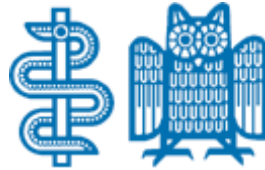


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Institut für

Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. M. Herrmann



**Genotypische und phänotypische Charakterisierung von
deutschen *Clostridium difficile* Infektionen im Rahmen einer
internationalen Multizentrischen Punktprävalenzuntersuchung
(EUCLID)**

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

2013

vorgelegt von Dominik Jorge Segundo

Zevallos Falla

geboren am 21. Juni 1984 in Paderborn

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Fassung	1
2 Einleitung	3
2.1 <i>C. difficile</i>	3
2.2 Epidemiologie.....	3
2.3 Klinisches Bild	5
2.4 Diagnostik.....	5
2.5 Therapie	6
2.6 Thematik.....	7
3 Material und Methodik	9
3.1 Methodik.....	9
3.1.1 Antigennachweis (Stuhl).....	9
3.1.2 Antigennachweis Toxin A/B Test (Isolate).....	11
3.1.3 Anaerobe Kultur	11
3.1.4 PCR (Stuhl)	11
3.1.5 Toxin PCR (Isolate)	17
3.1.6 Ribotypisierung	19
3.1.7 Antibiotika-Resistenztestung	20
3.2 Geräte, Reagenzien und Software	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Proben und eingeschlossene Kliniken	22
4.2 Diagnostische Testverfahren	23
4.2.1 GDH- und Toxin A/B-Test (Stuhl)	23
4.2.2 PCR (Stuhl)	24
4.2.3 Kultur	25
4.2.4 Toxin A/B-Test (Isolate)	26
4.2.5 Toxin PCR.....	27
4.2.6 Methodenvergleich.....	28
4.3 Resistenztestung	30

4.4	Prädominante Ribotypen	32
4.4.1	Toxigene vs. nicht toxigene Stämme der Ribotypen.....	32
4.4.2	Antibiotika-Resistenz der Ribotypen	33
4.4.3	Geographische Verteilung der Ribotypen (molekulare Epidemiologie).....	43
5	Diskussion	47
6	Literaturverzeichnis	55
7	Danksagung	60
8	Anhang.....	62
8.1	Geräte, Reagenzien und Software	62
8.2	Überblick zum Vergleich der Methoden der CDI-Diagnostik	65
8.3	Baumdiagramm des Verarbeitungsprozesses der Gesamtproben.....	66
8.4	Vierfeldertafeln.....	67

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BTS	Bakterien-Test-Standard
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CCA	cell cytotoxicity assay
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> assoziierte diarrhoe
Cdt	<i>Clostridium difficile</i> (binäres) Toxin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EIA	Enzymimmunoassay
ExoSAP	Exonuclease I - shrimp alkaline phosphatase
GLDH / GDH	Glutamatdehydrogenase
HCCA	alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPV	negativer prädiktiver Wert
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNM	Primer Nukleotid Mix
PPV	positiver prädiktiver Wert
RNA	Ribonukleinsäure
slpA	surface layer protein A

TBE	Tris-Borat-EDTA
TOF	time of flight
tpi	Triosephosphatisomerasegen
UdS	Universität des Saarlandes
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
WT	Wildtyp

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Die Basis dieser Studie war die europäische halbjährige Punktprävalenzstudie auf *C. difficile* (EUCLID), welche die erste prospektive Evaluierung von *C. difficile* Infektionen bei hospitalisierten Patienten in Deutschland ermöglichte. Dank der deutschlandweiten Teilnahme konnte ebenfalls eine epidemiologische Aussage bezüglich der Entwicklung von *C. difficile*, insbesondere des Ribotyps 027, in Deutschland gemacht werden.

Eine Gesamtzahl von 155 Kliniken an verschiedenen Standorten in Deutschland nahm an dieser prospektiven Kohortenstudie teil. Es gab zwei Sammelphasen: eine Phase im Januar 2013 und eine im Juli 2013. Die eingesendeten Durchfall-Proben wurden laboratorisch zunächst auf Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und Toxin A/B (*C. diff* Quik Chek Complete) getestet. GDH positive Proben wurden durch eine PCR und eine anaerobe Kultur bestätigt. Die Isolate wurden anschließend weiter bezüglich ihrer Toxizität charakterisiert (Toxin A/B-Test, PCR). Ebenfalls fand eine Ribotypisierung aller Isolate statt.

Eine Gesamtzahl von 2156 Stuhlproben wurde aufgenommen, davon 1176 im Januar 2013 und 980 im Juli 2013. 99 Proben wurden aufgrund der geringen Menge des Materials ausgeschlossen. Unter den 2057 untersuchten Proben waren 472 GDH positiv (22,9%), und von diesen waren wiederum 255 Toxin-A/B positiv (54,0%). Eine *C. difficile* Infektion wurde in 426 Fällen durch eine PCR bestätigt (90,2%), 400 Proben davon wurden als toxisch eingestuft (93,8%). Durch eine anaerobe Kultur der GDH positiven Proben konnte in 424 Fällen (89,8%) ein Wachstum von *C. difficile* nachgewiesen werden, wobei 371 Proben davon Toxin A/B positiv waren (87,5%). Von den Isolaten waren weiterhin 373 positiv für die Toxin-Gene *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* und *cdtB* (87,9%). Die höchste Anzahl mittels PCR ermittelter Ribotypen der Isolate wurde beim Ribotyp 027 (21,7%) gefunden, gefolgt vom Ribotyp 001 (19,1%), 014 (10,1%), 002 (3,8%), 140 (3,1%), 015 (2,8%) und 078 (2,6%) mit regional unterschiedlichem Verteilungsmuster. Die höchsten Raten des hypervirulenten 027-Stammes wurden in den westlichen Teilen Deutschlands in Regionen mit der Postleitzahl 5 (54%), 4 (48%), 6 (23%) und 7 (20%) festgestellt, während in einigen nördlichen (2 und 3) und südlichen (8) Regionen 027 noch nicht gefunden wurde. Es scheint eine Durchwanderung von West nach Ost durch die Regionen 9 (19%) und 0 (29%) zu geben, wobei die nord-östlichen Teile 1 (7%) wohl auch erreicht sind. Die 078-Stämme wurden mit den höchsten Raten in dem PLZ-

Bereich 3 (17%) festgestellt, während sie in anderen Regionen eher sporadisch auftraten. Nebensächlich wurden Ribotypen gefunden, welche durch das Toxin A, B und binäre Toxin-Gene gekennzeichnet sind, weshalb sie vermutlich als hypervirulent einzustufen sind. Eine detaillierte klinische Folgestudie sollte dies klären.

2 Einleitung

2.1 *C. difficile*

Der Erreger des heute bekannten *Clostridium difficile* wurde erstmalig in den 1970er-Jahren bekannt, als besonders bei chirurgischen Patienten unter Clindamycin-Therapie Kolitiden auftraten. So entstand in der Geschichte der Name der Antibiotika-assoziierten Kolitis (Tedesco et al. 1974). Schließlich wurde 1977 *C. difficile* als einer der wichtigsten Erreger der Antibiotika-assoziierten Kolitis erkannt (Bartlett et al. 1977).

C. difficile ist ein obligat anaerobes, gram-positives sporenbildendes Stäbchenbakterium. In einer Analyse des Genoms von *C. difficile* konnte gezeigt werden, dass 11% des Genoms aus mobilen genetischen Anteilen bestehen, welche unter anderem für die Antibiotikaresistenz, Virulenz und Veränderung der Oberflächenstruktur verantwortlich sind. Die Stoffwechselfunktionen in diesem Genomabschnitt ermöglichen das Überleben und das Wachstum im Darm des Wirtes. Diese Genomvariabilität reflektiert die Möglichkeit des Organismus, den Darm als Nische zu nutzen, wo es zur Entwicklung von Virulenzen kommt (Sebahia et al. 2006).

Die Toxinproduktion des Enterotoxin (Toxin A) und des Zytotoxin (Toxin B) werden in ihrer Expression durch einen positiven (tcdR) und einen negativen Regulator (tcdC) gesteuert. Bei den um 2007 schwer verlaufenden Infektionen mit *C. difficile* in Kanada, den USA, Großbritannien, Frankreich, Belgien und den Niederlanden handelte es sich um Erreger mit partiellen Deletionen im Gen für tcdC. Dieser neue Erreger besitzt ein weiteres, als binäres Toxin bezeichnetes Toxin und trägt die Bezeichnung Ribotyp 027. Er besitzt eine erhöhte Virulenz, welche auf eine gesteigerte Toxinproduktion zurückzuführen ist, als Folge einer Deletion der 18 bp in tcdC (Bartlett 2006; Cloud und Kelly 2007; McDonald et al. 2005).

2.2 Epidemiologie

C. difficile ist der häufigste Erreger einer nosokomialen Antibiotika-assoziierten Diarrhoe, und ist als Todesursache signifikant und zunehmend gestiegen. Bei ca. 1% aller im Krankenhaus aufgenommenen Patienten ist CDI die häufigste Ursache einer nosokomialen Diarrhoe. Bricht die Erkrankung im Krankenhaus aus, liegt die allgemeine Mortalität ebenfalls bei 1%. Bei dem Ausbruch der Erkrankung spielen kausale Zusammenhänge (wie die Verwendung von Antibiotika und Chemotherapie), ein erhöhtes Risiko einer Exposition gegenüber *C. diffi-*

cile unter immobilisierten bettlägerigen Patienten mit chronischen Krankheitszuständen, oder ein allgemeiner Systemausfall bei Patienten im Endstadium einer Krankheit eine Rolle. (Buchner und Sonnenberg 2001; Dallal et al. 2002). Man schätzt, dass CDI-Patienten bis zu drei Wochen länger im Krankenhaus bleiben als Patienten ohne CDI (Kyne et al. 2002).

Im Jahr 2008 wurde in einer Studie aus 34 Ländern eine mittlere Inzidenz der CDI von 4,1 pro 10000 Patiententage erhoben. Es konnten 65 Ribotypen von *C. difficile* differenziert werden, wobei die Prävalenz des besonders virulenten Ribotyps 027 in dieser Arbeit bei 5% lag. Im Verlauf starben 22% der untersuchten Patienten, wobei in 40% der Todesfälle (8,7% aller Patienten) eine CDI als Ursache anzusehen war. Bei den meisten Patienten bestand ein vordefiniertes Risikoprofil (höheres Lebensalter, Komorbidität, rezente Antibiotikatherapie) (Bauer et al. 2011). *C. difficile* ist in etwa 10-20 % der Fälle die Ursache der Antibiotika-assoziierten Diarrhoen und die Hauptursache für Antibiotika-assoziierte Kolitis (50-75 %) und pseudomembranöse Kolitis (mehr als 90 %) in Krankenhäusern. Die Inzidenz von symptomatischen *C. difficile* Infektionen hat im Verlauf der letzten 20 Jahre zugenommen. In Deutschland verdoppelte sich die Inzidenz in den Jahren 2002 bis 2006 von 1,7-3,8 auf 14,8 Fälle pro 100 000 stationäre Patienten. Ein großes Problem bei der Therapie ist die hohe Rate an Therapieversagen (z. B. Metronidazol 22 %, Vancomycin 14 %) und eine hohe Rezidivrate (Metronidazol 27 %, Vancomycin 24 %) (Vardakas et al. 2012).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass asymptomatische Träger toxischer *C. difficile* Stämme ein signifikant geringeres Risiko für die Entwicklung einer CDI aufweisen (Kyne et al. 2000). Bei Krankenhausaufnahme sind 3-7 % der Patienten Träger von *C. difficile*. Abhängig von Risikofaktoren wie Dauer des Krankenhausaufenthaltes, Alter des Patienten, Schwere der Grunderkrankung und Antibiotikaeinnahme steigt diese Zahl auf 16-35% (McFarland et al. 1989).

Seit April 2007 befindet sich nun auch der hochvirulente Stamm 027 in Deutschland. Dieser hypervirulente Stamm breitet sich in Deutschland aus. Es erscheint daher absehbar, dass sich nicht nur die Inzidenz und der Schweregrad einer CDAD in Deutschland erhöhen wird, sondern auch, dass bei uns zunehmend jüngere Personen betroffen sein werden. Das Robert Koch-Institut hat auf diese Veränderungen mit einer Verschärfung der Meldepflicht der CDAD reagiert (Eichel-Streiber und Braun 2008).

2.3 Klinisches Bild

Das Spektrum *C. difficile*-assoziierter Erkrankungen reicht von einer milden wässrigen Diarrhoe bis hin zur pseudomembranösen Enterokolitis mit fulminantem Verlauf und hoher Mortalität. Die Pathogenese ist multifaktoriell: Neben der Akquisition des Toxin bildenden Erregers sowie Alteration der Darmflora durch eine antibiotische/zytostatische Therapie spielen patientenspezifische Faktoren (hohes Lebensalter, Komorbidität, eingeschränkte Immunität) eine Rolle (Schlottmann et al. 2007).

In der Regel setzt die Symptomatik abrupt mit wässrigem Durchfall mit charakteristischem fauligem Geruch ein (mindestens drei Stuhlgänge pro Tag für zwei oder mehrere Tage). Blut im Stuhl wird meist nur bei sehr schweren Verläufen nachgewiesen. Weitere klinische Symptome sind Schmerzen in den unteren Quadranten des Abdomens, häufig verbunden mit Fieber sowie einer differenzialdiagnostisch wenig beachteten, aber wichtige Hinweise gebenden, ausgeprägten Leukozytose und Hypalbuminämie. Systemische Zeichen können bei milden Verläufen fehlen, sind jedoch bei schweren Verläufen fast regelhaft vorhanden. Insgesamt tritt Fieber in ~ 28% der Fälle auf, Leukozytose in ~ 50% und abdominale Schmerzen in ~ 22%. Die Hypalbuminämie ist das Ergebnis eines massiven Proteinverlustes und kann bereits früh im Krankheitsverlauf auftreten. In seltenen Fällen kann der Durchfall bei Patienten mit schweren Verläufen aufgrund eines paralytischen Ileus fehlen. Meist handelt es sich um postoperative Patienten, die Betäubungsmittel zur Schmerzbehandlung erhalten.

Krankheitsbilder: Diarrhoe, Ileus, pseudomembranöse Colitis (PMC), toxisches Megakolon, Darmperforationen, Sepsis (RKI 2014).

2.4 Diagnostik

Die Referenzstandards sind die Zellkultur-Zytotoxizitäts-Assays (CCA) und die toxigene Kultur. Bedingt durch den Nachteil, dass sie länger als 48 Stunden benötigen, wurden sie in der Praxis jedoch weitgehend verlassen und dienen z.Z. als Vergleichsstandards in Studien um neue und schnellere Testverfahren zu entwickeln (Wilcox 2012).

Aktuell angewandte Testverfahren sind zum einen die Toxin-Enzym-Immuno-Assays (EIA), welche Toxin A und B detektieren sollen. Weiterhin angewandt werden GDH-EIA, welche alle Stämme von *C. difficile* nachweisen, jedoch kein Toxin. Ebenso finden PCR-Verfahren eine Anwendung in der Diagnostik, sie weisen die Gene für das jeweilige Toxin (tcdA/tcdB) oder auch für Toxin-Regulationsproteine nach.

EIA-Tests weisen keine guten Sensitivitäten und Spezifitäten nach. Aufgrund dieser nicht idealen Vorhersagewerte sollte laut ESCMID-Empfehlungen in der *C. difficile* Diagnostik ein zweistufiges Verfahren angewendet werden (Debast et al. 2013).

Der erste durchgeführte Test sollte eine hohe Sensitivität aufweisen, um eine CDI mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können (Wilcox 2012). Dies kann laut ESCMID-Empfehlungen ein EIA auf GDH oder die Toxine A und B oder eine Realtime-PCR auf tcdB sein. Ist einer dieser ersten durchgeführten Tests negativ, so kann eine CDI wegen des hohen negativen Vorhersagewerts ausgeschlossen werden. Ist ein Test positiv, so wird – abhängig davon, welcher Erst-Test gemacht wurde – zur Bestätigung ein EIA auf GDH, ein EIA auf Toxin A und B, eine Realtime-PCR auf die tcdA/tcdB-Gene oder ein Zytotoxizitätstest durchgeführt (Crobach, M J T et al. 2009).

2.5 Therapie

Bei der CDI sollte mit einer schnellen Stufentherapie nach Diagnostik begonnen werden. Ebenso sollte die Therapie der CDI allgemeine Maßnahmen wie die Absetzung der Antibiotika des Patienten und eine supportive Therapie, die den Wasser- und Elektrolythaushalt normalisiert, umfassen. Im Anschluss daran kann eine Antibiotikatherapie in Erwägung gezogen werden, ebenso wie eine chirurgische Sanierung beispielsweise bei Darmperforationen, Peritonitis oder toxischem Megakolon (RKI 2014).

Bei der Stufentherapie ist zunächst eine Unterscheidung zwischen schwerer und nicht schwerer CDI zu treffen. Für die Praxis erscheint es sinnvoll, die Kriterien aus dem Update der ESCMID-Therapieleitlinien 2014 zu übernehmen. Diese lauten: „Eine schwere oder lebensbedrohliche CDI ist definiert als CDI Episode mit einem oder mehreren spezifischen Zeichen und Symptomen von schwerer Kolitis oder einem komplizierten Krankheitsverlauf mit signifikanten systemischen Toxin Wirkungen und Schock, der zu einer Intensivtherapie, einer Kolektomie oder zum Tod führt.“ Hinweiszeichen auf einen schweren Krankheitsverlauf (und damit prognostisch ungünstige Parameter) können die folgenden Laborwerte sein (sofern sie nicht anderweitig erklärbar sind):

- Leukozytose ($> 15 \times 10^9/l$)
- Reduziertes Serumalbumin ($< 30 \text{ g/l}$)
- Anstieg des Serumkreatinins ($\geq 1,5 \text{ mg/dl}$ oder $\geq 1,5 \times$ prämorbidem Ausgangswert)

Diese Laborwerte sollten am selben Tag wie die Stuhluntersuchung bestimmt werden. Das Lebensalter und/oder eine chronische Erkrankung (z.B. Malignom) alleine reichen zur Definition eines schweren CDI-Krankheitsverlaufes nicht aus. Mittel der ersten Wahl für die nicht schwere CDI ist Metronidazol p.o. 3x 500 mg für zehn Tage. Bei Kontraindikationen gegenüber Metronidazol (z. B. wegen Unverträglichkeit oder Schwangerschaft), stehen alternativ Fidaxomicin p.o. 2x 200 mg, Teicoplanin 2x 100–200 mg und Vancomycin p.o. 4x 125–250 mg, jeweils für zehn Tage, zur Verfügung (Debast et al. 2013).

Bei Patienten mit lebensbedrohlichen Krankheitsbildern (PMC, toxisches Megakolon) wird eine kombinierte Therapie mit Vancomycin (oral oder über enterale Sonden) und Metronidazol (i.v.) empfohlen (Gerding et al. 2008).

Rezidive sind nicht selten (ca. 10-20%), besonders bei älteren Patienten, bei Patienten unter weiterbestehender Antibiose, bei chronischen gastrointestinalen Krankheiten sowie schweren Grunderkrankungen. Die Diagnose und Behandlung eines ersten Rezidivs erfolgt in gleicher Weise wie bei der Ersterkrankung. Jedoch können Patienten auch mehrfach Rezidive erleiden. Wiederkehrende Rezidive sollten mit einer antimikrobiellen Intervalltherapie in Kombination mit Probiotika behandelt werden (Surawicz 2004).

2.6 Thematik

Die Arbeit stellt die aktuelle und nationalweite Entwicklung des Geno- und Phänotyps von *C. difficile* dar. Im Rahmen der europaweiten Punktprävalenzstudie „European, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *C. difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea“ (EUCLID), wurden zum ersten Mal in Deutschland flächendeckend 2156 Stuhlproben an Durchfall erkrankter Patienten aus insgesamt 90 Kliniken gesammelt und untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im Rahmen dieser Studie sollen zur Etablierung einer effizienteren CDI-Diagnostik dienen, ebenso um die tatsächliche Inzidenz und Epidemiologie von *C. difficile* aufzudecken und die Genauigkeit des *C. difficile* Quik Chek Complete Tests (Techlab, Firma Alere, Jena, Deutschland) zu bestimmen.

Für die Diagnostik wird in diversen Studien ein 2-3-Schritt-Algorithmus empfohlen, welcher meistens einen EIA-Test, eine zytotoxische Kultur und ein molekularbiologisches Verfahren einschließt (Debast et al. 2013). Dies wird auch in dieser Studie bestätigt.

Weiterhin wird in dieser Arbeit ein Überblick über die aktuell prädominierenden Ribotyp-Stämme geschaffen und eine Aussage über deren Toxigenität und Virulenz getroffen. Seit 2007 befindet sich der hochvirulente Ribotyp 027 in Deutschland (Jansen et al. 2010). Das führte dazu, dass eine Reihe von Studien gestartet wurde, welche die Verbreitung und Entwicklung von *C. difficile* – und dessen virulenten Stämmen – untersuchen (Deutscher Ärzte-Verlag GmbH und Ärzteblatt 2007).

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen ebenfalls die Anhäufung weiterer Stämme in Deutschland, wie z.B. der Ribotyp 001. Diese Ergebnisse wurden bereits in anderen Studien erwähnt, in denen z. B. Ribotyp 001 oder 078 durch erhöhte Resistenzmuster auffielen (Weber et al. 2013).

Aufgrund dieser Sachverhalte wurden in dieser Arbeit alle Proben ribotypisiert, so dass erstmals auch die Ausbreitung und Entwicklung der Ribotypen in Deutschland epidemiologisch dargestellt werden konnte.

Des Weiteren wurde in dieser Studie eine Empfindlichkeitsprüfung aller positiven Befunde in Bezug auf eine Therapie mit Moxifloxacin, Rifampicin, Vancomycin, Clarithromycin und Metronidazol durchgeführt, um die Resistenzen der vorherrschenden Stämme zu untersuchen und darzustellen. Die Multiresistenz des Ribotyps 027 ist mittlerweile durch diverse Studien erwiesen (Mena et al. 2012), es sind jedoch inzwischen auch weitere Stämme bekannt, welche multiple Resistenzen aufweisen (Müller et al. 2012).

3 Material und Methodik

3.1 Methodik

3.1.1 Antigennachweis (Stuhl)

Für den Nachweis von *C. difficile* in den Stuhlproben wurde der C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test (Firma Alere, Jena, Deutschland) als initialer Suchtest eingesetzt.

Dabei handelt es sich um einen Kassetten-Schnelltest, der gleichzeitig das Glutamat Dehydrogenase-Antigen (GDH) und die Toxine A und B von *C. difficile* in Stuhlproben nachweist. (C Diff Quik Chek Complete Test 2013)

Dieser Test wurde wie folgt nach Anleitung des Herstellers durch das Laborpersonal bei allen nativen Stuhlproben durchgeführt.

Anleitung des Herstellers:

1. Verdünnungspuffer vorlegen

Stuhlproben: 750 µl Verdünnungspuffer in das Reagenzglas geben.

2. Konjugat hinzufügen

1 Tropfen Konjugat in das Reagenzglas geben.

3. Proben in das Reagenzglas geben

Alle Proben müssen vorab gleichmäßig suspendiert werden. Bei flüssigen/halbfesten Proben eine Transferpipette nutzen und damit 25 µl Probe in das Reagenzglas geben. Bei festen Proben die Stuhlprobe gründlich mit einem hölzernen Applikator mischen und eine kleine Menge Probe (ca. 2 mm Durchmesser, 25 µl) in das Reagenzglas geben. Anschließend zu einer Emulsion verarbeiten. Bei Transportmedien-Proben 100 µl Probe (2 Tropfen aus der Pipette) in das Reagenzglas geben. Verdünnte Proben gründlich vermischen.

4. Proben in die Probenvertiefung der Testkassette geben

500 µl Proben-Konjugatmischung mit der Pipette in die Probenvertiefung der Testkassette übertragen (kleine Öffnung in der oberen rechten Ecke der Testkassette). Bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.

5. Waschpuffer zugeben

300 µl Waschpuffer auf das Reaktionsfenster geben (große Öffnung in der Mitte der Testkassette) und vollständig einziehen lassen.

6. Substrat zugeben

2 Tropfen Substrat auf das Reaktionsfenster geben (große Öffnung in der Mitte der Testkassette). Nach 10 Minuten das Testergebnis ablesen.

Interpretation des Testergebnisses:

Folgende Ergebnisse sind möglich:

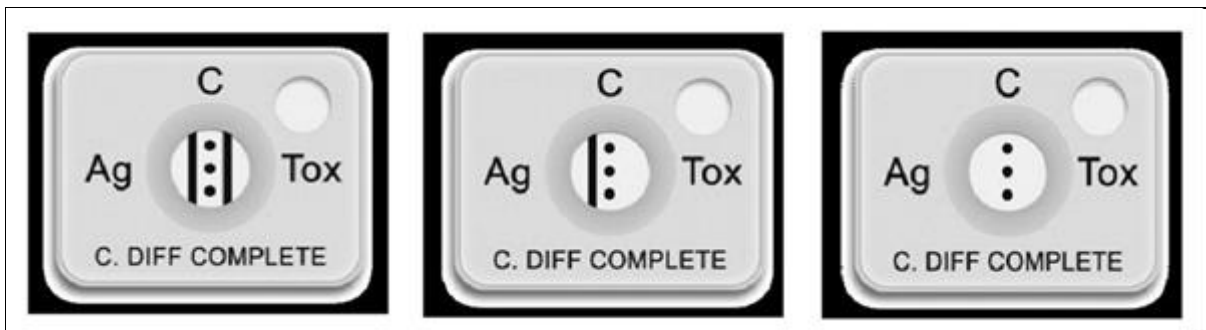


Abbildung 1: Reaktionsfenster der Testkassetten mit den möglichen Ergebnissen

Es gibt 3 mögliche Linien im zentralen Reaktionsfenster: Ag steht für GDH, C für die Kontrolle und Tox für die Toxine A/B.

Tabelle 1: Interpretation der Testergebnisse

Der Test zeigt Linien bei	Interpretation des Ergebnisses
Nur Kontrolle	Negativ
Kontrolle und Antigen	GDH positiv
Kontrolle, Antigen und Toxin	GDH und Toxin A/B positiv
Kontrolle und Toxin	Unbestimmt/Toxin positiv

Dadurch konnte primär zwischen GDH positiven Proben und GDH- negativen Proben differenziert werden. Die GDH positiven Proben wurden in der Studie weiter mit molekularen Tests untersucht. Die GDH negativen Proben wurden verworfen. Ebenso konnte bei den GDH positiven Proben unterschieden werden, ob es sich dabei um eine toxische Infektion handelte oder nicht. Dies ließ sich direkt aus den Testkassetten ablesen. Auch diese Ergebnisse wurden

mit molekularen Ergebnissen verglichen und werden im Diskussionsteil dieser Arbeit erläutert.

3.1.2 Antigennachweis Toxin A/B Test (Isolate)

Bei diesem Antigennachweis wurde derselbe GDH-Toxin-A/B-Test angewandt wie oben beschrieben. Dieses Mal wurde nicht Stuhlmaterial getestet, sondern die gezüchteten Isolate der jeweiligen Proben. Es wurde wieder der C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test verwendet. Das Verfahren wurde erneut nach Herstelleranleitung angewandt und jeweils die GDH- und die Toxin-Ergebnisse mit den molekularen Ergebnissen verglichen.

3.1.3 Anaerobe Kultur

Für die Bebrütung der Proben wurde ein CLO-Agar der Firma Biomérieux verwendet, welches einen Selektivnährboden für *C. difficile* darstellt und andere Clostridien Arten unterdrückt. Auf diesen Agar wurden die Proben anhand eines Drei-Ösen-Ausstriches aufgetragen. Zuvor wurde 1 ml der nativen Stuhlprobe mit einer sterilen Impföse entnommen. Anschließend erfolgte für 48 Stunden eine anaerobe Bebrütung der Petrischalen bei 37° C in einem GENbox-Anaerobiertopf (Biomérieux). Im Anschluss daran wurden die Proben mit MALDI-TOF (Maldi-Biotyper, Bruker) untersucht, um die positiven Proben zu bestätigen. MALDI-TOF ist ein Massenanalyseverfahren, welches aus einer Laserionisation und einer Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator besteht. Ebenso flossen in die Interpretation der Ergebnisse folgende Kriterien ein: Für eine positive *C. difficile* Kultur sprach das Ergebnis, wenn die Morphologie der gewachsenen Kolonie weiß-gräulich, flach, nicht scharf begrenzt und nicht hämolisierend war. Ein weiteres Kriterium war der Pferdestall-ähnliche Geruch der Kultur. Nach erfolgreicher Bestätigung des Nachweises von *C. difficile* genügte eine anaerobe Bebrütung auf einer Columbia Agarplatte.

3.1.4 PCR (Stuhl)

Für die molekulargenetische Untersuchung von den GDH positiven *C. difficile* Proben, wurde das GenoType CDiff-Testsystem der Firma HAIN Lifescience eingesetzt. Dieses Testsystem dient zur Identifizierung von *C. difficile* aus Stuhl- und Kulturproben, ebenso wie zur Differenzierung von apathogenen, virulenten und hochvirulenten Stämmen wie z.B. der Ribotyp 027.

Die Identifizierung des *C. difficile* wird anhand der Detektion der *tpi*-Lokuskontrolle ermöglicht. Weiterhin können die Toxingene *tcdA* und *tcdB* nachgewiesen werden, welche für das Toxin A und das Toxin B codieren. Anhand dessen ist eine Aussage bezüglich der Virulenz des vorhandenen Keimes möglich. Ebenso können die binären Toxingene *cdtA/cdtB* nachgewiesen werden welche für das binäre Toxin CDT codieren. Des Weiteren können Deletionen in den Regulatorgenen *tcdC* oder Moxifloxacin-Resistenzen nachgewiesen werden. Die Resistenz gegenüber Moxifloxacin wird anhand einer Mutation im *gyrA*-Gen registriert und nachgewiesen. Anhand dieser Muster kann dann beispielsweise der hochvirulente Ribotyp 027 identifiziert werden, je nachdem welche Gene in den jeweiligen Proben exprimiert wurden.

Der gesamte Testablauf wird in drei Phasen unterteilt: DNA-Isolierung aus den Stuhlproben, Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern vermehrt und reverse Hybridisierung. Anschließend werden die Farbreaktionen des Bandenmusters anhand einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten Schablone visuell ausgewertet.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden detailliert dargestellt.

DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung wurde der GenoXtract-Isolierungsautomat der Firma HAIN Lifescience in Kombination mit dem GXT Stool Extraction Kit verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht eine einfache und schnelle automatisierte Gewinnung bakterieller DNA aus Stuhlproben.

Das Verfahren basiert auf der Magnetic-Bead-Technologie. Die automatische Isolierung der DNA wird in vier Phasen unterteilt: Zellyse, Kopplung der freigesetzten DNA an Magnetpartikel, Waschen des DNA-Magnetpartikel-Komplexes und Elution der DNA.

Bevor die Durchführung startete, wurden Positivkontrollproben vorbereitet. Die Positivkontrollprobe wurde anschließend wie eine Patientenprobe eingesetzt und verarbeitet.

Durchführung der DNA-Isolierung

Im ersten Schritt wurden 100mg Stuhl mit einem Abstrichtupfer aus der Stuhlprobe entnommen. Anschließend wurde der Tupfer für 10 Sekunden mit 1 ml "Stool Stabilizer"-Puffer in einem 2-ml-Schraubdeckelgefäß ausgewaschen. Im Anschluss daran wurde die Probe für 5 min zum vortexen bei maximaler Geschwindigkeit mit dem VV3-Vortexer behandelt. Daraufhin wurde die Probe für 4 min bei 5.000 x g in einer Standard-Tischzentrifuge zentrifugiert und 600 µl des resultierenden Überstandes in ein 2-ml-Schraubdeckelgefäß überführt. Im letzten Schritt wurden die Proben in einem Probengefäß in das GenoXtract-Gerät gesetzt und

dieses gemäß Anleitung des Herstellers bedient. Nach dem Lauf wurde das Eluat aus dem Gerät entnommen und war bereit für die Amplifikation.

Amplifikation

Der Amplifikationsmix wurde auf Eis in einem Reinraum hergestellt. Dafür wurden pro Ansatz 35 µl Primer-Nukletid-Mix, 5 µl 10-fach PCR Puffer, 2 µl 25mM MgCl₂-Lösung, 0,3 µl DNA Taq Polymerase und 3 µl Wasser (molecular biology grade) in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde dieser Amplifikationsmix zu je 45 µl in ein Multiply-µStrip-Gefäß aliquotiert. In einem separaten Bereich wurden dann 5 µl der DNA-Lösung dazu pipettiert und durchmischt. Zu jedem Ansatz wurde eine Kontaminationskontrolle zugesetzt, welche statt der 5 µl DNA-Lösung 5 µl Wasser enthielt. Somit enthielt jede Probe zum Schluss 50 µl, welche vor der Amplifikation noch mit dem Galaxy Mini Star (VWR) zentrifugiert wurden.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (GTQ-Cycler 24, HAIN Lifescience) nach folgendem Schema:

Tabelle 2: Programmierungsprotokoll des Thermocyclers für die Amplifikation der DNA

1. Schritt	5 min bei 95°	
2. Schritt	30 sek bei 95°	10 Zyklen
	2 min bei 58°	
3. Schritt	25 sek bei 95°	20 Zyklen
	40 sek bei 53°	
	40 sek bei 70°	
4. Schritt	8 min bei 70°	

Hybridisierung

Die reverse Hybridisierung zur Detektion der positiven Signale erfolgte automatisiert mit dem ProfiBlot II T (Tecan). Generell besteht Schritt eins aus der Denaturierung der Amplifikationsprodukte und Schritt zwei aus der Hybridisierung der Biotin-markierten einzelsträngigen Amplifikate an membrangebundene Sonden. Im dritten Schritt werden alle unspezifisch gebundenen Amplifikate entfernt und letztendlich ein Streptavidin/Alkalische Phosphatase(AP)-Komplex hinzugegeben, der zu einer AP-vermittelten Farbreaktion führte.

Es wurden für jede zu untersuchende Probe 20 µl Denaturierungsreagenz in eine Inkubationswanne pipettiert. Anschließend wurde dieselbe Menge der Probe hinzugegeben und durch Auf- und abpipettieren gemischt. Bei Raumtemperatur wurde das Denaturierungsreagenz-Amplifikat-Gemisch für 5 Minuten inkubiert. Die Lösungen für Konjugat und Substrat wur-

den vorbereitet, indem das jeweilige Konzentrat mit dem entsprechenden Puffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt wurde. Anschließend wurde die Wanne in den zuvor nach Herstellerangaben vorbereiteten ProfiBlot II T (Tecan) eingelegt und folgendes Programm gestartet:

Hybridisierung

- Inkubation mit 1 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung für 2 Minuten bei 45 °C
- Pause zum Einlegen der mit Gelstift nummerierten Membranstreifen
- Weitere Inkubation für 30 Minuten bei 45 °C
- Absaugen der Lösung

Entfernung der unspezifisch gebundenen Amplifikate

- Inkubation mit 1 ml vorgewärmter Stringent-Waschlösung für 15 Minuten bei 45 °C
- Absaugen der Lösung

Konjugation mit Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Komplex

- Inkubation mit 1 ml Konjugat (1:100 verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen der Lösung

Waschen der Membranstreifen (je 2x)

- Inkubation mit 1 ml Rinse-Lösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen der Lösung

Waschen der Membranstreifen

- Waschen mit 1 ml Aqua destillata für 2 Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen der Lösung
- Alkalische Phosphatase-vermittelte Farbreaktion
- Inkubation mit 1 ml Substrat (1:100 verdünnt) für 6 Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen der Lösung

Waschen der Membranstreifen (je 2x)

- Waschen mit 1 ml Aqua destillata für 2 Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen der Lösung

Nach Beendigung des Programms wurden die Streifen aus ihrer jeweiligen Kavität entnommen, wenige Minuten an der Raumluft getrocknet und mit transparentem Klebestreifen auf dem zugehörigen Protokollbogen befestigt.

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand des Bandenmusters der Membranstreifen. Für die Interpretation wurde eine Schablone der Firma HAIN Lifescience eingesetzt.

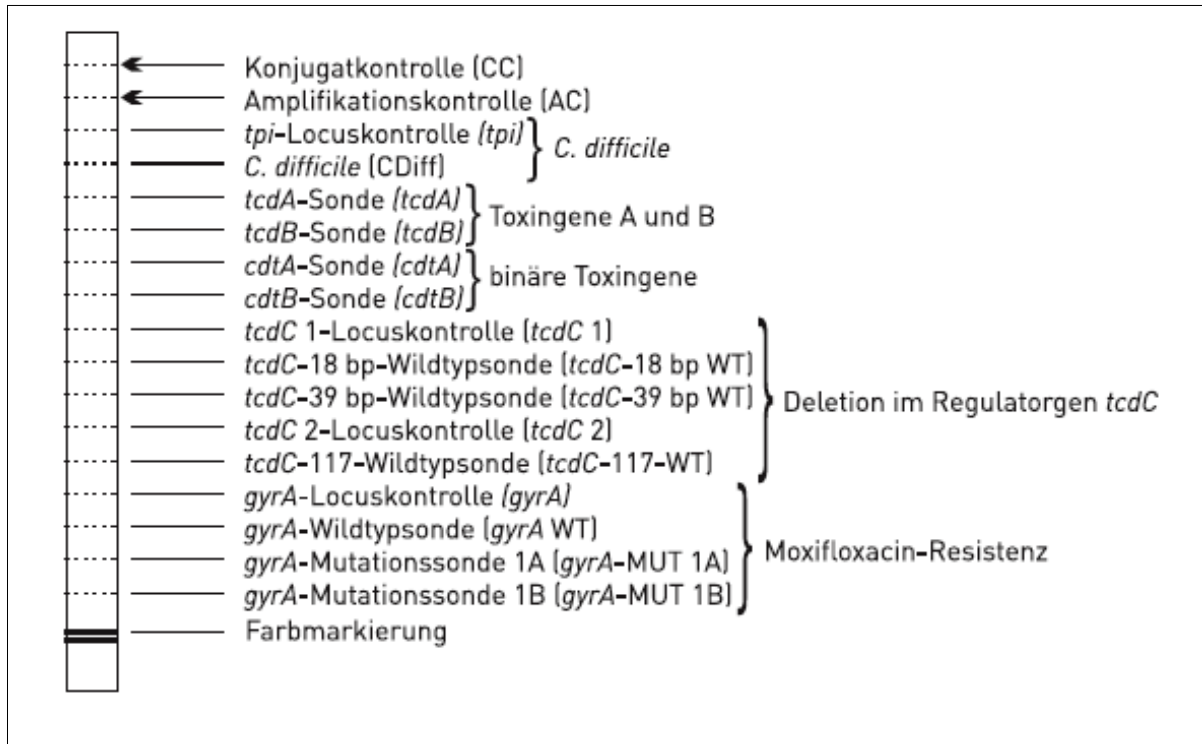


Abbildung 2: Schablone aus der Testanleitung von HAIN Lifescience zur Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Konjugatkontrolle (CC) dokumentiert die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion und muss immer entwickelt sein. Währenddessen kann durch die Amplifikationskontrolle (AC) ein Fehler beim Ansatz oder der Durchführung der Amplifikation ausgeschlossen werden, wenn sie positiv ist. Sie kann jedoch auch aufgrund von Kompetitionsreaktionen abgeschwächt sein oder ganz fehlen. Trotzdem kann in diesem Fall ein positives Testergebnis weiter als positiv gewertet werden.

Die tpi-Locuskontrolle (tpi) sowie die *C. difficile*-Bande (CDiff) stehen bei einer positiven Entwicklung als Nachweis für den *C. difficile* Keim. Sind diese Banden positiv ist eine *C. difficile* Infektion vorhanden, sind sie negativ bedeutet dies einen *C. difficile* Ausschluss. Handelt es sich um einen positiven *C. difficile* Befund, muss die gyrA-Locuskontrolle ebenfalls positiv sein.

Die Locuskontrollen tcdC 1 und tcdC 2 müssen nicht immer entwickelt sein, da sie für die Genbereiche eines virulenten Stammes von *C. difficile* stehen.

Die Toxingen-Sonden tcdA und tcdB stehen für einen spezifischen Bereich des jeweiligen Toxingens. Sie können zusammen oder getrennt entwickelt sein, was für das Vorhandensein oder die Abwesenheit des jeweiligen Toxins spricht. Ähnlich verhält es sich bei der Interpretation der Sonden für das binäre Toxingen cdtA und cdtB. Beide Sonden stehen für einen spezifischen Bereich des jeweiligen binären Toxingens. Diesmal ist jedoch die Anwesenheit von beiden Reaktionszonen notwendig um das Vorhandensein des binären Toxins nachzuweisen. Keine Entwicklung spricht dementsprechend für die Abwesenheit des binären Toxins.

Die Sonden tcdC-18 bp WT, tcdC-39 bp WT und tcdC-117 WT liegen in Bereichen des Regulatorgens tcdC des *C. difficile*. Eine partielle Deletion dieser Bereiche (einzeln oder zusammen) charakterisiert einen hochvirulenten *C. difficile* Stamm. Eine Deletion bedeutet ebenso eine erhöhte Toxinproduktion des jeweiligen Stammes. Dementsprechend spricht man von einem Wildtyp, wenn eine dieser Sonden fehlt (Deletion).

Bei der gyrA-Wildtypsonde (gyrA WT) handelt es sich um einen Resistenzbereich, welcher für eine Moxifloxacin-Resistenz des jeweiligen Stammes steht. Der Wegfall der Sonde (durch eine Mutation in dem Gen) bedeutet dementsprechend für die jeweilige Probe, dass es sich um einen Moxifloxacin-resistenten Stamm handelt.

Die gyrA-Mutationssonden MUT1A und MUT1B detektieren die beiden häufigsten Mutationen im gyrA-Gen. Eine entwickelte Sonde spricht dementsprechend für eine Mutation in dem Gen, was als Folge eine Moxifloxacin-Resistenz des jeweiligen Stammes bedeutet.

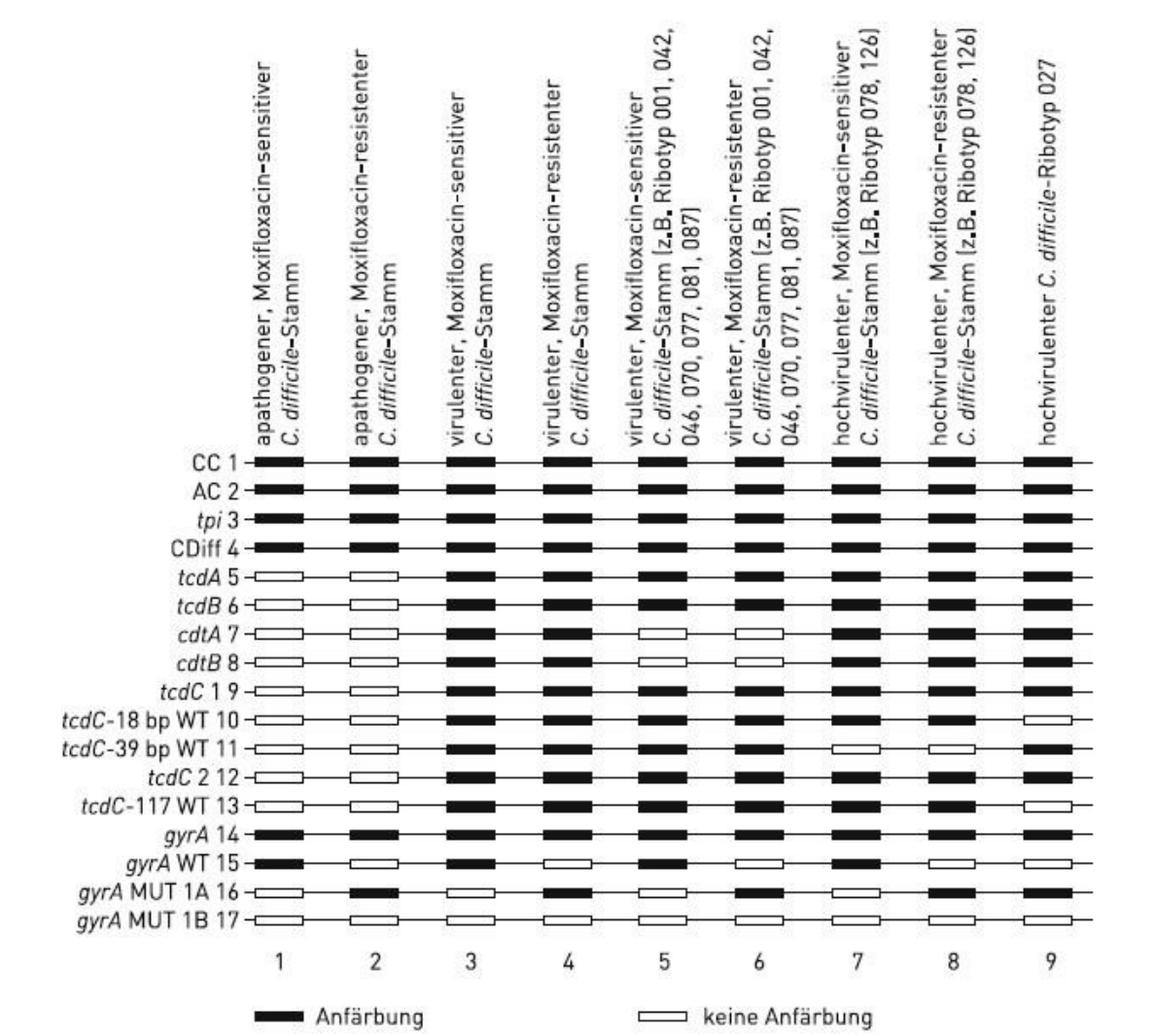


Abbildung 3: Schablone mit möglichen Bandenmustern und deren Auswertung der Firma HAIN Lifescience

3.1.5 Toxin PCR (Isolate)

Zusätzlich zu der PCR aus Stuhlmaterial wurde eine Multiplex PCR gefertigt, welche dieses Mal nicht aus nativem Stuhlmaterial gewonnen wurde, sondern aus den Kulturisolaten (siehe Kapitel 3.1.3).

Der Ansatz für die Multiplex-PCR wurde im Reinraum hergestellt. Folgende Bestandteile wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert: 12,5 µl Hotstart PCR Mastermix, 9 µl Nuclease-Free Water, 0,15 µl Primer tcdA-F3345, 0,15 µl Primer tcdA-R3969, 0,1 µl Primer tcdB-R5670, 0,05 µl Primer tcdB-R6079A, 0,05 µl Primer tcdB-R6079B, 0,05 µl Primer cdtA-F739A, 0,05 µl Primer cdtA-F739B, 0,1 µl Primer cdtA-R958, 0,1 µl Primer cdtB-F617, 0,1 µl Primer cdtB-R878, 0,05 µl Primer 908CLD_dluDs und 0,05 µl Primer 909CLD_dluDs mit einer Primerkonzentration von 100 µmol.

Tabelle 3: Übersicht der bei der Multiplex-PCR eingesetzten Primer

Target	Primername	Sequenz (5'-3')	Länge
tcdA	tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTAa	629 bp
	tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
tcdB	tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	410 bp
	tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	
	tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	
cdtA	cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	221 bp
	cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	
	cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
cdtB	cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262 bp
	cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	
GLDH	908CLD_glu	GTCTTGGATGGTTGATGAGTAC	158 bp
	909CLD_glu	TTCCTAATTTAGCAGCAGCTTC	

Diesem Ansatz wurden 2,5 µl der aufgereinigten DNA, des zu analysierenden *C. difficile* Isolates hinzugefügt. Für den Ablauf der Multiplex-PCR im Thermocycler wurde folgendes Schema gewählt:

Tabelle 4: Programmierung des Thermocyclers für die Multiplex-PCR

Temperatur [°C]	Dauer	
95	15 min	
94	45 sek	35 Wiederholungen
50	45 sek	
72	1 min	
72	10 min	
15	∞	

Nach Durchführung der PCR wurden die PCR-Produkte auf einem 2-prozentigen QA-Agarosegel™ (MP North American) aufgetragen und durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Dabei enthielt jede Tasche des Gels 2,5 µl SYBR Gold Mix und 5 µl PCR-Produkt. Der SYBR Gold Mix setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: SYBR Gold nucleic acid gel stain (molecular probes) 1:100 verdünnt mit Dimethylsulfoxid, 70 µl dieser Verdünnung wurde nochmals mit 1000 µl Loading dye (Fermentas) vermischt. In jeder Gelelektrophorese wurde neben der DNA der Isolate auch eine Negativkontrolle (H₂O) und ein Ladder (Größenmarker) mitgeführt. Das Gel konnte nach 90 Minuten Laufzeit bei 100 Volt ausgewertet werden. Dies erfolgte durch eine Aufnahme mit dem Gel Doc XR+ System (Bio-

Rad). Auf diese Weise lassen sich vorhandene Toxingene sowie das GLDH – wie in Abbildung 4 gezeigt – nachweisen.

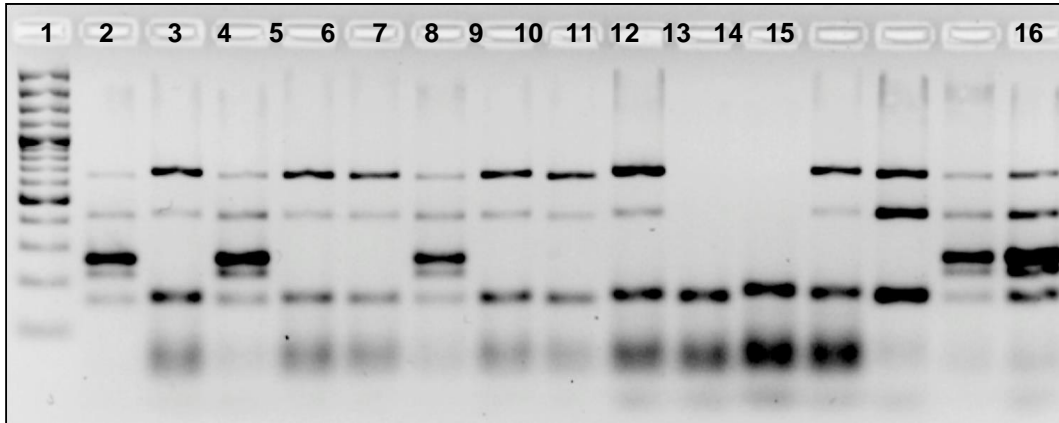


Abbildung 4: Toxingene der Multiplex-PCR. 1: tcdA, 2: tcdB, 3: cdtA und 4: GLDH

3.1.6 Ribotypisierung

Das Prinzip der Ribotypisierungs-PCR beruht darauf, dass die rRNA-Operons bei jedem Ribotyp an unterschiedlichen Orten der rRNA zu finden sind. Ein Operon ist eine Funktionseinheit der DNA bzw. rRNA, die für ein bzw. für mehrere Proteine codiert. Dies hat zur Folge, dass am Ende der PCR jedem Ribotyp eine spezifische Kombination aus Anzahl und Fragmentgrößen der Operons zugeordnet werden kann. Die verwendeten Primer sind komplementär zu dem 3'-Ende des 16S rRNA-Gens und dem 5'-Ende des 23S rRNA-Gens. Dadurch wird die so genannte intergenic spacer region (ISR) amplifiziert.

Tabelle 5: Verwendete Primer der Ribotypisierung

Target	Primernamen	Sequenz (5'-3')	Länge
23 S	23 S	CCC TGC ACC CTT AAT AAC TTG ACC	200-600 bp
16 S	16S-BMN5	GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT	

Der verwendete PCR-Mix setzte sich für eine Probe wie folgt zusammen: 12,5 µl Hostart PCR-Master-Mix, 0,25 µl Primer 23 S, 0,25 µl Primer 16S-BMN5, 9 µl Nuclease-Free Water. Die Primerkonzentration betrug 100 µmol. Zu diesem PCR-Mix wurden 3 µl der 1:10 vorverdünnten DNA des *C. difficile* Isolates hinzugefügt.

Tabelle 6: Programmierung des Thermocyclers für Ribotypisierungs-PCR

Temperatur [°C]	Dauer	
95	5 min	
92	1 min	26 Wiederholungen
55	1 min	
72	1,5 min	
95	1 min	
55	45 sek	
72	5 min	
4	∞	

Anschließend konnten die Proben in den Thermocycler gestellt werden, der gemäß der Darstellung in Tabelle 6 programmiert wurde.

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Taschen des 1-prozentigen QA-Agarosegels™ (MP North American) enthielten: 2,5 µl SYBER Gold Mix und 5 µl PCR-Produkt. Auch hier enthielt jedes Gel zusätzlich zu den Amplifikaten einen Ladder und eine Negativkontrolle. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 100 Volt. Danach konnte eine Aufnahme des Gels durch das Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) erstellt werden. Amplifikation bezeichnet die Vermehrung von DNA-Abschnitten. Sie wird in der Molekularbiologie in vitro zur Vermehrung von DNA verwendet (Debatisse und Malfoy 2005)

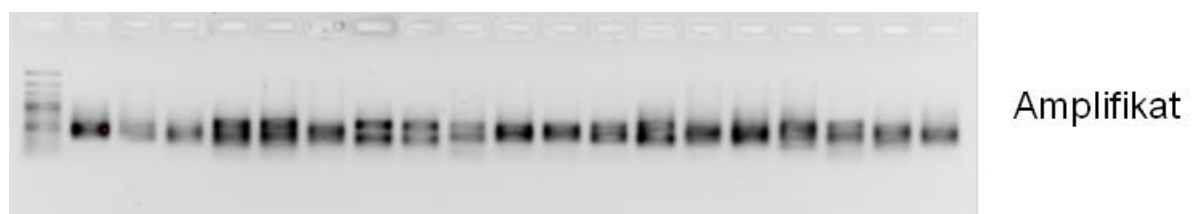


Abbildung 5: Aufnahme eines Agarose-Gels mit Ribotypisierungs-PCR-Amplifikaten

Die Proben, für welche die Erfolgskontrolle positiv ausfiel, wurden 1:100 verdünnt, um sie für die DNA-Sequenzierung vorzubereiten. Das Prinzip der DNA-Sequenzierung ist es, eine Elektrophorese der PCR-Amplifikate innerhalb einer Kapillare durchzuführen. Als Ergebnis erhält man ein Bandenmuster.

3.1.7 Antibiotika-Resistenztestung

Die Antibiotika-Resistenztestung wurde für fünf Antibiotika durchgeführt (Vancomycin, Metronidazol, Moxifloxacin, Clarithromycin und Rifampicin). Genutzt wurden hierfür der E-Test (Epsilon-Meter-Test) und der Plattendiffusionstest.

Der E-Test basiert auf einem Papierstreifen, der mit einem Antibiotikum getränkt ist, dessen Konzentration vom Anfang des Streifens bis zu seinem Ende kontinuierlich exponentiell zunimmt. Die in den verschiedenen Segmenten enthaltenen Wirkstoffkonzentrationen sind wie bei einem Lineal auf den Teststreifen aufgedruckt.

Der Epsilon-Teststreifen wird in der Petrischale auf den Nährboden gelegt, der mit der zu untersuchenden Bakterienkultur beimpft wurde. Nach Bebrütung der Kultur kann 24 Stunden später die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums für das untersuchte Bakterium abgelesen werden. Sie entspricht der Konzentration, bei der die Hemmhof-Ellipse den Teststreifen überkreuzt.

Mittels des E-Tests wurden die MHK's für Vancomycin, Metronidazol und Moxifloxacin ermittelt.

Der Plattendiffusionstest verwendet ebenfalls einen Nährboden, welcher mit einer Bakterien-suspension beimpft wird. Diese Organismen führen nach Bebrütung der Agarplatte zu einem makroskopisch sichtbaren Bewuchs, der sich als Trübung des Agars bemerkbar macht. Durch Aufbringung wachstumshemmender Stoffe auf dem Agar mittels Plättchen wird das Wachstum der Organismen modifiziert.

Im Plättchentest wurden Testplättchen mit Clarithromycin und Rifampicin verwendet.

Zu Beginn wurde ein 5-ml-Röhrchen mit 2,5 ml NaCl 0,9% aufgefüllt, in welches mittels eines Tupfers Bakterien von der Platte beigefügt wurden, bis eine Trübung auftrat, die einem McFarland >4 entsprach. Diese Suspension wurde mittels eines frischen Tupfers auf zwei Columbia-Agarplatten in drei Ebenen aufgestrichen. Auf eine Platte kamen zwei E-Tests, auf die andere ein E-Test und zwei Plättchentests. Anschließend wurden die Agarplatten bei 37 Grad für 24 h anaerob bebrütet. Anhand der Plättchentests konnte man direkt ablesen, ob es sich um sensible oder resistente Stämme handelte. Von den E-Tests wurden die MHK abgelesen. Die MHK der Proben lag zwischen 0,001 mg/L und 32 mg/L.

3.2 Geräte, Reagenzien und Software

Die Übersicht der verwendeten Geräte, Reagenzien und Software ist im Anhang dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Proben und eingeschlossene Kliniken

Insgesamt wurden 2156 Proben aus 90 deutschen Kliniken eingesandt. Teilweise bestanden die einsendenden Kliniken aus kumulierten Häusern. Daraus resultierend ergab sich eine Gesamtzahl von 155 Teilnehmern, welche in allen Postleitzahlbereichen Deutschlands vertreten waren. Das Projekt wurde in zwei Phasen geteilt, welche sich an die vorgegebenen Zeiten der europäischen Prävalenzstudie (Euclid) hielten. Die erste Phase, die Winterphase, begann im Frühjahr 2013. Die zweite Phase begann entsprechend ein halbes Jahr später im Sommer 2013. In beiden Phasen konnte eine annähernd gleiche Anzahl an Proben gewonnen werden.

Tabelle 7: Anzahl der Proben und Kliniken nach Postleitzahlbereich

Postleitzahlbereich	Anzahl Teilnehmer	Anzahl Proben 1. Durchlauf	Anzahl Proben 2. Durchlauf	Anzahl Gesamtproben
0	17	103	107	210
1	11	84	47	131
2	7	82	66	148
3	3	41	28	69
4	51	290	264	554
5	31	170	147	317
6	9	95	101	196
7	17	153	103	256
8	5	77	59	136
9	4	81	58	139
Gesamt	155	1176	980	2156

Alle empfangenen Proben bestanden aus Stuhlmaterial. Lediglich 99 der Proben konnten nicht weiter untersucht werden, da sie nicht ausreichend Material zur Verarbeitung enthielten. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von 2057 verwendeten Proben.

Verarbeitungsprozess der Proben

In einem ersten Schritt wurden die verwendbaren Proben einem Antigennachweistest unterzogen (GDH- und Toxin A/B-Test). Die Stühle, die ein positives Testergebnis (n=472) lieferten, wurden anschließend auf einen Nährboden aufgestrichen und als anaerobe Kultur gezüchtet. Parallel dazu wurde eine PCR der nativen Stühle durchgeführt.

Mit den Kulturen, welche ein positives Ergebnis hervorbrachten (n=424), wurde erneut der Antigennachweistest (GDH- und Toxin A/B-Test) durchgeführt, ebenso wie eine Empfindlichkeitsprüfung auf die Antibiotika Vancomycin, Metronidazol, Moxifloxacin, Clarithromycin und Rifampicin. Weiterhin wurde eine Ribotypisierung aller Proben durchgeführt.

Die GDH negativen Proben wurden ausgeschlossen. Eine Übersicht der Arbeitsprozesse ist als Baumdiagramm im Anhang beigefügt.

4.2 Diagnostische Testverfahren

4.2.1 GDH- und Toxin A/B-Test (Stuhl)

Von der Gesamtheit der untersuchten Stuhlproben (n=2057) wurden 472 durch den GDH-Test als GDH positiv erkannt (22,95%). Sie bilden die Grundlage für die weiteren diagnostischen Testverfahren, die sich anschließen.

Durch die im Anschluss durchgeführte PCR aller 472 GDH positiven Proben, konnte ein genetisches Profil erstellt werden, welches sich nach der tpi-Bande, der tcdC-Bande und der Empfindlichkeit gegen Moxifloxacin richtete. Daraus ist ein Schema entstanden, welches dazu dient, die weiteren diagnostischen Verfahren zu vergleichen. Es ist in der folgenden Tabelle zu sehen.

Tabelle 8: Genetisches Profil der GDH-positiven Proben

Genetisches Profil	Anzahl GDH positive Proben (absolut und relativ)		tpi	Toxingene	tcdC	Moxifloxacin Empfindlichkeit
	absolut	relativ				
Apathogen	25	5,30%	positiv	negativ	negativ	WT
Apathogen	1	0,21%	positiv	negativ	negativ	Mutation
Virulent	13	2,75%	positiv	binär	WT	WT
Virulent	25	5,30%	positiv	binär	WT	Mutation
Virulent	153	32,42%	positiv	A,B	WT	WT
Virulent	88	18,64%	positiv	A,B	WT	Mutation
Hochvirulent	8	1,69%	positiv	binär	delta-39bp	WT
Hochvirulent	3	0,64%	positiv	binär	delta-39bp	Mutation
Ribotyp 027	71	15,04%	positiv	binär	delta-18bp,117	Mutation
Keine CDI (tpi=0)	46	9,75%	negativ	negativ		
Keine Zuordnung	39	8,26%	positiv	A,B,binär	diverse	nicht auswertbar
Gesamt	472	100%				

Das Ergebnis des daraufhin ausgeführten Toxin A/B Tests erbrachte als Resultat 255 toxische Proben (54,03%) und konnte damit im Vergleich mit der PCR, die 400 Proben als toxisch (84,75%) identifizierte, nicht mithalten. Hinzu kommt, dass der Toxin A/B-Test in 13 Fällen positiv war, in denen die PCR jedoch ein negatives Ergebnis lieferte. Dies kann man als 13 falsch positiv getestete Proben des Toxin A/B-Tests werten.

Ein besseres Ergebnis lieferte der Toxin A/B-Test bei der Erkennung der nicht toxischen Proben. Die PCR identifizierte 26 Proben als apathogen und nicht toxisch, die der Toxin A/B-Test ebenfalls alle als nicht toxisch erkannte.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Toxin A/B-Tests ersichtlich.

Tabelle 9: Toxin A/B-Test bezogen auf das genetische Profil der GDH positiven Proben

Genetisches Profil	Anzahl	tpi	Toxingene	tcdC	Moxifloxacin-Empfindlichkeit	Toxin A/B-Test
Apathogen	25	positiv	negativ	negativ	Wildtyp	0
Apathogen	1	positiv	negativ	negativ	Mutation	0
Virulent	13	positiv	binär	WT	Wildtyp	8
Virulent	25	positiv	binär	WT	Mutation	20
Virulent	153	positiv	A,B	WT	Wildtyp	77
Virulent	88	positiv	A,B	WT	Mutation	59
Hochvirulent	8	positiv	binär	delta-39bp	Wildtyp	4
Hochvirulent	3	positiv	binär	delta-39bp	Mutation	1
Ribotyp 027	71	positiv	binär	delta-18bp,117	Mutation	58
Keine CDI (tpi=0)	46	negativ	negativ			13
Keine Zuordnung	39	positiv	A,B,binär	diverse	nicht auswertbar	15
Gesamt	472					255

4.2.2 PCR (Stuhl)

Mit der PCR konnte in 426 der GDH positiven Proben (n=472) eine CDI bestätigt werden (90,25%). In den restlichen 46 Fällen lieferte der Test ein negatives Ergebnis (9,75%).

In der weiteren Auswertung wurden 400 Proben als toxisch (84,75%) und 26 als nicht toxisch (5,51%) erkannt. Addiert man zu diesen 26 nicht toxischen Proben noch die 46 Proben mit negativem PCR-Ergebnis, dann wurden in Summe 72 nicht toxische Proben durch die PCR erkannt (15,25%).

Nach weiterer Auswertung konnten die verschiedenen Toxin-Typen entschlüsselt werden. Das Ergebnis waren 10 Proben mit Toxin A (2,12%), 2 Proben mit Toxin B (0,42%), 253

Proben mit Toxin A,B (53,60%), 5 Proben mit Toxin A,binär (1,06%) und 130 Proben mit Toxin A,B,binär (27,54%).

Daraus ergibt sich eine Gesamtsumme von 265 Proben des Toxintyps "AB" (56,14%), 135 Proben des binären Toxintyps "ABC" (28,60%) und 72 nicht toxischen Proben (15,25%). Das Ergebnis kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 10: Übersicht der Toxintypen der PCR aus dem nativen Material

Toxintyp	Anzahl absolut und relativ	
A	10	2,12%
B	2	0,42%
A,B	253	53,60%
A,binär	5	1,06%
binär	130	27,54%
nicht toxischen	72	15,25%
Gesamt	472	100%

4.2.3 Kultur

Aus den GDH positiven Proben (n=472) konnten 424 Isolate gewonnen werden (89,83%). In 48 Fällen ergab die Anzucht kein Wachstum (10,17%). Die 424 Isolate bilden die Grundlage für die weiteren diagnostischen Verfahren.

Des Weiteren konnten die gewonnenen Isolate dem genetischen Profil der PCR zugeordnet werden. Aus vier dieser genetischen Profile konnten zu 100% alle Proben angezüchtet werden. Die restlichen lagen im Durchschnitt um etwa 90%. Es fiel jedoch auch auf, dass bei 17 der Proben, die durch die PCR als CDI negativ bestätigt wurden, ein Wachstum zu erkennen war (3,6% von n=472). Sie sind als Kultur falsch positive Proben aufzufassen. Grund dafür kann eine Mischinfektion der Proben sein, die zu einem Wachstum in der Kulturanzucht führte. In der folgenden Tabelle sind alle Ergebnisse aufgelistet.

Tabelle 11: Übersicht der Kulturoisolate bezogen auf das genetische PCR-Profil

Genetisches Profil	Anzahl	Toxin	tcdC	Moxifloxacin-Empfindlichkeit	Kulturoisolate
Apathogen	25	negativ	negativ	Wildtyp	23
Apathogen	1	negativ	negativ	Mutation	1
Virulent	13	binär	WT	Wildtyp	13
Virulent	25	binär	WT	Mutation	24
Virulent	153	A,B	WT	Wildtyp	145
Virulent	88	A,B	WT	Mutation	85
Hochvirulent	8	binär	delta-39bp	Wildtyp	8
Hochvirulent	3	binär	delta-39bp	Mutation	2
Ribotyp 027	71	binär	delta-18bp,117	Mutation	71
Keine CDI (t _{pi} =0)	46	negativ			17
Keine Zuordnung	39	A,B,binär	diverse	nicht auswertbar	35
Gesamt	472				424

4.2.4 Toxin A/B-Test (Isolate)

Mit den Kulturoisolaten (n=424) wurde erneut der C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test durchgeführt, um die Toxine A und B zu bestimmen. Das Ergebnis erbrachte 371 toxische Proben (87,50%) und 53 nicht toxische Proben (12,50%). Diesmal wurden 33,47% mehr Proben erkannt als beim Toxin A/B-Test aus dem nativen Material.

Tabelle 12: Ergebnisse des Toxin A/B-Tests aus den Isolaten

Genetisches Profil	Anzahl	Toxin	tcdC	Moxifloxacin-Empfindlichkeit	Toxin A/B Test (Isolate)
Apathogen	25	negativ	negativ	Wildtyp	1
Apathogen	1	negativ	negativ	Mutation	0
Virulent	13	A,B,binär	WT	Wildtyp	12
Virulent	25	A,B,binär	WT	Mutation	24
Virulent	153	A,B	WT	Wildtyp	134
Virulent	88	A,B	WT	Mutation	82
Hochvirulent	8	A,B,binär	delta-39bp	Wildtyp	6
Hochvirulent	3	A,B,binär	delta-39bp	Mutation	2
Ribotyp 027	71	A,B,binär	delta-18bp,117	Mutation	70
Keine CDI (t _{pi} =0)	46	negativ			14
Keine Zuordnung	39	A,B / A,B,binär	diverse	nicht auswertbar	26
Gesamt	472				371

Vergleicht man nun die Resultate mit den toxischen Ergebnissen der PCR, welche in dem Fall auf die Isolate bezogen wird (n=424, toxische Proben n=383), ergibt sich, dass der Toxin

A/B-Test 96,87% der Fälle erkennen konnte (371 Proben). Allerdings sind in diesen Proben 14 Fälle enthalten, die bei der PCR als CDI negativ erkannt wurden. Sie werden als falsch positive des Toxin A/B-Tests zugeordnet. Weiterhin wurde durch den Toxin A/B-Test eine Probe als toxisch erkannt, die in der PCR als nicht toxisch identifiziert wurde. Sie wird ebenfalls als falsch positiv gewertet. Nach Abzug dieser falsch positiven Proben bleiben 356 richtig erkannte. Dadurch wird das Erkennungspotential des Toxin A/B-Tests auf 92,95% gemindert.

4.2.5 Toxin PCR

Aus allen Isolaten (n=424) konnte durch die Multiplex-PCR bestätigt werden, dass es sich bei allen Proben um ein positives GDH-Ergebnis handelt (100%). Als toxisch wurden 380 Fälle erkannt, was einem Anteil von 80,50% der Gesamtzahl der untersuchten Proben (n=472) entspricht. Als nicht toxisch wurden 92 Proben erkannt, was einen Anteil von 19,94% ergibt. In diesen 92 Proben sind 48 Fälle enthalten, die bei der Kulturanzucht kein Wachstum zeigten. Sie werden deshalb als nicht toxisch bewertet, da sie durch das Kultur negative Ergebnis auch keinen Toxinnachweis hervorbringen können.

Im Vergleich mit dem toxischen Ergebnis der nativen PCR, bezogen auf die Isolate (n=424, toxische Proben n=383), stimmt die PCR aus den Isolaten in 373 Fällen überein (97,39%). Allerdings sind 13 Fälle vorhanden, in denen die native PCR ein negatives CDI-Ergebnis hervorbrachte. Dadurch, dass diese 13 Proben jedoch auch bei der Kultur ein Wachstum zeigten und anschließend durch die PCR als positiv bestätigt wurden, kann man die 13 Fälle als falsch negative Proben der PCR aus nativem Material werten. Vermutlich entstand dies durch zu lange Lagerung des Probenmaterials. Weiterhin gibt es einen Fall, in dem die native PCR eine Probe als nicht toxisch erkannte, diese jedoch im Isolat durch die PCR als toxisch identifiziert wurde. Im Toxin A/B-Test aus dem Isolat wurde ebenfalls ein toxisches Ergebnis erbracht. Aus diesem Grund kann man diesen Fall als falsch negativ der Toxin-PCR werten. Vermutlich ist dies auf eine Behandlung des Patienten zurückzuführen, die zu einer Abschwächung der Keime führte.

Die Auswertung zeigte zudem, dass 2 Proben dem Toxin Typ A zugesprochen werden konnten (0,42%), 252 Proben dem Typ A,B (53,39%) und 126 Proben dem Typ A,B,binär (26,58%). Wie zuvor bereits erwähnt, wurden 92 Proben als nicht toxisch erkannt (19,94%).

Tabelle 13: Übersicht der Toxintypen aus der PCR der Isolate

Toxin Typ	Anzahl der Toxin PCR positiven aus den Isolaten (absolut und relativ)	
A	2	0,42%
B	0	0,00%
AB	252	53,39%
binär	126	26,69%
nicht toxischen	92	19,94%
Gesamt	472	100%

4.2.6 Methodenvergleich

Vergleich der Methoden der CDI-Diagnostik

Zur Diagnostik einer CDI wurde primär der GDH- und Toxin A/B-Test angewendet. Durch diese Selektion erhielt man 472 zu bearbeitende Fälle, die GDH positiv waren. Durch die PCR wurden im Anschluss jedoch nur 426 Fälle als positiv erkannt (90,25%). Annähernd ähnlich war das Ergebnis der kulturellen Anzucht, demzufolge 424 Proben ein Wachstum zeigten (89,83%). Im ersten Moment erscheinen diese Ergebnisse relativ ähnlich. Bei näherer Betrachtung erkennt man jedoch wesentliche Unterschiede in den Resultaten dieser beiden Testverfahren. Schaut man sich das genetische Profil der Proben an, ist dort zu erkennen, dass die Kultur in 17 Fällen ein positives Ergebnis liefert, die PCR Methode jedoch dort eine CDI durch ein negatives Ergebnis ausschließt. Diese Fälle sind als Kultur falsch positiv zu werten (3,6% von n=472), vorausgesetzt es hat eine Verunreinigung der Proben stattgefunden. Ebenso gibt es unterschiedliche Ergebnisse bei den Kultur-negativen Resultaten. In 19 Fällen lieferte die Kultur ein negatives Ergebnis, in denen die PCR jedoch im Vergleich eine CDI bestätigte. Diese Fälle können entstehen, wenn Patienten beispielsweise antibiotisch anbehandelt wurden, so dass zwar molekularbiologisch nachweisbare Keime vorhanden waren, diese aber nicht mehr fähig waren in der Anzucht zu wachsen.

Vergleich der Methoden zur Diagnostik einer toxischen Kultur

Es wurden zwei Methoden angewendet um die Proben auf eine toxische Infektion zu testen (Toxin A/B Test und PCR). Beide wurden zunächst mit nativem Material getestet und anschließend mit den Isolaten der Kulturanzucht.

Von der Gesamtzahl (n=472) konnten durch die PCR aus nativem Material 400 Proben (84,75%) als toxisch erkannt werden, durch den Toxin A/B-Test aus nativem Material 255

Proben (54,03%), durch die PCR aus den Isolaten (n=424) 380 Proben (89,62%) und durch den Toxin A/B-Test aus den Isolaten 371 Proben (87,50%).

Ein Vergleich der mit nativem Material durchgeführten Tests lässt erkennen, dass die PCR dem Toxin A/B-Test überlegen ist. Insgesamt fand der Toxin A/B-Test nur 255 toxische Proben (63,75%) von 400 möglichen Fällen, welche die PCR als toxisch identifizieren konnte. Dazu ist zu erwähnen, dass von den 255 Fällen 242 Ergebnisse mit den Ergebnissen der PCR übereinstimmten (94,90%) und als richtig positiv gewertet werden. Die restlichen 13 Fälle wurden durch die PCR als negativ erkannt, was dazu führt, dass sie als falsch positiv des Toxin A/B-Tests zählen (5,10%).

Im Vergleich lieferten der Toxin A/B-Test und die PCR aus den Isolaten (n=424) annähernd identische Ergebnisse. Lediglich 9 Fälle konnte die PCR mehr identifizieren (2,12%). Um einen Vergleich mit den PCR-Ergebnissen aus den nativen Proben zu ermöglichen, wurden diese bezogen auf die Isolate ausgewertet. Daraus ergab sich eine Gesamtzahl von 383 Fällen, welche die PCR als toxisch identifizierte (90,33% von n=424).

Vergleicht man die Methoden aus den Isolaten gegenüber der PCR aus nativem Material, wird deutlich, dass der Toxin A/B-Test aus Kulturoisolen 371 der 383 möglichen toxischen Fällen erkannte (96,87%), und die PCR 380 Fälle (99,21%) aus den Isolaten. Es lässt sich jedoch auch erkennen, dass 14 Proben des Toxin A/B-Tests und 13 Proben der PCR ein positives Ergebnis lieferten, wo die PCR aus nativem Material ein negatives Ergebnis erbrachte. Sie werden jeweils als PCR (nativ) falsch negativ gewertet, oder sie wurden durch eine Verunreinigung hervorgebracht, welche ein Kulturwachstum zuließ. Ebenfalls ist zu erkennen, dass in den Isolat-Methoden jeweils eine Probe vorhanden war, welche in der nativen PCR als apathogen und nicht toxisch erkannt wurde, hier jedoch ein positives Ergebnis lieferte. Sie sind ebenfalls als PCR (nativ) falsch negativ zu werten.

Vergleich der Methoden zur Bestimmung des Toxin Typs

Zur Bestimmung des Toxin Typs wurde die PCR jeweils aus nativem Material und den Isolaten gefertigt.

Als Ergebnis erbrachte die PCR aus nativem Material 400 toxische Fälle (84,75%) und 72 nicht toxische Fälle (15,25%). Die PCR aus den Isolaten dagegen ergab in 380 Fällen (80,50%) ein toxisches Ergebnis und in 92 Fällen (19,49%) ein nicht toxisches Ergebnis (hier wurden die Kultur negativen Proben ebenfalls als Toxin negativ gewertet).

In 394 Fällen stimmten die Ergebnissen der beiden Tests überein (83,47%), während sie in den übrigen 78 Fällen einen unterschiedlichen Toxintyp nachwiesen (16,53%). Teilweise lagen die Übereinstimmungen bei 0% wie bei den Typen A, B und binär. Niedrig war auch die Übereinstimmung bei den nicht toxischen Stämmen, wo die Rate lediglich bei 58,59% lag.

Tabelle 14: Übersicht der Toxintypen im Vergleich zwischen nativen Material und Isolat

Toxintyp	Toxin PCR (Isolat)		Toxin PCR (nativ)		Übereinstimmungen Isolat/nativ	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
A	2	0,42%	10	2,12%	0	0,00%
B	0	0,00%	2	0,42%	0	0,00%
AB	245	51,91%	253	53,60%	221	87,35%
AC	0	0,00%	5	1,06%	0	0,00%
binär	126	26,69%	130	27,54%	115	88,46%
nicht toxischen	99	20,97%	72	15,25%	58	58,59%
Gesamt	472	100%	472	100%	394	83,47%

4.3 Resistenztestung

Bei allen Proben welche bei der Kulturanzucht ein Wachstum zeigten (n=424), wurde eine Empfindlichkeitsprüfung auf Metronidazol, Moxifloxacin, Vancomycin, Clarithromycin und Rifampicin durchgeführt. In vier Fällen konnte bei der Resistenz gegen Metronidazol, Moxifloxacin und Vancomycin kein Ergebnis erzielt werden, ebenso wenig wie bei der MHK-Auswertung. Lediglich eine Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin und Clarithromycin gelang bei diesen Proben. In einem Fall konnte insgesamt kein Ergebnis hervorgebracht werden, weder für die Empfindlichkeitsprüfung, noch für die MHK-Testung.

Dementsprechend wurde in 419 Fällen die Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol, Moxifloxacin und Vancomycin getestet (98,82%) und in weiteren 423 Fällen gegenüber Rifampicin und Clarithromycin (99,76%). Weiterhin konnte in 423 Fällen eine komplette MHK-Testreihe erfolgen (99,76%). Der MHK-Test bezog sich auf Metronidazol, Moxifloxacin und Vancomycin.

Zusätzlich konnte durch die Auswertung der PCR eine Empfindlichkeitsaussage gegenüber Moxifloxacin erbracht werden. Von der Gesamtheit (n=472) war es möglich, durch die Auswertung in 387 Fällen eine Aussage zu treffen (81,65%), bei 39 Proben war dies nicht möglich (8,23%), und bei 48 Proben war die PCR negativ bezüglich einer CDI (10,13%). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 15: Übersicht der Empfindlichkeit der Proben gegenüber der getesteten Antibiotika

	Metronidazol	Moxifloxacin	Vancomycin	Clarithromycin	Rifampicin	Moxifloxacin PCR
Resistent	2	196	0	209	31	188
Sensibel	417	223	419	214	392	199
Gesamt	419	419	419	423	423	387

Die Empfindlichkeitsprüfungen für Metronidazol, Vancomycin und Rifampicin erbrachten ein annähernd ähnliches Resultat. Bei Metronidazol waren lediglich 2 von 419 Proben resistent (0,48%), während es bei Rifampicin 31 von 423 Proben (7,33%) waren. Allein Vancomycin erbrachte zu 100% eine Sensitivität aller 419 Proben gegenüber dem Antibiotikum.

Ein weiteres annähernd gleiches Ergebnis erbrachte die Prüfung auf Moxifloxacin und Clarithromycin. Dort waren die resistenten und sensiblen Proben annähernd gleich verteilt. Von den 419 Fällen waren gegen Moxifloxacin 196 resistent (46,78%) und 223 sensibel (53,22%), während bei Clarithromycin von insgesamt 423 Proben 209 resistent (49,41%) und 214 sensibel (50,59%) waren.

Das Ergebnis der Moxifloxacin-Empfindlichkeit der PCR erbrachte ebenso ein nahezu analoges Resultat wie der herkömmliche Test auf Moxifloxacin. Die Verteilung lag bei 188 resistenten (48,58%) und 199 sensiblen (51,42%) Proben.

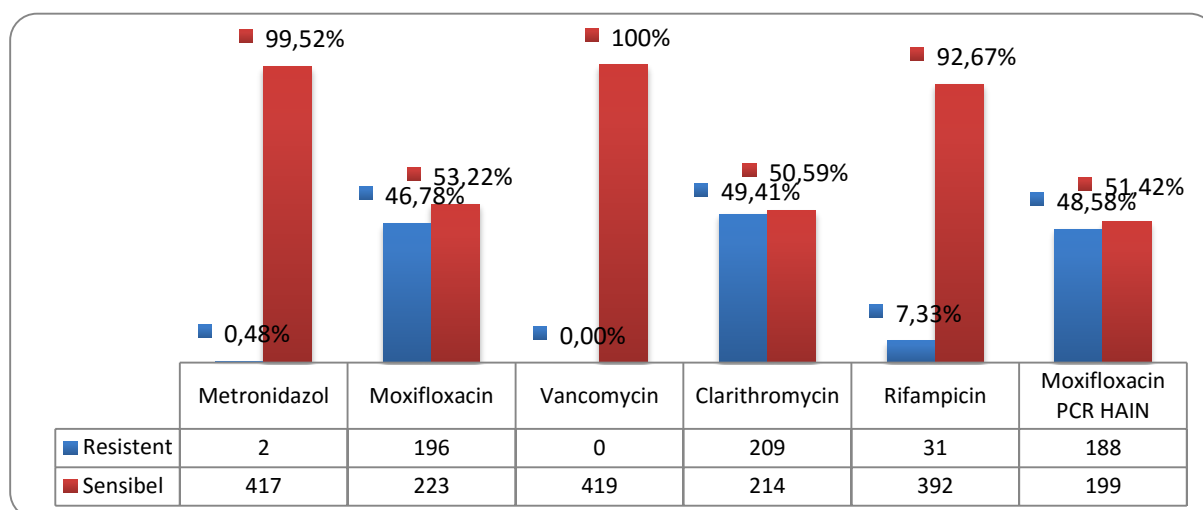


Abbildung 6: Empfindlichkeitsergebnisse im Überblick

4.4 Prädominante Ribotypen

Darstellung der Fälle

Mit den gewonnenen Isolaten (n=424) wurde eine Ribotypisierung durchgeführt. Das Ergebnis erbrachte in 397 Fällen (93,63%) eine Identifizierung von insgesamt 42 Ribotypen. In den übrigen 27 Fällen (6,37%) war eine Determinierung nicht möglich.

Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Ribotypen nach ihrer Anzahl gruppiert. Diejenigen, die im zweistelligen Bereich lagen, wurden im Einzelnen betrachtet, während die restlichen als „Andere“ zusammengelegt wurden.

Somit ergaben sich 8 prädominante Ribotypen mit einer Gesamtzahl von 280 Fällen (66,04% n=424), und 34 „Andere“ Ribotypen mit einer Gesamtzahl von 117 Fällen (27,59% n=424).

Bemerkenswert war die Anzahl des Ribotyps 027, welcher in 92 Proben erkannt wurde und somit 21,70% der gesamten Isolate entspricht (n=424). Ähnlich dominant waren die Anzahlen des Ribotyps 001 mit 82 Proben (19,34%) und des Ribotyps 014 mit 43 Proben (10,14%). Die Gruppe aller anderen Ribotypen mit einer Anzahl im 1-stelligen Bereich ergab 117 Fälle (27,59%).

Tabelle 16: Übersicht der prädominanten Ribotypen

Ribotyp	Anzahl	Anzahl in Prozent
027	92	22,0%
001	82	19,0%
014	43	10,0%
002	16	4,0%
140	13	3,0%
015	12	3,0%
020	11	2,0%
078	11	3,0%
Undetermined	27	6,0%
Andere	117	28,0%
Summe	424	

4.4.1 Toxigene vs. nicht toxigene Stämme der Ribotypen

Die 8 prädominanten Ribotypen können anhand der durchgeführten Tests (Toxin A/B-Test und PCR) bezüglich ihrer Toxizität näher erläutert werden. Einmal wurden die Tests mit Nativmaterial durchgeführt und einmal aus den Kulturisolaten.

Vergleicht man nun die verschiedenen Ergebnisse der Tests untereinander, erkennt man, dass der Toxin A/B-Test aus nativem Material die wenigsten toxischen Proben erkennen konnte. Mit insgesamt 182 Proben waren es nur 65%. Dagegen konnte der Toxin A/B-Test aus den Isolaten 295 Proben als toxisch erkennen, was 92,50 % ausmacht. Anders war es bei dem PCR-Verfahren, welches annähernd identische Ergebnisse lieferte. Die PCR aus Nativmaterial erkannte 265 Proben als toxisch (94,64%) und die PCR aus den Isolaten 267 Proben (95,35%).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Testverfahren (Toxin A/B-Test, PCR) anhand des Vorkommens toxischer Proben innerhalb der einzelnen Ribotypen, entstehen ähnliche Resultate. Es ist zu erkennen, dass die Proben der Ribotypen 027, 001, 014, 015, 020 und 078 annähernd vollständig als toxisch erkannt wurden (im Durchschnitt 97,43% - Ergebnis aus PCR Isolat), womit man sie als toxische Stämme werten kann. Andererseits wird ersichtlich, dass die Testverfahren bei den Ribotypen 002 und 140 die wenigsten Proben als toxisch erkannten. Bei dem Ribotyp 002 ist dies allerdings grenzwertig, und man kann ihn im Durchschnitt zu 87,50% (Ergebnis aus PCR Isolat) als toxischen Stamm betrachten. Anders ist es bei dem Ribotyp 140, hier liegt der Durchschnitt der Prozentzahl aller toxischen Testverfahren bei 13,46%. Der Prozentwert der PCR aus dem Isolat beträgt allerdings 0,00%, womit der Ribotyp 140 als nicht toxischer Stamm gewertet werden kann.

Tabelle 17: Übersicht der Ergebnisse der Toxin-Tests der prädominanten Ribotypen

Ribotyp	Anzahl	Toxin A/B-Test positiv (nativ)	Toxin A/B-Test positiv (Isolat)	Toxin-PCR positiv (nativ)	Toxin-PCR positiv (Isolat)
027	92	76	91	90	92
001	82	55	81	82	82
014	43	25	41	41	43
002	16	5	12	14	16
140	13	1	1	5	0
015	12	8	12	12	12
020	11	6	11	10	11
078	11	6	10	11	11
Gesamt	280	182	259	265	267

4.4.2 Antibiotika-Resistenz der Ribotypen

Alle Proben der Gesamten 42 Ribotypen (n=397) wurden einer Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Clarithromycin, Rifampicin, Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin unterzogen. Ebenfalls konnte durch die Auswertung der PCR eine Aussage bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin getroffen werden.

Von den 397 zu untersuchenden Proben zeigten 201 Proben eine Resistenz gegenüber Clarithromycin (50,63%), 30 Proben gegenüber Rifampicin (7,56%), 2 Proben gegenüber Metronidazol (0,50%), 0 Proben gegenüber Vancomycin (0,00%) und 187 Proben gegenüber Moxifloxacin (47,10%) bzw. 177 Proben gegenüber Moxifloxacin aus der PCR-Wertung (44,58%).

Tabelle 18: Übersicht der Anzahl der Antibiotika-Resistenzen der Ribotypen

Ribotyp	Anzahl	Resistenz Clarithromycin	Resistenz Rifampicin	Resistenz Metronidazol	Resistenz Vancomycin	Resistenz Moxifloxacin	Resistenz Moxifloxacin aus PCR
027	92	91	27	0	0	92	82
001	82	68	0	1	0	70	69
014	43	1	0	0	0	2	2
002	16	1	0	1	0	1	1
140	13	7	0	0	0	2	3
015	12	0	0	0	0	0	0
020	11	0	0	0	0	1	2
078	11	4	0	0	0	5	2
Andere	117	29	3	0	0	14	16
Gesamt	397	201	30	2	0	187	177
Prozentual		50,63%	7,56%	0,50%	0,00%	47,10	44,58%

Im Folgenden werden die prädominanten Ribotypen im Einzelnen bezogen auf die Antibiotika bewertet.

Vancomycin

Alle Ribotypen zeigten ausnahmslos zu 100 % eine Sensibilität gegenüber Vancomycin. Es gibt dementsprechend keine resistenten Stämme. Dies wird in der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 19: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Vancomycin

Ribotyp	Anzahl	Vancomycin-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	0	0,0%
001	82	0	0,0%
014	43	0	0,0%
002	16	0	0,0%
140	13	0	0,0%
015	12	0	0,0%
020	11	0	0,0%
078	11	0	0,0%
Andere	117	0	0,0%
Gesamt	397	0	0,0%

Metronidazol

Bei Metronidazol ist das Ergebnis ähnlich wie bei Vancomycin. Hier zeigten lediglich 2 Proben (0,50%) eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum (jeweils 1 Fall bei Ribotyp 001 und Ribotyp 002). Anhand dieses Ergebnisses ist davon auszugehen, dass es sich bei allen Ribotypen um nicht resistente Stämme handelt. Die Einzelfälle sind bezüglich dessen nicht relevant, sie schließen jedoch eine Entwicklung von resistenten Stämmen nicht aus.

Tabelle 20: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Metronidazol

Ribotyp	Anzahl	Metronidazol-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	0	0,0%
001	82	1	1,0%
014	43	0	0,0%
002	16	1	6,0%
140	13	0	0,0%
015	12	0	0,0%
020	11	0	0,0%
078	11	0	0,0%
Andere	117	0	0,0%
Gesamt	397	2	0,5%

Rifampicin

Gegenüber Rifampicin zeigten 30 Proben eine Resistenz (7,6%). Jedoch sind diese zu 90,00% dem Ribotyp 027 zuzuordnen (27 Proben). Insgesamt zeigten also 29,35% der Proben innerhalb des Ribotyps 027 eine Resistenz. Dieses Ergebnis spricht für die Entwicklung einer Resistenz des Stammes 027 gegenüber dem Antibiotikum Rifampicin. Aus der Gruppe der „Anderen“ Ribotypen zeigten 3,0% der Proben eine Resistenz.

Tabelle 21: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Rifampicin

Ribotyp	Anzahl	Rifampicin-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	27	29,0%
001	82	0	0,0%
014	43	0	0,0%
002	16	0	0,0%
140	13	0	0,0%
015	12	0	0,0%
020	11	0	0,0%
078	11	0	0,0%
Andere	117	3	3,0%
Gesamt	397	30	7,6%

Clarithromycin

Gegenüber Clarithromycin zeigten zwar 201 Proben eine Resistenz (50,63%), diese konnten jedoch zu 79,10% den Ribotypen 027 und 001 zugesprochen werden. Die restlichen traten vereinzelt auf und waren nur noch bei den prädominanten Ribotypen 140 mit 54,0% und Ribotyp 078 mit 36,0% nennenswert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei den Ribotypen 027 und 001 um resistente Stämme handelt (Im Durchschnitt zu 91,43%). Durch das Vorkommen von Resistenzen innerhalb der Ribotypen 140 und 078 zu 54,0% und 36,0% kann von einer Entwicklung einer Resistenz dieser Stämme gesprochen werden. Ebenso trat bei den nicht prädominanten Ribotypen bei 25,0% der Proben eine Resistenz auf. Dies lässt den Schluss zu, dass vereinzelt Ribotypen hier resistente Stämme aufweisen. Die Ribotypen 015 und 020 waren zu 100% sensibel gegenüber Clarithromycin.

Tabelle 22: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Clarithromycin

Ribotyp	Anzahl	Clarithromycin-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	91	99,0%
001	82	68	84,0%
014	43	1	2,0%
002	16	1	6,0%
140	13	7	54,0%
015	12	0	0,0%
020	11	0	0,0%
078	11	4	36,0%
Andere	117	29	25,0%
Gesamt	397	201	50,6%

Moxifloxacin

Die Fälle bei Moxifloxacin zeigten ein ähnliches Ergebnis wie bei Clarithromycin. Der Ribotyp 027 war zu 100% resistent gegenüber Moxifloxacin, der Ribotyp 001 zu 86,0%. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Ribotypen 027 und 001 um resistente Stämme handelt. Es traten auch vereinzelte resistente Proben innerhalb der anderen Ribotypen auf, wohingegen hier allerdings der Ribotyp 078 mit 45,0% hervorsteicht. Bei vielen der anderen ist eine Entwicklung in Richtung resistenter Stämme zu bemerken (5,0% bis 15,0%). Bemerkenswert war ebenfalls, dass der Ribotyp 015 erneut zu 100% sensibel war.

Tabelle 23: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Moxifloxacin

Ribotyp	Anzahl	Moxifloxacin-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	92	100,0%
001	82	70	86,0%
014	43	2	5,0%
002	16	1	6,0%
140	13	2	15,0%
015	12	0	0,0%
020	11	1	9,0%
078	11	5	45,0%
Andere	117	14	12,0%
Gesamt	397	187	47,1%

Moxifloxacin (PCR)

Die genotypischen Ergebnisse der PCR bezüglich der Resistenz gegenüber Moxifloxacin korrelieren mit den Ergebnissen des Moxifloxacin-Tests. Es wurden zwar 10 Proben weniger erkannt, doch die Verteilung auf die Ribotypen ist annähernd identisch. Bei den Ribotypen 027 und 001 kann von einer Resistenz ausgegangen werden (89,0% und 85,0%). Bei den anderen Ribotypen traten Resistenzen im Bereich von 2,0% bis 23,0% auf. Man kann von einer beginnenden Entwicklung resistenter Stämme ausgehen. Lediglich der Ribotyp 015 war erneut zu 100% sensibel gegenüber Moxifloxacin.

Tabelle 24: Übersicht der Resistenz der Ribotypen gegenüber Moxifloacin

Ribotyp	Anzahl	Moxifloxacin-resistente Stämme	Anzahl in Prozent
027	92	82	89,0%
001	82	69	85,0%
014	43	2	5,0%
002	16	1	6,0%
140	13	3	23,0%
015	12	0	0,0%
020	11	2	2,0%
078	11	2	18,0%
Andere	117	16	14,0%
Gesamt	397	177	44,6%

Gesamtübersicht der prädominanten Ribotypen und deren Resistenz

Betrachtet man die Ribotypen bezüglich deren Resistenz in der unten aufgeführten Abbildung, wird ersichtlich, dass die Stämme der Ribotypen 027 und 001 dominieren. Bei ihnen kann man die meisten resistenten Stämme gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin nachweisen. Bei dem Ribotyp 027 kommt noch hinzu, dass seine Stämme zu 29% gegenüber Rifampicin resistent sind. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Ribotypen 140 und 078 ebenso resistente Stämme gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin aufweisen, jedoch zu einem geringeren Anteil (36,0% bis 54,0%).

Bemerkenswert ist, dass bei allen Ribotypen (außer bei dem Ribotyp 027) keine resistenten Stämme gegenüber Vancomycin, Metronidazol und Rifampicin nachzuweisen sind, und sie dementsprechend nahezu vollständig sensibel sind.

Ebenso ersichtlich wird, dass der Ribotyp 015 durchgängig sensible Ergebnisse gegenüber allen getesteten Antibiotika erbrachte. Bei diesem Ribotyp sind keine resistenten Stämme nachzuweisen.

Die Ribotypen 014, 002, und 020 weisen nur vereinzelt Resistenzen gegenüber Clarithromycin, Vancomycin und Moxifloxacin nach.

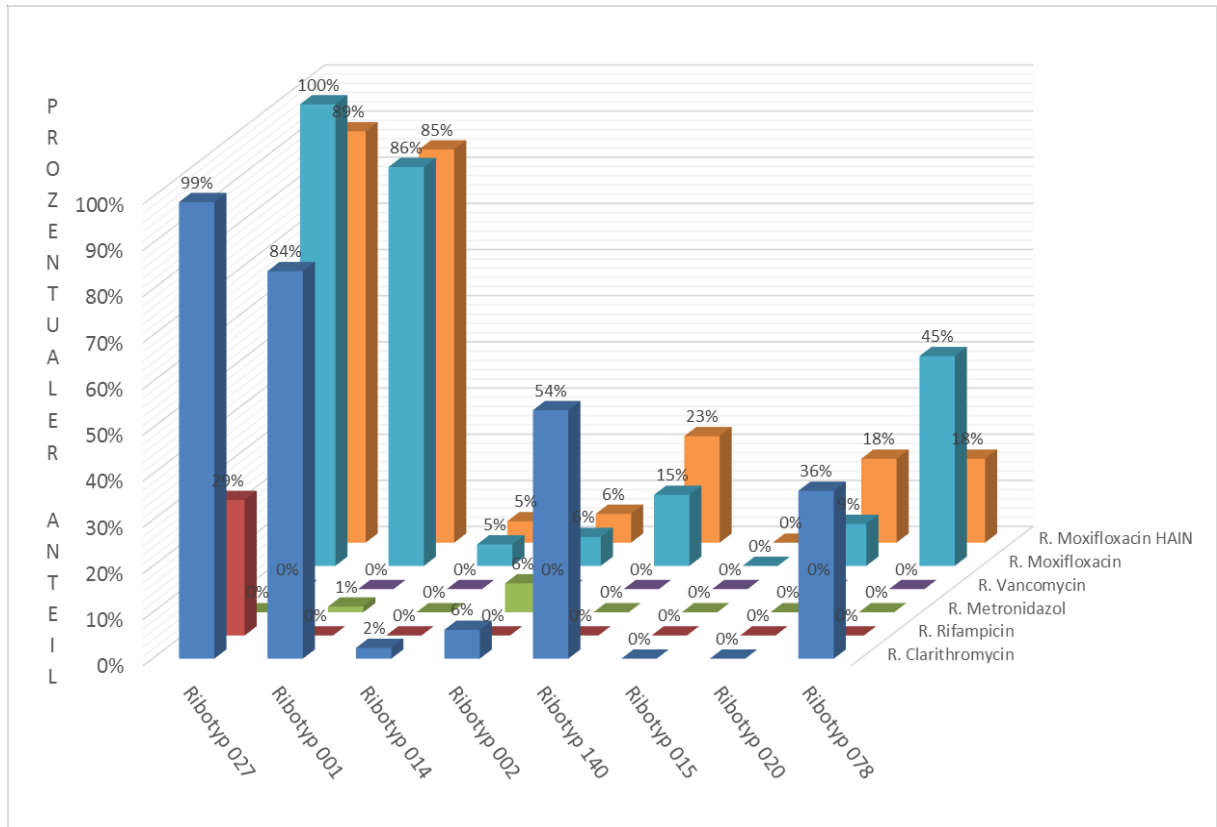


Abbildung 7: Übersicht der Häufigkeitsverteilung der Resistenzen der prädominanten Ribotypen

MHK Auswertung der Ribotypen

Es wurde bei allen Ribotypen die Minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Moxifloxacin, Vancomycin und Metronidazol bestimmt. Im Folgenden werden die Mittelwerte der MHK betrachtet, bezüglich der Ribotypen. Daraus wird ersichtlich, dass die MHK für Metronidazol und Vancomycin im Durchschnitt erheblich niedriger sind als die für Moxifloxacin. Der Gesamtdurchschnitt der MHK für Metronidazol beträgt 0,409 mg/L, für Vancomycin 0,410 mg/L und für Moxifloxacin 1,094 mg/L. Damit liegt der Durchschnitt von Moxifloxacin im Mittel 0,685 mg/L höher als der der anderen beiden Antibiotika. Eine Sonderstellung nimmt der Ribotyp 027 ein, bei dem alle Proben ausnahmslos einen MHK-Wert >32 mg/L

nachwiesen, da sie resistent sind. Die absolute Anzahl der Proben betrug für Metronidazol 417, für Vancomycin 419 und für Moxifloxacin 223.

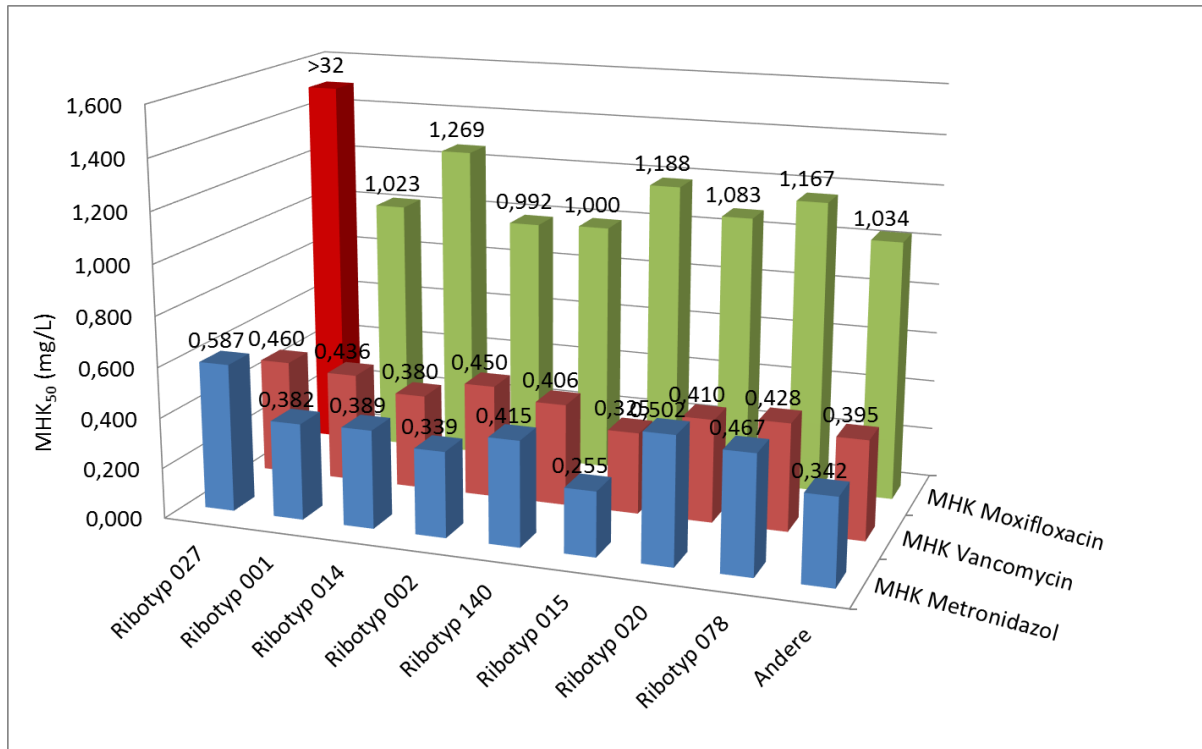


Abbildung 8: Übersicht der Häufigkeitsverteilung der MHK der Ribotypen

Um eine genaue Darstellung der Verteilung der MHK bezogen auf die einzelnen Ribotypen zu schaffen, werden sie im Folgenden bezüglich des getesteten Antibiotikums im Einzelnen näher betrachtet.

MHK Vancomycin

In der Abbildung 9 wird die relative Häufigkeit des Vorkommens der MHK der einzelnen Ribotypen dargestellt. Es wird ersichtlich, dass sich die MHK für Vancomycin um einen Bereich zwischen 0,125 mg/L und 0,75 mg/L erstrecken. Die Verteilung der MHK innerhalb der Ribotypen erreicht Werte bis zu 70% innerhalb eines MHK-Bereiches. Sie läuft so gesehen spitz zum Mittelwert hinzu. Als Ausreißer sind lediglich der Ribotyp 027, Ribotyp 001 und Ribotyp 002 zu erkennen, welche man vereinzelt in einem Bereich von 1,0 mg/L bis 2 mg/L findet.

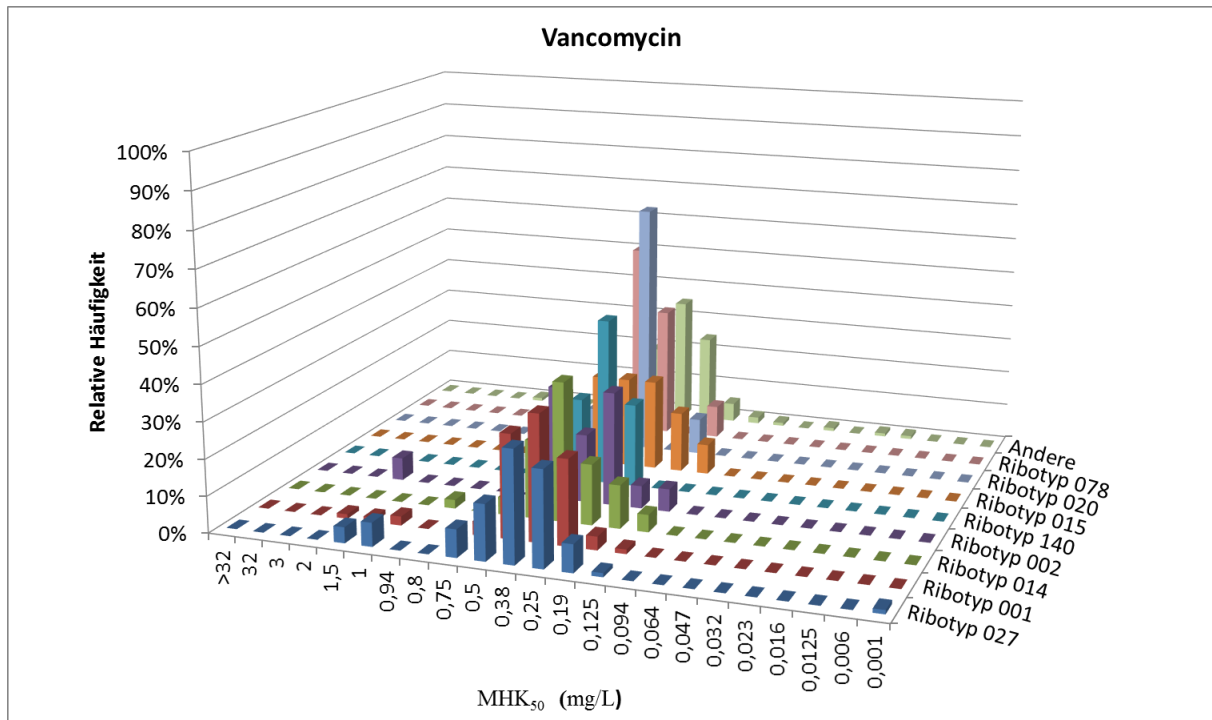


Abbildung 9: Übersicht der MHK-Verteilung für Vancomycin

MHK Metronidazol

Im Vergleich zu Vancomycin erkennt man in Abbildung 10, dass sich bei Metronidazol die Bandbreite der Verteilung der MHK etwas erweitert hat. Diesmal erstreckt sie sich über einen Bereich zwischen 0,094 mg/L und 0,75 mg/L. Insgesamt sind die MHK innerhalb der Ribotypen auch stärker verteilt. Es kommt zu einem Spitzenwert von maximal 40% innerhalb eines MHK-Bereiches. Die Verteilung läuft daher eher flach um mehrere Bereiche. Im Gegensatz zu Vancomycin erkennt man außerdem, dass sich quasi bei allen Ribotypen (außer Ribotyp 015) Ausreißer gebildet haben, welche sich in Bereichen zwischen 1,0 mg/L und 1,5 mg/L befinden. Ebenso sind vereinzelte resistente Stämme zu erkennen, welche sich bei >32 mg/L befinden (Ribotyp 001 und Ribotyp 014).

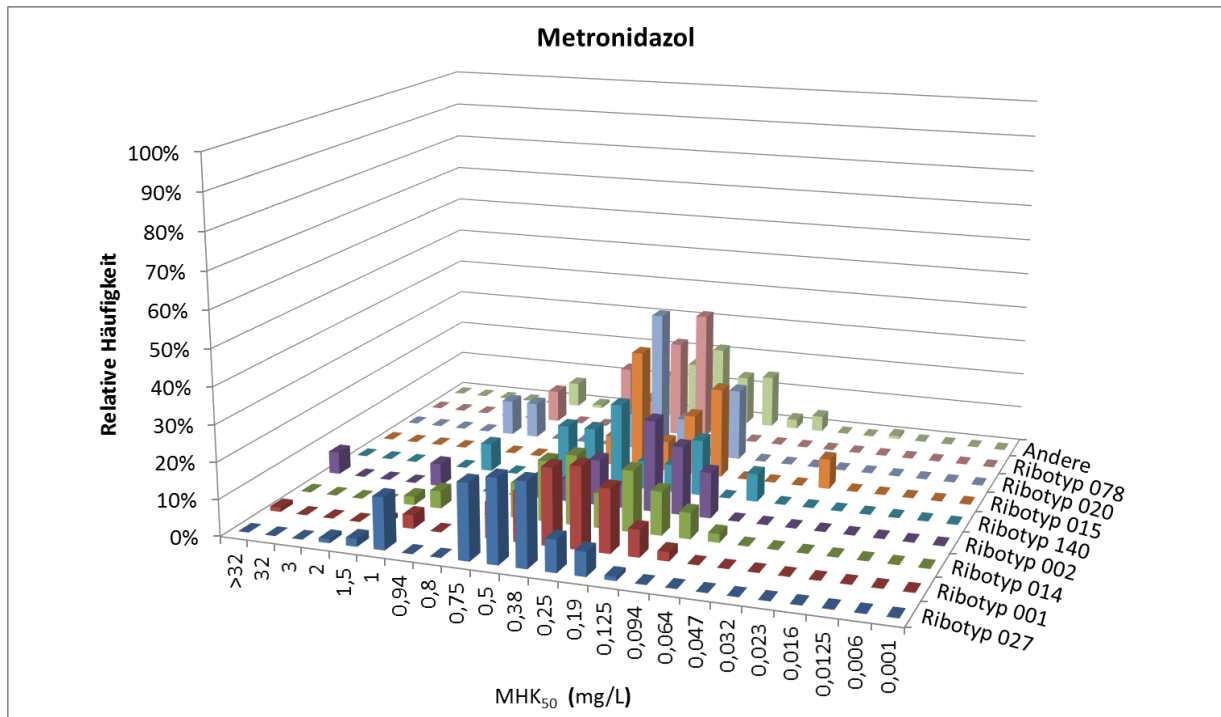


Abbildung 10: Übersicht der MHK-Verteilung für Metronidazol

MHK Moxifloxacin

Im Vergleich zu Vancomycin und Metronidazol hat sich bei Moxifloxacin die Bandbreite der Verteilung bezüglich der MHK noch stärker zu höheren Werten verschoben. Sie befindet sich zwischen 0,5 mg/L und 2 mg/L. Bemerkenswert ist zudem, dass die Verteilung des Ribotyps 027 zu 100% >32 mg/L liegt und des Ribotyp 001 zu über 80%. Ebenfalls ist zu erkennen, dass auch die prädominanten Ribotypen häufiger bei den resistenten Werten >32 mg/L liegen. Dies wird in Abbildung 11 ersichtlich.

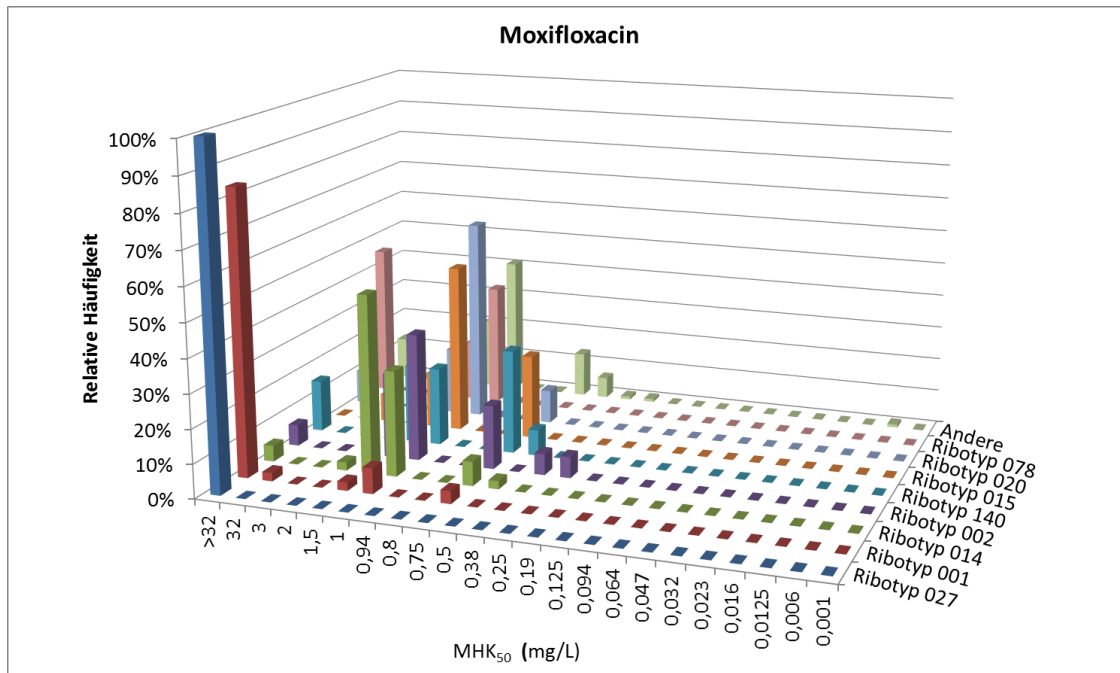


Abbildung 11: Übersicht der MHK-Verteilung für Moxifloxacin

4.4.3 Geographische Verteilung der Ribotypen (molekulare Epidemiologie)

Alle Ribotypen wurden den entstammenden Postleitzahlen zugeordnet, um auf diese Weise die Verteilung und Verbreitung der Stämme innerhalb Deutschlands zu beurteilen.

Wie man aus folgender Abbildung entnehmen kann, stammten im Durchschnitt aus jedem PLZ-Bereich Ribotypen in einem relativen Verhältnis von 17,65% zu deren eingesendeten Gesamtproben.

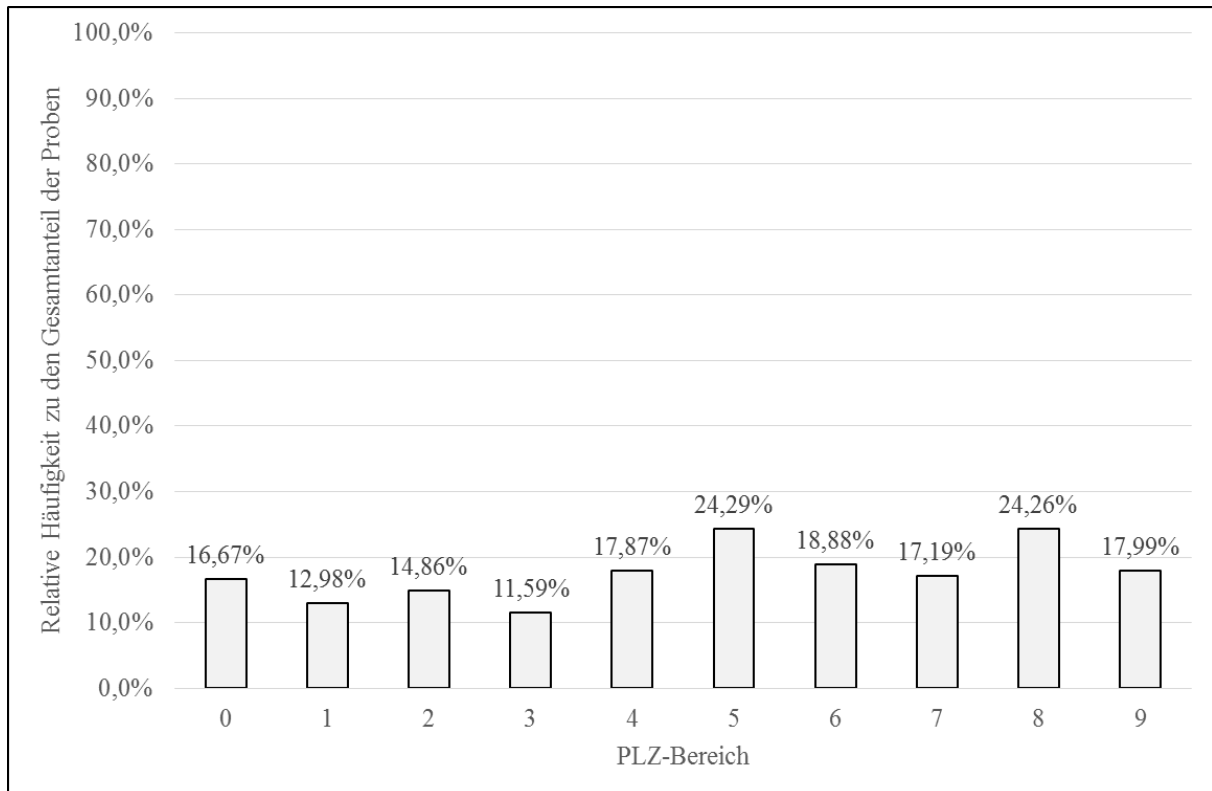


Abbildung 12: Überblick der Häufigkeit von Ribotypen innerhalb eines PLZ-Bereiches in Relation zu deren Gesamtanzahl eingesendeter Proben

Zu den einzelnen Ribotypen war bemerkenswert, dass der Ribotyp 027 nicht flächendeckend vorkam, sondern vermehrt in den westlichen Teilen (Postleitzahlen 4, 5, 6 und 7) und den östlichen Teilen (Postleitzahlen 1, 0 und 9) Deutschlands auftrat. Die nördlichen und zentralen Teile Deutschlands blieben eher ausgespart (Postleitzahlen 1 und 3). Ebenso bemerkenswert ist die Verteilung des Ribotyps 001. Er kommt nicht nur relativ häufig vor (Durchschnitt 36,50%), sondern ist auch – außer im Westen, wo er geringer vorkommt – annähernd gleichmäßig auf alle Gebiete verteilt. Dies wird in den folgenden beiden Abbildungen ersichtlich.

Verteilung der prädominanten Ribotypen von *C. difficile* in Deutschland Phase 1

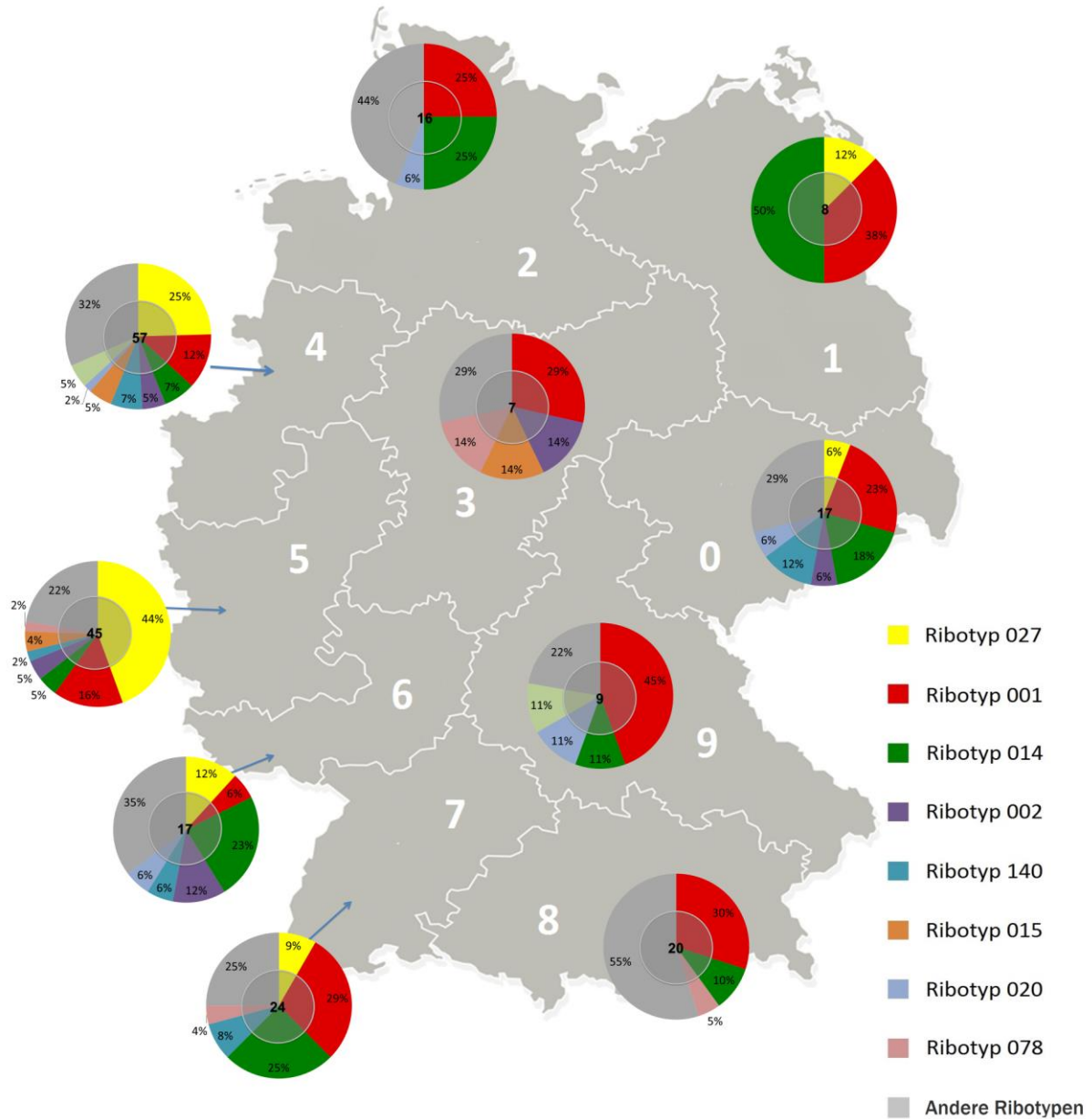


Abbildung 13: Darstellung der Verteilung der Ribotypen nach Postleitzahlbereich der ersten Phase

Verteilung der prädominanten Ribotypen von *C. difficile* in Deutschland Phase 2

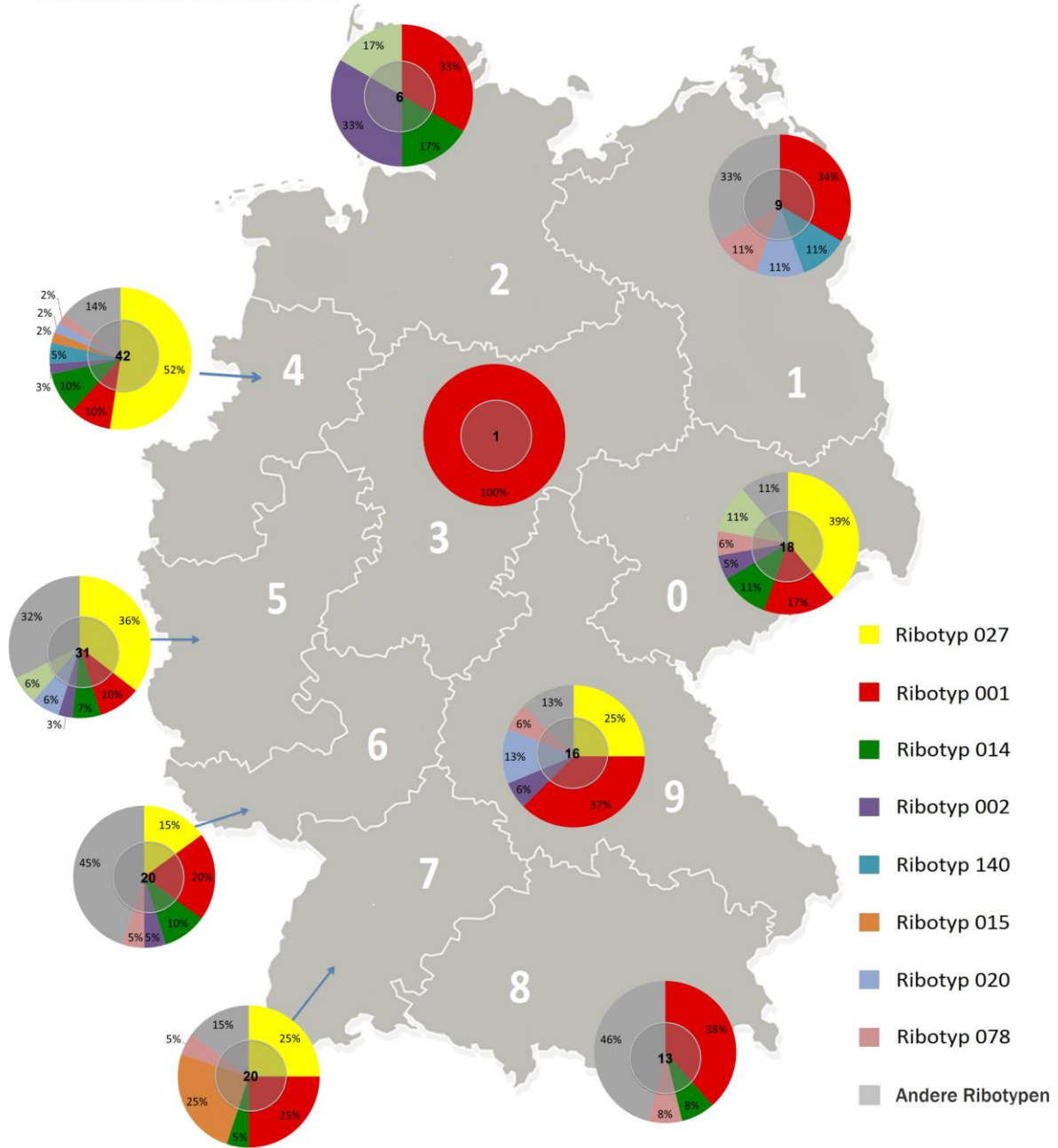


Abbildung 14: Darstellung der Verteilung der Ribotypen nach Postleitzahlbereich der zweiten Phase

5 Diskussion

GDH-Test zur Erkennung von C. difficile

In der Studie wurde der C. Diff Quik Check Complete Test, welcher gleichzeitig einen GDH-Test und ein EIA-Verfahren darstellt, zur primären Differenzierung der Proben genutzt. Somit konnten in einem ersten Schritt aus den 2057 untersuchten Proben 472 als GDH positiv selektiert werden. Im weiteren Verlauf wurde von diesen 472 Proben jeweils eine native PCR gefertigt sowie eine Kultur angelegt. Das PCR-Ergebnis erbrachte 46 negative Fälle, was 9,75% falsch positive Ergebnisse des GDH-Tests bedeutet. Bei der Kultur waren es 48 Fälle ohne Wachstum, was dementsprechend 10,17% falsch positive Ergebnisse des GDH-Tests ausmacht. Im Durchschnitt ergibt dies 90,04% richtig positive Proben des GDH-Tests. Dieses Ergebnis ist gut und bestätigt den Einsatz des GDH-Tests als primäres Screening-Verfahren. Es sollte jedoch ein weiterer Test, z. B. eine Kultur oder ein molekulares Verfahren, angeschlossen werden, um die falsch positiven Proben zu erkennen.

Ähnliche Ergebnisse des GDH-Tests wurden auch in anderen Studien erbracht. So wurden beispielsweise im Rahmen einer Meta-Analyse 21 Papers verglichen, in denen der Einsatz des GDH-Tests überprüft wurde. Es wurde eine Sensitivität des GDH-Tests von >90% nachgewiesen (Shetty et al. 2011). In anderen Studien wurden jedoch auch Schwächen des GDH-Tests gefunden, die sich auf die Detektion bestimmter Ribotypen – unter anderem des Ribotyps 027 – bezogen. Der Ribotyp konnte in diesen Tests nicht erkannt werden (Goldenberg et al. 2011). Der C. Diff Quik Check Complete-Test wurde bereits in anderen Studien geprüft, in denen er wegen seiner hohen Sensitivität als GDH-Test empfohlen wird, jedoch nicht zur alleinigen Nutzung bei der Prüfung auf toxische Proben, da er dabei eine zu geringe Sensitivität bezüglich der Toxinprüfung aufweist (Kawada et al. 2011).

Vergleich von Kultur und PCR zur Erkennung von C. difficile

Von den Gesamtproben (n=472) wurden durch die PCR 426 Proben als positiv erkannt (90,25%), während es bei der Kultur 424 Proben waren (89,83%). Ein gemeinsames Ergebnis lieferten sie in 407 Fällen. Bei den negativen Fällen wurden durch die PCR 46 Proben als negativ erkannt (9,75%), während es bei der Kultur 48 Proben waren (10,17%). Es kam allerdings nur bei 29 negativen Proben zu einem gemeinsamen Ergebnis. In den differierenden Fällen zeigten 17 Proben ein Wachstum in der Kulturanzucht, jedoch kein positives PCR-Ergebnis. Die angeschlossene Toxin-PCR der respektiven Isolate erbrachte jedoch positive Ergebnisse. Dies bedeutet eine 3,60% falsch negative Rate der PCR mit nativem Material.

Dies kann beispielsweise dadurch begründet werden, dass Primer zur Detektion der Gensequenzen des *C. difficile* fehlten. Bei weiteren 19 differierenden Fällen gab es zwar ein positives PCR-Ergebnis, jedoch konnte kein Wachstum in der Kultur nachgewiesen werden, was eine 4,03% falsch Kultur negative Rate bedeutet. Dies kann dadurch begründet werden, dass der Patient, welcher die Probe lieferte, schon antibiotisch behandelt wurde, was zu einem Absterben des Bakteriums führte, das sich molekularbiologisch jedoch trotzdem noch nachweisen ließ.

Bei der Analyse der Vierfeldertafel in der Tabelle 29 (Anhang) im Vergleich zwischen der Kultur und der PCR erbrachte das Ergebnis 95,99%, 60,42%, 95,54% und 63,04% bezüglich der SEN, SPE, PPV und NPV.

Damit kann gezeigt werden, dass die PCR ein hoch Sensitives Verfahren darstellt. Die niedrige Spezifität ist bedingt durch die falsch negative Rate der PCR. Jedoch weist die Kultur, wie oben beschrieben, ebenfalls eine ähnliche falsch negative Rate auf. Aufgrund dieser Tatsache liefert die PCR annähernd identische Ergebnisse bezüglich der SEN, SPE, PPV und NPV, und stellt ein zuverlässiges Verfahren dar um ein *C. difficile* bereits im nativen Material mit einem molekularen Ergebnis zu detektieren. Der Vorteil der PCR-Methode besteht in dem Fall in der kürzeren Dauer des Verfahrens und der Möglichkeit der weiteren Analyse, beispielsweise der Erkennung toxigener Proben. Es sollte trotz dessen nicht auf eine Kultur verzichtet werden, um die falsch negativen Fälle zu erkennen.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Erkennung von *C. difficile* durch molekulare Verfahren zeigen diverse Studien. So wurde beispielsweise in einer amerikanischen multizentrischen Studie, welche 1875 Stuhlproben an Durchfall erkrankter Patienten untersuchte, eine anaerobe Kultur der Proben angelegt und die positiven Kulturen mit einem PCR Ergebnis verglichen. Die Ergebnisse der SEN, SPE, PPV und NPV waren 98,7%, 87,5%, 42% und 99,9% (Carroll et al. 2013).

In einer kanadischen Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass die PCR falsch negative Ergebnisse erbrachte, welche sich in weiteren zytotoxischen Untersuchungen als CDI bestätigten. So wurden in dieser Studie 86%, 19% und 44% von den PCR negativen Proben von schweren, milden und nicht klinisch in Erscheinung getretenen Patienten im Nachhinein durch ein kulturelles Verfahren als positiv erkannt, was die Wichtigkeit der Nutzung verschiedener Methoden unterstreicht (Leis et al. 2013).

Tests zur Erkennung von toxischen Proben

Die Auswertung der Ergebnisse des C. Diff Quick Check Complete Tests ergibt eine hohe falsch negative Rate. Bei dem nativen Material fielen 33,47% der Proben falsch negativ gegenüber der PCR aus, was zu hoch ist um eine sichere Diagnostik zu liefern. Im Gegensatz dazu war die falsch negative Rate aus den Kulturisolaten mit 5,72% wesentlich geringer, welche damit in einem akzeptablen Bereich liegt. Ebenso war auch die falsch positive Rate des Tests relativ gering. Aus dem nativem Material waren es 2,75% falsch positive, aus den Isolaten 3,18%.

Entsprechend dieser Ergebnisse ergibt sich eine SEN, SPE, NPV und PPV von 59,90%, 87,93%, 23,50% und 97,25%. Der Goldstandard in der Studie besteht aus der anaeroben Kulturanzucht und der Toxin-PCR der Isolate.

Als Konklusion dieser Ergebnisse ergibt sich, dass der EIA-Test wegen seiner geringen Sensitivität und Spezifität als einziges Verfahren zur Diagnostik einer toxischen CDI nicht ausreichend ist. Dies bestätigt ebenfalls der NPV, welcher mit 23,50% sehr niedrig ist. Zur Bestätigung einer toxischen Probe liefert der Test allerdings mit einem hohen PPV von 97,25% ein gutes Ergebnis. Dementsprechend ist es empfehlenswert, molekularbiologische Testverfahren anzuschließen um eine sichere toxische CDI zu diagnostizieren. In der Tabelle 30 (Anhang) sind die Ergebnisse in einer Vierfeldertafel übersichtlich dargestellt.

Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls in diversen Studien erbracht. So wird zum Beispiel der GDH- und Toxin A/B-Test wegen seiner geringen Sensitivität nicht mehr zur alleinigen Diagnostik bei Patienten mit Durchfällen empfohlen, sondern es sollte ein molekularer Test mit einem 2-3 Schritt Algorithmus angeschlossen werden (Brecher et al. 2013).

In einer weiteren prospektiven Studie, in der drei verschiedene EIA-Verfahren miteinander verglichen wurden, konnten bei 986 Stuhlproben folgende Ergebnisse für Spezifität, Sensitivität, PPV und NPV erbracht werden: 41,1-54,8 %, 98.9-100 %, 75.0–100 % und 95.5-96.5 %. Dort wurde als Goldstandard die toxische Kultur benutzt. Unter den untersuchten EIAs befand sich ebenfalls der Quick Check Complete Test. (Bruins et al. 2012).

Mitte dieses Jahres brachte die ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) ein Update der Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung einer CDI heraus. Es wurden alle bis zu dem Datum erbrachten randomisierten und nicht randomisierten Studien eingeschlossen, welche über Pubmed oder Google Scholar gefunden wurden. Ebenfalls wurden die aktuellen Leitsätze der Infectious Diseases Society of America (IDSA), der Australasian Society for Infectious Diseases, der American College of Gastroenterology, und

der HPA/Public Health England guidance document eingeschlossen. Zur Diagnostik wird dort ebenfalls ein 2- oder 3-Schritt-Algorithmus empfohlen, welcher darin besteht, ein primäres positives Ergebnis mit einem zweiten Schritt zu bestätigen. Dieser besteht dann aus einem Toxin-Nachweisverfahren oder einem GDH- oder Toxingen-Nachweisverfahren, je nachdem welcher Test primär verwendet wurde. Ebenfalls wird dort der GDH-Test als Screening-Verfahren mit einem molekularen Anschlussverfahren zur Identifizierung toxischer Stämme empfohlen (Debast et al. 2013).

Ein besseres Ergebnis konnte der EIA Test allerdings aus dem Material der Kulturoisolate erzielen. Die SEN, SPE, PPV und NPV des Toxin A/B-Tests waren diesmal 93,20%, 96,30%, 99,73%, und 49,06% gegenüber dem Goldstandard, was schon im akzeptablen Bereich liegt. Im klinischen Alltag kann man diesen Test dementsprechend nutzen um eine toxische CDI zu erkennen, jedoch dauert die Kulturanzucht zu lange um ein schnelles Ergebnis zu liefern.

Ebenso gute Ergebnisse konnten bei der PCR aus dem nativen Material, sowie aus der Toxin-PCR aus den Kulturoisolaten erzielt werden. Hier waren die Ergebnisse für SEN, SPE, PPV und NPV 96,62%, 100%, 100% und 80,56% sowie respektive 94,06%, 100%, 100% und 52,94%. Eine Übersicht ist in folgender Grafik aufgeführt. Die PCR besteht dadurch, dass sie aus nativem Material gefertigt werden kann und dass sie ein schnelles Testverfahren darstellt, womit die PCR im klinischen Alltag zu empfehlen ist. Die Toxin-PCR aus den Kulturoisolaten liefert ebenfalls gute Ergebnisse, doch ist sie mit einer längeren Testdauer verknüpft, bedingt durch die vorangehende Kulturanzucht.

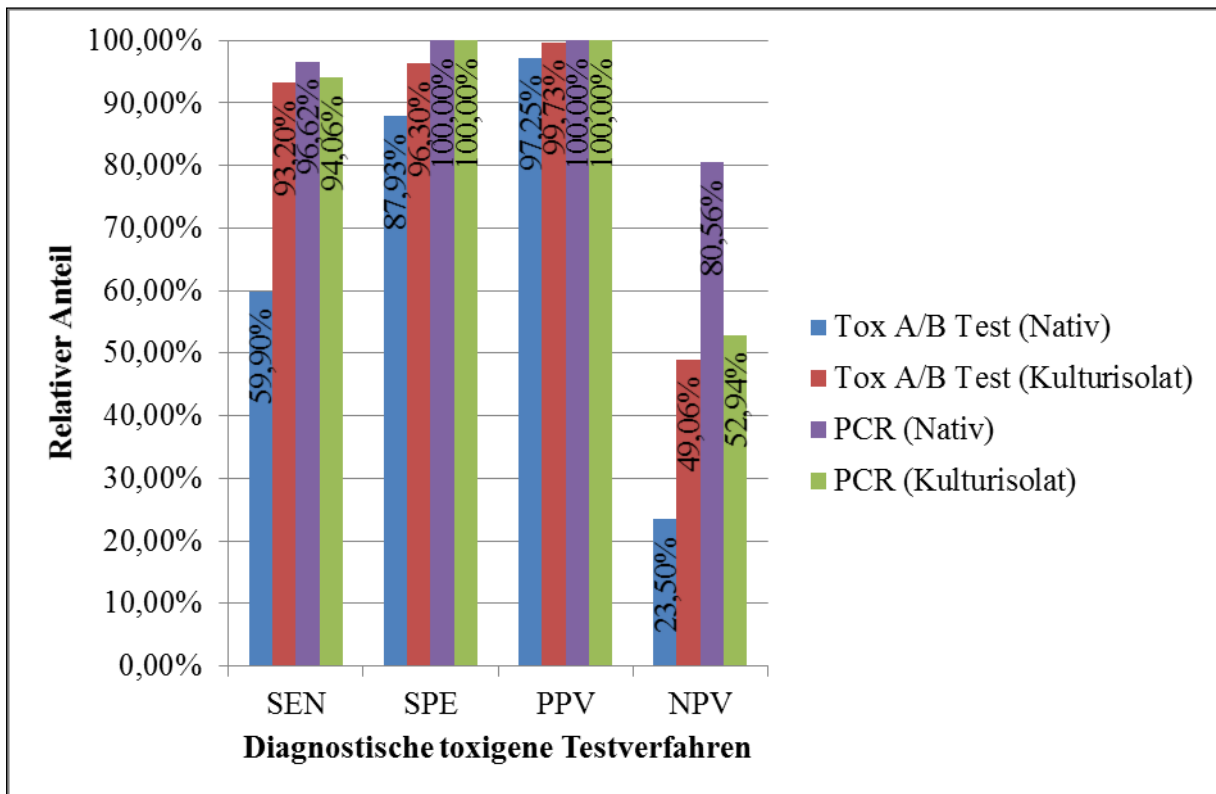


Abbildung 15: Überblick der SPE, SEN, PPV und NPV der toxigenen Testverfahren

In einer prospektiven multizentrischen Studie aus London, welche 12420 Stuhlproben untersuchte, wurden ebenfalls diverse Verfahren zur Erkennung toxigener Proben untersucht und verglichen. Es wurden Verfahren angewandt, welche Toxine in den nativen Materialien erkannten, sowie Verfahren, welche eine vorherige Kulturanzucht bedingten. Die Ergebnisse der Sensitivität der EIA-Verfahren waren mit 45%-58% ähnlich dieser Studie. Ebenso wird empfohlen, ein molekularbiologisches Verfahren wie eine PCR in Kombination mit einem GDH-Test bzw. einem EIA-Verfahren zu wählen, um ähnliche Ergebnisse wie mit einer Toxin-PCR aus Kulturisolaten zu erzielen. (Planche et al. 2013).

Andere Studien zeigen ebenfalls, dass PCR-Verfahren schnell sind und als Screening-Verfahren eingesetzt werden können. In einer australischen Studie, welche 650 Stuhlproben untersuchte, wird dies bestätigt. Dort werden Zeiten von 4 Stunden für 21 Probenuntersuchungen angegeben sowie hervorragende Werte für die SEN, SPE, PPV und NPV mit 100%, 99,1%, 94,9% und 100% (Pallis et al. 2013).

Auswertung der Ribotypen

In dieser Studie wurden insgesamt 42 verschiedene Ribotyp-Stämme isoliert, von denen 8 dominierten. Nennenswert ist der Ribotyp 027, welcher in 92 Proben gefunden wurde (21,70% von n=424 Isolaten), gefolgt von Ribotyp 001 mit 82 Fällen (19,34%) und Ribotyp

014 mit 43 Fällen (10,14%). Insgesamt machen diese drei Ribotypen 51,18% der gesamten 424 Isolate aus. Es kann durch diese Studie die Weiterentwicklung und Verbreitung des Ribotyps 027 in Deutschland bestätigt werden. In diversen anderen Studien sowie Fachzeitschriften wird schon darauf hingewiesen.

So wird z. B. schon 2007 von schwer verlaufenden Infektionen mit *C. difficile* berichtet, sowie die Zunahme des Ribotyps 027 (Robert Koch-Institut (RKI) - Epidemiologisches Bulletin 46/2007). Weiterhin berichtete das Robert Koch-Institut über die Zunahme des Ribotyps 027 im Juni 2013. Es wurde im Vergleich der Bundesländer eine deutliche Zunahme der Inzidenz gegenüber den Vorjahren erwähnt (Robert Koch-Institut (RKI) - Epidemiologisches Bulletin 25/2013).

In einer Studie, welche in Hessen in den Jahren 2008-2009 durchgeführt wurde, konnte man ebenfalls die Dominanz der Ribotypen 001 und 027 bestätigen (Arvand et al. 2010).

Ebenso wurden in Süddeutschland Daten über *C. difficile* der Jahre 200-2007 gesammelt, welche zeigten, dass der Ribotyp 001 gehäuft vorkam (Eurosurveillance 2008).

Andere Studien zeigen dagegen, dass gewisse Weltregionen keinesfalls oder nur gering von dem Ribotyp 027 betroffen sind. So besagt beispielsweise eine Studie in Südost-Schottland, welche mit 353 molekularbiologisch bestätigten CDI-Proben durchgeführt wurde, dass kein Ribotyp 027 detektiert wurde, während der Ribotyp 001 dominierte (Taori et al. 2013). Ebenfalls zeigt eine andere Studie, welche in Asien durchgeführt wurde, dass die Ribotypen 027 und 078 eher rar sind und stattdessen der Ribotyp 017 epidemisch über mehrere asiatische Regionen ausbrach. Bemerkenswert war dort, dass es sich um Toxin-A-negative/Toxin-B-positive Stämme handelte (Collins et al. 2013). Bei einer weiteren Studie in Taiwan, in der 149 Patienten an einem Screening-Verfahren auf *C. difficile* teilnahmen, konnte ebenfalls kein 027er-Stamm gefunden werden (Wei et al. 2013).

In einer weiteren saarländischen Studie, welche 2012 Isolate aus dem UKS und anderen nationalen Einsendern Deutschlands untersuchte, war die Verteilung der prädominanten Ribotypen noch zugunsten des Ribotyps 001 mit 18%, gefolgt von Ribotyp 014 mit 16% und Ribotyp 027 mit 15% (Müller et al. 2012). Dies deutet auch auf eine Weiterentwicklung des Ribotyps 027 hin.

Resistenztestung der Ribotypen

Die Sensibilitätsprüfung aller Ribotyp-Stämme ergab, dass sie zu 100% sensibel gegenüber Vancomycin sind, zu 99,5% sensibel gegenüber Metronidazol und zu 92,4% sensibel gegen-

über Rifampicin. Auf Moxifloxacin reagierten nur noch 52,9% der Proben, auf Clarithromycin 49,4%.

Bemerkenswert ist, dass die Resistenz gegenüber Rifampicin zu 87% durch den Ribotyp 027 bedingt war. Insgesamt zeigten 29% der Proben des Ribotyps 027 eine Resistenz gegenüber Rifampicin. Dies deutet auf die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Rifampicin hin. Weiterhin zeigte der Ribotyp 027 zu 100% eine Resistenz gegenüber Moxifloxacin und zu 99% gegenüber Clarithromycin.

Ebenso bemerkenswert ist der Ribotyp 001, welcher in 84% der Fälle eine Resistenz gegenüber Clarithromycin zeigte und in 86% gegenüber Moxifloxacin.

Weiterhin nennenswert sind die Ribotypen 140 und 087 mit jeweils 54% und 36% resistenten Fällen gegenüber Clarithromycin und jeweils 15% und 45% resistenten Fällen gegenüber Moxifloxacin.

Dagegen zeigten die Stämme des Ribotyps 015 und 020 zu 100% eine Sensibilität gegenüber allen getesteten Antibiotika. Ebenso der Ribotyp 014, welcher lediglich 2% resistente Fälle gegenüber Clarithromycin zeigte.

Damit sind die Ribotypen 027 und 001 als multiresistente Stämme einzuordnen.

Gegenüber der oben schon erwähnten saarländischen Studie von 2012 kann gezeigt werden, dass die Resistenzen gegenüber Rifampicin diesmal höher sind (96% sensible gegenüber 92% sensible), ebenso wie die Resistenzen gegenüber Moxifloxacin und Clarithromycin (57%/58% sensible gegenüber 53%/49% sensible) (Müller et al. 2012).

In einer weiteren Studie im Jahr 2013 wurde der Ribotyp 078 mit den von EUCAST und CLSI empfohlenen Leitlinien auf Resistenzen getestet. Es wurden 49 humane Ribotypen isoliert, von denen 16% sensibel gegenüber Moxifloxacin waren (Keessen et al. 2013). Im Vergleich dazu wurden in dieser Studie 11 Proben mit dem Ribotyp 078 gefunden. Davon waren 6 sensibel gegenüber dem herkömmlichen Plattendiffusionstest mit Moxifloxacin und gegenüber der PCR-Methode (54,55%). Währenddessen wird in einem Brief der American Society for Microbiology über drastische Anstiege der Moxifloxacin-Resistenz in den letzten Jahren berichtet. (Mena et al. 2012), was dem Resistenzprofil dieser Studie ebenfalls entspricht. Es ist von einem Anstieg der Resistenz des Ribotyps 078 gegenüber Moxifloxacin auszugehen.

PCR Resistenzbestimmung

Durch die PCR aus nativem Material konnte in dieser Studie eine Resistenzaussage bezüglich Moxifloxacin erbracht werden. Bei 386 Proben konnte ein Vergleich zwischen der PCR-Bestimmung und der herkömmlichen Plattendiffusionstestung zur Bestimmung der Resistenzen hergestellt werden. Das Ergebnis erbrachte eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie einen hohen PPV und NPV von 98,29%, 95,34%, 95,03% und 98,40%, was in folgender Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 25: Vierfeldertafel der PCR gegenüber dem Plattendiffusionstest

	Plattendiffusionstest			Ergebnis		
		resistent	sensibel			
PCR		172	9	181	SEN	98,29%
	resistent	3	184	187	SPE	95,34%
	sensibel	175	193	368	PPV	95,03%
					NPV	98,40%

Diese Ergebnisse bringen hervor, dass die PCR-Methode eine zuverlässige Methode ist, um eine eventuelle Moxifloxacin-Resistenz der jeweiligen Proben zu erkennen. Verglichen mit dem Plattendiffusionstest werden annähernd identische Werte geliefert, siehe Tabelle 25. Da das PCR-Verfahren jedoch einen Zeitvorteil mit sich bringt, wäre es die Methode der Wahl.

Tabelle 26: Übersicht der Resistenzbestimmung des Plattendiffusionstests gegenüber der PCR

	Resistent	Sensibel	Total
Plattendiffusionstest	196 (46,78%)	223 (53,22%)	419
PCR	188 (48,58%)	199 (51,42%)	387

6 Literaturverzeichnis

C-Diff-Quik-Chek-Complete-Test(2013): Online verfügbar unter <http://www.alere.com/de/de/product-details/c-diff-quik-chek-complete.html>

Arvand, M.; Hauri, A.; Zaiß, N.; Witte, W.; Bettge-Weller, G. (2010): Schwer verlaufende Clostridium-difficile-Infektionen in Hessen 2008 – 2009. In: *Dtsch med Wochenschr* 135 (40), S. 1963–1967. DOI: 10.1055/s-0030-1263342.

Bartlett, John G. (2006): Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. In: *Ann Intern Med* 145 (10), S. 758–764.

Bartlett, John G.; Onderdonk, Andrew B.; Cisneros, Ronald L.; Kasper, Dennis L. (1977): Commentary: Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. *J Infect Dis* 1977; 136:701. In: *J Infect Dis* 190 (1), S. 202–209. DOI: 10.1086/421470.

Bauer, Martijn P.; Notermans, Daan W.; van Benthem, Birgit H B; Brazier, Jon S.; Wilcox, Mark H.; Rupnik, Maja et al. (2011): *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. In: *Lancet* 377 (9759), S. 63–73. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61266-4.

Brecher, S. M.; Novak-Weekley, S. M.; Nagy, E. (2013): Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections: There Is Light at the End of the Colon. In: *Clinical Infectious Diseases* 57 (8), S. 1175–1181. DOI: 10.1093/cid/cit424.

Bruins, M. J.; Verbeek, E.; Wallinga, J. A.; Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S.; Kuijper, E. J.; Bloembergen, P. (2012): Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31 (11), S. 3035–3039. DOI: 10.1007/s10096-012-1658-y.

Buchner, A. M.; Sonnenberg, A. (2001): Medical diagnoses and procedures associated with *Clostridium difficile* colitis. In: *The American journal of gastroenterology* 96 (3), S. 766–772. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.03619.x.

Carroll, K. C.; Buchan, B. W.; Tan, S.; Stamper, P. D.; Riebe, K. M.; Pancholi, P. et al. (2013): Multicenter Evaluation of the Verigene *Clostridium difficile* Nucleic Acid Assay. In: *Journal of Clinical Microbiology*. DOI: 10.1128/JCM.01690-13.

Cloud, Jeffrey; Kelly, Ciaran P. (2007): Update on *Clostridium difficile* associated disease. In: *Curr Opin Gastroenterol* 23 (1), S. 4–9. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32801184ac.

Collins, Deirdre A.; Hawkey, Peter M.; Riley, Thomas V. (2013): Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. In: *Antimicrob Resist Infect Control* 2 (1), S. 21. DOI: 10.1186/2047-2994-2-21.

Crobach, M J T; Dekkers, O. M.; Wilcox, M. H.; Kuijper, E. J. (2009): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 (12), S. 1053–1066. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03098.x.

Dallal, Ramsey M.; Harbrecht, Brian G.; Boujoukas, Arthur J.; Sirio, Carl A.; Farkas, Linda M.; Lee, Kenneth K.; Simmons, Richard L. (2002): Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. In: *Ann Surg* 235 (3), S. 363–372.

Debast, Sylvia B.; Bauer, Martijn P.; Kuijper, Ed J. (2013): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). In: *Clin Microbiol Infect*, S. n/a. DOI: 10.1111/1469-0691.12418.

Debatisse, Michelle; Malfoy, Bernard (2005): Gene amplification mechanisms. In: *Advances in experimental medicine and biology* 570, S. 343–361. DOI: 10.1007/1-4020-3764-3_12.

Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; Ärzteblatt, Redaktion Deutsches: Clostridium-difficile-assoziierte Diarrhö 2007: Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger (01.06.2007). Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/archiv/55860/>, zuletzt geprüft am 24.09.2013.

Eichel-Streiber, Christoph von; Braun, Veit (2008): Das difficile Clostridium / The difficile Clostridium. In: *Laboratoriums Medizin* 32 (4), S. 219–234. DOI: 10.1515/JLM.2008.043.

Eurosurveillance (2008): Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 001 in southern Germany. Online verfügbar unter <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V13N49/art19057.pdf>, zuletzt aktualisiert am 08.12.2008, zuletzt geprüft am 26.10.2013.

- Gerding, Dale N.; Muto, Carlene A.; Owens, Robert C. (2008):** Treatment of *Clostridium difficile* infection. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 1, S. S32-42. DOI: 10.1086/521860.
- Goldenberg, Simon D.; Gumban, Maria; Hall, Anthony; Patel, Amita; French, Gary L. (2011):** Lack of effect of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile* by glutamate dehydrogenase and polymerase chain reaction. In: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (3), S. 417–419. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.012.
- Jansen, A.; Kleinkauf, N.; Weiß, B.; Zais, N.; Witte, W.; Bornhofen, B. et al. (2010):** Clostridium-difficile-Ribotyp 027: Epidemiologie und Klinik des erstmaligen endemischen Auftretens in Deutschland. In: *Z Gastroenterol* 48 (09), S. 1120–1125. DOI: 10.1055/s-0029-1245269.
- Kawada, Miki; Annaka, Megumi; Kato, Haru; Shibasaki, Sumie; Hikosaka, Keiko; Mizuno, Hiroshi et al. (2011):** Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in faeces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. In: *J Infect Chemother* 17 (6), S. 807–811. DOI: 10.1007/s10156-011-0267-5.
- Keessen, Elisabeth C.; Hensgens, Marjolein P. M.; Spigaglia, Patrizia; Barbanti, Fabrizio; Sanders, Ingrid MJG; Kuijper, Ed J.; Lipman, Len J. A. (2013):** Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet *Clostridium difficile* PCR-Ribotype 078. In: *Antimicrob Resist Infect Control* 2 (1), S. 14. DOI: 10.1186/2047-2994-2-14.
- Kyne, L.; Warny, M.; Qamar, A.; Kelly, C. P. (2000):** Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. In: *The New England journal of medicine* 342 (6), S. 390–397. DOI: 10.1056/NEJM200002103420604.
- Kyne, Lorraine; Hamel, Mary Beth; Polavaram, Rajashekhar; Kelly, Ciaran P. (2002):** Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. In: *Clin Infect Dis* 34 (3), S. 346–353. DOI: 10.1086/338260.
- Leis, Jerome A.; Gold, Wayne L.; Ng, John; Hirji, Zahir; Pillai, Dylan R.; Broukhanski, George et al. (2013):** Indeterminate tcdB using a *Clostridium difficile* PCR assay: a retrospective cohort study. In: *BMC Infect Dis* 13 (1), S. 324. DOI: 10.1186/1471-2334-13-324.
- McDonald, L. Clifford; Killgore, George E.; Thompson, Angela; Owens, Robert C Jr; Kazakova, Sophia V.; Sambol, Susan P. et al. (2005):** An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. In: *N Engl J Med* 353 (23), S. 2433–2441. DOI: 10.1056/NEJMoa051590.

- McFarland, L. V.; Mulligan, M. E.; Kwok, R. Y.; Stamm, W. E. (1989):** Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. In: *N Engl J Med* 320 (4), S. 204–210. DOI: 10.1056/NEJM198901263200402.
- Mena, A.; Riera, E.; Lopez-Causape, C.; Weber, I.; Perez, J. L.; Oliver, A. (2012):** In Vivo Selection of Moxifloxacin-Resistant *Clostridium difficile*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5), S. 2788–2789. DOI: 10.1128/AAC.06433-11.
- Müller, L.; Halfmann, A.; Herrmann, M. (2012):** Aktuelle Daten und Trends zur Antibiotikaresistenzentwicklung von *Clostridium difficile*. In: *Bundesgesundheitsbl.* 55 (11-12), S. 1410–1417. DOI: 10.1007/s00103-012-1556-6.
- Pallis, A.; Jazayeri, J.; Ward, P.; Dimovski, K.; Svobodova, S. (2013):** Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins from stool samples using real-time multiplex PCR. In: *Journal of Medical Microbiology* 62 (Pt_9), S. 1350–1356. DOI: 10.1099/jmm.0.058339-0.
- Planche, Timothy D.; Davies, Kerrie A.; Coen, Pietro G.; Finney, John M.; Monahan, Irene M.; Morris, Kirsti A. et al. (2013):** Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of C difficile infection. In: *The Lancet Infectious Diseases* 13 (11), S. 936–945. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70200-7.
- RKI (2014):** RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - *Clostridium difficile*. Online verfügbar unter http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html#doc2393684bodyText7, zuletzt aktualisiert am 10.11.2014, zuletzt geprüft am 10.11.2014.
- Robert Koch-Institut (RKI) - Epidemiologisches Bulletin 25/2013:** Epidemiologisches Bulletin 25/2013.
- Robert Koch-Institut (RKI) - Epidemiologisches Bulletin 46/2007:** Epidemiologisches Bulletin 46/2007.
- Schlottmann, R.; Kaup, B.; Kaase, M.; Tannapfel, A.; Schmidt, W. E.; Schmitz, F. (2007):** Clostridium-difficile-assoziierte Erkrankungen. In: *Gastroenterologie* 2 (1), S. 53-63. DOI: 10.1007/s11377-006-0058-1.
- Sebahia, Mohammed; Wren, Brendan W.; Mullany, Peter; Fairweather, Neil F.; Minton, Nigel; Stabler, Richard et al. (2006):** The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. In: *Nat Genet* 38 (7), S. 779–786. DOI: 10.1038/ng1830.

Shetty, N.; Wren, M.W.D.; Coen, P. G. (2011): The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. In: *Journal of Hospital Infection* 77 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.jhin.2010.07.024.

Surawicz, Christina M. (2004): Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. In: *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 1 (1), S. 32–38. DOI: 10.1038/ncpgasthep0018.

Taori, S. K.; Wroe, A.; Poxton, I. R. (2013): *Clostridium difficile* infections in South East Scotland: mortality and recurrence in a region without PCR Ribotype 027. In: *Journal of Medical Microbiology* 62 (Pt_9), S. 1468–1477. DOI: 10.1099/jmm.0.061093-0.

Tedesco, F. J.; Barton, R. W.; Alpers, D. H. (1974): Clindamycin-associated colitis. A prospective study. In: *Ann Intern Med* 81 (4), S. 429–433.

Vardakas, Konstantinos Z.; Polyzos, Konstantinos A.; Patouni, Konstantina; Rafailidis, Petros I.; Samonis, George; Falagas, Matthew E. (2012): Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with Vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 40 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.004.

Weber, Irene; Riera, Elena; Déniz, Candi; Pérez, José L.; Oliver, Antonio; Mena, Ana (2013): Molecular Epidemiology and resistance profiles of *Clostridium difficile* in a tertiary care hospital in Spain. In: *International Journal of Medical Microbiology* 303 (3), S. 128–133. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.016.

Wei, Hsiao-Lun; Wei, Sung-Hsi; Huang, Chien-Wen; Shih, Chih-Hung; Huang, Yi-Wen; Lu, Min-Chi et al. (2013): Molecular typing and epidemiology of *Clostridium difficile* in respiratory care wards of central Taiwan. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. DOI: 10.1016/j.jmii.2013.03.014.

Wilcox, M. H. (2012): Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. In: *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 6, S. 13–20. DOI: 10.1111/1469-0691.12057.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den lieben Menschen bedanken, die mir während der drei Jahre geholfen haben meine Dissertation anzufertigen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, vor allem meinen Eltern, ihr habt mir erst ermöglicht dieses Studium zu beginnen. Danke für die ständige Unterstützung bei all den Sachen während der gesamten Jahre, immer war ein offenes Ohr da wenn es mal nicht weiter ging. Vielen Dank auch an meine lieben Geschwister, ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen.

Ebenso möchte ich mich aufrichtig bei meiner Frau Marina Zevallos bedanken. Danke für deine vielseitige Hilfe in allerlei Dingen während des gesamten Studiums. Ohne dich wäre vieles nicht so schön und vor allem nicht so einfach geworden. Danke dafür, dass du mir immer Freiräume schaffen konntest wenn es nötig war. Und Danke natürlich für die süßen zwei Kinder die wir während der Zeit bekommen haben. Ohne euch wäre all dies nicht so erfolgreich verlaufen. Ihr habt mir immer Mut gemacht.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Lutz von Müller. Vielen lieben Dank für die gute Betreuung während der gesamten Zeit. Ich hatte an Ihnen stets einen Ansprechpartner der mir bei großen und kleinen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Erklärend und hinweisend waren Sie stets mit offenem Herzen und Freundlichkeit mir gegenüber, sei es vor Ort oder aus der Ferne. Dank Ihrer Unterstützung konnte diese Arbeit gelingen, vielen Dank für die umfangreiche und gut gelungene Organisation.

Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Team des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Homburg bedanken. Insbesondere den vielen helfenden Mitarbeitern des Labors für die Umsetzung und tatkräftige Unterstützung während der Arbeit im Labor. Ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen.

Ein Lob geht auch an das Sekretariat mit Frau Silke Mahler, vielen Dank für die vielen geführten Telefonate und den Interaktionen mit den Studienteilnehmern aus Deutschland und dem Ausland. Ihre Hilfe war sehr wertvoll und die Mitarbeit mit Ihnen war sehr angenehm.

Ganz herzlich möchte ich mich ebenfalls bei Anna Nimmesgern und Tabea Kramer bedanken. Mit euch wurde die Arbeit im Institut sehr angenehm, es ging stets freundlich und oft auch lustig zu. Dank euch kam auch ein Schwung Spaß in die Sache. Nicht zu vernachlässigen die vielen Male wo ihr mit Eurer Unterstützung immer ansprechbar wart und mir bei Fragen hilfsbereit zur Seite standet. Ein schöneres Team kann man sich nicht Wünschen.

Auch bei meinem Freundeskreis möchte ich mich bedanken, für die vielen Male die ihr mich aufgemuntert habt weiter zu machen. Insbesondere meiner damaligen Kommilitonin Cornelia Thielen. Ebenso meinem Kommilitonen Markus Mock der mir bei kniffligen Excel Aufgaben helfen konnte.

Danke auch an die Korrekturleser (insbesondere Sarah Wehmeier) für eure Zeit die ihr aufgebracht habt um mir zu helfen. Dank euch sind viele kleinere und größere Fehler in meiner Dissertation beseitigt worden.

8 Anhang

8.1 Geräte, Reagenzien und Software

Tabelle 27: Verwendete Geräte, Reagenzien und Software

Kultur	
COS (Columbia agar + 5% sheep blood)	Biomérieux
Anaerobiertopf 2,5 l-Volumen mit Deckel	Merck
Plattenkorb für 12 Petrischalen	Merck
Anaerobier-Sicherheitskatalysator	Oxoid
Macs mics jar gassing system	Don Whitley Scientific
CLO (Selektivmedium zur Anzucht von <i>C. difficile</i> aus Stuhlproben)	Biomérieux
GENbox Anaerobiertopf 7,0 l	Biomérieux
GENbox anaer (10 Aluminiumbeutel mit je 1 Gasgenerator)	Biomérieux
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus
Massenspektrometrie	
MALDI Biotyper mit MALDI Biotyper Automation Control Software	Bruker
HPLC geeignetes Wasser	Fluka
Formic-Acid	Fluka
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich
Acetonitrile	Fluka
Ethanol absolut	Fluka
Ethanol 70 %	Zentrales Chemikalienlager UdS
Trifluoressigsäure 80 %	Zentrales Chemikalienlager UdS

HCCA portioned		Bruker
BTS (Bakterien-Test-Standard)		Bruker
Antigennachweis		
C. diff Quik Chek Complete Inhalt: Testkarte Verdünnungspuffer Waschpuffer Substrat Konjugat Positivkontrolle Einweg-Kunststoffpipette		Techlab
Reagenzgläser		Eppendorf
Applikator Stäbchen		
Lab Dancer S40	Vortexer	VWR
Stuhl-/Kulturaufreinigung		
Maxwell 16 MDx Instrument		Promega
Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit Inhalt: Maxwell 16 LEV RNA Cartridges Nuclease free water Elution tubes 0,5ml LEV Plungers		Promega
Polymerase-Ketten-Reaktion		
Galaxy Mini Star	Zentrifuge	VWR
Multiply-µStrip Pro 8er Kette	0,2 ml PCR-Gefäße	Sarstedt
GTQ-Cycler 24	Thermocycler	Hain Lifescience
Taq Polymerase Qiagen (50/U) Inhalt: Taq Qiagen 5U/µl MgCl ₂ 25mM 10x Puffer (15mM MgCl ₂) H ₂ O dest.		Hain Lifescience

PNM (Primer-Nukleotid-Mix, GenoType CDiff Ver 1.0 Kit)	Hain Lifescience
Hybridisierung	
ProfiBlot II T automatischer Hybridisierungsblotprozessor	Tecan
GenoType CDiff Ver 1.0 Kit Inhalt: Membranstreifen Denaturierungsreagenz Hybridisierungspuffer Stringent-Waschlösung Rinse-Lösung Konjugat-Konzentrat Konjugat-Puffer Substrat-Konzentrat Substrat-Puffer Aqua destillata	Hain Lifescience
Auswertung der Daten	
Hausinternes MIB-Programm	
[M/Lab] Software	Dorner HealthSolutions
Excel 2007	Microsoft
Auswertung der Laborergebnisse	
Protokollbogen (enthalten in GenoType CDiff Ver 1.0 Kit)	Hain Lifescience
Schablone (enthalten in GenoType CDiff Ver 1.0 Kit)	Hain Lifescience
[M/Lab] Software	Dorner Health Solutions

8.2 Überblick zum Vergleich der Methoden der CDI-Diagnostik

Tabelle 28: Überblick der Tests der CDI-Diagnostik

Genetisches Profil	Anzahl	Toxin	tcdC	Moxifloxacin Empfindlichkeit	GDH Test positiv	PCR nativ positiv	PCR nativ negativ	Kultur positiv	Kultur negativ
Apathogen	25	negativ	negativ	Wildtyp	25	25	0	23	2
Apathogen	1	negativ	negativ	Mutation	1	1	0	1	0
Virulent	13	A,B,binär	WT	Wildtyp	13	13	0	13	0
Virulent	25	A,B,binär	WT	Mutation	25	25	0	24	1
Virulent	153	A,B	WT	Wildtyp	153	153	0	145	8
Virulent	88	A,B	WT	Mutation	88	88	0	85	3
Hochvirulent	8	A,B,binär	delta-39bp	Wildtyp	8	8	0	8	0
Hochvirulent	3	A,B,binär	delta-39bp	Mutation	3	3	0	2	1
Ribotyp 027	71	A,B,binär	delta-18bp,117	Mutation	71	71	0	71	0
Keine CDI (tpi=0)	46	negativ			46	0	46	17	29
Keine Zuordnung	39	A,B,binär	diverse	nicht auswertbar	39	39	0	35	4
Gesamt	472				472	426	46	424	48

8.3 Baumdiagramm des Verarbeitungsprozesses der Gesamtproben

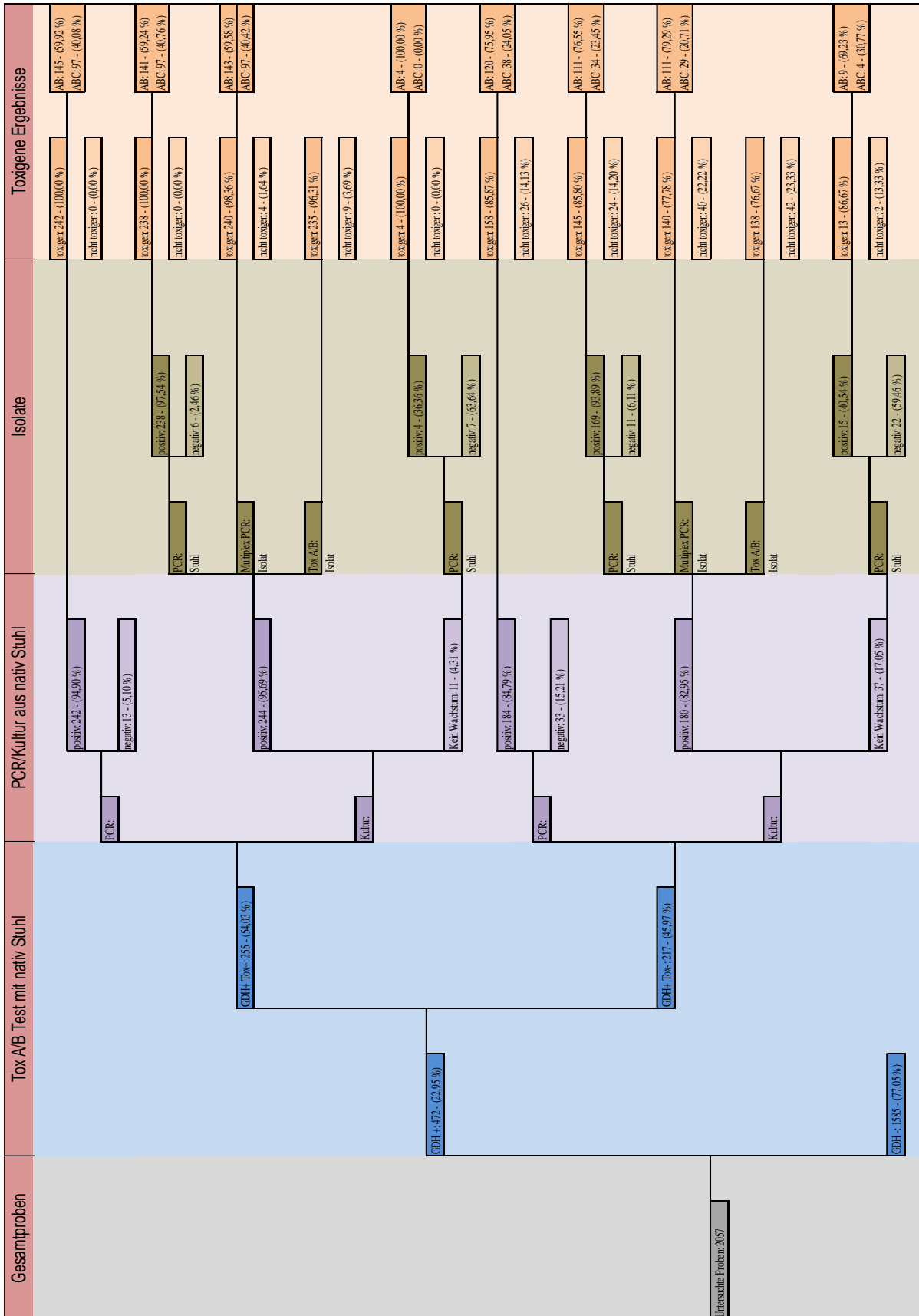


Abbildung 16: Baumdiagramm des Bearbeitungsprozesses der Gesamtproben

8.4 Vierfeldertafeln

Tabelle 29: Vierfeldertafel der PCR gegenüber der Kultur

	Kultur			Ergebnis		
		positiv	negativ		SEN	95,99%
PCR	positiv	407	19	426	SPE	60,42%
	negativ	17	29	46	PPV	95,54%
		424	48	472	NPV	63,04%

Tabelle 30: Vierfeldertafel des Toxin A/B-Test aus nativem Material gegenüber dem Goldstandard

	Goldstandard			Ergebnis		
		toxigen	nicht toxigen		SEN	59,90%
C. Diff Quick Check Complete Test	toxigen	248	7	255	SPE	87,93%
	nicht toxigen	166	51	217	PPV	97,25%
		414	58	472	NPV	23,50%