-bi+	1,5	A1
179	A-B-bi+	> 32	A1
143	A-B+bi+	1	A1
187	A-B+bi+	1,5	A1
188	A-B+bi+	1,5	mp 2
14	A-B+bi+	> 32	A1
150	A-B+bi+	> 32	A1
240	A-B+bi+	> 32	in etwa sc 1 (einzelne Basenabweichungen)
324	A+B+	1,5	B
327	A+B+	> 32	sc 3
328	A+B+	> 32	n.s.
329	A+B+	> 32	sc 3
72	A+B+bi+	1,5	mp 1

305	A+B+bi+	1,5	n.s.
276	A+B+bi+	> 32	n.s.
303	A+B+bi+	> 32	A1
330	A+B+bi+	> 32	A1

(n.s. = nicht sequenziert)

In Anlehnung an Curry et al. [10] fand sich der Genotyp A1 achtmal, der Genotyp sc 3 viermal, die Genotypen sc 1 und B jeweils einmal. Die Genotypen mp 1 und mp 2 (Abkürzungen selbst gewählt) wurden bisher noch nicht beschrieben. Sie fanden sich jeweils einmal.

Eine **18bp-Deletion** fand sich bei den Genotypen B und mp 2.

Die **Wildtyp-Sequenz** ist im Folgenden im Abgleich zur bei uns aufgetretenen **tcdC-A1-Sequenz** dargestellt. Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz sind hierbei farblich hervorgehoben. Ebenfalls dargestellt und farblich (gelb) hervorgehoben ist die **18 bp-Deletion von NAPI/027**.





Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die *tcdC-A1*-Sequenz mehrere Punktmutationen sowie eine 39 bp-Deletion.

Abschließend ist die Sequenz des Wildtyps im Abgleich mit den bei uns aufgetretenen **Sequenzen** A1, B, mp 1 und mp 2, sc1 und sc3 dargestellt. Abweichungen sind erneut farblich (gelb) hervorgehoben. Unklare Basen (mit „n“ dargestellt) sind ebenfalls farblich gekennzeichnet (blau):











Punktmutationen auf. Die *tcdC-sc1*-Sequenz zeigte neben Punktmutationen eine 39 bp-Deletion. Anzumerken ist, dass die Zuordnung zu *tcdC-sc 1* nicht komplett der *tcdC-sc 1*-Sequenz von Curry et al. entspricht [10]. Die exakten Unterschiede sind im Abschnitt „Diskussion“ dieser Arbeit dargestellt. Bei *tcdC-sc 3* fanden sich zwei Punktmutationen.

Hinweis: Die genauen Ergebnisse aller Experimente können dem **Anhang** entnommen werden.

## 5. Diskussion

Das sporenbildende, grampositive Stäbchenbakterium *Clostridium difficile* erlangt als **nosokomialer Keim** immer größere Bedeutung. Der Anaerobier kann Diarrhoe und in schweren Fällen sogar eine lebensbedrohliche pseudomembranöse Colitis bis hin zu einem toxischen Megacolon verursachen. Vor allem ein *Clostridium difficile*-Stamm sorgte in den letzten Jahren für Aufregung: der **PCR-Ribotyp 027**, der mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden zu sein scheint [52]. Im Jahr 2003 erfolgte erstmals eine Meldung aus den USA über diesen **hypervirulenten Stamm**. Kanada folgte. Kurze Zeit später breitete sich dieser Erreger auch in Europa aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum 2005 bis 2007 untersucht, ob dieser Stamm bereits am **Universitätsklinikum München** aufgetreten ist. Hierfür fanden mehrere Experimente statt: kulturelle Anzucht, PCR und E-Test aller 330 untersuchten Isolate sowie Sequenzierung und Ribotypisierung einiger selektierter Stämme. Aus der Routinediagnostik konnte auf die ELISA-Ergebnisse der jeweiligen Isolate zurückgegriffen werden.

### 5.1 Stuhl-ELISA

Im Vergleich zur Anzahl der Toxin-**negativen** (29,4 %) und **-positiven** (70,6 %) Stämme dieser Arbeit wurde in einer zweimonatigen prospektiven Studie im Jahr 2005, in der 38 Krankenhäuser in 14 verschiedenen europäischen Ländern betrachtet wurden, ein um fast 16 Prozent höherer Anteil gefunden: 86,1 % der dort untersuchten Stämme waren Toxinbildner [2].

### 5.2 Betroffene Fachgebiete

Mit 39,4 % waren Stationen der **Inneren Medizin** am stärksten betroffen. Auf diesen Stationen besteht meist ein hoher Bedarf an Antibiotika. Zudem sind die Liegezeiten - beispielsweise durch den Einsatz von Chemotherapie - oft länger als in anderen Fachgebieten. Dadurch steigt die Gefahr der Kolonisierung und Infektion von Tag zu Tag. Das mit 16,9 % am zweithäufigsten betroffene Fachgebiet war die **Pädiatrie**. Eine steigende Anzahl von CDI bei Kindern wurde

auch in den USA beobachtet: Dort stiegen die nationalen Fallzahlen von 3565 im Jahr 1997 auf 7779 im Jahr 2006 [46]. Weitere häufiger betroffene Fachgebiete waren **Orthopädie-, Chirurgie- und Intensivstationen**: 12,7 % und je 9,4 %. In einer Dissertation über die Inzidenz von *C. difficile* an einem deutschen Universitätsklinikum stammten 48 % der Isolate aus Inneren Abteilungen, 11 % aus chirurgischen Kliniken, 15 % aus anderen operativen Abteilungen und 17 % von Intensivstationen [22]. Das Hauptaugenmerk bei der weiteren Beobachtung und Eindämmung von *C. difficile* sollte daher vor allem auf Stationen der Inneren Medizin liegen, wobei es sich bei der vorliegenden retrospektiven Studie im Vergleich zu einer prospektiv angelegten Studie um keine repräsentative Stichprobe handeln könnte. Es ist denkbar, dass durch „wahlloses“ Einschicken ein gewisses Bias auftritt: Internistische Abteilungen schickten unter Umständen mehr Proben ein, was in der vorliegenden Studie zu einer höheren Anzahl von *C. difficile*-Fällen auf internistischen Stationen führte. Ein solches Bias könnte durch ein prospektives Studiendesign vermieden werden.

### 5.3 Altersspezifische Verteilung und E-Test

Bei der altersspezifischen Betrachtung fällt auf, dass neben älteren Patienten **immer mehr jüngere Patienten** betroffen sind [15]. Ein deutlicher Höhepunkt ist bei den 0 bis 9-Jährigen sowie bei der Altersgruppe der über 50-Jährigen zu verzeichnen. Zusätzlich ist ein kleinerer Gipfel auch bei den 30 bis 39-Jährigen zu beobachten. Die **größte Anzahl der Fälle** fand sich aber immer noch **bei älteren Patienten**. Zu erwähnen ist auch die steigende Resistenzrate mit zunehmendem Alter der Patient/innen: Bei über 49-Jährigen sind deutlich mehr Moxifloxacin-resistente Stämme zu finden, was daran liegen könnte, dass Moxifloxacin häufig bei exazerbierter COPD und ambulant erworbener Pneumonie verschrieben wird - beides Erkrankungen älterer Menschen.

Die **Resistenzrate** (gemäß des Instituts für Standards in Klinik und Labor = ISKL bei  $> 8 \mu\text{g/ml}$ ) aller untersuchten Stämme für Moxifloxacin von 36,7 % korreliert mit den Ergebnissen der unter Punkt 5.1 bereits erwähnten Studie in 14 EU-Ländern: dort wird eine Moxifloxacin-Resistenzrate von 37,5 % beschrieben [2].

Interessant ist eine Veröffentlichung aus den USA, in der dargestellt wird, dass CDI keine Erkrankung sozial ausgegrenzter Bevölkerungsschichten ist, wie es sonst bei Infektionen zu beobachten ist: CDI tritt dort eher in der weissen Bevölkerungsschicht mit Privatversicherung und gehobenerem Wohnort auf. Dies könnte daran liegen, dass sich diese Bevölkerungsgruppe möglicherweise schon bei einem geringen Anlass antibiotisch behandeln lässt [46, 54].

#### 5.4 PCR: genotypische Ausstattung

Betrachtet man die genotypische Ausstattung der 330 Stämme (52,7 % *tcdA+*, *tcdB+*; 14,3 % *tcdA-*, *tcdB+*; 1,5 % *tcdA+*, *tcdB-*; 31,5 % *tcdA-*, *tcdB-*), wird deutlich, dass **über die Hälfte der Stämme die Gene für die Toxine A und B trägt**. In anderen Studien wurden teils ähnliche Verteilungen der Genotypen beobachtet. Zum Vergleich sind die Ergebnisse dieser Arbeit und die Ergebnisse anderer Studien in folgender Tabelle zusammengefasst und im Text erläutert:

**Tab. 11: Verteilung der Genotypen - Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Ergebnissen anderer Studien**

	Anzahl der untersuchten Stämme	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i>	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB+</i>	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB-</i>	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i>
diese Arbeit	n = 330	52,7 %	14,3 %	1,5 %	31,5 %
Polen [48]	n = 49	46,9 %	40,8 %	0,0 %	12,3 %
Asien [60]	n = 150	50,0 %	27,3 %	0,0 %	22,7 %
Korea [59]	n = 378	65,1 %	25,1 %	0,0 %	9,8 %

In einer Studie aus **Polen** mit 49 Stämmen fanden sich folgende Ergebnisse: 46,9 % *tcdA+*, *tcdB+*; 40,8 % *tcdA-*, *tcdB+* und 12,3 % *tcdA-*, *tcdB-* [48]. In einer Studie aus **Asien** mit 150 Stämmen ergaben sich folgende Ergebnisse: 50,0 % *tcdA+*, *tcdB+*; 27,3 % *tcdA-*, *tcdB+* und 22,7 % *tcdA-*, *tcdB-* [60]. In einer Studie aus **Korea** mit 378 Stämmen waren 65,1 % *tcdA+*, *tcdB+*; 25,1 % *tcdA-*, *tcdB+* und 9,8 % *tcdA-*, *tcdB-* [59]. Damit scheint die Verteilung der *tcdA+*, *tcdB+*-Stämme und der *tcdA-*, *tcdB+*-Stämme ebenso stärkeren Schwankungen zu unterliegen wie

*tcdA*-, *tcdB*--Stämme. *tcdA*+, *tcdB*--Stämme traten in den drei vorgestellten Studien nicht auf.

Betrachtet man die *tcdA*- und *tcdB*-Ausstattung in der vorliegenden Arbeit getrennt, sind 54,2 % der Isolate *tcdA*+ und 66,9 % *tcdB*+. Dies passt zu Veröffentlichungen, laut denen das ***tcdB*** eine **größere Rolle** spielt **als** das ***tcdA*** [40]. Toxin B ist zudem ein 1000-fach stärkeres Zytotoxin als Toxin A [50]. Gleichzeitig steigt auch die Prävalenz von Stämmen, die *tcdA*- *tcdB*+ sind: in unserer Studie sind es 14,3 %. Dies passt zur Gesamtprävalenz in Deutschland: 14,2 % [2] bzw. 12 % [24].

Betrachtet man die Ausstattung der **Stämme mit den Genen des binären Toxins**, wird deutlich, dass nur ein kleiner Anteil (in dieser Arbeit 7,9 %) diese Gene trägt. Dies deckt sich mit den Aussagen von Veröffentlichungen, die bei etwa 6 % der Stämme von der Bildung des binären Toxins ausgehen [32].

Diese Gene scheinen aber keine so große Rolle zu spielen wie früher angenommen: Patienten, in deren Stuhl nur das binäre Toxin gebildet wird, die beiden Haupttoxine A und B aber nicht exprimiert werden, sind beschwerdefrei. Die entsprechenden *Clostridium difficile*-Stämme sind als apathogen zu werten [15].

### 5.5 Vergleich ELISA-PCR

In dieser Arbeit waren 71 % der ELISA- und PCR-Ergebnisse konkordant. Auf einem Treffen der Gesellschaft für Molekulare Pathologie 2009 wurde folgendes Ergebnis präsentiert: 88 % (179 von 204) der PCR- und Immunoassay-Ergebnisse waren konkordant [7].

Weshalb die aus der Routinediagnostik stammenden **ELISA**-Ergebnisse mit den **PCR**-Ergebnissen dieser Arbeit **nicht konkordant** sind, kann mehrere Ursachen haben:

- **Gründe, warum ein Isolat im ELISA positiv und in der PCR negativ ist:**

a) methodisch bedingt: Selbst eine etablierte Methode weist keine 100 %ige Spezifität auf. R-Biopharm gibt eine Spezifität von 96,8 % an.

b) verschiedene *C. difficile*-Stämme: Es ist denkbar, dass ein Patient verschiedene *C. difficile*-Stämme in seinem Stuhl beherbergt (Toxin-positive und Toxin-negative Stämme).

- **Gründe, warum ein Isolat im ELISA negativ und in der PCR positiv ausfällt:**

- a) methodisch bedingt: Selbst eine etablierte Methode weist keine 100 %ige Sensitivität auf. R-Biopharm gibt eine Sensitivität von 89,7 % an.
- b) Sensitivitätsproblem: Eine zu geringe Toxinmenge in der eingeschickten Stuhlprobe könnte sich auf das Ergebnis auswirken. Es ist möglich, dass *C. difficile* nicht gleichmäßig im Stuhl verteilt war [19]. Für den klinischen Alltag bedeutet das ein Übersehen wichtiger Stämme und damit eine möglicherweise zu spät eingeleitete Therapie für die betroffenen Patienten. Dieses Problem kann durch die Untersuchung einer weiteren Stuhlprobe verringert werden. Dies führt allerdings zu Mehrkosten.
- c) Lagerung und Transport: durch längere Lagerungszeiten (auf der Station) und längere Transportzeiten kann vorhandenes Toxin proteolytisch abgebaut werden. Die Stuhlproben wurden routinemäßig im Stuhllabor in Großhadern, München, untersucht. So war es nicht eruiert, wie die Proben vor dem Eintreffen im Labor gelagert und transportiert wurden.
- d) Ein weiterer wichtiger Grund: das Gen bzw. die Gene sind vorhanden, aber werden nicht exprimiert (z.B. durch Punktmutation), das heißt, das Toxin wird nicht gebildet.

In dieser Arbeit betrug die **Sensitivität** des ELISA 79,7 % und die **Spezifität** lediglich 50,0 %. In einer Veröffentlichung, die die Zuverlässigkeit von Immunoassays und Zytotoxizitätstests verglich, lag die **Spezifität** zwischen 87,0 % und 97,4 %. Die **Sensitivitätswerte** der Immunoassays lagen zwischen 90,7 % und 96,3 %. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Immunoassays geeignet sind, um die Anwesenheit von *C. difficile*-Toxin zuverlässig nachzuweisen [45]. In der vorliegenden Studie ist denkbar, dass die in der PCR positiv getesteten Stämme das Gen unter Umständen nicht exprimieren - in einem solchen Fall wäre der ELISA richtig negativ bei einem positiven PCR-Ergebnis. Der entsprechende Stamm hätte erneut angezüchtet und aus dem Kulturüberstand hätte ein ELISA

gemacht werden müssen. Nur so hätte überprüft werden können, ob ein PCR-positives Isolat das Toxin bildet.

Um höhere Sensitivitäts- und Spezifitätswerte zu erhalten, wird für den Routine-Ablauf im Labor entweder eine parallele kulturelle Anzucht jeder Probe oder als Screening-Test der Nachweis des *C. difficile*-Antigens Glutamat-Dehydrogenase (GDH) als ELISA empfohlen. Dieser GDH-ELISA weist eine ähnliche Sensitivität auf wie die Kultur. Der negative prädiktive Wert des GDH-Tests beträgt 99,8 %, womit eine *C. difficile*-Infektion in der untersuchten Probe ausgeschlossen werden kann [17, 37]. In den Richtlinien der europäischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Infektiologie (= ESCMID) wird dieses Vorgehen ebenfalls empfohlen [9].

Interessant ist eine prospektive Studie laut der *C. difficile*-Patienten mit **negativem** ELISA für Toxin A/B eine **gleich schwere Erkrankung** haben wie Patienten mit einem **positiven** ELISA: 132 von CDI-Patienten stammende Stuhlproben waren in der PCR **positiv**. In 32 % (n = 43) der Fälle war der Enzymimmunoassay Toxin-**negativ**. Letztere Patienten zeigten dieselbe Klinik wie Toxin-**positive** Patienten und ein gleiches Risiko, Sporen zu übertragen [21]. Weitere Studien werden zeigen, ob der Toxinnachweis mittels Enzymimmunoassay klinisch relevant bleibt.

### 5.6 Ribotypisierung und Sequenzierung selektierter Stämme

Bei den Ergebnissen der **Ribotypisierung der drei höchstverdächtigen A+B+bi+Moxi-R-Stämme** fällt auf, dass zwei den identischen Ribotyp (Ribotyp Freiburg 94) besitzen. Eine nosokomiale Infektion mit einem identischen Stamm ist denkbar. Leider konnte der dritte Ribotyp weder der Freiburger noch der UK-Nomenklatur zugeordnet werden.

Die **Ribotypisierung der zwei A+B+bi+Moxi-S-Stämme** ergab für das eine Isolat den Ribotyp Freiburg 28; der zweite Stamm konnte keinem Ribotyp zugeordnet werden.

Bei der **Ribotypisierung** (Klassifizierung nach UK) **der 14 zufällig ausgewählten Stämme** traten die Ribotypen 078, 001 und 94 auf (zusätzlich trat der Ribotyp 94 nach der Freiburger Nomenklatur auf - ein weiteres Isolat konnte nicht zugeordnet

werden). Dem RKI liegen für den Zeitraum 1.1.2008 bis 31.12.2009 folgende Daten vor: von 7471 übermittelten *C. difficile*-Fällen erfüllten 817 den Meldetatbestand (d.h. Angaben für eine schwer verlaufende CDI bzw. Angaben, die zum Nachweis von Ribotyp 027 zur Verfügung stehen). Von diesen 817 wurden 138 ribotypisiert: 114 entfallen auf Ribotyp 027, 21 auf 001 und je nur ein bis zwei auf weitere Ribotypen [14]. In einer anderen Veröffentlichung, in der von Mai 2006 bis März 2007 *C. difficile*-Stämme ribotypisiert wurden, dominierte Ribotyp 001 mit 52,4 % der 21 ribotypisierten Stämme [5]. In einer weiteren Veröffentlichung wurden 19,5 % der Isolate dem Ribotyp 001 und 2,4 % dem Ribotyp 078 zugeordnet [1]:

**Tabelle 12: Vergleich der Verteilung der Ribotypen mehrerer Studien**

	<b>diese Arbeit</b>	<b>Arvand [1]</b>	<b>Borgmann [5]</b>	<b>Hensgen [25]</b>
Region	Deutschland, Bayern	Deutschland, Hessen	Deutschland, Süddeutschland	Niederlande
<b>Ribotyp 001</b>	35,7 % (n = 5 von 14)	19,5 % (n = 8 von 41)	52,4 % (n = 11 von 21)	27,4 % (118 von 430)
<b>Ribotyp 027</b>	0,0 % (n = 0 von 14)	58,5 % (n = 24 von 41)	0,0 % (n = 0 von 21)	3,3 % (n = 14 von 430)
<b>Ribotyp 078</b>	42,9 % (n = 6 von 14)	2,4 % (n = 1 von 41)	4,8 % (n = 1 von 21)	9,1 % (n = 39 von 430)

Die **Ribotypen 001** und **078** scheinen neben dem **Ribotyp 027** deutschlandweit eine große Rolle zu spielen - im Unterschied zu den USA oder Kanada, wo der **Ribotyp 027** vorherrschend ist [8].

Betrachtet man die Ergebnisse der **Sequenzierung** der *tcdC*-Region wurden vier der aufgetretenen Genotypen bereits beschrieben: *tcdC*-A1, -B, -sc 1 und -sc 3 [10]. Die Genotypen mp 1 und mp 2 (Abkürzungen selbst gewählt) wurden bisher noch nicht beschrieben.

In den folgenden Tabellen sind die Sequenzierungsergebnisse von Curry et al. [10] den Ergebnissen dieser Arbeit direkt gegenübergestellt:

**Tabelle 13: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Curry et al.**

(In Klammern ist die durch das jeweilige Codon kodierte Aminosäure angegeben, falls diese vom Wildtyp abweicht.)

Genotyp	Position	Wildtyp	Curry	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-A1</i>	53 bp	g (S)	t (I)	t (I)	Triplet- veränderung
	117 bp	a (L)	t (F)	t (F)	Triplet- veränderung
	120 bp	c	t	t	keine Auswirkung
	183 bp	c	t	t	keine Auswirkung
	184-186 bp	caa	taa	taa	Stoppcodon
	330 bp	a	g	g	keine Auswirkung
	341-379 bp	ctaaaaaggctg aagaacaacgc aaaaaagaaga agagg	39 bp- Deletion	39 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	430 bp	c	t	t	keine Auswirkung
	516 bp	a	c	c	keine Auswirkung
	558 bp	t	a	a	keine Auswirkung
	585 bp	a	g	g	keine Auswirkung
	660 bp	t	c	c	keine Auswirkung
	675 bp	g	a	g	keine Auswirkung

Genotyp	Position	Wildtyp	Curry	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-B</i>	330-347 bp	agctgaagaagct aaaaa	18 bp- Deletion	18 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar

Genotyp	Position	Wildtyp	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-mp1</i>	92 bp	g (G)	a (D)	Triplet- veränderung
	117 bp	a (L)	t (F)	Triplet- veränderung
	120 bp	c	t	keine Auswirkung
	183 bp	c	t	keine Auswirkung
	184-186 bp	caa	taa	Stoppcodon
	313 bp	g (A)	a (T)	Triplet- veränderung
	323-352 bp	ctaaaaaagctgaagaagct aaaaaggctg	30 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	358-378 bp	caacgcaaaaaagaagaag ag	21 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	585 bp	a	g	keine Auswirkung
	660 bp	t	a	keine Auswirkung

Genotyp	Position	Wildtyp	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-mp2</i>	61-97 bp	aaaataattaaattcttaagag caciaagggtattg	37 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar

Genotyp	Position	Wildtyp	diese Arbeit	Bedeutung
	100 bp	c	t	keine Auswirkung
	117 bp	a (A)	t (F)	Triplet- veränderung
	120 bp	c	t	keine Auswirkung
	159 bp	a	g	keine Auswirkung
	183 bp	c	t	keine Auswirkung
	184-186 bp	caa	taa	Stoppcodon
	287-297 bp	ctattgaagct	11 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	330-347 bp	agctgaagaagctaaaaa	18 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	358-378 bp	caacgcaaaaaagaagaag ag	21 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	430 bp	c	t	keine Auswirkung
	516 bp	a	c	keine Auswirkung
	526 bp	g (G)	c (R)	Triplet- veränderung
	563 bp	a (K)	g (E)	Triplet- veränderung
	585 bp	a	g	keine Auswirkung
	660 bp	t	c	keine Auswirkung

Genotyp	Position	Wildtyp	diese Arbeit	Bedeutung
	681 bp	t	c	keine Auswirkung

Genotyp	Position	Wildtyp	Curry	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-sc1</i>	43 bp	g (G)	a (R)	g (R)	Triplet- veränderung
	92 bp	g (G)	a (D)	a (D)	Triplet- veränderung
	120 bp	c (G)	t (V)	t (V)	Triplet- veränderung
	183 bp	c (N)	t (I)	t (I)	Triplet- veränderung
	184-186 bp	caa	caa	taa	Stoppcodon
	330-347 bp	agctgaag aagctaaa aa	18 bp- Deletion	Bereich der 39 bp- Deletion	
	330-379 bp			39 bp- Deletion	Auswirkung auf Toxizität denkbar
	363 bp	c	t	Bereich der 39 bp- Deletion	
	378 bp	g	a	Bereich der 39 bp- Deletion	
	426 bp	a (R)	a (R)	g (G)	Triplet- veränderung
	430 bp	c (P)	c (P)	t (I)	Triplet- veränderung
	516 bp	a (L)	a (L)	c (Y)	Triplet- veränderung

Genotyp	Position	Wildtyp	Curry	diese Arbeit	Bedeutung
	543 bp	t	c	t	keine Auswirkung
	558 bp	t (Y)	t (Y)	a (K)	Triplet- veränderung
	585 bp	a	g	g	keine Auswirkung
	660 bp	t (N)	a (N)	c (K)	Triplet- veränderung
	666 bp	t	c	t	keine Auswirkung

Genotyp	Position	Wildtyp	Curry	diese Arbeit	Bedeutung
<i>tcdC-sc3</i>	126 bp	t (F)	t (L)	c (F)	keine Auswirkung
	148 bp	g (A)	t (S)	t (S)	Triplet- veränderung

In allen oben aufgeführten *tcdC*-Genotypen fanden sich **Punktmutationen** und 11, 18, 21, 30, 37 sowie 39 bp-**Deletionen**. In einer Dissertation aus Freiburg, die sich mit der molekularen Analyse des *tcdC*-Gens, dessen Deletionen und deren Auswirkungen auf die Toxinsynthese von *C. difficile* befasst, wurden insgesamt drei Deletionstypen gefunden: 18, 39 und 54 bp [16].

Die große Anzahl von Deletionen und Punktmutationen sowie das Auftauchen zweier noch nicht beschriebener Sequenzen (mp 1 und mp 2) zeigt die überaus **hohe Variabilität des Genoms bzw. des Pathogenitäts-Lokus**.

Durch Deletionen und Stopcodons sind Auswirkungen auf die Transkription und Translation möglich: Ob Deletionen zu einer **Toxizitätsminderung oder -steigerung** führen, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden: Laut Spigaglia [61] führt eine Deletion im *tcdC*-Gen zu einer verstärkten Toxinproduktion. In der oben erwähnten Dissertation wurde genau das Gegenteil

beobachtet [16]: Als Messmethode wurde ein Zytotoxizitätstest eingesetzt, bei dem zytopathische Effekte von *C. difficile* auf Verozellen bestimmt werden können. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen (von 1 : 10 bis 1 : 10<sup>7</sup>) konnte die Toxizität des Wildtyps mit Deletionsstämmen (18-, 39- und 54 bp-Deletion) verglichen werden: Hierbei zeigte der Wildtyp nach drei Stunden eine Toxizität von 1 zu ca. 1x10<sup>4</sup>. Die Deletionsstämmen hingegen wiesen nach drei Stunden mit Werten zwischen ca. 1 zu 1x10<sup>3</sup> und ca. 1 zu 10<sup>1</sup> eine durchgehend niedrigere Toxizität auf als der Wildtyp. Eine Messung nach 24 Stunden ergab ebenfalls entsprechende Werte: ca. 1 zu 1x10<sup>6</sup> beim Wildtyp im Vergleich zu Werten zwischen ca. 1 zu 1x10<sup>4</sup> und ca. 1 zu 1x10<sup>2</sup>. Zusätzlich wurde dort die Toxizität des 027-Stammes untersucht. Diese lag durchgehend über der Toxizität des Wildtyps: 1 zu 10<sup>5</sup> nach drei Stunden sowie 1 zu 10<sup>7</sup> nach 24 Stunden [16]. Somit scheinen neben einer Deletion andere Faktoren eine entscheidende Rolle für die Toxizität zu spielen, die bisher nicht geklärt werden konnten.

### 5.7 Fazit und Ausblick

Leider waren **klinische Informationen** nicht verfügbar. Für weitere Studien bietet sich ein **prospektives Studiendesign**, bei dem durch ein genaues Studienprotokoll bereits beim Einschicken einer Probe auf mehr klinische Information geachtet wird, an. Dadurch wären viele weitere interessante Betrachtungsweisen möglich.

*C. difficile* muss weiterhin Beachtung geschenkt werden. Noch ist die **Pathogenese nicht vollständig geklärt**. Die steigenden Fälle jüngerer Patienten machen die zunehmende Pathogenität von *C. difficile* deutlich. Die weitere Betrachtung der Entwicklung an der Universitätsklinik München ist notwendig, um gegebenenfalls durch Umstellung der Antibiotikatherapien und geeignete Hygienemaßnahmen rechtzeitig eingreifen zu können [35].

Laut **Robert Koch-Institut** (RKI) gelten bei Patienten mit Durchfällen aufgrund von toxinbildendem *C. difficile* folgende - hier zusammengefasste - **Hygiene-Empfehlungen** [52, 55]:

- **Prävention und Kontrolle von CDI** durch frühe Erkennung der Symptomatik, etablierte Surveillance, Kenntnis der endemischen Häufigkeit von CDI,

Festlegung von „Alert-Raten“, rasche Diagnostik, sachgerechte Therapie und Hygienemaßnahmen

- **Unterbrechung von Infektketten** durch geeignete räumliche Unterbringung (Einzelunterbringung mit eigener Nasszelle, ggf. Kohortenisolierung bei Patienten mit gleichem Erregertyp), Personalschutzmaßnahmen (geschultes Personal in Bezug auf den Übertragungsweg und die zu beachtenden Schutzmaßnahmen, Anlegen von Schutzkittel und Einweghandschuhen vor engem Patientenkontakt, Pflege sowie bei möglichem Kontakt mit erregerhaltigem Material und Ablegen vor Verlassen des Zimmers in geschlossenem Behältnis; sorgfältige Händehygiene: zuerst übliche Händedesinfektion, dann Hände trocknen lassen, gründlich waschen und wieder trocknen), Desinfektion und Reinigung von Flächen (Tägliche Wischdesinfektion der patientennahen (Handkontakt-)Flächen bevorzugt unter Anwendung von Oxidantien, z.B. mit Peressigsäure oder Natrium-Hypochlorit; bei Bedarf Erweiterung der Maßnahmen auf weitere kontaminationsgefährdete Flächen), Medizinprodukte (patientenbezogene Verwendung aller Medizinprodukte mit direktem Kontakt zum Patienten sowie deren Desinfektion nach Gebrauch. Eine zentrale Aufbereitung ist bei Transport in einem geschlossenen Behältnis möglich. Bevorzugte Anwendung thermischer Desinfektionsverfahren. Geschirr: Transport in geschlossenem Behältnis zur Spülmaschine, dann Reinigung bei > 60 °C; Wäsche/Textilien: desinfizierendes Waschverfahren, Betten/Matratzen: wischdesinfizierbare Bezüge), Transport des Patienten (Informieren des Zielbereichs, so wenig Kontakt zu anderen Patienten und Besuchern wie möglich; abschließende Desinfektion der Transportmittel, aller Handkontaktflächen und verwendeter Gegenstände; sorgfältige Händehygiene), Schlussdesinfektion (alle Flächen im Patientenzimmer, d.h. wie tägliche Desinfektion), Abfallentsorgung (mit Sekreten/Exkreten kontaminierter Abfall: nach Abfallschlüssel EAK 180104 gemäß LAGA-Richtlinie), Maßnahmen bei Ausbrüchen (besonders konsequente Einhaltung der oben dargestellten Maßnahmen, betreuendes Personal sollte nur für betroffene Patienten eingesetzt werden; Antibiotikaregime überprüfen; Begrenzung eines Ausbruchs nicht möglich: Schließung der betroffenen Einheit).

Die vollständigen Empfehlungen können auf der **Homepage des RKI** ([www.rki.de](http://www.rki.de)) unter „Prävention und Bekämpfungsmaßnahmen“ aufgerufen werden.

Wie effizient die Umsetzung von Hygienemaßnahmen sein kann, zeigte eine prospektive Studie, in der gezeigt wurde, dass das konsequente Tragen von Handschuhen eine Verringerung der Inzidenz von 7,7/1000 Patienten auf 1,5/1000 Patienten zur Folge hatte [30].

Um *Clostridium difficile* effizient einzudämmen und die Inzidenz längerfristig zu senken, sind ein **restriktiverer Antibiotikagebrauch** und eine konsequente Durchführung der **Hygieneempfehlungen** notwendig [44, 47]. Einen wichtigen Schritt in diese Richtung bildet das auf dem Europäischen Antibiotikatag 2011 vorgestellte „Gesetz zur Änderung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) und weiterer Gesetze“ vom 28. Juli 2011:

Ziel ist ein verbesserter Schutz vor Infektionen mit schwierig zu behandelnden Erregern. Schwerpunkte betreffen die Übermittlung von Meldungen zum gehäuftem Auftreten nosokomialer Infektionen an das RKI, die Konkretisierung von Pflichten und Verantwortlichkeiten im Bereich der Infektionsprävention sowie Aspekte des Gebrauchs von Antibiotika (Antiinfektiva). Ausserdem soll in Zukunft eine „Kommission Antiinfektiva, Resistenz und Therapie“ (Kommission ART) am Robert Koch-Institut tätig sein, die Empfehlungen für Standards der Diagnostik und Therapie von Infektionen nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft formulieren und allgemein verfügbar machen soll. Ebenso sollen Leitlinien überarbeitet bzw. neu erstellt werden [57].

Es muss erreicht werden, dass resistente Keime eingedämmt werden und Antibiotika auch künftig wirksam bleiben [57].

## 6. Zusammenfassung

### **Molekulare Charakterisierung klinischer *Clostridium difficile*-Isolate am Münchner Universitätsklinikum, 2005 - 2007**

*Clostridium difficile*, ein sporenbildendes grampositives anaerobes Stäbchenbakterium, kann eine antibiotika-assoziierte Diarrhoe, eine pseudomembranöse Colitis sowie ein toxisches Megacolon hervorrufen.

Die *Clostridium difficile*-Infektion (CDI) ist eine nosokomiale Erkrankung, die weltweit zunehmend an Bedeutung gewinnt. Zum aktuellen Zeitpunkt steigen sowohl Inzidenz als auch Prävalenz der CDI. Neben den Hauptvirulenzfaktoren - den großen Exotoxinen, benannt als Toxin A und Toxin B - könnte das binäre Toxin zur CDI beitragen. Tatsächlich wurde bereits vor mehr als 20 Jahren ein Zusammenhang zwischen den Symptomen der CDI und dem toxigenen Potential von *C. difficile*-Stämmen, die für die Infektion verantwortlich sind, angenommen. Diese Vermutung wurde vor kurzem durch das Auftreten eines epidemischen Stammes bestätigt - genannt NAPI/027 - der für einen signifikanten Anstieg der Erkrankungsinzidenz und damit verbundener Mortalität verantwortlich ist. Er zeichnet sich durch folgende Merkmale aus [42]: Toxin A und B positiv, binäres Toxin positiv, 18bp-Deletion im *tcdC*-Gen, 100 %ige Moxifloxacinresistenz und Ribotyp 027.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob dieser hypervirulente Stamm an den Standorten des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München bereits aufgetreten ist. Hierfür wurden *C. difficile*-Stämme, die von 2005 - 2007 von Patienten am Münchner Universitätsklinikum isoliert wurden, pheno- und genotypisch charakterisiert. Auf eine während der Routinediagnostik erstellten *C. difficile*-Stammsammlung von 330 Stämmen wurde zurückgegriffen und die ebenfalls aus der Routinediagnostik stammenden Toxin A/B-ELISA-Ergebnisse dieser 330 Stuhlproben wurden retrospektiv betrachtet (70,6 % positiv). Um die ELISA-Ergebnisse zu vergleichen, wurde eine PCR der *C. difficile*-DNA aller 330 Isolate durchgeführt. Hierbei fanden sich folgende Ergebnisse der für die Toxine A

und B kodierenden Gene: A+B+ (52,7 %), A-B+ (14,3 %), A+B- (1,5 %), A-B- (31,5 %). Zusätzlich wurden in einigen Stämmen die für das binäre Toxin (bi) kodierenden Gene *cdtA* und *cdtB* mittels PCR gefunden: bi+A+B+ (1,5 %), bi+A+B- (0,9 %), bi+A-B+ (3,7 %), bi+A-B- (1,8 %). Insgesamt tragen 26 Isolate (7,9 %) das binäre Toxin. Außerdem wurde die Moxifloxacin-Empfindlichkeit aller 330 Isolate mittels E-Test (Resistenzrate = 36,7 %) ermittelt. Drei für NAPI/027 höchstverdächtige Stämme wurden ribotypisiert: Der Ribotyp Freiburg 94 (kein Korrelat bei Ribotyp UK) fand sich bei zwei Stämmen. Das dritte Isolat konnte keinem Ribotypen zugeordnet werden. Die Sequenzierung der *tcdC*-Region des Pathogenitäts-Lokus bei den zwei dem Ribotyp 94 zugeordneten Isolaten ergab bei beiden den Genotyp *tcdC*-A1. Eine 18 bp-Deletion trat hierbei nicht auf. Der dritte Stamm wurde nicht sequenziert. Zusätzlich wurden 14 zufällig ausgewählte Stämme untersucht: als häufigste Ribotypen zeigten sich Ribotyp Freiburg 40/UK 078 (n = 6) und Ribotyp Freiburg 45/UK 001 (n = 5). Die Sequenzierung der *tcdC*-Region des Pathogenitäts-Lokus zeigte die bereits beschriebenen Genotypen *tcdC*-A 1 (n = 6), *tcdC*-sc 3 (n = 4), *tcdC*-sc 1 (n = 1) und *tcdC*-B (n=1). Die Genotypen *tcdC*-mp 1 (n = 1) und *tcdC*-mp 2 (n = 1) traten neu auf.

In den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten der Münchner Universitätskliniken konnte der epidemische Stamm NAPI/027 nicht nachgewiesen werden. Dennoch sollte weiterhin ein Augenmerk auf *C. difficile*-Erkrankungen gelegt werden, da die deutschlandweit und auch an den Münchner Universitätskliniken gefundenen Ribotypen 078 und 001 ebenfalls mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert sein können. Dem sinnvollen Einsatz von Antibiotika und der exakten Einhaltung geeigneter Hygienemaßnahmen kommt hierbei große Bedeutung zu.

## 7. Summary

### **Molecular characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates at the Munich University hospital, 2005 - 2007**

*Clostridium difficile* is a sporeforming grampositive anaerobic bacterium that can cause antibiotic-associated diarrhoea, pseudomembranous colitis and toxigenic megacolon.

*Clostridium difficile*-infection (CDI) is a nosocomial disease of paramount importance worldwide. Currently incidence and prevalence increase. Besides the main virulence factors - the large exotoxins known as toxin A and toxin B - the binary toxin might contribute to CDI. In fact, a relationship between the symptoms of CDI and the toxigenic potential of *C. difficile* strains responsible for infection has been proposed more than 20 years ago. This assumption was recently confirmed by demonstrating that toxin levels are correlated with the severity of CDI and by the emergence of an epidemic strain, named NAPI/027, which is responsible for a significant increase in disease incidence and associated death. It is characterized by the following criteria: toxin A and B positive, binary toxin positive, 18bp-deletion of *tcdC*-gene, 100 % Moxifloxacin-resistance and ribotype 027.

Aim of this study was to examine if this hypervirulent strain has already appeared at the LMU hospitals. Therefore *C. difficile* strains isolated from patients at the Munich University Hospital from 2005-2007 were pheno- and genotypically characterized. A look in retrospective was taken at the results of the toxin A/B stool ELISA of the routine diagnosis of 330 isolates from patients with suspected diarrhoea (positive 70,6 %). To compare the results of ELISA testing, PCR detecting *tcdA*- and *tcdB*- genes coding for toxin A and B was carried out with *C. difficile* DNA derived from all 330 isolates. The following genotypes were found: A+B+ (52.7 %), A-B+ (14.3 %), A+B- (1.5 %), A-B- (31.5 %). In addition, *cdtA* and *cdtB* genes coding for the binary toxin (bi) were detected by PCR. Altogether, 26 (7.9 %) isolates were bi+ (bi+A+B+, 1.5 %; bi+A+B-, 0.9 %; bi+A-B+, 3,7 %; bi+A-

B-, 1.8 %). We also tested Moxifloxacin susceptibility of all 330 isolates by E-test (resistance rate of 36.7%). Ribotyping of isolates that were *tcdA+B+* *Cdt+* as NAP1/027 was done. Two of them showed ribotype Freiburg 94 (no correlate in ribotype UK). The third isolate could not be correlated. Sequencing of the PaLoc-*tcdC*-region of the two samples showed genotype *tcdC*-A1. No 18 bp-deletion could be found within those two isolates. The third sample was not sequenced. Additionally 14 random chosen isolates were examined: the most frequent ribotypes of these isolates were ribotype Freiburg 40/UK 078 (n = 6) and ribotype Freiburg 45/UK 001 (n = 5). Sequencing of the PaLoc-*tcdC*-region showed the already known genotypes *tcdC*-A1 (n = 6), *tcdC*-sc 3 (n = 4), *tcdC*-sc 1 (n = 1) and *tcdC*-B (n = 1). Genotypes *tcdC*-mp 1 (n = 1) and *tcdC*-mp 2 (n = 1) appeared new.

For the followed period no 027 strain was found at the Munich University Hospital. As ribotypes 078 and 001 related severe CDI were not only found at the Munich University hospitals but also at other hospitals all over Germany watching *C. difficile*-diseases will be necessary. Reasonable use of antibiotics and accurate compliance of measures of sanitation play an important role.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G** (2009) Clostridium difficile ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal C. difficile infection in Hesse, Germany. Euro Surveill 14
2. **Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I** (2007) Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13:1048-1057
3. **Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB** (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 298:531-534
4. **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
5. **Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, von Eichel-Streiber C, Gruber H, Brazier JS, Schulte B** (2008) Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany. Euro Surveill 13
6. **Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C** (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in Clostridium difficile. Gene 181:29-38
7. **Brauser D** (2009) Sensitivity, Specificity Higher With PCR Than Conventional EIA in C Difficile-Associated Diarrhea. Association for Molecular Pathology (AMP) 2009 Annual Meeting: Abstract ID19.
8. **Chekins A, Sambol S, Davidson D, Nagaro K, Mancini M, Hidalgo-Arroyo G, Brazier JS J, S, Gerding D** (2009) Distribution of Clostridium difficile strains from a North American, European and Australian trial of treatment for C. difficile infections: 2005–2007. Anaerobe 15:230-233
9. **Crobach M, Dekkers O, Wilcox M, Kuijper E, (ESCMID) ESoCMaID** (2009) Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI) Clin Microbiol Infect 15:1053-1066
10. **Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH** (2007) tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of Clostridium difficile. J Clin Microbiol 45:215-221
11. **Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S** (2008) Clostridium difficile toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. Journal of medical microbiology 57:685-689
12. **Eberhard A** (2008) Direkter Nachweis von Clostridium difficile und Ausschluss des Ribotyp 027. Laborinformation 91
13. **Eckmanns T** (2008) Clostridium difficile assoziierte Diarrhoe (CDAD): ein zunehmendes Problem in Deutschland. ÖGD
14. **Eckmanns T** (2010) Clostridium-difficile-Infektionen: Übermittlungen gemäß IfSG von 01/2008 bis 12/2009. Epidemiologisches Bulletin, RKI 10

15. **Eichel-Streiber C** (2008) Das difficile Clostridium. *J Lab Med* 32:219-234
16. **Fritsche J** (2009) Molekulare Analyse des tcdC Gens von Clostridium difficile: Charakterisierung von Deletionen und deren Auswirkungen auf die Toxinsynthese. Dissertation
17. **Gilligan PH** (2008) Is a two-step glutamate dehydrogenase antigen-cytotoxicity neutralisation assay algorithm superior to the Premier Toxin A and B Enzyme Immunoassay for laboratory detection of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 46:1523-1525
18. **Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC** (2004) Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from Clostridium difficile. *Journal of clinical microbiology* 42:1933-1939
19. **Granzow K** (2007) Prävalenz von Clostridium perfringens Enterotoxin A in Stuhlproben von Patienten mit Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe. Dissertation, Universitätsmedizin Berlin
20. **Grünewald T** (2001) Nosokomiale Epidemiologie und Transmission der Clostridium-difficile-Infektion. *Dtsch Med Wschr* 126:519-522
21. **Guerrero D** (2011) Clinical and infection control implications of Clostridium difficile infection with negative enzyme immunoassay for toxin. *Clin Infect Dis* 53:287-290
22. **Günther A** (2010) Inzidenz von Clostridium difficile an einem Universitätsklinikum und Untersuchungen zum Nachweis von C. difficile in der Krankenhausumgebung. Dissertation
23. **Hall I, 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
24. **Heimesaat MM, Granzow K, Leidinger H, Liesenfeld O** (2005) Prevalence of Clostridium difficile toxins A and B and Clostridium perfringens enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhea. *Infection* 33:340-344
25. **Hensgens MP, Goorhuis A, Notermans DW, van Benthem BH, Kuijper EJ** (2009) Decrease of hypervirulent Clostridium difficile PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveill* 14
26. **Indra A, Huhulescu S, Hasenberger P, Schmid D, Alfery C, Wuerzner R, Fille M, Gattringer K, Kuijper E, Allerberger F** (2006) First isolation of Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Austria. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11:E060914 060913
27. **Indra A, Lassnig H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S, Allerberger F** (2009) Clostridium difficile: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr* 121:91-95
28. **Jansen A, Kleinkauf N, Weiss B, Zaiss NH, Witte W, Bornhofen B, Kist M, von Eichel-Streiber C, Neumann M, Michels H, Eckmanns T** (2010) [Emergence of clostridium difficile ribotype 027 in Germany: epidemiological and clinical characteristics]. *Z Gastroenterol* 48:1120-1125
29. **Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, Johnson S, Gerding DN, McDonald LC, Limbago BM** (2008)

- Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging infectious diseases* 14:1039-1045
30. **Johnson S, Gerding DN, Olson MM, Weiler MD, Hughes RA, Clabots CR, Peterson LR** (1990) Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *Am J Med* 88:137-140
  31. **Joseph R, Demeyer D, Vanrenterghem D, van den Berg R, Kuijper E, Delmee M** (2005) First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 10:E051020 051024
  32. **Kdolsky** (2007) Prävention und Kontrolle von *Clostridium difficile* in Krankenhäusern und Einrichtungen der stationären Pflege. *AGES 2*
  33. **Kist M** (2007) *Clostridium difficile*-assoziierte Diarrhöe: Kernaussagen. *Krankenhaushygiene up to date* 2:301-316
  34. **Kuijper EJ, Coignard B, Tull P** (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12 Suppl 6:2-18
  35. **Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T** (2008) Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 13
  36. **Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, Pons JL** (2004) Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 42:5710-5714
  37. **Limbach** (2011) Laborinformationen *Clostridium difficile*. [www.labor-limbach.de](http://www.labor-limbach.de), Heidelberg
  38. **Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T** (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England journal of medicine* 353:2442-2449
  39. **Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD** (1985) Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and immunity* 47:349-352
  40. **Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI** (2009) Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458:1176-1179
  41. **Matamouros S, England P, Dupuy B** (2007) *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 64:1274-1288
  42. **McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN** (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* 353:2433-2441

43. **McDonald LC, Owings M, Jernigan DB** (2006) Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. Emerging infectious diseases 12:409-415
44. **McNulty C, Logan M, Donald IP, Ennis D, Taylor D, Baldwin RN, Bannerjee M, Cartwright KA** (1997) Successful control of Clostridium difficile infection in an elderly care unit through use of a restrictive antibiotic policy. The Journal of antimicrobial chemotherapy 40:707-711
45. **Musher DM, Manhas A, Jain P, Nuila F, Waqar A, Logan N, Marino B, Graviss EA** (2007) Detection of Clostridium difficile toxin: comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. J Clin Microbiol 45:2737-2739
46. **Nylund CM, Goudie A, Garza JM, Fairbrother G, Cohen MB** (2011) Clostridium difficile infection in hospitalized children in the United States. Arch Pediatr Adolesc Med 165:451-457
47. **Pepin J, Valiquette L, Cossette B** (2005) Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. Cmaj 173:1037-1042
48. **Pituch H** (2004) The first report of the occurrence of Cardiff-PCR-ribotypes among clinical Clostridium difficile strains isolated from patients with AAD in a university hospital, Warsaw. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Prague / Czech Republic
49. **Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P** (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. Infection and immunity 56:2299-2306
50. **Pothoulakis C, Barone LM, Ely R, Faris B, Clark ME, Franzblau C, LaMont JT** (1986) Purification and properties of Clostridium difficile cytotoxin B. The Journal of biological chemistry 261:1316-1321
51. **Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L** (2007) Increase in Clostridium difficile-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerg Infect Dis 13:1417-1419
52. **Reichardt C** (2007) Dramatischer Anstieg von Clostridium-difficile-assoziiierter Diarrhoe in Deutschland: Ist der neue Stamm PCR-Ribotyp 027 bereits angekommen? Dtsch Med Wochenschr 132:223-228
53. **Reisinger EC** (2004) Antibiotika-assoziierte Diarrhoe. Dtsch Med Wochenschr 129:111-113
54. **rme/Ärzteblatt.de** (2011) USA: Zunehmende C. difficile-Infektionen bei Kindern. Ärzteblatt <http://www.aerzteblatt.de/v4/news/news.asp?id=44139>
55. **Robert-Koch-Institut** (2008) Empfehlungen des Robert Koch-Institutes zu Hygienemaßnahmen bei Patienten mit Durchfällen aufgrund von toxinbildendem Clostridium difficile.
56. **Robert-Koch-Institut** (2009) Clostridium difficile - RKI-Ratgeber für Ärzte. Epidemiologisches Bulletin 06
57. **Robert-Koch-Institut** (2011) Europäischer Antibiotikatag 2011: Antibiotikaresistenz und nosokomiale Infektionen. Epidemiologisches Bulletin 45
58. **Schneider T** (2007) Clostridium difficile-assoziierte Diarrhö: Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger. Deutsches Ärzteblatt 104:A1588-1594

59. **Shin B** (2011) Epidemiologic study of *Clostridium difficile* culture positive cases using repetitive-sequence based PCR fingerprinting and PCR-ribotyping in 3 tertiary care hospitals in Korea from 2004 to 2010. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)
60. **Shin BM, Lee EJ, Kuak EY, Yoo SJ** (2009) Comparison of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in a tcdA-tcdB+ *C. difficile* prevalent area. *Anaerobe* 15:266-269
61. **Spigaglia P, Mastrantonio P** (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 40:3470-3475
62. **Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M** (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 186:307-312
63. **Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI** (1999) PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of clinical microbiology* 37:461-463
64. **Sunenshine RH, McDonald LC** (2006) *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 73:187-197
65. **van Steenberg J, Debast S, van Kregten E, van den Berg R, Notermans D, Kuijper E** (2005) Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 10:E050714 050711
66. **Voth DE, Ballard JD** (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18:247-263
67. **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
68. **Wayne P** (1997) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. National Committee for Clinical Laboratory Standards

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüssmann, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Durch ihn durfte ich die Welt der Mikrobiologie entdecken und auf der DGHM 2008 in Dresden einen Vortrag halten. Für seine ehrlich geäußerte fachkundige Kritik bin ich ihm von ganzem Herzen dankbar.

Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann danke ich für die Möglichkeit zur Promotion am Max von Pettenkofer-Institut.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Betreuer, Herrn Dr. Panthel, der immer ein offenes Ohr für sämtliche Belange dieser Arbeit hatte und mich mit seinem hervorragenden Fachwissen beraten hat.

Frau Dr. Bader danke ich sehr für das Erstellen der Stammsammlung sowie für die kompetente Einarbeitung in der Anfangsphase dieser Arbeit und der steten Bereitschaft, mir in praktischen Fragen wertvolle Tipps zu geben.

Von ganzem Herzen danke ich Frau Pfaffinger, die mich in die Geheimnisse guter Laborarbeit eingeweiht und mich mit Ihrer Erfahrung und Ihrem Können unterstützt hat.

Frau Scherer, Frau Baumann, Herrn Dr. Glocker und Herrn Prof. Kist danke ich recht herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiter/innen und Mitdotorand/innen, die für ein schönes Arbeitsklima sorgten und mir bei allen Anliegen stets zur Verfügung standen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder, Frau Eder, Frau Feuser-Koebe, Familie Fischler, Familie Gstrein, Herrn und Frau Knoll, Herrn und Frau Lotsch, Herrn und Frau Mietschke, Frau Plänk, Frau Runge, Familie Wesely und meinen Freundinnen und Freunden für den selbstverständlichen Glauben an meinen Erfolg und all die schönen Stunden danken, die ich mit ihnen verleben durfte und darf.

## **10. Curriculum vitae**

auf Anfrage

# 11. Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite	
Abb. 1:	PaLoc und Gene für das binäre Toxin (abgewandelt nach [42] )	10
Abb. 2:	Merkmale des hypervirulenten Epidemiestammes, Ribotyp 027	13
Abb. 3:	Geschlechtsverteilung	17
Abb. 4:	Isolate der Chirurgischen Klinik Nussbaumstraße	18
Abb. 5:	Isolate der Chirurgischen Klinik & Medizinischen Poliklinik Innenstadt Pettenkoferstraße	18
Abb. 6:	Isolate des Dr. von Haunerschen Kinderspitals	19
Abb. 7:	Isolate der Frauenklinik Maistraße	19
Abb. 8:	Isolate der Psychiatrischen Klinik Nussbaumstraße	19
Abb. 9:	Isolate der Medizinischen Klinik Innenstadt Ziemssenstraße	20
Abb. 10:	Isolate sonstiger Kliniken	20
Abb. 11:	Isolate des Universitätsklinikums München, Standort Großhadern	21 f.
Abb. 12:	<i>cdd</i> 3-Nachweis inklusive Wasser- und DNA-Kontrolle	28
Abb. 13:	<i>tpi</i> -Nachweis inklusive DNA- und Wasser-Kontrolle	28
Abb. 14:	Toxin A/B-ELISA	31
Abb. 15:	Betroffene Fachgebiete - absolute Anzahl der Stationen	32
Abb. 16:	Betroffene Fachgebiete - absolute Anzahl der Isolate	33
Abb. 17:	Verteilung der Isolate nach Altersgruppen	34
Abb. 18:	Merkmale des hypervirulenten Epidemiestammes, Ribotyp 027	35
Abb. 19:	Reihenfolge der Versuche	35
Abb. 20:	Charakterisierung von vier <i>C. difficile</i> -Stämmen (multiplex PCR)	36
Abb. 21:	Genotypen - absolute & prozentuale Verteilung	36
Abb. 22:	<i>C. difficile</i> -Stämme, bei denen die für das binäre Toxin codierenden Gene <i>cdtA</i> und <i>cdtB</i> vorhanden sind.	37

Abb.23:	Vollständige genotypische Ausstattung aller 330 Stämme	38
Abb. 24:	Vergleich ELISA-PCR: konkordante vs. nicht-konkordante Ergebnisse	39
Abb. 25:	Vergleich ELISA-PCR: konkordante vs. falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse	39
Abb. 26:	Genotypische Ausstattung inkl. Moxifloxacin-Resistenz aller <i>C. difficile</i> -Stämme	42
Abb. 27:	Moxifloxacin-Sensibilität vs. -Resistenz	43
Abb. 28:	PCR von <i>tcdC</i>	46
Abb. 29:	Sequenzen - Wildtyp vs. <i>tcdC</i> A1 vs. NAPI/027	48 f.
Abb. 30:	Sequenzen - Wildtyp vs. <i>tcdC</i> -A1, <i>tcdC</i> -B, <i>tcdC</i> -mp1, <i>tcdC</i> -mp2, <i>tcdC</i> sc1 und <i>tcdC</i> -sc3 sowie der 18 bp-Deletion von NAPI/027	51 ff.

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
Tabelle 1:	Geräte und Laborbedarf	15 f.
Tabelle 2:	Kits	16
Tabelle 3:	Nährmedien und -suspension	23
Tabelle 4:	Primer - inkl. Bindungsstellen, Gen und Produktgröße	26
Tabelle 5:	Genotypen und Moxifloxacin-Resistenz - <i>catA/B</i> -	40
Tabelle 6:	Genotypen und Moxifloxacin-Resistenz - <i>catA/B</i> +	40
Tabelle 7:	Ribotypisierung der drei höchstverdächtigen Stämme	44
Tabelle 8:	Ribotypen der zwei A+B+bi+ (Moxi-S) Stämme	44
Tabelle 9:	Ribotypisierung 14 zufällig ausgewählter Stämme	45
Tabelle 10:	Sequenzierung 19 ausgewählter Stämme	46 f.
Tabelle 11:	Verteilung der Genotypen - Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Ergebnissen anderer Studien	59
Tabelle 12:	Vergleich der Verteilung der Ribotypen mehrerer Studien	63
Tabelle 13:	Vergleich der Sequenzierungsergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Curry et al.	64 ff.

## Abkürzungsverzeichnis

AAC	Antibiotika-assoziierte Colitis
AGES	österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
bi	binäres Toxin
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> -assoziierte Diarrhoe
CDI	<i>Clostridium difficile</i> -Infektion
<i>cdtA</i>	Gen für binäres Toxin
<i>cdtB</i>	Gen für binäres Toxin
CNFAgar	<i>Clostridium difficile</i> -Agar
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
ESGCD	European Study Group on <i>Clostridium difficile</i>
GCT	große Zytotoxine
ISKL (CLSI)	Institut für Standards in Klinik und Labor (clinical and laboratory standards institute)
JHSPH	Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health
LAGuS	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LCT	large cytotoxines
MHK	minimale Hemmkonzentration
Moxi-R	resistent für Moxifloxacin
Moxi-S	sensibel für Moxifloxacin
n.s.	nicht sequenziert
n.z.	nicht zuzuordnen
PMC	pseudomembranöse Colitis
RKI	Robert Koch-Institut
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tcd A	Toxin A
Tcd B	Toxin B
<i>tcdA</i>	Gen für Toxin A

<i>tcdB</i>	Gen für Toxin B
<i>tcdC</i>	Gen für Toxin C
<i>tcdR</i>	Gen für Toxin R
<i>tpi</i>	spezienspezifische Triosephosphat-Isomerase

## Ausführliche Liste der Isolate

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-ELISA	cdd	3	tpi	Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
1	m	KIISAUG	1	1	1	1	A-B+	1,5	0,3			
2	m	KIIS5	1	1	1	1	A+B+	2	1			
3	w	MIGG21	1	1	1	1	A+B+	1,5	61			
4	m	KIISAUG	0	1	1	1	A-B+	1,5	0,3			
5	m	KIIS5	1	1	1	1	A+B+	2	9			
6	w	CHGI 11B	1	0	1	1	A+B+	> 32	74			
7	m	KIIPIS	0	1	1	1	A-B+	1,5	7			
8	m	KIISAUG	0	1	1	1	A+B+	1	0,3			
9	m	KIIS5	1	0	1	1	A+B+	0,75	9			
10	m	KIISAUG	0	1	1	1	A-B-	1	0,3			
11	m	MIGF8	1	0	1	1	A+B+	0,5	52			
12	w	MIGF7	0	1	1	1	A-B-	1	58			
13	w	MIGF7	0	1	1	1	A-B-	1	58			
14	w	URGH4	1	1	1	1	A-B+bi+	> 32	3	A1	40	078
15	m	MIGF2B	1	1	1	1	A+B+	0,5	55			
16	m	KIIS1	0	1	1	1	A-B-	0,75	1			
17	m	KIIS3	1	1	1	1	A+B+	1	8			
18	m	MIGF7	0	1	1	1	A+B+	> 32	63			
19	m	MIGF10A	0	1	1	1	A+B+	1	23			
20	m	MIGF8	1	1	1	1	A+B+	> 32	63			
21	m	KIIGAS	1	1	1	1	A+B+	1,5	9			
22	w	KIIS5	1	1	1	1	A+B+	0,5	0,2			
23	m	MIGF2C	1	1	1	1	A+B+	0,5	60			
24	m	M-HE-2	0	1	1	1	A-B-	0,75	1			
25	m	MIGF8	1	1	1	1	A+B+	> 32	63			
26	m	MIGF22	0	1	1	1	A+B+	> 32	3			
27	w	MIGH6	0	1	1	1	A-B-	0,5	39			
28	w	MIGF6A	1	1	1	1	A+B+	1	25			
29	m	KIINIPS	0	1	1	1	A+B+	1	0,4			
30	w	MIGF10B	0	1	1	1	A-B-	1,5	51			
31	w	KIISAUG	1	1	1	1	A+B+	> 32	0,6			
32	w	CHIEN	0	1	1	1	A-B+bi+	1	33			
33	m	MIGF9	1	1	1	1	A+B+	1,5	79			
34	m	MIIKP371	1	1	1	1	A+B+	1	68			
35	w	KIGG9A	0	1	1	1	A-B-	1,5	2			
36	m	HNGI7	0	1	1	1	A+B+	1,5	42			
37	w	M-HE-2	0	1	1	1	A-B+	1,5	1			
38	m	MIIAINF	0	1	1	1	A-B-	1,5	56			
39	m	M-TH-1E	1	1	1	1	A+B+	1,5	34			
40	m	STG K21	1	1	1	1	A+B+	2	72			
41	m	ORGI11A	1	1	1	1	A+B+	> 32	36			
42	w	MIIHAEM	0	1	1	1	A-B-	1,5	2			
43	m	KIIS5	1	1	1	1	A+B+	1,5	3			
44	m	ORGI11A	1	1	1	1	A+B+	> 32	36			
45	m	MIGF8	0	1	1	1	A-B-	1,5	66			
46	m	NRG I2	0	1	1	1	A-B-	4	27			
47	w	ORGI11A	1	1	1	1	A-B-	>32	72			
48	w	KIIKMT	1	1	1	1	A-B+	> 32	4			
49	m	CHIS 2	1	1	1	1	A-B+	1,5	52			
50	w	KIIS3	1	0	1	1	A-B+	1,5	3			
51	w	ORGI11A	1	0	1	1	A-B+	> 32	67			
52	w	MIGG21	1	1	1	1	A-B+	1	50			
53	m	ORGI11A	1	1	1	1	A-B-	> 32	60			
54	w	CHINOT	1	0	1	1	A-B+	0,75	67			
55	m	MIGF10B	1	1	1	1	A+B+	1	81			
56	m	MIGF10B	1	1	1	1	A+B+	1	81			
57	m	MIGF10A	0	1	1	1	A+B+	1	67			
58	m	MIGF8	1	1	1	1	A+B+	1	84			
59	w	MIGF21	1	1	1	1	A+B+	> 32	57			
60	m	MIGL21	1	1	1	1	A+B+	0,75	45			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
61	m	MIIPS4	1	1	1	A-B+	> 32	62			
62	w	ORGH11	1	0	1	A-B+	0,5	46			
63	w	FRGI10B	0	1	1	A-B-	1	1			
64	m	MIGG10A	1	1	1	A+B+	0,75	67			
65	m	MIGH11A	1	1	1	A+B+	> 32	70			
66	m	MIGF2C	1	0	1	A-B-	0,38	9			
67	w	MIGH11	1	0	1	A-B-	0,5	57			
68	m	MIGF21	0	1	1	A+B+	1	70			
69	w	MIGF3	0	1	1	A-B-	> 32	62			
70	w	MIGF9	0	1	1	A-B-	1	32			
71	m	MIGH8B	1	1	1	A+B+	> 32	58			
72	m	MIIS5	1	1	1	A+B+bi+	1,5	61	mp 1	28	023 einer der fünf A+B+bi+-Stämme, Moxi-S
73	m	MIGF21	0	1	1	A+B+	0,75	70			
74	w	MIITS	0	0	1	A-B-	1,5	65			
75	m	KIIS2	1	1	1	A+B+	0,75	17			
76	m	MIGH8B	1	1	1	A+B+	0,75	58			
77	w	MIGG10B	0	1	1	A+B+	1	67			
78	m	MIGG10B	0	1	1	A-B-	0,75	24			
79	w	MIGF2A	1	1	1	A+B+	> 32	62			
80	m	MIGL21	1	1	1	A+B+	1	35			
81	w	MIGF6B	1	1	1	A+B+	> 32	92			
82	w	MIGF21	0	1	1	A+B+	> 32	57			
83	m	MIIPS4	1	1	1	A+B+	> 32	68			
84	w	MIGF8	1	1	1	A+B+	> 32	81			
85	m	MIGG21	0	1	1	A-B-	0,75	69			
86	w	MIIS4	1	1	1	A+B+	> 32	87			
87	w	MIGF10B	1	0	1	A-B-	0,75	21			
88	w	MIGF22	1	0	1	A-B-	8	94			
89	w	CHGTRA	1	0	1	A-B-	> 32	82			
90	w	MIGH11	1	0	1	A-B-	1,5	87			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
91	m	MIGG10B	1	1	1	A+B+	> 32	57			
92	m	MIGF8	1	0	1	A-B-	> 32	82			
93	m	MIGF21	1	1	1	A-B-	> 32	79			
94	m	KIISAUG	1	1	1	A-B-	1,5	1			
95	m	MIGF10A	0	1	1	A-B-	1,5	73			
96	m	MIGG21	1	0	1	A-B-	> 32	70			
97	w	CHIS 1	1	1	1	A-B-	6	64			
98	w	MIGPM2	1	1	1	A-B-	8	65			
99	m	KIISAUG	0	1	1	A-B-	1,5	1			
100	m	CHIEN	0	1	1	A-B-	1	42			
101	w	MIIPS3	1	0	1	A-B-	0,75	74			
102	m	MIIPS19	1	1	1	A+B+	> 32	64			
103	w	MIGG7	1	1	1	A-B-bi+	> 32	73			
104	w	KIINIPS	1	1	1	A-B+	1	1			
105	m	PSI C4	0	1	1	A+B+	1	62			
106	w	KIISAUG	1	1	1	A-B+	> 32	1			
107	w	FRGI5	1	1	1	A+B+	> 32	70			
108	m	KIGG9A	0	1	1	A-B-	1,5	0,9			
109	m	KIIS3	0	1	1	A+B+	1	1			
110	m	IBGPALL	1	1	1	A+B+	> 32	75			
111	m	KIIS3	0	1	1	A-B-	1	1			
112	m	KIGG9A	0	1	1	A-B+	1	1			
113	w	KIIS5	0	1	1	A-B-	1	2			
114	w	MIGF6B	1	1	1	A+B+	1	48			
115	m	MIGG9A	0	1	1	A-B-	1	1			
116	m	MIGF7	1	1	1	A+B+	1	36			
117	m	MIGF7	1	1	1	A+B+	1	36			
118	m	KIHKMT	0	1	1	A-B-	1	11			
119	w	PSI B2	1	1	1	A+B+	> 32	44			
120	m	MIGH11A	0	1	1	A+B+	> 32	33			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
121	w	CHG PA	1	1	1	A+B+	1	31			
122	w	IBGPALL	1	1	1	A+B+	> 32	78			
123	w	CHINOT	1	1	1	A+B+	> 32	57			
124	m	KIGG9A	1	1	1	A-B-	0,75	3			
125	w	KIIA	0	1	1	A-B-	1	2			
126	m	KIISAUG	0	1	1	A-B-	0,75	0,9			
127	w	KIISAUG	0	1	1	A-B-	2	1			
128	m	MIGG3	0	1	1	A+B+	> 32	65			
129	w	MIIENDO	0	1	1	A+B+	1,5	34			
130	w	MIIKN	1	1	1	A-B-	0,25	81			
131	m	MIGH22B	1	1	1	A+B+	0,75	74			
132	m	MIGF3	1	1	1	A+B+	1	43			
133	m	MIGH22A	1	1	1	A+B+	4	71			
134	m	MIGG10B	1	1	1	A+B+	> 32	73			
135	w	FRIOP1	0	1	1	A-B-	1	25			
136	w	MIGG10B	1	1	1	A+B+	> 32	61			
137	m	KIIS3	1	1	1	A-B-bi+	1,5	11	A1	40	078
138	w	KIIKMT	1	1	1	A+B+	1	17			
139	w	MIIENDO	0	1	1	A-B-	1	47			
140	w	MIGG10A	0	1	1	A+B+	1	31			
141	w	KIIKMT	0	1	1	A-B+	> 32	13			
142	m	IBGNOT	0	1	1	A-B-	1,5	19			
143	w	MIGG21	1	1	1	A-B-bi+	1	36	A1	40	078
144	m	MIGF7	1	1	1	A+B+	1,5	36			
145	w	MIGH11	1	1	1	A+B+	> 32	83			
146	m	CHGTRA	1	1	1	A+B+	1,5	37			
147	m	MIGG7	0	1	1	A-B-	1,5	67			
148	m	MIGF7	1	1	1	A+B+	1,5	36			
149	m	MIIKN	1	1	1	A+B+	1,5	76			
150	w	MIGG21	1	1	1	A-B-bi+	> 32	36	A1	40	078

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
151	m	KIIA	1	1	1	A+B+	1,5	0,2			
152	w	MIIIS3	1	1	1	A+B+	1	43			
153	m	MIIIS22	0	1	1	A-B-	1	29			
154	m	MIGH11A	1	1	1	A-B-	1,5	66			
155	m	MIGF9	0	1	1	A-B-	0,75	57			
156	m	MIIAINF	1	1	1	A-B+	> 32	61			
157	w	MIGF4	1	1	1	A+B+	1	56			
158	m	CHIS2	1	1	1	A+B-	4	60			
159	m	MIGG5	1	1	1	A-B-	1,5	66			
160	m	MIGM21	1	1	1	A-B-	> 32	46			
161	m	KIIS1	1	1	1	A-B-	> 32	2			
162	w	MIGG10A	1	1	1	A-B-	1,5	55			
163	m	KIITONKO	1	0	1	A-B-	3	11			
164	w	CHIEN	1	1	1	A+B-bi+	1,5	33			
165	w	STG K21	1	1	1	A-B-bi+	1	72			
166	m	KIIS3	1	1	1	A-B-	1,5	9			
167	w	MIGH7	1	1	1	A-B-	2	38			
168	w	MIGF10B	0	1	1	A+B+	0,75	50			
169	w	MIGG22A	0	1	1	A+B-	1,5	58			
170	m	MIGF3	0	1	1	A-B-	0,75	84			
171	m	DEIAMANN	1	1	1	A+B-bi+	1,5	38			
172	m	DEIAMANN	1	1	1	A+B-bi+	1	38			
173	w	MIGG9B	0	1	1	A-B-	1,5	0,8			
174	m	MIGG10B	1	1	1	A-B-	> 32	59			
175	w	KIIS3	0	1	1	A-B-	1,5	1			
176	w	MIGG10A	0	1	1	A-B-	0,75	55			
177	w	MIIWS	1	1	1	A-B-	> 32	80			
178	w	MIGG10A	1	1	1	A-B-	8	55			
179	w	MIGG10A	1	1	1	A-B-bi+	> 32	55	A1	nz	-
180	m	MIGPM3	1	1	1	A+B+	>32	69			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
181	w	MIGF6A	0	1	1	A-B+	4	31			
182	m	MIGI11A	0	1	1	A-B+	> 32	66			
183	w	MIIS5	0	1	1	A-B+	12	49			
184	w	MIGI11A	0	1	1	A+B+	> 32,	87			
185	m	MIGG9B	1	1	1	A+B+	0,5	2			
186	w	MIGF4	1	1	1	A+B+	0,75	23			
187	w	MIITS	1	1	1	A-B+bi+	1,5	65	A1	40	078
188	m	CHIS 9	1	1	1	A-B+bi+	1,5	79	mp 2	94	-
189	w	FRIGP1	1	1	1	A+B+	0,75	36			
190	m	MIIPS19	1	1	1	A-B-	>32	75			
191	w	CHGG7	1	1	1	A+B+	>32	1			
192	w	CHGH6	0	1	1	A-B-	> 32	59			
193	m	MIGF3	1	0	1	A-B-	> 32	70			
194	w	MIGF4	0	1	1	A+B+	0,75	23			
195	w	CHGG2	0	1	1	A-B-	3	75			
196	m	MIGI11A	1	1	1	A-B-	> 32	31			
197	m	MIGF10B	0	1	1	A-B+	2	63			
198	m	MIGF2C	0	1	1	A-B+	> 32	56			
199	m	MIGF9	1	1	1	A-B+	1,5	61			
200	m	MIINOT	1	1	1	A-B+bi+	2	27			
201	w	FRGI5	1	1	1	A+B+	> 32	70			
202	m	PSI C4	1	1	1	A+B+	1	46			
203	w	MIGH11	1	1	1	A+B+	> 32	48			
204	m	MIGI11A	0	1	1	A-B-	> 32	66			
205	w	MIGF10A	1	1	1	A+B+	> 32	74			
206	m	KIGG9A	0	1	1	A-B-	1	2			
207	w	MIGI11B	1	1	1	A-B-	> 32	48			
208	w	PMGK22B	1	1	1	A-B-	1,0	76			
209	w	CHIS3	1	1	1	A-B-	3	80			
210	m	MIGF21	1	1	1	A-B-	4,0	59			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
211	w	CHIS4	1	1	1	A-B+	> 32	76			
212	m	PMGK22B	0	1	1	A-B+	1	66			
213	m	MIGF3	0	1	1	A-B+	1,0	40			
214	w	MIGI11A	1	1	1	A-B-	> 32	87			
215	w	MIGF6A	0	1	1	A-B+	1,5	31			
216	m	MIGF2C	1	1	1	A-B-bi+	1,5	56			
217	w	MIIPS19	1	1	1	A+B+	> 32	63			
218	w	MIGG11	1	1	1	A+B+	> 32	83			
219	w	FRIGP1	0	1	1	A+B+	1	36			
220	w	MIIPS19	1	1	1	A+B+	> 32	43			
221	m	ANISMAI	0	1	1	A-B-	0,75	63			
222	m	MIGF3	0	1	1	A-B-	> 32	57			
223	w	CHGH7	0	1	1	A-B-	> 32	71			
224	w	MIGF7	0	1	1	A-B+	> 32	71			
225	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	59			
226	m	KIIS3	1	1	1	A+B+	1	9			
227	m	KIIA	0	1	1	A-B-	1,5	0,6			
228	w	KIIKMT	0	1	1	A-B-	1	14			
229	m	MIGL21	0	1	1	A+B+	1	22			
230	m	KIIGAS	0	1	1	A-B-	1	4			
231	m	MIIPS20	1	1	1	A-B-	1	64			
232	w	KIIS3	1	1	1	A-B+bi+	0,75	14			
233	m	HNGI8	1	1	1	A+B+	> 32	66			
234	m	KIIS3	1	1	1	A-B+bi+	0,75	9			
235	w	KIPIPS	1	1	1	A+B+	1	0,2			
236	m	KIIS3	1	1	1	A-B-	1,5	4			
237	m	MIGF21	1	0	1	A-B-	> 32	62			
238	w	KIIKMT	0	1	1	A-B-	1	14			
239	m	MIGF10B	1	1	1	A+B+	8	45			
240	m	MIGG10A	0	1	1	A-B+bi+	> 32	52	sc 1	40	078

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
241	m	MIGG10B	0	1	1	A-B-	0,75	68			
242	w	CHGG7	1	1	1	A+B+	0,38	62			
243	m	MIGL21	1	1	1	A+B+	0,75	65			
244	m	PMGK22B	0	1	1	A-B+	1	60			
245	m	MIIA	1	1	1	A-B-	> 32	76			
246	m	ANG F0	1	1	1	A+B+	0,75	55			
247	m	KIIGAS	0	1	1	A+B+	0,75	17			
248	m	MIGF2A	0	1	1	A+B+	0,75	64			
249	w	CHGG2	1	1	1	A+B+	> 32	75			
250	w	MIGG21	1	1	1	A-B+bi+	> 32	58			
251	m	MIGG21	1	1	1	A-B+bi+	> 32	59			
252	m	MIGL21	1	1	1	A+B+	1	65			
253	m	KIIS3	1	1	1	A+B+	0,75	9			
254	w	CHGG2	1	1	1	A+B+	> 32	91			
255	w	MIGF21	1	1	1	A+B+	1	39			
256	w	MIGF21	1	1	1	A+B+	2	39			
257	m	KIITONKO	1	1	1	A+B+	4	3			
258	m	CHGG7	1	0	1	A-B-	6	70			
259	w	MIGF21	1	1	1	A+B+	1,5	39			
260	w	KIIPIS	0	1	1	A-B-	1	0,6			
261	w	MIGF9	1	1	1	A+B+	> 32	76			
262	w	MIGF9	1	1	1	A+B+	> 32	76			
263	m	MIIS5	1	1	1	A-B-bi+	2	81			
264	m	KIIPIS	1	1	1	A+B+	1	10			
265	m	MIGF10B	1	0	1	A-B-	0,75	45			
266	m	CHG PA	1	1	1	A+B+	1	66			
267	m	MIIS5	1	1	1	A+B+	1,5	65			
268	m	CHGI 11B	1	1	1	A-B-	> 32	44			
269	w	M-HE-2	0	1	1	A-B+	0,75	2			
270	w	CHGH22	1	1	1	A+B+	> 32	62			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK
			ELISA	cdd 3	tpi						
271	m	CHIS 67	0	1	1	A+B+	0,5	79			
272	m	MIIENKR	0	1	1	A+B+	1	35			
273	m	MIIENKR	1	1	1	A+B+	4	35			
274	w	CHIEN	1	1	1	A+B+	2	48			
275	m	MIIPS4	1	1	1	A+B+	2	72			
276	m	IBGNOT	1	1	1	A+B+bi+	> 32	74	n.s.	n.z.	n.z. einer der fünf A+B+bi+-Stämme, Moxi-R
277	m	NRGH8	1	1	1	A+B+	> 32	74			
278	w	MIIUEW	1	1	1	A+B+	> 32	69			
279	w	MIGG10B	1	1	1	A+B+	8	66			
280	w	MIIS3	1	1	1	A+B+	> 32	65			
281	w	ORGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	56			
282	m	ORGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	64			
283	m	MIGF21	1	0	1	A+B+	1,5	37			
284	m	CHGG7	1	1	1	A+B+	1	66			
285	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	69			
286	w	KIIMT	1	1	1	A-B-	3	8			
287	w	KIIPIS	1	1	1	A+B+	1,5	1			
288	w	KIITONKO	1	1	1	A+B+	2	17			
289	m	MIGI11A	1	1	1	A-B+	> 32	72			
290	m	MIIPS19	1	1	1	A-B-	>32	65	sc 3	45	001
291	m	MIGG7	1	1	1	A+B+	> 32	10			
292	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	54			
293	m	KIIS1	1	1	1	A+B+	4	16			
294	m	KIIS3	1	1	1	A+B+	2	72			
295	w	MIGH11	1	1	1	A+B+	> 32	88			
296	w	MIIPS19	1	1	1	A-B-	>32	74	sc 3	45	001
297	m	MIIPS2	1	1	1	A+B+	> 32	72			
298	w	MIGH11	1	1	1	A+B+	> 32	57			
299	m	MIIPS2	1	1	1	A+B+	> 32	77			
300	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	73			

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK	
			ELISA	cdd 3	tpi							
301	m	KIITONKO	1	1	1	A+B+	0,75	12				
302	m	KIIA	1	1	1	A+B+	2	1				
303	m	MIGG10B	1	1	1	A+B+bi+	> 32	66	A1	94		- einer der fünf A+B+bi+-Stämme, Moxi-R
304	m	MIIPS1P	1	1	1	A+B+	> 32	90				
305	m	MIGG10B	1	1	1	A+B+bi+	1,5	66	n.s.	n.z.	n.z.	einer der fünf A+B+bi+-Stämme, Moxi-S
306	m	MIGF3	1	1	1	A+B+	> 32	70				
307	m	MIIS21	1	1	1	A+B+	> 32	24				
308	m	ANGH2	1	1	1	A+B+	> 32	57				
309	w	MIIS21	1	1	1	A+B+	> 32	65				
310	w	CHGI 11B	1	1	1	A+B+	> 32	88				
311	w	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	86				
312	m	MIGG7	1	1	1	A+B+	4	86				
313	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	57				
314	m	MIGF3	1	1	1	A+B+	2	72				
315	w	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	65				
316	w	MIGH4	1	1	1	A+B+	4	38				
317	m	MIGG7	1	1	1	A+B+	> 32	86				
318	m	M-TH-1C	1	1	1	A+B+	1,5	24				
319	w	PMGK22B	1	1	1	A+B+	2	63				
320	m	KIINIPS	1	1	1	A-B+	2	0,9				
321	w	MIGI11A	1	1	1	A-B+	1	1				
322	w	MIGG11	1	0	1	A-B+	> 32	78				
323	w	MIGI11A	1	1	1	A-B+	> 32	84				
324	w	KIISC3	1	1	1	A+B+	1,5	63	B	22	94	
325	m	MIUEW	1	1	1	A+B+	> 32	67				
326	m	MIGI11A	1	1	1	A+B+	> 32	42				
327	w	MIIPS19	1	1	1	A+B+	> 32	67	sc 3	45	001	
328	w	MIUEW	1	1	1	A+B+	> 32	68	n.s.	45	001	
329	w	MIUEW	1	1	1	A+B+	> 32	68	sc 3	45	001	
330	m	MIIPFL	1	1	1	A+B+bi+	> 32	60	A1	94		- einer der fünf A+B+bi+-Stämme, Moxi-R

Nr.	m / w	Station	Toxin aus Stuhl-			Genotyp	E-Test in µg/ml	Alter	Sequenzierung tcdC	Ribotyp Freiburg	Ribotyp UK	
			ELISA	cdd 3	tpi							
331		Kontrollstamm von Prof. Kist				A+B+bi+						
332		Kontrollstamm von Prof. Kist				A+B+bi+						
333		Kontroll-DNA von ATCC				A+B+						

Eine Liste der Stationsabkürzungen findet sich auf den folgenden Seiten.

Abkürzung	Station				
ANGH2	Klinikum Großhadern, Station H2, Anästhesie				
ANISMAI	Klinik für Anästhesiologie Maiastraße, Intensivstation				
CHG PA	Klinikum Großhadern, chirurgische Poliklinik, Ambulanz				
CHGG2	Klinikum Großhadern, Station G2, Chirurgie				
CHGG7	Klinikum Großhadern, Station G7, Chirurgie				
CHGH22	Klinikum Großhadern, Station H22, Strahl/Orth.				
CHGH6	Klinikum Großhadern, Station H6, Chirurgie				
CHGH7	Klinikum Großhadern, Station H7, Chirurgie				
CHG111B	Klinikum Großhadern, Station I11B, Orthopädie				
CHGTRA	Klinikum Großhadern, Station H5, Transplant				
CHIEN	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Endoskopie				
CHINOT	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Ambulanz/Notaufnahme				
CHIS 1	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Station 1 (Privat)				
CHIS 2	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Station 2 (Viszeral)				
CHIS 67	Chirurgische Klinik Pettenkoferstraße, Station P6+7				
CHIS 9	Chirurgische Klinik Pettenkoferstraße, Station P9 (Privat)				
CHIS3	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Station 3 (Unfall)				
CHIS4	Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, Station 4 (Unfall)				
DEIAMANN	Dermatologische Klinik Innenstadt, Männerambulanz				
FRGI10B	Klinikum Großhadern, Station I10, Säuglinge, Intensiv				
FRGI5	Klinikum Großhadern, Station I5, Frauen				
FRIGP1	Frauenklinik Maiastraße, Station 1, Geburtshilfe				
FRIOP1	Frauenklinik Maiastraße, Station 0, Geburtshilfe				
HNGI7	Klinikum Großhadern, Station I7, HNO				
HNGI8	Klinikum Großhadern, Station I8, HNO				
IBGNOT	Klinikum Großhadern, Nothilfe				
IBGPALL	Klinikum Großhadern, Palliativstation				
KIGG9A	Klinikum Großhadern, Station G9A, Kinderkardiologie				
KIIA	Haunersches Kinderspital, Pädiatrische Ambulanz				
KIIGAS	Haunersches Kinderspital, Gastroenterologische Ambulanz				

Abkürzung	Station				
KIIKMT	Haunersches Kinderspital, Intensiv Knochenmarktransplantation				
KIINIPS	Haunersches Kinderspital, Neugeborenen Intensiv				
KIPIPS	Haunersches Kinderspital, Intensiv Intern				
KIIS1	Haunersches Kinderspital, Station Intern 1				
KIIS2	Haunersches Kinderspital, Station Intern 2				
KIIS3	Haunersches Kinderspital, Station Intern 3				
KIIS5	Haunersches Kinderspital, Station Intern 5				
KIISAUG	Haunersches Kinderspital, Station Intern Säuglinge				
KIISC3	Haunersches Kinderspital, Station Kinderchirurgie 3				
KIITONKO	Haunersches Kinderspital, Tagesstation Onkologie				
M-HE-2	Kinderzentrum Heiglhofstraße				
M-TH-1C	Städtisches Krankenhaus Thalkirchen, Station 9, Derma				
M-TH-1E	Städtisches Krankenhaus Thalkirchen, Station 4, Derma				
MIGF10A	Klinikum Großhadern, Station F10A, Med III, Innere				
MIGF10B	Klinikum Großhadern, Station F10B, Med III, Innere				
MIGF21	Klinikum Großhadern, Station F 21, Med II, Innere				
MIGF22	Klinikum Großhadern, Station F22, Med I, Innere				
MIGF2A	Klinikum Großhadern, Station F 2A, Med I, Intensiv				
MIGF2B	Klinikum Großhadern, Station F2B, Med II, Intensiv				
MIGF2C	Klinikum Großhadern, Station F 2C, Med III, Intensiv				

<b>MIGF3</b>	Klinikum Großhadern, Station F 3, Med I, Innere		
<b>MIGF4</b>	Klinikum Großhadern, Station F 4, Med I, Innere		
<b>MIGF6A</b>	Klinikum Großhadern, Station F6A, Med I+II, Innere		
<b>MIGF6B</b>	Klinikum Großhadern, Station F 6B, Med I+II, Innere		
<b>MIGF7</b>	Klinikum Großhadern, Station F7 Med II, Innere		
<b>MIGF8</b>	Klinikum Großhadern, Station F8 Med II, Innere		
<b>MIGF9</b>	Klinikum Großhadern, Station F9, Med II, Innere		
<b>MIGG10A</b>	Klinikum Großhadern, Station G 10A, Med III, Innere		
<b>MIGG10B</b>	Klinikum Großhadern, Station G 10B, Med III, Innere		

<b>Abkürzung</b>	<b>Station</b>		
<b>MIGG11</b>	Klinikum Großhadern, Station G 11, Dialyse		
<b>MIGG21</b>	Klinikum Großhadern, Station G21 Med III, Innere		
<b>MIGG22A</b>	Klinikum Großhadern, Station G 22A, NI / NCH		
<b>MIGG3</b>	Klinikum Großhadern, Station G3, Herzchirurgie		
<b>MIGG5</b>	Klinikum Großhadern, Station G 5, Chirurgie, Intensiv		
<b>MIGG7</b>	Klinikum Großhadern, Station G 7, Chirurgie		
<b>MIGG9A</b>	Klinikum Großhadern, Station G 9A, Kinderkardiologie		
<b>MIGG9B</b>	Klinikum Großhadern, Station G 9B, Kinderkardiologie		
<b>MIGH11</b>	Klinikum Großhadern, Station H 11, Orthopädie		
<b>MIGH22A</b>	Klinikum Großhadern, Station H 22A, Strahl/Orth.		
<b>MIGH22B</b>	Klinikum Großhadern, Station H 22B, Strahl/Orth.		
<b>MIGH4</b>	Klinikum Großhadern, Station H 4, Urologie		
<b>MIGH6</b>	Klinikum Großhadern, Station H6, Chirurgie		
<b>MIGH7</b>	Klinikum Großhadern, Station H 7, Chirurgie		
<b>MIGH8B</b>	Klinikum Großhadern, Station H 8B, Neurologie		
<b>MIGI11A</b>	Klinikum Großhadern, Station I 11A, Orthopädie		
<b>MIGI11B</b>	Klinikum Großhadern, Station I 11B, Orthopädie		
<b>MIGL21</b>	Klinikum Großhadern, Station L 21, Med III/Isolierstation		
<b>MIGM21</b>	Klinikum Großhadern, Station M 21, Med III/Isolierstation		
<b>MIGPM2</b>	Klinikum Großhadern, Medizinische Poliklinik 2		
<b>MIGPM3</b>	Klinikum Großhadern, Medizinische Poliklinik 3		
<b>MIIA</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Ambulanz		
<b>MIIAINF</b>	Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Infektionsambulanz		
<b>MIIENDO</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Endoskopie		
<b>MIIENKR</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Endokrinologie		
<b>MIIHAEM</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Ambulanz Hämatologie		
<b>MIIKN</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, künstliche Niere		
<b>MIIKP371</b>	Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Nephrologisches Zentrum, Kabine 371		
<b>MIIINOT</b>	Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Notaufnahme		

Abkürzung	Station			
<b>MIIPFL</b>	<b>Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Station 2/Intensivpflege</b>			
<b>MIIPS19</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 19, Nephrologie</b>			
<b>MIIPS1P</b>	<b>Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Privatstation</b>			
<b>MIIPS2</b>	<b>Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Station 2</b>			
<b>MIIPS20</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 20, Kardiologie</b>			
<b>MIIPS3</b>	<b>Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Station 3</b>			
<b>MIIPS4</b>	<b>Medizinische Poliklinik Pettenkoferstraße, Station 4</b>			
<b>MIIS21</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 21</b>			
<b>MIIS3</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 3</b>			
<b>MIIS4</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 4</b>			
<b>MIIS5</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 5</b>			
<b>MIIS22</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Station 22</b>			
<b>MIITS</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Transplant-Ambulanz</b>			
<b>MIUUEW</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Überwachung</b>			
<b>MIISWS</b>	<b>Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Intensiv</b>			
<b>NRG I2</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station I2, Neuro, Intensiv</b>			
<b>NRGH8</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station H8, Neurologie</b>			
<b>ORGH11</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station H11, Orthopädie</b>			
<b>ORGI11A</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station I11A, Orthopädie</b>			
<b>PMGK22B</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station K22, Phys. Med.</b>			
<b>PSI B2</b>	<b>Psychiatrische Klinik Nussbaumstraße, Station B2</b>			
<b>PSI C4</b>	<b>Psychiatrische Klinik Nussbaumstraße, Station C4</b>			
<b>STG K21</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station K21, Strahlen</b>			
<b>URGH4</b>	<b>Klinikum Großhadern, Station H4, Urologie</b>			

Felix qui potuit rerum cognoscere causas.

Vergil (70-19 v. Chr.)

Ἐμπειρία γὰρ τῆς ἀπειρίας κρατεῖ.

Menander (ca. 342 - 291 v.Chr.)