

Clostridium difficile

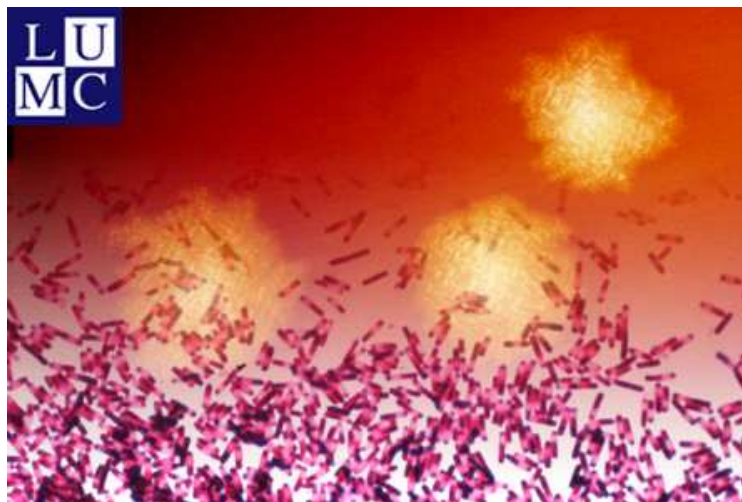
Optimalisatie van de real-time toxine B-PCR bij feces



Karakterisatie en sequentie-analyse van ribotype 078-stammen



ELISA voor detectie van toxine A en B in vloeibare culturen



Studente: Jenny de Jong, 1212162
Medische microbiologie, Hogeschool Utrecht
Stagementrix: K. van Vliet
Stage-instelling: Leids Universitair Medisch Centrum
Stagebegeleiders: J. Corver en D. Bakker
Afstudeerperiode: 12 november 2007 – 30 mei 2008, Leiden

Afstudeerverslag

Gegevens stage-instituut

- Leids Universitair Medisch Centrum
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden
- Afdeling Klinisch Medisch Laboratorium
Telefoon 071-526 35 60
- Stagebegeleiders:

Naam:	Jeroen Corver	Dennis Bakker
Titel(s):	Dr. ir.	Ing.
Functie:	Post doc.	Research analyst
Afdeling:	Medische Microbiologie	Klinisch Medisch Laboratorium
Telefoon:	071-526 36 49	071-526 14 51
E-mail:	j.corver@lumc.nl	d.bakker@lumc.nl

Gegevens opleidingsinstituut

- Hogeschool Utrecht
Institute for Life Sciences & Chemistry
F.C. Donderstraat 65
3572 JE Utrecht
Telefoon 030-275 88 88
- Opleiding: Biologie en Medisch Laboratorium Onderzoek
Specialisatie: Medische Microbiologie
- Stagementrix: K. van Vliet
- Afstudeerperiode: 12 november 2007 – 30 mei 2008

Gegevens student

- J.G. de Jong
Zuiderkeerkring 205
2408 JZ Alphen aan den Rijn
Telefoon 06-182 901 40

Handtekening als bewijs van goedkeuring

D. Bakker

J.G. de Jong

Voorwoord

Na zeven maanden stage in het Leids Universitair Medisch Centrum is een einde gekomen aan mijn onderzoek over *Clostridium difficile*. Deze periode is voor mij in veel opzichten erg leerzaam geweest. Hoewel mijn scriptie af is, gaan de onderzoeken gewoon door. In deze scriptie heb ik geprobeerd u een goed beeld te geven van mijn onderzoeken rond *C. difficile*. De onderzoeken die in deze scriptie zijn besproken heb ik natuurlijk niet alleen kunnen doen.

Om te beginnen is een goede begeleiding erg belangrijk en zonder de hulp van Jeroen Corver en Dennis Bakker had deze scriptie niet de huidige vorm kunnen aannemen. Ik wil hen bedanken voor hun begeleiding, maar ook de vrijheid die ik tijdens de stageperiode heb gehad. Door hen heb ik een duidelijk beeld gekregen wat 'de research' precies inhoudt. Ook wil ik hen bedanken voor de steun en begrip in de moeilijke tijd die ik heb gehad.

Ik heb veel commentaar en adviezen gehad tijdens werkbijeenkomsten over mijn resultaten van de *Clostridium*-groep. Deze groep bestaat naast mijn begeleiders uit Ed Kuijper, Céline Harmanus, Bram Goorhuis en Renate van den Berg. Hen wil ik bedanken voor hun suggesties. Ik vond het leuk om mee te mogen doen aan dit *Clostridium*-project. Céline wil ik extra bedanken voor het nakijken van mijn Engelse samenvatting.

Kevin den Hertog, Anouk van Leeuwen en Dick de Jong wil ik graag bedanken voor hun suggesties voor mijn verslag en/of hun enorme steun tijdens de moeilijke tijd die ik meemaakte.

K. van Vliet, M.M. Immink en D. van Brenk wil ik graag bedanken voor hun commentaar en adviezen op de presentaties.

Verder wil ik alle medewerkers van het Klinisch Medisch Laboratorium bedanken voor de gezellige tijd die ik met hun heb gehad tijdens mijn stage en voor het uitlenen van computers.

Jenny de Jong

Samenvatting

Clostridium difficile is een anaërobe Gram-positieve staaf, die sporen kan vormen. Deze bacterie kan milde diarree, pseudomembraneuze colitis en toxinogene megacolon veroorzaken. Deze ziektebeelden worden samengevat als *C. difficile* infectie (CDI). *C. difficile* kan drie toxinen produceren: toxine A, toxine B en een binair toxine. Toxine A en toxine B veroorzaken diarree en beschadigingen in de dikke darm. De functie van het binaire toxine in infectie met *C. difficile* is nog niet bekend.

Op het LUMC is een real-time toxine B-PCR (real-time toxB-PCR) ontwikkeld. Hierbij wordt feces voorbehandeld met STAR-buffer en het DNA wordt automatisch geïsoleerd met de MagNA Pure LC. Met verschillende voorbehandelings- en DNA-isolatie methoden is geprobeerd deze toxB-PCR te optimaliseren. Echter werd geen verbetering van de sensitiviteit waargenomen t.o.v. de ontwikkelde methode.

Het doel van dit onderzoek was het verbeteren van de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR bij feces met behulp van looxster® en een specifiek aankweekmedium. Looxster® is een methode waarbij prokaryoot DNA wordt geconcentreerd. Het specifieke aankweekmedium bevatte cycloserine, cefoxitine, taurocholaat en lysozym. De eerste twee zijn antibiotica en remmen de groei van *Enterobacteriaceae*. De laatste twee genoemde stoffen zorgen ervoor dat sporen van *C. difficile* kunnen ontkiemen.

Uit de resultaten bleek dat zowel looxster® als het specifiek ontwikkelde aankweekmedium geen verbetering gaf van sensitiviteit van de real-time toxB-PCR bij feces. Omdat bij gebruik van het specifiek ontwikkelde aankweekmedium geen verbetering van de real-time toxB-PCR bij feces werd gevonden, werd besloten de groei van *C. difficile* in dit medium te onderzoeken zonder feces.

Hieruit bleek dat de groei van *C. difficile* in het specifieke aankweekmedium niet reproduceerbaar was. Om deze reden werd onderzocht in welk medium *C. difficile* wel goed wilde groeien. Vier verschillende aankweekmedia werden bij dit experiment onderzocht: het specifieke aankweekmedium (BHI+CCTL), Thio, TSB+XV en BHI.

Uit de resultaten bleek dat de bacterie in het medium thio het beste groeide. Daarom wordt geprobeerd de rt toxB-PCR te optimaliseren met het medium thio dat cycloserine en cefoxitine bevat en verschillende concentraties taurocholaat en lysozym.

De virulentiefactoren van *C. difficile* zijn onderzocht in ribotype 078-stammen op basis van PCR. Deze virulentiefactoren zijn het *tcdA*-gen, *tcdB*-gen, *tcdC*-gen, die liggen op het pathogeniciteitslocus (PaLoc) en *cdtA*-gen en *cdtB*-gen, die liggen op het cytolethal distending toxine locus (CdtLoc). Daarnaast werd een deel van het *tcdC*-gen gesequenced en werd een PCR uitgevoerd op het *ErmB*-gen.

Het doel was om een relatie aan te kunnen tonen tussen ribotype 078-stammen afkomstig van mens en varken op basis van de virulentiefactoren. Ribotype 078-stammen uit verschillende jaargangen (2005-2007) zijn ook onderzocht om eventueel te kunnen verklaren waarom dit ribotype de laatste jaren toeneemt. Tevens is onderzocht wat de verschillen zijn tussen gekarakteriseerde ribotype 078-stammen en de referentiestam ribotype 027.

Uit de resultaten bleek dat de gekarakteriseerde ribotype 078-stammen van humane- en varkensafkomst dezelfde virulentiefactoren (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* en *cdtB*) hadden. Het *tcdC*-gen bevatte bij de ribotype 078-stammen puntmutaties op positie 183bp en 184bp. De mutatie op positie 184bp resulteert in een vroegtijdig stopcodon. Daarnaast hadden alle gekarakteriseerde ribotype 078-stammen een 39bp deletie in het *tcdC*-gen.

Alle gekarakteriseerde *C. difficile* ribotype 078-stammen hadden ook dezelfde bekende virulentiefactoren als de zeer virulente *C. difficile* ribotype 027. Het *tcdC*-gen van ribotype 027 heeft een puntdeletie, waardoor door een frameshift verderop in het gen een stopcodon ontstaat. Dus ribotype 078 heeft een andere mutatie in het *tcdC*-gen dan ribotype 027, maar beide mutaties leiden tot een vroegtijdig stopcodon.

Door een mutatie/deletie in het *tcdC*-gen kunnen hypervirulente *C. difficile*-stammen ontstaan, die meer toxine A en toxine B produceren dan andere pathogene stammen die geen mutaties hebben. Om de concentraties van deze toxinen in vitro te kunnen bepalen werd een ELISA opgezet.

Een ELISA is een techniek die gebaseerd is op de interactie tussen antigenen en antilichamen. Het doel van dit onderzoek was dus het opzetten van een ELISA voor detectie van enterotoxine A en cytotoxine B in vloeibare culturen.

Voor beide toxinen werd een indirecte ELISA en een sandwich ELISA ontwikkeld. Voor de sandwich ELISA werden echter andere antilichamen gebruikt dan voor de indirecte ELISA.

Uit de resultaten bleek dat de indirecte toxB ELISA het gevoeligst was met het primaire antilichaam konijn α -toxB (1:500) en het secundaire antilichaam Geit α -konijn (1:500). Deze indirecte toxB ELISA kan gebruikt worden voor het detecteren van toxine B in vloeibare culturen.

De sandwich toxA ELISA leek het gevoeligst met het primaire antilichaam rund α -toxA (1:500), het secundaire antilichaam muis (1:500) α -toxA en het tertiaire antilichaam geit α -muis (1:500). Alle positieve signalen van de sandwich toxA ELISA werden echter steeds minder sterk door een nog onbekende oorzaak. Om deze reden wordt een indirecte toxA ELISA uitgevoerd met een deel van de antilichamen van de sandwich toxA ELISA.

Summary

Clostridium difficile is an anaerobic Gram positive rod that can form spores. This bacterium can cause diarrhea, pseudomembranous colitis and toxic megacolon. These syndromes are called *C. difficile* infections, CDI. *C. difficile* can produce three toxins: toxin A, toxin B and a binary toxin. Toxin A and toxin B cause diarrhea and damages to the colon. The function of the binary toxin in infection with *C. difficile* is unknown.

A real-time toxB-PCR is developed at the LUMC. Faeces will be treated with STAR-buffer and the DNA will automatically be isolated by the MagNA Pure LC. Different pretreatment- and DNA isolation methods were tried to optimize this PCR. However no improvement of the sensitivity was observed with regard to the developed method.

The goal of this research was to improve the sensitivity of the real-time toxB-PCR on faeces with Looxster[®] or with a specific medium. Looxster[®] is a method that concentrates prokaryotic DNA. The specific medium contains cycloserin and cefoxitin, to inhibit the growth of *Enterobacteriaceae*, and taurocholate and lysozyme, which have a germinating function on the spores of *C. difficile*.

From the results it became clear that looxster[®] didn't improve the sensitivity of the real-time toxB-PCR. There also wasn't found any improvement of the sensitivity of the real-time toxB-PCR with faeces with the specific developed medium. Because of this reason it was researched if *C. difficile* could grow in the medium without faeces.

These results showed that the growth of *C. difficile* in the specific medium wasn't reproducible. For this reason it was examined in which medium *C. difficile* would grow well. Four different media were used for this experiment: the specific media (BHI+CCTL), Thio, TSB+XV and BHI.

The results showed that *C. difficile* would grow the best in the medium containing thio. For this reason the optimisation of the real-time toxB-PCR will be examined with the medium containing thio and which also contains cycloserin and cefoxitin and different concentrations of taurocholate and lysozyme.

Virulence markers of *C. difficile* ribotype 078 were researched with PCR. These virulence markers are the *tcdA* gene, *tcdB* gene, *tcdC* gene, which are located on the pathogenicity locus, and *cdtA* gene and *cdtB* gene, which are located on the cytolethal distending toxin locus (CdtLoc). Also a part of the *tcdC* gene was sequenced and the presence of the *ErmB* gene was researched by PCR.

The goal was to prove there was a relation in virulence markers between ribotype 078 strains from humans and pigs. Ribotype 078 strains from different years (2005-2007) were also examined for a possible explanation of the increase of this ribotype. These results were also compared with the virulence markers of *C. difficile* ribotype 027 (reference strain).

From the results it became clear that the characterised ribotype 078 strains of humans and pigs had the same virulence markers (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB*). The *tcdC* gene of all characterised ribotype 078 strains had the same mutations at position 183bp and 184bp. The mutation at position 184bp led to an premature stopcodon. All strains had also a 39bp deletion in the *tcdC* gene.

All characterised *C. difficile* ribotype 078 strains also had the same virulence markers as the hypervirulent *C. difficile* ribotype 027. The *tcdC* gene of ribotype 027 had a point deletion, which introduces a stopcodon by frameshift. In conclusion ribotype 078 had another mutation in the *tcdC* gene than ribotype 027, but both mutations led to an introduction of an early stopcodon.

This mutation in the *tcdC* gene can give rise to hypervirulent *C. difficile* strains. These strains produce more toxin A and toxin B than other pathogenic strains without the mutation in the *tcdC* gene. To define the concentrations of these toxins an ELISA was developed.

An ELISA is a technique that is based on the interaction between antigenes and antibodies. The goal of this research was to create an ELISA for detection of enterotoxin A and cytotoxin B in liquid cultures.

An indirect ELISA and a sandwich ELISA were developed for both toxins. For the sandwich ELISA other antibodies were used than for the indirect ELISA. The results of both ELISA's were compared.

From the results it became clear that the indirect toxB ELISA was most sensitive with the primary antibody rabbit α -toxB (1:500) and secondary antibody goat α -rabbit (1:500). This indirect toxB ELISA can be used for detection of toxin B in liquid cultures.

The sandwich ELISA seemed the most sensitive with the primary antibody bovine α -toxA (1:500), the secondary antibody mouse α -toxA (1:500) and the tertiary antibody goat α -mouse (1:500). However the positive signals of the sandwich toxA ELISA became weaker by a still unknown cause. For this reason an indirect toxA ELISA will be done with some of the antibodies of the sandwich toxA ELISA.

Afkortingenlijst

α	Anti
Ab	Antilichaam
API	Appareils et Procédés d'Identification
BHI	Brain Heart Infusion broth
BHI+CCTL	BHI met cycloserine, cefoxitine, taurocholaat en lysozym
bp	baseparen
CDI	<i>Clostridium difficile</i> infectie
cDNA	copy DeoxyriboNucleic Acid
<i>cdtA</i>	Cytolethal Distending Toxin A gen (voor het binaire toxine)
<i>cdtB</i>	Cytolethal Distending Toxin B gen (voor het binaire toxine)
CFU	Colony Forming Unit
Clos-plaat	<i>Clostridium difficile</i> specifieke agar-plaat
CNA	Columbia agar met colistine en nalidixinezuur
Ct	Cyclenumber threshold
Δ	Deletie
ELISA	Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
EtOH	Ethanol
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
H ₂ SO ₄	Zwavelzuur
HCl	Zoutzuur
HRP	HorseRadish Peroxidase
kb	kilobase
KI	Kolomisolatie
MgP	MagNA Pure LC
mRNA	messenger RiboNucleic Acid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonaat
NaAc	Natriumacetaat (NaCH ₃ COO)
NaHCO ₃	Natriumwaterstofcarbonaat
PaLoc	Pathogenicity locus
PBS	Physiological Buffered Salt (NaCl 0,9%)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PhHV	Phocine Herpes Virus
rt-PCR	real-time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Sp.	Species
STAR	Stool Transport And Recovery Buffer
<i>tcdA</i>	Toxine <i>Clostridium difficile</i> A gen
TcdA	Toxine <i>Clostridium difficile</i> A
<i>tcdB</i>	Toxine <i>Clostridium difficile</i> B gen
TcdB	Toxine <i>Clostridium difficile</i> B
<i>tcdC</i>	Toxine <i>Clostridium difficile</i> C gen
TcdC	Toxine <i>Clostridium difficile</i> C (een membraanbindend eiwit)
<i>tcdE</i>	Toxine <i>Clostridium difficile</i> E gen
TcdE	Toxine <i>Clostridium difficile</i> E (een porievormend eiwit)
<i>tcdR</i>	Toxine <i>Clostridium difficile</i> R gen
TcdR	Toxine <i>Clostridium difficile</i> R (een σ -factor)
Thio	Thioglycolaat met resazurine
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TSB+XV	Trypton Soya Broth met X- en V-factor bouillon
VIDAS	Vitek Immuno Diagnostic Assay System

Inhoudsopgave

1. Inleiding	10
1.1 <i>Clostridium difficile</i>	10
2. Theorie	11
2.1 Pathogenese van <i>Clostridium difficile</i> infecties	11
2.2 Virulentiefactoren	12
2.3 Karakterisatie	14
2.4 Epidemieën in Nederland	15
2.5 Afstudeerprojecten	16
2.5.1 Looxster® en aankweekmedium	17
2.5.2 ELISA	18
3. Materiaal en methoden	19
3.1 Looxster® en aankweekmedium	19
3.1.1 Real-time toxB-PCR met feces behandeld met looxster® en aankweekmedium	19
3.1.2 Groei van <i>C. difficile</i> stam 630 in het specifiek ontwikkeld aankweekmedium	21
3.1.3 Groei van twee stammen in verschillende aankweekmedia	21
3.2 Karakterisatie en sequentie-analyse van ribotype 078-stammen	22
3.3 ELISA	24
3.3.1 Indirecte ELISA	24
3.3.2 Detectiegrens indirecte ELISA	25
3.3.3 Sandwich ELISA	26
4. Resultaten	28
4.1 Looxster® en aankweekmedium	28
4.1.1 Real-time toxB-PCR met feces behandeld met looxster® of aankweekmedium	28
4.1.2 Groei van <i>C. difficile</i> stam 630 in aankweekmedium	32
4.1.3 Groei van twee stammen in verschillende aankweekmedia	34
4.2 Karakterisatie en sequentie-analyse ribotype 078-stammen	36
4.2.1 Karakterisatie ribotype 078-stammen	36
4.2.2 Sequentie-analyse ribotype 078-stammen	38
4.2.3. Gevoeligheidsbepaling	38
4.2.4 Overzicht van de karakterisatie en sequentie-analyse	39
4.3 ELISA	40
4.3.1 Indirecte toxA ELISA	40
4.3.2 Detectiegrens indirecte toxA ELISA	42
4.3.3 Indirecte toxB ELISA	43
4.3.4 Sandwich ELISA	43
4.3.5 Indirecte toxB ELISA met andere antilichamen	44
5. Discussie en conclusie	46
5.1 Looxster® en aankweekmedium	46
5.2 Karakterisatie en sequentie-analyse ribotype 078-stammen	49
5.3 ELISA	51
6. Bronnenlijst	54
6.1 Literatuur	54
6.2 Internetsites	56
Bijlage 1: Pathogenese van <i>Clostridium difficile</i> associated diarrhea	II
Bijlage 2: Herkomst van de monsters	III
Bijlage 3: Protocol DNA-precipitatie met natriumacetaat	IV
Bijlage 4: Protocol DNA-precipitatie met isopropanol	V

1. Inleiding

Clostridium species (sp.) komen verspreid voor in grond, stof en water. Deze bacteriesoort kan behoren tot de normale darmflora van mens en dier.

De meeste *Clostridium sp.* groeien alleen onder anaërobe omstandigheden. Het zijn Gram-positieve staven, die (sub)terminale sporen kunnen vormen. Morfologisch is het geslacht *Clostridia* zeer polymorf: korte, dikke staven tot lange filamenteuze vormen, recht of gebogen.

In een Grampreparaat kleuren de sporen niet aan. De vorm (rond of ovaal) en de plaats (subterminaal of terminaal) van de sporen in een staaf zijn afhankelijk van het species.

C. perfringens kan leven bij mens en dier in de dikke darm zonder daar een infectie te veroorzaken. Onder bepaalde omstandigheden produceert deze bacteriesoort een neurotoxine dat bij de mens gasgangreen kan veroorzaken (weefselverval met gasontwikkeling onder andere na infectie als gevolg van een operatie in het dikkedarmgebied of wonden met straatvuil). Ook kan deze bacterie voedselvergiftiging veroorzaken.

C. tetani veroorzaakt tetanus, dat veroorzaakt wordt door een exotoxine dat de zenuwen van het centrale zenuwstelsel aantast zodat spastische verlammingen ontstaan. Onder de microscoop is deze bacteriesoort vaak te zien als trommelstokvormige staven.

C. botulinum leeft in de grond en veroorzaakt botulisme. Deze zeldzame ziekte wordt gekenmerkt door ernstige verlammingverschijnselen veroorzaakt door het exotoxine.

C. difficile kan bij de mens diarree veroorzaken, die kan leiden tot bijvoorbeeld pseudomembraneuze colitis, een dikkedarmontsteking met vorming van membranen. Bij negen procent van de mens behoort *C. difficile* tot de normale darmflora (dragerschap).

1.1 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile is voor het eerst beschreven in 1936, maar zijn associatie met pseudomembraneuze colitis werd pas bekend in 1978. Nu wordt de bacterie herkend als een belangrijke nosocomiale ziekteverwekker.^{1,2}

Clostridium difficile is een bekende ziekenhuisbacterie, die milde diarree tot levensbedreigende pseudomembraneuze colitis kan veroorzaken. Deze ziektebeelden worden samengevat als *C. difficile* infecties (CDI). CDI is direct geassocieerd met het gebruik van antibiotica, voornamelijk fluoroquinolonen. Veranderingen in de intestinale flora door het gebruik van antibiotica maken het mogelijk dat overgroei met *C. difficile* ontstaat.¹

De bacterie kan zich oa. verspreiden door de vorming van sporen. De sporen zijn zeer resistent tegen o.a. droogte, vriezen, warmte, maagzuur, alcohol, chloor en gewone schoonmaakmiddelen. De sporen kunnen maandenlang in de omgeving blijven overleven en transmissie kan plaatsvinden van patiënt naar patiënt via handen, kleding of (instrumenten van) ziekenhuispersoneel of via de omgeving (bijv. kamer of toilet).¹

Clostridium difficile kan drie toxinen produceren: toxine A (TcdA), een enterotoxine, toxine B (TcdB), een cytotoxine en een binair toxine (Cdt). Diagnose is hoofdzakelijk gebaseerd op het aantonen van toxinen A en B.¹

2. Theorie

2.1 Pathogenese van *Clostridium difficile* infecties

In gezonde mensen leven meer dan vijfhonderd soorten bacteriën in de dikke darm. Eén gram feces kan 10^{12} bacteriën bevatten. Deze bacteriën voorkomen kolonisatie van *C. difficile*.

Na een besmetting met *C. difficile* wordt het merendeel van de patiënten asymptomatisch drager. Deze patiënten hebben een hoge antilichaamrespons tegen toxine A. Hun feces en/of de sporen van *C. difficile* in de omgeving kunnen als reservoir dienen voor nosocomiale spreiding van *C. difficile*.^{3,A}

Slechts een klein deel van de patiënten krijgt CDI. *Clostridium difficile* infecteert de gastheer d.m.v. sporen en levende bacteriën via de fecaal-orale weg. De meeste levende bacteriën gaan echter dood in de maag, maar de sporen kunnen de zure omgeving van de maag overleven. In de dunne darm ontkiemen de sporen onder invloed van galzouten. De flagellen van *C. difficile* zorgen ervoor dat de bacterie zich kan voortbewegen. Daarnaast bezit *C. difficile* een polysaccharidekapsel dat fagocytose belemmert.^{4,5}

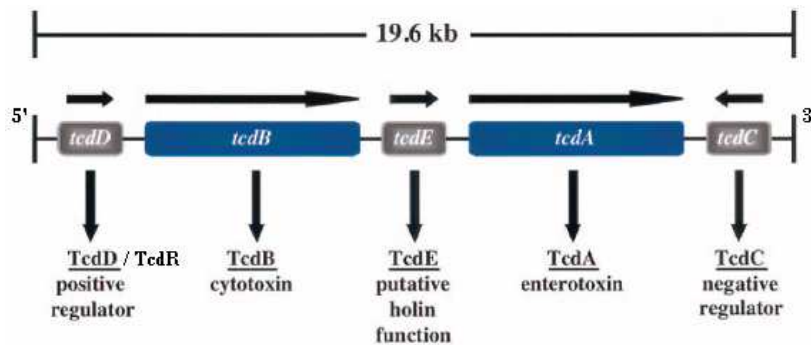
Eenmaal in de dikke darm begint *C. difficile* zich te vermenigvuldigen. De mucosa van de darm maakt de hechting van de bacterie aan de epitheelcellen van de dikke darm mogelijk.^{6,A} Onder stressfactoren produceert *C. difficile* twee toxinen, A en B. Enterotoxine A veroorzaakt de diarree en uitgebreide weefselbeschadiging van de mucosa van de dikke darm (pseudomembraneuze colitis). Cytotoxine B veroorzaakt de epitheelcelapoptose.^{6,B}

De toxineproductie van *C. difficile* leidt tot o.a. migratie van monocyten en neutrofielen vanuit de bloedbaan naar de epitheelcellen van de dikke darm van de gastheer. De monocyten (macrofagen) en neutrofielen kunnen de bacterie onschadelijk maken. Zie bijlage 1 voor de bijbehorende afbeelding.⁶

2.2 Virulentiefactoren

TcdA en TcdB (toxine A en B) zijn beide glucosyltransferases. De twee toxinegenen (*tcdA* en *tcdB*) worden gecodeerd in een open reading frame, gelokaliseerd op het pathogeniciteitslocus (PaLoc) van 19,6kb in *C. difficile* (zie figuur 2.1). Het *tcdA*-gen is 8.133 nucleotide lang en wordt tot expressie gebracht als een enterotoxine. Het 7.098-nucleotide lange *tcdB*-gen wordt tot expressie gebracht als een cytotoxine.⁷

Beide toxinegenen worden tot expressie gebracht tijdens de late exponentiele fase en stationaire fase van de groei. Transcriptie van beide genen vindt plaats in dezelfde richting.^{7,8}



Figuur 2.1: Schematische weergave van het pathogeniciteitslocus (PaLoc) van *C. difficile*.²

Beide toxinen, enterotoxine A en cytotoxine B, liggen op dit 19,6kb grootte PaLoc. De pijlen boven de genen geven de richting aan van transcriptie. Samen met de *tcdA*- en *tcdB* genen liggen nog drie open reading frames op dit locus: het *tcdR*-gen (vroeger *tcdD*), het *tcdE*-gen en het *tcdC*-gen.

Naast beide toxinegenen bevinden zich nog drie open reading frames op het PaLoc. Het *tcdR*-gen, vroeger *tcdD*, ligt upstream van het *tcdB*-gen en wordt tot expressie gebracht samen met beide toxinegenen. TcdR is een σ -factor en bindt aan het RNA-polymerase, zodat het RNA-polymerase de promotor van *tcdA* en *tcdB* herkent en eraan bindt. Dus TcdR is een positieve regulator voor toxine-expressie.⁹

Het *tcdC*-gen ligt downstream van het *tcdA*-gen en transcriptie van dit gen vindt plaats in de tegenovergestelde richting van de twee toxinegenen, het *tcdR*-gen en het *tcdE*-gen. Het *tcdC*-gen wordt als TcdC-eiwit tot expressie gebracht. In de vroege exponentiele fase van de groeicurve wordt veel TcdC geproduceerd, maar de hoeveelheid TcdC daalt tijdens de exponentiele fase.^{8,10}

De daling van *tcdC* expressie correspondeert met de toename van TcdA, TcdB en TcdR en TcdE.¹¹ TcdC is een membraan-gebonden eiwit. Gedacht wordt dat TcdC een functie heeft als anti σ -factor.^{9,10,11}

Waarschijnlijk destabiliseert TcdC het TcdR-bevattende mRNA-polymerase voordat het een complex kan vormen aan de promotor van *tcdA* of *tcdB*. Dit komt door de interactie van TcdC met TcdR of TcdR-bevattende RNA-polymerase of allebei. Door deze mogelijke interactie functioneert het TcdC-eiwit als een negatieve regulator van de toxineproducties.^{9,10,11}

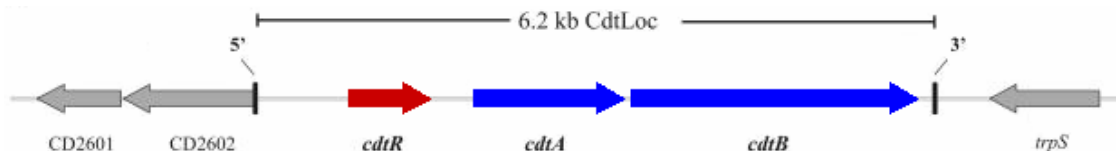
Het *tcdE*-gen dat codeert voor het eiwit TcdE ligt tussen het *tcdB*-gen en het *tcdA*-gen. TcdE lijkt op een porievormend eiwit en helpt waarschijnlijk de toxinen A en B door de celwand van *C. difficile* heen. Dit is echter nog niet bewezen. Dus toxine-expressie hangt af van de daling van TcdC, TcdR-expressie en waarschijnlijk de vrijlating van het toxine uit de cel door TcdE.¹²

Het binaire toxine, een actine-specifiek adenosine difosfaat-ribosyltransferase, is gerelateerd aan het binaire toxine van andere *Clostridium*-soorten, zoals *C. perfringens*. Dit binaire toxine kan alleen geproduceerd worden door virulente *C. difficile*-stammen. Onbekend is nog wat de exacte rol is van het binaire toxine in de pathogenese.¹³

Het binaire toxine bestaat uit twee delen: een enzymatisch component (*cdtA*) en een bindingscomponent (*cdtB*). Deze genen liggen op het cytolethal distending toxine locus (CdtLoc), dat zich bevindt op het chromosoom van *C. difficile* (zie figuur 2.2).¹³

Het functioneel CdtLoc is 6,2kb groot. Alleen pathogene stammen (met het PaLoc) kunnen het CdtLoc bevatten. Er bestaan pathogene stammen die een niet-functioneel CdtLoc bevatten. Dit CdtLoc is dan 4,2kb groot en bevat *cdtAB*-pseudogenen. Stammen die niet pathogeen zijn bevatten in plaats van het CdtLoc een 68bp sequentie.¹³

Het *cdtR*-gen ligt upstream van het *cdtA*-gen en codeert voor het CdtR-eiwit. Dit eiwit kan de productie van het binaire toxine activeren. Onbekend is nog welke signalen CdtR activeert.¹³



Figuur 2.2: Een schematische weergave van een functioneel CdtLoc met de aanliggende genen. *cdtA* en *cdtB* zijn de genen die coderen voor het binaire toxine. Het gen *cdtR* is de positieve regulator van de *cdtA*- en *cdtB*-genen.¹³

Het binaire toxine van *C. difficile* wordt onderzocht en is mogelijk een virulentie factor. De eerste *C. difficile* waarvan is aangetoond dat die het binaire toxine produceerde, was een PCR-ribotype 027-stam. Deze ribotype 027-stam was geïsoleerd uit een patiënt met ernstige pseudomembraneuze colitis.^{14,15}

2.3 Karakterisatie

Het *Clostridium* referentielaboratorium ontvangt veel *Clostridium difficile*-stammen afkomstig van patiënten uit heel Nederland. Dit referentielaboratorium karakteriseert de stammen en bepaald het ribotype. Met deze gegevens en aanvullende informatie kan bepaald worden of er sprake is van een uitbraak of epidemie.

Op het *Clostridium* referentielaboratorium worden *Clostridium difficile*-stammen gekarakteriseerd door het aantonen van bepaalde genen m.b.v. PCR. Eerst wordt onderzocht of de stam het *GluD*-gen bevat, specifiek voor *C. difficile*. De op het lab bekende *GluD*-PCR (in-house ontwikkeld) wordt uitgevoerd met *C. difficile* specifieke primers. *GluD* codeert voor glutamaat dehydrogenase (GDH).¹⁶

Alle pathogene *C. difficile*-stammen bevatten het PaLoc. Sommige pathogene stammen hebben een deletie in het *tcdA*-gen. Door deze deletie komt het *tcdA*-gen tot expressie als een niet functioneel eiwit.^{17,18}

Bij de *toxA*-PCR wordt gebruik gemaakt van twee primersets. De eerste primerset (in-house ontwikkeld) amplificeert een 331bp groot deel van het *tcdA*-gen, ongeacht de aanwezigheid van de bovenstaande deletie. Naast het 331bp amplificaat wordt bij *C. difficile*-stammen, die een deletie bevatten in het *tcdA*-gen ook een extra amplificaat van 714bp geamplificeerd met behulp van de tweede primerset.¹⁸

De tot nu toe bekende pathogene *C. difficile*-stammen bevatten allemaal een functioneel *tcdB*-gen, coderend voor toxine B. Met behulp van de op het lab bekende PCR, ontstaat er een 204bp groot amplificaat dat gemakkelijk is aan te tonen op een 1,5% agarosegel.¹⁷

Pathogene *C. difficile*-stammen kunnen hoog resistent zijn tegen erythromycine en clindamycine. Het *ErmB*-gen kan voor deze resistentie zorgen. Dit gen codeert voor erythromycine ribosomaal methylase B. Met de op het lab bekende *ErmB*-PCR ontstaat een 651bp groot amplificaat.¹⁹

Het *tcdC*-gen codeert voor een negatieve regulator (TcdC) van de expressie van de twee toxinegenen. Sommige stammen hebben echter deleties of mutaties in dit gen.

Met de op het lab bekende *tcdC*-PCR worden drie controles meegenomen: een stam zonder deletie, een stam met een 18bp deletie (Δ) en een stam met een 39bp deletie. De producten die bij deze PCR kunnen ontstaan zijn amplificaten van 159bp groot (geen deletie), van 141bp groot (Δ 18bp) of van 120bp groot (Δ 39bp). Deze deletie-informatie wordt gebruikt voor bevestiging van bepaalde ribotypen, zoals ribotype 027.²⁰

Voor een onderzoek, besproken in deze scriptie, is een deel van het *tcdC*-gen gesequenced van *C. difficile* ribotype 078.

Ribotype 027 heeft in vergelijking met de referentiestam 630 (ribotype 012) een puntdeletie op plaats 117. Door deze deletie ontstaat een frameshift, waardoor verderop in het gen een vroegtijdig stopcodon gevormd wordt. Het gevolg is dat een niet functioneel TcdC-eiwit tot expressie gebracht wordt.

Onderzocht is of ribotype 078-stammen ook een deletie en/of een mutatie hebben in *tcdC*-gen waardoor een niet functioneel TcdC-eiwit tot expressie gebracht wordt.²¹

Niet alle pathogene *C. difficile*-stammen kunnen het binaire toxine produceren. Stammen die wel een functioneel CdtLoc bevatten, vertonen na de *cdtA*-PCR van het laboratorium een amplificaat van 375bp groot op een agarosegel en na de *cdtB*-PCR een amplificaat van 510bp groot.^{22,23}

C. difficile kan verdeeld worden in meer dan 180 PCR-ribotypen. PCR-ribotypering is gebaseerd op verschillen in bandenpatronen op agarosegel, die verkregen zijn met PCR amplificatie van de intergenic spacer regions, die tussen het 23S en 16S rRNA genen in liggen.²⁴

2.4 Epidemieën in Nederland

In mei 2005 was het St. Jansdal Ziekenhuis in Harderwijk het eerste ziekenhuis in Nederland waar een uitbraak van CDI met een nieuwe hypervirulente *C. difficile*-stam (PCR-ribotype 027) plaatsvond. In die tijd was weinig bekend over deze specifieke stam. In Canada en het Verenigd Koninkrijk waren ook uitbraken met deze stam.²⁵

Tijdens deze epidemie was de incidentie van CDI in het ziekenhuis verhoogd van 3,8 patiënten per 10.000 patiënten in 2004, naar 58,4 per 10.000 in april-september 2005. Van april tot september 2005 hadden 45 patiënten de CDI-diagnose. De stammen uit feces van deze patiënten hadden het PCR-ribotype 027. Negen van de 45 patiënten zijn overleden door de complicaties van CDI en hun onderliggende conditie. Slechts voor drie van de 45 patiënten was CDI de hoofdoorzaak van hun dood.²⁵

Het ziekenhuis heeft toen maatregelen genomen om de epidemie onder controle te krijgen. Deze maatregelen waren onder andere: alle patiënten met diarree werden geïsoleerd totdat twee testen negatief waren op *C. difficile*-toxinen, handen werden gewassen met water en zeep, gebruik van chloor, geen fluoroquinolonen-gebruik en beperkt gebruik van cefalosporinen en clindamycine. De uitbraak kwam ten einde in september 2005.²⁵

Tot half augustus 2007 hebben 62 gezondheidszorginstellingen en laboratoria meer dan tweeduizend fecesmonsters gestuurd naar het *Clostridium* referentielaboratorium voor het bepalen van het type *Clostridium difficile*. 22% van deze monsters hadden het PCR-ribotype 027. In Utrecht, Flevoland, Gelderland en vooral in Noord-Holland zijn uitbraken geweest met *C. difficile* ribotype 027. In de rest van het land werd dit ribotype wel gevonden bij patiënten, maar dit waren geïsoleerde gevallen/infecties.^C

De verspreiding van ribotype 027 over Nederland neemt toe. De gevallen in de nieuw aangedane instellingen blijven beperkt, vergeleken met de eerdere gevallen in de ziekenhuizen die al in 2005 ribotype 027 aantroffen. Ribotype 027 blijft echter een lastige ziekteverwekker, die ook na langdurige afwezigheid opnieuw een epidemie kan veroorzaken.^C

Het ribotype 078 wordt veel gevonden in vee. Dit ribotype komt, naast ribotype 027, meer voor bij patiënten in Nederland sinds medio 2006. Het ribotype 078 kan ook bij patiënten CDI veroorzaken. Ribotype 078 is het derde type dat veel gevonden wordt bij patiënten in Nederland. In het buitenland wordt dit ribotype ook steeds vaker gevonden bij de mens.^{26,27} Alleen in Meppel is een uitbraak voorgekomen met ribotype 078. In de rest van het land wordt *C. difficile* ribotype 078 veel gevonden bij patiënten, maar hebben nog geen uitbraak veroorzaakt.^{27,28}

2.5 Afstudeerprojecten

Het afstudeerproject bestond uit drie onderdelen. Deze zijn hieronder weergegeven. De doelen van deze onderdelen zijn dikgedrukt weergegeven.

1. Het optimaliseren van real-time PCR voor de diagnostiek van *Clostridium difficile* infectie met een DNA extractiemethode gebaseerd op looxster® en een specifiek ontwikkeld aankweekmedium.

De door het LUMC ontwikkelde PCR voor de diagnostiek van CDI heeft een lage sensitiviteit van ongeveer 10^4 - 10^5 CFU/gram feces. Verschillende voorbehandelings- en extractiemethoden zijn getest zonder duidelijke verbetering van de sensitiviteit.

Met behulp van looxster® (aspecifieke binder van prokaryotisch DNA) is een verbetering van de sensitiviteit de PCR diagnostiek op respiratoire en bloedmonsters voor de PCR diagnostiek van bacterie-infecties vastgesteld.^D Looxster® zal in dit onderzoek gebruikt worden op fecesmonsters om de sensitiviteit van diagnostiek van CDI te verbeteren.

In het specifiek ontwikkelde aankweekmedium kunnen fecesmonsters worden aangekweekt. Dit aankweekmedium bevat cycloserine en cefoxitine, dat *Enterobacteriaceae* remt. Ook bevat dit aankweekmedium taurocholaat en lysozym dat ervoor zorgt dat sporen kunnen ontkiemen. Deze methode zou ook voor een verbetering van de sensitiviteit van de PCR-diagnostiek bij feces kunnen zorgen.

2. Karakterisatie en sequentie-analyse van het *tcdC*-gen van ribotype 078-stammen volgens de methode die gebruikt wordt in het artikel van Paltansing et al.²⁹

In deze studie zijn 9 *C. difficile*-stammen verzameld uit Nederlandse ziekenhuizen waarbij een deletie in het TcdC is gevonden en die niet behoren tot het bekende ribotype 027 type. 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen zullen gekarakteriseerd worden en een deel van het *tcdC*-gen zal gesequenced worden n.a.v. het artikel van MacCannell DR et al.²⁰ Acht van de 51 stammen zijn varkensstammen, de rest zijn afkomstig van de mens. Het doel van dit experiment is een onderzoek naar de verschillende virulentiefactoren van de *C. difficile* ribotype 078-verdachte stammen van patiënten en varkens. En het verschil in virulentiefactoren tussen ribotype 078-stammen en ribotype 027-stammen.

3. Opzetten van een ELISA voor het detecteren van enterotoxine A (TcdA) en cytotoxine B (TcdB) in vloeibare culturen.

De hypervirulente *C. difficile* ribotype 027 produceert door een mutatie in het *tcdC* meer enterotoxine A en cytotoxine B dan isolaten die geen mutaties hebben. De test die gebruikt is om de hyperexpressie van de toxinen in ribotype 027 aan te tonen, zal operationeel gemaakt worden in het LUMC om stammen met andere deleties/mutaties dan beschreven in het ribotype 027, verder te onderzoeken.³⁰

2.5.1 Looxster® en aankweekmedium

De detectiegrens van de ontwikkelde real-time toxB-PCR bij feces is 10^4 - 10^5 CFU/g feces. Geprobeerd wordt om de gevoeligheid van real-time toxB-PCR gelijk of gevoeliger te maken dan de kweek (10^3 CFU/g).

In het LUMC is een real-time toxB-PCR ontwikkeld, omdat pathogene *C. difficile*-stammen bestaan, die geen functioneel *tcdA*-gen hebben, maar wel een functioneel *tcdB*-gen. De feces wordt als eerste voorbehandeld met STAR-buffer (Roche Nederland B.V.). De STAR-buffer verwijdert remmende factoren, die in feces aanwezig kunnen zijn. Het DNA wordt vervolgens automatisch geïsoleerd met de MagNA Pure LC (Roche Nederland B.V.). Daarna wordt de real-time toxB-PCR uitgevoerd.³¹

Verschillende voorbehandelingsmethoden en DNA isolatiemethoden op feces zijn getest om de real-time toxB PCR gevoeliger te maken. De STAR-buffer behandeling en de DNA-isolatie met de MagNA Pure LC gaven toch de beste resultaten.

Geprobeerd wordt real-time toxB-PCR bij feces te optimaliseren m.b.v. een DNA concentratiemethode gebaseerd op looxster® en met een voorkweek in een specifiek ontwikkeld aankweekmedium.

Looxster® is een technologie gebaseerd op een eiwit, dat motieven in prokaryoot DNA herkent en bindt en uiteindelijk prokaryoot DNA concentreert. Deze methode is getest op respiratoire monsters, bloed, ascitesvocht, weefsel, etc. Deze monsters bevatten veel eukaryoot DNA en weinig prokaryoot DNA.^D

Na een behandeling met looxster® is de uiteindelijke concentratie prokaryoot DNA in het monster hoger. Hierdoor wordt de gevoeligheid van amplificatiemethoden verhoogd, want meer amplificaten kunnen uiteindelijk gevormd worden.^D Looxster® wordt in dit onderzoek gebruikt op fecesmonsters om de sensitiviteit van diagnostiek van CDI te verbeteren.

Het specifiek ontwikkelde aankweekmedium bevat de antibiotica cycloserine (500mg/L) en cefoxitine (8mg/L).³² Deze antibiotica zorgen ervoor dat *Enterobacteriaceae* geremd worden in hun groei. Het aankweekmedium bevat bovendien taurocholaat (0,1%) en lysozym (5mg/L) om eventueel aanwezige sporen van *C. difficile* in fecesmonsters te laten ontkiemen.^{33,34}

Bij dit onderzoek wordt dit specifiek ontwikkelde aankweekmedium (BHI+CCTL) gebruikt om fecesmonsters op te kweken en hiermee de sensitiviteit van diagnostiek van CDI te verbeteren.

2.5.2 ELISA

ELISA staat voor Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay. Het is een immunologische techniek, die gebaseerd is op de interactie tussen antigenen en antilichamen. Met behulp van een ELISA kunnen specifieke antilichamen of antigenen in een monster gedetecteerd worden en de concentraties daarvan kunnen vastgesteld worden met behulp van een standaard.

Het doel van dit onderzoek is een ELISA opzetten voor detectie van enterotoxine A (TcdA) en cytotoxine B (TcdB) in vloeibare culturen. De hypervirulente *C. difficile* ribotype 027-stam produceert door een deletie in het *tcdC*-gen meer toxine A en toxine B dan pathogene stammen, die geen mutaties hebben.³⁵

Op het laboratorium van het LUMC bestaat echter al een test op de VIDAS om toxinen aan te tonen. Deze test is niet bedoeld voor vloeibare culturen, maar alleen voor feces. De uitslag van de VIDAS geeft ook geen duidelijkheid of het gaat om toxine A of B en de concentratie ervan.

De ELISA-test, die gebruikt is om de soort en hoeveelheid toxinen aan te tonen³⁰, zal operationeel gemaakt worden in het LUMC om stammen met andere deleties dan ribotype 027, verder te onderzoeken.

Indien de ELISA werkt, worden *C. difficile*-stammen opgekweekt in een vloeibare cultuur. Op verschillende tijdstippen tijdens de groeicurve worden monsters afgenomen. Deze monsters worden getest in de ELISA op expressie van toxinen. Tevens worden van dezelfde monsters het mRNA geïsoleerd en geanalyseerd m.b.v. reverse transcriptase PCR gevolgd door een real-time PCR op de toxine- en regulatiegenen. De resultaten van de PCR worden vergeleken met de resultaten van de ELISA om een verband tussen expressieniveaus van mRNA en toxineproductie aan te kunnen tonen.

3. Materiaal en methoden

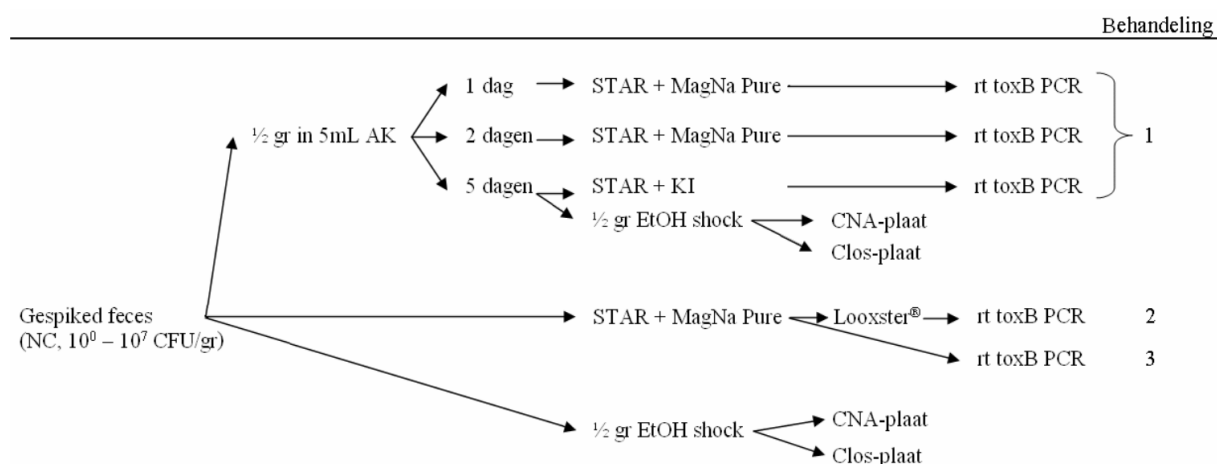
3.1 Looxster® en aankweekmedium

3.1.1 Real-time toxB-PCR met feces behandeld met looxster® en aankweekmedium

De in glycerinebouillon bewaarde *C. difficile* stam 630 is anaëroob gekweekt op bloedplaten (Trypase Soy agar met 5% schapenbloed, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk) bij 37°C. Na twee dagen incubatie is een *C. difficile*-suspensie gemaakt in PBS. De concentratie van de stockoplossing is berekend met behulp van de OD600-waarden ($OD600 = 1,0 = 4 \times 10^7$ CFU/ml, Concentratie = $4 \times 10^7 \times OD600 \times \text{verdunding}$).

Vanuit deze stockoplossing is een verdunningsreeks gemaakt: 4×10^0 , 4×10^1 , 4×10^2 t/m 4×10^7 CFU/ml. Als controle op de verdunningsreeks is 100 µL van de concentraties 4×10^2 en 4×10^3 CFU/mL op bloedplaten gekweekt.

Vier gram negatief feces (geen *C. difficile*-toxinen aangetoond) is gespiked met elke verdunning, zodat de eindconcentratie *C. difficile* 10^0 t/m 10^7 CFU/g feces werd. Ook is in dit experiment feces meegenomen dat niet gespiked is met *C. difficile*, de negatieve controle.



Figuur 3.1.1: Schematische weergave van de voorbehandelingen en controles op de gespiked fecesmonsters. Een half gram gespiked feces is in het specifieke aankweekmedium gevoegd en anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Na één, twee en vijf dagen is 500 µL besmet aankweekmedium met STAR-buffer behandeld en het DNA is met de MagNa Pure LC of kolomisolatie (KI) geïsoleerd. Ook is op 500 µL besmet aankweekmedium na vijf dagen incubatie een ethanolshock uitgevoerd en van daaruit is 100 µL op Clos- en CNA-platen geënt.

De gespiked feces is ook direct behandeld met STAR-buffer. Het DNA is geïsoleerd met de MagNa Pure LC. Een deel van dit DNA is geprecipiteerd en geconcentreerd met behulp van Looxster®.

Op alle DNA-monsters is een real-time toxB-PCR uitgevoerd. Als controle op de verdunningen van de gespiked feces zijn deze direct na een ethanolshock op Clos- en CNA-platen geënt en beoordeeld na één dag incubatie.

Met drie verschillende methoden zijn de fecesmonsters behandeld, voordat een real-time toxB-PCR werd uitgevoerd (figuur 3.1.1). Bij elk van de drie behandelingen is de identieke gespiked feces gebruikt. Als extra controle is de gespiked feces in elke verdunning ook op bloedplaten geënt (100 µL) na een ethanolshock. Dit was de controle op de concentraties van de gespiked feces.

Op een halve gram van de gespiked feces is een ethanolshock uitgevoerd. Hiervan is 100µL op Clos- en CNA-platen geënt en deze zijn beoordeeld na één dag incubatie. Tevens is na vijf dagen incubatie op een halve milliliter aankweekmedium met gespiked feces een ethanolshock uitgevoerd en op Clos- en CNA-platen geënt. Deze ethanolshock is gebruikt om na te gaan of na incubatie van het feces aankweek heeft plaats gevonden van *C. difficile*. Door gebruik te maken van een ethanolshock zijn de *Enterobacteriaceae* gedood.

Van de verdachte kolonies is een Grampreparaat gemaakt. Alle handelingen met de negatieve controles zijn los van alle andere monsters uitgevoerd. Dit is gedaan om contaminatie te voorkomen.

Behandeling 1: De gespiked feces (0,5g) is toegevoegd aan 5mL specifiek aankweekmedium (Media Products B.B. Groningen, Nederland). Het medium met feces is anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Na één, twee en vijf dagen incubatie is 500µL aankweekmedium voorbehandeld met STAR-buffer (Roche Nederland B.V.). Vervolgens is het DNA automatisch geïsoleerd met de MagNA Pure LC (Roche Nederland B.V.).

Omdat gedacht werd dat de monsters na vijf dagen incubatie veel *C. difficile*-DNA zou bevatten, was het DNA van deze monsters geïsoleerd m.b.v. kolomisolatie, KI, (QIAamp DNA mini bloodkit, Qiagen, Nederland) om contaminatie in de MagNA Pure LC te voorkomen.

Behandeling 2: De gespiked feces is met STAR-buffer voorbehandeld en vervolgens is het DNA geïsoleerd met de MagNA Pure LC. Daarna is het DNA geprecipiteerd (zie bijlage 3) en geconcentreerd met behulp van Looxster® (SIRS lab, Duitsland).

Behandeling 3: De gespiked feces (0,5g) is direct met STAR-buffer voorbehandeld. STAR-buffer zorgt voor binding van remmende factoren, inactivatie van nucleasen en stabilisatie van DNA. Daarna is het DNA geïsoleerd met de MagNA Pure LC. Dit is de standaard voorbehandeling en DNA-isolatie voordat de real-time toxB-PCR wordt uitgevoerd.³¹

Van 45 monsters van de drie verschillende voorbehandelingsmethoden is de aanwezigheid van het *tcdB*-gen getest met de real-time toxB-PCR. Hierbij is als positieve controle *C. difficile* stam 630 meegenomen en als negatieve controle PBS. PBS is als negatieve controle gebruikt, omdat voor het spiken de concentraties *C. difficile* stam 630 in PBS is gemaakt.

Als interne controle van de real-time toxB-PCR is in elk monster PhHV (1:1000) toegevoegd. Dit is meegenomen als controle op de DNA-isolatie en als controle op het plaatsvinden van eventuele remming van de monsters. De resultaten van de real-time toxB-PCR zijn vervolgens met elkaar vergeleken en zouden eventuele verdere onderzoeken gedaan kunnen worden.

De primers die bij de real-time toxB-PCR zijn gebruikt, waren forward primer (5pmol): 5' GAAAGTCCAAGTTTACGCTCAAT 3', de reverse primer (10pmol): 5' GCTGCACCTAACTTACACCA 3' (Eurogentec, België) en probe (0,2µM): 5' FAM-ACAGATGCAGCCAAAGTTGTTGAATT-TAMRA 3' (Biomer, Duitsland). De real-time toxB PCR is uitgevoerd volgens de methode die beschreven staat in het artikel van Van den Berg et al.³¹

3.1.2 Groei van *C. difficile* stam 630 in het specifiek ontwikkeld aankweekmedium

Ook is onderzocht of *C. difficile* stam 630 zonder feces kan groeien in het medium. Bovendien is het verschil in groei onderzocht in medium dat uit de koelkast kwam en medium dat van tevoren anaëroob is geïncubeerd.

Op dezelfde manier als de methode met feces (zie hoofdstuk 3.1.1 blz.19-20) is een verdunningsreeks gemaakt. De verdunningsreeks is echter niet gemaakt in PBS, maar direct in het specifieke aankweekmedium (1mL) en is anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Gekeken werd naar de helderheid van het aankweekmedium.

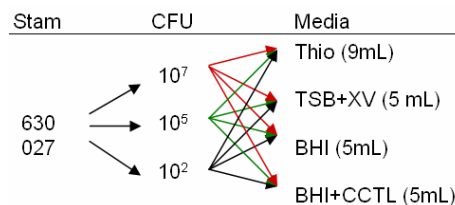
Tevens zijn controles meegenomen op de verdunningsreeks (100µL 10^3 CFU/mL en 10µL 10^4 CFU/mL zijn geënt op bloedplaten) en is ook aankweekmedium meegenomen dat niet is geïnoculeerd met *C. difficile*.

Van de troebele monsters (na één, twee en vijf dagen incubatie) is een Grampreparaat gemaakt en 10µL op een bloedplaat geënt. Dit experiment is een aantal maal uitgevoerd.

3.1.3 Groei van twee stammen in verschillende aankweekmedia

Bij dit experiment is gebruik gemaakt van vier verschillende aankweekmedia en twee verschillende stammen. De volgende aankweekmedia zijn anaëroob gepreïncubeerd: TSB+XV (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk), BHI (Abbott B.V. Wiesbaden, Duitsland) en het specifieke aankweekmedium (BHI+CCTL) (5mL). Thio hoeft niet anaëroob gepreïncubeerd te worden, omdat thio van onder naar boven een gradueel oplopend zuurstofgehalte heeft. Het doel van dit experiment was om te ontdekken in welk aankweekmedium *C. difficile* het beste wilde groeien.

Bij dit experiment is gebruik gemaakt van drie concentraties (10^8 , 10^6 en 10^3 CFU/mL) en twee verschillende stammen (*C. difficile* stam 630 en ribotype 027). De concentraties 10^3 (100µL en 200µL) en 10^4 CFU/mL (10µL en 20µL) zijn geënt op bloedplaten als controle op de juistheid van de verdunningsreeks. Ook is een negatieve controle meegenomen waarbij elke soort aankweekmedium niet werd geïnoculeerd.



Figuur 3.1.2: Schematische weergave van de uitvoering van het onderzoek op het verschil in groei van *C. difficile* in verschillende media. Van beide stammen zijn drie verschillende aantallen CFU's geïnoculeerd in de verschillende media. Na één en twee dagen is de OD600 gemeten. Van media geïnoculeerd met 10^2 CFU is 100µL op bloedplaat geënt.

In figuur 3.1.2 is de schematische weergave te zien van dit onderzoek. Van beide stammen is 10^7 , 10^5 en 10^2 CFU (100µL uit 10^8 , 10^6 en 10^3 CFU/mL) geïnoculeerd in de vier verschillende media. De concentratie in thio (9mL) was dus lager dan in de andere drie aankweekmedia (5mL). Na één en twee dagen incubatie in de schudstoof is de OD600 gemeten van elk aankweekmedium. De negatieve controle (op de groei) is hierbij als blanco meegenomen. Bovendien is na twee dagen incubatie 100µL aankweekmedium, waarin 10^2 CFU is toegevoegd, geënt op bloedplaat.

Dit experiment is meerdere malen uitgevoerd. Van deze resultaten wordt het gemiddelde en de standaarddeviatie berekend. De formule van de standaarddeviatie is:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum (x_i - \bar{x})^2 \right)}$$

n = het aantal resultaten
 $\bar{x}$ = het gemiddelde van de resultaten
 x_i = de variabele resultaten

3.2 Karakterisatie en sequentie-analyse van ribotype 078-stammen

Vanuit glycerinebouillons zijn 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen gekweekt op bloedplaten (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk). Het benodigde DNA van *C. difficile* ribotype 078-stammen is m.b.v. QIAamp DNA mini bloodkit (QIAGEN Benelux B.V., Nederland) geïsoleerd volgens de instructies van de fabrikant.

De stammen die bij dit experiment zijn gebruikt, zijn afkomstig uit Nederland, Duitsland (één stam) en België (één stam). Zie bijlage 2 voor de herkomst van de monsters.

Op vijf *C. difficile* ribotype 078-stammen is een *toxA* +/- PCR uitgevoerd volgens de methode die beschreven staat in het artikel van Kato et al.¹⁷ Bij deze PCR wordt gebruikt gemaakt van twee primersets. Met deze primersets kan worden geanalyseerd of een *toxA*-gen aanwezig is en of deze een deletie bevat.

Ook is van diezelfde ribotype 078-stammen een *toxB*-PCR uitgevoerd volgens de methode die beschreven staat in het artikel van Kato et al.¹⁷

De aanwezigheid van het *ErmB*-gen in alle 51 ribotype 078-stammen is onderzocht m.b.v. de *ErmB*-PCR volgens de methode die beschreven staat in het artikel van Sutcliffe et al.¹⁹

De aanwezigheid van de twee binaire toxinegenen, *cdtA* en *cdtB*, is in negen *C. difficile* ribotype 078-stammen onderzocht m.b.v. de *cdtA*- en *cdtB*-PCR. Deze PCR's zijn uitgevoerd volgens de methode die beschreven staat in het artikel van Stubbs et al.²²

Het totale volume van de amplificatie reactiemix van al deze PCR's was 50µL. Deze reactiemix bestond uit 25µL hotstar mastermix (Qiagen, Benelux B.V. Nederland), 5µL template, de benodigde hoeveelheid primers (zie tabel 3.2.1) en is aangevuld met rnase-vrij water tot een totaal volume van 50µL (Qiagen, Benelux B.V. Nederland). De primersequenties van elke PCR zijn weergegeven in tabel 3.2.1.

Tabel 3.2.1: Overzicht van de primersequenties voor elke PCR. Alle primers zijn afkomstig van het bedrijf Eurogentec, België.

PCR	Primer	Primersequentie
<i>ToxA</i> +/-	forward	5' TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC 3'
	reverse	5' CCACCAGCTGCAGCCATA 3'
	forward	5' TGTGGAATAGGTGCTGAAG 3'
	reverse	5' AGATGGAGATGAGAAAAAGTGA 3'
<i>ToxB</i>	forward	5' GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC 3'
	reverse	5' CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT 3'
<i>ErmB</i>	forward	5' GAAAARGTACTCAACCAATA 3'
	reverse	5' AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC 3'
<i>cdtA</i>	forward	5' TGAACCTGGAAAAGGTGATG 3'
	reverse	5' AGGATTATTTACTGGACCATTTG 3'
<i>cdtB</i>	forward	5' CTTAATGCAAGTAAATACTGAG 3'
	reverse	5' AACGGATCTCTTGCTTCAGTC 3'

Van negen *C. difficile* stammen is een deel van het *tcdC*-gen gesequenced. Hiervoor is eerst een *tcdC*-PCR uitgevoerd met 1 µL forward primer: 5' TTTTCATATGGCTTGTTCTGAAGACCATGA 3' en reverse primer: 5' TTTTCTCGAGTTAATTAATTTCTCTACAGC 3' (1 µL) (Eurogentec, België).

Eén microliter template is toegevoegd aan 5 µL 10× Pfu PCR-buffer met MgSO₄, de primers, 0,5 µL dNTP's, 0,5 µL Pfu-enzym (Fermentas, Duitsland) en 41 µL rnase-vrij water (Qiagen, Benelux B.V. Nederland).²¹

Vervolgens is het volgende PCR-programma uitgevoerd: 5 minuten bij 94°C, 3 cycli van 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 50°C en 1 minuut bij 72°C, gevolgd door 30 cycli van 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 55°C en 1 minuut bij 72°C en als laatste stap: 10 minuten bij 72°C.²¹

De PCR-amplificaten zijn op een 0,8% agarosegel gebracht en geanalyseerd. De PCR-producten van 500bp zijn uit gel gezuiverd m.b.v. een agarosegel-extractie kit (QIAEXII, Qiagen, Benelux B.V. Nederland).

De amplificatie reactiemix is gemaakt volgens het protocol van ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, blz.17 en 18.³⁶ Ook is volgens dit protocol de cycle-sequence-PCR uitgevoerd op de PCR-producten die uit gel gezuiverd zijn. De primer, die bij deze PCR gebruikt is, heeft de volgende sequentie: 5' CATATCCTTTCTTCTCTTC 3'.

De PCR-producten van de cycle-sequence-PCR zijn vervolgens geprecipiteerd met isopropanol (zie bijlage 4)³⁶ en geanalyseerd in een automatische sequencer (ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer (AB applied biosystems, Applera Nederland)). De data hiervan is geanalyseerd met Vector NTI advance 10 program (invitrogen).

De gevoeligheid op erythromycine, clindamycine, ciprofloxacin en moxifloxacin is van alle 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen onderzocht. Deze stammen zijn gekweekt op Columbia-bloedplaten (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk) met daarop twee E-testen: clindamycine en erythromycine of moxifloxacin en ciprofloxacin (AB Biodisk, Zweden). Na twee dagen zijn deze afgelezen.³⁷

De E-test bestaat uit een niet-poreuze plastic strip met een vooropgestelde schaal van concentraties antibiotica. De test wordt gebruikt om de Minimum Inhibition Concentration (MIC) van antibiotica te bepalen. De E-test-strip wordt op de beënte platen gelegd, waarna het antibioticum in de plaat diffundeert en na incubatie een ellips gevormd wordt. De MIC-waarde ligt ter hoogte van het snijpunt van de ellips met de strip.

3.3 ELISA

3.3.1 Indirecte ELISA

Vanuit een glycerinebouillon is *C. difficile* stam 630 gekweekt op een bloedplaat (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk). Op dezelfde dag zijn vier buizen met 12,5mL BHI (Abbott B.V. Wiesbaden, Duitsland) anaëroob geïncubeerd.

Een dag later zijn de *C. difficile* kolonies geïncubeerd in 1mL PBS. Hiervan is 200µL in elke buis met geïncubeerd BHI gepipetteerd. Met de dop van de buizen open zijn ze één uur anaëroob geïncubeerd bij 37°C, zodat het medium echt weer anaëroob werd. Daarna zijn de doppen dichtgedraaid en de buizen zijn vervolgens in een schudstoof gezet bij 37°C voor drie dagen. Het doel hiervan was om de bacteriën zoveel mogelijk toxinen te laten produceren om deze vervolgens te kunnen detecteren met de ontwikkelde ELISA.

Het medium is na drie dagen incubatie gecentrifugeerd (3220 rpm, 5 minuten). De bacteriën zaten in de pellet, maar de toxinen in het supernatant. Het supernatant is bewaard bij 4°C en als eerst getest in de VIDAS® 30 met de VIDAS® *C. difficile* toxine A&B (CDAB-) kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk) om te controleren of toxinen wel aanwezig waren. Van de pellets zijn Grampreparaten gemaakt.

Voor dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van een indirecte ELISA. Zie figuur 3.3.1 voor het principe van een indirecte ELISA. De supernatanten met de toxinen (antigenen) zijn gecoat op de welletjes van een ELISA-plaat (475094 ELISA 96-wellsplaat, NUNC, part of Thermo Fisher Scientific) m.b.v. coatingbuffer (50µL per well in een één op één verdunning) (100mM Na₂CO₃, 100mM NaHCO₃, pH 9,6 opgelost in H₂O, Merck, Duitsland). De plaat met coatingbuffer is overnacht geïncubeerd bij 4°C, waardoor de welletjes de toxinen adsorbeerden. De plaat is na incubatie gewassen met PBS (300µL per well) en vervolgens is blockingbuffer (300µL per well) (1% (w/v) Elk in PBS, Campina, Nederland) toegevoegd aan de welletjes.

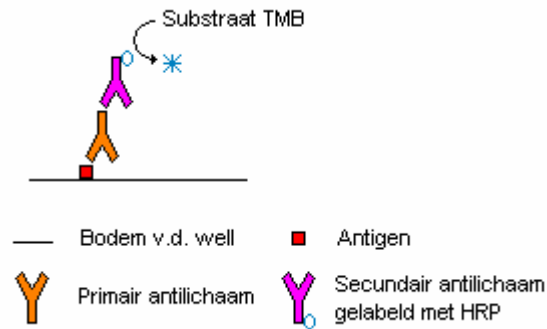
Na het wegwassen van de blockingbuffer met PBS zijn de primaire antilichamen (konijn α-toxine A of B, bron onbekend), verdund in blockingbuffer (50µL in totaal per well), toegevoegd aan de welletjes en voor één uur geïncubeerd bij kamertemperatuur. Vervolgens zijn de ongebonden primaire antilichamen verwijderd door te drie keer te wassen met 0,05% (v/v) Tween20 (300µL per well) (Merck, Duitsland) in PBS. De welletjes zijn nog eens gewassen met PBS om de Tween20 te verwijderen.

Hierna zijn secundaire antilichamen (Zwijn α-konijn immunoglobulines gelabeld met HRP, DakoCytomation, Dako Nederland B.V., België), verdund in blockingbuffer (50µL in totaal), toegevoegd. Na één uur incubatie bij kamertemperatuur zijn de welletjes drie keer gewassen met 0,05% (v/v) Tween20 in PBS en één keer met PBS.

Vers gemaakt substraat (TMB: 3,3',5'-Tetramethylbenzidine, Merck, Duitsland) is toegevoegd (50µL per well) en de ELISA-plaat stond vervolgens voor maximaal vijftien minuten in het donker. Het substraat wordt omgezet door het label (HRP) van de secundaire antilichamen en hierdoor ontstond een chemische kleurreactie. Deze reactie is gestopt door 2M H₂SO₄ (50µL per well) (Merck, Duitsland) toe te voegen aan de welletjes.

De intensiteit van de kleurreactie is gemeten met een ELISA-reader (E = 450nm) (SLT Spectra III reader, SLT Labinstruments, Oostenrijk).

Als positieve controle en standaardreeks op de toxA ELISA is een standaard toxine A (Mucovax B.V. Leiden, Nederland) (1mg/mL) meegenomen in de volgende verdunningen: 1:50, 1:500, 1:5000 en 1:50.000. Als positieve controle op de toxB ELISA is toxine B (bron en concentratie onbekend) meegenomen in dezelfde verdunningen als het standaard toxine A. Met deze standaardreeks kunnen de concentraties in de monsters bepaald worden. Als negatieve controle is i.p.v. toxinen alleen coatingbuffer gecoat op het welletje.



Figuur 3.3.1: Weergave van het principe van een indirecte ELISA. De welletjes worden gecoat met antigenen. Na wasstappen worden primaire antilichamen toegevoegd. Vervolgens worden gelabelde secundaire antilichamen toegevoegd na het wassen van de welletjes. Na wasstappen wordt vers gemaakt substraat (TMB) toegevoegd, dat reageert met het label. Hierdoor ontstaat een chemische kleurreactie. Deze kleurreactie kan worden gemeten met een ELISA-reader. Aan de hand van de intensiteit van de kleurreacties kunnen de concentraties worden berekend.

Zowel de monsters, als de primaire en secundaire antilichamen zijn in verschillende concentraties getest in de ELISA (de monsters 10×, 100×, 1000× en 10.000× verdund en de antilichamen 500×, 1000× en 2000× verdund). Dit is gedaan om de optimale concentratie te bepalen waarbij het beste resultaat verkregen werd.

3.3.2 Detectiegrens indirecte ELISA

Omdat de concentratie (1mg/mL) van toxine A bekend is, kan de detectiegrens hiervan bepaald worden. De volgende concentraties standaard toxine A zijn gebruikt bij dit onderzoek: 20; 10; 5; 2,5; 2; 1; 0,5; 0,25 en 0,2 µg/mL. De primaire antilichamen zijn 1:500, 1:1000 en 1:2000 verdund, het secundaire antilichaam is alleen 1:1000 verdund. Een positieve controle (toxine A 1:200) en vier verschillende negatieve controles zijn ook meegenomen in de ELISA:

NC1: het welletje is alleen gecoat met coatingbuffer (zonder toxine).

NC2: i.p.v. het primaire antilichaam is blockingbuffer gebruikt.

NC3: i.p.v. het secundaire antilichaam is blockingbuffer gebruikt

NC4: geïncubeerd werd met blockingbuffer i.p.v. antilichamen.

Het gemiddelde van de extinctiewaarden van de negatieve controles wordt afgetrokken van de waarden van het standaard toxine A. De laagste concentratie toxine A die na deze correctie een positieve extinctiewaarde geeft, is de detectiegrens. De indirecte toxA ELISA is uitgevoerd, zoals beschreven staat op bladzijde 24.

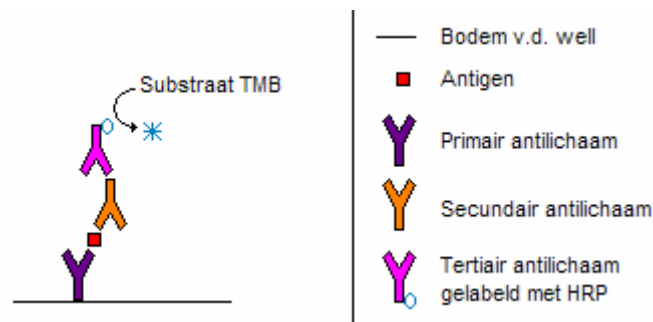
3.3.3 Sandwich ELISA

Naast de indirecte ELISA is een sandwich ELISA ontwikkeld voor de detectie van de toxinen van *C. difficile*. De resultaten van de sandwich ELISA en de indirecte ELISA zijn met elkaar vergeleken.

Bij de sandwich ELISA is gebruik gemaakt van drie verschillende antilichamen. Zie figuur 3.3.2 voor het principe. Hierbij zijn de welletjes gecoat met het primaire antilichaam verdund in coatingbuffer (50µL in totaal per well) en voor een nacht geïncubeerd bij 4°C. Na het wassen met PBS (300µL per well) zijn de toxinen verdund in blockingbuffer (50µL in totaal per well) toegevoegd aan de welletjes. Dit is voor anderhalf uur geïncubeerd bij kamertemperatuur.

Na drie wasstappen met 0,05% (v/v) Tween20 in PBS (300µL per well) en één wasstap met PBS is het secundaire antilichaam verdund in blockingbuffer toegevoegd (50µL in totaal per well). Na anderhalf uur incubatie bij kamertemperatuur zijn de welletjes drie keer gewassen met 0,05% (v/v) Tween20 in PBS en één keer met PBS. Vervolgens is het tertiaire antilichaam verdund in blockingbuffer toegevoegd (50µL in totaal per well). Het tertiaire antilichamen is gelabeld met HRP.

Na dezelfde wasstappen is vers gemaakt substraat (TMB, 50µL per well) toegevoegd, dat moet reageren met HRP. Dit is bij kamertemperatuur in het donker geïncubeerd. Na maximaal vijftien minuten is deze kleurreactie gestopt met 2M H₂SO₄ (50µL per well). De intensiteit van de kleurreactie is gemeten een ELISA-reader (E = 450nm).



Figuur 3.3.2: Weergave van het principe van een sandwich ELISA. De welletjes zijn gecoat met het primaire antilichaam. Na wasstappen zijn de antigenen (toxinen) toegevoegd. Vervolgens zijn de welletjes gewassen en is het secundaire antilichaam toegevoegd. Na wasstappen is het tertiaire antilichaam toegevoegd dat het HRP label bevat.

Na de laatste wasstappen is vers gemaakte substraat (TMB) toegevoegd, dat reageert met het HRP-label. Hierdoor ontstaat een chemische kleurreactie. Deze kleurreactie kan worden gemeten met een ELISA-reader. Aan de hand van de intensiteit van de kleurreacties kunnen de concentraties worden berekend.

Voor deze sandwich ELISA waren andere antilichamen en toxinen beschikbaar dan voor de indirecte ELISA:

- konijn α -toxA IgG (2mg/mL) (Dr. H. Genth, Hannover Medical School, Duitsland),
- konijn α -toxB IgG (2mg/mL) (Dr. H. Genth, Hannover Medical School, Duitsland),
- muis α -toxA IgG (1,11mg/mL) (GeneTex[®], Inc., Bioconnect Huissen Nederland)
- muis α -toxB IgG (3mg/mL) (GeneTex[®], Inc., Bioconnect Huissen Nederland),
- rund α -toxA (concentratie onbekend) (Mucovax B.V. Leiden, Nederland),
- paard α -ToxA&B IgG (concentratie onbekend) (Abcam, Cambridge, Verenigd Koninkrijk),
- toxine A (1mg/mL) (Mucovax B.V. Leiden, Nederland) (verdund naar 70 μ g/mL),
- toxine B (70 μ g/mL) (Mucovax B.V. Leiden, Nederland).

Onderzocht is welk antilichamenpaar het beste resultaat geeft in de sandwich toxA- en toxB ELISA. Geit α -konijn-HRP en Geit α -muis-HRP waren alleen beschikbaar als tertiair antilichaam, dus kan alleen konijn of muis α -toxA of α -toxB worden gebruikt als secundair antilichaam. Als controle is een indirecte ELISA meegenomen met konijn α -toxA als primair antilichaam en geit α -konijn-HRP als secundair antilichaam.

Als eerste is onderzocht welk antilichamenpaar positieve waarden gaf in de toxA- en toxB ELISA. Hierbij is een 1:500 verdunning gebruikt voor elk antilichaam. De toxinen zijn in de sandwich ELISA gebruikt in concentratie 0,14ng/mL.

De antilichamenparen die positieve waarden gaven in dit onderzoek, zijn vervolgens getest in de ELISA met verschillende verdunningen van de toxinen (1:500, 1:1000 en 1:2000). Ook is onderzocht of een α -toxA antilichaam reageerde met toxine B en andersom.

4. Resultaten

4.1 Looxster® en aankweekmedium

4.1.1 Real-time toxB-PCR met feces behandeld met looxster® of aankweekmedium

Met twee verschillende methoden (hoofdstuk 3.1.1 op blz. 19-20) is geprobeerd de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR te verhogen. Voor elke methode zijn dezelfde verdunningen *C. difficile* in feces gebruikt. In tabel 4.1.1 zijn de resultaten weergegeven van de controle op de verdunningen.

Tabel 4.1.1: Resultaten van de controle op de verdunningsreeks.

Concentratie verdunningen (CFU/mL)	Verwacht aantal kol. (100µL)	Werkelijk aantal kol. (100µL)
4×10^3	400	28
4×10^2	40	3

Het verkregen aantal kolonies van de verdunningsreeks lag ongeveer een factor tien lager dan verwacht. In tabel 4.1.2 is dit factorverschil al verrekend bij het verwachte aantal kolonies na een ethanolshock op plaat.

Tabel 4.1.2: Resultaten van het aantal kolonies na een EtOH-shock. Links in tabel zijn de verwachte en werkelijke concentraties van de gespiked feces weergegeven. In het midden van de tabel zijn de resultaten weergegeven van het aantal kolonies gevonden op platen na een ethanolshock op de gespiked feces. Rechts in de tabel zijn de resultaten weergegeven van het aantal kolonies op plaat na ethanolshock op de gespiked feces na vijf dagen incubatie in het aankweekmedium.

Nummer	Verwacht conc. gespiked feces (CFU/g)	Werkelijk conc. gespiked feces (CFU/g)	EtOH-shock na het spiken				EtOH-shock na 5 dagen	
			Verwacht aantal kol.	Werkelijk aantal kolonies			Werkelijk aantal kolonies	
				Clos-plaat	CNA-plaat	Gram	Clos-plaat	CNA-plaat
7	10^7	10^6	5×10^4	>1000	overgroeit			
6	10^6	10^5	5×10^3	>100	overgroeit			
5	10^5	10^4	5×10^2	113	overgroeit			
4	10^4	10^3	5×10^1	56	overgroeit		0	niet verdacht
3	10^3	10^2	5×10^0	0	10 verdacht, id nr 0		0	niet verdacht
2	10^2	10^1	5×10^{-1}	0	4 verdacht, id nr 0		0	niet verdacht
1	10^1	10^0	5×10^{-2}	0	4 verdacht, id nr 0		0	niet verdacht
0	10^0	10^{-1}	5×10^{-3}	0	3 verdacht	GPS + sub. sporen	0	niet verdacht
NC	0	0	0	0	3 verdacht	GPS + sub. sporen	0	niet verdacht

Het aantal kolonies op de Clos-plaat van de ethanolshock direct na het spiken kwam redelijk overeen met de verwachting. Het aantal kolonies op de CNA-plaat kwam echter niet overeen met de verwachting. Op de CNA-platen nummer 4 t/m 7 was er sprake van overgroei van verschillende bacteriën. Bij de overige platen zijn wel verdachte *C. difficile* kolonies gevonden, zelfs bij de negatieve controle.

In de Grampreparaten van deze verdachte kolonies zijn Gram-positieve staven (GPS) met subterminale sporen gevonden. Met een API rapid ID 32 A (Biomérieux, Benelux B.V.) zijn de verdachte kolonies van de negatieve controle geïdentificeerd als *C. beijerinckii*.

Verwacht werd dat het aantal kolonies op de Clos- en CNA-plaat van de ethanolshock na vijf dagen incubatie veel hoger lag dan het verwachte aantal kolonies. Echter was dit niet het geval. Op de Clos-platen zijn helemaal geen kolonies gevonden en op de CNA-platen zijn geen *C. difficile*-verdachte kolonies gevonden.

In tabel 4.1.3 zijn de resultaten weergegeven van de real-time toxB-PCR van de drie verschillende voorbehandelingsmethoden.

Tabel 4.1.3: Resultaten van de real-time toxB-PCR van de drie voorbehandelingsmethoden.

Links in de tabel zijn de verwachte en werkelijke concentraties van de gespiked feces weergegeven. Midden in de tabel zijn de Ct-waarden weergegeven van de real-time toxB PCR op de gespiked feces. Rechts in de tabel zijn de Ct-waarden weergegeven van de interne controle van de real-time toxB PCR.

Nummer	Verwacht conc. gespiked feces (CFU/g)	Werkelijk conc. gespiked feces (CFU/g)	Ct-waarden van de real-time toxB PCR					Ct-waarden van de interne controle (PhHV)				
			STAR+ MgP	STAR+MgP Looxster	Aankweek+STAR+MgP/KI 1e dag	2e dag	5e dag	STAR+ MgP	STAR+MgP Looxster	Aankweek+STAR+MgP/KI 1e dag	2e dag	5e dag
7	10 ⁷	10 ⁶	31,7	33,7	35,9	34,5	N/D	32,0	32,8	30,9	30,7	N/D
6	10 ⁶	10 ⁵	35,7	N/A	40,9	40,7	41,5	31,3	N/A	31,0	31,3	N/A
5	10 ⁵	10 ⁴	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	31,9	N/A	30,7	31,2	N/A
4	10 ⁴	10 ³	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,4	N/A	31,0	31,2	N/A
3	10 ³	10 ²	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,3	N/A	31,6	31,3	N/A
2	10 ²	10 ¹	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,0	N/A	31,1	31,1	N/A
1	10 ¹	10 ⁰	N/A	N/A	N/A	N/A	43,3	31,9	35,9	31,2	31,3	N/A
0	10 ⁰	10 ⁻¹	42,2	N/A	N/A	N/A	N/A	31,8	N/A	30,7	32,0	N/A
NC	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	46,7	31,4	N/A	30,9	31,3	N/A
UK027							23,7					N/A
PBS							39,6					N/A

Rechts in tabel 4.1.3 zijn de Ct-waarden aangegeven van de interne controles. Bij de monsters van de vijfde dag en de positieve en negatieve controles was geen interne controle (PhHV) toegevoegd. De Ct-waarden van de interne controles lagen in de verwachte range (tussen 30,0 en 33,0). De meeste concentraties van de interne controle van de voorbehandeling met looxster[®] waren niet aantoonbaar.

Midden in tabel 4.1.3 zijn de Ct-waarden weergegeven van de real-time toxB-PCR op de monsters met de verschillende voorbehandelingen.

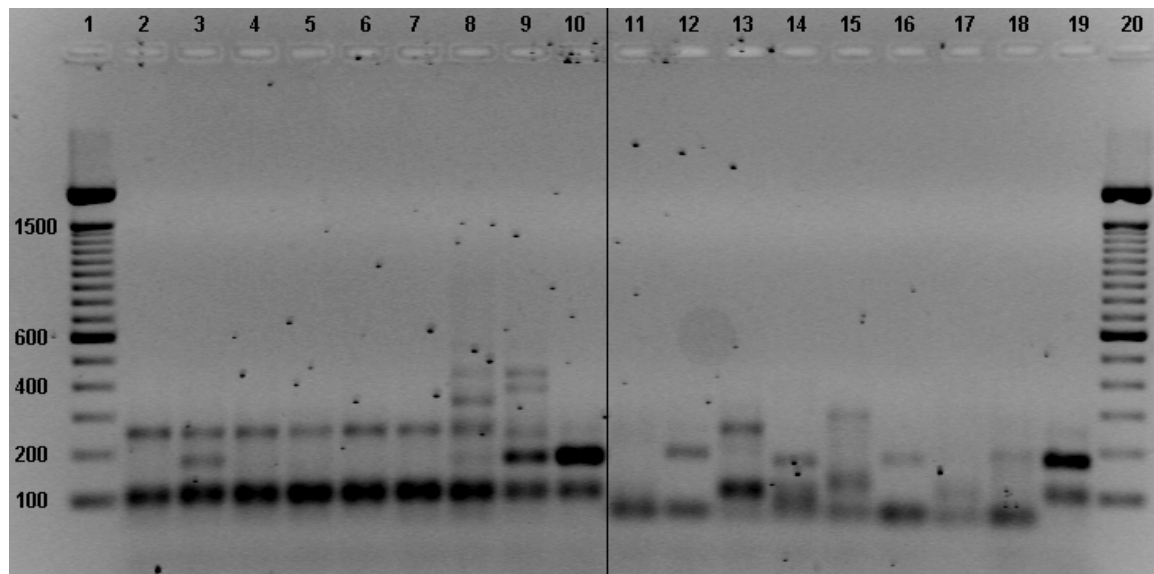
De real-time toxB-PCR die ontwikkeld is op het LUMC bestaat uit een voorbehandeling met STAR-buffer, gevolgd door een automatische DNA-isolatie (MagNA Pure LC). De detectiegrens van deze methode ligt ongeveer bij concentratie van 10⁵ CFU/g feces. Dit is gebaseerd op de laagste werkelijke concentratie gespiked feces, waarbij een Ct-waarde is gevonden. Ook wordt een Ct-waarde van 42,4 gevonden bij concentratie 10⁻¹ CFU/g feces.

De nabehandeling met looxster[®] had een detectiegrens van 10⁶ CFU/g feces. Dit was minder gevoelig dan dezelfde behandeling zonder looxster[®].

Bij de voorkweek gaf de real-time toxB-PCR bij elke dag incubatie vanaf de concentratie 10⁵ CFU/g een Ct-waarde. Deze lagen rond de Ct-waarde van 41. Bij de negatieve controle en bij gecorrigeerde concentratie 10⁰ CFU/g feces zijn na vijf dagen incubatie ook Ct-waarden gevonden (hoger dan 43).

De positieve controle UK027 had een Ct-waarde van 23,7. De negatieve controle (PBS) had een Ct-waarde van 39,6.

Als controle op de Ct-waarden van de real-time toxB-PCR zijn de PCR-producten geanalyseerd m.b.v. gelelektroforese. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 4.1.1, 4.1.2 en 4.1.3.



Figuur 4.1.1: 1% agarosegel na elektroforese met een deel van de PCR-producten van de real-time toxB-PCR. Slot 1 en 20 bevatten een 100bp ladder (7 μ L, Invitrogen, Nederland). Slot 2 t/m 10 bevatten respectievelijk monsters NC, 10^0 t/m 10^7 CFU/g behandeld met STAR-buffer en MagNA Pure LC (20 μ L). Slot 11 t/m 19 bevatten respectievelijk monsters NC, 10^0 t/m 10^7 CFU/g behandeld met STAR-buffer, MagNA Pure LC en Looxster[®] (20 μ L). Naast slot 1 zijn de groottes van de bandjes weergegeven.

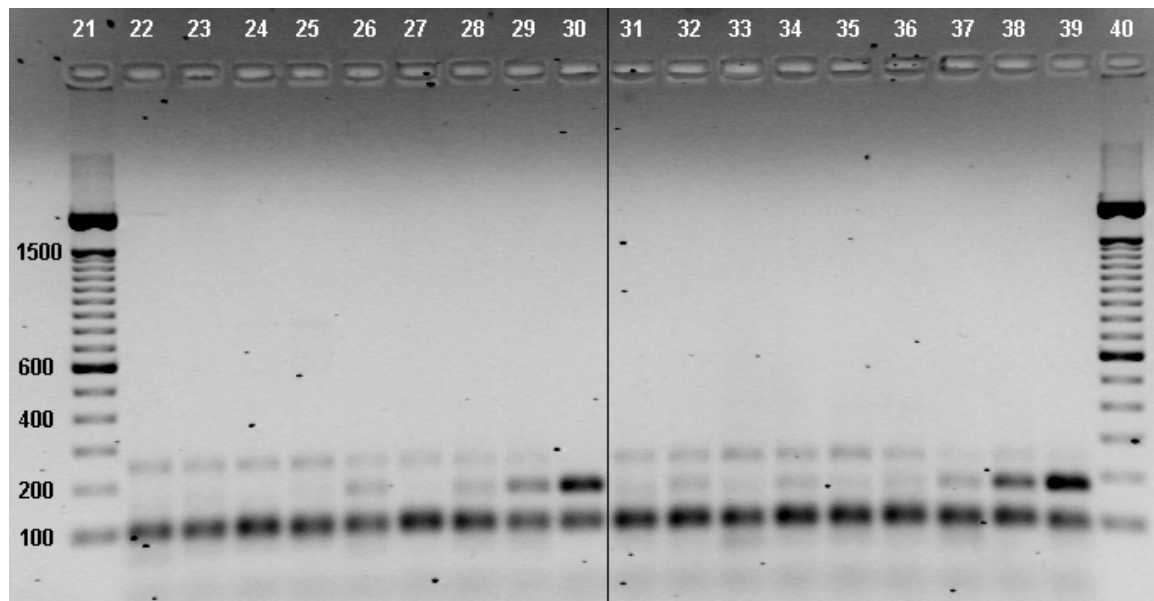
Het PCR-product van de interne controle moest 89bp groot zijn. Dit bandje was bij elk monster zichtbaar op de agarosegel als een dikke band net iets groter dan het 100bp bandje van de 100bp ladder. Waarschijnlijk diffunderen de PCR-producten van de monsters minder snel door de agarosegel dan de ladder, wegens glycerol en zouten van de PCR-mix.

Het PCR-product van de real-time toxB-PCR zou 177bp groot moeten zijn. Dit bandje is alleen bij de monsters 10^0 , 10^6 en 10^7 CFU/g (slot 3, 9 en 10) zichtbaar op de agarosegel. Ook is een heel zwak een bandje van 177bp zichtbaar bij 10^5 CFU/g (slot 8). Echter is geen Ct-waarde van dit monster gevonden in de real-time toxB-PCR.

Verder zijn zwakke bandjes zichtbaar met andere groottes.

In slot 13 en 19 (monsters 10^1 en 10^7 CFU/g) is een bandje zichtbaar van 89bp groot. Dit is het PCR-product van de interne controle en komt overeen met de gevonden Ct-waarde bij deze twee monsters. Een heel zwak bandje van 89bp groot is ook zichtbaar in slot 14 en 17. Van deze monsters zijn echter geen Ct-waarden gevonden in de real-time toxB PCR.

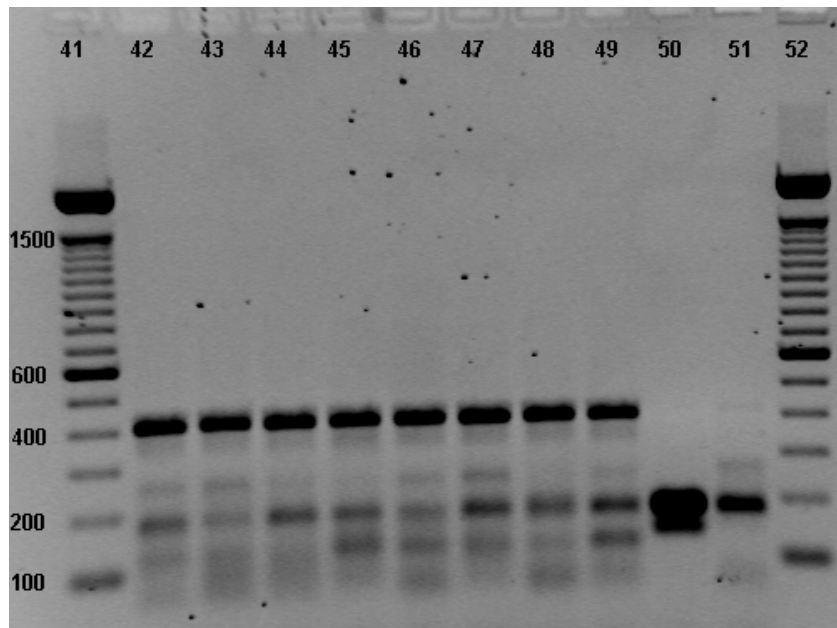
Alleen in slot 19 (monster 10^7 CFU/g) is een duidelijk bandje zichtbaar van 177bp groot. Dit kwam overeen met de gevonden Ct-waarde van de real-time toxB-PCR. Bandjes met andere groottes zijn ook zichtbaar.



Figuur 4.1.2: 1% agarosegel na elektroforese met een deel van de PCR-producten van de real-time toxB-PCR. Slot 21 en 20 bevatten een 100bp ladder (7µL). Slot 22 t/m 30 bevatten respectievelijk de monsters NC, 10^0 t/m 10^7 CFU/g na één dag voorkweek (20µL). Slot 31 t/m 39 bevatten respectievelijk de monsters NC, 10^0 t/m 10^7 CFU/g na twee dagen voorkweek (20µL). Naast slot 21 zijn de groottes van de bandjes weergegeven.

Bij elk monster na één dag voorkweek is een bandje zichtbaar van ongeveer 100bp groot. Dit is het PCR-product van de interne controle. In slot 29 en 30 (monsters 10^6 en 10^7 CFU/g feces na één dag voorkweek) is een bandje zichtbaar van 177bp groot. Dit is het PCR-product van de real-time toxB-PCR en komt overeen met de gevonden Ct-waarde. Echter is in slot 26 en 28 ook een zwak bandje zichtbaar van 177bp groot. Bij deze monsters is geen Ct-waarde gevonden. Verder zijn bandjes zichtbaar met andere groottes. Dit zijn onbekende bijproducten.

Bij elk monster na twee dagen voorkweek is het PCR-product van de interne controle zichtbaar als bandje van 100bp groot. In slot, 32, 34 t/m 39 was een zwak tot duidelijk zichtbaar bandje te zien van 177 bp groot. Dit PCR-product is echter alleen terug te vinden in de Ct-waarden van monsters met de concentratie 10^6 en 10^7 CFU/g feces. Ook bij deze monsters zijn bijproducten gevormd, die zichtbaar zijn op de gel.



Figuur 4.1.3: 1% agarosegel na elektroforese met een deel van de PCR-producten van de real-time toxB-PCR. Slot 41 en 52 bevatten een 100bp ladder (7 μ L). Slot 42 t/m 49 bevatten respectievelijk de monsters NC, 10^0 t/m 10^7 CFU/g na vijf dagen voorkweek (20 μ L). Slot 50 bevatte de positieve controle (UK027) en 51 de negatieve controle (PBS) (20 μ L). Naast slot 41 zijn de groottes van de bandjes weergegeven.

De interne controle is bij de monsters na vijf dagen voorkweek niet toegevoegd. Bij deze monsters is dan ook geen bandje zichtbaar op de agarosegel van ongeveer 89bp groot. In elk slotje is een zwak tot duidelijk zichtbaar bandje zichtbaar van 177bp groot. Dit is het PCR-product van de real-time toxB-PCR. Alleen de Ct-waarden van de monsters met de concentratie NC, 10^1 en 10^6 CFU/g feces komen overeen met het gevonden bandje op gel. Van concentratie 10^7 CFU/g feces (slot 49) is echter geen real-time toxB-PCR uitgevoerd.

In slot 50, de positieve controle, was een dik bandje zichtbaar van 177bp groot. Dit is het PCR-product van real-time toxB-PCR. Ook is in slot 51, de negatieve controle, een duidelijk bandje zichtbaar van 177bp groot. Dit komt overeen met de gevonden Ct-waarde. Verder zijn dikke bandjes zichtbaar van ongeveer 400bp groot en zwakke bandjes van andere groottes.

4.1.2 Groei van *C. difficile* stam 630 in aankweekmedium

Het leek erop dat *C. difficile* niet is aangekweekt in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium met feces. Na vijf dagen voorkweek is in de real-time toxB PCR een Ct-waarde gevonden vanaf een gecorrigeerde concentratie van 10^5 CFU/g feces. Deze lagen rond een Ct-waarde van 41. Echter zijn geen kolonies gevonden op de platen van de monsters die vijf dagen zijn voorgekweekt.

Om deze reden is onderzocht of *C. difficile* stam 630 zonder feces kon groeien in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium. Bovendien is het verschil in groei onderzocht in het medium dat uit 4°C kwam en medium dat van te voren anaëroob was geïncubeerd.

Dit experiment is meerdere malen uitgevoerd. Niet bij elk experiment groeide *C. difficile* stam 630 zonder feces in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium. Op de volgende bladzijde zijn de resultaten weergegeven waarbij de stam wel groeide in het aankweekmedium.

Tabel 4.1.4: Resultaten van de groei van *C. difficile* stam 630 in aankweekmedium uit 4°C en gepreïncubeerd na één dag incubatie. Links in de tabel zijn de resultaten weergegeven van het medium uit 4°C. Rechts in de tabel zijn de resultaten weergegeven van het medium dat anaëroob gepreïncubeerd is.

Koelkast				Pre-incubatie			
Verw. conc. (CFU/mL)	Werkelijke conc. (CFU/mL)	Helder/troebel?	Grampreparaat	Verw. conc. (CFU/mL)	Werkelijke conc. (CFU/mL)	Helder/troebel?	Grampreparaat
4×10 ⁷	4×10 ⁷	troebel	GPS >100, kapot 20-100	4×10 ⁷	4×10 ⁷	troebel	GPS >100, sporen, kapot >100
4×10 ⁶	4×10 ⁶	troebel	GPS 20-100	4×10 ⁶	4×10 ⁶	troebel	GPS >100, kapot 0-5
4×10 ⁵	4×10 ⁵	helder	-	4×10 ⁵	4×10 ⁵	troebel	GPS >100, kapot 0-5
4×10 ⁴	4×10 ⁴	helder	-	4×10 ⁴	4×10 ⁴	helder	Geen bacteriën
4×10 ³	4×10 ³	helder	-	4×10 ³	4×10 ³	troebel	GPS 5-20
4×10 ²	4×10 ²	helder	-	4×10 ²	4×10 ²	helder	-
4×10 ¹	4×10 ¹	helder	-	4×10 ¹	4×10 ¹	helder	-
4×10 ⁰	4×10 ⁰	helder	-	4×10 ⁰	4×10 ⁰	helder	-
NC	NC	helder	Geen bacteriën	NC	NC	helder	Geen bacteriën

Uit de controle op de verdunningsreeks (uitplaten van de verdunningsreeks) bleek dat de concentraties van de verdunningsreeks juist waren. Na één dag incubatie waren de buizen met het aankweekmedium direct uit de koelkast troebel bij 4×10⁶ en 4×10⁷ CFU/mL. Van deze monsters en de negatieve controle zijn Grampreparaten gemaakt. De monsters zijn ook geënt op bloedplaten (Trypcase Soy agar met 5% schapebloed, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk). Gram-positieve staven zijn gevonden in de Grampreparaten, behalve bij de negatieve controle (zie tabel 4.1.4)

Na één dag incubatie zijn de buizen met het anaëroob gepreïncubeerde aankweekmedium troebel bij concentratie 4×10³ CFU/mL en 4×10⁵ t/m 4×10⁷ CFU/mL. Gram-positieve staven zijn gevonden in de Grampreparaten van deze concentraties. In het Grampreparaat van de concentratie 4×10⁴ CFU/mL en de negatieve controle zijn geen bacteriën gevonden. Tien microliter van het troebele aankweekmedium van elke concentratie is geënt op bloedplaten.

De bloedplaten, afgeënt van zowel anaëroob gepreïncubeerd buizen als buizen direct uit 4°C, waren na één dag incubatie vol gegroeid met *C. difficile*-kolonies. Op de bloedplaat van concentratie 4×10⁴ CFU/mL, dat verdund is in anaëroob gepreïncubeerd aankweekmedium, zijn daarentegen slechts vier kolonies gevonden. Op de platen van de negatieve controles groeiden geen bacteriën.

Na twee dagen incubatie waren de buizen met het aankweekmedium direct uit de koelkast troebel bij 4×10² en 4×10⁵ t/m 4×10⁷ CFU/mL. In de Grampreparaten van deze concentraties zijn Gram-positieve staven gevonden.

Na twee dagen incubatie waren alle buizen met het anaëroob gepreïncubeerde aankweekmedium troebel, behalve de negatieve controle. Gram-positieve staven zijn gevonden in de Grampreparaten van deze concentraties.

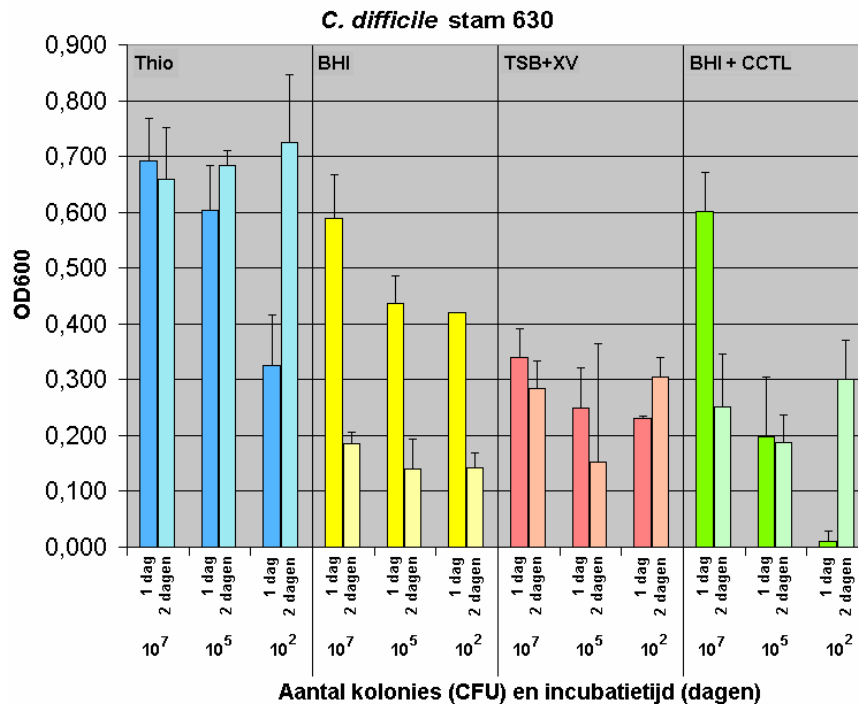
Alle bloedplaten geënt met het twee-dagen-geïncubeerde aankweekmedium, waren na één dag incubatie helemaal vol gegroeid met *C. difficile*-kolonies.

Alle buizen met aankweekmedium waren na vijf dagen incubatie troebel, behalve de negatieve controles. In de Grampreparaten van alle troebele aankweekmedia zijn Gram-positieve staven gevonden.

Bij alle concentraties waren de bloedplaten na één dag incubatie vol gegroeid met *C. difficile*-kolonies. Op de negatieve controleplaten zijn geen bacteriën gevonden.

4.1.3 Groei van twee stammen in verschillende aankweekmedia

C. difficile stam 630 groeide niet altijd in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium zonder feces. Dit experiment was dus niet reproduceerbaar. Om deze reden is de groei van *C. difficile* meerdere malen onderzocht in vier verschillende aankweekmedia.



Grafiek 4.1.1: De gemiddelde OD600-waarden na één en twee dagen incubatie van *C. difficile* stam 630 van elk aankweekmedium bij elk aantal toegevoegde kolonies. De blauw gekleurde kolommen zijn de waarden van het medium thio, de gele van BHI, de roze van TSB+XV en de groene van het specifiek ontwikkelde aankweekmedium(BHI+CCTL). De donker gekleurde zijn de waarden na één dag incubatie en de lichtgekleurde na twee dagen.

In grafiek 4.1.1 staan de gemiddelde OD600-waarden van *C. difficile* stam 630 weergegeven van de verschillende aankweekmedia na één en twee dagen incubatie. De standaarddeviatie is ook in de grafiek weergegeven. De standaarddeviatie van BHI die geïnoculeerd is met 10^2 CFU na één dag incubatie was 0,0.

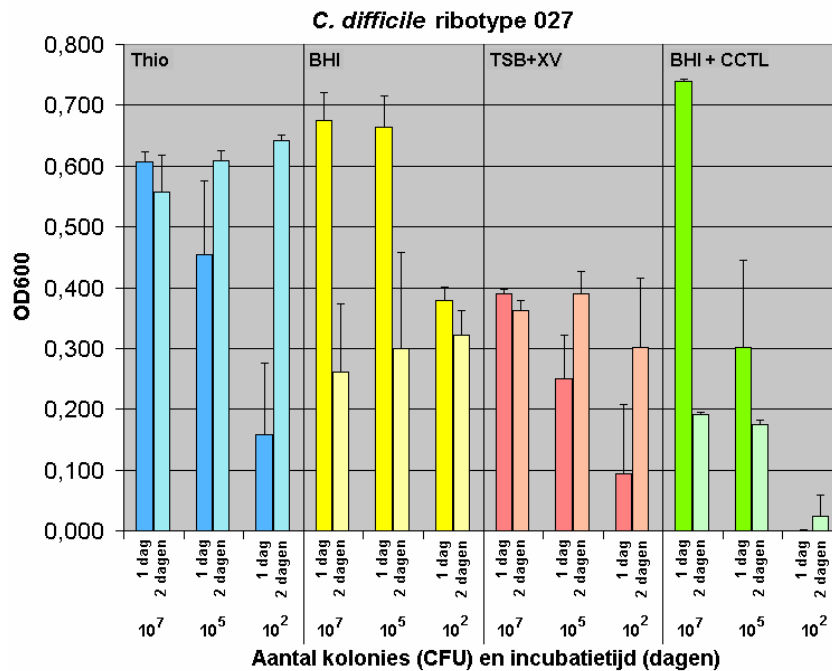
Na één dag incubatie waren de gemiddelde OD600-waarden van elk medium aflopend naarmate het aantal toegevoegde CFU's kleiner werd.

Na twee dagen incubatie waren de OD600-waarden van de thio duidelijk het hoogst vergeleken met de waarden van andere media na twee dagen incubatie.

De OD600-waarde van 10^7 CFU geïncubeerd in BHI+CCTL zakte fors na twee dagen incubatie, terwijl de OD600-waarden van 10^2 CFU na twee dagen incubatie steeg.

De drie OD600-waarden van het aankweekmedium BHI waren het laagst na twee dagen incubatie vergeleken met de OD600-waarden van andere media na twee dagen incubatie. Na één dag waren de OD600-waarden van BHI echter wel hoog. De OD600-waarden van het medium TSB+XV waren nooit hoger 0,400.

Met behulp van de OD600-waarden is het aantal verwachte kolonies berekend voor elk medium geïnoculeerd met stam 630 (concentratie = $4 \times 10^7 \times \text{OD600} \times \text{verdunding}$). Na twee dagen incubatie in de verschillende aankweekmedia zijn op de platen van elk media gemiddeld meer kolonies gevonden dan verwacht. De meeste kolonies zijn gevonden op de platen afgeënt van de thio.



Grafiek 4.1.2: De gemiddelde OD600-waarden na één en twee dagen incubatie van *C. difficile* ribotype 027 van elk aankweekmedium bij elk aantal toegevoegde kolonies. De blauw gekleurde kolommen zijn de waarden van het medium thio, de gele van BHI, de roze van TSB+XV en de groene van het specifiek ontwikkelde aankweekmedium (BHI+CCTL). De donker gekleurde zijn de waarden na één dag incubatie en de lichtgekleurde na twee dagen.

In grafiek 4.1.2 staan de gemiddelde OD600-waarden weergegeven van de aankweekmedia na één en twee dagen incubatie van *C. difficile* ribotype 027. Na één dag incubatie waren de gemiddelde OD600-waarden van elk medium aflopend naarmate het aantal toegevoegde CFU's kleiner werd.

Na twee dagen incubatie waren de OD600-waarden van de thio het hoogst vergeleken met de waarden van andere media na twee dagen incubatie.

Na één dag incubatie waren de OD600-waarden van de BHI hoger dan de waarden van de thio. Maar na twee dagen incubatie waren de OD600-waarden van de BHI fors gezakt. Hetzelfde gold voor 10^7 en 10^5 CFU geïncubeerd in BHI+CCTL.

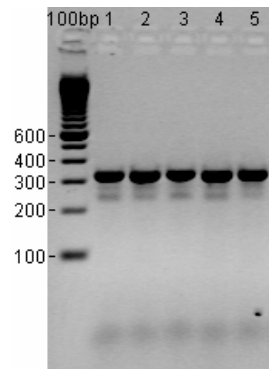
De OD600-waarden van het medium TSB+XV waren nooit hoger 0,450.

Met behulp van de OD600-waarden is het aantal verwachte kolonies berekend voor elk medium geïnoculeerd met ribotype 027. Na twee dagen incubatie in de verschillende aankweekmedia zijn op de platen van elk media gemiddeld meer kolonies gevonden dan verwacht. De meeste kolonies zijn gevonden op de platen afgeënt van de thio.

4.2 Karakterisatie en sequentie-analyse ribotype 078-stammen

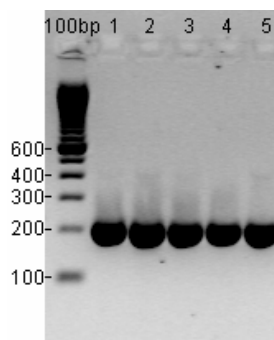
4.2.1 Karakterisatie ribotype 078-stammen

Op monsters 07031661-2, 07013678, JB7, UMCN en UMC12-3 is *toxA* +/- PCR en een *toxB*-PCR uitgevoerd. Ze zijn respectievelijk genummerd als 1 t/m 5. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 4.2.1 en 4.2.2.



Figuur 4.2.1: 1,5% agarosegel na elektroforese met vijf monsters na een *toxA* +/- PCR. Het meest linker slotje bevatte een 100bp ladder (Invitrogen, Nederland). Links van deze ladder zijn de groottes van een aantal bandjes weergegeven. In slotnummer 1 t/m 5 zaten respectievelijk monsters 07031661-2, 07013678, JB7, UMCN en UMC12-3 na een *toxA* +/- PCR.

In figuur 4.2.1 is de 1,5% agarosegel weergegeven na elektroforese met vijf monsters na een *toxA* +/- PCR. Elk monster toonde een bandje aan op de agarosegel van ongeveer 331bp groot. Het PCR-product na een *toxA* +/- PCR moest 331bp groot zijn. De vijf monsters hadden dus het *toxA*-gen. De monsters hadden echter geen deletie in het *toxA*-gen. Als dit wel het geval zou zijn, zou een bandje van 714bp zichtbaar zijn.

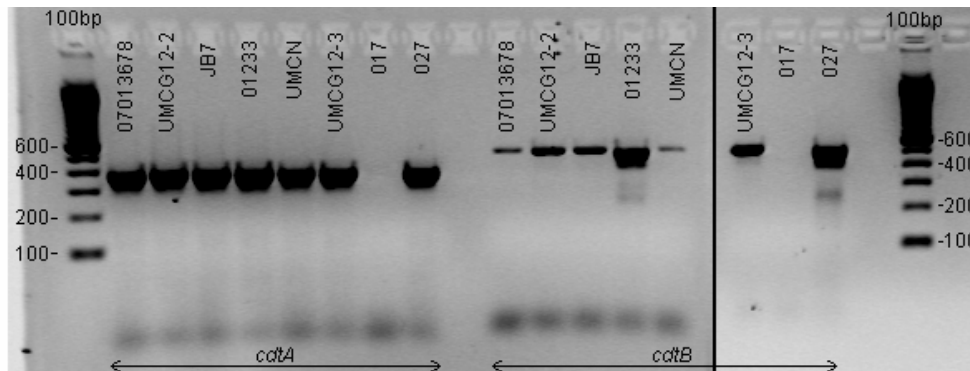


Figuur 4.2.2: 1,5% agarosegel na elektroforese met vijf monsters na *toxB*-PCR. Het meest linker slotje bevatte een 100bp ladder. Links van deze ladder zijn de groottes van een aantal bandjes weergegeven. In slotnummer 1 t/m 5 zitten respectievelijk monsters 07031661-2, 07013678, JB7, UMCN en UMC12-3 na een *toxB*-PCR.

In figuur 4.2.2 is de 1,5% agarosegel weergegeven na elektroforese met vijf monsters na een *toxB*-PCR. Elk monster toonde een bandje aan op de agarosegel van ongeveer 204bp groot. Het PCR-product na een *toxB*-PCR moest 204bp groot zijn. De vijf monsters hadden dus het *toxB*-gen.

Van alle monsters is de aanwezigheid van het *ErmB*-gen onderzocht m.b.v. de *ErmB*-PCR. De amplificaten zijn na de *ErmB*-PCR op een 1,5% agarosegel geanalyseerd. Het PCR-product moest na deze *ErmB*-PCR 651bp groot zijn. In totaal toonden slechts zeven (14%) ribotype 078-stammen een bandje van ongeveer 651bp groot. Vier van deze zeven monsters waren van varkensafkomst. Dus 50% van de varkensstammen bevatte het *ErmB*-gen. Slechts 7% van de humane stammen bevatte het *ErmB*-gen.

De aanwezigheid van de twee binaire toxinegenen, *cdtA* en *cdtB*, zijn in negen *C. difficile* stammen onderzocht m.b.v. de *cdtA*- en *cdtB*-PCR. Een deel van de resultaten van deze twee PCR's zijn weergegeven in figuur 4.2.3.



Figuur 4.2.3: 1,5% agarosegel na elektroforese met zes monsters na de *cdtA*- en *cdtB*-PCR. In het meest linker slotje en in het meest rechter slotje bevond zich de 100bp ladder. Naast deze ladders zijn de groottes weergegeven van een aantal bandjes. Links op de agarosegel zijn de resultaten weergegeven van de *cdtA*-PCR en rechts van de *cdtB*-PCR.

In figuur 4.2.3 is de 1,5% agarosegel weergegeven na elektroforese met zes monsters na de *cdtA*- en *cdtB*-PCR.

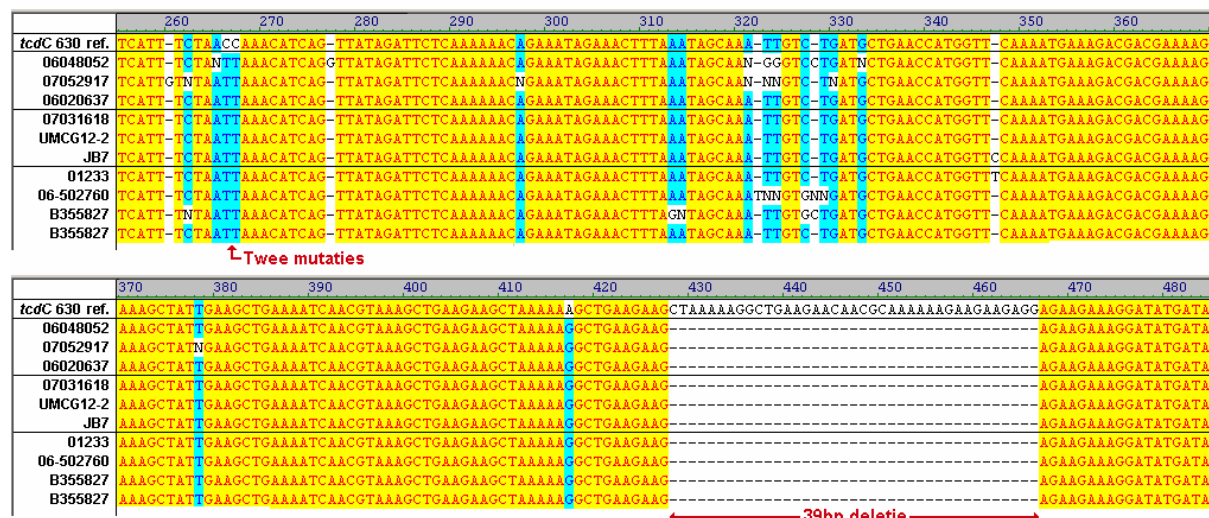
Het PCR-product na een *cdtA*-PCR moest 375bp groot zijn. Elk van de zes monsters vertoonde een bandje van ongeveer 375bp groot op de 1,5% agarosegel na de *cdtA*-PCR. Het PCR-product na een *cdtB*-PCR moest 510bp groot zijn. Elk van de zes monsters vertoonde ook een bandje van ongeveer 510bp groot op de gel, alleen waren deze bandjes niet even sterk.

De negatieve controle stam 017 vertoonde bij beide PCR's geen bandje. De positieve controle ribotype 027 vertoonde wel bandjes bij beide PCR's.

De overige drie stammen zijn na de *cdtA*- en *cdtB*-PCR ook geanalyseerd op een agarosegel. Daaruit bleek dat alledrie de monsters beide binaire toxinebandjes vertoonden.

4.2.2 Sequentie-analyse ribotype 078-stammen

Van negen *C. difficile*-stammen is een deel van het *tcdC*-gen gesequenced. Voor de analyse is het *tcdC*-gen van *C. difficile* stam 630 meegenomen als referentiestam. In figuur 4.2.4 is het resultaat van een deel van de sequentie weergegeven van het *tcdC*-gen.



Figuur 4.2.4: Resultaten van een deel van de *tcdC*-sequentie van negen monsters na *tcdC*-PCR en cycle-sequence-PCR. De nucleïneuren in het geel komen in elk monster overeen. De blauwe nucleïneuren komen bij enkele monsters niet overeen. De witte gedeeltes in de sequentie geven deleties weer van de meeste monsters (enkele monsters hebben op deze plek wel een nucleotide of de nucleotide kon niet bepaald worden (N)) of geven een extra nucleotide in één monster weer.

De resultaten van een deel van de *tcdC*-sequentie van negen monsters na *tcdC*-PCR en cycle-sequence-PCR zijn weergegeven in figuur 4.2.4.

Ten opzichte van de referentiestam (*tcdC* 630 ref.) hebben alle monsters dezelfde twee mutaties, T-T (in het rood bovenaan aangegeven in het figuur). De tweede mutatie zorgt direct voor een introductie van een vroegtijdig stopcodon TAA.

Ook hebben alle monsters een 39bp deletie in het *tcdC*-gen (in het rood onderaan aangegeven in het figuur) ten opzichte van de referentiestam.

4.2.3. Gevoeligheidsbepaling

Van bijna alle stammen is de gevoeligheid bepaald op erythromycine, clindamycine, ciprofloxacin en moxifloxacin m.b.v. E-testen. Van twee stammen zijn echter geen gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd, omdat daarvan geen bacteriën beschikbaar waren.

De resultaten van de gevoeligheidsbepaling zijn weergegeven in tabel 4.2.1. Zes stammen (12%) waren resistent tegen moxifloxacin, 48 stammen (94%) waren resistent tegen ciprofloxacin en 40 stammen (78%) waren resistent tegen erythromycine.

Veertien stammen (27%) waren resistent tegen clindamycine en vijf stammen daarvan hadden het *ErmB*-gen. Drie stammen (6%) waren zeer resistent ($\geq 192\mu\text{g/mL}$) tegen clindamycine. Twee stammen daarvan hadden het *ErmB*-gen.

Slechts twee monsters (06065935 en 07054744, 4%) waren resistent tegen alle vier de antibiotica. Beide monsters waren van humane afkomst en bevatten het *ErmB*-gen niet.

4.2.4 Overzicht van de karakterisatie en sequentie-analyse

De resultaten van de karakterisatie en sequentie-analyse van alle 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen zijn weergegeven in tabel 4.2.1.

Tabel 4.2.1: Een overzicht van de resultaten van de karakterisatie en sequentie-analyse van 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen. Monsternummers met een zwart sterretje zijn varkensstammen. Monsters met een groen resultaat bevatten het ErmB-gen en waren resistent voor erythromycine en clindamycine. Monsters met een oranje resultaat bevatten of het ErmB-gen of waren resistent tegen erythromycine of clindamycine. Resultaten met een rood sterretje hadden twee zones bij de gevoeligheidsbepaling. De meest resistente zone is genoteerd.

		Virulentiefactoren					<i>tcdC</i> mutatie			Gevoeligheid (µg/mL)			
Stam	Ribotype	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>ermB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	183bp	184bp	Δ39	Mox	Cip	Ery	Clinda
µg/mL													
R	>1	>1	>2	>4									
G	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 1	≤ 1									
* Varkensstammen * Dubbele zone ErmB gen en res Ery en Clinda ErmB gen of res Ery en Clinda													
06020637	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	4
06022902	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	24	>256	12
06023414	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	>256
06026976	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	2
06048052	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,38	>32	>256	2
06055460	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	>256	3
06060406	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	6
06065571	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32	>32	>256	1
06065935	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32	>32	>256	>256
06066407	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	12
06069956	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	>256	3
06075407	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	3
06076907	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	1,5
06090460	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	3
06-502760	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	3	>32	1	4
07000812	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	1,5	2
07002164	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32	>32	>256	1,5
07002169	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	>256	0,75
07002171	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	6	>256	1
07004578	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	32	>256	3
07005405	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	0,75	4
07009825	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	4
07010250	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5*	>32*	1	3
07012297	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	1,5
07013678	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	1	3
07031618*	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	192
07031620*	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	2
07031655*	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	4
07031656*	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	12
07031657*	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	3
07031661*	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,38	0,19	1,5	1,5
07031662*	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	0,19	>256	3
07041838	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	>256	3
07044755	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	1	4
07045389	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	>256	6
07052917	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	1
07054744	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32	>32	>256	24
07054751	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	1	4
07055954	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,38	>32	>256	1,5
07064071	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32	>32	>256	3,0
01233	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	0,75	0,5
15084	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	1	>32	1	8
2522385	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39				
31807*	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	2
33	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	6
58	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,5	>32	>256	4
B355827	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39				
JB7	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	>32*	>32*	>256*	2
UMCG 12-2	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,75	>32	>256	8
UMCG 12-3	078	ja	ja	ja	ja	ja	T	T	Δ39	0,5*	12*	>256*	6
UMCN	078	ja	ja	nee	ja	ja	T	T	Δ39	0,125	0,13	0,5	6

4.3 ELISA

4.3.1 Indirecte toxA ELISA

Vier buizen met 12,5mL BHI zijn geïnoculeerd met 200µL *C. difficile* stam 630-suspensie. De buizen zijn voor drie dagen anaëroob geïncubeerd bij 37°C. Na drie dagen waren twee buizen troebel (buis 1 en 4). Vervolgens zijn de vier buizen gecentrifugeerd (3220 rpm, 5 minuten). Het supernatant is bewaard in nieuwe buizen bij 4°C en 1mL daarvan is getest in de VIDAS® 30 met de CDAB-kit. Van de pellets zijn Grampreparaten gemaakt. Het resultaat hiervan is weergegeven in tabel 4.3.1.

Tabel 4.3.1: Resultaten van het supernatant in de VIDAS® en de Grampreparaten. In het midden van de tabel staan de resultaten weergegeven van de Grampreparaten. Het aantal gevonden bacteriën in het Grampreparaat is gebaseerd op het aantal per gezichtsveld met een objectief van 100× met olie. Rechts in de tabel zijn de resultaten weergegeven van de VIDAS®

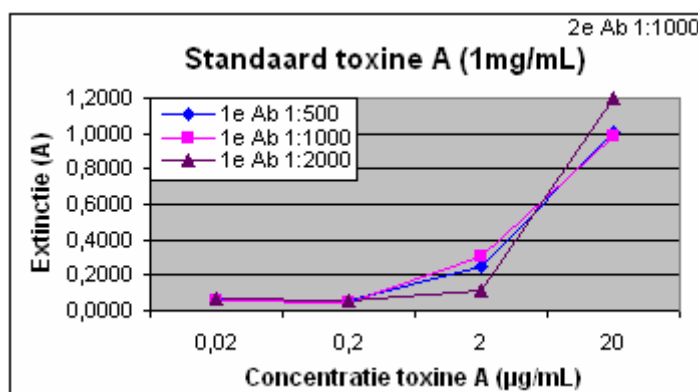
Buis	Grampreparaat	Aantal	Supernatant in de Vidas
1 (troebel)	GPC	>100	Twijfelachtig 0,19
2	Kapot, sporen?	0-5	Positief 0,37
3	Kapot, sporen?	5-20	Twijfelachtig 0,36
4 (troebel)	GPS	0-5	Positief 6,27
	GPS ontleurd en kapot	>100	

In het Grampreparaat van buis 1, die troebel was, zijn meer dan honderd Gram-positieve cocci gevonden (GPC). De VIDAS® gaf een twijfelachtig resultaat op de aanwezigheid van de toxinen.

In het Grampreparaat van buis 2 en 3 zijn weinig Gram-positieve staven gevonden. De testwaarde van de VIDAS® was bij 0,37 of hoger positief. De waarden van buis 2 en 3 lagen vlakbij elkaar, maar buis 2 was positief en buis 3 twijfelachtig.

In het Grampreparaat van buis 4, die troebel was, zijn veel Gram-positieve staven gevonden. Het supernatant van deze buis was hoogpositief in de VIDAS®.

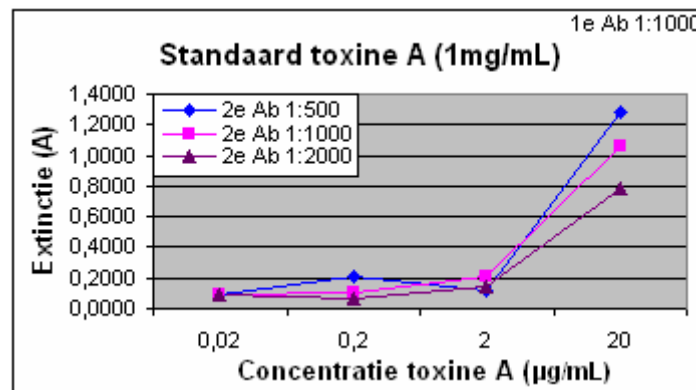
Omdat in buis 1 alleen Gram-positieve cocci zijn gevonden in het Grampreparaat, is dit monster niet meegenomen in de ELISA. In de grafieken 4.3.1 en 4.3.2 zijn de resultaten weergegeven van het standaard toxine A in de toxA ELISA.



Grafiek 4.3.1: Resultaten van standaard toxine A met variabele verdunningen van het primaire antilichaam (1^e Ab) in de toxA ELISA. De secundaire antilichaamverdunding was 1:1000. Elke primaire antilichaamverdunding heeft een eigen kleur in de grafiek.

In grafiek 4.3.1 zijn de resultaten weergegeven van het standaard toxine A met variabele verdunningen van het primaire antilichaam (1^e Ab) in de toxA ELISA. De waarden van de monsters en de standaard konden niet gecorrigeerd worden op de achtergrondsignalen, omdat geen negatieve controles waren meegenomen.

Er was vanuit gegaan dat positieve extinctiewaarden boven 0,2A lagen. De verdunningen 1:500 en 1:1000 van het primaire antilichaam gaven ongeveer dezelfde waarden aan bij elke concentratie van het standaard toxine A en waren bij 20 en 2 µg/mL positief. Verdunning 1:2000 van het primaire antilichaam was alleen positief bij concentratie 20 µg/mL toxine A.



Grafiek 4.3.2: Resultaten van standaard toxine A met variabele verdunningen van het secundaire antilichaam (2^e Ab) in de toxA ELISA. De primaire antilichaamverdunding was 1:1000. Elke secundaire antilichaamverdunding heeft een eigen kleur in de grafiek.

In grafiek 4.3.2 zijn de resultaten weergegeven van het standaard toxine A met variabele verdunningen van het secundaire antilichaam (2^e Ab) in de toxA ELISA. De extinctiewaarden bij 20 µg/mL toxine A waren bij elke verdunning van het secundaire antilichaam positief, maar lagen redelijk uit elkaar. Bij de overige concentraties lagen de extinctiewaarden van elke verdunning dichtbij elkaar.

In de indirecte toxA ELISA met de variabele verdunningen van het primaire antilichaam gaf monster nummer twee in alle verdunningen de hoogste extinctiewaarden aan. Alle monsters gaven de hoogste extinctiewaarde aan bij monsterverdunding 1:100. Alle monsters hadden echter lagere positieve extinctiewaarden (niet hoger dan 0,3A) dan het standaard toxine A.

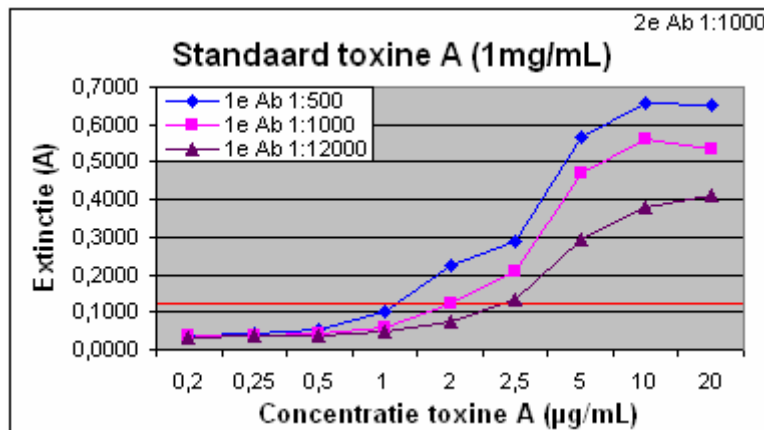
In de indirecte toxA ELISA met de variabele verdunningen van het secundaire antilichaam had monsterverdunding 1:1000 de hoogste extinctiewaarden. Monster nummer twee had in alle verdunningen de hoogste extinctiewaarden bij secundaire antilichaamverdunding 1:500. Alle monsters hadden echter lagere positieve extinctiewaarden (niet hoger dan 0,3A) dan het standaard toxine A.

De concentraties van toxine A in de monsters zijn niet berekend, omdat de extinctiewaarden niet gecorrigeerd konden worden op de achtergrondsignalen.

4.3.2 Detectiegrens indirecte toxA ELISA

Omdat de concentratie van het standaard toxine A bekend is en omdat deze positieve waarden had in de indirecte toxA ELISA, is onderzocht wat de detectiegrens is van de toxA ELISA.

Drie maal het gemiddelde van de extinctiewaarden van de negatieve controles zijn afgetrokken van de extinctiewaarden van het standaard toxine A. Deze gecorrigeerde waarden van het standaard toxine A zijn weergegeven in grafiek 4.3.3.



Grafiek 4.3.3: Resultaten van het standaard toxine A gecorrigeerd met de negatieve controles in de toxA ELISA. Er is gebruik gemaakt van variabele verduunningen van het primaire antilichaam. De secundaire antilichaamverduunning was 1:1000. De rode lijn geeft drie keer de gemiddelde waarde aan van de negatieve controles. Extinctiewaarden boven deze lijn zijn als positief beschouwd. Elke primaire antilichaamverduunning heeft een eigen kleur in de grafiek.

In grafiek 4.3.7 is te zien dat het standaard toxine A de hoogste extinctiewaarden had bij de primaire antilichaamverduunning 1:500. Primair antilichaamverduunning 1:2000 gaf de laagste waarden. Alledrie de antilichaamverduunningen gaven lagere extinctiewaarden naarmate de concentratie lager werd.

De rode lijn in grafiek 4.3.3 geeft drie keer de gemiddelde waarde van de negatieve controles weer. Extinctiewaarden boven deze grens (0,1245A) zijn als positief beschouwd. De detectiegrens van het standaard toxine A bij de primaire antilichaamverduunning 1:500 ligt dichtbij 1µg/mL. De detectiegrens van de primaire antilichaamverduunning 1:1000 is 2µg/mL en van verduunning 1:2000 2,5µg/mL

4.3.3 Indirecte toxB ELISA

Op dezelfde manier als de indirecte toxA ELISA is de indirecte toxB ELISA uitgevoerd. Hierbij is als primair antilichaam konijn α -toxB gebruikt. Een standaard toxine B (concentratie onbekend) en dezelfde monsters als in de toxA ELISA zijn meegenomen in deze indirecte toxB ELISA.

De extinctiewaarden van het standaard toxine B waren in elke verdunning en bij elk antilichaamverdunning negatief. De extinctiewaarden van het standaard toxine B waren immers net zo laag als de extinctiewaarde van de negatieve controle.

In de indirecte toxB ELISA met de variabele verdunningen van het primaire antilichaam had monster nummer vier in alle verdunningen bij elke primaire antilichaamverdunning de hoogste extinctiewaarden.

Elk monster gaf bij monsterverdunning 1:10 de hoogste extinctiewaarden. Monster nummer vier had bij deze monsterverdunning extinctiewaarden tussen 0,6A en 0,9A. Monster nummer twee en drie hadden bij monsterverdunning 1:10 extinctiewaarden tussen 0,2 en 0,3. Deze lagen dus duidelijk lager dan de waarden van monster nummer vier.

De primaire antilichaamverdunning 1:500 gaf de hoogste extinctiewaarden bij elke monsterverdunning, 1:2000 gaf de laagste extinctiewaarden bij elke monsterverdunning.

In de indirecte toxB ELISA met de variabele verdunningen van het secundaire antilichaam had monster nummer vier in alle verdunningen bij elke primaire antilichaamverdunning de hoogste extinctiewaarden

Elk monster gaf bij monsterverdunning 1:10 positieve extinctiewaarden (hoger dan 0,2A). Monster nummer vier had bij deze monsterverdunning extinctiewaarden tussen 0,5A en 1,0A. Monster nummer twee en drie hadden bij monsterverdunning 1:10 extinctiewaarden tussen 0,2 en 0,3. Deze lagen dus duidelijk lager dan de waarden van monster nummer vier.

De primaire antilichaamverdunning 1:500 gaf de hoogste extinctiewaarden bij elke monsterverdunning, 1:2000 gaf de laagste extinctiewaarden bij elke monsterverdunning.

Het standaard toxine B was in de uitgevoerde indirecte toxB ELISA negatief. Daarom is dit standaard toxine B nog eens getest in kleinere verdunningen: 1:5, 1:10, 1:20 en 1:40. Hierbij zijn weer verschillende concentraties primaire en secundaire antilichamen gebruikt.

Uit deze indirecte toxB ELISA bleek dat de extinctiewaarden van het standaard toxine B nog steeds negatief waren. Ze waren lager dan drie keer de waarde van de negatieve controle.

4.3.4 Sandwich ELISA

Naast de indirecte ELISA is een sandwich ELISA ontwikkeld voor de detectie van de toxinen van *C. difficile*. Dit is gedaan omdat de monsters bij de indirecte toxA ELISA lage extinctiewaarden gaven en omdat het standaard toxine B negatief bleef in de indirecte toxB ELISA.

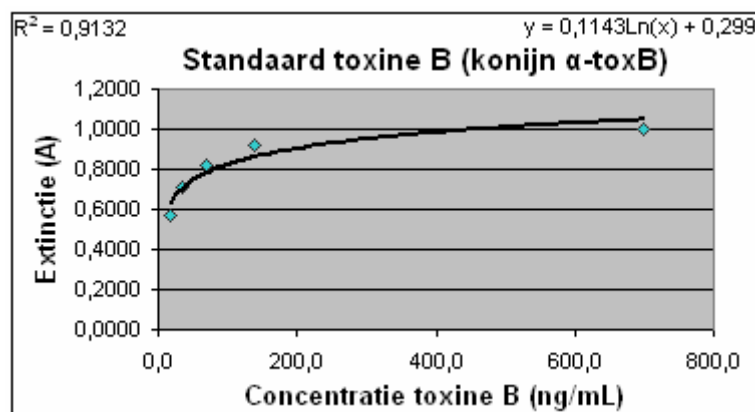
Onderzocht is welk antilichamenpaar het beste resultaat geeft in de sandwich toxA- en toxB ELISA. Geit α -konijn-HRP en Geit α -muis-HRP waren alleen beschikbaar als tertiair antilichaam, dus kan alleen konijn of muis α -toxA of α -toxB gebruikt worden als secundair antilichaam.

Uit de resultaten van de sandwich toxA ELISA bleek dat het antilichamenpaar konijn α -toxA (primair) en muis α -toxA (secundair) de hoogste extinctiewaarden gaf in de toxA ELISA. Echter gaf het antilichamenpaar konijn α -toxA en muis α -toxB ook een positieve waarde. Het antilichamenpaar rund α -toxA (primair) en konijn α -toxA (secundair) gaven ook hoge extinctiewaarden. Geen van de α -toxA antilichamen reageerde met toxine B. De hoogste extinctiewaarde van alle antilichamenparen kwam voor bij de kleinste toxineverdunding (de één op één verdunding met blockingbuffer).

Uit de resultaten van de sandwich toxB ELISA bleek dat geen van de α -toxB antilichamen positieve extinctiewaarden gaven met toxine A als antigeen. Weinig antilichamenparen gaven positieve waarden. Het antilichamenpaar muis α -toxB (primair) en konijn α -toxB (secundair) gaven zwakke positieve waarden. Hetzelfde gold voor paard α -ToxA&B (primair) en konijn α -toxB (secundair). Het antilichamenpaar konijn α -toxB (primair) en muis α -toxB (secundair) gaven geen positieve waarden en het antilichamenpaar paard α -ToxA&B (primair) en muis α -toxB ook niet.

4.3.5 Indirecte toxB ELISA met andere antilichamen

Omdat de sandwich toxB ELISA lage positieve waarden gaf bij sommige antilichamenparen, is een indirecte toxB ELISA opgezet met de antilichamen die zijn gebruikt bij de sandwich toxB ELISA. De resultaten van het standaard toxine B in de indirecte toxB ELISA zijn weergegeven in grafiek 4.3.4.



Grafiek 4.3.4: Resultaten van het standaard toxine B met als primair antilichaam konijn α -toxB in de indirecte toxB ELISA. Deze waarden zijn gecorrigeerd op de gemiddelde waarde van de negatieve controles. Rechtsboven in de grafiek is de formule van de trendlijn (zwart) weergegeven. Linksboven is de correlatiecoëfficiënt (R^2) weergegeven.

In grafiek 4.3.4 zijn de resultaten weergegeven van het standaard toxine B met als primair antilichaam konijn α -toxB in de indirecte toxB ELISA. Zowel de primaire als de secundaire antilichamen zijn in een 1:500 verdunding gebruikt. De extinctiewaarden zijn gecorrigeerd met drie maal het gemiddelde van de negatieve controles. Naarmate de concentratie van het standaard toxine B hoger werd, werd de adsorptie ook hoger.

De correlatiecoëfficiënt (R^2) geeft aan in hoeverre de berekende trendlijn een goede weergave is van het verband tussen de gemeten waarden. Betrouwbare waarden liggen rond 1,0. De correlatiecoëfficiënt van het standaard toxine B in de indirecte toxB ELISA lag tussen de 0,9 en 1,0.

Bij deze indirecte toxB ELISA zijn ook monster meegenomen van de groeicurve van *C. difficile* ribotype 078 en stam 630 (respectievelijk 1:100 en 1:1000 verdund). De resultaten van de monsters zijn weergegeven in tabel 4.3.2.

Tabel 4.3.2: Resultaten van een selectie monsters van *C. difficile* ribotype 078 en stam 630 in de indirecte toxB ELISA met als primair antilichaam konijn α -toxB. Links in de grafiek zijn de resultaten weergegeven van ribotype 078 en rechts van stam 630. De concentraties van de monsters zijn berekend.

Resultaten van een selectie monsters in de tox B ELISA (konijn α -toxB)									
Ribotype 078 (1:100)	Extinctie (A)	Gecorrigeerde extinctie (A)	Conc. (ng/mL)	Conc. $\times 100$ (μ g/mL)	Stam 630 (1:1000)	Extinctie (A)	Gecorrigeerde extinctie (A)	Conc. (ng/mL)	Conc. $\times 1000$ (μ g/mL)
2	0,6550	0,5296	7,52	0,75	2	0,6610	0,5356	7,92	7,92
5	0,7220	0,5966	13,51	1,35	5	0,7790	0,6536	22,25	22,25
8	0,7340	0,6086	15,01	1,50	8	0,8920	0,7666	59,80	59,80
12	0,5060	0,3806	2,04	0,20	12	0,9120	0,7866	71,23	71,23
					15	0,8430	0,7176	38,95	38,95

In tabel 4.3.2 zijn de resultaten weergegeven van een selectie monsters die zijn meegenomen in de indirecte toxB ELISA. De verkregen extinctiewaarden zijn gecorrigeerd met drie maal het gemiddelde van de negatieve controles. Beide stammen hadden positieve monsters in de indirecte toxB ELISA.

Van de monsters zijn de concentraties berekend met de formule van de trendlijn $y = 0,1143 \ln(x) + 0,2990$ (weergegeven in grafiek 4.3.4). Dus $x = e^{\left(\frac{y-0,2990}{0,1143}\right)}$. Vervolgens zijn deze concentraties omgerekend in μ g/mL en gecorrigeerd op de verdunning.

Bij de toxB ELISA met als primair antilichaam muis α -toxB had het standaard toxine B een oplopende adsorptie naarmate de concentratie hoger werd. De monsters waren echter allemaal negatief in deze toxB ELISA.

5. Discussie en conclusie

5.1 Looxster® en aankweekmedium

Met twee verschillende methoden (zie hoofdstuk 3.3.1. op blz.19-20) is geprobeerd de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR te verhogen. Voor elke methode zijn dezelfde concentraties *C. difficile* in feces gebruikt.

Elke concentratie gespiked feces is na een ethanolshock geënt op Clos- en CNA-platen. Vanaf de gecorrigeerde concentratie 10^3 CFU/g feces en hoger zijn *C. difficile*-kolonies gevonden op de Clos-platen. Dit kwam overeen met de gevoeligheid van de kweek (10^3 CFU/g).

Op de CNA-platen zijn geen losse *C. difficile*-kolonies gevonden, wegens overgroei. Veel andere bacteriën hebben dus toch de ethanolshock overleefd. Vanaf concentratie 10^2 CFU/g feces en lager zijn wel veel losliggende kolonies gevonden, maar geen *C. difficile*. Waarschijnlijk kwam dit omdat *C. difficile* de kans niet kreeg om te groeien door de groei van veel andere overlevende bacteriën.

Op alle monsters van de drie verschillende methoden is een real-time toxB-PCR uitgevoerd. De interne controle (PhHV) gaf positieve Ct-waarden. De PCR-producten van de interne controle waren ook zichtbaar op de 1% agarosegelen als bandje van ongeveer 100bp groot. Er was dus in deze PCR geen sprake van remming van de monsters tijdens de real-time toxB-PCR en het DNA was goed geïsoleerd.

De meeste monsters waarop de looxster®-concentratiemethode is uitgevoerd, gaven geen Ct-waarde voor de interne controle. Looxster® concentreert prokaryoot DNA, waardoor het zeer waarschijnlijk is dat het virale DNA van PhHV verloren ging.

Eerder was vastgesteld dat de real-time toxB-PCR met voorbehandeling met STAR-buffer en DNA-isolatie met de MagNA Pure LC een sensitiviteit had van 10^4 - 10^5 CFU/g. Dit kwam overeen met het resultaat uit dit experiment, want vanaf concentratie 10^5 CFU/g feces en hoger zijn Ct-waarden gevonden.³¹

Een hoge Ct-waarde is gevonden bij de gecorrigeerde concentratie 10^{-1} CFU/g, maar op plaat (direct na een ethanolshock) is aangetoond dat het monster geen *C. difficile* bevatte (tabel 4.1.2). Waarschijnlijk was hier sprake van contaminatie tijdens het toevoegen van het DNA in de PCR-mix.

De Ct-waarden van deze methode kwamen overeen met de 177bp grootte bandjes op de 1% agarosegel. Op de gel was echter ook een heel zwak bandje zichtbaar bij 10^5 CFU/g, maar deze had geen Ct-waarde. De agarosegel is dus gevoeliger dan de real-time toxB PCR. De analyse m.b.v. een agarosegel is echter een veel bewerkelijkere methode dan de analyse m.b.v. de real-time toxB PCR. Verder waren veel bandjes zichtbaar op de gel met andere groottes. Dit waren onbekende en onverklaarbare bijproducten.

Alleen bij concentratie 10^6 CFU/g feces, die nabehandeld is met looxster®, is een Ct-waarde gevonden in de real-time toxB PCR. De PCR was dus met deze nabehandeling minder gevoelig dan de voorbehandeling met STAR-buffer en DNA-isolatie met de MagNA Pure LC. Ook was op de 1% agarosegel enkel bij concentratie 10^6 CFU/g feces een bandje zichtbaar van 177bp groot. Hieruit kon geconcludeerd worden dat looxster® de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR niet verbeterde.

Looxster® concentreert prokaryoot DNA. Het wordt gebruikt bij monsters die veel eukaryoot DNA bevatten en weinig prokaryoot DNA. Feces bevat daarentegen veel meer prokaryoot DNA dan eukaryoot DNA.

Dat is waarschijnlijk de reden waarom looxster® de sensitiviteit van de real-time toxB PCR bij feces niet verbeterde. Om deze reden is besloten geen verdere onderzoeken te doen met looxster® om de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR bij feces te verbeteren.

Bij de voorkweek van feces is gebruik gemaakt een specifiek ontwikkeld aankweekmedium. Het doel hiervan was dat meer *C. difficile* gekweekt zou worden, waardoor meer *C. difficile*-DNA geïsoleerd zou kunnen worden. De real-time toxB PCR bij feces wordt hiermee gevoeliger.

Vanaf de gecorrigeerde concentratie 10^5 CFU/g feces en hoger zijn Ct-waarden gevonden bij de monsters van de voorkweek. De Ct-waarden van deze concentratie lagen rond de 41 en was hoger dan de Ct-waarde (35,7) gevonden bij standaardbehandeling en DNA isolatie (STAR-buffer en MagNA Pure LC). Op de 1% agarosegel waren deze PCR-producten zichtbaar als bandje van 177bp groot.

Op gel waren ook veel zwakkere bandjes zichtbaar van 177bp groot bij lagere concentraties gespiked feces. Deze hadden daarentegen geen Ct-waarden. De agarosegel lijkt dus gevoeliger dan de real-time toxB PCR.

De real-time toxB PCR toonden bij de negatieve controle en de gecorrigeerde concentratie 10^0 CFU/g feces van de voorkweek na vijf dagen incubatie Ct-waarden (hoger dan 43). Hier was waarschijnlijk sprake van contaminatie, omdat op de Clos- en CNA-platen na ethanolshock geen *C. difficile* zijn gevonden (tabel 4.1.2). Deze contaminatie zou gebeurd kunnen zijn tijdens het toevoegen van het geïsoleerde DNA in de PCR-mix voor de real-time toxB-PCR.

De positieve controle op de real-time toxB-PCR, had een lage Ct-waarde (23,7) vergeleken met andere Ct-waarden. Er waren dus veel PCR-producten gevormd. Op de 1% agarosegel was dit zichtbaar als dik bandje van 177bp groot. De negatieve controle op de PCR (PBS) had een hoge Ct-waarde (39,6). Ook dit PCR-product was zichtbaar op gel. Waarschijnlijk was hier sprake van contaminatie. Deze contaminatie zou gebeurd kunnen zijn tijdens het toevoegen van het geïsoleerde DNA in de PCR-mix voor de real-time toxB-PCR.

Op de agarosegel van de monsters van de voorkweek na vijf dagen incubatie zijn PCR-producten zichtbaar als dikke bandjes van ongeveer 400 bp groot. Dit waren onbekende en onverklaarbare bijproducten. De PCR-producten zouden geanalyseerd kunnen worden. Deze bijproducten zouden dan uit gel gesneden en gezuiverd moeten worden en vervolgens gesequenced. Dit is echter niet gedaan, omdat dit te veel werk zou zijn en omdat alleen gefocust werd op *C. difficile*.

Het aankweekmedium met gespiked feces is na vijf dagen incubatie afgeënt op Clos- en CNA-platen. Verwacht werd dat het aantal kolonies op de Clos- en CNA-platen na een ethanolshock hoger lag dan het aantal kolonies direct na het spiken. Op geen van deze platen is echter *C. difficile* teruggevonden.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat het specifiek ontwikkelde aankweekmedium (BHI met cycloserine, cefoxitine, taurocholaat en lysozym) *Clostridium difficile* in feces niet aankweekt en de real-time toxB PCR bij feces dus niet gevoeliger maakt.

Gedacht werd dat het specifieke aankweekmedium, wegens een hoge concentratie cycloserine, 500mg/L, *C. difficile* remde en/of doodde of dat *C. difficile* de kans niet kreeg om te groeien, omdat heel veel andere bacteriën ook groeiden.³²

Om deze reden is onderzocht of *C. difficile* stam 630 zonder feces kan groeien in het specifieke aankweekmedium. Uit de experimenten bleek dat *C. difficile* stam 630 soms groeide in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium en soms niet. Dit was dus niet reproduceerbaar. Maar als de stam wel groeide in het aankweekmedium, groeide het sneller in anaëroob gepreïncubeerd medium dan medium uit 4°C. Na twee dagen waren immers alle concentraties van het gepreïncubeerde aankweekmedium troebel en is *C. difficile* gevonden in Grampreparaten en op de bloedplaten.

Omdat *C. difficile* stam 630 niet altijd wilde groeien in het specifiek ontwikkelde aankweekmedium is onderzocht in welk aankweekmedium (thio, TSB+XV, BHI en het specifieke medium BHI+CCTL) *C. difficile* wel altijd wilde groeien. Dit experiment is meerdere malen uitgevoerd.

Evenveel kolonies (CFU) zijn toegevoegd in 9mL thio en in 5mL TSB+XV, BHI en BHI+CCTL. De concentratie *C. difficile* in thio was dus lager dan in de overige media.

Uit de resultaten bleek dat het medium thio elke keer hoge OD600-waarden gaf na één en na twee dagen incubatie, ondanks dat dit medium de laagste startconcentratie *C. difficile* bevatte. De overige media gaven na twee dagen incubatie meestal een veel lagere OD600-waarde aan dan na één dag incubatie.

Op de platen afgeënt van thio zijn de meeste *C. difficile*-kolonies gevonden en dit was meestal meer dan verwacht. Het voordeel van het medium thio is dat het niet anaëroob gepreïncubeerd hoeft te worden, omdat thio van onder naar boven een gradueel oplopend zuurstofgehalte heeft. Om deze redenen wordt een nieuw specifiek aankweekmedium geproduceerd. Het nieuwe medium wordt thio met:

1. 250mg/L cycloserine, 8mg/L cefoxitine, 0,1% taurocholaat en 5mg/L lysozym,
2. 250mg/L cycloserine, 8mg/L cefoxitine en 0,1% taurocholaat en
3. 250mg/L cycloserine, 8mg/L cefoxitine en 5mg/L lysozym.

BHI+CCTL bevatte 500mg/L cycloserine en het specifieke aankweekmedium thio zal 250mg/L cycloserine bevatten. Gedacht wordt dat 500mg/L cycloserine te veel *C. difficile* doodt en/of remt.³² Ook worden verschillende concentraties taurocholaat en lysozym toegevoegd in het nieuwe specifieke aankweekmedium. Het verschil in groei tussen deze drie specifieke aankweekmedia (thio) en het specifieke aankweekmedium BHI wordt met elkaar vergeleken. Misschien kan met dit aankweekmedium (thio) de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR bij feces wel verbeterd worden.

Een andere manier om de sensitiviteit van de real-time toxB-PCR bij feces te verbeteren is met behulp van meerdere targets. Dit zou bijvoorbeeld kunnen met primers voor drie genen van het PaLoc. Hiervoor moeten dan wel verschillende specifieke probes worden ontwikkeld met hetzelfde fluorescentielabel. Met deze techniek zou signaal in de real-time PCR omhoog gebracht kunnen worden en dus zorgen voor een hogere gevoeligheid van de real-time PCR.

5.2 Karakterisatie en sequentie-analyse ribotype 078-stammen

Het doel van deze experimenten was een onderzoek naar de verschillende virulentiefactoren van *C. difficile* ribotype 078-verdachte stammen van patiënten en varkens. Ook is gekeken naar het verschil van *C. difficile* ribotype 078 en ribotype 027.

In tabel 4.2.1 op bladzijde 39 zijn de resultaten weergegeven van 51 *C. difficile* ribotype 078-stammen. Zowel de varkensstammen als de humane stammen (uit 2005-2007) bevatten allemaal het *tcdA*-gen en het *tcdB*-gen. Ook bevatten alle ribotype 078-stammen de twee binaire toxinegenen, *cdtA* en *cdtB*.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat *C. difficile* ribotype 078 geïsoleerd uit patiënten en varkens dezelfde virulentiefactoren hebben en dat geen verschil in virulentiefactoren zit tussen stammen uit 2005, 2006 en 2007.

Het virulente *C. difficile* ribotype 027 bevat ook het *tcdA*-gen, het *tcdB*-gen en beide binaire toxinegenen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat *C. difficile* ribotype 078 dezelfde virulentiefactoren heeft als het virulente *C. difficile* ribotype 027.

De ribotype 078-stammen van de patiënten en van de varkens hebben een T-T mutatie op positie 183bp en 184bp in het *tcdC*-gen. De mutatie op positie 184bp leidt tot een stopcodon (TAA). Het gevolg is dat het *tcdC*-gen een niet-functioneel TcdC tot expressie brengt. Het *tcdC*-gen bevat in alle 51 ribotype 078-stammen ook een 39bp deletie. Op dit gebied zijn de varkensstammen en de humane stammen (uit 2005-2007) ook identiek aan elkaar.

Ribotype 027 heeft een puntdeletie in het *tcdC*-gen. Hierdoor ontstaat een frameshift, waardoor verderop in het gen een vroegtijdig stopcodon wordt geïntroduceerd. Hierdoor is het *tcdC*-gen niet functioneel. Ook heeft ribotype 027 een 18bp deletie in het *tcdC*-gen.

Zowel ribotype 027- als ribotype 078-stammen hebben een niet functioneel *tcdC*-gen door een introductie van een vroegtijdig stopcodon. De stopcodons worden echter door een mutatie (ribotype 078) of een deletie (ribotype 027) geïntroduceerd. Bij ribotype 027 is bewezen dat door deze deletie hyperexpressie plaatsvindt van de toxinegenen.²² Waarschijnlijk zal dit ook het geval zijn bij ribotype 078, omdat deze ook een niet-functioneel *tcdC*-gen bevat.

Resistentie tegen moxifloxacin is gevonden bij 12% van alle ribotype 078-stammen. Tegen ciprofloxacine zijn 88% van de ribotype 078-stammen resistent. Resistentie tegen erythromycine is gevonden bij 75% van de ribotype 078-stammen en tegen clindamycine 6% van de ribotype 078-stammen.

Dit gevoeligheidsbeeld lijkt op die van de historische ribotype 027-stam (ribotype 027 voordat het epidemieën veroorzaakte).³⁸ Deze stam was namelijk ook gevoelig voor moxifloxacin. De epidemische ribotype 027-stam is wel resistent tegen moxifloxacin.

Zeven ribotype 078-stammen bevatten het *ErmB*-gen. Slechts twee daarvan waren hoog resistent tegen erythromycine en clindamycine. De overige vijf stammen hadden geen hoge resistentie tegen clindamycine, maar wel tegen erythromycine.

In een studie van Pituch et al. zijn ook stammen beschreven die niet het *ErmB*-gen bevatten, maar wel resistent zijn tegen erythromycine en/of clindamycine.³⁹ Waarschijnlijk is een ander mechanisme dan het *ErmB*-gen verantwoordelijk voor de resistentie tegen erythromycine.

Bij dit onderzoek zijn ribotype 078-stammen van patiënten gebruikt afkomstig uit heel Nederland (één uit België en één uit Duitsland) en varkensstammen afkomstig van twee boerderijen. Om een beter beeld te kunnen krijgen tussen de overeenkomsten in virulentiefactoren van humane- en varkensstammen zouden ook ribotype 078-stammen uit het buitenland kunnen worden onderzocht.

Voor een beter beeld in resistentie van ribotype 078-stammen zouden van historische ribotype 078-stammen ook gevoeligheidsbepalingen kunnen worden uitgevoerd. De resultaten van dit onderzoek kunnen dan vergeleken worden met de Nederlandse ribotype 078-stammen om een beter beeld te verkrijgen over de virulentie van *C. difficile* ribotype 078.

De genetische relatie tussen humane- en varkensstammen is bepaald met MLVA, Multi-Locus Variable tandem repeat Analyses. De MLVA voor *C. difficile* is ontwikkeld in het LUMC. Hiermee kan worden onderzocht of stammen daadwerkelijk genetisch aan elkaar gerelateerd zijn.

Dit is gedaan met behulp van een PCR op tandem repeats op zeven verschillende loci. De DNA-producten na de PCR vormden op een agarosegel na elektroforese een bandenpatroon. Dit bandpatroon is met behulp van de ABI 3100 en Bionumerics (Applied Biosystems, USA) geanalyseerd.

Uit de resultaten blijkt dat alle varkensstammen en humane stammen genetisch aan elkaar gerelateerd zijn. Sommige varkens- en humane stammen zijn zelfs identiek. Ook is er sprake van klonaliteit tussen een aantal varkens- en humane stammen.

Bij deze MLVA zijn ook een aantal buitenlandse stammen meegenomen (bijvoorbeeld Duitse, Belgische, Italiaanse en Ierse). Ook deze stammen zijn genetisch gerelateerd aan Nederlandse stammen of is er zelfs sprake van klonaliteit.

5.3 ELISA

Het doel van dit experiment was het opzetten van een ELISA om de concentraties toxine A en B te kunnen detecteren in vloeibare culturen. Als eerste is onderzocht of het verkregen protocol voor een indirecte ELISA werkte.

Er is vanuit gegaan dat een positieve waarde boven 0,2A lag. Bij concentratie 20µL/mL toxine A gaf de indirecte toxA ELISA bij elke primaire en secundaire antilichaamverdunding een positieve extinctiewaarde van 0,8A of hoger. Bij een concentratie lager (2µg/mL) lagen deze waarden niet boven 0,3A.

Alle geteste monsters (verdunding 1:10 t/m 1:10.000) in de indirecte toxA ELISA hadden een extinctiewaarde lager dan 0,3A, uitgezonderd de waarde van monster nummer twee (max. 0,288A). Opvallend was dat monster vier lage waarden gaf in de toxA ELISA, terwijl de VIDAS® voor dit monster een hoog positieve waarde gaf (tabel 4.3.1 op blz. 40).

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de indirecte toxA ELISA werkt, omdat deze ELISA de toxinen van de monsters en de standaard kan detecteren. Echter werkt de ELISA niet optimaal, omdat de waarden van de monsters laag zijn. Het kan ook zijn dat de monsters weinig toxine A produceren.

Voor het bepalen van de detectiegrens van de toxA ELISA is het standaard toxine A meegenomen in veel verschillende verdunningen. De detectiegrens ligt bij de primaire antilichaamverdunding 1:500 net boven 1µg/mL. De detectiegrens bij de secundaire antilichaamverdunding 1:1000 is 2µg/mL.

Wegens het vele gebruik van de antilichamen is besloten dat de primaire en secundaire antilichamen in de toxA ELISA in een 1:1000 verdunning worden gebruikt, omdat deze ook hoog positieve waarden gaven. De detectiegrens van deze antilichaamverdundingen is 2µg/mL.

Het standaard toxine B, waarvan de concentratie onbekend was, was in elke verdunning (1:5 t/m 1:50.000) negatief. De monsters echter niet. Monster nummer vier heeft in de indirecte toxB ELISA bij beide variabele antilichaamverdundingen de hoogste waarden (rond 0,8A bij monsterverdunding 1:10).

Hieruit kan geconcludeerd worden dat onbekend is of de indirecte toxB ELISA werkt. Immers kon de standaard toxine B niet gedetecteerd worden in deze ELISA. Alleen monster nummer vier had hoog positieve waarden. Dit kan verklaren waarom de VIDAS® een hoge uitslag gaf bij dit monster, terwijl de toxA ELISA negatief was voor dit monster.

Het standaard toxine B was echter afkomstig uit een oude batch. Waarschijnlijk is het toxine in loop van de tijd instabiel geworden en kon de toxB ELISA daarom geen toxine detecteren.

Het doel lijkt deels bereikt te zijn. Het protocol werkte bij de toxA ELISA. Het standaard toxine A en de monsters waren positief. In het vervolg zouden de toxA ELISA's uitgevoerd met een standaard reeks toxine A in de verdunningen: 1:50, 1:100, 1:200, en 1:400.

Deze verdunningen worden meegenomen, omdat deze waarden positief waren in de toxA ELISA (grafiek 4.3.3). Met deze verdunningen kunnen de concentraties toxine A berekend worden in de meegenomen monsters.

Het standaard toxine B (uit de oude batch) gaf geen positieve waarden in de toxB ELISA. De monsters echter wel. Maar zonder een standaard toxine B kunnen de concentraties van deze monsters niet berekend worden.

Omdat bekend is dat sandwich ELISA's meestal specifiek en sensitiever zijn dan indirecte ELISA's zijn, is een sandwich toxA en toxB ELISA ontwikkeld voor de detectie van toxine A en B in vloeibare culturen. Eerst is onderzocht welk antilichamenpaar het beste resultaat gaf in de toxA- en toxB ELISA.

Uit de resultaten van deze onderzoeken bleek dat het antilichamenpaar konijn α -toxA (primair) en muis α -toxA (secundair) de hoogste extinctiewaarden gaf in de toxA ELISA. Echter gaf het antilichamenpaar konijn α -toxA en muis α -toxB ook een positieve waarde. Waarschijnlijk was hier sprake van een aspecifiek signaal en zijn de positieve waarden van het antilichamen paar konijn α -toxA en muis α -toxA ook niet meer betrouwbaar. Dit zou gecontroleerd kunnen worden door een sandwich toxA ELISA uit te voeren met deze antilichamen zonder dat het standaard toxine A wordt toegevoegd (maar bijv. coatingbuffer). Bij het antilichamenpaar rund α -toxA en konijn α -toxA zijn ook hoog positieve waarden gevonden. Geen positieve waarden zijn gevonden bij het antilichamenpaar rund α -toxA en konijn α -toxB. Hierbij was dus geen sprake van een aspecifiek signaal. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de sandwich toxA ELISA meest optimaal werkt met antilichamen paar rund α -toxA en konijn α -toxA en dat het toxine A kan detecteren in vloeibare culturen.

Uit de resultaten van sandwich de toxB ELISA bleek dat weinig antilichamenparen positieve waarden gaven. Het antilichamenpaar muis α -toxB (primair) en konijn α -toxB (secundair) gaven zwakke positieve waarden. Hetzelfde gold voor paard α -ToxA&B (primair) en konijn α -toxB (secundair).

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de sandwich toxB ELISA weinig toxine B kan detecteren en dus niet optimaal werkt. Wel is hier gebruik gemaakt van het standaard toxine B uit een nieuwe batch. Dit standaard toxine zou dus stabiel moeten zijn. Daarom is besloten een indirecte toxB ELISA uit te voeren met antilichamen van de sandwich ELISA en het standaard toxine B afkomstig uit de nieuwe batch.

Bij de toxB ELISA met als primair antilichaam muis α -toxB heeft het standaard toxine B oplopende extinctiewaarden naarmate de concentratie hoger wordt. De monsters van de groeicurve waren echter allemaal negatief in deze ELISA door een onverklaarbare oorzaak. Bij de toxB ELISA met als primair antilichaam konijn α -toxB heeft het standaard toxine B ook oplopende extinctiewaarde naarmate de concentratie hoger werd. De monsters van de groeicurve in deze toxB ELISA waren (hoog) positief.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de indirecte toxB ELISA werkt met konijn α -toxB als primair antilichaam en geit α -konijn als secundair antilichaam. De detectiegrens van deze indirecte toxB ELISA moet nog bepaald worden. Daarna kan deze ELISA gebruikt worden om toxine B te detecteren in monsters die zijn afgenomen tijdens de groeicurve van *C. difficile*.

Sandwich toxA ELISA's zijn regelmatig uitgevoerd. De adsorptie van het standaard toxine A werd echter steeds minder. Concentratie 700ng/mL toxine A gaf een extinctiewaarde (450nm) van 0,5790A. Na zes dagen was dit 0,2540A en na vijftien dagen 0,1810A.

Gedacht werd dat de stabiliteit van toxine A minder werd naarmate de tijd. Het standaard toxine A is bewaard bij 4°C. Daarom is de sandwich toxA ELISA uitgevoerd met standaard toxine A en monsters bewaard bij 4°C en bij -80°C. Dit is ook direct onderzocht bij de indirecte toxB ELISA.

Het doel van dit experiment was om aan te tonen dat de stabiliteit van de toxinen verminderd was bij 4°C. Uit de resultaten bleek dit niet het geval. Standaard toxine A bewaard bij -80°C gaf geen hogere extinctiewaarde dan die bewaard bij 4°C. Alle monsters waren in de toxA ELISA zelfs negatief.

Hetzelfde gold voor de indirecte toxB ELISA. Het standaard toxine B en de monsters bewaard bij -80°C gaven geen hogere extinctiewaarden dan die bewaard bij 4°C. Het standaard toxine B en de monsters gaven ongeveer dezelfde waarden als voorheen. De signaalsterkte bij de indirecte toxB ELISA zwakte dus niet af.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de stabiliteit van beide toxinen bewaard bij 4°C niet verminderd wordt binnen vijftien dagen.

Gedacht werd dat rund α -toxA steeds instabieler werd. Deze a Om deze reden wordt een indirecte toxA ELISA ontwikkelend met de antilichamen die gebruikt zijn bij de sandwich toxA ELISA. Als primair antilichaam wordt konijn α -toxA of muis α -toxA gebruikt. Het verschil in adsorptie tussen deze primaire antilichamen wordt onderzocht.

De ontwikkelde toxA ELISA's zijn dus niet bruikbaar om toxine A te detecteren in monster die zijn afgenomen tijdens de groeicurve van *C. difficile*. Als de indirecte toxA ELISA optimaal werkt, wordt de detectiegrens bepaald. Daarna kan de toxA ELISA gebruikt worden om toxine A te detecteren in monsters die zijn afgenomen tijdens de groeicurve van *C. difficile*.

Als controle dat werkelijk de toxinen uit de monsters worden aangetoond in de ELISA zouden de toxinen van de monsters op gel geanalyseerd kunnen worden.

Als eerst wordt *C. difficile* gekweekt in een vloeibare cultuur. Vervolgens kan uit deze cultuur de eiwitten gezuiverd worden en op een acrylamidegel op grootte worden gescheiden. Daarna wordt de gel gekleurd met coomassiekleuring en kan geanalyseerd worden of de toxinen aanwezig zijn (TcdA: 208kDa, TcdB: 270kDa)².

6. Bronnenlijst

6.1 Literatuur

1. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults, S.M. Poutanen, A.E. Simor, juli 2004
2. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease, D.E. Voth and J.D. Ballard, april 2005
3. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea, oa. J.K. Shim en S. Johnson, februari 1998
4. *Clostridium difficile* and Inflammatory Bowel Disease, M. Issa, A.N. Ananthakrishnan and D.G. Binion, mei 2008
5. Pathogenesis and treatment of *Clostridium difficile* infection, I. Tonna en P.D. Welsby, 6 oktober 2004
6. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, C. Pothoulakis, 1996.
7. Transcriptional analysis of the toxigenic element of *Clostridium difficile*, G.A. Hammond, D.M. Lyerly and J.L. Johnson, augustus 1996
8. Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*, o.a. T. Hundsberger, V. Braun, december 1996
9. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor, N. Mani and B. Dupuy, 2001
10. Evidence that *Clostridium difficile* TcdC Is a Membrane-Associated Protein, R. Govind, G. VEDIYAPPAN, RD Rolfe, JA Fralick, mei 2006
11. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC, S. Matamouros, P. England, B. Dupuy, juni 2007
12. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*, K.S. Tan, B.Y. Wee, K.P. Song, juli 2001
13. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator, oa. G.P. Carter, D. Lyras, augustus 2007
14. *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 wint terrein, maar epidemieën blijven beperkt - augustus 2007, RIVM, augustus 2007
15. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands, A. Goorhuis, T. van der Kooi, N. Vaessen, F.W. Dekker, R. van den Berg, C. Harmanus, S. van den Hof, D.W. Notermans, E.J. Kuijper, september 2007
16. Prospective Multicenter Evaluation of a New Immunoassay and Real-Time PCR for Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Hospitalized Patients, oa. R.J. van den Berg, L.S. Bruijnesteijn van Coppenraet, juli 2005
17. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR, oa. H. Kato, N. Kato, K. Watanabe, augustus 1998
18. Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains, H. Kato, N. Kato, S. Katow, T. Maegawa, S. Nakamura, D.M. Lyerly, juni 1999
19. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR, J. Sutcliffe, T. Grebe, A. Tait-Kamradt, L. Wondrack, november 1996
20. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada, D.R. MacCannell, T.J. Louie, D.B. Gregson, M. Laverdiere, A.C. Labbe, and S. Henwick, 2006
21. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains, S.H. Cohen, Y.J. Tang, J. Silva, februari 2000

22. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*, S. Stubbs, M. Rupnik, M. Gibert, J. Brazier, B. Duerden, M. Popoff, maart 2000
23. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*, C. Gonçalves, D. Decre, F. Barbut, B. Burghoffer, J.C. Petit, mei 2004
24. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing, P. Bidet, F. Barbut, V. Lalande, B. Burghoffer, and J.C. Petit, juni 1999
25. Evaluation of an outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in the St Jansdal hospital in Harderwijk, september 2006
26. Prevalence of PCR Ribotypes among *Clostridium difficile* Isolates from Pigs, Calves, and Other Species, oa. K. Keel, J.S. Brazier, maart 2007
27. Second annual report of the national Reference Laboratory for *Clostridium difficile* (2006-2007), oa. Drs. A. Goorhuis, december 2007
28. *Clostridium difficile* Associated Disease: emergence of a new hyper virulent strain, PCR-ribotype 078, A. Goorhuis, D. Bakker, J. Corver, S.B. Debast, C. Harmanus, D.W. Notermans, E.J. Kuijper, 2008
29. Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands, 2005, S. Paltansing, R.J. van den Berg, R.A. Guseinova, C.E. Visser, E.J. Kuijper, november 2007
30. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe, oa. M. Warny, J. Pepin, A. Fang, 2005
31. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR, R.J. van den Berg, E.J. Kuijper, L.E. van Coppenraet, E.C. Claas, februari 2006
32. Evaluation of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and cycloserine-cefoxitin-fructose broth for recovery of *Clostridium difficile* from environmental sites, CR Clabots, KM Bettin, LR Peterson, DN Gerding, november 1991
33. Value of lysozyme agar incorporation and alkaline thioglycollate exposure for the environmental recovery of *Clostridium difficile*, MH Wilcox, WN Fawley, P Parnell, januari 2000
34. Comparison of cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA) and taurocholate-CCFA for recovery of *Clostridium difficile* during surveillance of hospitalized patients, DZ Bliss, S Johnson, CR Clabots, K Savik, DN Gerding, september 1997
35. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe, M. Warny, J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, L.C. McDonald, september 2005
36. ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, 1998
37. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Seventh Edition, 2007
38. Emergence of an epidemic strain of *Clostridium difficile* in the United States 2001–4: potential role for virulence factors and antimicrobial resistance traits, LC McDonald, G. Killgore, A. Thompson, S. Johnson, DN Gerding, 2004
39. Prevalence and association of PCR ribotypes of *Clostridium difficile* isolated from symptomatic patients from Warsaw with macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) type resistance, H. Pituch, J.S. Brazier, P. Obuch-Woszczatynski, D. Wultanska, F. Meisel-Mikolajczyk, M. Luczak, februari 2006
40. Molecular Cloning, a laboratory manual, volume 3, 2001

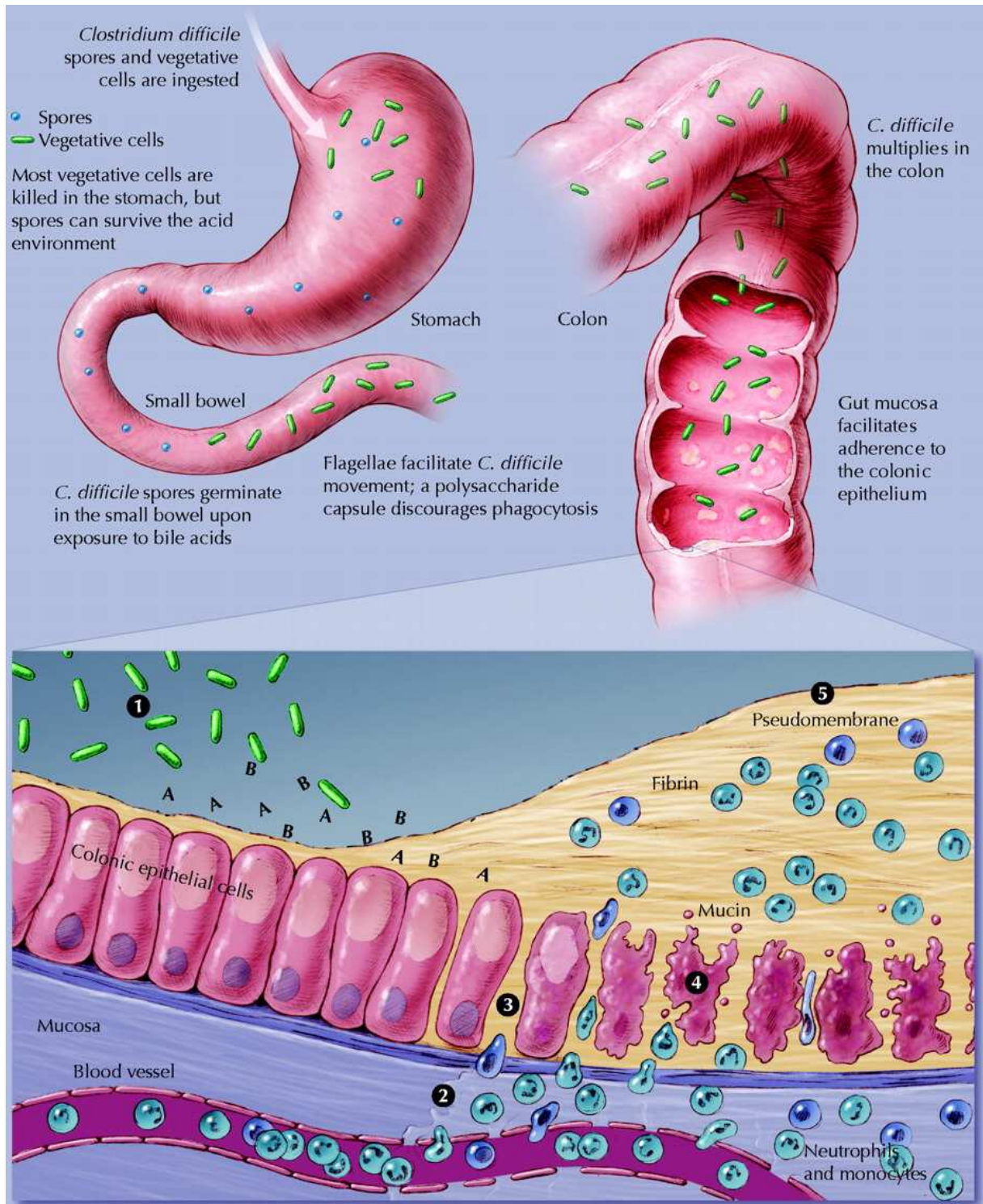
6.2 Internetsites

- A. <http://www.cdifff-support.co.uk/images/cDiff-Factors-Large.jpeg>, juli 2004
- B. <http://www.cdifff-support.co.uk/images/cDiffLarge.jpeg>, juli 2004
- C. http://www.rivm.nl/cib/binaries/CDAD%20rapportage%20augustus%202007%20ned_tcm92-41785.pdf#_class=, augustus 2007
- D. http://www.looxster.com/files/sirs-lab_looxster_universal_technote.pdf, maart 2007

Bijlagen

Bijlage 1: Pathogenese van <i>Clostridium difficile</i> infecties	II
Bijlage 2: Herkomst van de monsters	III
Bijlage 3: Protocol DNA-precipitatie met natriumacetaat	IV
Bijlage 4: Protocol DNA-precipitatie met isopropanol	V

Bijlage 1: Pathogenese van *Clostridium difficile* infecties



Figuur B1.1: Pathogenese van *Clostridium difficile* infecties. Onder stressfactoren produceert *C. difficile* enterotoxine A en cytotoxine B (1). Enterotoxine A veroorzaakt diarree en uitgebreide weefselbeschadiging van de mucosa van dikke darm (pseudomembraneuze colitis) (2). Cytotoxine B veroorzaakt de epitheelcelapoptose (3). De toxineproductie van *C. difficile* leidt tot migratie van monocyt en neutrofielen vanuit de bloedbaan (4) naar de epitheelcellen van de dikke darm van de gastheer (5). De monocyt en neutrofielen kunnen de bacterie onschadelijk maken.^{B,4,6}

Bijlage 2: Herkomst van de monsters

Tabel B2.1: Overzicht van de herkomst van de monsters die gebruikt zijn voor de karakterisatie en sequentie-analyse voor 078-stammen. Monsternummers die met een sterretje zijn weergegeven, zijn varkensstammen.

Monster	Herkomst	Monster	Herkomst
06020637	Harderwijk	07031620*	Vethuizen
06022902	Utrecht	07031655*	Vethuizen
06023414	Arnhem	07031656*	Vethuizen
06026976	Amersfoort	07031657*	Vethuizen
06048052	Haarlem	07031661*	Vethuizen
06055460	Bergen op Zoom	07031662*	Vethuizen
06060406	Amersfoort	07041838	Zwolle
06065571	Utrecht	07044755	Den Haag
06066407	Lelystad	07045389	Sittard
06069956	Groningen	07052917	Utrecht
06075407	Amsterdam	07054744	Amsterdam
06076907	Amsterdam	07054751	Amsterdam
06090460	Friesland	07055954	Utrecht
06-502760	Utrecht	07064071	Haarlem
07000812	Doetinchem	06065935	Utrecht
07002164	Groningen	01233	Leiden
07002169	Amsterdam	15084	Haarlem
07002171	Amsterdam	2522385	België
07004578	Groningen	31807*	IJsselsteijn
07005405	Amsterdam	33	Amersfoort
07009825	Amsterdam	58	Amersfoort
07010250	Bergen op Zoom	B355827	Gouda
07012297	Friesland	JB7	
07013678	Duitsland	UMCG 12-2	Utrecht
07031618*	Vethuizen	UMCG 12-3	Utrecht
		UMCN	Utrecht

* Varkensstam

Bijlage 3: Protocol DNA-precipitatie met natriumacetaat

Voor de optimalisatie van de real-time toxB PCR bij feces is voor de nabehandeling met looxster[®] het automatisch geïsoleerde DNA eerst geprecipiteerd met natriumacetaat.

Benodigdheden

- o Natriumacetaat
- o 70% ijskoude ethanol
- o H₂O

Methode

- o Schat het volume van de DNA-oplossing
- o Voeg natriumacetaat (NaAc) toe, zodat de eindconcentratie NaAc 0,2M wordt en meng deze oplossing.
- o Voeg twee keer zoveel ijskoude ethanol toe als het volume van de DNA-NaAc-oplossing.
- o Meng deze oplossing en bewaar het op ijs voor 15-30 minuten.
- o Centrifugeer 10 minuten bij 0°C (12.000g)
- o Verwijder het supernatant voorzichtig. De pellet kan onzichtbaar zijn
- o Voeg 500µL 70% ethanol.
- o Centrifugeer 2 minuten bij 4°C (12.000g)
- o Verwijder het supernatant voorzichtig. De pellet kan onzichtbaar zijn
- o Droog het epje (de epjes) bij kamertemperatuur met de dop open, zodat het laatste beetje ethanol verdwijnt
- o Los de (onzichtbare) pellet op in 20-50µL H₂O.⁴⁰

Bijlage 4: Protocol DNA-precipitatie met isopropanol

Voordat de sequentie van het *tcdC*-gen m.b.v. de automatische sequencer geanalyseerd kon worden, werden de PCR-producten na de cycle-sequence-PCR geprecipiteerd met isopropanol.

Benodigdheden

- o 75% isopropanol
- o Hi-Di-formamide

Methode

- o Breng de gehele reactiemix na de cycle-sequence-PCR over in een 1,5mL eppendorf epje
- o Voeg 80µL 75% isopropanol toe aan de reactiemix
- o Sluit het epje en vortex het kort.
- o Laat het epje 15 minuten staan bij kamertemperatuur om de PCR-producten te precipiteren
- o Plaats het epje in een centrifuge en markeer duidelijk de bovenzijde.
- o Centrifugeer het epje voor 20 minuten op maximale snelheid
- o De volgende stap moet onmiddellijk uitgevoerd worden na het centrifugeren. Als dit niet mogelijk is, centrifugeer voor de volgende stap het epje nog eens twee minuten.
- o Verwijder het supernatant voorzichtig. Pellets kunnen onzichtbaar zijn
- o Voeg 250µL 75% isopropanol aan het epje toe en vortex het kort
- o Centrifugeer het epje vijf minuten op maximale snelheid (gemarkeerde zijde boven)
- o Verwijder het supernatant voorzichtig
- o Plaats het epje met de dop open bij 90°C voor één minuut om de pellet te drogen.
- o Suspendeer de pellet in 12µL Hi-Di-formamide
- o Plaats het epje met dichte dop bij 95°C voor drie minuten.
- o Centrifugeer het epje kort, totdat er geen condens meer aan de dop zit
- o De sequentie van het DNA kan nu bepaald worden.³⁶