

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Herrmann

**SURFACE LAYER PROTEIN A SEQUENZ-
TYPISIERUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG
VON *CLOSTRIDIUM DIFFICILE***

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von
Katja Speck
geboren am 16. April 1978 in Immenstadt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
1 Zusammenfassung	12
1.1 Zusammenfassung	12
1.2 Summary	13
2 Einleitung	14
2.1 Zielsetzung der Arbeit	14
2.2 <i>C. difficile</i> : allgemeine Einteilung und historische Aspekte	15
2.3 Virulenzfaktoren	15
2.4 <i>C. difficile</i> assoziierte Diarrhoe	16
2.4.1 Prävalenz und klinische Bedeutung	16
2.4.2 Pathogenese	17
2.4.3 Klinische Symptomatik	18
2.4.4 Risikofaktoren	19
2.4.5 Komplikationen	19
2.4.6 Behandlungsoptionen	20
2.4.7 Epidemiologie und Auftreten neuer hochvirulenter Stämme	21
2.5 Diagnostik von <i>C. difficile</i> Infektionen	22
2.5.1 Phänotypische Charakterisierung	22
2.5.2 Genotypische Charakterisierung	23
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Chemikalien	29
3.1.2 VIDAS® <i>C. difficile</i> Toxin A&B (CDAB)	31
3.1.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	31

3.1.4	<i>C. difficile</i> Referenzstämme	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Toxinnachweis direkt aus der nativen Stuhlprobe - Toxin A/B Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
3.2.2	Anaerobe Anzucht	34
3.2.3	Antibiotika-Resistenztestung	35
3.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.5	Nachweis von PCR-Produkten mit Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.6	Sequenzierung der PCR-Produkte	37
3.2.7	Sequenzanalyse	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST)	40
4.2	Charakteristik der Proben	40
4.3	Nachgewiesene Genotypen (slpAST)	41
4.3.1	Verwandtschaft und Clusterzuordnung	44
4.4	Subgruppen-Analyse	46
4.4.1	Antibiotikaresistenz	46
4.4.2	TcdC-Gen Mutationen	48
4.5	Patientencharakteristik	49
4.6	Epidemiologie im zeitlichen Verlauf	51
4.6.1	Fallzahlen im zeitlichen Verlauf	51
4.6.2	Ribotypen im zeitlichen Verlauf	52
4.7	Externe Einsendungen	54
5	Diskussion	56
5.1	Surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) als Nachweismethode in der <i>C. difficile</i> Routinediagnostik	56
5.2	Nachgewiesene Genotypen am UKS	59
5.3	Antibiotikaresistenz und TcdC-Gen Mutationen	61
5.4	Patientencharakteristik	63
5.5	Zeitliche Epidemiologie	65

5.6	Schlussfolgerung	69
5.7	Ausblick	70
6	Literaturverzeichnis	71
7	Publikationen/Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

16s, 23s, 5s ...	Untereinheiten der prokaryotischen ribosomalen RNA
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
A	Adenosin
AAD	Antibiotikaassoziierte Diarrhoe
AFLP	amplified fragment-length polymorphism, amplifizierte Fragment-Längen Polymorphismen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar, base pair
C	Cytosin
C-terminal	Aminosäure mit freier Carboxygruppe (COOH)
CDAD	<i>C. difficile</i> assoziierte Diarrhoe
CDT	binäres Toxin, aktinspezifische ADP-Ribosyltransferase
cdtA/B	kodierender Bereich für binäres <i>C. difficile</i> -Toxin
CLO-Agar	<i>C. difficile</i> -Agar
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTNP	Desoxytrinukleotidphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung g (9,80665 m/s ²)
GTP	Guanidintriphosphat
HMW	high molecular weight, hohes Molekulargewicht

i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
ISR	intergenic spacer region, intergenische Abschnitte der DNA
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
LMW	low molecular weight, niedriges Molekulargewicht
MALDI-TOF ..	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	minimal inhibitory concentration
MLST	Multilocus Sequenztypisierung
MLVA	Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat-Analyse
N-terminal	Aminosäure mit freier Aminogruppe (NH ₂)
NaCl	Natriumchlorid
NAP	North American pulsed field type, North American Pulsfeld Typ
OH-Gruppe ...	Hydroxylgruppe
p.o.	per os
PaLoc	Pathogenitätslocus
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PCR-RT	PCR-Ribotypisierung
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMC	Pseudomembranöse Colitis
R	Adenosin oder Guanin
rDNA	ribosomale DNA
REA	Restriktionsendonuklease-Analyse
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Ribotyp
s-layer	surface layer, Oberflächenproteinschicht
slpA	Oberflächenprotein A, surface layer proteine A

slpAST	surface layer Protein A Sequenztypisierung
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
tcdA - E	Gene von <i>C. difficile</i>
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
Upm	Umdrehungen per Minute
W	Adenosin oder Thymin
Y	Cytosin oder Thymin

Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung der Sequenz eines <i>slpA</i> -Gens (eigenes Isolat, Ausschnitt)	26
2	Clusteranalyse mit Darstellung der Ribotyp-Gruppen	44
3	<i>tcdC</i> -Gen Mutationen bei RT 027 und RT 078	49
4	Anzahl aller charakterisierten Isolate je Untersuchungsmonat	51
5	Kulturell bestätigte CDAD unterteilt in die verschiedenen Ribotypen am UKS pro Quartal im Zeitraum März 2008 bis März 2010	53
6	Isolate anderer saarländischer Krankenhäuser	55

Tabellenverzeichnis

1	Anteil der verschiedenen Ribotypen an allen untersuchten Proben	43
2	Zu Clustern geordnete Stämme	45
3	Antibiotikaempfindlichkeit der verschiedenen Ribotypen	47
4	TcdC-Gen Mutationen der verschiedenen Genotypen	48
5	Schwere Infektionen unter den häufigsten Ribotypen. Anzahl der Fälle und relative Häufigkeit	50
6	Fallzahlen pro Quartal und Ribotyp (2008 - 2010)	52
7	Extern eingesandte RT pro Untersuchungsjahr	54

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) zur Charakterisierung von *Clostridium difficile*

Die *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoe ist eine der häufigsten Ursachen nosokomialer Infektionen. In Deutschland wurden erstmals im Jahr 2007 Erkrankungsfälle mit dem neuen hypervirulenten Stamm Ribotyp 027 (Toxinotyp III, Pulsfeldgelelektrophorese-Muster North American Pulsfeld Typ 1) registriert. Eine genotypische Charakterisierung von *Clostridium difficile* Isolaten wird bislang nur von wenigen hochspezialisierten Laboren durchgeführt. Auf Grundlage dieser Promotionsarbeit wurde die Genotypisierung mithilfe der Sequenzierung des surface layer Protein A-Gens am Universitätsklinikum des Saarlandes etabliert. Im Zeitraum von März 2008 bis März 2010 wurden insgesamt 630 klinische Isolate charakterisiert. Die Technik ermöglichte die eindeutige Differenzierung der neuen hypervirulenten epidemischen Ausbruchsstämme (Ribotypen 027, 001, 078). Auch weniger prävalente und sporadisch auftretende Stämme wurden differenziert. Die Technik erwies sich in der Studie als ein gut standardisierbares und geeignetes Verfahren für die lokale und globale Erregersurveillance und erfüllte alle Anforderungen an eine qualitativ hochwertige Methode. Zusätzlich wurde bei Isolaten bekannter Ausbruchsstämme die Typisierung des tcdC-Gens durchgeführt, sie zeigte das konstante Auftreten der stammspezifischen Mutationen bei Ribotyp 027 und 078, aber auch bei sporadischen Stämmen. Die Resistenztestung gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin ergab die bekannten Resistenzmuster. Retrospektiv wurde der Schweregrad einzelner Fälle anhand der Kriterien des Robert-Koch-Institutes evaluiert. Hierbei wurden schwere Verläufe vor allem bei Patienten im Alter über 65 Jahren und bei Ribotyp 027 gefunden. 57,1% der Verläufe waren unkompliziert. Die Fallzahlen waren insgesamt im Verlauf schwankend, eine tendenzielle Rückläufigkeit war nach anfänglichen Gipfeln im Jahr 2009 mit Beginn des Jahres 2010 zu beobachten. Die Vielfalt sporadischer Stämme nahm zu. Der epidemische Ausbruchsstamm Ribotyp 027 blieb jedoch mit 35,87 % der Fälle konstant der am häufigsten vorkommende Typ, was auf ein endemisches Auftreten in dieser Region hindeutet.

1.2 Summary

Clostridium difficile typing by sequencing of surface layer protein A gene

Clostridium difficile associated diarrhea is one of the most common causes of nosocomial infections. In Germany first infections due to the new hypervirulent strain ribotype 027 (toxintype III, pulsed field gelelectrophoresis type North American pulsed field type 1) were reported in 2007. *Clostridium difficile* genotyping is provided only by specialised laboratories. Based on this study genotyping by sequence analysis of the surface layer protein A gene was established at the University hospital of Saarland. Between March 2008 and March 2010 630 clinical isolates were characterised. It could be differentiated exactly between hypervirulent epidemic strains (ribotype 027, 001 and 078) and more sporadic less prevalent strains. This technique proved to be a suitable screening method for local and global *Clostridium difficile* surveillance. It was good to standardise and showed all characteristics of a high quality method. Additionally, isolates of known outbreak strains were characterised by tcdC gene sequence typing. The typical tcdC gene mutations were shown for ribotype 027 and 078 as well as for sporadic strains. Antibiotic resistance testing to Clarithromycin and Moxifloxacin revealed known resistance patterns. Retrospectively severity of disease was analysed by using criteria from Robert-Koch-Institute. Severe cases were found mainly among patients older than 65 years and infections with ribotype 027. 57,1 % of cases were uncomplicated. Concerning incidence the number of cases fluctuated over the years, a partial decrease was observed in the beginning of 2010. The diversity of strains increased. At least the epidemic outbreak strain ribotype 027 remained the most common type with 35,87 % of cases which indicates endemic occurrence in this region.

2 Einleitung

2.1 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele:

1. Das Verfahren der single locus surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) sollte als standardisierte Routinemethode zur Typisierung von *Clostridium difficile* (*C. difficile*) Isolaten getestet und am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) etabliert werden
2. Es sollte die epidemiologische Situation der *C. difficile* assoziierten Diarrhoe (CDAD) am UKS analysiert werden. Die wichtigsten epidemiologischen Ausbruchsstämme Ribotyp (RT) 027, 078, 001 und zusätzlich sporadisch auftretende Stämme sollten zuverlässig nachgewiesen und in ihrem zeitlichen Verhalten beurteilt werden. Außerdem sollte die Grundlage für epidemiologische Untersuchungen bezüglich der Dynamik und Ausbruchssituationen spezifischer *C. difficile* Stämme am UKS und weiteren Kliniken des Saarlandes geschaffen werden.
3. Für eine umfassende genotypische Analyse der *C. difficile* Stämme sollte zusätzlich die Sequenz des tcdC-Toxinrepressorgens auf bekannte Mutationen als Ursache für erhöhte Virulenz untersucht werden. Die phänotypische Analyse wurde durch Antibiotika-Resistenztestung ergänzt.
4. Bei verfügbaren klinischen Angaben sollten beim untersuchten Patientengut retrospektiv Daten zu spezifischen Charakteristika wie Alter, Geschlecht, Schweregrad der Infektion und Rekurrenz erhoben und Unterschiede bei einzelnen RT erfasst werden.

2.2 *C. difficile*: allgemeine Einteilung und historische Aspekte

C. difficile ist ein anaerobes, grampositives, sporenbildendes und stäbchenförmiges Bakterium. Taxonomisch lässt es sich einordnen in die Abteilung der *Firmicutes*, die Klasse der *Clostridia*, Ordnung der *Clostridiales*, Familie der *Clostridiaceae*, Gattung *Clostridium* und die Art *C. difficile*. Im Jahr 1935 wurde *C. difficile* erstmals aus dem Stuhl gesunder Neugeborener isoliert und erhielt aufgrund der schwierigen Isolierung und Anzucht den Namen *Bacillus difficilis* (Hall, 1935). Im Laufe weiterer Studien konnte die Produktion eines bei Mäusen tödlich wirkenden Toxins nachgewiesen werden, die Toxizität war nur 10 - 100-fach schwächer als die des Botulinum-Toxins (Bartlett, 2008-1). Der Zusammenhang zwischen der schweren antibiotikaassoziierten Diarrhoe (AAD) durch Infektion mit toxinogenen *C. difficile* Stämmen und dem pathologischen Korrelat einer Pseudomembranösen Colitis (PMC) wurde erstmals 1974 hergestellt, als bei Patienten unter Therapie mit Clindamycin gehäuft schwere Durchfallerkrankungen beobachtet wurden (Tedesco, 1974). Ab dem Jahr 2002 kam es in Kanada und den USA zu einem rapiden Anstieg schwerer *C. difficile* Infektionen (Hensgens, 2011), verbunden mit einer höheren Morbidität und Mortalität. Ursächlich war ein neuer hypervirulenter *Clostridien*-Stamm vom RT 027 (Toxinotyp III, North American pulsed field Type NAP 1). Vermutlich durch weitverbreiteten Gebrauch von Fluorchinolonen wurde die Resistenzentwicklung gegen Makrolide und Chinolone begünstigt. Zunehmend breitete sich RT 027 auch in Europa aus (Kuijper, 2008). Der erste Ausbruch mit dem neuen hochvirulenten RT 027 Stamm in Deutschland wurde 2007 in Südwestdeutschland in den Regionen Trier und Stuttgart registriert, hierbei kam es auch zu Todesfällen (Kleinkauf, 2007; Zaiß 2007).

2.3 Virulenzfaktoren

C. difficile besitzt mehrere Virulenzfaktoren, zu denen eine Kapsel, Adhäsine, Fimbrien, Flagellen und proteolytische Enzyme zählen. Der primär wichtigste Pathogenitätsmechanismus ist allerdings die Produktion von Toxin A und B, die Bedeutung des binären Toxins CDT wird noch kontrovers diskutiert. Toxinogene *Clostridien*-Stämme produzieren immer zumindest eines dieser drei oben genannten Toxine (Rupnik, 2005), nicht toxinproduzierende Stämme hingegen sind apathogen. Die Mehrheit der enteropathogenen Stämme produziert sowohl Toxin A als auch Toxin B, wobei beide synergistisch wirken. Allerdings verfügt Toxin B über eine

von Toxin A unabhängige Pathogenität, wie bei isolierten Ausbrüchen nachgewiesen wurde (Kuijper, 2001; Alfa, 2000).

Toxin A und B

Toxin A hat ein Molekulargewicht von 309 kDa, Toxin B von 267 kDa (Viswanathan, 2010). Die hitzelabilen, einkettigen und strukturell sehr ähnlich aufgebauten Toxine besitzen beide eine C-terminale Rezeptorbindungsdomäne, eine zentral liegende hydrophobe Translokationsdomäne zur Insertion des Toxins in Zellmembranen des Endosoms und eine N-terminale katalytische Domäne mit Glykosyltransferase-Aktivität (Kelly, 2008). Nach der Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose des Toxins in die Epithelzellen des Colon, die nachfolgende Reaktionskaskade über Glykolisierung GTP-bindender rho-Proteine im Zytoplasma führt schließlich zur Lyse des Aktinzytoskeletts und zum Zelltod (Kelly, 2008). Da die Toxine über jeweils verschiedene Zellrezeptoren angreifen, wirkt Toxin A als Enterotoxin permeabilitätserhöhend und proinflammatorisch (Mitchell, 1987), Toxin B steigert als Cytotoxin vorwiegend die intestinale Permeabilität durch Apoptose und ist dabei bis zu 10-fach höher toxisch wirksam als Toxin A (Riegler, 1995).

Binäres Toxin

Ein weiteres Toxin, das binäre Toxin CDT, welches bei bis zu 6 % der Stämme auftritt (Barbut, 2005), wird in seiner Funktion als aktinspezifische ADP-Ribosyltransferase als ein möglicher weiterer Virulenzfaktor diskutiert. Die pathophysiologische Bedeutung ist bislang noch nicht hinreichend bewiesen, vermutlich besteht zwischen den drei Toxinen ein synergistischer Wirkmechanismus mit dem Resultat einer höheren Toxinproduktion (McDonald, 2005).

2.4 *C. difficile* assoziierte Diarrhoe

2.4.1 Prävalenz und klinische Bedeutung

Als Sporenbildner kann *C. difficile* widrige Umweltbedingungen überstehen und besiedelt, bedingt durch sein ubiquitäres Vorkommen, den humanen und auch den tierischen Intestinaltrakt. In der gesunden Normalbevölkerung sind 2 - 3 % der Erwachsenen besiedelt, bereits im Darm von Säuglingen und Kleinkindern kann bei bis zu 80 % *C. difficile* (Bartlett, 2002)

nachgewiesen werden. Allerdings bedingen hier die sich noch in Entwicklung befindlichen Toxin-Rezeptorstrukturen der Mucosa zunächst eine reduzierte pathogene Wirkung (Eglow, 1992). Deutlich erhöht ist das Auftreten der Erreger in Krankenhäusern und Pflegeheimen, hier bewegen sich die Kolonisationsraten bei Patienten zwischen 5 - 25 % (Bartlett, 2002). Nach einer abgelaufenen Erkrankung (CDAD) bleibt bei bis zu 40 % der Patienten der Darm dauerhaft besiedelt (McFarland, 1989). Von besonderer Bedeutung für die nosokomiale Verbreitung ist unter anderem die Resistenz gegen zahlreiche Flächen- und Händedesinfektionsmittel. Die Übertragung kann somit leicht aus der kontaminierten Umgebung und über das betreuende Personal betroffener Patienten erfolgen (Hull, 2004; Sunenshine, 2006). Der Übertragungsweg erfolgt exogen fäkal-oral und selten endogen, auch eine Aufnahme durch verunreinigte tierische Produkte ist möglich (Songer, 2005). *C. difficile* ist der häufigste Erreger der nosokomial erworbenen Diarrhoe und insgesamt ursächlich für 15 - 25 % aller Fälle von AAD (Bartlett, 2008-2).

2.4.2 Pathogenese

C. difficile ist ein fakultativ pathogener Darmkeim. Keineswegs alle, sondern nur die Toxinproduzierenden Stämme führen zu einer CDAD. Normalerweise bildet die natürliche Darmflora eine biologische Schutzfunktion gegen die ungehinderte Vermehrung pathogener Keime. Wird diese gestört, beispielsweise durch Antibiotikagabe, resultiert eine Dysbalance. Folge ist einerseits eine Abnahme natürlicher, i.d.R. protektiv wirkender Bakterien und andererseits eine zunehmende bakterielle Fehlbesiedelung, u.a. mit *Candida albicans*, *Klebsiella oxytoca* und *C. difficile* (Schröder, 2006). Aus oral aufgenommenen *Clostridien*-Sporen entwickeln sich bei günstigen Verhältnissen vegetative, vermehrungsfähige Erreger unter Produktion und Sezernierung der Toxine A und B im Lumen des Colon. Es kommt zur Adhäsion an und zur Aufnahme der Toxine in die Epithelzellen der Colonmucosa. Toxinvermittelte Modulationen des Zytoskeletts führen zur Apoptose der Epithelzellen und zusätzlich zum Verlust der interzellulären „tight junctions“, was einen Flüssigkeits- und Proteinverlust und Störungen des Elektrolyttransports zur Folge hat (Poutanen, 2004). Vermittelt durch Zytokine wie Interleukin-8 und Tumor-Nekrosefaktor alpha erfolgt die Aktivierung und Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Monozyten. Die nachfolgende hämorrhagische Entzündungsreaktion geht einher mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität, der Zerstörung der Mucosa und

Sekretion von Mucin und Fibrin (Poutanen, 2004). Die Ansammlung dieser Stoffe, Zelltrümmer und Granulozyten bildet die charakteristischen, endoskopisch und zum Teil auch computertomographisch nachweisbaren Pseudomembranen.

2.4.3 Klinische Symptomatik

Die CDAD manifestiert sich in unterschiedlichen Schweregraden, von leichtem Durchfall bis hin zur maximalen Ausprägungsform mit dem Bild einer fulminanten PMC (Kuijper, 2007). Diese kann in 3 - 5 % der Fälle (Kyne, 1999) letal verlaufen und außerdem mit schweren Komplikationen wie einem paralytischen Ileus, einem toxischen Megacolon, einer Darmperforation oder einer generalisierten Sepsis einhergehen. Die Durchfälle sind in der Regel wässrig bis schleimig-weich, selten blutig und weisen einen charakteristischen fauligen Geruch auf (Bartlett, 2008-2). Allgemeinsymptome wie Abdominalkrämpfe, Unterbauchschmerzen und Fieber können begleitend auftreten.

Die Falldefinition des Robert-Koch-Instituts (RKI) umfasst folgende Kriterien (Nübel, 2009):

1. Durchfall oder toxisches Megacolon und Nachweis von *C. difficile* Toxin A und/oder B oder kultureller Nachweis von toxinproduzierendem *C. difficile* im Stuhl,
2. endoskopisch nachgewiesene PMC,
3. histopathologischer Nachweis von CDAD (mit oder ohne Durchfall) in bei Endoskopie, Colektomie oder Autopsie entnommenen Gewebeproben.

Von einem schweren Fall spricht man bei Vorliegen eines der nachfolgenden Kriterien (Nübel, 2009):

1. Erneute stationäre Aufnahme aufgrund einer rekurrenten Infektion,
2. Verlegung auf eine Intensivstation zur Behandlung der CDAD oder ihrer Komplikationen,
3. Colektomie aufgrund eines Megacolon, einer Perforation oder einer refraktären Colitis,

4. Tod innerhalb weniger als 30 Tagen nach Diagnosestellung und CDAD als Ursache oder zum Tode beitragende Erkrankung.

2.4.4 Risikofaktoren

Als Risikofaktor für die Entwicklung einer CDAD steht vorrangig die Gabe von Antibiotika. Auch wenn grundsätzlich alle Antibiotika in der Lage sind, eine PMC zu induzieren, kann einigen Substanzklassen ein besonders hohes Risikopotential zugeschrieben werden (Cephalosporine, Clindamycin, Fluorchinolone). Bei anderen Stoffgruppen (Cotrimoxazol, Vancomycin) ist das Risiko dagegen eher gering (Owens, 2008). Der Krankenhausaufenthalt per se oder eine Unterbringung in Pflegeheimen erhöht ebenso wie Grund- und Begleiterkrankung und ein Lebensalter >65 Jahre die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung (Loo, 2011). Des Weiteren werden ein niedriger Serum-Immunglobulinspiegel (IgG), die Langzeitgabe von Protonenpumpeninhibitoren und medikamentöse oder krankheitsbedingte Immunsuppression als Risikofaktoren angesehen (Vaishnavi, 2009). Die Bedeutung der Virulenz verschiedener Stämme für die Krankheitsexpression wird gerade in Hinblick auf neue hochvirulente Stämme sehr kontrovers diskutiert.

2.4.5 Komplikationen

Besonders gefürchtete Komplikationen sind die schweren Verlaufsformen mit hoher Morbidität (z.B. Intensivpflichtigkeit, Notwendigkeit von umfassenden Darmoperationen wie Colectomie), Mortalität sowie häufige Rezidive. Die Rückfallquote liegt bei bis zu 20 % aller Patienten nach Absetzen der oralen Therapie mit Vancomycin oder Metronidazol. Die Wahrscheinlichkeit hierfür steigt mit der Anzahl der Rezidive noch weiter an (Kelly, 2008; Schneider, 2007).

Als unabhängige Faktoren für die Vorhersage der Mortalität sind drei Punkte ausschlaggebend (Sailhamer, 2009):

1. Alter über 70 Jahre,
2. schwere Leukozytose oder Leukozytopenie,
3. kardiorespiratorisches Versagen mit Intubation oder Katecholaminpflichtigkeit.

Liegen alle drei Kriterien vor beträgt die Mortalität 57,1 %. Trifft keiner der Punkte auf den Patienten zu, beträgt die Mortalität 0 % (Sailhamer, 2009).

Neben dem Auftreten einer Sepsis mit Multiorganversagen kann auch bei bestimmten Begleiterkrankungen wie ischämischen Herzerkrankungen und renaler Dysfunktion sowie bei Hypoalbuminämie zum Zeitpunkt der Manifestation (Wilson, 2010) mit einem komplizierten Verlauf gerechnet werden. Außerdem sind weitere laborchemische Marker wie Leukozytose (>20,000 Zellen/ml) und ein Creatinin-Anstieg (>2 mg/dl) signifikant mit besonders schwerem Verlauf assoziiert (Henrich, 2009).

2.4.6 Behandlungsoptionen

Therapie der Wahl

Therapie der ersten Wahl ist, nach dem Absetzen der bisherigen Antibiose, die Gabe von Metronidazol in einer Dosierung von 500 mg 3x/Tag per os (p.o.) für 10 - 14 Tage bei milder Ersterkrankung (Cohen, 2010). Bei schwerer Ersterkrankung werden 125 mg Vancomycin 4x/Tag p.o. verabreicht, für gelegentlich empfohlene höhere Dosen von 250 - 500 mg fehlt der Nachweis der klinischen Evidenz (Gonzales, 2010). Im Falle von Komplikationen, welche mit Transportstörungen des Darmes einhergehen, soll mit 500 mg Vancomycin 4x/Tag p.o. oder per Magensonde und zusätzlich 500 mg Metronidazol intravenös (i.v.) alle 8 Stunden therapiert werden (Cohen, 2010). Bei komplettem Ileus oder mutmaßlich unzureichender intestinaler Resorption kann Vancomycin als rektaler Einlauf (500 - 1000 mg in 1000 ml NaCl 0,9 %) verabreicht werden. Therapie der Wahl bei fulminanter schwerster CDAD ist die totale oder subtotale Colectomie. Bei rekurrenten Infektionen wird meist erneut 125 mg Vancomycin p.o. über einen verlängerten Zeitraum in Form eines gepulsten Schemas gegeben. Dieses

könnte folgendermaßen aussehen: 14 Tage 4x/Tag, 7 Tage 2x/Tag, 7 Tage 1x/Tag, danach 8 Tage lang alle 2 Tage 1x (Kelly, 2008), allerdings ohne evidenzbasierte Grundlagen (Van Nood, 2009).

Bezüglich des Anwendens neuer Substanzklassen wurde der Einsatz von Tigecyclin i.v. oder von Daptomycin i.v. beschrieben. Beide Medikamente sind in vitro gegen *C. difficile* wirksam, kontrollierte klinische Studien existieren aber bislang nicht (Shah, 2010; Tyrrell, 2006). Für die Therapie rekurrenter Infektionen stehen mittlerweile zwei neue Stoffe zur Verfügung, Rifaximin ist hierbei v.a. nach vorheriger Vancomycin-Gabe effektiv (Johnson, 2007). Fidaxomicin, ein bakterizid wirkender Stoff, erhielt 2011 auf dem amerikanischen Markt die Zulassung (Tannock, 2010) und gilt als besonders effektiv durch hohe Rückfallprävention und geringe Resistenzinduktion (Lo Vecchio, 2012).

Alternative Therapieoptionen

Alternative Behandlungsmöglichkeiten werden derzeit hinsichtlich des klinischen Nutzens untersucht. Die Gabe von Probiotika (u.a. *Saccharomyces boulardii*) erwies sich bislang als vielversprechend bezüglich der Prävention (McFarland, 2009). Für Immunglobuline und monoklonale Antikörper wurde eine signifikante Reduktion der Rekurrenz gezeigt (Lowy, 2010). Unterstützend bei der Behandlung rezidivierender Infektionen können Tolevamer (Hinkson, 2008) und Cholestyramin (Pollok, 2009) wirken. Für entwickelte Impfstoffe konnte im Tierversuch die Neutralisation von Toxin A belegt werden (Gardiner, 2009).

Eine schon länger bekannte Therapieoption ist die sogenannte Stuhltransplantation. Hierbei wird mikrobiologisch untersuchter und aufbereiteter Stuhl gesunder Spender entweder als rektaler Einlauf (Schwan, 1984) oder über eine nasojejunale Sonde verabreicht. Ziel ist die Wiederherstellung einer protektiven Darmflora. In aktuellen Studien konnte mit diesem Verfahren in bis zu 91 % der Fälle eine schnelle klinische Verbesserung und Heilung erreicht werden (Van Nood, 2009).

2.4.7 Epidemiologie und Auftreten neuer hochvirulenter Stämme

Sowohl die höhere Inzidenz als auch die zunehmende Schwere des Verlaufs der CDAD wird seit 2003 weltweit festgestellt (Barbut, 2007). In Deutschland ergaben Analysen einen Anstieg

der Erkrankung unter stationären Patienten von sieben auf 78 Fälle pro 100.000 in den Jahren 2000 bis 2006 (Nübel, 2009). Als Ursache dieser Zunahme wurde ein neuer epidemischer und besonders virulenter Stamm identifiziert (RT 027). Er produziert alle drei bekannten Toxine und ist gegen zahlreiche Antibiotika, einschließlich Moxifloxacin und Clarithromycin, resistent. Im Vergleich zum historischen *C. difficile* Stamm konnten beim neuen RT 027 verschiedene genetische Merkmale nachgewiesen werden, welche in ihrer Gesamtheit die gesteigerte Toxizität und Virulenz erklären.

2.5 Diagnostik von *C. difficile* Infektionen

2.5.1 Phänotypische Charakterisierung

Die aktuelle Routinediagnostik stützt sich auf Kultur und Toxinnachweis aus verdächtigen Stuhlproben. Die Bedeutung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist noch Gegenstand klinischer Studien.

Kultur

Diagnostischer Goldstandard ist die anaerobe Anzucht. Das Bakterium wird aus frischen Stuhlproben isoliert und auf speziellen Selektivmedien (Cycloserin-Cefoxitin-Fructose-Agar) unter anaeroben Bedingungen angezüchtet. Das typische Wachstum der Kolonien, der spezifische Geruch und der mikroskopische Nachweis erlaubt die phänotypische Bestimmung von *C. difficile*. Die weitere Differenzierung ist mit Bunter Reihe, 16s-rDNA (Desoxyribonukleinsäure) Sequenzierung oder mithilfe der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) möglich. Die Kultur von *C. difficile* ist eine höchst sensitive Nachweismethode (95 %) (Staneck, 1996). Allerdings kann hierbei aufgrund der identischen Morphologie rein vom Aussehen der Bakterienkultur her keine Unterscheidung zwischen toxinogenen und apathogenen Stämmen erfolgen (Schneider, 2007). Dies wird durch den Toxinnachweis in Kultur (toxinogene Kultur) oder durch Nachweis der Toxingene möglich („toxinotyping“) (Rupnik, 2010).

Antigennachweis

Der Zytotoxizitätstest in einer Zellkultur gilt als der Goldstandard des Toxinnachweises. Durch den zytopathischen Effekt vorwiegend von Toxin B wird in verschiedenen Zelllinien (z.B. Vero Zellen) das Zytoskelett geschädigt, es kommt zur Abrundung der Indikatorzellen. Dieses

Phänomen kann im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. Schon sehr geringe Mengen an Toxin in der Größenordnung weniger Picogramm genügen für die Bestätigung. Der Test hat eine Sensitivität und Spezifität von nahezu 100 % (Bartlett, 2008-2). Weniger zeit- und kostenintensiv ist der Nachweis mittels serologischer Verfahren („Enzyme-linked immunosorbent Assay“, ELISA). Hierbei können beide Toxine innerhalb weniger Stunden im nativen Stuhl nachgewiesen werden (Spezifität 95 - 100 %) (Poutanen, 2004), allerdings mit einer geringen Sensitivität (65 - 85 %) (Schröder, 2006).

Ein weiterer Test ist der Nachweis des sogenannten „Common“-Antigens, einer Glutamatdehydrogenase, welche sowohl von toxinogenen als auch von nicht-toxinogenen *C. difficile* Stämmen konstitutiv in nachweisbarer Menge produziert wird (Wilkins, 2003). Eine hohe Sensitivität von nahezu 100 % zeichnet die Methode aus. Dieser Test wird vorwiegend als Screening-Verfahren eingesetzt, da er zwar bei negativem Ergebnis die Infektion mit *C. difficile* ausschließt, im positiven Fall aber lediglich das Vorliegen des Keims und nicht seine Virulenz oder Toxizität anzeigt (Cohen, 2010). Der negative Vorhersagewert beträgt 99 % (Schneider, 2007).

2.5.2 Genotypische Charakterisierung

Bedingt durch fehlende Standardisierung der Nachweismethoden entwickelte sich neben einer uneinheitlichen Nomenklatur eine Vielzahl an regional bevorzugt angewandten Verfahren. Prinzipiell sind alle unter ihnen in der Lage, die epidemisch relevanten Stämme zu typisieren (Killgore, 2008) und Subtypen zu unterscheiden.

Molekularbiologische Typisierungen stützen sich auf den Nachweis spezifischer Genabschnitte mittels der PCR. Wichtige Zielgene für die Typisierung einzelner *Clostridien*-Stämme sind hier zum einen der sogenannte Pathogenitätslocus (PaLoc), zum anderen das Oberflächenprotein A-Gen (slpA-Gen). Im Folgenden sollen die gebräuchlichsten Methoden kurz dargestellt werden.

Elektrophoretische Analyse

Dieser Analyseart liegt die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte und Sichtbarmachung der gewonnenen Fragmente durch gelelektrophoretische Auftrennung zugrunde.

RESTRIKTIONSENDONUKLEASE-ANALYSE (REA)

Beim Verfahren der REA wird die gesamte DNA von *C. difficile* mittels des bakteriellen Restriktionsenzym HindIII (von *Hämophilus influenza*) geschnitten (Peerbooms, 1987). Die entstehenden Fragmente werden per Gelelektrophorese sichtbar gemacht und können anhand des individuellen spezifischen Bandenmusters eines jeden Stammes zu derzeit zehn Gruppen und 27 Subtypen zugeordnet werden (Beispiel: RT 027 entspricht REA-Typ BI). Diese laborintensive Technik gilt als reproduzierbar und höchst diskriminatorisch und wird hauptsächlich in Nordamerika angewandt (Kristjánsson, 1994).

PULSFELDGELELEKTROPHORESE (PFGE)

Eine weitere Technik, welche hauptsächlich in den USA und Kanada angewandt wird, ist die Pulsfeldgelelektrophorese („pulsed field gel electrophoresis“, PFGE). Die Gesamtheit des Genoms wird enzymatisch mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut, die entstehenden großen DNA-Fragmente werden dann in einem wechselnden Spannungsfeld gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch vorzeitige Degradierung der DNA (Klaassen, 2002) können mit dieser Methode aber nicht alle Stämme zuverlässig nachgewiesen werden. Obwohl hoch diskriminativ, ist die Methode zeit- und kostenintensiv (Bidet, 2000).

PCR-RIBOTYPISIERUNG (PCR-RT)

C. difficile besitzt bis zu 15 Kopien des ribosomalen rRNA-Operons, welches Gene für die ribosomale RNA (16s, 23s, 5s) kodiert. Zwischen diesen einzelnen Genen liegen unterschiedlich lange (200 - 600 Basenpaare (bp)), intergenische DNA-Abschnitte, sogenannte „intergenic spacer regions“ (ISR) (Stubbs, 1999). Die Methode des Ribotypisierens vervielfältigt mittels PCR die 16s-23s-ISR. Anhand des individuellen Musters, welches durch unterschiedliche Fragmentlängen bei der elektrophoretischen Auftrennung zustande kommt, erfolgt die Zuordnung zum jeweiligen Bakterienstamm. Es lassen sich derzeit über 200 verschiedene RT unterscheiden, unter anderem die weltweit häufigsten RT 001, 027, 078, 017 und 014 (Tenover, 2011). Die PCR-RT ist ein sehr wichtiges, vor allem in Europa angewandtes Nachweisverfahren.

TOXINOTYPING

Das Toxinotyping beruht auf der Technik der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) mit anschließender PCR und unterscheidet Stämme von *C. difficile* anhand Punktmutationen in den Toxin-Genen *tcdA* und *tcdB* auf dem PaLoc (Rupnik, 2010). Der gesamte PaLoc wird mittels PCR abgelesen und vervielfältigt, ein anschließender Enzymverdau ermöglicht die Unterscheidung hinsichtlich Fragmentlänge und Polymorphismen am Restriktionsort. Toxinotypen sind definiert als Gruppen von Stämmen, welche identische Veränderungen im PaLoc haben. Zurzeit lassen sich 24 unterschiedliche Typen charakterisieren (Typ I - XXIV) (Rupnik, 2008). Je nach Typ werden beide Toxine, nur Toxin A oder kein Toxin produziert. Wichtige Typen sind Typ III - V (Toxin A und B positiv) und Typ 0. Die Methode des Toxinotypings korreliert gut mit Ribotypisierung und REA und wird vorwiegend zur Subtypisierung durchgeführt.

AMPLIFIZIERTE FRAGMENT-LÄNGEN POLYMORPHISMEN (AFLP)

Bei der AFLP verwendete Restriktionsenzyme schneiden die DNA mit überstehenden Enden („sticky ends“). Bei der anschließenden Ligation mit dem jeweiligen Gegenstück der Restriktionsfragmente entstehen Adapter für die Anlagerung der Primer in der nachfolgenden PCR. Mehrere Amplifikationen erzeugen durch die Auswahl selektiver Basen Fragmente, welche in einer gelelektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht und anhand ihres typischen Musters einem Stamm zugeordnet werden können (Mohammadi, 2005).

Sequenzbasierte Analyse

SURFACE LAYER PROTEIN A SEQUENZTYPISIERUNG (SLPAST)

C. difficile besitzt eine kristalline Oberflächenschicht aus zwei Proteinen, die sogenannte „surface-layer“ (s-layer). Die elektronenmikroskopisch sichtbaren Proteine werden vom *slpA*-Gen kodiert. Wird das Gen abgelesen, entsteht als Produkt ein Vorläufer-Protein („precursor“), welches nach Spaltung zwei Peptide ergibt, die dann zu einer Schicht assoziieren. Bislang konnte das Phänomen einer Oberflächenschicht aus zwei Proteinen als Produkt eines einzigen Precursor-Proteins nur bei *C. difficile* nachgewiesen werden (Eidhin, 2006). Das größere Peptid mit einem Molekulargewicht von 48 - 56 kDa („high molecular weight“, HMW) wird vom C-terminalen Ende des Precursors abgelesen und ist genetisch konserviert.

„MULTIPLE-LOCUS VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT“-ANALYSE (MLVA)

Auf den Chromosomen von *C. difficile* kommen sich wiederholende kurze DNA-Abschnitte vor, sogenannte „repeats“ (Van den Berg, 2007). Die MLVA vergleicht an unterschiedlichen Genorten die Anzahl der Wiederholungen in 6 - 7 verschiedenen „repeats“ und analysiert den Verwandtschaftsgrad verschiedener Stämme. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der besonderen Eignung für Ausbruchs-Analysen und epidemiologische Untersuchungen (Marsh, 2006).

MULTILOCUS SEQUENZTYPISIERUNG (MLST)

Die MLST charakterisiert *Clostridien*-Isolate anhand der Sequenzen von sieben nicht regulierten, konstitutiv exprimierten „house-keeping“ Genen (*aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk*, *sodA*) (Lemee, 2004). Interne Fragmente mit einer Größe von 450 - 500 bp eines jeden Gens werden vervielfältigt und analysiert. Jedes „house-keeping“-Gen zeigt unterschiedliche Sequenzen und individuelle Allele und damit ein typisches Profil („sequence type“) eines Stammes (Griffiths, 2010). Anhand dieser MLST-Profile können Isolate einfach via Datenbanken abgeglichen werden.

SUBTYPISIERUNG DURCH SEQUENZIERUNG DES PALOC

Der PaLoc ist ein 19,6 kb umfassender Abschnitt im Genom des Bakteriums, auf welchem die Gene *tcdA* und *tcdB* jeweils die Toxine A und B enkodieren (Warny, 2005). Der Nachweis der *tcdA*- und *tcdB*-Gene aus Stuhlproben ist die Grundlage für die molekulargenetische Diagnostik der *C. difficile* Infektionen. Des Weiteren findet sich im PaLoc das 700 bp umfassende *tcdC*-Gen (Dingle, 2011), ein negatives Regulatorgen, welches die Transkription und damit die Toxinproduktion unterdrückt. Dieses Gen zeichnet sich durch eine Vielzahl an genetischen Polymorphismen aus, bei nicht toxinogenen Stämmen ist der PaLoc nicht nachgewiesen (Cohen, 2000). Das Gen *tcdD* gilt als ein positiver Regulator der Transkription, *tcdE* bedingt die Freisetzung der Toxine aus der Zelle (Kelly, 2008). Eine konstitutionell aktivierte Toxinsynthese ist charakteristisch für *Clostridien*-Stämme mit Mutationen des Suppressorgens *tcdC*. Mutationen im *tcdC*-Gen werden mit besonders virulentem Phänotyp in Verbindung gebracht. Drei unterschiedliche genetische Variationen bzw. Allele des Wildtyps werden dem Typ A, B und C zugeordnet (Spigaglia, 2002). Typ A besitzt eine 39-bp Deletion (Nukleotide 341 - 379),

Typ B und C eine 18-bp Deletion (Nukleotide 330 - 347).

Eine zusätzliche nonsense-Punktmutation (C184T) bei Typ A führt zur Verkürzung des Proteins auf 61 Aminosäuren anstatt 232 (Spigaglia, 2002). Es verliert dadurch seine unterdrückende Funktion und führt zu einer weitaus höheren Expression der Gene und damit der Toxinproduktion, die Zytotoxizität ist *in vitro* 16 - 23-fach erhöht. Bei dem neuen, epidemiologisch relevanten RT 027 führt neben der 18-bp Deletion die weitere Deletion eines einzelnen Basenpaares (single-bp Deletion) zur Bildung eines Stopp-Codons. Eine hieraus resultierende Verkürzung des Proteins auf 22 Aminosäuren bewirkt die Inaktivierung des Repressors und eine signifikant gesteigerte Toxinproduktion (Curry, 2007). Funktionell bedeutsam für die Inaktivierung des *tcdC*-Gens sind jedoch auch weitere Punktmutationen. Bekannt sind bei einigen *C. difficile* Subtypen beispielsweise eine Basenpaardeletion an Position 117, welche durch Verschiebung des Leserasters zu einem Stopp-Codon an Position 196 führt, das *tcdC*-Gen wird von 232 auf 65 Aminosäuren verkürzt (Stabler, 2010). Weitere Punktmutationen sind eine Baseninsertion an Position 212, welche sich aber in einem nicht abgelesenen Abschnitt befindet und zwei Nukleotid-, „nonsense“-Mutationen, welche zur Verkürzung des *tcdC*-Gens auf 63 und 85 Aminosäuren führen (Curry, 2007).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

5-FACH LADEPUFFER: Glycerin 25 ml, 10-fach TBE 50 ml, Aqua dest. 100 ml, Bromphenolblau 0,05 g, Xylen-Zyanol 0,05 g

AQUA DESTILLATA: Wasser zu Injektionszwecken, Reinheit: PCR-grade, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

BRUCELLA-AGAR: enthält Trypton 10 g/l, Peptamin 10 g/l, Dextrose 1 g/l, Hefeextrakt 2 g/l, Natriumchlorid 5 g/l, Natrium-Bisulfit 0,1 g/l, Agar 15 g/l, pH 7,0

BREWER-THIOGLYKOLAT-BOUILLON: enthält Hefeextrakt 5 g/l, pankreatisch abgebautes Casein 15 g/l, wasserfreie Glucose 5 g/l, L-Cystin 0,5 g/l, Natriumchlorid 2,5 g/l, Natriumthioglykolat 0,5 g/l, Resazurin 0,001 g/l, Agar 0,75 g/l, pH 7,1

Clostridium difficile-AGAR (CLO-AGAR): Selektivmedium zur Anzucht von *C. difficile* aus Stuhlproben, enthält tierisches Pepton 21 g/l, Hammelblut 50 ml/l, Cycloserin 0,1 g/l, Cefoxitin 0,008 g/l, Amphotericin B 0,002 g/l, Fa. Biomerieux, Frankreich

DNA MINI KIT QIAMP: für genomische DNA-Präparationen, enthält sterile Spinsäulen und Eppendorfcups, ATL-Puffer (Gewebe Lysis Puffer), Proteinase-K (Degradierung von Histonproteinen und PCR-Inhibitoren), AL-Puffer (Lysis Puffer), AW1 (Waschlösung), AW2 (Waschlösung), Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland

DTNP SET 1: enthält 4 x 25 µmol dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 100 mM, pH 8.4 - 8.6, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

ETHIDIUMBROMIDLÖSUNG: gebrauchsfertig, enthält Ethidiumbromid, 1 %ige Lösung in Wasser (10 mg/ml), Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

ETHANOL (96-100 %): Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar

EXOSAP-IT: enthält die Enzyme Exonuclease I und Shrimps Alkalische Phosphatase, USB, usb Europe GmbH, Staufeu, Deutschland

MOLEKULARGEWICHTSMARKER: Gel-Pilot 1kb Plus Ladder (100), Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland

NATRIUMCHLORID (0,9 %): physiologische Kochsalzlösung, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

PRIMER: synthetisiert von Fa. biomers, Ulm, Deutschland

- slpAcom 19 forward (5'-GTT GGG AGG AAT TTA AGR ATG-3')
- slpAcom 20 reverse (5'-GCW GTY TCT ATT CTA TCD TYW-3')
- C1CDIFF forward (5'-TTA ATT AAT TTT CTC TAC AGC TAT CC-3')
- C2CDIFF long reverse (5'-TCT AAT AAA AAG GAG ATT GTA TTA T-3')

QA AGAROSE TM: Polysaccharide, MW > 120 000 Dalton, molecular biology grade, Fa. MP biomedical, Illkirch, Frankreich

QIAGEN TAQ DNA POLYMERASE KIT: 100 x 250 units Taq DNA Polymerase, 10x PCR Buffer, 10x CoralLoad PCR Buffer, 5x Q-Solution, 25 mM MgCl₂ (gebrauchsfertig), Fa. Qiagen, Hilden Deutschland

TBE-PUFFER (TRIS-BORAT-EDTA-PUFFER): enthält Borsäure 55,03 g/l (0,89 M), EDTA-Na₂H₂O 7,44 g/l (0,02 M), Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan, 107,81 g/l (0,89 M), 10-fach konzentrierte wässrige Lösung, für Mischung im Verhältnis 1:10 100ml TBE-Puffer zu 900 ml Aqua destillata geben, Fa. Applichem, Dornstadt, Deutschland

3.1.2 VIDAS® *C. difficile* Toxin A&B (CDAB)

Das Testsystem enthält folgende Materialien und Reagenzien:

HARDWARE: analytisches Modul, Computer und Drucker

CDAB REAGENZIENRIEGEL: gebrauchsfertig, enthält Probenküvetten, Waschlösung (TRIS Puffer 0,05 mol/l, Detergenz und Konservierungsmittel), Konjugat (Biotin-markierter monoklonaler *C. difficile* Anti-Toxin A und B Antikörper der Maus), Marker (mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin und TRIS-Puffer 0,05 mol/l), Messküvette mit Substrat (4-Methyl-umbelliferyl-Phosphat 0,6 mmol/l, Diethanolamin DEA 0,62 mol/l, Natriumazid 1 g/l)

FESTPHASENREZEPTOR: gebrauchsfertige polyklonale *C. difficile* Anti-Toxin A Antikörper des Kaninchens und monoklonale *C. difficile* Anti-Toxin B Antikörper der Maus

STANDARD: rekombinantes *C. difficile* Toxin A, verdünnt in TRIS Puffer 0,05 mol/l

TOXIN A POSITIVKONTROLLE: rekombinantes *C. difficile* Toxin A, verdünnt in TRIS Puffer 0,05 mol/l
Negativkontrolle: TRIS-Puffer 0,05 mol/l und BSA 5 %

3.1.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

BRUTSCHRANK: Brutschrank vom Typ Heraeus B5050E, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 18.03.2008)

CLUSTALW: ClustalW Multiple Sequence Alignment, <http://www.clustal.org>, 18.03.2008

EPPENDORF SAFELOCK TUBES: 1,5 ml, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland

GELELEKTROPHORESEKAMMER: Typ Sub-Cell GT-System, und Typ Bio-Rad Power Pac

1000, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

GENBAG MICROAER: Beutel zur Erzeugung eines anaeroben Milieus zur Kultivierung anaerober Mikroorganismen, Fa. bioMérieux, Frankreich

MIKRO-SCHRAUBRÖHRE: 1,5 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

MIKROWELLE: Fa. Elektrolux Haushaltsgeräte, Vertriebs GmbH, Nürnberg, Deutschland

PARAFILM CT 06836, Fa. American National Can, Greenwich, USA

PCR-GEFÄSSE: 0,2 ml, dünnwandig, Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland

PIPETTEN: Eppendorf Reference, 0,1-2,5, 0,2-10, 2-20, 10-100, 50-200, 100-1000µl, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling, Deutschland

TRANSILLUMINATOR: Reichelt Chemietechnik GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland

THERMOCYCLER: Typ Biometra T-Gradient 48, Fa. Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland

THERMOMIXER: Typ Comfort von Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

VORTEXER: Typ Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA

WAAGE: Typ Mettler P160N, Mettler-Toledo GmbH, Schweiz

ZENTRIFUGE: Typ Himac CT 15 E von Hitachi, VWZ International bvba, Leuven, Belgien

3.1.4 *C. difficile* Referenzstämme

Insgesamt 77 Referenzstämme unterschiedlicher RT wurden uns vom RKI Wernigerode zur Verfügung gestellt und zur Bestätigung unserer Ergebnisse herangezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Toxinnachweis direkt aus der nativen Stuhlprobe - Toxin A/B Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein diagnostischer Schnelltest ist der Nachweis von Toxin A und Toxin B mittels ELISA (VIDAS Antigen-Testsystem VIDAS® *C. difficile* Toxin A&B von bioMérieux, Frankreich), der nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

Es wird hierzu 200 µl flüssiger Stuhl mit 1000 µl Probendiluent (R1) zusammengegeben und bis zur vollständigen Homogenisierung der Suspension auf einem Vortexer gemischt. Bei Stuhlproben festerer Konsistenz wird das Volumen mit einem 200 µl Aqua destillata enthaltenden Referenzröhrchen verglichen. Die homogene Suspension wird fünf Minuten bei mindestens 12 000 g zentrifugiert, die Temperatur der Probe soll hierbei zwischen zwei und 25 °C betragen. 300 µl des Probenüberstandes werden in die Probenküvetten der Reagenzienriegel pipettiert, alle weiteren Schritte werden automatisch vom Gerät durchgeführt.

Die in der Probe potentiell vorhandenen Toxine binden spezifisch an polyklonale (ein Gemisch aus Antikörpern verschiedener B-Zellen) Anti-Toxin A Antikörper vom Kaninchen und monoklonale (Klone einer einzelnen B-Zelle) Anti-Toxin B Antikörper der Maus. Die Antikörper sind an einen Festphasenrezeptor gebunden und mit Biotin markiert. Bei vorhandenen Toxinen erfolgt die Bindung an die jeweiligen spezifischen Antikörper unter Ausbildung eines Komplexes. Die Inkubation mit dem bakteriellen, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Protein Streptavidin dient dem Nachweis der Anwesenheit von Biotin. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse des Substrats, woraus ein bei einer Wellenlänge von 450 nm messbar fluoreszierendes Produkt entsteht. Die Höhe dieses Signals korreliert mit der enthaltenen Menge an Toxin in der Probe. Als Ergebnis dient ein Testwert, der aus dem Quotienten der jeweiligen relativen Fluoreszenzwerte (Patientenserum und Standard-Messung) berechnet und nach folgendem Schema interpretiert wird: Testwert <0,13 Ergebnis negativ, kein Toxin, Testwert >0,13 bis <0,37 Ergebnis zweifelhaft und Testwert >0,37 Ergebnis positiv, Toxin vorhanden.

Im Falle eines negativen Ergebnisses im VIDAS®*C. difficile* Toxin A&B Antigen-ELISA wird die Stuhlprobe zunächst in eine Brewer-Thioglykolat-Bouillon inokuliert und 48 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Dieses Verfahren dient der spezifischen Anreicherung der potentiell vorhandenen *Clostridien*. Aus der angereicherten Bouillon werden 200 µl mit NaCl vermischt, um eine Trübung nach McFarland Standard 1,0 zu erreichen und dann erneut wie die ursprüngliche Stuhlprobe in das VIDAS® *C. difficile* Toxin A&B Testsystem eingesetzt. Zeigt sich auch hier ein negatives Ergebnis, gilt die Probe als negativ. Bei einem positiven Ergebnis wird das Isolat weiter nach oben aufgeführtem Schema bearbeitet.

3.2.2 Anaerobe Anzucht

Hierfür wird das Bakterium aus frischen Stuhlproben kulturell angezchtet und isoliert. Dazu entnimmt man mit einer sterilen Einmal-Impföse mindestens 1 ml der flüssigen Stuhlprobe und beimpft Petrischalen mit Selektivnährböden mittels 3-Ösen-Ausstrich. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im anaeroben Milieu bei 37 °C zeigen sich zwei bis fünf mm große, matt grau-weiße und unregelmäßig begrenzte Kolonien ohne Hämolyse-Saum. Eine gelb-grüne Fluoreszenz kann bei einer Wellenlänge von 365 nm nachgewiesen werden. Ein weiteres Charakteristikum ist der typische pferdedungartige Geruch der Bakterienkolonien (Delmée, 2001).

Bei untypischem Wachstum der Kolonien und Unsicherheit in der Bewertung wird ein Gram-Präparat angefertigt. Hierzu bringt man einige Bakterienkolonien auf einen Objektträger in einige Tropfen Aqua destillata ein und färbt diese zunächst für 30 Sekunden mit Kristallviolett. Anschließend folgt die einminütige Beizung mit Lugolscher Lösung (Jod-Kalium-Lösung). Das Präparat wird dann durch tropfenweises Hinzufügen von Alkohol differenziert, danach mit ausreichend Wasser gespült und sodann 30 Sekunden lang mit Safranin gefärbt. Nach weiterer Spülung mit Wasser und anschließender Trocknung kann der Objektträger unter dem Mikroskop begutachtet werden. Bei Vorliegen von *C. difficile* in Reinkultur sind blau-violett gefärbte, grampositive Stäbchen mit subterminalen, ovalen Endosporen sichtbar.

Isolate mit positivem Kulturnachweis wurden zur DNA-Isolierung und Genotypisierung in das hausinterne PCR-Labor geschickt.

3.2.3 Antibiotika-Resistenztestung

Zur quantitativen Darstellung der antibiotischen Empfindlichkeit einzelner klinischer *C. difficile* Isolate wurde der E-Test (AB Biodisk, Solna, Schweden) verwendet. Ein vordefinierter antibiotischer Gradient auf den Teststreifen dient der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK, „minimal inhibitory concentration“, MIC) in mg/l, also derjenigen Menge an Antibiotikum, welche in ihrer geringsten Konzentration fähig ist, das Wachstum des Bakteriums zu hemmen. Die MHK wird am Schnittpunkt des Bakterienrasens mit dem E-Test-Streifen abgelesen.

Zunächst werden die Stuhlproben in ein Röhrchen mit Brewer-Bouillon inokuliert und für 48 Stunden bei 37 °C anaerob inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Bakteriensuspension entnommen und nach Herstellung und Vergleich mit einer McFarland-Trübungsreihe auf einen McFarland Standard von 1,0 in NaCl verdünnt. Ein steriler Wattetupfer wird in diese Suspension getaucht, danach beimpft man hiermit eine Brucella-Agar-Platte drei Mal vollständig mittels konfluentem Ausstrich. Nach vollständiger Trocknung der Platte wird ein E-Test-Streifen für Moxifloxacin und ein Streifen für Clarithromycin aufgebracht und die Platte danach unter den oben genannten Bedingungen drei Tage bebrütet.

Nach Ablauf dieser Zeit kann der sichtbare Bakterienrasen und der ellipsenförmig ungewachsene Saum um den Antibiotikum-Streifen beurteilt werden. Der MHK-Wert wird an der Schnittstelle zwischen Streifen und Hemmellipse auf der Skala abgelesen. Im Falle eines MHK-Wertes unter 0,5 mg/l können die Isolate als empfindlich gegenüber dem Antibiotikum eingestuft werden.

3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf der Vervielfältigung bestimmter genau definierter DNA-Abschnitte einer Länge von bis zu 4 kb. In dieser Studie wurden die Genabschnitte für das *slpA*-Gen und das *tcdC*-Gen mit PCR aus Kulturisolaten amplifiziert.

Isolierung der DNA

C. difficile positive Stuhlproben wurden mit dem QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen aufgereinigt. Hierzu werden ein bis zwei Bakterienkolonien in 180 µl ATL-Puffer aufgelöst und 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Die Mischung wird bei 56 °C mindestens eine Stunde inkubiert.

Nach einer kurzen Zentrifugation werden 200 µl AL-Puffer hinzugefügt und die Mischung 10 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Nach erneutem kurzem Zentrifugieren erfolgt die Zugabe von 200 µl 96 - 100 %igem Ethanol, nach Pipettieren in eine QIAamp Spinsäule wird diese dann für eine Minute bei 6000 g (8400 Upm) zentrifugiert.

Das Zentrifugat wird verworfen und die Spinsäule in ein neues Tube gestellt. Auf das Hinzufügen von 500 µl AW1-Puffer folgt eine Minute Zentrifugation bei 6000 g (8400 Upm). Nach erneutem Verwerfen des Zentrifugats und Verbringen der Spinsäule in ein neues Tube werden 500 µl AW2 Puffer hinzugegeben und drei Minuten bei maximaler Umdrehung (13000 Upm) zentrifugiert. Um sämtliche Alkoholreste aus der Säule zu entfernen, wird die Spinsäule vor dem Umsetzen in das letzte Tube kräftig geschüttelt, nach Zufügen von 200 µl AE-Puffer eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach ein letztes Mal bei 6000 g (8400 Upm) zentrifugiert. Das Zentrifugat enthält nach diesen Schritten die hochreine DNA zum Einsatz in die PCR.

PCR des Pathogenitätslocus (PaLoc)

Für die Vervielfältigung des Zielgens *tcdC* werden die Primer C1CDiff mit der Nukleotidsequenz 5'-TTA ATT AAT TTT CTC TAC AGC TAT CC-3' in Vorwärtsrichtung und C2CDiff-long mit der Basenabfolge 5'-TCT AAT AAA AAG GAG ATT GTA TTA T-3' in Rückwärtsrichtung verwendet (Spigaglia, 2002).

Auf eine Denaturierung von 10 Minuten Dauer bei 95 °C folgen 40 Zyklen mit Einzelschritten von jeweils einer Minute bei 95 °C, danach bei 50 °C und zuletzt bei 72 °C. Die anschließende 10-minütige Annealing-Phase wird bei 72 °C durchgeführt.

PCR des surface layer Protein A-Gens (slpA)

Die Primer *slpAcom 19 forward* (5'-GTT GGG AGG AAT TTA AGR ATG-3') und *slpAcom 20 reverse* (5'-GCW GTY TCT ATT CTA TCD TYW-3') dienen der Replikation des surface layer Protein A-Gens (Kato, 2005). Die PCR startet mit einer Denaturierungsphase von 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 95 °C, einer Minute bei 54,8 °C und zwei Minuten bei 72 °C. Als Abschluss erfolgt wiederum ein Annealing bei 72 °C für die Dauer von 10 Minuten.

PCR-Ansatz

Das Reaktionsgemisch für die PCR wird zusammengesetzt aus 5 µl hochreiner, isolierter Proben-DNA, 5 µl 10-fach-PCR-Puffer, 10 µl Q-Lösung und 2,25 µl Nukleotidgemisch (dNTPs). Die dNTPs werden zum Gebrauch vorbereitet aus je 50 µl dATP, 50 µl dCTP, 50 µl dTTP und 50 µl dGTP vermischt mit 800 µl Wasser und aliquotiert à 50 µl. Des Weiteren fügt man jeweils 0,5 µl Start- und End-Primer, 26,45 µl PCR-Wasser und 0,3 µl Taq-Polymerase auf Eis gekühlt als letztes Reagenz hinzu. Jeweils 50 µl dieses Ansatzes werden in die Reaktionsgefäße pipettiert und dann zur PCR in den Thermocycler gestellt.

3.2.5 Nachweis von PCR-Produkten mit Agarose-Gelelektrophorese

Zur Sichtbarmachung der amplifizierten DNA-Fragmente werden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Auf diesem findet eine gelelektrophoretische Auftrennung nach Molmasse statt.

Das 1%ige Agarosegel wird wie folgt hergestellt. 1,5 g Agarose werden mit 150 ml TBE-Puffer gemischt und bei 100 °C in der Mikrowelle bis zur vollständigen Homogenisierung aufgekocht, fehlendes Volumen wird durch Zugabe von Aqua destillata ersetzt. Nach anschließender Abkühlung auf 40 - 50 °C und Zugabe von 18 µl Ethidiumbromid als Fluoreszenzmarker wird die gesamte Mischung in eine waagrecht fixierte Gelhalterung gegossen und die Kämme für die benötigte Anzahl an Geltaschen eingesetzt.

Nach Festwerden des Gels setzt man die Halterung in die Elektrophoresekammer, dabei wird das Gel von TBE-Puffer vollständig bedeckt. Jeweils 10 µl PCR-Produkt werden mit 2 µl Laufpuffer („loading buffer“) gemischt und in die Taschen pipettiert. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der Probe und färbt sie an. Nach einer Laufzeit von 30 Minuten bei 150 Volt wird das Gel auf dem Transilluminator fotografiert. Ein zusätzlich auf das Gel pipettierter Größenmarker erlaubt das Einordnen der Bandengröße.

3.2.6 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte werden die Amplifikate enzymatisch mit ExoSAP aufgereinigt, um unerwünschte Interferenzen mit freien Nukleotiden und ungenutzten Primern zu vermeiden. Hierzu pipettiert man 5 µl Amplifikat mit 2 µl ExoSAP auf Eis in ein Eppendorff-

Gefäß. Anschließend erfolgt die Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C, die Enzyme Exonuclease I und Shrimp alkalische Phosphatase entfernen überschüssige dNTPs und Primer von den PCR-Produkten. Direkt danach wird das Gefäß zur Inaktivierung der Enzyme für weitere 15 Minuten bei 80 °C inkubiert. Bis zum Versand werden die Produkte bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurden für das externe Labor die jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer im Verhältnis 1 : 9 verdünnt und mitversandt.

Die in der PCR vervielfältigten und anschließend dephosphorylierten Genabschnitte wurden als Serviceleistung in einem externen Labor (4base Lab, Reutlingen) sequenziert. Ihre Basenabfolge wird dort nach der Didesoxymethode von Sanger abgelesen. Hierbei führt der Einbau von ddNTPs (Didesoxyribonukleotidtriphosphate) im Rahmen einer Sequenz-PCR zum Abbruch der Polymerisationsreaktion, da diese sogenannten Kettenabbruch-ddNTPs keine 3'-Hydroxylgruppe besitzen. Eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase ist nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenzen unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Das Chromatogramm, d.h. die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Die Sequenzierungsergebnisse werden als Datei im FASTA-Format übermittelt.

3.2.7 Sequenzanalyse

Der Abgleich der Sequenzen mit internationalen Datenbanken wurde mittels „BLAST“ durchgeführt. Dieses Programm vergleicht eingegebene Sequenzen mit internationalen Datenbanken und Servern und berechnet die Übereinstimmung. Der Grad der Ähnlichkeit und die Qualität des Suchergebnisses werden durch bestimmte Parameter festgelegt. Der E-Wert („E-value“) ist ein Indikator der statistischen Signifikanz. Je kleiner dieser Wert ist, desto signifikanter ist das Ergebnis. Ein E-Wert von 0,05 beispielsweise bedeutet, dass die Ähnlichkeit mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 : 100 nur durch Zufall aufgetreten ist. Die Höhe des „Bit-

Scores“ korreliert mit der Qualität des Abgleichs. Die Höhe der gefundenen Übereinstimmung wird mit dem maximalen Identitäts-Wert („maximal identity“) in Prozent angegeben.

Die Gen-Sequenzen im FASTA-Dateiformat wurden in das „BLAST search tool“ eingesetzt und mit Datenbanksequenzen der höchsten maximalen Übereinstimmung verglichen (i.d.R. 98 - 100 % Identität).

4 Ergebnisse

4.1 Surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST)

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Etablierung der surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) zur Typisierung von *C. difficile* am UKS.

Hierzu analysierten wir 77 Kontroll- und Referenzstämme, welche uns vom RKI in Wernigerode zur Verfügung gestellt wurden und eigene Isolate von Patienten mit bekanntem RT. Die Ergebnisse bestätigen die Eignung des Verfahrens der slpA-Sequenztypisierung als eine gut anwendbare, reproduzierbare und zuverlässige Typisierungsmethode von *C. difficile* für die Routinediagnostik.

Die Übersicht der nachgewiesenen Stämme zeigt, dass alle hochvirulenten und die weltweit häufigsten Ausbruchsstämme unter unseren Isolaten eindeutig identifiziert werden konnten, darunter die epidemischen *C. difficile* Ausbruchsstämme RT 027, 078 und 001. Auch seltene, bislang nur sporadisch oder geographisch begrenzt aufgetretene Stämme, wie der japanische Ausbruchsstamm smz, konnten wir mit großer Zuverlässigkeit bestimmen. Eine geringe Anzahl an Isolaten konnte in unserer Studie noch keinem bestimmten Typ zugeordnet werden, da internationale Vergleichsdaten dazu bislang noch fehlen.

4.2 Charakteristik der Proben

Über einen Zeitraum von 2 Jahren, vom 17. März 2008 bis 18. März 2010, untersuchten wir am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKS Stuhlproben von Patienten. Bei diesen bestand der klinisch begründete Verdacht auf eine CDAD, z.B. aufgrund bestimmter Symptome wie schwere wässrige Durchfälle oder vorangegangene Antibiotikatherapie mit Substanzen erhöhten Risikos.

Im oben genannten Zeitraum erhielten wir 630 Stuhlproben. Diese stammten von insgesamt 491 Patienten. Von 92 dieser Patienten erhielten wir im Verlaufe ihres Klinikaufenthaltes mehrere Proben, nämlich jeweils zwei bis sieben.

540 Stuhlproben stammten aus dem UKS in Homburg. 366 Isolate stammten von internistischen, 77 von chirurgischen Stationen, 30 aus der Klinik für Neurologie und Psychiatrie. 18

Proben stammten aus der Kinderklinik, 12 aus der Urologie, 11 aus der Radiologie, 10 aus der Orthopädie, sieben Proben aus der Gynäkologie, drei aus der Dermatologie, zwei aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und eine Probe wurde aus der Pathologie eingesandt. Auch Kliniken aus dem übrigen Bundesland Saarland sandten 90 Stuhlproben von 80 Patienten, welche an schweren Durchfällen litten, zur Untersuchung ein. Dazu zählten die Bliestalkliniken in Blieskastel, das DRK Krankenhaus in Saarlouis, die Knappschaftskrankenhäuser Püttlingen und Sulzbach, das städtische Krankenhaus Neunkirchen, das Marienkrankenhaus St. Wendel und das Caritas-Krankenhaus Dillingen.

4.3 Nachgewiesene Genotypen (slpAST)

Durch den Abgleich der Gensequenzen unserer klinischen Isolate mit internationalen Datenbanken wurden die einzelnen Proben bekannten RT zugeordnet. Falls einer Sequenz kein RT zugeschrieben werden konnte, wurden Übereinstimmungen in anderen Charakterisierungsmerkmalen, wie Ähnlichkeit mit einer bestimmten Serogruppe oder mit einem slpA-Typ, für die Typisierung gewählt. Die überwiegende Mehrheit der Fälle (605 Proben, 96,03 %) konnte mit maximaler Identität von 98 - 100 % im „BLAST“ wenigstens einem der oben genannten Merkmale zugeordnet werden. In 14 Fällen war die Sequenz keinem international bekannten RT oder einem weiteren Identifikationsmerkmal zuzuordnen. Diese Proben wurden von uns aufgrund fehlender Sequenzdaten bzw. -homologien als nicht definiert bezeichnet. Elf Proben waren wegen vorzeitiger DNA-Degradierung nicht mehr auswertbar.

Basierend auf hohen Sequenzübereinstimmungen wurden einzelne RT zu Gruppen zusammengefasst (RT 014/066, RT 012/046/092, RT 031/094). Bekannte RT konnten wir bei verwandtschaftlicher Nähe literaturgestützt geeigneten slpA-Typen bzw. einer Serogruppe zuordnen (Stubbs, 1999; Kato, 2010).

Tabelle 1 zeigt die in 630 Patientenproben nachgewiesenen RT, slpA-Typen und Serogruppen. Die typischen, weltweit prävalenten Ausbruchsstämme (RT 027, RT 001, RT 078) waren eindeutig differenzierbar und stellten in einem hohen Prozentsatz die Genotypen in unserem Patientenkollektiv dar.

Es wurden bei 35,87 % RT 027 (slpA-Typ gc8), bei 23,01 % RT 001 (slpA-Typ gr/okz, Serogruppe G) und bei 12,22 % RT 014/066 (slpA-Typ gc0636/hr, Serogruppe H), gefolgt von RT 078 (4,92 %) identifiziert.

Seltenerer Typen waren mit RT 031/094 (slpA-Typ y32/nt0442) zu 3,80 %, RT 002 (slpA-Typ Yok) zu 3,49 %, RT 010 (Serogruppe D) zu 2,85 %, slpA-Typ smz zu 1,90 %, Serogruppe I zu 1,42 %, RT gc0577 (Serogruppe X) zu 1,26 % und RT 012/046/092 (slpA-Typ km0429/g9376) zu 1,11%, vertreten.

Des Weiteren fanden sich in 0,95 % RT og39 und in 0,79 % Serogruppe B. Zu je 0,63% lag RT 017 (slpA-Typ hr02, Serogruppe F), RT y02 und Serogruppe A vor. Jeweils eine Patientenprobe (0,15 %) gehörte zu den RT 053, 079 und y52.

2,22 %, also 14 Proben, zeigten einen unbekanntem Typ zu dem noch keine Sequenzhomologien existieren. 1,74 % aller Proben waren, wie oben erwähnt, nicht zu analysieren und wurden deswegen als nicht auswertbar bezeichnet.

Tab. 1: Anteil der verschiedenen Ribotypen an allen untersuchten Proben

Ribotyp	slpA-Sequenztyp, Serogruppe	Anzahl (n)	Prozent (%)
027	gc8	226	35,87
001	gr/okz/Sero G	145	23,01
014/066	gc0636/ /hr, Sero H	77	12,22
078	<i>nicht definiert</i>	31	4,92
031/094	y32/nt0442	24	3,80
002	Yok	22	3,49
010	Sero D	18	2,85
smz	smz	12	1,90
<i>nicht definiert</i>	Sero I	9	1,42
gc0577	Sero X	8	1,26
012/046/092	km0429/g9376	7	1,11
og39	og39	6	0,95
<i>nicht definiert</i>	Sero B	5	0,79
017	hr02/Sero F	4	0,63
<i>nicht definiert</i>	Sero A	4	0,63
y02	<i>nicht definiert</i>	4	0,63
079	<i>nicht definiert</i>	1	0,15
053	<i>nicht definiert</i>	1	0,15
y52	<i>nicht definiert</i>	1	0,15
Keine Homologie		14	2,22
Nicht auswertbar		11	1,74
gesamt		630	100

4.3.1 Verwandtschaft und Clusterzuordnung

Die Verwandtschaft der verschiedenen *Clostridien*-Stämme, die sich hinsichtlich ihres Genoms teils nur sehr gering unterscheiden und ähnliche Eigenschaften beispielsweise bezüglich der Virulenz besitzen, wurde durch Sequenzvergleich des *slpA*-Gens untersucht. Zur deutlicheren Darstellung des Verwandtschaftsgrades und der Analyse der Cluster erstellten wir ein Cladogramm nach Art eines phylogenetischen Baumes (Abbildung 2).

Jeder Schnittpunkt oder Knoten repräsentiert hier einen nächsten gemeinsamen Verwandten. Der Baum wurde anhand der Analyse des sequenzierten Genabschnitts des *slpA*-Gens mit „BLAST“ und „ClustalW“ konstruiert und macht die verwandtschaftliche Nähe einzelner RT, *slpA*-Typen oder Serogruppen sichtbar.

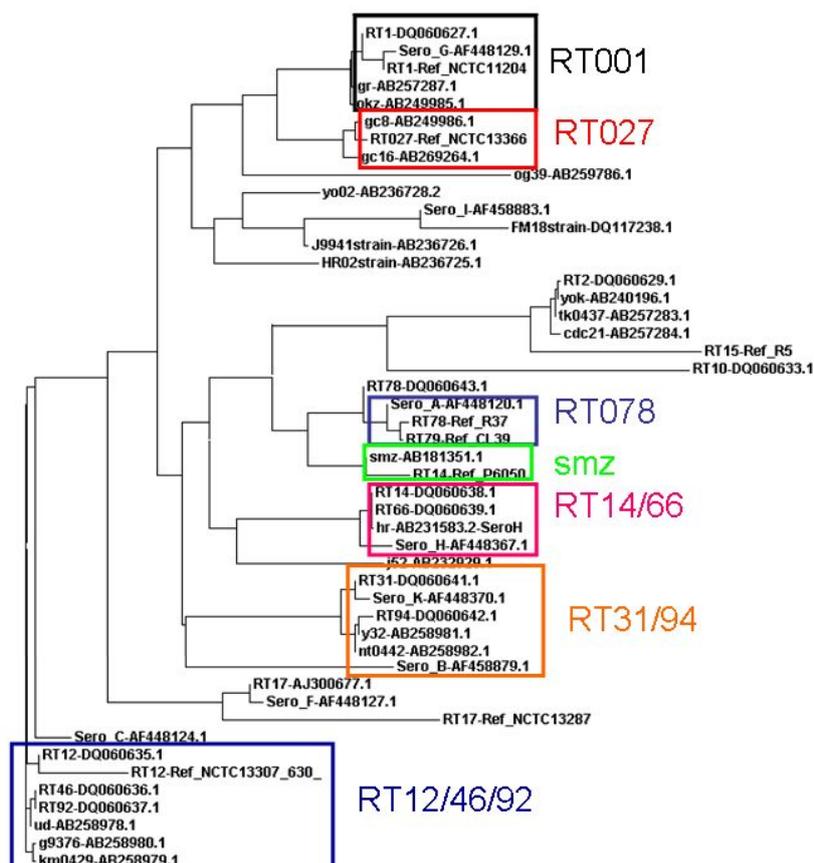


Abb. 2: Clusteranalyse mit Darstellung der Ribotyp-Gruppen

Genotypen mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. Resistenzen, Epidemiologie) ordneten wir zu noch umfassenderen Clustern (Tabelle 2).

Tab. 2: Zu Clustern geordnete Stämme

Cluster	Ribotyp/slpA-Sequenztyp
I	RT 001,027,031/094, Sero B
II	RT 002,010,015,014/066,078,079
III	og39,y02, Sero I
IV	übrige

Cluster I beinhaltet demnach RT 001, 027, 031/094 und Serogruppe B. Zu Cluster II gehören RT 002, 010, 014/066, 015, 078 und 079. Cluster III umfasst Serogruppe I sowie die slpA-Typen og39 und y02. Zu Cluster IV gehören alle übrigen sporadisch vorkommenden Ribo- und slpA-Typen und Serogruppen.

4.4 Subgruppen-Analyse

Bei einem Teil der Proben führten wir zusätzliche Untersuchungen durch. Diese Subgruppen-Analyse sollte zum einen zeigen, ob sich die im Saarland untersuchten Stämme in bestimmten Merkmalen von internationalen Stämmen unterscheiden und zum anderen die Zugehörigkeit unserer Isolate zu einem Stamm anhand anderer bekannter phäno- und genotypischer Merkmale verifizieren.

Mit zunehmender Etablierung unserer Methode war die Charakterisierung der Isolate anhand eines Merkmals (slpAST) zuverlässig und eindeutig, so dass wir auf zusätzliche Untersuchungsmethoden verzichten konnten.

4.4.1 Antibiotikaresistenz

320 der eingesandten Isolate wurden zur phänotypischen Charakterisierung hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz gegenüber Moxifloxacin und Clarithromycin untersucht. Tabelle 3 zeigt die Resistenzprofile der untersuchten Stämme.

RT 027 war ähnlich wie RT 001 i.d.R. in nahezu 100 % der Fälle resistent gegenüber beiden Antibiotika (Moxifloxacin 97 %, Clarithromycin 95 %). RT 001 zeigte eine Resistenz von 93 % gegen Moxifloxacin und 88 % gegen Clarithromycin. Bei RT 078 lag ein gemischtes Resistenzprofil vor, er war sensibel gegenüber Moxifloxacin (64 %) und resistent gegenüber Clarithromycin (72 %). Der japanische Ausbruchsstamm RT smz wies eine Resistenz von 10 % gegen Moxifloxacin und 20 % gegen Clarithromycin auf.

Tab. 3: Antibiotikaempfindlichkeit der verschiedenen Ribotypen

RT	Anzahl (n)	Moxifloxacin resistent (%)	Clarithromycin resistent (%)
027	144	97	95
001	81	93	88
014/066	27	0	0
078	11	36	72
002	11	0	0
031/094	11	0	0
smz	10	10	20
Sero I	7	29	29
y02	5	0	20
og39	3	0	0
012	2	0	50
017	2	0	0
Sero B	2	100	0
079	1	100	100
053	1	0	0
gc0577	1	0	0
010	1	0	100

4.4.2 TcdC-Gen Mutationen

Bei 262 Isolaten unterschiedlicher RT wurde die Amplifizierung und anschließende Sequenzanalyse des tcdC-Gens durchgeführt. Tabelle 4 bildet die anteilige Häufigkeit einzelner Mutationen und den prozentualen Anteil der jeweiligen Deletionen bei den untersuchten Stämmen ab.

Tab. 4: TcdC-Gen Mutationen der verschiedenen Genotypen

Ribotyp	Anzahl (n)	$\Delta 18$ bp (%)	$\Delta 39$ bp (%)
027	132	100	0
001	75	0	0
014/066	27	0	0
002	11	0	0
078	9	0	100
031/094	8	0	0

Für die Ausbruchsstämme RT 027 und RT 078 konnten die typischen Mutationen des tcdC-Gens nachgewiesen werden. Bei den RT 027 Stämmen war in 100 % der untersuchten Isolate die bekannte 18-bp umfassende Deletion zu finden. Gleichzeitig wurde hier das Auftreten einer 1-bp Deletion an Position 117 beobachtet, aus der sich ein Stopp-Codon ergibt. Ein Isolat vom Typ og39 zeigte diese 18-bp Deletion ebenfalls. RT 078 wies in 100 % der untersuchten Isolate die bekannte 39-bp umfassende Deletion in Kombination mit einer Punktmutation an Position 184 auf. Dieselbe Mutation konnte bei einem untersuchten Isolat der Serogruppe I gefunden werden.

Bei den übrigen untersuchten Stämmen unterschiedlicher RT (RT 001, 002, 014/066 und 031/094) wurden bezüglich des tcdC-Gens ausschließlich Wildtypsequenzen ohne Mutationen nachgewiesen. Abbildung 3 zeigt die oben beschriebenen Mutationen in den Sequenzen eines internationalen Referenzstammes (VPI10463) und zweier eigener Isolate vom RT 027 und 078.

	101	RT027 STOP		150
VPI10463	TACNGGCATT	TATTTTAGGC	GTGTTTTTTG	GCAATATATC CTCACCAGCT
RT027	TACNGGCATT	TATTTT_GGT	GTGTTTTTTG	GCAATATATC CTCACCAGCT
RT078	TACNGGCATT	TATTTTTGGT	GTGTTTTTTG	GCAATATATC CTCACCAGCT
	151		RT078 STOP	200
VPI10463	TGTTCTGGAAG	ACCATGAGGA	GGTCATTTCT	AACCAACAT CAGTTATAGA
RT027	TGTTCTGGAAG	ACCATGAGGA	GGTCATTTCT	AATCAAACAT CAGTTATAGA
RT078	TGTTCTGGAAG	ACCATGAGGA	GGTCATTTCT	AATTAACAT CAGTTATAGA
	201			250
VPI10463	TTCTCAAAAA	ACAGAAATAG	AAACTTTAAA	TAGCAATTTG TCTGATGCTG
RT027	TTCTCAAAAA	ACAGAAATAG	AAACTTTAAA	TAGCAATTTG TCTGATGCTG
RT078	TTCTCAAAAA	ACAGAAATAG	AAACTTTAAA	TAGCAATTTG TCTGATGCTG
	251			300
VPI10463	AACCATGGT	CAAAATGAAA	GACGACGAAA	AGAAAGCTAT TGAAGCTGAA
RT027	AACCATGGT	CAAAATGAAA	GACGACGAAA	AGAAAGCTAT TGAAGCTGAA
RT078	AACCATGGT	CAAAATGAAA	GACGACGAAA	AGAAAGCTAT TGAAGCTGAA
	301			350
VPI10463	AATCAACGTA	AAGCTGAAGA	AGCTAAAAAA	GCTGAAGAA GCTAAAAAGGC
RT027	AATCAACGTA	AAGCTGAAGA	AGCTAAAAAAGGC
RT078	AATCAACGTA	AAGCTGAAGA	AGCTAAAAAG	GCT.....
	351			400
VPI10463	TGAAGAACAA	CGCAAAAAAG	AAGAAGAGGA	GAGAAAGGA TATGATACTG
RT027	TGAAGAACAA	CGTAAAAAAG	AAGAAGAGGA	GAGAAAGGA TATGATACTG
RT078GAAGAAGA	GAGAAAGGA TATGATACTG

Abb. 3: tcdC-Gen Mutationen bei RT 027 und RT 078

4.5 Patientencharakteristik

Das Durchschnittsalter der 491 untersuchten Patienten lag bei 66,7 Jahren. Der jüngste Erkrankte war drei Monate alt (Infektion mit RT gc0577), der älteste Patient war im Alter von 96,4 Jahren (RT 027). Das Durchschnittsalter bei Infektionen mit RT 027 betrug 68,6 Jahre (Minimum 17,7; Maximum 96,4 Jahre), bei RT 001 lag es bei 67,9 Jahren (Minimum 1,0; Maximum 95,7 Jahre) und bei RT 078 71,8 Jahre (Minimum 40,5; Maximum 92,9 Jahre). Das durchschnittliche Alter bei den anderen RT war 66,6 (Minimum 1,2; Maximum 86,9 Jahre, in beiden Fällen Infektionen mit RT 014/066).

Unter den insgesamt 491 untersuchten Patienten waren 246 Frauen und 245 Männer. Eine geschlechtsspezifische Präferenz der Erkrankung konnte damit nicht nachgewiesen werden.

Klinische Daten über den Krankheitsverlauf waren zum Zeitpunkt der Studie noch nicht für alle Patienten zu erhalten. Wir analysierten retrospektiv bei 224 der untersuchten Patienten den

Schweregrad der Erkrankung anhand der vier Kriterien Rezidiv, Notwendigkeit der Operation (Colektomie), Behandlung auf Intensivstation und Tod (Tabelle 5).

Bei 43 mit RT 027 erkrankten Patienten kam es zu schweren Verläufen (neun Patienten auf Intensivstation, Rezidiv bei 24 Patienten, zehn Patienten im Zuge der Infektion verstorben). Von den 65 mit RT 001 infizierten Patienten verstarben zwei an den Folgen, acht wurden auf einer Intensivstation behandelt, 17 erkrankten rezidivierend. Drei von neun Patienten mit RT 078 verstarben, einer erlitt ein Rezidiv. Von den 25 mit RT 014/066 infizierten Patienten verstarb einer, einmal wurde eine Colektomie durchgeführt, drei Patienten wurden intensivmedizinisch behandelt und vier hatten ein Rezidiv. Intensivmedizinisch betreut werden musste auch jeweils ein Patient mit RT 002 und 053, sowie zwei Patienten mit RT 031/94 und ein Patient mit einer nicht auswertbaren Probe. Dieser wurde nach einem Rezidiv auch colektomiert. In der Gruppe RT smz kam es bei zwei Patienten zu einem Rezidiv, wie auch bei zwei Patienten mit RT 002 und einem mit RT 010. Insgesamt gesehen überwogen jedoch bei allen retrospektiv untersuchten Patienten die unkomplizierten Verläufe (57,1 %).

Tab. 5: Schwere Infektionen unter den häufigsten Ribotypen. Anzahl der Fälle und relative Häufigkeit

	Alle	RT 001	RT 027	Andere
	n (%)			
Patienten	224 (100)	65 (29)	77 (34,4)	82 (36,6)
Intensivstation	25 (11,1)	8 (12,3)	9 (11,6)	8 (9,8)
Colektomie	2 (0,9)	0 (0)	0 (0)	2 (1,2)
Rezidiv	52 (23,2)	17 (26,2)	24 (31,2)	11 (13,4)
Exitus letalis	17 (7,5)	2 (3,1)	10 (12,9)	5 (6,1)
unkomplizierter Verlauf	128 (57,1)	38 (58,5)	34 (44,2)	56 (68,3)

4.6 Epidemiologie im zeitlichen Verlauf

4.6.1 Fallzahlen im zeitlichen Verlauf

Mithilfe der spAST konnte die zeitliche epidemiologische Entwicklung der Krankheitsausbrüche am UKS charakterisiert werden.

Im Jahr 2008 wurden am UKS 213 Isolate untersucht, im Jahr 2009 270 und im ersten Quartal 2010 57. Die Zahlen der charakterisierten Proben schwanken im gesamten Untersuchungszeitraum deutlich (Abb. 4). Gipfel sind zu erkennen in den Monaten Juni 2008 (28 Fälle), November 2008 (38 Fälle) und April 2009 (35 Fälle). Tiefpunkte zeigen sich im August 2008 (11 Fälle) sowie im Juli und Oktober 2009 (8 bzw. 9 Fälle). Konstant hohe Zahlen finden sich, abgesehen von August 2008, zwischen Juni 2008 und Juni 2009. Die Fallzahlen in den einzelnen Monaten lagen im Mittelwert bei 21,6 Fällen pro Monat (Minimum 8, Maximum 38).

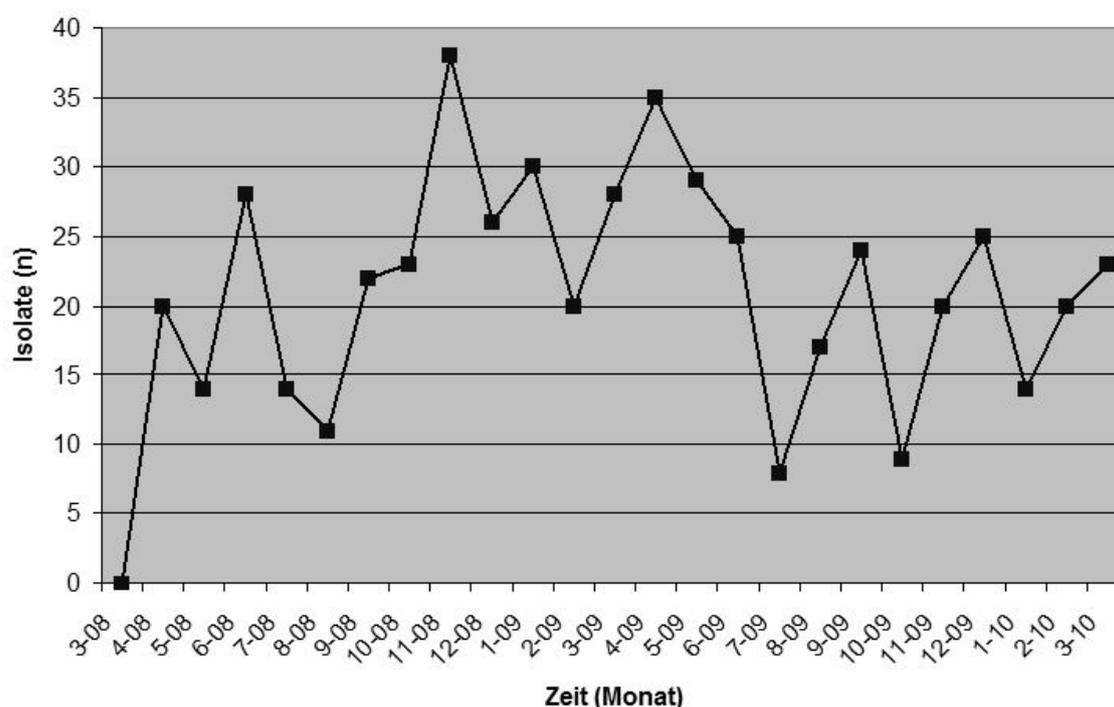


Abb. 4: Anzahl aller charakterisierten Isolate je Untersuchungsmonat

4.6.2 Ribotypen im zeitlichen Verlauf

Tabelle 6 zeigt die Fallzahlen bezogen auf einzelne nachgewiesene Genotypen. Der Trend der Infektionen mit RT 027 war im Jahr 2008 bis zum 2. Quartal 2009 zunehmend (von 7 auf 12 - 34 Fälle), und sank ab dem 2. Quartal 2009 wieder (10 - 11 Fälle). Insgesamt gesehen kam RT 027 im Untersuchungszeitraum als dominierender Typ am UKS zu 31,7 % vor.

Die Zahlen von RT 001 verhielten sich ähnlich wie RT 027: im 2. Quartal 2009 kam es zum Anstieg (von 7 auf 16 - 31 Fälle), dann zum Absinken ab dem 3. Quartal 2009 (5 - 8 Fälle), das Gesamtvorkommen lag bei 23,01 %. RT 014/066 war im letzten Quartal 2008 sowie im ersten und letzten Quartal 2009 am häufigsten vertreten (11 - 13 Fälle), dazwischen kam es zu 5 - 8 Erkrankungen mit diesem Typ. Von Infektionen mit RT 078 lagen ein bis vier klinische Isolate vor. Auffallend war die tendenzielle Zunahme der Vielfalt anderer und sporadischer RT (031/094, 002, 010, smz, gc0577, 012/046/092, og39, 017, y02, 079, 053, y52, Sero A, B und I). Hiervon verzeichneten wir ab dem Quartal 1 / 2009 bis zu 22 Fälle.

Tab. 6: Fallzahlen pro Quartal und Ribotyp (2008 - 2010)

	Q1/08	Q2/08	Q3/08	Q4/08	Q1/09	Q2/09	Q3/09	Q4/09	Q1/10
RT 027	7	22	12	33	34	31	10	11	11
RT 001	7	20	18	16	17	31	8	8	5
RT 014/066	0	5	7	12	11	8	6	7	13
RT 078	1	1	1	4	3	3	4	3	4
sporadisch	0	9	7	20	13	13	20	22	17
nicht auswertbar/nicht definiert	2	5	2	2	0	3	1	3	7
gesamt	17	62	47	87	78	89	49	54	57

Abbildung 5 verdeutlicht graphisch den Anteil der häufigsten RT aller am UKS untersuchten Isolate je Quartal des Untersuchungszeitraumes. Die oben erwähnten Gipfel (06/08, 11/08 und 04/09) und Tiefpunkte (08/08 und 10/09) sind auch hier klar zu erkennen.

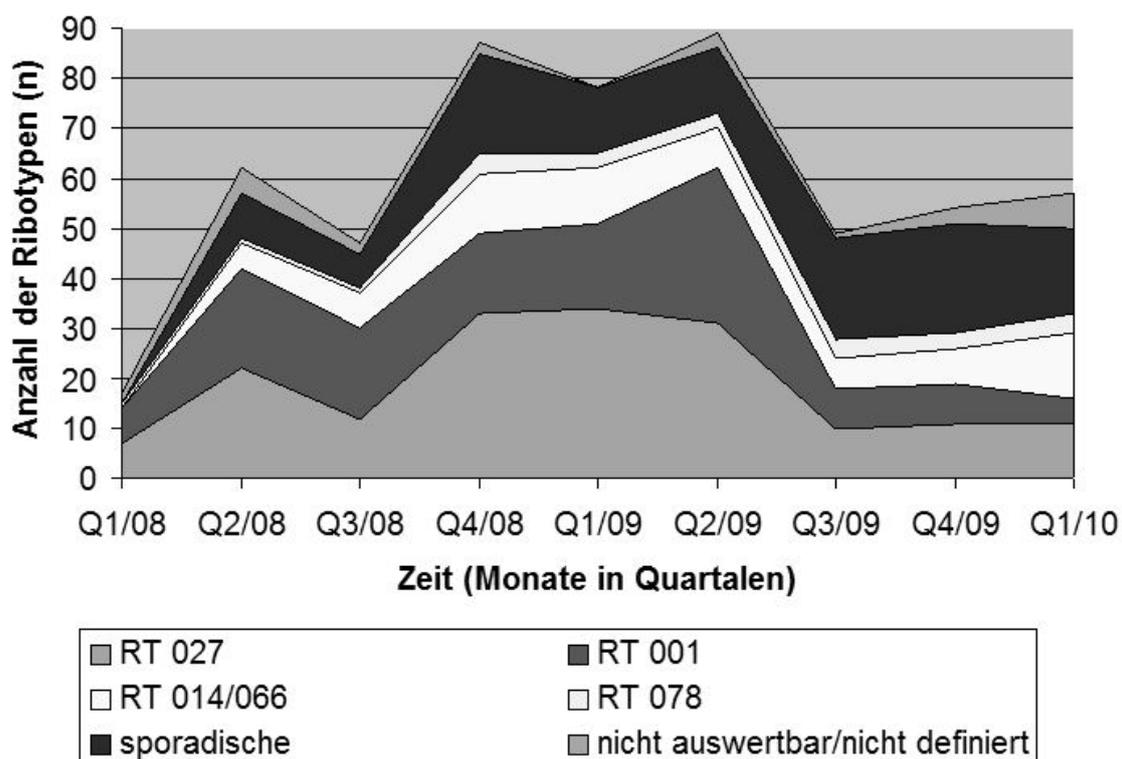


Abb. 5: Kulturell bestätigte CDAD unterteilt in die verschiedenen Ribotypen am UKS pro Quartal im Zeitraum März 2008 bis März 2010

4.7 Externe Einsendungen

Von weiteren saarländischen Krankenhäusern wurden vom 17. März 2008 bis 18. März 2010 90 Isolate an das Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am UKS zur Typisierung eingesandt. Die Patienten litten nach klinischen Angaben überwiegend an schweren oder rezidivierenden *C. difficile* Infektionen. Tabelle 7 stellt die Fallzahlen einzelner RT pro Untersuchungsjahr dar.

Tab. 7: Extern eingesandte RT pro Untersuchungsjahr

Externe RT	2008	2009	2010
027	41	11	2
001	6	6	2
014/066	4	4	0
078	1	3	0
sporadisch	4	5	1
gesamt	56	29	5

Der prozentual am häufigsten vertretene Stamm unter den untersuchten Isolaten war RT 027 (60 %), gefolgt von RT 001 (15,6 %) und RT 014/066 (8,9 %). Sporadische RT (RT yok/002, og39, 010, 012/046/092, Sero I, Sero B) kamen mit je ein bis zwei Isolaten zu insgesamt 11,1 % vor. RT 078 war in vier Fällen (4,4 %) nachweisbar, ein Isolat zeigte einen unbekanntem, nicht definierten Typ. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der neue RT 027 Ausbruchsstamm auch in den anderen saarländischen Kliniken mehrheitlich für CDAD verantwortlich war.

Die Genotypen und ihre prozentuale Verteilung waren denen des UKS in Homburg ähnlich (Abbildung 6). Insgesamt nahmen die Fallzahlen der auswärtigen Kliniken kontinuierlich ab, im Jahr 2008 wurden 56 Patientenproben untersucht, im Folgejahr 2009 29 und im Jahr 2010 nur noch fünf.

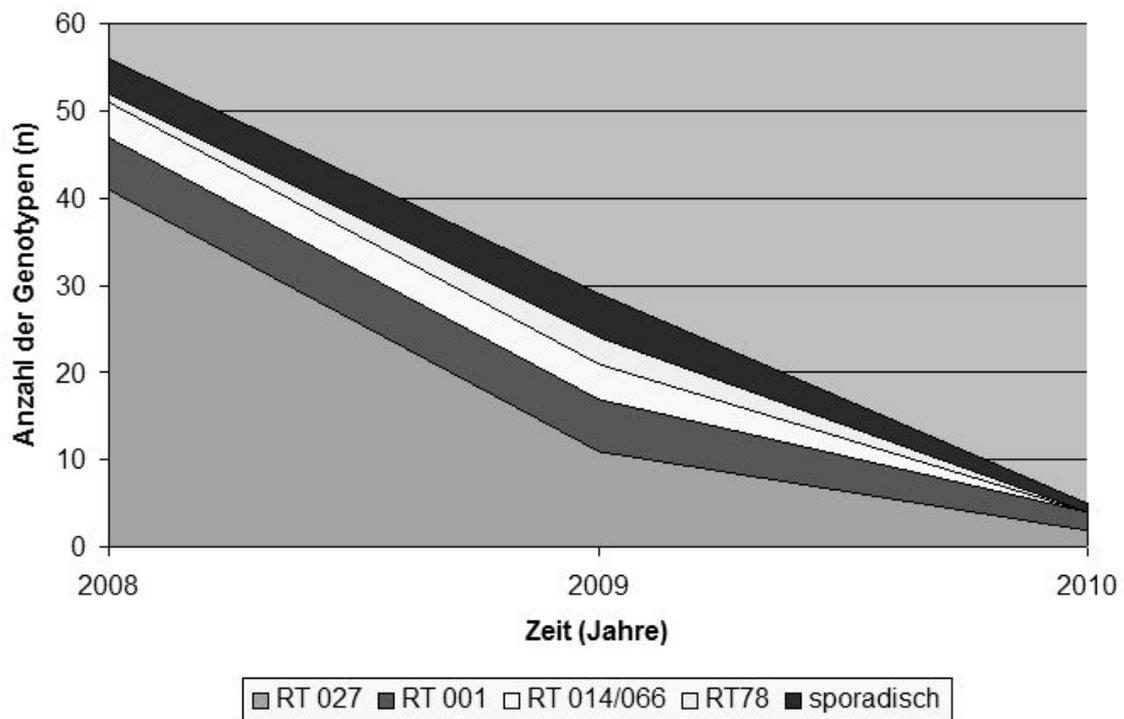


Abb. 6: Isolate anderer saarländischer Krankenhäuser

5 Diskussion

5.1 Surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) als Nachweismethode in der *C. difficile* Routinediagnostik

Internationale Methoden zur Typisierung von klinischen *C. difficile* Isolaten sind uneinheitlich und werden bislang nur von wenigen spezialisierten Laboren angewandt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde am UKS die Methode der surface layer Protein A Sequenztypisierung (slpAST) zur Typisierung von *C. difficile* etabliert. Es wurde ein genotypisches Verfahren gewählt, welches in der täglichen Routinediagnostik standardisiert angewandt werden konnte und Vorteile gegenüber phänotypischen und anderen genotypischen Verfahren bot. Vor allem konnten die international geforderten Qualitätskriterien für ein geeignetes Nachweisverfahren anhand dieser Studie für slpAST belegt werden.

Weltweit existiert eine Vielzahl an Methoden zur Charakterisierung von *C. difficile*. Mit Beginn der Zunahme an CDAD wurden vor allem phänotypische Methoden wie Antibiogramme und Cytotoxizitäts-Tests angewandt (Brazier, 2001). Diese wurden jedoch bald um genotypische Verfahren ergänzt, einerseits aufgrund einer geringeren Zeit- und Arbeitsintensität, andererseits wegen der deutlich sensitiveren Art der Einteilung und Unterscheidung verschiedener Stämme (Diskrimination). Heute gelten molekulare Methoden wie die slpAST wegen ihrer umfassenderen Typisierungsfähigkeit, welche vor allem an der Zahl der differenzierten Subtypen gemessen wird, als die den phänotypischen überlegenen Testverfahren (Brazier, 2001). Jede einzelne Methode hat spezifische Vor- und Nachteile, grundsätzlich können jedoch als Gütekriterien einer qualitativ hochwertigen Methode folgende definierte Eigenschaften verwendet werden (Struelens, 1998; Kristjansson, 1994):

1. Wiederholbarkeit der Ergebnisse unter gleichen Bedingungen (Reproduzierbarkeit),
2. Typisierbarkeit im Sinne des Differenzierungspotentials hinsichtlich einzelner Typen und Subtypen,
3. Stabilität der Ergebnisse,
4. Diskriminierungsfähigkeit bzw. Trennschärfe und Konkordanz zur Epidemiologie des Erregers und bezüglich der Ergebnisse anderer Untersuchungen.

Außerdem sollten technische Vorteile wie gut standardisierbare Handhabung des Tests, geringe Kosten im Vergleich zu anderen Methoden und die Möglichkeit eines hohen Datenumsatzes gegeben sein.

In internationalen Studien wurde das Verfahren der slpAST bei anderen Bakterien mit einer s-layer ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Bei der Identifikation und Subtypisierung von *Campylobacter fetus*, *Lactobacillus helveticus* und *Streptokokken* der Gruppe A (Karjalainen, 2002) erwies sich slpAST anderen Methoden gegenüber als überlegen. Auch bei der Differenzierung von *Staphylococcus aureus* wird die Sequenzierung eines polymorphen Gens („single locus sequence typing“), des Protein A-Gens (spa), zur Typisierung von *Staphylococcus aureus* Stämmen routinemäßig im Rahmen von internationalen Studien angewandt („spa-typing“) (Strommenger, 2008).

Den sequenzbasierten Methoden werden im Allgemeinen die Vorteile einer einfachen Normierung und des zuverlässigen Erzielens gleicher Ergebnisse bei unterschiedlichen Anwendern zugeschrieben. Die Materialien sind gebrauchsfertig zu erhalten und verursachen im Vergleich zu anderen Methoden geringere Kosten (Karjalainen, 2002).

In einer internationalen Vergleichsstudie von sieben häufig verwendeten Nachweisverfahren für *C. difficile* (REA, PFGE, PCR-RT, MLST, MLVA, AFLP und slpAST) von Killgore (Killgore, 2008) wurde die Typisierbarkeit, die Unterscheidungsfähigkeit sowie der Nutzen der Techniken für epidemiologische Untersuchungen miteinander verglichen. SlpAST war hier in der Lage, alle Isolate zu charakterisieren sowie Ausbruchsstämme in einzelnen Institutionen zuverlässig herauszufiltern. In der Studie wurde den verschiedenen Methoden jeweils ein Zah-

lenwert (Diskriminationsindex D) als Maß für die Genauigkeit der Unterscheidung zugeordnet. Je höher dieser Wert ist, desto genauer kann die Methode einzelne Typen differenzieren.

SlpAST wies einen hohen Index auf und lag vor der Ribotypisierung (0,8 vs. 0,7).

In der vorliegenden Studie konnten alle hochvirulenten und weltweit häufigsten Ausbruchsstämme (RT 027, RT 078 und RT 001) eindeutig unter den Isolaten identifiziert werden. Darüber hinaus wurden seltenere, bislang nur sporadisch oder geographisch begrenzt aufgetretene Stämme wie der japanische Ausbruchsstamm smz zuverlässig nachgewiesen. Auch die von Killgore (Killgore, 2008) geforderte Fähigkeit der genotypischen Nachweisverfahren zum Clustern von Isolaten mit ähnlichen Eigenschaften wie Antibiotika-Resistenz, epidemiologischem Verhalten oder Höhe der Toxin-Produktion zu Gruppen und dem Ausschluss davon abweichender Isolate war mittels slpAST problemlos durchzuführen.

Kato beschrieb, dass für globale epidemiologische Untersuchungen einerseits ein Vergleich der sequenzierten Stämme miteinander unerlässlich ist (Kato, 2005) und andererseits, dass sich slpAST aufgrund der leichten Transferierbarkeit von Resultaten für multizentrische epidemiologische Untersuchungen eignet (Kato, 2009). Eine akkurate Typisierung ist essentiell für das Verständnis der sich ändernden Epidemiologie von *C. difficile* (Tenover, 2011).

Besonders zuverlässig gelingt diese dann, wenn Ergebnisse nicht auf unterschiedlichen Bandenmustern beruhen. Die visuelle Auswertung bei Techniken solcher Art ist nur bedingt standardisierbar. Daraus resultiert eine geringere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Northey, 2005). Mit slpAST können Genabschnitte anhand ihrer spezifischen Basenabfolgen miteinander verglichen und geringste Unterschiede im Genom genau beschrieben und lokalisiert werden. Die einzigartige Sequenz eines Isolats kann eindeutig einem bestimmten Typ zugeordnet werden, wie es in der aktuellen Arbeit in 96,03 % der Fälle gelang. Sequenzierungsdaten können, in ständig aktualisierten und wachsenden Datenbanken abgelegt, von mehreren Untersuchern selbst bei Anwendung verschiedener PCR-Profile und Sequenzierungstechniken miteinander abgeglichen und analysiert werden. Der oftmals nötige Austausch von Referenzstämmen wird somit hinfällig.

Auch Killgore beschrieb, dass im Gegensatz zu slpAST bei Verfahren wie PCR-RT, REA oder PFGE die Ergebnisse auf Unterschieden in Länge und Intensität von Bandenmustern, welche bei Elektrophorese mit Agarose- oder Acrylamidgelen entstehen, beruhen (Killgore, 2008). Direkte Vergleiche dieser Muster können im Grunde nur erfolgen, wenn sie auf einem gemeinsamen Gel aufgetragen werden, was bei mehreren Anwendern nicht durchführbar ist. Mit Verfahren wie der international immer noch vielfach angewandten PCR-RT und PFGE können einige Stämme nicht ausreichend differenziert werden, was insbesondere die Unterscheidung zwischen epidemiologischen und sporadischen Stämmen erschwert (Bidet, 2000). Aufgrund dieses Sachverhalts fällt die Eignung für epidemiologische Untersuchungen geringer aus (Marsh, 2010).

Die Ergebnisse einer Studie von Kato, wonach slpAST eine reproduzierbare, verlässliche und sensitive Methode ist (Kato, 2005), stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Das hierbei getestete Verfahren erwies sich als sicher anwendbar. Mithilfe der slpAST konnten alle vorkommenden Genotypen am UKS eindeutig nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden alle geforderten Kriterien eines leistungsfähigen Nachweisverfahrens erfüllt. Aufgrund der Restriktion von Typisierungsmethoden war diese Art der Analyse bislang lediglich an einigen wenigen Speziallaboratorien und nicht flächendeckend möglich. Wegen der zuverlässigen Ergebnisse der Studie konnte slpAST erstmals als Routinemethode am neuen Konsiliarlabor für *C. difficile* des UKS in Homburg etabliert werden. Die gut standardisierten Techniken und die kommerziell erhältlichen Reagenzien ermöglichen jedem molekularbiologischen Labor die Anwendung in der *C. difficile* Diagnostik.

5.2 Nachgewiesene Genotypen am UKS

Der erste Ausbruch von Infektionen mit RT 027 in Deutschland nahm im Jahr 2007 seinen Ausgang in Trier, Rheinland-Pfalz (Kleinkauf, 2007). Seit 2008 ist die Zunahme von CDAD, verursacht durch den hypervirulenten epidemischen Ausbruchsstamm RT 027, auch am UKS zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt waren deutschlandweit kaum epidemiologische Daten zu *C. difficile* verfügbar.

In der vorliegenden Studie wurden 630 klinische Isolate analysiert. 605 Isolate (96,03 %) konnten mit slpAST eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden, für 14 Isolate (2,22 %) lag

noch keine internationale Datenbanksequenz vor, in 11 Fällen (1,74 %) waren die Proben nicht auswertbar. Die häufigsten Genotypen am UKS waren im gesamten Untersuchungszeitraum in absteigender Reihenfolge RT 027 (35,87 %), RT 001 (23,01 %), RT 014/066 (12,22 %) und RT 078 (4,92 %). Der weltweit neue, hochvirulente Epidemiestamm RT 027 war somit der häufigste Verursacher schwerer CDAD am UKS.

Im Vergleich der Ergebnisse mit internationalen Daten fällt zum einen auf, dass die Verhältnisse am UKS mit Zahlen aus den USA und Kanada übereinstimmen. Nach Freeman ist RT 027 dort mit 80 % der vorherrschende Typ (Freeman, 2010). Auch in England liegt dieser RT mit insgesamt 41 % an der Spitze der vorkommenden Genotypen (Brazier, 2008).

Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie der „European *Clostridium difficile* Infection survey Study Group“ (ECDIS) im Jahr 2008 in 34 europäischen Ländern RT 027 nur zu 5 % gefunden, die häufigsten Typen waren RT 014 (15 %), RT 001 (10 %) und RT 078 (8 %) (Bauer, 2011). Auch eine Studie von Hensgens (Hensgens, 2009) zeigt Unterschiede zu unseren Daten. Er beschreibt für das Jahr 2009 in den Niederlanden einen Anstieg von RT 001 auf 27,5 %, eine Abnahme der Zahl an RT 027 auf 3 % und die europaweite Zunahme an Infektionen mit RT 001 und 078.

Betrachtet man allein die Situation in Deutschland, so konnte Zaiß (Zaiß, 2010) zeigen, dass RT 001 im gesamten Land auftrat. Das Vorkommen von RT 027 hingegen war regional streng begrenzt auf den Südwesten Deutschlands. Des Weiteren lag die deutschlandweite Häufigkeit von RT 001 bei 47 %, von RT 078 und RT 027 bei je 8 %. Die Situation am UKS deckt sich hier eindeutig mit der in Deutschland. RT 027 ist als konstant dominierender RT im Saarland, zumindest in Teilen, endemisch.

Ursachen dafür, warum und unter welchen Voraussetzungen sich ein RT weltweit ausbreitet, teilweise von anderen RT verdrängt wird und längerfristig in einem Gebiet endemisch bleibt, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt. Sicherlich spielen aber Selektionsvorteile aufgrund von Multiresistenzen eine tragende Rolle.

Bestimmte RT finden an verschiedenen Orten unterschiedliche Umweltbedingungen vor, welchen sie sich entweder besonders gut anpassen oder unter denen sie sich nicht dauerhaft vermehren können und von anpassungsfähigeren Stämmen verdrängt werden. RT 001 kann sich geographisch verbreiten, während RT 027 vor allem in Südwestdeutschland endemisch

scheint. Ein vorherrschendes antibiotisches Therapierregime, der allgemeine Einsatz und das Verordnungsverhalten von Antibiotika sowie Hygienemaßnahmen vor Ort in einer Ausbruchssituation sind entscheidende Faktoren.

Weiter sind verschiedene äußere Umstände wie beispielsweise Bevölkerungsstruktur und Morbidität der Einwohner als Einfluss denkbar. Ein anderer Grund könnte auch die vor Ort bestehende medizinische Infrastruktur sein. Erfolgt in deren Rahmen eine konsequente und adäquate Erregersurveillance, werden möglicherweise mehr Keime nachgewiesen als an Orten, an denen dies nicht der Fall ist. Sicherlich sind weitere umfassende Studien zum populationsbiologischen Verhalten von *C. difficile* nötig, um Erkenntnisse darüber zu gewinnen und letztlich sowohl lokale Ausbrüche als auch überregionale Epidemien umfassend zu verstehen.

5.3 Antibiotikaresistenz und TcdC-Gen Mutationen

Antibiotika-Resistenzprofile sind vor allem klinisch bedeutsam (Norén, 2010), die Erregeradaptierte Therapie kann daraus abgeleitet werden. Antibiotika begünstigen durch die Zerstörung der residenten mikrobiellen Flora des Colons eine Übersiedelung mit *C. difficile*. Besonders bedeutsam wird dies, wenn der Erreger durch erworbene Resistenzen einen Wachstumsvorteil erlangt. Bezüglich nosokomialer und geographischer Verbreitung genießen die betroffenen Stämme einen Selektionsvorteil. Durch die Kombination von Resistenztestung und genotypischen Nachweisverfahren können zusätzliche Informationen über Klonalität und Pathogenität einer *C. difficile* Population gewonnen werden (Curry, 2007).

Ein Teil der Isolate wurde in dieser Arbeit hinsichtlich einer Resistenz gegenüber Moxifloxacin und Clarithromycin getestet. Makrolide und Fluorchinolone bedingen aufgrund der geschilderten Resistenzen die Verbreitung hypervirulenter Stämme. Für die Therapie der CDAD sind sie nicht geeignet, dienen aber der Stamm-Typisierung.

RT 027 war in nahezu 100 % der Fälle resistent gegenüber beiden Antibiotika (Moxifloxacin 97 %, Clarithromycin 95 %). RT 001 zeigte eine Resistenz von 93 % gegen Moxifloxacin und 88 % gegen Clarithromycin. Bei RT 078 lag ein gemischtes Resistenzprofil vor, er war i.d.R. sensibel gegenüber Moxifloxacin (64 %) und resistent gegenüber Clarithromycin (72 %).

Die Ergebnisse der Arbeit werden im Vergleich mit internationalen Studien bestätigt. Die neu-

en epidemischen Stämme RT 001 und 027 sind größtenteils Fluorchinolon-resistent, während hingegen die sporadischen Stämme meist noch sensibel sind (Freeman, 2010). RT 027 ist resistent gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin (Nübel, 2009), auch bei RT 001 ist dies zu beobachten (Brazier, 2008). Ein dem unseren ähnliches Resistenzprofil von RT 078 wurde von Goorhuis (Goorhuis, 2008) beschrieben (Clarithromycin-Resistenz 78 %, 88 % sensibel gegenüber Moxifloxacin).

Antibiotikaresistenzen stellen einen Selektionsvorteil für die Stämme dar und betreffen vor allem die epidemischen hochvirulenten Ausbruchsstämme. Da diese Merkmale in einem ständigen Wandel begriffen sind, sollte ein genaues Monitoring erfolgen. Daten verschiedener Untersucher berichten international bereits von Resistenzen gegenüber Clindamycin und sogar Metronidazol und Vancomycin (Kujiper, 2008; Viswanatan, 2010).

Da in der klinischen Routinediagnostik die Antibiotikaresistenztestung immer durchgeführt wird und dieses Charakteristikum nicht zentraler Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war, wurden die Resistenzprofile nicht bei allen Isolaten erfasst.

Mutationen im *tcdC*-Repressorgen sind assoziiert mit einer erhöhten Virulenz des Erregers (Kelly, 2008). Die Analyse des *tcdC*-Gens hinsichtlich vorhandener Mutationen liefert daher eine Aussage zur Pathogenität eines Stammes. Ihr Nutzen liegt vor allem in der Differenzierung epidemiologischer Stämme (Marsh, 2010) und wird auch diagnostisch genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse zur zusätzlichen Differenzierung einiger Stämme angewandt.

Es wurde bei den untersuchten RT 027 Isolaten zu 100 % die bereits beschriebene 18-bp umfassende Deletion des Pathogenitätslocus gefunden und gleichzeitig das Auftreten einer 1-bp Deletion an Position 117 beobachtet. RT 078 wies in 100 % der untersuchten Isolate eine bekannte 39-bp umfassende Deletion in Kombination mit einer Punktmutation an Position 184 auf. Bei den übrigen untersuchten Stämmen wurden keine Mutationen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse werden international bestätigt. Die Deletion an Position 117 führt durch Verschiebung des Leserasters zu einem Stopp-Kodon an Position 196, das *tcdC*-Gen wird von 232 auf 65 Aminosäuren verkürzt (Stabler, 2010). In Kombination mit der 18-bp Deletion resultiert hieraus eine 16-fach erhöhte Produktion von Toxin A und eine 23-fach erhöhte Produktion von Toxin B (Kola, 2010; Curry, 2007). Die 39-bp Deletion (Nukleotide 341 - 379)

und eine zusätzliche Transition (C184T) bewirken eine Nonsense-Mutation und die Verkürzung des Proteins auf 61 anstatt 232 Aminosäuren. Somit kommt es bei RT 078 zum Verlust der negativen Regulatorfunktion des Gens (Spigaglia, 2002). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit bei einem Isolat vom Typ og39 die 18-bp Deletion und bei einem Isolat der Serogruppe I die 39-bp Deletion gefunden werden. Diese beiden Stämme treten sporadisch auf, weitergehende internationale Untersuchungen bezüglich ihrer Virulenz und Epidemiologie sind noch nicht verfügbar. Es wird hierdurch allerdings deutlich, dass auch bei anderen als den neuen epidemischen Ausbruchstämmen hypervirulente Eigenschaften postuliert werden müssen.

5.4 Patientencharakteristik

Bei einem Teil der untersuchten Patienten wurden retrospektiv klinische Daten erhoben und die Erkrankungsfälle nach den Aspekten Alter, Geschlecht und Schweregrad der Infektion charakterisiert. Hiermit konnte ein umfassendes klinisches Bild der von CDAD betroffenen Patienten am UKS gezeichnet werden.

Die Rate von CDAD wird bei Patienten über 65 Jahre als bis zu 20-fach höher beschrieben (Bartlett, 2008-2), hohes Alter gilt außerdem als signifikanter Risikofaktor für einen schweren Verlauf der Krankheit (Henrich, 2009). Das durchschnittliche Alter der hier untersuchten Patienten lag bei 66,7 Jahren (3 Monate bis 96 Jahre). Bei den einzelnen RT gab es diesbezüglich kaum Unterschiede, das durchschnittliche Alter bei RT 027 betrug 68, bei RT 001 67, bei RT 078 71 und bei den übrigen untersuchten RT 66 Jahre. Vergleicht man hierzu internationale klinische Daten, so sind diese Erhebungen weitestgehend konform zu den hier zu diskutierenden. Bei einer Vielzahl anderer Autoren bewegt sich das durchschnittliche Alter in Bereichen von 65 bis 83 Jahren (Morgan, 2008; Kyne, 1999; Borgmann, 2008).

Die Gruppe der Infektionen mit RT 078 am UKS zeigte das höchste Durchschnittsalter. Aufgrund der auch in dieser Studie nachgewiesenen *tcdC*-Gen Mutationen wird RT 078 als hypervirulenter Ausbruchstamm diskutiert. International wird er jedoch eher in Zusammenhang mit ambulant erworbener CDAD gebracht und betrifft im Vergleich mit RT 027 jüngere Patienten (Goorhuis, 2008). Untersuchungen zur spezifischen Genese der CDAD waren in dieser Arbeit nicht möglich. Vermutlich spielen aber regionale Unterschiede eine Rolle, welche sich

auf nosokomialen oder ambulanten Erwerb einer CDAD durch verschiedene RT auswirken. Darüber hinaus hängt das Durchschnittsalter sicherlich mit der Art der untersuchten Patienten zusammen, die Analyse an einer pädiatrischen Einrichtung wird ein jüngeres Alter erbringen als an einem geriatrischen Zentrum. Des Weiteren bleibt zu bedenken, dass mit höherem Alter per se eine größere Morbidität und dadurch möglicherweise vermehrt Krankenhausaufenthalte verbunden sind und daher das Risiko, an CDAD zu erkranken, in der Altersgruppe der über 65-jährigen von vornherein höher ist als bei jüngeren Patienten.

Unter den insgesamt 491 in Homburg untersuchten Patienten waren 246 Frauen und 245 Männer. Eine diesbezügliche Präferenz der Erkrankung war nicht zu erkennen. Internationale Angaben zur Geschlechterverteilung hingegen sind unterschiedlich. Der Anteil von Frauen und Männern wird einerseits als nahezu gleich (Kyne, 1999) oder mit einem bis zu 15 % höheren Frauenanteil beschrieben (Morgan, 2008; Borgmann, 2008). Die Geschlechterverteilung ist abhängig von der Bevölkerungsstruktur und den demographischen Merkmalen am Ort einer durchgeführten Studie. Insgesamt ist der Frauenanteil an der Weltbevölkerung höher, so dass daraus eine höhere Zahl weiblicher Patienten abgeleitet werden könnte. Frauen werden im Durchschnitt älter, auch dies könnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für CDAD bedingen.

Bei der Einteilung der Schweregrade wurden in dieser Arbeit die vom RKI (Eckmanns, 2010) vorgeschlagenen Kriterien zur Meldepflichtigkeit schwer verlaufender *C. difficile* Infektionen (rekurrente Infektion, Verlegung auf eine Intensivstation, chirurgischer Eingriff (Colectomie), Tod und CDAD als Ursache oder als zum Tode beitragende Erkrankung und/oder Nachweis des RT 027) verwendet.

Insgesamt konnten von 224 analysierten Patienten 42,9 % (n = 96) einem schweren und 57,1 % einem unkomplizierten (n = 128) Verlauf zugeordnet werden. Unter den schweren Fällen waren 45 % durch RT 027 verursacht, 28 % durch RT 001 und 27 % durch andere RT (078, 014/066, smz, 031/094, 010, 002, 053). Die häufigsten Rezidive und Todesfälle waren bei RT 027 zu finden. RT 001 führte häufiger zu Aufnahme auf Intensivstation. Bezüglich der Rezidive waren die Zahlen ähnlich hoch wie bei RT 027, die Todesfälle jedoch deutlich geringer. Bei den anderen RT lagen die vier Kriterien in jeweils ähnlichem Ausmaß vor (durchschnittlicher prozentualer Anteil 7,6). Hinsichtlich der unkomplizierten Verläufe gab es die wenigsten bei RT 027 (44,8 %), die restlichen Infektionen verliefen überwiegend unkompliziert (58,5 -

68,3 %).

Die Zahlen am UKS unterscheiden sich insgesamt gesehen von den vom RKI (Eckmanns, 2010) erhobenen Zahlen aus den Jahren 2008 - 2009 (von 733 Patienten 89,7 % schwere Verläufe). In anderen Studien sind allerdings den vorliegenden ähnlichere Zahlen zu finden (Kyne, 1999: 40 % schwere Fälle). Am UKS konnten schwere Fälle nicht nur bei den hypervirulenten, sondern auch bei selteneren RT nachgewiesen werden. Die Assoziation einzelner RT mit besonders schwerem Verlauf ist international bekannt (Freeman, 2010).

Die häufigsten RT unter den schweren Infektionen sind 001 und 027 (Arvand, 2009; Arvand, 2010), aber eben nicht zwangsläufig nur RT 027 (Jansen, 2010). Nach Morgan (Morgan, 2008) ist es nicht wahrscheinlicher, durch RT 027 schwer zu erkranken als durch andere RT. Hierin stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit überein. Ein großes Problem sind auch immer noch die Rezidive, 15 - 35 % der Patienten erkranken mehrfach (Barbut, 2000; Schneider, 2007). Die vorliegenden Zahlen zeigen diesbezüglich mit 23,2 % eine Übereinstimmung.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Auswertung der klinischen Angaben in größerem Umfang noch genauere und aussagekräftigere Daten liefern kann. Der Vergleich mit anderen Studien ist erschwert durch sehr unterschiedliche Fallzahlen und das Spektrum der nachgewiesenen RT. Die meisten Studien stützen sich auf die hochvirulenten Epidemiestämme, sporadischere Typen wurden bisher klinisch kaum genauer untersucht. Die Bedeutung einer prospektiven Datenerhebung wird hiermit deutlich, retrospektiven Analysen fehlt aufgrund nicht vorliegender klinischer Angaben die Vollständigkeit.

5.5 Zeitliche Epidemiologie

Seit 2008 konnte mit Beginn dieser Studie das zunehmende Auftreten von CDAD, verursacht durch den epidemischen Ausbruchsstamm RT 027, am UKS beobachtet werden. Vor 2007 wurden in Deutschland erhöhte Inzidenzraten an CDAD registriert (Kleinkauf, 2008; Vonberg, 2007), allerdings war die Verbindung mit bestimmten RT noch unklar. Im Herbst 2007 wurden aus Hessen 31 % RT 027-Infektionen gemeldet, diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll die Fähigkeit des Stammes sich in kurzer Zeit regional auszubreiten (Jansen, 2010).

Die Anzahl der hier insgesamt untersuchten Isolate war im Jahr 2009 am höchsten (270, 2008 213 Isolate). Danach wurden in den ersten 3 Monaten des Jahres 2010 nur 57 Isolate zur Typi-

sierung eingesandt. Diesen Trend bestätigten auch die Zahlen der externen Einsender aus dem Saarland, es kam hier zur Abnahme von 56 (2008) auf 5 (2010) Isolate.

Der Rückgang der Zahlen am UKS ist unter Umständen auf ein verändertes Management innerklinischer Infektionsausbrüche verbunden. Maßnahmen wie Einzelzimmerisolierung betroffener Patienten, spezielle Hygienemaßnahmen für das Personal sowie eine erhöhte Vigilanz seitens behandelnder Ärzte gegenüber dem Erreger und eine zügige mikrobiologische Diagnostik können hierzu beigetragen haben. International wird die Abnahme der Inzidenz ebenfalls mit verbesserter Überwachung und der Etablierung von Präventionsmaßnahmen begründet (Lo Vecchio, 2012), außerdem ist auch die restriktivere Verordnung bestimmter Risiko-Antibiotika (Barbut, 2011) ursächlich.

Der Vergleich mit internationalen Daten zeigt zunächst eine kontinuierliche Zunahme der Fallzahlen ab dem Jahr 2007, das RKI (Eckmanns, 2010) berichtet von insgesamt 7471 gemeldeten CDAD-Fällen zwischen dem 1.1.2008 und dem 31.12.2009. Problematisch bei Beurteilung der insgesamt pro Jahr vorliegenden Fälle ist jedoch das zumindest in Deutschland sehr unterschiedliche Meldewesen. I.d.R. müssen nur klinisch schwere Erkrankungen gemeldet werden, lediglich das Bundesland Sachsen meldet jeden CDAD-Fall.

Darüber hinaus werden einerseits abnehmende Zahlen (Viseur, 2011) berichtet, Hensgens (Hensgens, 2009) schilderte für die Niederlande die tendenzielle Rückläufigkeit der Fallzahlen in einem Beobachtungszeitraum von vier Jahren. Andererseits belegen internationale Studien die immer noch anhaltende weltweite Verbreitung der CDAD (Tenover, 2011).

Studien zur langfristigen Entwicklung der Fallzahlen sind weiterhin notwendig, um eine wie am UKS zu beobachtende Abnahme entsprechend interpretieren zu können.

Aus internationalen Langzeitstudien (Beobachtungszeitraum >10 Jahre) ist das Auftreten sogenannter „high incidence years“ bekannt. Hier kam es in einigen Jahren zu besonders vielen CDAD-Fällen durch unterschiedlichste RT, führend war jeweils ein anderer RT. Es wurde beobachtet, dass der zunächst prädominante Stamm weniger häufig auftrat, um dann zu verschwinden (Belmares, 2009). Ein solcher Wechsel wird auch aus Israel berichtet (Bishara, 2011), Gründe hierfür wurden nicht näher untersucht. Bezüglich der aktuellen Daten ist zumindest über die 2 Jahre der Studie RT 027 prädominant, eine Änderung konnte bislang nicht beobachtet werden.

Auffallend in der vorliegenden Arbeit waren deutliche Fallzahlschwankungen im gesamten Untersuchungszeitraum. Gipfel gab es jeweils in den Monaten Juni 2008 (28 Fälle), November 2008 (38 Fälle) und April 2009 (35 Fälle). Tiefpunkte zeigen sich im August 2008 (11 Fälle) sowie im Juli und Oktober 2009 (8 bzw. 9 Fälle). Auch bei anderen Autoren werden Schwankungen solcher Art berichtet (Arvand, 2009: Anstieg der Fälle von Januar 2008 bis Gipfel im September 2008, Tiefpunkt im November 2008 mit erneutem Anstieg bis April 2009). Allerdings konnte bislang keine einheitliche Dynamik der zeitlichen Epidemiologie nachgewiesen werden, welche Faktoren letztlich solche Schwankungen verursachen, ist nicht bekannt. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit von Erkrankungsgipfeln (besonders Januar - März und Häufung in den Wintermonaten), wie sie aktuell in Bayern und auch in Kanada und Wales zu beobachten war (Reil, 2011), lassen sich aus den Zahlen der vorliegenden Arbeit nicht ableiten.

Die zeitliche Epidemiologie der häufigsten RT der aktuellen Untersuchung unterlag ebenso Schwankungen. Infektionen mit RT 027 waren im Jahr 2008 bis zum 2. Quartal 2009 zunehmend (von 7 auf 12 - 34 Fälle), und sanken ab dem 2. Quartal 2009 wieder (10 - 11 Fälle). Insgesamt gesehen kam RT 027 im Untersuchungszeitraum zu 31,7 % vor und scheint somit am UKS endemisch zu sein. Die Zahlen von RT 001 verhielten sich ähnlich: im 2. Quartal 2009 kam es zum Anstieg (von 7 auf 16 - 31 Fälle), dann zum Absinken ab dem 3. Quartal 2009 (5 - 8 Fälle), das Gesamtvorkommen lag bei 24 %. RT 014/066 war im letzten Quartal 2008 und im ersten und letzten Quartal 2009 am häufigsten vertreten (11 - 13 Fälle), dazwischen kam es zu 5 - 8 Erkrankungen. Von Infektionen mit RT 078 lagen insgesamt zwischen einem und vier klinische Isolate vor.

Im Vergleich mit anderen internationalen Untersuchungen werden von einzelnen RT ebenfalls schwankende Fallzahlen berichtet, beispielsweise aus den Niederlanden. In der ersten Hälfte von 2009 kam es hier zur Abnahme von RT 027 bei Zunahme von RT 001 (Freeman, 2010) und einer insgesamt signifikanten Reduktion der Inzidenz von RT 027 Infektionen (Hensgens, 2009). Im Gegensatz zu den Daten am UKS zeigt eine Studie aus den Jahren 2008/2009 eine zeitlich homogene Verteilung von RT 001 ohne große Schwankungen, was für ein endemisches Vorkommen spricht, sowie eine inhomogene Verteilung von RT 027 mit starken Schwankungen als Hinweis auf epidemisches Vorkommen (Arvand, 2010). Die Verhältnisse

sind am UKS umgekehrt.

Insgesamt scheint national die Verteilung der häufigsten RT im zeitlichen Verlauf ein typisches Muster anzunehmen: RT 001 ist endemisch in Krankenhäusern in ganz Deutschland, die Verteilung von RT 027 ist beschränkt auf den Südwesten und außerdem bezüglich der Inzidenz abnehmend (Zaiß, 2010). Dieses Muster kann anhand der vorliegenden Untersuchung bislang nicht vollständig nachvollzogen werden.

Auffallend war am UKS die tendenzielle Zunahme der Vielfalt anderer und sporadischer RT (031/094, 002, 010, smz, gc0577, 012/046/092, og39, 017, y02, 079, 053, y52, Sero A, B und D) im zeitlichen Verlauf. Hiervon wurden ab dem Quartal 4 / 2008 zwischen 13 - 22 Fälle verzeichnet. Internationale Studien bestätigen diesen Trend (Jansen, 2010). Bei Hensgens (Hensgens, 2009) konnten 41 Typen differenziert werden. Barbut berichtet von mittlerweile 65 verschiedenen gefundenen RT in Europa (Barbut, 2011).

Die Ergebnisse der zu diskutierenden Studie am UKS konnten intern durch die Untersuchungen der Isolate externer Einsender aus dem Saarland bestätigt werden. Der prozentual am häufigsten vertretene Stamm war RT 027 (60 %), gefolgt von RT 001 (15,6 %), sporadische RT kamen zu insgesamt 10 % vor. Die Fallzahlen waren insgesamt rückläufig bei kontinuierlicher Prädominanz von RT 027.

Genaue Ursachen für schwankende Zahlen im zeitlichen Verlauf einer Untersuchung sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. In diesem Zusammenhang ist es vonnöten, Studien mit höheren Fallzahlen über einen noch längeren Zeitraum durchzuführen. Ansätze dazu sind am UKS bereits in Arbeit.

5.6 Schlussfolgerung

Die slpAST ist eine objektive und gut standardisierte Methode zur Typisierung von *C. difficile* Isolaten. Sie erfüllt alle relevanten Anforderungen an eine effektive Nachweismethode und zeichnet sich aus durch:

- Wiederholbarkeit der Ergebnisse (Reproduzierbarkeit),
- Typisierbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit bzw. Trennschärfe,
- Stabilität der Ergebnisse,
- Epidemiologische Konkordanz,
- technische Vorteile, gute Standardisierbarkeit, gut verfügbare Materialien und finanzielle Vorteile durch niedrige Kosten.

Aufgrund dieser Vorteile gegenüber traditionellen Verfahren bietet slpAST eine Basis für die standardisierte *C. difficile* Typisierung im Rahmen nationaler und internationaler Studien.

SlpAST wurde auf Grundlage dieser Arbeit als Standardverfahren in der Routinediagnostik des Konsiliarlabors für *C. difficile* am UKS in Homburg etabliert.

Die epidemiologische Situation der CDAD im Saarland konnte umfassend beobachtet und analysiert werden, Ausbruchssituationen mit neuen epidemiologisch relevanten Stämmen und deren Dynamik wurden fassbar und dokumentiert. Die Fallzahlen waren im Beobachtungszeitraum Schwankungen unterworfen, jedoch blieb der epidemische Ausbruchsstamm RT 027 mit 35,87 % der Fälle konstant der häufigste vorkommende Typ. Die zusätzlich durchgeführte Analyse des *tcdC*-Gens bewies das konstante Auftreten der stammspezifischen Mutationen bei RT 027 und 078, aber auch bei sporadischen Stämmen. Außerdem wurden durch die retrospektive Datenerhebung zur Patientencharakteristik die Krankheitsverläufe mit hochvirulenten Stämmen analysiert und die einzelnen Infektionsfälle nach ihrem Schweregrad eingeteilt. Schwere Verläufe traten v.a. in hohem Alter und bei RT 027 auf. Es ließen sich hyper- von weniger virulenten Stämmen unterscheiden, was im Wesentlichen das klinische Procedere für einen betroffenen Patienten beeinflusst.

5.7 Ausblick

Die Genotypisierung von *C. difficile* soll künftig dazu dienen, einerseits Verläufe und Ausbreitungsmuster verschiedener Stämme zu dokumentieren, lokale Ausbrüche frühzeitig wahrzunehmen und andererseits eine suffiziente Infektionsüberwachung und schnell greifende therapeutische Strategien und Interventionen zu erarbeiten. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Epidemiologie von *C. difficile* Infektionen sollten Ausbrüche untersuchen. Insbesondere eine Unterteilung in polyklonale (gleichzeitiges Auftreten mehrerer Stämme) oder monoklonale (durch einen einzigen dominanten Stamm verursachte Epidemien) können Hinweise auf das evolutionsbiologische Verhalten von *C. difficile* geben.

Vor allen Dingen für Ausbrüche auf einzelnen Stationen ist es wichtig, die Klonalität der Erreger zu bestimmen und deren Übertragung innerhalb einer Patientenpopulation zu differenzieren. Nicht zuletzt können mit derartigen klinischen Studien die Maßnahmen zur Infektionsprävention generell überprüft werden. Wie lange persistiert ein Stamm in einer Region oder einer Einrichtung, kann die Zahl der Neuerkrankungen reduziert werden oder kommt es trotz aller therapeutischen und hygienischen Maßnahmen zu lokalen Epidemien? Können neue, auf einen Stamm zugeschnittene Strategien zu schneller Eindämmung führen, diese Fragen bleiben bislang noch offen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, Harding GK, Dyck B, Olekson K, Embil JM (2000) Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:2706-14
2. Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G (2009) *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill.* 14:19403
3. Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G (2010) Schwer verlaufende *Clostridium-difficile*-Infektionen in Hessen 2008 - 2009. *Dtsch Med Wochenschr* 135:1963-7
4. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC (2000) Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:2386-8
5. Barbut F, Decré D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, Espinasse F, Raskine L, Robert J, Mangeol A, Branger C, Petit JC (2005) Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 54:181-5
6. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2007) Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 13:1048-57
7. Barbut F, Jones G, Eckert C (2011) Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. *Curr Opin Infect Dis* 24:370-6
8. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet

DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, ECDIS Study Group (2011) Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377:63-73

9. Bartlett JG (2002) Clostridium difficile-associated Enteric Disease. *Curr Infect Dis Rep* 4:477-483

10. Bartlett JG (2008-1) Historical perspectives on studies of Clostridium difficile and C. difficile infection. *Clin Infect Dis* 46: 4-11

11. Bartlett JG, Gerding DN (2008-2) Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 46: 12-8

12. Belmares J, Johnson S, Parada JP, Olson MM, Clabots CR, Bettin KM, Peterson LR, Gerding DN (2009) Molecular epidemiology of Clostridium difficile over the course of 10 years in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 49:1141-7

13. Bishara J, Goldberg E, Madar-Shapiro L, Behor J, Samra Z (2011) Molecular epidemiology of clostridium difficile in a tertiary medical center in Israel: emergence of the polymerase chain reaction ribotype 027. *Isr Med Assoc J* 13:338-41

14. Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, Rossier A, Barbut F, Petit JC (2000) Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 38:2484-7

15. Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, von Eichel-Streiber C, Gruber H, Brazier JS, Schulte B (2008) Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany. *Euro Surveill* 13: 19057

16. Brazier JS (2001) Typing of Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect* 7:428-31

17. Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, Duerden BI (2008) Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of Clostridium difficile PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro Surveill* 13:19000

18. Cohen SH, Tang YJ, Silva J (2000) Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis* 181:659-63

19. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH (2010) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:431-55

20. Curry, S, Marsh J, Muto C, O'Leary M, Pasculle AW, Harrison, L (2007) *tcdC* Genotypes Associated with Severe *TcdC* Truncation in an Epidemic Clone and Other Strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 45:215-21

21. Delmée M (2001) Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect* 7:411-6

22. Dingle KE, Griffiths D, Didelot X, Evans J, Vaughan A, Kachrimanidou M, Stoesser N, Jolley KA, Golubchik T, Harding RM, Peto TE, Fawley W, Walker AS, Wilcox M, Crook DW (2011) Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity. *PLoS One* 6:e19993

23. Eckmanns T, Schweickert B (2010) Robert Koch Institut: *Clostridium-difficile*-Infektionen: Übermittlungen gemäß IfSG von 01/2008 bis 12/2009. *Epidemiologisches Bulletin* 10:87-89

24. Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, O'Keane CJ, Gong D (1992) Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 90:822-9

25. Eidhin DN, Ryan AW, Doyle RM, Walsh JB, Kelleher D (2006) Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, *slpA*, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 55:69-83

26. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH (2010) The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol*

Rev 23:529-49

27. Gardiner DF, Rosenberg T, Zaharatos J, Franco D, Ho DD (2009) A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine* 27:3598-604

28. Gonzales M, Pepin J, Frost E, Carrier J, Sirard S, Fortier LC, Valiquette L (2010) Faecal pharmacokinetics of orally administered vancomycin in patients with suspected *Clostridium difficile* infection. *BMC Infectious Diseases* 10:363

29. Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LA, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Kuijper EJ (2008) *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J Clin Microbiol* 46:1157

30. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJ, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE (2010) Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 48:770-8

31. Hall IC, O'Toole E (1935) Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 49:390-402

32. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS (2009) Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis* 15:415-22

33. Hensgens MP, Goorhuis A, Notermans DW, van Benthem BH, Kuijper EJ (2009) Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveill* 14:19402

34. Hensgens MP, Goorhuis A, van Kinschot CM, Crobach MJ, Harmanus C, Kuijper EJ (2011) *Clostridium difficile* infection in an endemic setting in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:587-93

35. Hinkson PL, Dinardo C, DeCiero D, Klinger JD, Barker RH (2008) Tolevamer, an anionic polymer, neutralizes toxins produced by the BI/027 strains of *Clostridium difficile*. *Antimicrob*

Agents Chemother 52:2190-5

36. Hull MW, Beck PL (2004) Clostridium difficile-associated colitis. Can Fam Physician 50:1536-40, 1543-5

37. Jansen A, Kleinkauf N, Weiss B, Zaiss NH, Witte W, Bornhofen B, Kist M, von Eichel-Streiber C, Neumann M, Michels H, Eckmanns T (2010) Clostridium-difficile-Ribotyp 027: Epidemiologie und Klinik des erstmaligen endemischen Auftretens in Deutschland. Z Gastroenterol 48:1120-5

38. Johnson S, Schriever C, Galang M (2007) Interruption of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin Infect Dis 44:846-8

39. Karjalainen T., Saumier N, Barc MC, Delmée M, Collignon A (2002) Clostridium difficile genotyping based on slpA variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. J Clin Microbiol 40:2452-8

40. Kato H, Yokoyama T, Arakawa Y (2005) Typing by sequencing the slpA gene of Clostridium difficile strains causing multiple outbreaks in Japan. J Med Microbiol 54:167-171

41. Kato H, Kato H, Nakamura M, Iwashima Y, Nakamura A, Ueda R (2009) Rapid analysis of Clostridium difficile strains recovered from hospitalized patients by using the slpA sequence typing system. J Infect Chemother 15:199-202

42. Kato H, Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, Kaji C, Arakawa Y (2010) Typing of Clostridium difficile isolates endemic in Japan by sequencing of slpA and its application to direct typing. J Med Microbiol 59:556-62

43. Kelly CP, LaMont JT (2008) Clostridium difficile-more difficult than ever. N Engl J Med 359:1932-40. Erratum in: N Engl J Med (2010) 363:1585

44. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B,

Gerding DN, McDonald LC (2008) Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 46:431-7

45. Klaassen CH, van Haren HA, Horrevorts AM (2002) Molecular fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 40:101-4

46. Kleinkauf N, Weiss B, Jansen A (2007) Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridium difficile* PCR ribotyp 027 in Germany. *Euro Surveill.* 12:3307

47. Kleinkauf N, Eckmanns T (2008) *Clostridium difficile*: Zum Stand der Meldungen schwer verlaufender Infektionen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 15: 117-119

48. Kola A (2010) *Clostridium difficile*-associated infections. How dangerous are the new strains? *Internist (Berl)* 51:154-60

49. Kristjánsson M, Samore M, Gerding D, Degirolami P, Bettin K, Karchmer A, Arbeit R (1994) Comparison of Restriction Endonuclease Analysis, Ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Differentiation of *Clostridium difficile* Strains. *J Clin Microbiol* 32:1963-9

50. Kuijper EJ, de Weerd J, Kato H, Kato N, van Dam AP, van der Vorm ER, Weel J, van Rheenen C, Dankert J (2001) Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20:528-34

51. Kuijper E, van Dissel J, Wilcox M (2007) *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Curr Opin Infect Dis* 20:376-383

52. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, Drudy D, Fitzpatrick F, Wiuff C, Brown DJ, Coia JE, Pituch H, Reichert P, Even J, Mossong J, Widmer AF,

Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Delmée M, Coignard B, Wilcox M, Patel B, Frei R, Nagy E, Bouza E, Marin M, Akerlund T, Virolainen-Julkunen A, Lyytikäinen O, Kotila S, Ingebretsen A, Smyth B, Rooney P, Poxton IR, Monnet DL (2008) Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 31:18942

53. Kyne L, Merry C, O'Connell B, Kelly B, Keane C, O'Neill D (1999) Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. *Age and Ageing* 28:107-113

54. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL (2004) Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol* 42:2609-17

55. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Béliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A (2011) Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med* 365:1693-703

56. Lo Vecchio A, Zacur GM (2012) *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Curr Opin Gastroenterol* 28:1-9

57. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas WD Jr, Leney M, Sloan S, Hay CA, Ambrosino DM (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362:197-205

58. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, Muto CA, Harrison LH (2006) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J Clin Microbiol* 44:2558-66

59. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, Harrison LH (2010) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 48:412-8

60. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433-41
61. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 320:204-10
62. McFarland LV (2009) Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15:274-80
63. Mitchell TJ, Ketley JM, Burdon DW, Candy DC, Stephen J (1987) Biological mode of action of *Clostridium difficile* toxin A: a novel Enterotoxin. *J med Microbiol* 23:211-9
64. Mohammadi T, Reesink HW, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH (2005) Amplified-fragment length polymorphism analysis of *Propionibacterium* isolates implicated in contamination of blood products. *Br J Haematol* 131:403-9
65. Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DF, Brazier J, Reacher M (2008) Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: a case-case study. *PLoS One* 19;3
66. Norén T, Alriksson I, Akerlund T, Burman LG, Unemo M (2010) In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993-2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 16:1104-10
67. Northey G, Gal M, Rahmati A, Brazier JS (2005) Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 by REP-PCR and PFGE. *J Med Microbiol* 54:543-7
68. Nübel U, Mielke M (2009) *Clostridium difficile*. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin* 24:233-239
69. Owens RC, Donskey C, Gaynes R, Loo V, Muto C (2008) Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 46:19-31

70. Peerbooms PG, Kuijt P, Maclaren DM (1987) Application of chromosomal restriction endonuclease digest analysis for use as typing method for *Clostridium difficile*. *J Clin Pathol* 40:771-6
71. Poilane I, Humeniuk-Ainouz C, Durand I, Janoir C, Cruaud P, Delmée M, Popoff MR, Collignon A (2007) Molecular characterization of *Clostridium difficile* clinical isolates in a geriatric hospital. *J Med Microbiol* 56:386-90
72. Poutanen M, Simor A (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* 171:51-8
73. Pollok RC (2009) *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 360:637-8
74. Reil M, Hensgens MP, Kuijper EJ, Jakobiak T, Gruber H, Kist M, Borgmann S (2011) Seasonality of *Clostridium difficile* infections in Southern Germany. *Epidemiol Infect* 8:1-7
75. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherls J, Bischof G (1995) *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest* 95:2004-11
76. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather N, Gerding D, Johnson S, Just I, Lyerly D, Popoff M, Rood J, Sonenshein A, Thelestam M, Wren B, Wilkins T, von Eichel-Streiber C (2005) Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol* 54:113-7
77. Rupnik M (2008) Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev* 32:541-55
78. Rupnik M (2010) *Clostridium difficile* toxinotyping. *Methods Mol Biol* 646:67-76
79. Sailhamer EA, Carson K, Chang Y, Zacharias N, Spaniolas K, Tabbara M, Alam HB, DeMoya MA, Velmahos GC (2009) Fulminant *Clostridium difficile* colitis: patterns of care and predictors of mortality. *Arch Surg* 144:433-9

80. Schwan A, Sjölin S, Trottestam U, Aronsson B (1984) Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis* 16:211-5
81. Schneider T, Eckmanns T, Ignatius R, Weist K, Liesenfeld O (2007) *Clostridium-difficile*-assoziierte-Diarrhö. *Dtsch Ärztebl* 104:1588-94
82. Schröder O, Gerhard R, Stein J (2006) Antibiotic-associated diarrhea. *Z Gastroenterol* 44:193-204
83. Shah D, Dang MD, Hasbun R, Koo HL, Jiang ZD, DuPont HL, Garey KW (2010) *Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:555-64
84. Songer JG (2005) The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Res Rev* 5:321-6
85. Spigaglia P, Mastrantonio P (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 40:3470-5
86. Staneck J, Weckbach L, Allen S, Siders J, Gilligan P, Coppitt G, Kraft J, Willis D (1996) Multicenter Evaluation of Four Methods for *Clostridium difficile* Detection: ImmunoCard *C. difficile*, Cytotoxin Assay, Culture, and Latex Agglutination. *J Clin Microbiol* 34:2718-21
87. Stabler R, Valiente E, Dawson L, He M, Parkhilla J, Wren B (2010) In-depth genetic analysis of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 strains reveals high genome fluidity including point mutations and inversions. *Gut Microbes* 1:269-276
88. Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U (2008) Spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 46: 574-581
89. Struelens MJ (1998) Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:581-5

90. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI (1999) PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 37:461-3
91. Sunenshine R, McDonald C (2006) *Clostridium difficile*-associated disease: New challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 73:187-97
92. Tannock GW, Munro K, Taylor C (2010) A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin. *Microbiology* 156:3354-9
93. Tedesco FJ, Alpers DH (1974) Editorial: Pseudomembranous colitis. *West J Med* 121:499-500
94. Tenover FC, Akerlund T, Gerding DN, Goering RV, Boström T, Jonsson AM, Wong E, Wortman AT, Persing DH (2011) Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. *J Clin Microbiol* 49:1831-7
95. Tyrrell KL, Citron DM, Warren YA, Fernandez HT, Merriam CV, Goldstein EJ (2006) In vitro activities of daptomycin, vancomycin, and penicillin against *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Fingoldia magna*, and *Propionibacterium acnes*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2728-31
96. Vaishnavi (2009) C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Microbiol* 27:289-300
97. Van den Berg R, Schaap I, Templeton K, Klaasen C, Kuijper E (2007) Typing and Subtyping of *Clostridium difficile* Isolates by Using Multiple-Locus variable-Number tandem-Repeat Analysis. *J Clin Microbiol* 45:1024-8
98. Van Nood E, Speelman P, Kuijper E, Keller J (2009) Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: is donor faeces the solution? *Euro Surveill* 14: 19316
99. Viseur N, Lambert M, Delmee M, Van Broeck J, Catry B (2011) Nosocomial and non-

nosocomial *Clostridium difficile* infections in hospitalised patients in Belgium: compulsory surveillance data from 2008 to 2010. *Euro Surveill* 16:20000

100. Viswanathan VK, Mallozzi MJ, Vedantam, G (2010) *Clostridium difficile* infection: An overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. *Gut Microbes* 1:234-242

101. Vonberg, RP, Schwab, F, Gastmeier P (2007) *Clostridium difficile* in discharged inpatients, Germany. *Emerg Infect Dis* 13:179-180

102. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366: 1079-1084

103. Wilkins T, Lysterly D (2003) *Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging. *J Clin Microbiol* 41:531-4

104. Wilson V, Cheek L, Satta G, Walker-Bone K, Cubbon M, Citron D, Gerding DN, Llewellyn MJ (2010) Predictors of death after *Clostridium difficile* infection: a report on 128 strain-typed cases from a teaching hospital in the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 50:77-81

105. Zaiß NH, Weile J, Ackermann G, Kuijper E, Witte W, Nübel U (2007) A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. *Euro Surveill* 12:3306

106. Zaiß NH, Witte W, Nübel U (2010) Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerg Infect Dis* 16:675-7

7 Publikationen/Danksagung

Zeitschriften

Joost I, Speck, K, Herrmann M, von Müller L (2009) Characterisation of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 33:13-8

Kongreßbeiträge

Characterization of *Clostridium difficile* isolates by using *slpA* and *tcdC* gene sequencing. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V.: 21. bis 24. September 2008, Dresden. Abstract: *International journal of medical microbiology*, 2008; 298, Suppl. 2 = No. 45

Characterization of *Clostridium difficile* isolates by using *slpA* and *tcdC* gene sequencing. ISC International conference on *Clostridium difficile*, Leipzig 26. - 27. September 2008

SlpA sequence typing for characterisation of *Clostridium difficile* isolates: is ribotype 027 already endemic in western parts of Germany? 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V.: 20. bis 23. September 2009, Göttingen. Abstract: *International journal of medical microbiology*, 2009; 299, Suppl. 1

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt an allererster Stelle meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Lutz von Müller für die jederzeit einmalige und beste Anleitung, die großartige fachliche und immer menschliche, unglaublich herzliche persönliche Unterstützung über die gesamte Zeit unserer gemeinsamen Arbeit. Tausend Dank!

Ebenso möchte ich mich vielmals bei dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. med. Mathias Herrmann bedanken für die Ermöglichung der umfassenden Forschung an meinem Thema und die breite Unterstützung in allen Bereichen, von Material, fachlicher Diskussion und Bearbeitungstipps bis Kongressreisen und Weihnachtsfeiern.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des PCR-Labors, des Stuhllabors und des Instituts für Mikrobiologie am UKS, besonders bei Diana Velten, Karin Richter und Susanne Loibl für die sehr, sehr gute Einarbeitung in die Geheimnisse der PCR und der Aufbereitung von Stuhlproben

Mein weiterer Dank gilt meiner Chefin Frau Dr. med. Margarita Metzger für die freien Stunden, Anja Weihrauch für die unschätzbare Hilfe beim Einarbeiten in LaTeX und Support bei PC-Problemen und meiner Schwester Birgit Dorbath und meinem Schwager Steffen Dorbath für die Unterstützung im Allgemeinen!