Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. K. Pfeffer

# Korrelation der Typisierung von *Clostridium difficile* Isolaten und klinischen Daten der Patienten mit *Clostridium difficile* Infektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christina Krajewski

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zweitgutachter: PD Dr. med. Timo Brandenburger

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern. Ich möchte ihnen hiermit für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage und für die Ermöglichung meines Studiums danken.

**Zusammenfassung (deutsch)**

In den letzten Jahren kam es weltweit zu einer Zunahme der *Clostridium difficile* Infektionen, wobei insbesondere Ausbrüche des Ribotypen (RT) 027 durch vermeintlich erhöhte Virulenz ein Problem darstellen. Die Träger dieses RTs zeigen laut einigen Studien einerseits bei Ausbruch der Infektion eine schwerere Klinik als Träger anderer RTs, zudem finden sich vermehrt Resistenzen gegen Antibiotika und auch die Anwesenheit anderer Toxingene, wie die Anwesenheit binärer Toxingene, wurde beschrieben. Es gibt jedoch auch Studien, welche besagen, dass RT 027 nicht virulenter ist als andere Ribotypen. Ebenso gibt es zunehmend Studien über andere Ribotypen, welche ein ähnliches Muster an Genexpressionen für Toxine wie RT 027 zeigen. Daher war das Ziel dieser Arbeit, über einen Zeitraum von anderthalb Jahren die klinischen und molekularbiologischen Merkmale verschiedener Stämme der im UKD mit *Clostridium difficile* infizierten Patienten zu untersuchen und vergleichen.

Die angewandte Methode der Unterscheidung verschiedener Stämme war in dieser Studie die *slpA* Sequenzierung. Hierbei konnten die meisten Isolate den *slpA*-Typen gr und gc8, korrelierend mit RT 001 und 027, zugeordnet werden. In den molekularbiologischen Untersuchungen zeigte sich, dass *slpA*-Typ gc8 der einzige *slpA*-Typ war, bei dem alle Isolate die Gene für Toxin A und B und für das binäre Toxin B exprimierten und eine Punktdeletion im *tcdC*-Gen (Δ117-TcdC) besaßen. Die zu *slpA* gr und gc8 gehörenden Isolate waren auffallend häufig gegen Erythromycin und Moxifloxacin resistent. Alle getesteten Isolate waren gegenüber Vancomycin und Metronidazol sensibel. Bei der Prüfung der klinischen Daten fiel auf, dass es zwar *slpA*-Typen gab, die in einigen Aspekten mit einer erhöhten Pathogenität assoziiert waren als andere *slpA*-Typen, jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass es einen *slpA*-Typen gab, der insgesamt zu einer signifikant pathogeneren Klinik führte als die anderen *slpA*-Typen.

Um eine noch größere Aussagekraft und auch Signifikanzen im Bereich der klinischen Daten zu erreichen, wäre es sicherlich sinnvoll, eine ähnliche Studie über einen noch längeren Zeitraum mit einem größeren Patientenkollektiv durchzuführen. Ebenso könnte versucht werden, die *slpA*-Typen mittels anderer Primer zu detektieren, sodass alle Proben einem *slpA*-Typen zugeordnet werden könnten. Zudem wäre es sicherlich sinnvoll, eine ähnliche Studie prospektiv durchzuführen um mehr Daten zuverlässiger erfassen zu können.

**Zusammenfassung (englisch)**

In recent years there has been an increase of *Clostridium difficile* infections worldwide, in which outbreaks of Ribotype (RT) 027 present a particular problem due to the putative virulence of this strain. Carriers of this RT have been shown to have a more severe clinical presentation during outbreaks than carriers of other RTs. In addition, this strain displays increased resistance against antibiotics and contains genes like those for binary toxins, which may contribute to virulence. On the other hand, some studies describe that RT 027 is not more virulent than other RT and there are a number of studies describing RTs with similar toxin genes. Thus, the aim of this work was to analyse and compare clinical and molecular biological characteristics of different strains from patients infected with *Clostridium difficile* in the UKD over a period of one and a half years.

The method used for discriminating different strains in this study was *slpA* sequence typing. Most isolates could be assigned to *slpA* gr and gc8, correlating to RT 001 and 027. Molecular biological analysis showed that *slpA* type gc8 was the only *slpA* type in which all isolates carried the genes for toxin A and B, binary toxin B and point deletion of the *tcdC* gene (Δ117-TcdC*)*. All *slpA* gr and gc8 isolates tested were sensitive to vancomycin and metronidazole, however more than 50 % were resistant to erythromycin and moxifloxacin. Analysis of the clinical data was remarkable in that while there are *slpA* types associated with a high pathogenicity in some aspects, there was not a single *slpA* type leading to a significantly more pathogenic clinical presentation than the other *slpA* types.

In order to reach an even higher validity and significant information concerning clinical data, it would certainly be reasonable to undertake a similar study over an even longer period with more patients. In addition, using different primers to match all samples to *slpA* types could be attempted in order to detect more *slpA* types. Furthermore, a prospective study may provide a clearer picture of the relationship between strain and clinical presentation and/or virulance.

**Abkürzungsverzeichnis**

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| AB | Antibiotikum |
| bp | Basenpaar |
| CDAD | *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoe |
| CDI | *Clostridium difficile* Infektion |
| CT | Computertomographie |
| *C. diff.* | *Clostridium difficile* |
| Del. | Deletion |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| ERY | Erythromycin |
| i.v. | intravenös |
| kbp | Kilobasenpaar |
| McF | McFarland |
| MHS | Mueller Hinton |
| MLST | Multilokussequenzierung |
| MLVA | multiple-locus-variable-number-tandem-repeat analysis |
| MTZ | Metronidazol |
| MXF | Moxifloxacin |
| NT | nicht typisierbar |
| PaLoc | Pathogenitätlocus |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |

| | |
|---|---|
| PFGE | Pulsfeldgelelektophorese |
| PMC | Pseudomembranöse Colitis |
| PPI | Protonenpumpeninhibitoren |
| R | resistent |
| REA | restriction endonuclease analysis |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| RT | Ribotyp |
| S | sensibel |
| *slpA* | surface layer protein A |
| UKD | Universitätsklinikum Düsseldorf |
| VA | Vancomycin |

**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung ..... 1
1.1 Allgemeines ..... 1
1.2 Klinik ..... 1
1.3 Diagnose ..... 2
1.4 Therapie ..... 2
1.5 Virulenz ..... 3
1.6 Typisierung ..... 4
1.7 Zusammenhang zwischen Stämmen und Klinik ..... 5
1.8 Fragestellung der Arbeit ..... 7
2. Materialien und Methoden ..... 8
2.1 Materialien ..... 8
2.1.1 Bakterienkultur und Resistenzbestimmung ..... 8
2.1.2 Probenaufarbeitung ..... 8
2.1.3 PCR ..... 9
2.1.4 Glycerinstock ..... 9
2.2 Methoden ..... 9
2.2.1 Methoden der Zellkultur ..... 9
2.2.2 Molekularbiologische Methoden ..... 10
2.2.3 Statistische Methoden ..... 17
3. Ergebnisse ..... 18
3.1 Verteilung der Stämme ..... 18
3.1.1 Monatliche Verteilung der Proben ..... 18
3.1.2 Häufigkeit der einzelnen Stämme ..... 19
3.2 Typisierung nach Ribotyp ..... 20
3.3 Überprüfung des Vorhandenseins der für Toxine kodierenden Gene ..... 23
3.4 Resistenzbestimmung ..... 24
3.5 Klinische Daten ..... 26

4. Diskussion ..... 37
4.1 Verteilung der Stämme ..... 37
4.2 RT Fragmentlängenanalyse ..... 38
4.3 Vorhandensein der für die Toxine codierenden Gene ..... 39
4.4 Resistenzbestimmung ..... 40
4.5 Klinische Daten ..... 40
5. Literaturverzeichnis ..... 47
6. Anhang ..... 54
7. Danksagung ..... 56

**Tabellen und Abbildungen**

Tabelle 1: Primer für die Real-Time PCR. ....12
Tabelle 2: Ansatz für die Real-Time PCR. ....13
Tabelle 3: Primer für die *slpA* Sequenzierung....15
Abbildung 1: Anzahl der monatlich positiv auf Clostridium difficile getesteten Stuhlproben von Dezember 2011 bis Mai 2013. ....18
Abbildung 2: Anzahl der Isolate, die den jeweiligen *slpA*-Typen zugeordnet werden konnten. ....19
Abbildung 3: Übersicht über die jeweilige Anzahl der Isolate, die zu den *slpA*-Typen gehörten, denen weniger als fünf Isolate zugeordnet werden konnten. ....20
Abbildung 4: Anzahl der Isolate, die den jeweiligen RTs zugeordnet werden konnten.21
Tabelle 4: Verteilung der Gene des PaLocs sowie des für das binäre Toxin B codierenden Gens (cdtB) unter den *slpA*-Typen. ....23
Tabelle 5: Verhältnis zwischen cdtB Gen, Δ117-TcdC und *slpA*-Typisierung....24
Tabelle 6: Resistenz gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin. ....25
Tabelle 7: Demographische Daten der Patienten, von denen die *C. diff.*-*slpA*-Typen isoliert wurden. ....26
Tabelle 8: Aufnahme in eine Gesundheitseinrichtung in den letzten 12 Monaten. ....28
Tabelle 9: Tag der Probenentnahme und begleitende Beschwerden. ....29
Tabelle 10: Verteilung der Schweregrade der Diarrhoe. ....31
Tabelle 11: Rezidive mit der aktuellen Infektion, CT-Durchführung und Test auf Norovirus. ....32
Tabelle 12: Einnahme von Antibiotika im Jahr vor der Infektion, Einnahme von PPIs und Antidiarrhoika. ....33
Tabelle 13: Weiteres Vorhandensein von Diarrhoe, weitere Antibiotikagabe, folgende Rezidive nach der Infektion und Aufenthalt auf einer Intensivstation. ....35

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Bei *Clostridium difficile* handelt es sich um ein Gram positives, obligat anaerobes, ubiquitär vorkommendes, sporenbildendes Bakterium, das die häufigste diagnostizierte Ursache nosokomialer Diarrhoen ist. Es ist bei einer geringen Anzahl der Erwachsenen Teil der normalen Darmflora, die Zahl der Träger unter erwachsenen hospitalisierten Personen liegt in der ersten Woche der Hospitalisierung bei bis zu 13% und nach vier Wochen Krankenhausaufenthalt bei 50% (1). Der Grund hierfür ist, dass *Clostridium difficile* unter anderem bei mangelnder Hygiene durch Mitarbeiter in Gesundheitseinrichtungen und über kontaminierte Oberflächen übertragen werden kann. Jährlich kosten *Clostridium difficile* Infektionen das deutsche Gesundheitssystem 464 Millionen Euro (2). Kürzlich konnten in den USA auch in Gemüse *Clostridium difficile* Isolate nachgewiesen werden (3). Dies kann wiederum zu einer weiteren Verbreitung des Bakteriums durch orale Aufnahme führen. Die Letalität einer *Clostridium difficile* Infektion liegt bei 1-2%, sie steigt jedoch bei pseudomembranöser Colitis (PMC) auf 6-30% (4). Die momentan durch *Clostridium difficile* Infektionen verursachten Kosten liegen in den USA jährlich bei 800 Millionen $, in Europa bei 3 Milliarden € (5).

## 1.2 Klinik

Bei Einnahme verschiedener Antibiotika, insbesondere von Cephalosporinen und Chinolonen, führt eine Zerstörung der Darmflora zu einer Vermehrung der *Clostridium difficile* Keime. Die Klinik kann von milder Diarrhoe bis hin zu PMC mit toxischem Megacolon und folgender Colonperforation und Sepsis variieren. Als Risikofaktoren für eine *Clostridium difficile* Infektion gelten vor allem Immunsuppression und eine schwere Grunderkrankung, hohes Alter des Patienten, vorherige Einnahme von Breitspektrumantibiotika und Protonenpumpeninhibitoren (PPI) und kürzlicher Aufenthalt in einer Gesundheits- oder Pflegeeinrichtung (6).

### 1.3 Diagnose

Besteht der Verdacht auf eine *Clostridium difficile* Erkrankung, kann zunächst eine Endoskopie oder eine Computertomografie (CT) zum Nachweis der Pseudomembranen oder des toxischen Megakolons durchgeführt werden.

In der Regel wird jedoch eine mikrobiologische Diagnostik durchgeführt. In dieser werden hauptsächlich die Toxine aus einer Stuhlprobe nachgewiesen. In der Regel werden die Toxine mittels ELISA nachgewiesen. Hierbei ist es sinnvoll, sowohl Toxin A als auch Toxin B nachzuweisen, da nicht alle *Clostridium difficile* Isolate beide Toxine exprimieren. Die Toxine können ebenfalls per Zytotoxizitätstest nachgewiesen werden, welcher die Toxine mit hoher Spezifität und Sensitivität nachweist. Der Nachteil der Methode liegt jedoch darin, dass Zellkulturen angelegt werden müssen und das Ergebnis erst nach ein bis drei Tagen vorliegt.

Es gibt jedoch auch *Clostridium difficile* Isolate, welche weder Toxin A noch Toxin B exprimieren.

Ausgehend von einer Stuhlprobe kann ein Protein des *Clostridium difficile*-Bakteriums (das Enzym Glutamat-Dehydrogenase) im Stuhl per ELISA nachgewiesen werden. Dieser Test hat eine hohe Sensitivität und dadurch einen hohen negativ prädiktiven Wert.

Es kann ebenfalls eine Bakterienkultur aus der Stuhlprobe angelegt werden. Hierfür werden anaerobe Selektivnährmedien benötigt, welche 2 Tage lang bebrütet werden müssen. Hierbei kann nicht zwischen solchen Isolaten, die Toxine exprimieren, und solchen, die keine Toxine exprimieren, unterschieden werden, sodass aus der Kultur ein Toxintest Auskunft darüber geben muss. Aus den Bakterienkulturen können jedoch Isolate für Untersuchung per PCR und Ribotypisierung sowie Sequenzierung gewonnen werden.

### 1.4 Therapie

Therapiert werden kann eine *Clostridium difficile* Infektion (CDI) zunächst neben Korrektur des Elektrolythaushalts durch die Behandlung mit enteralem Vancomycin und/oder Metronidazol. Es wurde berichtet, dass 99,7% der *Clostridium difficile* Isolate gegenüber Metronidazol und Vancomycin sensibel sind (7). Ein Problem ist, dass es in 15 bis 20% der *Clostridium difficile* Infektionen zu Rezidiven kommt (8).

Eine initiale CDI mit mildem oder moderatem Verlauf soll, wenn es der klinische Zustand des Erkrankten zulässt, durch Beenden der antibiotischen Therapie für 48 Stunden behandelt werden. Alternativ wird eine Behandlung mit oralem Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomycin empfohlen. Im Falle einer schweren Infektion sind Vancomycin oder Fidaxomycin oral die Mittel der Wahl. Bei einem komplizierten Verlauf wie bei Kolonperforation werden Kolektomie oder die Anlage eines Loop-Ileostomas empfohlen.

Ein erstes Rezidiv kann mit Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomycin oral therapiert werden. Ein zweites Rezidiv soll mit oralem Vancomycin oder Fidaxomycin behandelt werden, während bei multiplen Rezidiven eine Stuhlspende kombiniert mit oraler Vancomycin-Gabe in Betracht gezogen werden soll.

Falls keine orale Therapie möglich ist, ist einerseits Metronidazol i.v., andererseits Vancomycin per Magensonde oder als kolorektale Gabe indiziert (9).

### 1.5 Virulenz

Hauptsächlich verantwortlich für die Virulenz einer CDI ist der Pathogenitätslocus (PaLoc), welcher 19,6 Kilobasenpaare (kbp) lang ist und Gene enthält, die für folgende Toxine codieren: ein Enterotoxin (Toxin A, TcdA), ein Cytotoxin (Toxin B, TcdB), Toxine, welche die Menge der Produktion von TcdA und TcdB regulieren (TcdC und TcdR) und TcdE, welches eine Rolle bei der Ausschüttung der Toxine aus dem Bakterium spielt (10). Das Enterotoxin führt zu Diarrhoe, während das Cytotoxin zur Cytolyse des Colonepithels führt. In der log-Phase des Bakteriumwachstums wird viel TcdC produziert und wenig TcdA, TcdB, TcdD und TcdE, während in der stationären Phase TcdC wenig und die anderen Toxine viel produziert werden. Es wurde herausgefunden, dass TcdC die TcdR-abhängige Ausschüttung der anderen Toxine negativ reguliert (11). In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass TcdC keinen regulierenden Einfluss auf die Ausschüttung der anderen Toxine hat (12). Studien zufolge wird angenommen, dass TcdE für die Freisetzung der Toxine in die Umgebung zuständig ist (13) (14).

Die bisher isolierten und untersuchten *Clostridium difficile* Isolate waren meistens Träger der Toxine A und B, selten exprimierten die Isolate zwar Toxin B, nicht jedoch Toxin A oder keines der beiden Toxine (15). Es wurde beschrieben, dass Isolate, die zwar Toxin A, nicht jedoch Toxin B exprimieren, im Tierversuch keine Virulenz zeigen (16). Es wurde jedoch ebenfalls beschrieben, dass Isolate, die Toxin A nicht exprimieren, virulent sein können (17).

Einige Isolate produzieren die binären Toxine A und B (CdtA, CdtB), deren Funktion und Pathomechanismus nicht vollständig geklärt sind. Laut einer neuen Studien können sie eine Rolle bei rezidivierenden *Clostridium difficile* Infektionen spielen (18).

*Clostridium difficile* Isolate tragen Oberflächenproteine, darunter verschiedene Oberflächenproteine A (surface layper protein A, *slpA*) (19). Durch die *slpA*s können die Isolate an die Darmmukosa binden, wodurch die Invasion in die Mukosa reguliert wird. Zudem tragen sie auch zum Bakterienwachstum bei (20). Durch Blockade der Oberflächenproteine A mittels Antikörpern wird teilweise auch die Bindung der Bakterien an die Darmmukosa unterbunden und somit die Virulenz des Erregers verringert (21).

### 1.6 Typisierung

Bisher konnten über 100 verschiedene *Clostridium difficile*-Typen isoliert und analysiert werden (22). Hierzu gibt es verschiedene Typisierungsverfahren. Das in Europa am häufigsten benutzte Verfahren ist die Ribotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), andere Verfahren sind Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Multilokussequenzierung (MLST), multiple-locus-variable-number-tandem-repeat analysis (MLVA), restriction endonuclease analysis (REA), Toxinotyping und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Ebenso können *Clostridium difficile* Isolate anhand des Oberflächenproteins A typisiert werden (*slpA*-Sequenzierung) (23). Problematisch ist, dass es wenige standardisierte Sammlungen der einzelnen Stämme gibt, sodass die Nomenklaturen der einzelnen Verfahren sich unterscheiden. Dies macht einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Verfahren schwierig. So wird beispielsweise PCR-Ribotyp (RT) 027 als REA-Typ BI und PFGE-Typ NAP1 bezeichnet (24). Gerade die häufig vorkommenden Stämme sind mit allen Verfahren zuzuordnen und korrelieren oft miteinander, jedoch gibt es auch Stämme, bei denen die Korrelation der einzelnen Verfahren nicht eindeutig ist. Zudem ist bei einigen Verfahren die angewandte Methode zu grob, um in einer Ausbruchsituation genaue Unterscheidungen zwischen einzelnen Stämmen zu gewährleisten. Dies ist nur bei Ribotypisierung, REA und MLVA möglich.

Bei der *slpA*-Sequenzierung wird das Gen des Oberflächenproteins A des jeweiligen *Clostridium difficile* Isolates zunächst mittels PCR vervielfältigt. Durch weitere Aufarbeitung werden die einzelnen Nukleotide zu unterschiedlicher Fluoreszenz, welche mittels eines Detektors aufgenommen wird, angeregt. So können die Basensequenzen, welche unterschiedlich lang sind, aufgezeichnet werden. Anschließend werden sie mit

einer Datenbank abgeglichen, sodass der *slpA*-Typ detektiert werden kann. Der Nachteil der *slpA*-Sequenzierung liegt darin, dass nur ein Ausschnitt der gesamten *Clostridium difficile* Desoxyribonukleinsäure (DNA) typisiert wird. Die Vorteile dieser Technik sind, dass dadurch, dass mit der Sequenz des Genabschnittes, welche eindeutig ist und nicht von Interpretationen des Nutzers oder unterschiedlichen Bedingungen abhängig ist, gearbeitet wird, keine Referenzstämme benötigt werden und die Standardisierung des Verfahrens einfach ist. Ein standardisierter Vergleich der Ergebnisse verschiedener Labore ist mit sequenzbasierten Verfahren sehr viel einfacher als mit herkömmlichen Typisierungsverfahren (24). Auch bei Benutzung verschiedener Methoden der *slpA*-Sequenzierung werden gleiche Ergebnisse erzielt (25). Zum Teil können auch Kultur-negative Stämme mittels *slpA*-Sequenzierung typisiert werden, da direkt aus dem Stuhl eine PCR durchgeführt werden kann (26). Verglichen mit anderen Typisierungsmethoden ist die *slpA*-Sequenzierung kostengünstig und mit wenig Laboraufwand verbunden (25).

Als 2012 aus mehreren deutschen Referenzzentren verschiedene *Clostridium difficile* Isolate sequenziert wurden, zeigte sich, dass der am häufigsten ribotypisierte Stamm den Namen RT 001 trägt (7). Aktuell haben die Ribotypen 001, 027 und smz zu Ausbrüchen in den USA, in Europa und in Japan geführt (27) (28) (29) . Als besonders pathogene Stämme mit schweren Verläufen gelten RT 001 und vor allem RT 027.

Erstmals wurde RT 027 2004 isoliert, seitdem zeigt sich eine steigende Prävalenz (30). Er ist häufig resistent gegen Antibiotika, unter anderem Fluorochinolone und Makrolide (7). RT 027 besitzt eine 18 Basenpaare (bp) lange Deletion im Bereich des Genabschnittes, der für TcdC codiert, und eine einzelne bp-Deletion an Position 117 (bezeichnet als Δ117-TcdC), welche zu einem Stopp-Codon führt, sodass das Toxin nicht produziert wird. Hierdurch steigt die Produktion der anderen Toxine (31). Zudem besitzt dieser Stamm die binären Toxine CdtA und CdtB, bildet jedoch weniger Sporen als andere Stämme (32).

### 1.7 Zusammenhang zwischen Stämmen und Klinik

Darüber, ob einige Stämme zu einem schwerwiegenderen klinischen Verlauf führen als andere Stämme, gibt es gegensätzliche Angaben in der Literatur.

Anhand verschiedener Studien wurde gezeigt, dass verschiedene RTs zu unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen führen können. So wurde beschrieben, dass RT 027 pathogener ist als andere Stämme und die an ihm erkrankten Patienten an

einer schlimmeren Infektion leiden als die Träger anderer RTs. In einer groß angelegten kanadischen Studie mit 1008 Patienten konnte gezeigt werden, dass die Erkrankung an RT 027 zu einem schwereren Krankheitsverlauf als die Infektion mit anderen RTs führt. Außerdem führe ein hohes Alter kombiniert mit einer Infektion durch RT 027 zu einem noch größeren Risiko, an einem schweren Krankheitsverlauf zu leiden (33). Auch in einer europäischen Studie wurde 2005 beschrieben, dass 6,2% der in der Studie untersuchten Isolate zu RT 027 gehörten und die an diesem RT erkrankten Patienten einen schwerwiegenderen Verlauf als die an anderen RTs erkrankten Patienten zeigten (34).

Auch RT 244, der genetisch mit RT 027 verwandt ist, hat zu Infektionen geführt, die mit höheren Sterberaten und schwereren klinischen Verläufen als die Infektion mit anderen Ribotypen einhergegangen sind (35).

Ebenfalls wurde beschrieben, dass RT 078 zu einer schwereren Klinik führt als die anderen RTs (36). Hierbei erkrankten jedoch im Gegensatz zu RT 027 eher junge Patienten, welche die Infektion oft ambulant erworben haben (37). So verstarb beispielsweise eine 22-jährige Patientin an einer Infektion mit diesem RT (38).

Andere Studien zeigen jedoch, dass RT 027 nicht zu einem schwereren klinischen Verlauf führt. Aktuellen Angaben zufolge leiden die an RT 027 erkrankten Patienten außerhalb einer Ausbruchsituation, auch wenn sie durchschnittlich älter sind als die an anderen RTs erkrankten Patienten, eher in einer Pflegeeinrichtung leben und ihre Behandlung öfter von oralem Metronidazol auf intravenöses Metronidazol oder orales Vancomycin umgestellt wird, nicht an einem schwereren klinischen Verlauf der Infektion. Sie haben laut dieser Studie die gleiche Sterberate wie die an anderen RTs erkrankten Patienten und leiden vergleichbar häufig an Rezidiven (39). Laborparameter wie die Leukozytenzahl und die Albuminhöhe sollen ausschlaggebender für den Verlauf der Erkrankung sein als der die Infektion verursachende RT (40).

Passend hierzu wurde gezeigt, dass RT 027, zumindest, wenn er nicht innerhalb eines Ausbruchs isoliert wird, zu keiner schwereren Klinik als andere Stämme führt (41). Vor allem in einer nicht-Ausbruch-Situation sollen seine Isolate weniger Sporen, aber mehr Toxine, als die Isolate anderer RTs bilden und nicht zu einer schwereren klinischen Situation der Patienten führen (32).

### 1.8 Fragestellung der Arbeit

Bis 2008 konnten in 16 europäischen Ländern Isolate des RT 027 isoliert werden. Zwischen den Jahren 2000 und 2012 war *Clostridium difficile* der Durchfallerreger, der in Deutschland am meisten an Prävalenz zugenommen hat (42). Trotzdem gibt es bisher wenig große deutsche Studien, in denen *Clostridium difficile* Isolate typisiert wurden und auch wenig Studien, die sich in Deutschland mit dem Zusammenhang zwischen den einzelnen Stämmen und den klinischen Daten der Patienten befassen.

2007 wurde erstmals ein Ausbruch des *Clostridium difficile* RT 027 in Deutschland nachgewiesen (43). Bisher gibt es in Deutschland vor allem aus dem Saarland und Hessen Studien. In Hessen wurde in einer Studie zwischen 2011 und 2013 gezeigt, dass die beiden dort hauptsächlich vorhandenen RTs in diesem Zeitraum 001 und 027 waren, wobei die Prävalenz von RT 027 in dieser Zeit anstieg (44). Auch in einer Studie, die hauptsächlich mit Proben aus dem Saarland durchgeführt wurde, waren diese beiden RTs vorrangig vertreten, ebenso RT 014. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die national gesammelten Isolate sensibel gegenüber Metronidazol und Vancomycin waren, gerade die als virulent geltenden RTs jedoch häufig Resistenzen gegenüber systemisch angewandten Antibiotika zeigten (7). Ansonsten gibt es jedoch keine großen Studien über die Prävalenz der einzelnen RTs und auch keine Studie über die klinische Pathogenität der einzelnen RTs in Deutschland.

Daher ist das Ziel dieser Dissertation herauszufinden, wie die Verteilung der einzelnen Stämme bei einer großen Gruppe von *Clostridium difficile* Isolaten in Düsseldorf, also einer Großstadt in NRW, ist, welche Merkmale die Stämme hinsichtlich Toxinproduktion und Antibiotikaresistenzen zeigen und ob es Stämme gibt, die einen pathogeneren oder weniger pathogenen Krankheitsverlauf zeigen. Gerade die letzte Frage ist durch die kontroverse Datenlage darüber, ob es hypervirulente Stämme gibt oder nicht, von großem Interesse.

# 2. Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Bakterienkultur und Resistenzbestimmung

| | |
|---|---|
| COS-Platten | Biomérieux Nürtingen Deutschland |
| MHS-Platten | Biomérieux Nürtingen Deutschland |
| CLO-Platten | Biomérieux Nürtingen Deutschland |
| Wattestäbe | Hartmann Heidenheim Deutschland |
| Vortex | Heidolph Reax top Schwabach Deutschland |
| Dichtemesser Vitek Densi Check | Biomérieux Nürtingen Deutschland |
| Anaerobes Kultursystem | Anoxomat Mart Microbiology Drachten Niederlande |
| Erythromycin Antibiotika-Plättchen, 15μg | BD Sensi-Disc Heidelberg Deutschland |
| Metronidazol Antibiotika-Plättchen, 5μg | Oxoid Wesel Deutschland |
| Moxifloxacin Antibiotika-Plättchen, 5μg | BD Sensi-Disc Heidelberg Deutschland |
| Vancomycin Antibiotika-Plättchen, 30μg | BD Sensi-Disc Heidelberg Deutschland |

### 2.1.2 Probenaufarbeitung

| | |
|---|---|
| PBS-Puffer | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Invitrogen GIBCO Darmstadt Deutschland |
| Gerät zur Probenaufarbeitung | BioRobot EZ1, Qiagen Hilden Deutschland |
| Reagent Cartridge | Qiagen Hilden Deutschland |
| Sample tubes (2ml) | Qiagen Hilden Deutschland |
| Elution tubes (1,5ml) | Qiagen Hilden Deutschland |
| Disposable filter tips | Qiagen Hilden Deutschland |

| | |
|---|---|
| Disposable tip holders | Qiagen Hilden Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Hamburg Deutschland |
| Pipettenspitzen | Nerbe Plus Winsen Deutschland |
| Ösen | Sarstedt Nümbrecht Deutschland |

2.1.3 PCR

| | |
|---|---|
| Pipetten | Eppendorf Hamburg Deutschland |
| Pipettenspitzen | Nerbe Plus Winsen Deutschland |
| Mastermix | Qiagen Hilden Deutschland |
| Sonden | Metabion Martinsried Deutschland |
| Primer | Metabion Martinsried Deutschland |
| Wellplatten | Bioplastics Landgraaf Niederlande |
| PCR-Gerät | Biorad CFX München Deutschland |
| Tubes (1,5ml) | Sarstedt Nümbrecht Deutschland |
| Aqua dest. | Braun Melsungen Deutschland |

2.1.4 Glycerinstock

| | |
|---|---|
| Cryotubes (1,8ml) | NUNC Langenselbold Deutschland |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.2.1.1 Probengewinnung

Stuhlproben von Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf mit Verdacht auf eine CDI werden auf CLO-Agar ausgestrichen und 48 Stunden lang bei 37°C anaerob

bebrütet. Falls die Kultur verunreinigt ist, wird eine *Clostridium difficile* Kolonie auf COS-Agar isoliert. Sobald die *Clostridium difficile* Kolonien als Reinkultur vorliegen, können sie weiter verarbeitet werden.

#### 2.2.1.2 Probenaufbewahrung

Um die Proben zur späteren Verwendung aufzubewahren, werden alle *Clostridium difficile* Kolonien einer Agarplatte in 1ml Glyerinstock gegeben. Der Glycerinstock besteht zu 50% (v/v) aus Glycerin und zu 50% (v/v) aus LB-Medium (Hefeextrakt, Trypton, NaCl) und wird nach der Zugabe der Kolonien bei 4°C aufbewahrt.

#### 2.2.1.3 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung durch Plättchendiffusionstest

Für die Ausführung des Plättchendiffusiontestes werden *Clostridium difficile* Kolonien, die zuvor 48 Stunden lang anaerob bebrütet wurden, in 3ml 0,9% (m/V) Kochsalslösung aufgelöst. Die Suspension wird gevortext und anschließend die optische Dichte der Lösung auf 1-1.24 McFarland (McF) (=3*10^8 - 3,72*10^8 Bakterien/ml) eingestellt. Nun wird die Suspension auf eine Mueller Hinton (MHS) Agarplatte gegeben und 10 Minuten lang einwirken gelassen. Nach dieser Zeit wird die noch auf der Agarplatte befindliche Flüssigkeit abgesaugt und die Agarplatte wird zum kompletten Trocknen an die Luft gestellt. Danach werden 4 Antibiotikaplättchen (Erythromycin, Moxifloxacin, Metronidazol und Vancomycin) gleichmäßig auf den Agar aufgetragen. Abschließend wird die Agarplatte 24 Stunden lang bei 37°C anaerob bebrütet. Durch die Diffusion des Antibiotikums in den Agar wird ein Konzentrationsgradient gebildet, der das Wachstum der *Clostridium difficile* Bakterien konzentrationsabhängig hemmt.

Der Hemmhof wird nach 24 Stunden geprüft und gemessen.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Probenaufarbeitung für das Ribotyping

Um die DNA aus *Clostridium difficile* Kolonien aufzureinigen, werden je nach ihrer Größe zwei bis fünf Bakterienkolonien in 200µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)

aufgelöst. Die Suspension wird in einem Röhrchen in den BioRobot EZ1 gestellt, in welchem die Bakterien zunächst lysiert werden. Nach Hinzufügen von magnetisierten Siliciumdioxid-Partikeln zu der Lösung bindet die freie DNA an die Siliciumdioxid-Partikel. Durch Einführen eines Magneten werden die Siliciumdioxid-Partikel mit der DNA von der restlichen Lösung getrennt und die Lösung wird gewaschen. Unter weiterer Anwesenheit des Magneten wird die DNA eluiert und der DNA-haltige Überstand (100 µl) in ein neues Röhrchen gefüllt.

Die aufgereinigte DNA kann nun bei –20°C eingefroren oder direkt weiterverwendet werden.

#### 2.2.2.2 Multiplex Real-Time PCR

Die Real-Time PCR dient der Detektion der Gene tcdA, tcdB und Δ117-TcdC der durch die Probenaufarbeitung gewonnenen DNA. Zudem wird die DNA darauf untersucht, ob es sich um *Clostridium difficile* DNA handelt.

Zunächst wird ein Ansatz für die vorgesehene Anzahl an Proben hergestellt (s. Tabelle 1):

*Tabelle 1: Primer für die Real-Time PCR.*

| | Tox A | Tox B | C.diff | Δ117-TcdC |
|---|---|---|---|---|
| Mastermix (Hot Start Taq Polymerase, dNTPs, Puffer) | 12,5µl | | 12,5µl | |
| Primer I | tcdAF 1,25µl | tcdBF 1,25µl | CdF 1,25µl | tcdc-truncF 1,25µl |
| Primer II | tcdAR 1,25µl | tcdBR 1,25µl | CdR 1,25µl | tcdc-truncR 1,25µl |
| Sonde | tcdAS 1,25µl | tcdBS 1,25µl | CdS 1,25µl | tcdc-truncS 1,25µl |
| Aqua dest. | 2,5µl | | 2,5µl | |
| Insgesamt | 22,5µl | | 22,5µl | |

Es gibt somit zwei Ansätze, in denen sich jeweils zwei Primer-Sonde-Paare befinden. Die Ansätze werden gevortext und pro Probe 22,5µl in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. In jeweils ein Well der beiden Ansätze werden nun 2,5µl destilliertes Wasser als Negativkontrolle pipettiert, in zwei Wells je 2,5µl Standard-DNA-Proben (Konzentration: $10^5$ Plasmide pro µl bzw. $10^2$ Plasmide pro µl; Herstellung: s. 2.4.3) als Positivkontrolle, in den Ansatz für die Trunkierung und den *Clostridium difficile* Nachweis zusätzlich 2,5µl der aufgereinigten DNA des 078-Stammes und des 277-Stammes und in die restlichen Wells jeweils 2,5µl der zuvor aufgereinigten *Clostridium difficile* DNA.

Die 96-Wellplatte wird mit folgendem PCR-Lauf bearbeitet:

3 Minuten lang bei 95°C Erhitzung zur Herstellung der DNA-Einzelstränge, danach werden die folgenden beiden Schritte 30 Mal wiederholt: 95°C 10sek (Denaturierung) - 60°C 60sek (Annealing).

*Tabelle 2: Ansatz für die Real-Time PCR.*

| Gen | Primer | Genregion (bp) |
|---|---|---|
| tcdA | tcdAF: 5'-ATT CCA ATA CAA GYC GTC TAG AAA A-3'<br>tcdAR: 5'-TTT ATG TAT TCA AGA RCA ATA TCA CTG ACT-3'<br>tcdA-S: 5'Fam-RAT TTA CAT TTT GTA TGG ATA GGT GGA G-BHQ-1-3' | 796102-796186 |
| tcdB | tcdBF: 5'-AAC AGG TGT ATT TAG TAC AGA AGA TGG ATT-3'<br>tcdBR: 5'-AAT TGC TTC TCC TTC TAG GTT TTC AT-3'<br>tcdB-S: 5'-Hex-AAA TAT TTT GCC CCA GCT AAT ACA CTT-BHQ-1-3' | 793077-793161 |
| 16S | CdF: 5'-TGT ACA CAC GGA TAA CAT ACC GAA A-3'<br>CdR: 5'-CCG TTA CCT TAC CAA CTA GCT AAT CA-3'<br>CdS: 5'-Fam-CAT CTC TTG AAT ATC AAA GGT GAG CCA GTA CAG G-BHQ-1-3' | 125189-125289 |
| Δ117-TcdC | tcdc-truncF: 5'-TAT TGC TCT ACT GGC ATT TAT TTT GGT-3'<br>tcdc-truncR: 5'-AAA TGA CCT CCT CAT GGT CTT CA-3'<br>tcdc-truncS: 5'-TexasRed-TGT TTT TTG GCA ATA TAT CCT CAC CAG CTT GTT-BHQ-2-3' | 93-177 |

2.2.2.3 Plasmid-Herstellung

Plasmide, die die nachzuweisenden Gene tragen, werden hergestellt um quantifizierbare DNA zu produzieren um die Real-Time PCR zu quantifizieren und dienen als positive Kontrolle der Ansätze der Real-Time PCR. Für den Ansatz zur Bestimmung der Toxine werden Plasmide verwendet, die die Gene für die Toxine A und B enthalten, für den

Ansatz zur Bestimmung der von ∆117-TcdC und den Nachweis, dass es sich um *Clostridium difficile* DNA handelt, Plasmide, die die DNA des truncierten TcdC-Gens und von *Clostridium difficile* Bakterien enthalten. Als Positivkontrolle werden Plasmide verwendet, die die DNA der *C. difficile*-Stämme 078, 277 und 626 enthalten.

Das Zielgen, hier ein Teil des Toxin A Gens, wird durch die PCR amplifiziert, das PCR-Produkt zunächst aufgereinigt und 3,5µl des aufgereinigten PCR-Produkts werden mit 1µl Puffer zur Kontrolle auf ein Agarosegel (2,5% (m/v)) gegeben.

Das PCR-Produkt wird im PGEMT-Vektor ligiert, indem 3,5µl des PCR-Produkts mit 0,5µl (25ng) des Vektors, 1µl Dilutionspuffer, 1µl Ligationspuffer und 0,5µl T4-Ligase zusammenpipettiert und 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Dieser Ligationsmix wird nun in $3x10^6$ DH$\alpha$-kompetente *E. coli* gegeben und erst 30min lang auf Eis, dann 90sek lang in ein 42°C warmes Wasserbad und wieder auf Eis gestellt. Die Suspension wird in 400ml SOC-Medium gegeben und 1h lang bebrütet, bevor 50µl und 450µl der Lösung auf jeweils eine LB/Amp-Platte gegeben werden, die 12h lang bei 37°C bebrütet wird.

Mithilfe der Blau-Weiß-Färbung kann nun geprüft werden, welche Kolonien das Plasmid mit dem klonierten Gen besitzen und durch das Gen modifiziert wurden. Normalerweise tragen Bakterien eine ß-Galaktosidase. Durch Einführung eines Transgens in das Plasmid wird die ß-Galaktosidase gehemmt. ß-Galaktosidase spaltet den Farbstoff XGal in einen blauen Farbstoff und Galaktose. Kolonien, welche das Plasmid mit dem klonierten Gen und somit keine funktionelle ß-Galaktosidase besitzen, bleiben weiß, während sich Kolonien, die es nicht enthalten, blau färben.

Pro Ansatz werden nun vier Kolonien mit Plasmid in 5ml LB/Amp-Medium pipettiert und 16h lang bei 37°C bebrütet. 800µl der gewachsenen Klone werden in 200µl Glycerin (100% (v/v)) gegeben und bei –20°C eingefroren.

Zur Aufreinigung der Plasmide aus den *E. coli*-Bakterien wird das LB/Amp-Medium zentrifugiert, das Pellet entfernt und mittels Miniplasmidpräparation aufgereinigt.

Um zu sehen, ob die Klone das Insert enthalten, wird der PGEMT-Vektor geschnitten. Das benutzte Restriktionsenzym PVUII schneidet an zwei Stellen außerhalb der Insert-Region, sodass aus Klonen, die das Insert nicht enthalten, ein Stück von 440bp entsteht und aus Klonen, die das Insert enthalten, ein Stück von 550bp. Der Rest des Vektors beträgt 2563 bzw. 2453bp. Nun werden auf ein Agarosegel (1,5% (m/v)) 12µl des Ansatzes und 2,4µl 6*Puffer pipettiert.

Die Klone, die das Plasmid enthalten, werden wieder aus den Glycerinstöcken angezüchtet. Hierfür werden 200µl des Glycerinstocks in 5ml LB/Amp-Medium gegeben und 16h lang unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Plasmide werden aufgereinigt um sie zu sequenzieren. Die DNA-Konzentration (Plasmidkonzentration) wird mithilfe des Nanodrops gemessen. Aus Größe der Plasmide und der Plasmidkonzentration wird die Anzahl der Plasmidkopien in 1µl der Lösung ermittelt. Durch Hinzufügen von Tris HCl wird die Lösung so weit verdünnt, bis eine Lösung mit $10^5$ Plasmidkopien/µl und eine Lösung mit $10^2$ Plasmidkopien/µl entstanden ist. Die zwei Lösungen werden in der PCR eingesetzt, um eine Eichkurve zu generieren und somit eine Quantifizierung zu erlauben.

#### 2.2.2.4 PCR

Die PCR dient der Vervielfältigung der durch die Probenaufarbeitung gewonnenen DNA.

Erst wird ein Ansatz für die benötigte Anzahl an Proben hergestellt. Hierzu werden pro Probe 25µl Mastermix, 21µl destilliertes Wasser und je 1µl der beiden Primer (s. Tabelle 3) zusammenpipettiert. Nach dem Vortexen werden pro Probe 48µl des Ansatzes in ein Well pipettiert. Zuletzt werden 2µl der zuvor mittels EZ1 aufgereinigten *C. diff* DNA in jeweils ein Well pipettiert, sodass letztendlich 50µl Probenvolumen in jedem Well vorhanden sind.

Die Wells werden nun in das PCR-Gerät gestellt, das nach folgendem Protokoll arbeitet: zunächst DNA-Denaturierung bei 95°C (5min), danach werden folgende Schritte 35 Mal wiederholt: Erhitzung auf 95°C (20sek) zur Denaturierung, Abkühlung auf 55°C (180sek) zum Annealing der Primer und Erwärmung auf 74°C (30sek) zur Verlängerung. Abschließend wird die endgültige Elongation bei 74°C (5min) durchgeführt.

Die vervielfältigte DNA kann nun direkt für die Sequenzierung vorbereitet oder bei 4°C aufbewahrt werden.

*Tabelle 3: Primer für die* slpA *Sequenzierung.*

| Primer | Sequenz |
|---|---|
| slpA19 (forward) | 5'-GTT GGG AGG AAT TTA AGR AAT G-3' |
| slpA22 (reverse) | 5'-GCW GTY TCT ATT CTA TCD TYW CC-3' |

#### 2.2.2.5 Probenaufarbeitung für die Sequenzierung

Um die zuvor mittels PCR vervielfältigte DNA sequenzieren zu können, muss diese aufbereitet werden. Zuerst werden die 50µl DNA-haltige Probe in 250µl Bindungspuffer pipettiert. Die Suspension wird gevortext und in ein Röhrchen pipettiert, das an seinem unteren Ende eine Öffnung besitzt, vor der eine Siliciumdioxid-Membran liegt. Dieses Röhrchen wird vorher in ein größeres Sammelröhrchen gestellt, welches in der folgenden Zentrifugation (1min, 11000 x *g*) den durch die Membran zentrifugierten Puffer-Überstand auffängt. Die in der Suspension vorhandene DNA bindet hierbei an die Siliciumdioxid-Partikel der Membran. Das Röhrchen mit der Membran wird wieder in ein Sammelröhrchen gestellt und 700µl Waschpuffer werden auf die Membran gegeben. Die Röhrchen werden wieder zentrifugiert (1min, 11000 x *g*) und der Puffer-Überstand wird wieder durch das Sammelröhrchen aufgefangen, wobei die DNA an die Siliciumdioxid-Partikel gebunden bleibt. Das Röhrchen, in dem sich die DNA befindet, wird wieder in ein Sammelröhrchen gestellt und zum Trocknen der Siliciumdioxid-Membran erst zentrifugiert (2min, 11000 x *g*) und danach 2min offen stehen gelassen. Zuletzt wird das Röhrchen in ein größeres Röhrchen gestellt und 40µl Elutionspuffer werden auf die Membran gegeben. Die Röhrchen werden 1min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und abschließend zentrifugiert (1min, 11000 x *g*). Der Elutionspuffer löst die DNA aus der Siliciumdioxid-Membran, sodass sich ein DNA-haltiger Überstand in dem größeren Röhrchen befindet, welcher nun direkt für die Sequenzierung verarbeitet oder bei –20°C aufbewahrt werden kann.

#### 2.2.2.6 Sequenzierung

Die aufbereiteten DNA-Proben werden abschließend sequenziert. Hierzu wird die „Cycle-Sequencing“-Technologie nach Sanger verwendet.

Zu dem Ansatz, der die DNA-Proben enthält, werden die vier Nukleotide (A, C, G, T), die vier Basen als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) ohne 3’-OH-Gruppe (jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert), der rückwärts-Primer slpA23 und eine DNA-Polymerase hinzugegefügt.

Durch Erwärmen wird die DNA der Probe denaturiert, sodass Einzelstränge entstehen. Einer der Einzelstränge wird durch die DNA-Polymerase ausgehend von dem rückwärts-Primer verlängert. Dadurch, dass ein Teil der ddNTPs keine 3’-OH-Gruppe enthält, kann an der Stelle, an der sie in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden, die

DNA-Polymerase nicht weiterarbeiten, es kommt zu einem Kettenabbruch. Hierdurch entstehen verschieden lange DNA-Fragmente, welche jeweils mit einem der ddNTPs enden und durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden.

Mittels Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe zu ihrer jeweiligen Fluoreszenz angeregt und die verschiedenen Farben von einem Detektor erkannt. Die Reihenfolge der detektierten Fluoreszenzen gibt die Basensequenz des DNA-Stranges wieder.

Die Basensequenz wird nun mit einer Datenbank abgeglichen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und so der *Clostridium difficile* Stamm, dem die sequenzierte Probe angehört, bestimmt.

### 2.2.3 Statistische Methoden

#### 2.2.3.1 Sammlung der klinischen Daten

Um die klinischen Daten der an *Clostridium difficile* erkrankten Personen zu sammeln, wird nach Abschluss der Erhebung der Labordaten ein Fragebogen verwendet, der sowohl die klinische Situation als auch die Effektivität der Behandlung erfasst (s. Anhang).

Die Studiennummer des Ethikvotums lautet 4282.

#### 2.2.3.2 Auswertung der gesammelten klinischen Daten

Die klinischen Daten werden mittels des Fragebogens retrospektiv ermittelt. Hierbei werden einerseits die Mittelwerte der erfassten Daten verglichen, andererseits wird per SPSS mittels T-Test untersucht, ob die erfassten Unterschiede signifikant sind. Hierbei ist von einem zweiseitigen Test auszugehen. Das Signifikanzniveau liegt bei $p = 0,05$. Ist das ermittelte Ergebnis $p \leq 0,05$, ist davon auszugehen, dass ein signifikantes Ergebnis vorliegt. Ist das ermittelte Ergebnis $p > 0,05$, so ist davon auszugehen, dass das Ergebnis nicht signifikant ist.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Verteilung der Stämme

Im Zeitraum vom 01.12.2011 bis zum 31.05.2013 fiel für 402 Stuhlproben von 374 Patienten der Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf die Testung auf *C. diff.* positiv aus.

### 3.1.1 Monatliche Verteilung der Proben

Die Anzahl der asservierten *Clostridium difficile* Kulturen jedes Monats stellte sich folgendermaßen dar (Abbildung (Abb.) 1):

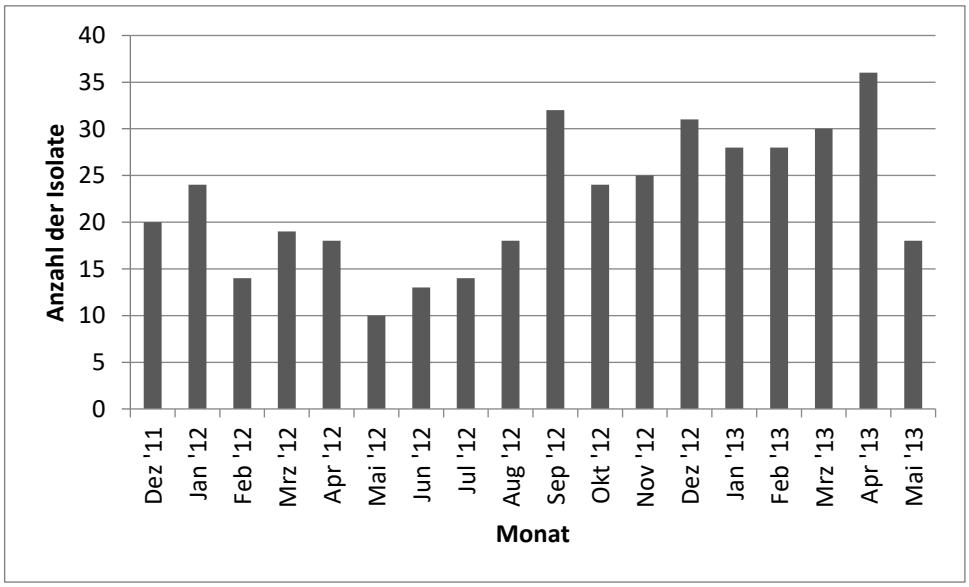


*Abbildung 1: Anzahl der monatlich positiv auf* Clostridium difficile *getesteten Stuhlproben von Dezember 2011 bis Mai 2013.*

Durchschnittlich fiel pro Monat für 22,3 Isolate von Patienten des UKD die Testung auf *C. diff.* positiv aus. Der Monat mit den wenigsten positiven Kulturen war der Mai 2012 (10 positive Stuhlproben), der mit den meisten der April 2013 (36 positive Stuhlproben). Insgesamt wurden von September 2012 bis Mai 2013 252 Isolate (62,7%) asserviert, während es in der ersten Hälfte des Testzeitraums von 18 Monaten nur 150 Isolate waren. Ansonsten war keine spezifische Verteilung der asservierten Isolate auf die Monate zu erkennen.

### 3.1.2 Häufigkeit der einzelnen Stämme

Um die gesammelten Isolate in verschiedene Gruppen einordnen zu können, wurden sie mittels *slpA* Sequenzierung *slpA*-Typen zugeordnet. Die Verteilung auf die einzelnen *slpA*-Typen ist in Abb. 2 dargestellt.

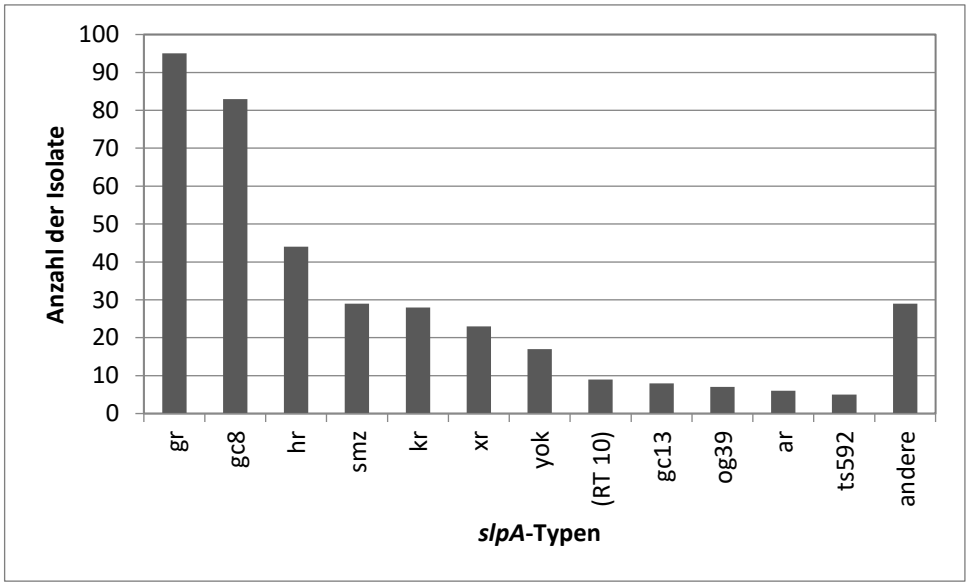


*Abbildung 2: Anzahl der Isolate, die den jeweiligen* slpA-*Typen zugeordnet werden konnten.*

*Die Isolate wurden mittels* slpA-*Sequenzen wie in Methoden beschrieben typisiert und die Verteilung der* slpA-*Typen dargestellt. Unter „andere" sind die* slpA-*Typen zusammengefasst, denen weniger als fünf Isolate zugeordnet werden konnten (cr, j52, y02, cc12078, nc0930, strain Y, 08162, ac12056, az12046, gc11, j41, 1, 941, 078)*.

180 Isolate, also 44,8% aller Isolate, konnten den *slpA*-Typen gr und gc8 zugeordnet werden. Die fünf häufigsten Typen waren gr, gc8, hr, smz und kr. Zu ihnen zählten 282 Isolate (70,2% aller Isolate). Insgesamt konnten die Isolate 23 verschiedenen *slpA*-Typen zugeordnet werden (gr, gc8, hr, smz, kr, xr, yok, (RT 10), gc13, og39, ar, ts592, cr, j52, y02, cc12078, nc0930, (Strain Y), 8162, ac12056, gc11, j41, 941). Ein Isolat konnte keinem *slpA*-Typen zugeordnet werden. Bei 18 Isolaten (4,5%) war die *slpA*-Sequenzierung nicht erfolgreich.

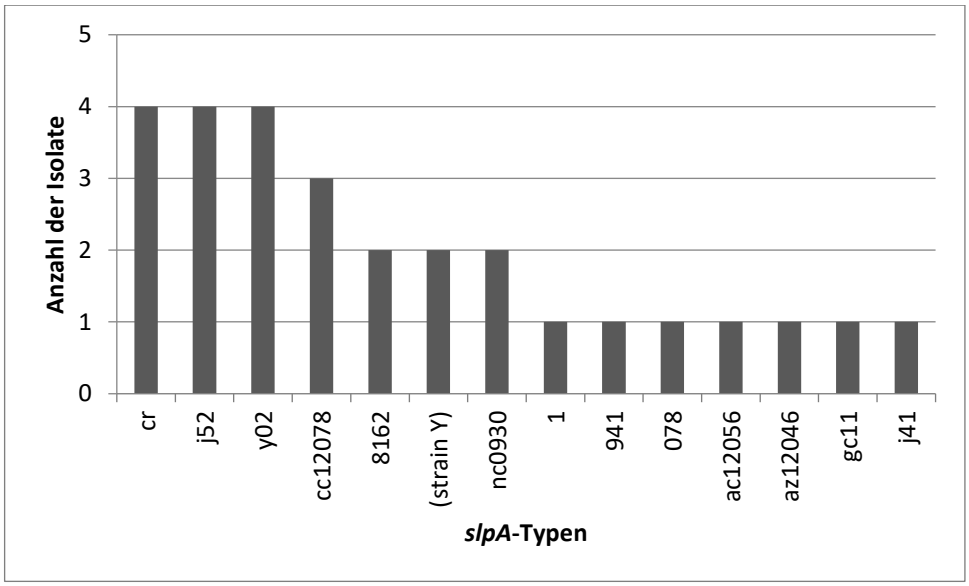


*Abbildung 3: Übersicht über die jeweilige Anzahl der Isolate, die zu den* slpA-*Typen gehörten, denen weniger als fünf Isolate zugeordnet werden konnten.*

Es gab jeweils 4 Isolate, die *slpA* cr, j52 und y02 zugeordnet werden konnten, 3 Isolate, die *slpA* cc12078 zugeordnet werden konnten und jeweils 2 Isolate, die *slpA* 8162, (Strain Y) und nc0930 zugeordnet werden konnten. Jeweils ein Isolat wurde *slpA* 0941, ac12056, gc11 und j41 zugeordnet.

### 3.2 Typisierung nach Ribotyp

Alle untersuchten Proben wurden in das Referenzzentrum des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg/Saar) gesendet und dort ribotypisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt.

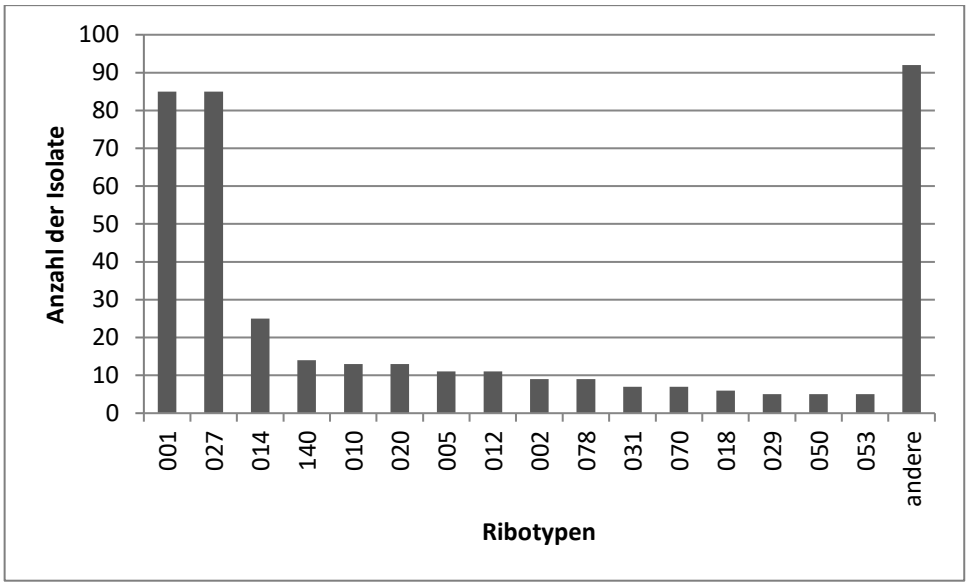


*Abbildung 4: Anzahl der Isolate, die den jeweiligen RTs zugeordnet werden konnten.*

*Dargestellt sind die Ergebnisse der Ribotypisierung für alle Ribotypen, denen mindestens 5 Isolate zugeordnet werden konnten.*

Von den 402 übersandten Proben gehörten jeweils 85 (21,1%) den RTs 001 und 027 an. 25 Proben (6,2%) wurden RT 014 zugeordnet, 14 (3,5%) RT 140. Jeweils 13 Proben (3,2%) gehörten den RTs 010 und 020 an. Die weitere Ribotypisierung ergab Folgendes: Die RTs 005 und 012 wurden jeweils 11 Mal (2,7%) isoliert, RT 015 10 Mal (2,5%), die RTs 002 und 078 je 9 Mal (2,2%) und die RTs 031 und 070 jeweils 7 Mal (1,7%). 6 Mal (1,5%) wurde RT 018 isoliert, jeweils 5 Mal (1,2%) die RTs 029, 050 und 053.

Zu den RTs 003, 009, 013, 023, 024, 035, 038, 043, 045, 046, 085, 087, 091, 106, 111, 131, 159, 207, 228 und 258 gehörten jeweils weniger als 5 Isolate.

Insgesamt wurden mittels Ribotypisierung 40 verschiedene RTs bestimmt, 29 Isolate (7,2%) konnten keinem RT zugeordnet werden. Verglichen damit wurden mittels *slpA*-Sequenzierung 23 verschiedene *slpA*-Typen detektiert und bei 18 Proben (4,5%) konnte das *slpA*-Gen nicht sequenziert werden.

Es wurde überprüft, welchen *slpA*-Typen die Isolate der einzelnen RTs angehörten und welchen RTs die Isolate der einzelnen *slpA*-Typen angehörten. Die beiden Typisierungsmethoden können übereinstimmen, müssen es jedoch nicht unbedingt. Die Ribotypisierung ist in sich eine feinere Typisierungsmethode, weil sie mehrere unterschiedliche RTs diskriminieren kann. Daher ist es möglich, mehrere RTs innerhalb eines *slpA*-Typen zu clustern. Die bisher beste Diskriminierung bietet Whole Genome Sequencing.

Bei fünf RTs gab es jeweils einen *slpA*-Typen, dem alle zu diesem RT gehörenden Isolate angehörten. Alle RT 002 Isolate gehörten zu *slpA* yok, alle RT 078 Isolate zu *slpA* smz, alle RT 070 Isolate zu *slpA* kr, alle RT 126 Isolate zu *slpA* smz und alle RT 029 Isolate zu *slpA* xr. Bei den anderen RTs konnten den Isolaten mehrere *slpA*-Typen zugeordnet werden.

82 (96,5%) Isolate, die zu RT 001 gehörten, gehörten *slpA* gr an. Ebenso verhielt es sich bei RT 027: dort konnten 82 (96,5%) der 85 Isolate *slpA* gc8 zugeordnet werden. Bei den RTs mit mindestens 10 Isolaten gehörten sehr viele Isolate (238 Isolate, 89,1%) jeweils dem *slpA*-Typen an, dem die meisten Isolate des jeweiligen RTs zugeordnet werden konnten.

12 (92,3%) der zu RT 020 gehörenden Isolate waren Isolate der *slpA*-Typen hr, 10 (90,9%) der RT 012 zugeordneten Isolate gehörten *slpA* kr an. Alle zu RT 140 gehörenden Isolate konnten entweder *slpA* xr (11 Isolate; 78,6%) oder hr (3 Isolate; 21,4%) zugeordnet werden. Ebenso konnten alle Isolate von RT 014 entweder *slpA*-Typ hr (18 Isolate; 72,0%) oder smz (7 Isolate; 28,0%) zusortiert werden. Die Stämme der RT 001 und RT 031 waren am heterogensten bezüglich der Übereinstimmung zwischen Typisierungsmethoden und beiden RTs konnten jeweils 4 verschiedenen *slpA*-Typen zugeordnet werden.

Die 29 Isolate, die keinem RT zugeordnet werden konnten, gehörten folgenden *slpA*-Typen an: gr (5 Isolate; 17,2%), gc13, hr und ts592 (je 3 Isolate; 10,3%), ar, smz, xr, nicht typisierbare Isolate (NT) (je 2 Isolate; 6,9%), az1046, gc8, kr, nc0941, og39, yok, 08162 (je 1 Isolat; 3,4%).

Auch wurde untersucht, welche RTs den einzelnen *slpA*-Typen zugeordnet werden konnten:

Der Vergleich von *slpA*-Typ und RT zeigte weniger eindeutige Übereinstimmungen als der Vergleich von RT und *slpA*-Typ, jedoch muss hier auch bedacht werden, dass nur 23 *slpA*-Typen bestimmt werden konnten, während 40 RTs isoliert werden konnten.

Alle 9 Isolate des *slpA*-Typen (RT10) gehörten zu RT 010. 79 (97,5%) Isolate des zweithäufigsten *slpA*-Typen gc8 konnten RT 027 zugeordnet werden. Der häufigste isolierte *slpA*-Typ war gr (82 Isolate). 84,5% (n = 70) seiner Isolate konnten RT 001 zugeordnet werden. 4 Isolate von *slpA* ar (66,7%) gehörten zu RT 005, die beiden anderen Isolate des *slpA*-Typen (33,3%) konnten keinem RT zugeordnet werden.

Von den 19 Isolaten, die nicht typisierbar waren, gehörten 6 (31,6%) zu RT 005.

### 3.3 Überprüfung des Vorhandenseins der für Toxine kodierenden Gene

Der PaLoc enthält die für die Toxine codierenden Gene bis auf die binären Toxingene *cdtA* und *cdtB*. Somit war es von Interesse zu überprüfen, inwiefern die gesammelten Isolate die Genabschnitte für die Toxine A und B exprimierten, ob sie das Gen für das binäre Toxin B (*cdtB*) exprimierten und ob sie Δ117-TcdC enthielten. Diese Kriterien wurden mittels real time PCR überprüft.

Insgesamt exprimierten 362 Isolate (90,0%) das *tcdA*-Gen und das *tcdB*-Gen, 111 Isolate (27,6%) das *cdtB*-Gen und bei 123 Isolaten (30,6%) konnte Δ117-TcdC nachgewiesen werden. Folgende Verteilung der Genexpression konnte für die verschiedenen *slpA*-Typen festgestellt werden:

*Tabelle 4: Verteilung der Gene des PaLocs sowie des für das binäre Toxin B codierenden Gens (cdtB) unter den* slpA-*Typen.*

| *slpA* Typ[a] (N) | tcdA (%) | tcdB (%) | Δ117-TcdC (%) | cdtB (%) |
|---|---|---|---|---|
| gr (95) | 98,9 | 98,9 | 0,0 | 0,0 |
| gc8 (83) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| hr (44) | 93,2 | 93,2 | 9,1 | 0,0 |
| smz (29) | 100,0 | 100,0 | 72,4 | 55,2 |
| kr (28) | 96,4 | 96,4 | 0,0 | 0,0 |
| xr (23) | 43,5 | 43,5 | 0,0 | 0,0 |
| yok (17) | 94,1 | 94,1 | 0,0 | 0,0 |
| (RT 10) (9) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| gc13 (8) | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| og39 (7) | 85,7 | 85,7 | 0,0 | 0,0 |
| ar (6) | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| ts592 (5) | 80,0 | 80,0 | 80,0 | 60,0 |
| NT[b] (18) | 100,0 | 100,0 | 31,6 | 36,8 |
| andere[c] (29) | 65,5 | 65,5 | 13,8 | 6,9 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten.*

Auffällig ist, dass die Isolate des *slpA*-Typs gc8 die Einzigen waren, die alle die Gene für Toxin A und B und für das binäre Toxin B exprimierten und Δ117-TcdC besaßen. Bei allen Isolaten der *slpA*-Typen gc13 und ar und allen Isolaten, die keinem *slpA*-Typ zugeordnet werden konnten, konnte die Anwesenheit der Gene für Toxin A und Toxin B gezeigt werden. Nur die Isolate des *slpA*-Typen (RT10) trugen alle keines der überprüften Gene. Bei allen Isolaten, die *slpA* gr, kr, xr, yok, (RT10), gc13, og39 und ar zugeordnet werden konnten, war weder Δ117-TcdC noch das *cdtB*-Gen anwesend. Vier

Isolate (9,1%) der zu *slpA* hr gehörenden Proben trugen Δ117-TcdC, während keine der Proben das Gen für *cdtB* trug.

Die Anwesenheit des Gens *cdtB* und von Δ117-TcdC ist differenziert für alle *slpA*-Typen, denen Isolate zugeordnet werden konnten, welche das Gen *cdtB* trugen und/oder Δ117-TcdC trugen, in Tabelle 5 dargestellt:

*Tabelle 5: Verhältnis zwischen cdtB Gen, Δ117-TcdC und* slpA-*Typisierung.*

| *slpA* Typ[a] (N) | Δ117-TcdC+ cdtB+ (%) | Δ117-TcdC+ cdtB- (%) | Δ117-TcdC- cdtB+ (%) | Δ117-TcdC- cdtB- (%) |
|---|---|---|---|---|
| hr (44) | 0,0 | 9,1 | 0,0 | 90,9*** |
| smz (29) | 55,2** | 17,2 | 0,0 | 27,6 |
| ts592 (5) | 60,0 | 20,0 | 0,0 | 20,0 |
| NT[b] (18) | 33,3 | 0,0 | 5,6 | 61,1 |
| andere[c] (29) | 6,9 | 6,9 | 0,0 | 73,3 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*** p < 0.05*
**** p < 0.001.*

Lediglich unter den nicht typisierbaren Isolaten war ein Isolat, das das *cdtB*-Gen, aber nicht Δ117-TcdC exprimierte. Keins der zu *slpA* hr gehörenden Isolate exprimierte sowohl das *cdtB*-Gen als auch Δ117-TcdC. Signifikant viele (16 Isolate, 55,2%; p < 0,001) der Isolate von *slpA* smz exprimierten sowohl das *cdtB*-Gen als auch Δ117-TcdC. Bei sowohl den NTs als auch den Isolaten der *slpA*-Typen, denen weniger als 5 Isolate angehörten, als auch den Isolaten von *slpA* hr, exprimierte die Mehrheit der Isolate weder das *cdtB*-Gen noch Δ117-TcdC (11 Isolate, 61,1%, p = 0,668; 22 Isolate, 73,3%, p = 0,165; 40 Isolate, 90,9%, p < 0,001). Das Ergebnis für *slpA* hr war signifikant.

### 3.4 Resistenzbestimmung

Die Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest ergab folgende Ergebnisse: alle 402 untersuchten Isolate waren sensibel gegenüber Metronidazol und Vancomycin. 181 (45,0%) der Isolate waren resistent gegen Moxifloxacin und Erythromycin, 163 (40,5%) waren sensibel gegenüber diesen beiden Antibiotika, 44 (10,9%) der Isolate waren sensibel gegenüber Moxifloxacin und resistent gegen Erythromycin, während lediglich 14 Isolate (3,5%) sensibel gegenüber Erythromycin und resistent gegen Moxifloxacin waren.

Die Sensibilität und Resistenz der einzelnen *slpA*-Typen ist in Tabelle 6 dargestellt.

*Tabelle 6: Resistenz gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin.*

| | Resistenz (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| *slpA* Typ[a] (N) | ERY[d]+ MXF[e] | Keine | Nur ERY[d] | Nur MXF[e] |
| gr (95) | 78,9*** | 18,9 | 1,1 | 1,1 |
| gc8 (83) | 98,8*** | 1,2 | 0,0 | 0,0 |
| hr (44) | 6,8 | 79,5 | 2,3 | 11,4 |
| smz (29) | 24,1 | 44,6 | 24,1 | 7,2 |
| kr (28) | 28,6 | 39,3 | 21,4 | 10,7 |
| xr (23) | 4,3 | 56,6 | 39,1 | 0,0 |
| yok (17) | 0,0 | 94,1 | 0,0 | 5,9 |
| (RT 10) (9) | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 |
| gc13 (8) | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| og39 (7) | 57,1 | 0,0 | 14,3 | 28,6 |
| ar (6) | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| ts592 (5) | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| NT[b] (18) | 0,0 | 94,4 | 0,0 | 5,6 |
| andere[c] (29) | 0,0 | 62,1 | 34,5 | 3,4 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
[d] *ERY = Erythromycin*
[e] *MXF = Moxifloxacin*
**** p < 0.001.*

Alle Isolate waren sensibel gegenüber Metronidazol und Vancomycin. Auffällig ist, dass 344 (85,6%) aller Isolate entweder sensibel gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin oder resistent gegen beide Antibiotika waren.

Zu den beiden häufigsten *slpA*-Typen, gr und gc8, und somit den weit verbreiteten *slpA*-Typen, gehörten signifikant viele (75 Isolate, 78,9%, $p < 0,001$ bzw. 82 Isolate, 98,8%, $p < 0,001$) Isolate, die resistent gegenüber beiden Antibiotika waren. Ebenso auffallend war, dass es unter den weniger häufig (weniger als 20 zugehörige Isolate) vorkommenden *slpA*-Typen wenig Isolate gab, die gegen beide Antibiotika resistent waren. Lediglich *slpA*-Typ og39 besaß 4 solcher Isolate (57,1%, $p = 0,508$), jedoch ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

### 3.5 Klinische Daten

Im Folgenden werden die *slpA*-Typen berücksichtigt, bei denen für mindestens fünf Patienten klinische Daten erhoben werden konnten.

27 Patienten, deren Stuhlprobe im Beobachtungszeitraum im UKD positiv auf *Clostridium diffcile* getestet wurde, waren lediglich ambulant vorstellig. Sie verteilten sich gleichmäßig auf alle *slpA*-Typen. Von den restlichen 375 Patienten, die in dem gewählten Zeitraum stationär aufgenommen waren und deren Stuhlproben positiv auf *Clostridium difficile* getestet wurden, konnten bei 360 Patienten alle oder so gut wie alle klinischen Daten erhoben werden, bei 17 Patienten konnte nur ein geringer Teil der erfragten Daten erhoben werden.

Tabelle 7 und 8 geben eine Übersicht über die Geschlechterverteilung, über den Altersmedian und das durchschnittliche Alter der zu den einzelnen *slpA*-Typen gehörenden Patienten sowie über den Anteil der Patienten, der im Jahr vor der *C. diff.* Infektion stationär in ein Krankenhaus aufgenommen wurde, den Anteil der Patienten, der in einer Pflegeeinrichtung lebte und die Anzahl der Krankenhausaufenthalte im letzten Jahr.

*Tabelle 7: Demographische Daten der Patienten, von denen die* C. diff.-slpA-*Typen isoliert wurden.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | männlich (%) | Alter Median (Jahre) | Alter (Jahre) |
|---|---|---|---|
| gr (95) | 43,2** | 73 | 68,7 |
| gc8 (83) | 51,8 | 76 | 72,8*** |
| hr (44) | 63,6 | 70,5 | 65,9 |
| smz (29) | 62,1 | 72 | 64,8 |
| kr (28) | 57,1 | 72 | 63,2 |
| xr (23) | 52,2 | 52 | 46,4** |
| yok (17) | 47,1 | 64 | 61,6 |
| (RT 10) (9) | 66,7 | 58 | 53,0 |
| gc13 (8) | 75,0 | 74 | 72,3 |
| og39 (7) | 85,7 | 62 | 51,7 |
| ar (6) | 83,3 | 61 | 55,0 |
| NT[b] (18) | 44,4 | 70 | 60,4 |
| andere[c] (35) | 54,3 | 60 | 55,8 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*** p < 0.05*
**** p < 0.001.*

Durchschnittlich waren 46,3% (186 Patienten) der Patienten weiblich, das durchschnittliche Alter aller Patienten betrug 64,1 Jahre und der Altersmedian lag bei 71 Jahren. Ein vergleichsweise hoher Anteil an weiblichen Trägern gehörte zu den Isolaten von *slpA* gr, yok und den nicht typisierbaren Isolaten (54 Isolate, 56,8%, p = 0,009; 9 Isolate, 52,9%, p = 0,574; 10 Isolate, 55,6%, p = 0,420), jedoch waren nur die Träger von *slpA* gr signifikant oft weiblich. Unter den Trägern der *slpA*-Typen og39, ar und gc13 waren wenig Frauen (1 Patient, 14,3%, p = 0,063; 1 Patient, 16,7%, p = 0,132; 2 Patienten, 25,0%, p = 0,230), jedoch sind dies *slpA*-Typen mit wenig Trägern, sodass hier das Geschlecht eines einzelnen Trägers mehr ins Gewicht fällt als bei *slpA*-Typen mit vielen Trägern, die Ergebnisse sind nicht signifikant. Sowohl der Altersdurchschnitt als auch der Altersmedian zeigten, dass die Patienten, deren Isolate *slpA* gc8 (72,8 bzw. 76 Jahre, p < 0,001) und gc13 (72,3 bzw. 74 Jahre, p = 0,271) trugen, durchschnittlich am ältesten waren, während die Träger von *slpA* xr (46,4 bzw. 52 Jahre, p = 0,006) und (RT 10) (53,0 und 58 Jahre, p = 0,122) durchschnittlich am jüngsten waren. Es unterschieden sich jedoch nur das hohe Alter der Träger von *slpA* gc8 und das niedrige Alter der Träger von *slpA* xr signifikant vom Alter der anderen Patienten.

*Tabelle 8: Aufnahme in eine Gesundheitseinrichtung in den letzten 12 Monaten.*

| | Aufnahme in eine Gesundheitseinrichtung in den letzten 12 Monaten | | | |
|---|---|---|---|---|
| *slpA*-Typ[a] (N) | Krankenhaus-aufenthalt (%) | Pflege-einrichtung (%) | Durch-schnittliche Anzahl der Krankenhaus-aufenthalte | Median der Anzahl der Krankenhaus-aufenthalte |
| gr (91) | 75,8 | 9,9 | 3,2 | 2 |
| gc8 (76) | 80,3 | 20,0 | 3,4 | 2 |
| hr (39) | 87,2 | 5,7 | 4,3 | 3 |
| smz (26) | 76,9 | 0,0 | 4,2 | 3 |
| kr (26) | 84,6 | 3,8 | 5,3 | 4 |
| xr (21) | 85,7 | 15,8 | 7,1 | 6 |
| yok (16) | 87,5 | 0,0 | 4,2 | 4,5 |
| (RT 10) (7) | 57,1 | 16,7 | 4,8 | 1 |
| gc13 (7) | 71,43 | 0,0 | 4,7 | 4 |
| og39 (7) | 57,1 | 0,0 | 3,1 | 0 |
| ar (5) | 60,0 | 20,0 | 2,2 | 2 |
| NT[b] (17) | 100,0 | 5,9 | 6,3 | 6 |
| andere[c] (32) | 84,4 | 9,7 | 6,3 | 3 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*** p < 0.05*
**** p < 0.001.*

298 Patienten (81,0%) wurden in dem Jahr vor der aktuellen *Clostridium difficile* Infektion in ein Krankenhaus aufgenommen, der Durchschnitt der Aufenthaltsanzahl betrug 4,2 und der Median 3 Aufenthalte in diesem Jahr.

Auffallend viele Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war und deren Isolat den *slpA*-Typen yok und hr angehörte, wurden im Jahr vor Abnahme der positiv getesteten Stuhlprobe oft in ein Krankenhaus aufgenommen (NT: 17 Patienten, 100,0%, p < 0,001; yok: 14 Patienten, 87,5%, p = 0,498; hr: 34 Patienten, 87,2%, p = 0,241). Nur die Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war, wurden signifikant häufig in ein Krankenhaus aufgenommen. Selten, jedoch nicht signifikant selten, erfolgte eine Aufnahme ins Krankenhaus bei Trägern der *slpA*-Typen (RT 10), og39 und ar (4 Patienten, 57,1%, p = 0,276; 4 Patienten, 57,1%, p = 0,276; 3 Patienten, 60,0%, p = 0,230).

36 (10,4%) Patienten lebten in einer Pflegeeinrichtung. Von ihnen gehörten 15 (41,7%) *slpA* gc8 an und 9 (25,0%) *slpA* gr. Keine Patienten, deren Isolat den *slpA*-Typen smz,

yok, gc13 und og39 zugeordnet werden konnte, lebten in einer Pflegeeinrichtung. Die Träger von *slpA* gc8 lebten signifikant häufig in einer Pflegeeinrichtung (p = 0,004), die von *slpA* gr jedoch nicht (p = 0,852). Die Träger von *slpA* smz, yok, gc13 und og39 lebten signifikant selten in einer Pflegeeinrichtung (jeweils p <0.001).

Die Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war, waren mit einer durchschnittlichen Aufenthaltszahl von 6,3 und einer medianen Aufenthaltszahl von 6 in diesem vergangenen Jahr überdurchschnittlich oft im Krankenhaus (p = 0,913). Ebenfalls häufig wurden die Träger von *slpA*-Typ xr im Krankenhaus vorstellig. Ihr Durchschnitt betrug 7,1 Aufenthalte, der Median 6 Aufenthalte im letzten Jahr (p = 0,556). Die Patienten, deren Isolat *slpA* og39 zugeordnet wurde, wurden mit durchschnittlich 3,1 und median 0 Aufenthalten selten in ein Krankenhaus aufgenommen (p = 0,585). Alle drei Ergebnisse waren nicht signifikant.

Tabelle 9 stellt dar, wie lange die diagnostische Latenzzeit war, also am wievielten Tag der aufgetretenen Diarrhoe die bearbeitete Stuhlprobe durchschnittlich genommen wurde, und wie viel Prozent der Patienten der einzelnen *slpA*-Typen jeweils blutigen Stuhl, Fieber und abdominelle Schmerzen hatten.

*Tabelle 9: Tag der Probenentnahme und begleitende Beschwerden.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | Diagnostische Latenzzeit[d] | Blut im Stuhl (%) | Fieber (%) | Schmerzen (%) |
|---|---|---|---|---|
| gr (91) | 7,2 | 9,0 | 10,1 | 20,9 |
| gc8 (74) | 6,4 | 13,5 | 18,9 | 23,0 |
| hr (36) | 3,7 | 22,9 | 2,8** | 14,3 |
| smz (26) | 2,8 | 11,5 | 26,9 | 19,2 |
| kr (26) | 3,5 | 19,2 | 30,8** | 26,9 |
| xr (19) | 3,2 | 0,0*** | 21,1 | 5,3 |
| yok (16) | 4,2 | 12,5 | 25,0 | 6,3 |
| (RT 10) (7) | 2,2 | 16,7 | 33,3 | 14,3 |
| gc13 (7) | 3,4 | 14,3 | 14,3 | 28,6 |
| og39 (7) | 1,9 | 0,0*** | 14,3 | 0,0*** |
| ar (5) | 2,4 | 0,0 | 20,0 | 0,0*** |
| NT[b] (17) | 3,0 | 11,8 | 11,8 | 35,3 |
| andere[c] (32) | 6,6 | 6,3 | 18,8 | 12,5 |

*[a] Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
*[b] NT = nicht typisierbar*
*[c] andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*[d] Tage zwischen Auftreten der Symptome und Abnahme der Probe*
*** p < 0.05*
**** p < 0.001.*

Durchschnittlich wurden die Stuhlproben nach 4,3 Tagen Durchfall genommen, also nach 4,3 Tagen stattgefundener Diarrhoe. Sehr früh wurden die Proben bei den Trägern der *slpA*-Typen og39 (6 Proben; nach 1,9 Tagen, p = 0,383), (RT10) (7 Proben; nach 2,2 Tagen, p = 0,565) und ar (5 Proben; nach 2,4 Tagen, p = 0,542), vergleichsweise spät bei den Trägern der *slpA*-Typen gr (91 Proben; nach 7,2 Tagen, p = 0,118) und gc8 (76 Proben; nach 6,4 Tagen, p = 0,480) genommen. Keins der Ergebnisse war signifikant.

Blutigen Stuhl setzten durchschnittlich 42 Patienten (11,7% aller Patienten) ab. Auffällig viele Patienten mit blutigem Stuhl konnten den *slpA*-Typen hr (8 Patienten; 22,9%, p = 0,103) und (RT 10) (1 Patient; 16,7%, p = 0,704) zugeordnet werden, während die Träger der *slpA*-Typen xr, og39 und ar keinen blutigen Stuhl hatten (p < 0,001; p < 0,001; p = 0,414). Die Träger von *slpA* hr hatten doppelt so häufig wie erwartet blutigen Stuhl, jedoch war das Ergebnis nur für die *slpA*-Typen xr und og39 signifikant.

Insgesamt hatten 60 (16,7%) der akquirierten Patienten Fieber. Viele Patienten mit Fieber konnten den *slpA*-Typen (RT 10) (2 Patienten, 33,3%; p = 0,357) und kr (8 Patienten, 30,8%; p = 0,043) zugeordnet werden, das Ergebnis war für *slpA* kr signifikant. Die Träger der *slpA*-Typen hr (1 Patient, 2,8%, p = 0,002), gr (9 Patienten, 10,1%, p = 0,478) und die Patienten, deren Isolate nicht typisierbar waren (2 Patienten, 11,8%; p = 0,950), hatten selten Fieber. Nur die Träger von *slpA* hr litten signifikant selten an Fieber. Mit 33,3% hatten doppelt so viele Träger von *slpA* (RT 10) wie erwartet Fieber.

18,8% (68 Patienten) aller erfassten Patienten litten an abdominellen Schmerzen. Auffallend viele Patienten, deren Isolat nicht typisiert werden konnte, und viele Patienten, deren Isolat *slpA* gc13 bzw. kr zugeordnet werden konnte, litten an abdominellen Schmerzen (6 Patienten, 35,3%, p = 0,075; 2 Patienten, 28,6%, p = 0,505; 7 Patienten, 26,9%, p = 0,271). Diese Ergebnisse waren nicht signifikant. Kein Patient, dessen Isolat den *slpA*-Typen og39 bzw. ar zugeordnet wurde, gab abdominelle Schmerzen an. Dies war signifikant selten (p < 0,001, p < 0,001).

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über den Schweregrad der Diarrhoe.

*Tabelle 10: Verteilung der Schweregrade der Diarrhoe.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | milde Diarrhoe[d] (%) | moderate Diarrhoe[e] (%) | starke Diarrhoe[f] (%) |
|---|---|---|---|
| gr (89) | 11,2 | 33,7 | 55,1** |
| gc8 (76) | 9,2** | 36,8 | 53,9 |
| hr (35) | 11,4 | 48,6 | 40,0 |
| smz (26) | 23,1 | 38,5 | 38,5 |
| kr (26) | 3,8** | 53,8 | 42,3 |
| xr (20) | 20,0 | 45,0 | 30,0 |
| yok (16) | 6,3 | 31,3 | 62,5 |
| (RT 10) (6) | 33,3 | 50,0 | 16,7 |
| gc13 (7) | 28,6 | 28,6 | 42,9 |
| og39 (7) | 57,1 | 28,6 | 14,3 |
| ar (5) | 40,0 | 40,0 | 20,0 |
| NT[b] (17) | 29,4 | 41,2 | 29,4 |
| andere[c] (28) | 28,6 | 42,9 | 28,6 |

[a] *Nur* slpA-*Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
[b] *NT = nicht typisierbar*
[c] *andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
[d] *milde Diarrhoe = 1-2 Stühle pro Tag*
[e] *moderate Diarrhoe = 3-5 Stühle pro Tag*
[f] *starke Diarrhoe = mindestens 6 Stühle am Tag*
*** p < 0.05.*

Insgesamt wies die Diarrhoe bei 56 (15,6%) aller Patienten eine milde Frequenz auf, bei 141 Patienten (39,3%) eine moderate und bei 161 Patienten (45,0%) eine starke.
Sehr wenig Patienten, deren Isolat *slpA* kr, yok und gc8 zugeordnet werden konnte, entwickelten eine milde Diarrhoe (1 Patient, 3,8%, p = 0,007; 1 Patient, 6,3%, p = 0,164; 7 Patienten, 9,5%, p = 0,015), während auffallend viele Patienten (4 Patienten, 57,1%, p = 0,079), deren Isolat *slpA* og39 angehörte, eine milde Diarrhoe aufwiesen. Das Ergebnis war für die Träger von *slpA* kr und gc8 signifikant. Vergleichsweise viele Patienten, deren Isolat zu *slpA* kr und (RT 10) gehörte, wiesen eine moderate Diarrhoe auf (14 Patienten, 53,8%, p = 0,115 bzw. 3 Patienten, 50,0%, p = 0,589), die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. An einer starken Diarrhoe litten wenig Patienten, deren Isolat den *slpA*-Typen og39 (1 Patient, 14,3%, p = 0,073) und (RT 10) (1 Patient, 16,7%, p = 0,147) zugeordnet werden konnte. Patienten, deren Isolat *slpA* yok, gr und gc8 zugeordnet werden konnte, litten häufig an starker Diarrhoe (10 Patienten, 62,5%, p = 0,147; 49 Patienten, 55,1%, p = 0,026; 40 Patienten, 54,1%, p = 0,073). Nur für *slpA* gr war das Ergebnis signifikant.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht darüber, bei welchem Anteil der Patienten die aktuelle *Clostridium difficile* Infektion ein Rezidiv darstellte und das wievielte Rezidiv dies

war, ob eine abdominelle CT durchgeführt wurde und ob sich dort ein auffälliger Befund zeigte und ob das Norovirus getestet wurde und ob das Ergebnis positiv ausfiel.

*Tabelle 11: Rezidive mit der aktuellen Infektion, CT-Durchführung und Test auf Norovirus.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | Rezidiv (%) | Zahl der Rezidive | abdominelle CT (%) | auffällige CT (%) | Norovirus Test (%) | Norovirus positiv (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| gr (91) | 9,9 | 1,2 | 13,2 | 33,3 | 44,0 | 5,0 |
| gc8 (76) | 15,8 | 1,3 | 19,7 | 73,3 | 47,4 | 2,8 |
| hr (39) | 5,1 | 1,0 | 15,4 | 33,3 | 35,9 | 0,0 |
| smz (27) | 3,7 | 2,0 | 19,2 | 80,0 | 34,6 | 11,1 |
| kr (26) | 7,7 | 1,0 | 19,2 | 0,0 | 53,8 | 7,1 |
| xr (20) | 28,6 | 1,2 | 15,0 | 66,7 | 78,9 | 20,0 |
| yok (16) | 6,3 | 1,0 | 6,3 | 100,0 | 37,5 | 0,0 |
| (RT 10) (7) | 0,0*** | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 28,6 | 50,0 |
| gc13 (7) | 14,3 | 1,0 | 14,3 | 100,0 | 28,6 | 50,0 |
| og39 (7) | 0,0 | 0,0 | 14,3 | 0,0 | 42,9 | 33,3 |
| ar (5) | 0,0 | 0,0 | 20,0 | 0,0 | 20,0 | 0,0 |
| NT[b] (17) | 11,8 | 1,0 | 5,9 | 100,0 | 5,9 | 0,0 |
| andere[c] (32) | 15,6 | 1,4 | 12,5 | 50,0 | 46,8 | 6,7 |

*[a] Nur slpA-Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
*[b] NT = nicht typisierbar*
*[c] andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
**** p < 0.001.*

Durchschnittlich erlitten 43 (10,9%) Patienten mit der aktuellen *Clostridium difficile* Infektion ein Rezidiv. 12 (27,9%) Patienten mit Rezidiven waren Träger von *slpA*-Typ gc8, jedoch kam es bei Trägern von *slpA* gc8 nicht signifikant häufig zu Rezidiven (p = 0,074). 6 Patienten (28,6%), deren Isolat *slpA* xr angehörte, litten an dem Rezidiv einer *Clostridium difficile* Infektion, jedoch war dies nicht signifikant häufig (p = 0,082). Kein Träger der *slpA*-Typen (RT 10), og39 und ar litt an einem Rezidiv, das Ergebnis war für *slpA* (RT10) signifikant (p < 0,001, p = 0,432, p = 0,544). Durchschnittlich kam es zu 1,1 Rezidiven.

13,7% der Patienten (55 Patienten) erhielten eine abdominelle CT, welche als Surrogat für eine schwere *C. diff.* Infektion gesehen werden kann. Eine besondere Verteilung auf die verschiedenen *slpA*-Typen war nicht zu erkennen. Bei 29 Patienten (52,7%) war der Befund der abdominellen CT auffällig. 11 dieser Patienten (37,9%) waren Träger des *slpA*-Typen gc8, doch die Träger von *slpA* gc8 erhielten nicht signifikant häufig eine CT Abdomen (p = 0,835).

Bei 160 (39,8%) aller Patienten wurde in der gleichen Stuhlprobe ein Test auf das Norovirus durchgeführt, welcher bei 12 Patienten (7,5%) positiv ausfiel. Der Test auf das

Norovirus fiel für jeweils keinen bis drei Patienten der unterschiedlichen *slpA*-Typen positiv aus, sodass hier keine Aussage über ein gehäuftes Vorkommen bezüglich eines oder mehrerer *slpA*-Typen zu treffen ist.

Tabelle 12 stellt dar, welcher Anteil der Patienten der jeweiligen *slpA*-Typen im Jahr vor der aktuellen *Clostridium difficile* Infektion mit einem Antibiotikum behandelt wurde, welcher Anteil der Patienten PPI nahm und welcher Anteil der Patienten mit einem Antidiarrhoikum behandelt wurde.

*Tabelle 12: Einnahme von Antibiotika im Jahr vor der Infektion, Einnahme von PPIs und Antidiarrhoika.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | Behandlung mit Antibiotikum (%) | Gabe von PPI[d] (%) | Gabe von Antidiarrhoikum (%) |
|---|---|---|---|
| gr (89) | 98,9 | 90,0 | 4,5 |
| gc8 (74) | 96,0 | 86,5 | 10,8 |
| hr (27) | 91,9 | 75,0 | 0,0*** |
| smz (26) | 100,0 | 80,8 | 3,8 |
| kr (26) | 100,0 | 84,6 | 3,8 |
| xr (19) | 100,0 | 73,7 | 5,3 |
| yok (16) | 100,0 | 75,0 | 6,3 |
| (RT 10) (6) | 100,0 | 100,0 | 16,7 |
| gc13 (7) | 85,7 | 71,4 | 14,3 |
| og39 (7) | 100,0 | 71,4 | 0,0 |
| ar (5) | 100,0 | 80,0 | 20,0 |
| NT[b] (17) | 94,1 | 70,6 | 5,9 |
| andere[c] (33) | 97,0 | 81,8 | 12,5 |

*[a] Nur slpA-Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
*[b] NT = nicht typisierbar*
*[c] andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*[d] PPI = Protonenpumpeninhibitor*
**** p < 0.001.*

Insgesamt erhielten 352 (97,0%) der Patienten in dem Jahr vor der *Clostridium difficile* Infektion mindestens ein Antibiotikum.

299 (82,8%) Patienten wurden aktuell mit einem PPI behandelt. Wenig (12 Patienten, 70,6%, p = 0,282; 5 Patienten, 71,4%, p = 0,421; 5 Patienten, 71,4%, p = 0,421) Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war, und wenig Patienten mit *slpA* gc13 und og39 erhielten einen PPI, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Insgesamt erhielten 24 Patienten (6,7%) ein Antidiarrhoikum. Viele, jedoch nicht signifikant viele, Patienten, die Träger von *slpA* ar (20,0%; 1 Patient; p = 0,468) und von *slpA* (RT 10) (16,7%; 1 Patient; p = 0,481) waren, wurden mit einem Antidiarrhoikum

behandelt, während kein Träger von *slpA* hr ($p < 0,001$) und og 39 ($p = 0,639$) ein Antidiarrhoikum erhielt. Für *slpA* hr war das Ergebnis signifikant.

144 (40,0%) der Patienten wurden mit oralem Metronidazol behandelt, 38 (10,6%) mit intravenösem (i.v.) Metronidazol, 175 (48,6%) mit Vancomycin und 3 (0,8%) mit Fidaxomycin. Es konnte keine Korrelation zwischen Therapieform und *slpA*-Typ sowie zwischen Therapieform und Schweregrad der *C. diff.* Infektion festgestellt werden. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen der Behandlungsdauer und einzelnen *slpA*-Typen festgestellt werden.

Bei lediglich drei Patienten wurde die *Clostridium difficile* Infektion mit Fidaxomycin behandelt.

In Tabelle 13 ist dargestellt, bei welchem Anteil der Patienten die Diarrhoe nach Abschluss der Behandlung sistierte, welcher Anteil der Patienten in den drei Monaten nach der *Clostridium difficile* Infektion Antibiotika erhielt, welcher Anteil der Patienten im ersten Monat nach der Infektion ein Rezidiv entwickelte, welcher Anteil der Patienten in den ersten drei Monaten nach der Infektion ein Rezidiv entwickelte und welcher Anteil der Patienten in den ersten drei Monaten nach der Infektion intensivmedizinisch behandelt wurde.

*Tabelle 13: Weiteres Vorhandensein von Diarrhoe, weitere Antibiotikagabe, folgende Rezidive nach der Infektion und Aufenthalt auf einer Intensivstation.*

| *slpA*-Typ[a] (N) | Diarrhoe aufgelöst nach Behand-lung (%) | weitere AB[d]-Gabe (%) | Rezidive in 1. Monat nach Infektion (%) | Rezidive in 3 Monaten nach Infektion (%) | Aufenthalt auf Intensiv-station (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| gr (89) | 73,0 | 61,8 | 10,1 | 15,7 | 21,3 |
| gc8 (74) | 60,8** | 65,8 | 16,4** | 26,0** | 23,3 |
| hr (36) | 69,4 | 61,1 | 13,9 | 16,7 | 19,4 |
| smz (26) | 69,2 | 53,8 | 0,0*** | 3,8 | 34,6 |
| kr (26) | 80,8 | 56,0 | 0,0*** | 12,0 | 36,0 |
| xr (17; 19) | 82,4 | 63,2 | 5,2 | 21,1 | 15,8 |
| yok (16) | 93,8** | 43,8 | 0,0*** | 0,0*** | 25,0 |
| (RT 10) (7) | 57,1 | 83,3 | 0,0*** | 0,0*** | 50,0 |
| gc13 (7) | 100,0*** | 71,4 | 14,3 | 28,6 | 42,9 |
| og39 (7) | 100,0*** | 71,4 | 0,0*** | 0,0*** | 28,6 |
| ar (5) | 60,0 | 100,0*** | 20,0 | 20,0 | 20,0 |
| NT[b] (17) | 88,2 | 58,8 | 0,0*** | 0,0*** | 23,5 |
| andere[c] (32) | 81,3 | 61,3 | 6,5 | 6,5 | 19,4 |

*[a] Nur slpA-Typen, die mindestens 5 Isolate enthalten, werden detailliert dargestellt*
*[b] NT = nicht typisierbar*
*[c] andere = Isolate mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten*
*[d] AB = Antibiotika*
*** p < 0.05*
**** p < 0.001.*

Insgesamt war bei 264 (75,4%) Patienten nach Abschluss der Behandlung keine Diarrhoe mehr vorhanden. Alle Träger von *slpA* gc13 (p < 0,001) und og39 (p < 0,001) litten nach der Behandlung nicht mehr an Diarrhoe, bei den Trägern von *slpA* yok war der Anteil mit 15 Patienten (93,8%, p = 0,010) auch sehr hoch. Die Ergebnisse waren signifikant. Unter den Patienten, deren Isolat zu *slpA* (RT 10), ar und gc8 gehörte, war der Anteil dieser Patienten im Vergleich zu den anderen *slpA*-Typen gering (4 Patienten, 57,1%, p = 0,258; 3 Patienten, 60,0%, p = 0,421; 45 Patienten, 60,8%, p = 0,004), jedoch war das Ergebnis nur für *slpA* gc8 signifikant.

221 Patienten (62,1%) erhielten in den ersten drei Monaten nach ihrer Infektion ein Antibiotikum. Am geringsten war der Anteil dieser Patienten unter denen, deren Isolat *slpA* yok zugeordnet werden konnte (7 Patienten, 43,8%; p = 0,135), am höchsten unter den Patienten, deren Isolat den *slpA*-Typen ar und (RT 10) zugeordnet werden konnte (5 Patienten, 100,0%, p < 0,001; 5 Patienten, 83,3%, p = 0,243). Somit erhielten die Träger von *slpA* ar signifikant häufig ein Antibiotikum.

In dem ersten Monat nach der Infektion litten 31 Patienten (8,7%) an einem Rezidiv ihrer Infektion. 38,7% dieser Patienten (12 Patienten, p = 0,014) trugen den *slpA*-Typen gc8, weitere 9 Patienten (29,0%, p = 0,411) *slpA* gr. Kein Rezidiv in dem ersten Monat nach der Infektion erlitten die Patienten, deren Isolat *slpA* smz (p < 0,001), kr (p < 0,001), yok (p < 0,001), (RT 10) (p = 0,447) und og39 (p = 0,488) zugeordnet werden konnte sowie die Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war (p < 0,001). Für die Träger von *slpA* gc8, smz, yok und für die Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war, war das Ergebnis signifikant.

Durchschnittlich erlitten 52 (14,9%) Patienten in den ersten drei Monaten nach der Infektion ein Rezidiv, wobei 36,5% dieser Rezidive (19 Rezidive, p = 0,002) von Patienten, die *slpA* gc8 trugen, ausgemacht wurden. Die Träger von *slpA* gc8 erlitten somit signifikant häufig ein Rezidiv innerhalb von 3 Monaten. Alle Patienten, deren Isolat *slpA* yok (p < 0,001), (RT 10) (p < 0,001) und og39 (p < 0,001) zugeordnet wurde, sowie die Patienten, deren Isolat nicht typisierbar war (p < 0,001), zeigten keine Rezidive in den ersten drei Monaten nach der Infektion. Diese Ergebnisse waren signifikant.

87 (24,4%) aller Patienten wurden in den drei Monaten nach der Infektion oder während der Infektion auf einer Intensivstation behandelt. Am höchsten war der Anteil dieser Patienten bei den Trägern des *slpA*-Typen (RT 10) (3 Patienten, 50,0%, p = 0,142), am geringsten bei den Trägern von *slpA* xr (3 Patienten, 15,8%, p = 0,317). Beide Ergebnisse waren nicht signifikant.

2 Patienten erhielten eine Kolektomie. Sie waren Träger der *slpA*-Typen hr und smz.

# 4. Diskussion

## 4.1 Verteilung der Stämme

Eine spezifische Verteilung der *slpA*-Typen auf die einzelnen Monate konnte in der Studie nicht erkannt werden. Dies spricht gegen eine jahreszeitliche Häufung der Infektionen (sowohl der Monat mit den wenigsten Isolaten, Mai 2012, als auch der Monat mit den meisten Isolaten, April 2013, lagen im Frühjahr) und auch gegen einen großen Ausbruch in einem oder zwei aufeinander folgenden Monaten. Da jedoch in der zweiten Hälfte des Zeitraums der Studie 62,7% der Stuhlproben isoliert wurden, kann insgesamt von einer steigenden Inzidenz der Infektionen ausgegangen werden. Dies hat sich auch in einigen nordamerikanischen, europäischen und asiatischen Studien gezeigt, ebenso in Beobachtungen des UKD (45) (26) (46).

Die beiden in der Studie am häufigsten vertretenen *slpA*-Typen (insgesamt 44,8%) waren gr und gc8. Da diese *slpA*-Typen weitgehend mit RT 001 und RT 027 übereinstimmen (31), unterstützt das Ergebnis die laut verschiedener Studien hohe Inzidenz dieser beiden Ribotypen (47) und die steigende Prävalenz von RT 027 (48). Laut Literatur sind in Deutschland RT 001, RT 027 und RT 014 am häufigsten vertreten (47). Passend dazu war *slpA*-Typ hr (korrelierend mit RT 014) in der Studie am dritthäufigsten vertreten. Bei 18 Isolaten war die *slpA*-Sequenzierung nicht erfolgreich und ein Isolat konnte keinem *slpA*-Typen zugeordnet werden. Warum die Sequenzierung nicht erfolgreich war, könnte versucht werden herauszufinden. So könnte überprüft werden, ob die DNA der entsprechenden Isolate mit anderen Primern replizierbar und damit sequenzierbar ist. Dies spräche für eine Mutation in dem Genabschnitt, an dem die Primer binden. Kato et al. haben dies bei einem Isolat, das mit den verwendeten Primern ebenfalls nicht typisierbar war, versucht, indem sie den Primer *slpA*com19 beibehalten, aber den Primer *slpA*com22 durch einen reversen Primer ersetzt haben. Auf diese Weise konnte das Isolat *slpA* ar zugeordnet werden (45). Hier wäre es einerseits interessant zu untersuchen, ob die Isolate mit anderen Primern typisierbar sind und welchen *slpA*-Typen sie bei erfolgreicher Typisierung zugeordnet werden können. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob es bei einem oder mehreren *slpA*-Typen gehäuft Mutationen im Bereich des für das *Surface Layer Protein A* kodierenden Genabschnittes gibt. Da *slpA*s laut Studien eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Bakterien an die Darmmukosa spielen (21), wäre es hier auch interessant weiter zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Pathogenität dieser mit herkömmlichen Primern nicht sequenzierbaren Isolate gibt.

### 4.2 RT Fragmentlängenanalyse

Bei der Fragmentlängenanalyse konnten 40 verschiedene Ribotypen bestimmt werden. 29 Isolate konnten keinem RT zugeordnet werden. Im Vergleich dazu wurden per *slpA*-Sequenzierung 23 verschiedene *slpA*-Typen detektiert. Für ein Isolat konnte kein übereinstimmender *slpA*-Typ gefunden werden und bei 18 Proben konnte das *slpA*-Gen nicht sequenziert werden. Dies zeigt einerseits, dass mittels *slpA*-Sequenzierung insgesamt mehr Isolate einem *slpA*-Typen zugeordnet werden konnten (383 Isolate vs. 373 Isolate; 95,3% vs. 92,8%). Andererseits konnten per Ribotypisierung mehr verschiedene Ribotypen bestimmt werden als *slpA*-Typen per *slpA*-Sequenzierung. Damit ist die *slpA*-Typisierung weniger diskriminierend als die Ribotypisierung. Dies spricht für eine differenziertere Zuordnung der Isolate zu einzelnen RTs als zu *slpA*-Typen. Diese differenziertere Zuordnung ist am deutlichsten an *slpA* hr und kr zu sehen (s. Ergebnisteil).

Dass *slpA* gc8 weitgehend mit RT 027 und *slpA* gr weitgehend mit RT 001 übereinstimmt, konnte schon in verschiedenen Studien gezeigt werden. Auch die Übereinstimmung von RT 002 und *slpA* yok konnte nachgewiesen werden (49) (45).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, bei der RT 078 und *slpA* smz übereinstimmten, zeigten Kato et al., dass RT smz und *slpA* smz übereinstimmen (45). Allerdings ist *slpA* smz in Japan für verschiedene Ausbrüche verantwortlich gewesen (26). Dies kann darauf hindeuten, dass es sich hierbei nicht um genau den gleichen Stamm wie in Europa handelt und somit auch die anderen zugeordneten RTs zu erklären sind. In dieser Studie lag keine Ausbruchsituation vor, sodass die Aussage hierzu etwas begrenzt ist.

Die Isolateanzahl in dieser Studie war größer als in den meisten vergleichbaren Studien. 30 Isolate konnten seltenen *slpA*-Typen zugeordnet werden, welchen jeweils weniger als 5 Isolate zugeordnet werden konnten. Somit ist die Aussagekraft über die RT-Zugehörigkeit dieser Isolate begrenzt. An dieser Stelle wäre es interessant, eine Studie mit noch mehr Isolaten durchzuführen oder die Ergebnisse aus allen Studien, in denen RT und *slpA*-Typ verglichen wurden, zu vereinen und zu analysieren. Durch Untersuchung von einer größeren Anzahl der einzelnen Isolate könnte eine größere statistische Aussagekraft erzielt werden. Hier wäre es unter anderem auch interessant zu sehen, wie sich *slpA*-Typ ts592, welchem in dieser Studie nur 4 Isolate zugeordnet werden konnten, verhält. In dieser Studie konnten 3 seiner 4 Isolate keinem RT

zugeordnet werden. Daher wäre es sicherlich spannend zu untersuchen, welchen Anteil an den nicht per Ribotypisierung zu untersuchenden Isolaten er trägt.

### 4.3 Vorhandensein der für die Toxine codierenden Gene

Wie auch schon in Studien beschrieben, besaßen alle Isolate von *slpA* gc8 die Mutation Δ117-TcdC (46) (31).

*SlpA* (RT10) war der einzige *slpA*-Typ, dessen Isolate alle keins der überprüften Gene trugen. Obwohl dieser *slpA*-Typ die Gene für die beiden Toxine A und B nicht exprimierte, zeigten die Patienten eine Durchfallsymptomatik. Dies wurde auch schon in anderen Studien beschrieben (48) und führt zu der Frage, ob bei diesen Isolaten die Virulenz durch das Vorhandensein des Gens für das binäre Toxin *cdt* gegeben ist. Eine andere Studie (50) hingegen besagt, dass im Tierversuch das alleinige Vorhandensein von *cdt* nicht zu Virulenz, sondern nur zu einer Besiedelung des Darms führt. Von den in dieser Studie untersuchten Isolaten, die *slpA* (RT10) angehörten, exprimierte keines das Gen für das binäre Toxin B. Trotzdem litten die Träger an Diarrhoe.

Nur Isolate, die zu *slpA* gc8 (100%), smz (55,2%), zu den nicht typisierbaren Isolaten (36,8%) und zu den *slpA*-Typen mit weniger als 5 zugehörigen Isolaten gehörten, besaßen Δ117-TcdC und/oder das *cdtB*-Gen. Δ117-TcdC soll laut einigen Studien zu einer vermehrten Toxinausschüttung führen, da das TcdC-Protein die Expression der *tcdA*- und *tcdB*-Gene negativ reguliert (51). Andererseits gibt es auch Studien, die belegen, dass es bei den betroffenen Isolaten zu keiner vermehrten Toxinproduktion kommt (52). Da in dieser Studie nicht die Toxinproduktion untersucht wurde, kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Allerdings wäre es sehr interessant, diesen Aspekt in einer folgenden Studie zu untersuchen. Inwiefern die betroffenen *slpA*-Typen zu einer stärkeren Ausprägung der Infektion, die aus einer vermehrten Toxinausschüttung resultieren kann, führen, wird bei der Interpretation der klinischen Daten untersucht.

Es gibt Schnelltests, welche anhand des Vorhandenseins von Δ117-TcdC sowie des Vorhandenseins binärer Toxingene in Stuhlproben RT 027 detektieren (53). In dem Probenkollektiv dieser Arbeit gab es jedoch auch Proben, welche diese Merkmale besaßen, jedoch nicht RT 027 zugeordnet wurden. Daher kann es sein, dass mit diesen Tests Patienten als Träger von RT 027 identifiziert werden, ohne diesen Ribotyp zu tragen.

### 4.4 Resistenzbestimmung

Unter den untersuchten Isolaten waren keine, die resistent gegen Metronidazol oder Vancomycin waren. In vereinzelten Studien konnten in der letzten Zeit Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika beobachtet werden (49) (54).

Knapp die Hälfte aller Isolate war resistent gegen Moxifloxacin und Erythromycin. Auffallend war, dass ein Großteil (77,3%; 98,8%) der Isolate von *slpA* gr und gc8 resistent gegen beide Antibiotika war. Dies entspricht auch der Aussage einer Studie von 2009 (55). Dort fiel auf, dass seltenere Stämme oft sensibel gegenüber beiden Antibiotikaklassen waren.

Insgesamt waren 85,6% der Isolate entweder resistent gegen Moxifloxacin und Erythromycin (45%) oder sensibel gegenüber beiden Antibiotika (40%). Die beiden großen Stämme *slpA* gr und gc8 scheinen sich dadurch, dass ein sehr großer Teil ihrer Isolate zu den resistenten Isolaten gehört, gut verbreiten zu können. Die Isolate seltenerer Stämme sind dementsprechend auch häufiger sensibel gegenüber den Antibiotika.

### 4.5 Klinische Daten

Für 360 Patienten konnten alle klinischen Daten oder ein Großteil der Daten erhoben werden, 27 Patienten waren nur ambulant vorstellig und für 17 Patienten konnte nur ein geringer Teil der klinischen Daten erhoben werden. Da mit 360 für sehr viele Patienten klinische Daten erhoben werden konnten, kam es zu aussagekräftigen Ergebnissen hinsichtlich der Pathogenität der einzelnen *slpA*-Typen. Die Isolate der 27 ambulant gesehenen Patienten verteilten sich gleichmäßig auf alle *slpA*-Typen. Somit kann nicht gesagt werden, dass einzelne *slpA*-Typen in dieser Studie vermehrt ambulant oder bei hospitalisierten Patienten vorkamen.

Bisher gab es sehr viele Studien über die Pathogenität der einzelnen *Clostridium difficile* Stämme. Oft wurde beschrieben, RT 027 sei ein besonders virulenter Stamm (51) (56) (46). Zudem wurde beschrieben, dass RT 078 ebenfalls übermäßig virulent ist (37). Allerdings gibt es auch immer mehr Studien, die eine gegensätzliche Datenlage zeigen und besagen, dass den einzelnen Stämmen kein leichterer oder schwererer klinischer Verlauf zugeschrieben werden kann (32).

Zunächst wurden die demographischen Daten der einzelnen *slpA*-Typen untersucht. Bei auffallend vielen weiblichen Personen konnten *slpA* gr, yok und nicht typisierbare Isolate isoliert werden und wenig *slpA* gc13, og39 und ar angehörende Isolate, also eher seltenere Stämme. Signifikant war das Ergebnis jedoch nur für *slpA* gr. In einer Studie konnte beschrieben werden, dass sowohl das weibliche Geschlecht als auch die Infektion mit RT 027 zu rezidivierenden Erkrankungen führen können (57). Die Träger der Isolate von *slpA* gc8 waren signifikant älter als die Träger anderer *slpA*-Typen, während die Träger der Isolate von *slpA* xr signifikant jung waren. Weibliches Geschlecht und hohes Alter der Träger können jedoch auch in demografischem Zusammenhang stehen. Dass die Träger von RT 027 eher alt sind, wurde auch vorher schon beschrieben, ebenso, dass sie häufig in einer Pflegeeinrichtung leben (39). Da ein hohes Alter einen Risikofaktor für einen schweren Verlauf der *Clostridium difficile* Infektion darstellt (58), kann es bei diesem Stamm eher zu einem schweren klinischen Verlauf der Infektion kommen. Signifikant viele Patienten, die Träger von nicht typisierbaren Isolaten waren, wurden im Jahr vor der Infektion in einem Krankenhaus aufgenommen. Krankenhausaufenthalte in der Anamnese können für eine chronische Grunderkrankung der Träger sprechen. Diese kann durch ein geschwächtes Immunsystem wiederum zu einem schwerwiegenderen Verlauf der Infektion führen. Zudem kann es sein, dass die Patienten sich im Krankenhaus mit ihrem *Clostridium difficile* Stamm infiziert haben. Viele Träger von *slpA* gc8 lebten in einer Pflegeeinrichtung. Einerseits kann dies dafür sprechen, dass es dort schnell zu einer Kolonialisierung des Darms der Bewohner durch mangelnde Hygiene des Pflegepersonals kommen kann, wie bereits in Studien beschrieben (59). Andererseits haben viele Bewohner von Pflegeeinrichtungen Grunderkrankungen und sind eher alt. Dies kann zu einer leichteren Kolonialisierung des Darms mit *Clostridium difficile* durch verminderte Funktion des Immunsystems sowie zu einem schwereren Verlauf der Infektion durch ein nicht intaktes Immunsystem führen. Ebenso werden Bewohner von Pflegeeinrichtungen vor Aufnahme in die Pflegeeinrichtung häufig im Krankenhaus behandelt, sodass es auch dort zu einer Kolonialisierung des Darms kommen kann (60). Dass die Träger von *slpA* gc8 überdurchschnittlich alt waren, passt zu der Aussage, dass die Träger von diesem *slpA*-Typen oft in einer Pflegeeinrichtung lebten. In einer hessischen Studie wurde genau das Gegenteil gezeigt. Dort wurden Stuhlproben von Bewohnern eines Pflegeheims untersucht, und kein einziger Bewohner trug RT 027, obwohl eine Besiedelung mit *Clostridium difficile* häufig war (61). Allerdings wurde auch schon über Ausbrüche von RT 027 in Pflegeheimen berichtet (59).

Die Träger von *slpA* xr und og39 litten signifikant selten an blutiger Diarrhoe. Ein häufiges Vorliegen von blutiger Diarrhoe könnte für eine höhere Toxizität des *slpA*-Typen sprechen. Es wurde beschrieben (62), dass blutiger Stuhl mit einem schwereren klinischen Verlauf assoziiert ist, nicht jedoch mit einer erhöhten Toxinproduktion des Isolats. In dieser Studie wurde, wie bereits beschrieben, lediglich die Expression der Gene, welche für die Toxine kodieren, untersucht. Es wäre jedoch auch sehr interessant in einer folgenden Studie die Toxinproduktion zu untersuchen und mit zu untersuchen, ob eine vermehrte Toxinproduktion bei einem erneut sehr großen Patientenkollektiv signifikant häufig zu blutiger Diarrhoe führt. Die Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf hatten laut der Studie von Akerlund et al. zwar häufiger, aber nicht signifikant häufiger, Fieber. Im Gegensatz hierzu konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Träger von *slpA* kr signifikant häufig und die Träger von *slpA* hr signifikant selten Fieber hatten. Abdominelle Schmerzen traten bei Akerlund et al. signifikant häufiger bei erhöhter Toxinproduktion auf, im Gegensatz hierzu gab es in unserer Studie keinen *slpA* Typen, welcher signifikant häufig zu abdominellen Schmerzen führte. Allerdings litten die Träger von *slpA* og39 und ar signifikant selten unter abdominellen Schmerzen. Auch hier wäre es interessant zu untersuchen, ob es bei einer folgenden Studie zu einer Korrelation zwischen Toxinproduktion und dem klinischen Verlauf der Infektion kommt.

Eine auffällige CT-Untersuchung fiel vor allem bei Trägern von *slpA* gc8 auf. Dies kann ein relativ objektiver Hinweis auf eine Darmschädigung und somit auch auf einen schweren, invasiven Verlauf der Infektion sein. Jedoch kann der auffällige Befund auch durch eine andere Ursache als die *Clostridium difficile* Infektion gegeben sein und ist im Grunde genommen nur ein sicheres Indiz, wenn eine Nachuntersuchung nach Abklingen der Infektion durchgeführt wird.

An starker Diarrhoe litten signifikant häufig die Träger von *slpA* gr. Dieser Sachverhalt kann damit zu erklären sein, dass *slpA* gr eher zu einer schwereren Symptomatik führt, da die Diarrhoe eines der Hauptmerkmale der Infektion ist, auch wenn sich ein toxisches Megakolon ohne Diarrhoe präsentieren kann. Signifikant wenig Patienten, die mit *slpA* (RT 10), also einem eher seltenen Typen, infiziert waren, litten aktuell an einem Rezidiv. In Studien konnten bisher gezeigt werden, dass RT 027 vermehrt zu Rezidiven führt (57). In dieser Studie führte eine Infektion mit *slpA* gc8 zwar vermehrt zu Rezidiven, dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Zudem wurde beschrieben, dass das Vorhandensein des binären Toxins, vor allem bei zusätzlichem Vorliegen von Δ117-TcdC, vermehrt zu Rezidiven führt (63) (64). Die *slpA*-Typen, die das Gen für das binäre Toxin B und Δ117-TcdC trugen, waren gc8, hr und smz. Von ihnen fiel nur *slpA* gc8 durch etwas mehr Rezidive als der Durchschnitt auf (15,8% vs. 10,9%). Dieses Ergebnis

war jedoch nicht signifikant. Die mit *slpA* gc8 infizierten Patienten erlitten allerdings in dem folgenden Monat nach der Infektion und in den drei Monaten nach der Infektion signifikant häufig ein Rezidiv ihrer *Clostridium difficile* Infektion. Dies bestätigt die Aussage der Studien.

Fast alle Patienten wurden vor Ausbruch der Infektion mit einem Antibiotikum behandelt. Dies unterstützt die allgemein anerkannte Meinung, dass *Clostridium difficile* Infektionen durch Antibiotikaeinnahme hervorgerufen werden. Zu der Einnahme von PPIs gab es in dieser Studie keine signifikanten Ergebnisse. Zu dem Effekt von PPIs auf eine *Clostridium difficile* Infektion gibt es sehr unterschiedliche Studien. So haben Studien gezeigt, dass die Einnahme von PPIs zu einer gravierenderen *Clostridium difficile* Infektion führen soll (65). Andererseits haben Studien auch gezeigt, dass die Behandlung von Patienten mit PPIs nicht zu einem schweren klinischen Verlauf der Infektion führen soll (66) (67). Ebenso gibt es Studien, die zeigen, dass die Einnahme von PPIs das Risiko einer *Clostridium difficile* Infektion erhöht (68). In dieser Studie konnte nicht gezeigt werden, dass es Unterschiede bezüglich der PPI-Einnahme bezogen auf die einzelnen *slpA*-Typen gab. Dies könnte jedoch in einer noch größeren Studie, bei der eine noch größere Anzahl an Isolaten zu einem signifikanten Ergebnis führen kann, erneut untersucht werden.

Bei der Betrachtung der Verteilung der therapeutischen Antibiotikaeinnahme der Patienten fiel auf, dass sich gerade die Träger des am häufigsten isolierten *slpA*-Typen gr weder durch häufige noch durch seltene Antibiotikaeinnahme auszeichneten. Auch ansonsten war die Verteilung der Patienten, die die Antibiotika Metronidazol oder Vancomycin sowie die Kombination beider Antibiotika erhielten, auf einzelne *slpA*-Typen nicht auffallend häufig oder auffallend selten. Bezüglich der Antibiotikaeinnahme kann einerseits die Gabe von oralem Metronidazol bedeuten, dass bei dem behandelten Patienten kein allzu schwerer klinischer Verlauf vorliegt, da Metronidazol nur bei unkomplizierten Verläufen eingesetzt werden soll. Eine i.v.-Antibiotikagabe kann bedeuten, dass der Patientin keine oralen Antibiotika erhalten kann und sie daher parenteral gegeben werden müssen. Dies kann einerseits an einem schweren klinischen Verlauf, andererseits an einer schweren Grunderkrankung des Patienten liegen. Jedoch kann sowohl von der oralen Metronidazol-Gabe von als auch von der i.v. Metronidazol-Gabe kein Rückschluss auf den Schweregrad der Infektion gezogen werden.

Signifikant viele mit *slpA* gc8 infizierte Patienten litten nach Abschluss der Behandlung weiterhin an Diarrhoe. Dies kann einerseits für eine schwere Schädigung der Darmmukosa, welche lange braucht, um wieder zu Stuhlgang mit normaler Konsistenz

beizutragen, sprechen. Andererseits kann es auch dafür sprechen, dass neben der *Clostridium difficile* Infektion noch andere Ursachen für die Diarrhoe vorgelegen haben und die Patienten häufig noch an anderen Erkrankungen litten.

Bei den prospektiven Rezidiven, also den Rezidiven im ersten Monat nach der untersuchten Infektion und in den ersten drei Monaten nach der untersuchten Infektion, litten die Träger von *slpA* gc8 signifikant häufig an einem Rezidiv. Auch in verschiedenen Studien konnte schon gezeigt werden, dass die mit *slpA* gc8 infizierten Patienten vergleichsweise häufig an Rezidiven litten (69). Es gibt jedoch auch Studien, die belegen, dass RT 027 nicht zu einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine rezidivierende Infektion führt (70). Retrospektiv litten die Träger von *slpA* gc8 auch in dieser Studie nicht signifikant häufig an einem Rezidiv, die aktuelle Infektion war zwar bei ihnen häufig, aber nicht signifikant häufig, ein Rezidiv. Damit ist die Aussagekraft dieser Studie bezüglich Rezidiven der Träger von *slpA* gc8 begrenzt. Kein Patient, der mit *slpA* yok, (RT 10), og39 oder mit einem nicht typisierbaren *slpA*-Typen infiziert war, litt in den ersten drei Monaten nach der Infektion an einem Rezidiv. Dies kann auch für eine geringere Pathogenität der Infektion sprechen.

Viele, aber nicht signifikant viele, Patienten, die mit *slpA* (RT 10) infiziert waren, mussten intensivmedizinisch behandelt werden. Dies steht im Gegensatz dazu, dass die mit *slpA* (RT 10) infizierten Patienten selten an Rezidiven litten. Daher ist es schwierig eine Aussage darüber zu treffen, ob dieser *slpA*-Typ insgesamt zu einem schweren klinischen Verlauf führt. Gegen eine Virulenz des *slpA*-Typen spricht jedoch, dass er häufig Infektionen bei immunkomprimierten, intensivmedizinisch behandelten Patienten verursacht und es bei Patienten mit besserer Immunabwehr nicht zu einer symptomatischen Infektion kommt. Generell kann ein Aufenthalt auf der Intensivstation dafür sprechen, dass die betroffenen Patienten einen vergleichsweise schweren Verlauf der Infektion haben, der häufig dazu führt, dass sie intensivmedizinisch betreut werden müssen, oder dass die betroffenen Patienten an einer schweren systemischen Erkrankung leiden und unabhängig von der *Clostridium difficile* Infektion intensivmedizinisch behandelt werden. Ebenso kann eine intensivmedizinische Behandlung für eine Immunkomprimierung der Patienten sprechen, dies kann wiederum für eine Anfälligkeit für Infektionen, zum Beispiel mit *C. diff.*, und auch mit wenig pathogenen Stämmen, sprechen. Um dies herauszufinden, müssten die jeweiligen Grunderkrankungen der Patienten und der Grund für die Aufnahme auf die Intensivstation näher untersucht werden. Es gibt eine italienische Studie, die von Patienten berichtet, die wegen einer *Clostridium difficile* Infektion intensivmedizinisch behandelt wurden. Alle dort ribotypisierten Stuhlproben gehörten RT 027 an (71). Eine

brasilianische Studie hingegen zeigte, dass die dort auf einer Intensivstation an *Clostridium difficile* erkrankten Patienten nicht RT 027, sondern RT 135 und 038 trugen (72). Die unterschiedlichen Ergebnisse können dafür sprechen, dass es sich um Ausbrüche oder gehäufte Übertragungen dieser Stämme auf den Stationen handelt. In dieser Studie wurden die Träger von *slpA* gc8 nicht häufig intensivmedizinisch behandelt.

Da insgesamt nur 2 Patienten im Rahmen ihrer *Clostridium difficile* Infektion eine Kolektomie erhielten und diese mit unterschiedlichen *slpA*-Typen infiziert waren, kann hier nicht gesagt werden, dass bestimmte *slpA*-Typen zu so einer schweren Infektion geführt haben, dass viele der mit ihnen infizierten Patienten kolektomiert werden mussten.

Eine weitere Begrenzung der Studie besteht darin, dass nicht zu allen Patienten die klinischen Daten komplett ermittelt werden konnten und dass es gerade bei den *slpA*-Typen mit relativ wenigen zugehörigen Isolaten schwer war, eine Aussage über die Pathogenität zu treffen, da eine einzelne fehlende Information eine Veränderung der Aussage darstellen kann und es wegen der geringen Anzahl an zugehörigen Isolaten ohnehin schwer ist, eine Aussage bezüglich der Pathogenität zu treffen. Dies führte, gerade wenn kein Isolat eines dieser *slpA*-Typen ein Merkmal aufwies, zu sehr signifikanten Ergebnissen. Ebenso wäre es sicherlich sinnvoll, eine weiterführende Studie prospektiv durchzuführen. Einerseits könnten mehr klinische Daten ermitteln werden, andererseits auch zuverlässigere Daten, da durch gezielte Beobachtung und auch Befragung der infizierten Patienten oder des behandelnden Personals noch während des Krankenhausaufenthaltes eine genauere Beantwortung einiger Fragen des Fragebogens möglich wäre. So könnte sicherlich eine bessere Aussagekraft erzielt werden.

Auch wäre es sehr interessant zu sehen, ob sich in einem noch längeren Studienzeitraum die Aussage der Studie verändern würde. Hier käme es zu besseren Aussagen über die weniger häufigen *slpA*-Typen und die Entwicklung der Häufigkeit der einzelnen *slpA*-Typen könnte beobachtet werden, ebenso eine eventuelle Progredienz oder Regredienz der Pathogenität einzelner *slpA*-Typen im Laufe der Zeit.

Zudem wäre es von Interesse, die Leukozytenzahl und Höhe des Albumins der infizierten Patienten zu untersuchen, da diese laut Studien eine gute Aussagekraft über die Schwere der Infektion erlauben (40).

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte, dass ein *slpA*-Typ zu einer signifikant schwereren Klinik führt als die

anderen *slpA*-Typen. Da die einzelnen untersuchten Aspekte nicht einem oder zwei *slpA*-Typen gehäuft zugeordnet werden konnten, kann nicht davon gesprochen werden, dass es *slpA*-Typen gibt, die in dieser Studie zu einem signifikant pathogeneren Krankheitsverlauf geführt haben. Auffallend war jedoch, dass ein sehr großer Teil der an Rezidiven erkrankten Patienten mit *slpA* gc8 infiziert war. Ebenso machten die Träger von *slpA* gc8 einen Großteil der Patienten mit auffälligem CT-Befund aus und *slpA* gc8 war der *slpA*-Typ mit dem größten Anteil an Bewohnern einer Pflegeeinrichtung. Allerdings war seine Pathogenität insgesamt nicht so stark ausgeprägt, wie es bisher in vielen Studien beschrieben wurde. Jedoch lag in dieser Studie auch kein Ausbruch vor, während viele Studien, die beschreiben, dass RT 027 sehr pathogen ist, in Ausbruchsituationen durchgeführt wurden.

## 5. Literaturverzeichnis


1. Hsu J, Abad C, Dinh M, Safdar N. Prevention of endemic healthcare-associated Clostridium difficile infection: reviewing the evidence. The American journal of gastroenterology. 2010;105(11):2327-39; quiz 40.

2. Grube RF, Heinlein W, Scheffer H, Rathmayer M, Schepp W, Lohse AW, et al. [Economic burden of Clostridium difficile enterocolitis in German hospitals based on routine DRG data]. Zeitschrift fur Gastroenterologie. 2015;53(5):391-7.

3. Rodriguez-Palacios A, Ilic S, LeJeune JT. Clostridium difficile with Moxifloxacin/Clindamycin Resistance in Vegetables in Ohio, USA, and Prevalence Meta-Analysis. Journal of pathogens. 2014;2014:158601.

4. Schroder O, Gerhard R, Stein J. [Antibiotic-associated diarrhea]. Zeitschrift fur Gastroenterologie. 2006;44(2):193-204.

5. Bouza E. Consequences of Clostridium difficile infection: understanding the healthcare burden. Clin Microbiol Infect. 2012;18 Suppl 6:5-12.

6. Vesteinsdottir I, Gudlaugsdottir S, Einarsdottir R, Kalaitzakis E, Sigurdardottir O, Bjornsson ES. Risk factors for Clostridium difficile toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2012;31(10):2601-10.

7. von Muller L, Halfmann A, Herrmann M. [Current data and trends on the development of antibiotic resistance of Clostridium difficile]. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2012;55(11-12):1410-7.

8. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent Clostridium difficile infection. The Journal of hospital infection. 2008;70(4):298-304.

9. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical M, Infectious D. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect. 2014;20 Suppl 2:1-26.

10. Govind R, Fitzwater L, Nichols R. Observations on the Role of TcdE Isoforms in Clostridium difficile Toxin Secretion. Journal of bacteriology. 2015;197(15):2600-9.

11. Matamouros S, England P, Dupuy B. Clostridium difficile toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Molecular microbiology. 2007;64(5):1274-88.

12. Bakker D, Smits WK, Kuijper EJ, Corver J. TcdC does not significantly repress toxin expression in Clostridium difficile 630DeltaErm. PloS one. 2012;7(8):e43247.

13. Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. Clostridium difficile toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. Journal of medical microbiology. 2008;57(Pt 6):685-9.

14. Govind R, Dupuy B. Secretion of Clostridium difficile toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. PLoS pathogens. 2012;8(6):e1002727.

15. Janezic S, Marin M, Martin A, Rupnik M. A new type of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile strain lacking a complete tcdA gene. Journal of clinical microbiology. 2015;53(2):692-5.

16. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature reviews Microbiology. 2009;7(7):526-36.

17. Cairns MD, Preston MD, Lawley TD, Clark TG, Stabler RA, Wren BW. Genomic Epidemiology of a Protracted Hospital Outbreak Caused by a Toxin A-Negative Clostridium difficile Sublineage PCR Ribotype 017 Strain in London, England. Journal of clinical microbiology. 2015;53(10):3141-7.

18. Stewart DB, Berg A, Hegarty J. Predicting Recurrence of C. difficile Colitis Using Bacterial Virulence Factors: Binary Toxin Is the Key. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract. 2012.

19. Mukherjee K, Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Proteins released during high toxin production in Clostridium difficile. Microbiology. 2002;148(Pt 7):2245-53.

20. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. Clostridium difficile infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut microbes. 2012;3(2):121-34.

21. Merrigan MM, Venugopal A, Roxas JL, Anwar F, Mallozzi MJ, Roxas BA, et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of Clostridium difficile. PloS one. 2013;8(11):e78404.

22. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of Clostridium difficile and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. Journal of clinical microbiology. 1999;37(2):461-3.

23. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of Clostridium difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. Journal of clinical microbiology. 2008;46(2):431-7.

24. Joost I, Speck K, Herrmann M, von Muller L. Characterisation of Clostridium difficile isolates by slpA and tcdC gene sequencing. International journal of antimicrobial agents. 2009;33 Suppl 1:S13-8.

25. Karjalainen T, Saumier N, Barc MC, Delmee M, Collignon A. Clostridium difficile genotyping based on slpA variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. Journal of clinical microbiology. 2002;40(7):2452-8.

26. Kato H, Yokoyama T, Arakawa Y. Typing by sequencing the slpA gene of Clostridium difficile strains causing multiple outbreaks in Japan. Journal of medical microbiology. 2005;54(Pt 2):167-71.

27. Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, Kaji C, et al. Typing of Clostridium difficile isolates endemic in Japan by sequencing of slpA and its application to direct typing. Journal of medical microbiology. 2010;59(Pt 5):556-62.

28. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile. Nature genetics. 2012.

29. Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, et al. Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of Clostridium difficile PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2008;13(41).

30. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent Clostridium difficile BI/NAP1/027. PloS one. 2011;6(9):e24894.

31. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 2005;366(9491):1079-84.

32. Sirard S, Valiquette L, Fortier LC. Lack of association between clinical outcome of Clostridium difficile infections, strain type, and virulence-associated phenotypes. Journal of clinical microbiology. 2011;49(12):4040-6.

33. Miller M, Gravel D, Mulvey M, Taylor G, Boyd D, Simor A, et al. Health care-associated Clostridium difficile infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;50(2):194-201.

34. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, et al. Update of Clostridium difficile infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2008;13(31).

35. Lim SK, Stuart RL, Mackin KE, Carter GP, Kotsanas D, Francis MJ, et al. Emergence of a ribotype 244 strain of Clostridium difficile associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2014;58(12):1723-30.

36. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Griffiths D, Shine B, et al. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in Clostridium difficile infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2013;56(11):1589-600.

37. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2008;47(9):1162-70.
38. Heslop OD, Roye-Green K, Coard K, Mulvey MR. A unique strain of community-acquired Clostridium difficile in severe complicated infection and death of a young adult. BMC infectious diseases. 2013;13:299.
39. Scardina T, Labuszewski L, Pacheco SM, Adams W, Schreckenberger P, Johnson S. Clostridium difficile infection (CDI) severity and outcome among patients infected with the NAP1/BI/027 strain in a non-epidemic setting. Infection control and hospital epidemiology. 2015;36(3):280-6.
40. Walk ST, Micic D, Jain R, Lo ES, Trivedi I, Liu EW, et al. Clostridium difficile ribotype does not predict severe infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;55(12):1661-8.
41. Cloud J, Noddin L, Pressman A, Hu M, Kelly C. Clostridium difficile strain NAP-1 is not associated with severe disease in a nonepidemic setting. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2009;7(8):868-73 e2.
42. Jansen PL, Stallmach A, Lohse AW, Lerch MM. Development of Gastrointestinal Infectious Diseases between 2000 and 2012. Zeitschrift fur Gastroenterologie. 2014;52(6):549-57.
43. Jansen A, Kleinkauf N, Weiss B, Zaiss NH, Witte W, Bornhofen B, et al. [Emergence of clostridium difficile ribotype 027 in Germany: epidemiological and clinical characteristics]. Zeitschrift fur Gastroenterologie. 2010;48(9):1120-5.
44. Arvand M, Vollandt D, Bettge-Weller G, Harmanus C, Kuijper EJ, Clostridium difficile study group H. Increased incidence of Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Hesse, Germany, 2011 to 2013. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2014;19(10).
45. Kato H, Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, et al. Typing of Clostridium difficile isolates endemic in Japan by sequencing of slpA and its application to direct typing. Journal of medical microbiology. 2010;59(Pt 5):556-62.
46. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. The New England journal of medicine. 2005;353(23):2433-41.
47. von Muller L, Mock M, Halfmann A, Stahlmann J, Simon A, Herrmann M. Epidemiology of Clostridium difficile in Germany based on a single center long-term surveillance and German-

wide genotyping of recent isolates provided to the advisory laboratory for diagnostic reasons. International journal of medical microbiology : IJMM. 2015.

48. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive Clostridium difficile strains that do not produce toxins A and B. New microbes and new infections. 2015;3:12-7.

49. Moura I, Monot M, Tani C, Spigaglia P, Barbanti F, Norais N, et al. Multidisciplinary analysis of a nontoxigenic Clostridium difficile strain with stable resistance to metronidazole. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(8):4957-60.

50. Geric B, Carman RJ, Rupnik M, Genheimer CW, Sambol SP, Lyerly DM, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative Clostridium difficile strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J Infect Dis. 2006;193(8):1143-50.

51. Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J, et al. The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of Clostridium difficile. PLoS pathogens. 2011;7(10):e1002317.

52. Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, Heap JT, Minton NP. Precise manipulation of the Clostridium difficile chromosome reveals a lack of association between the tcdC genotype and toxin production. Applied and environmental microbiology. 2012;78(13):4683-90.

53. Carroll KC, Buchan BW, Tan S, Stamper PD, Riebe KM, Pancholi P, et al. Multicenter evaluation of the Verigene Clostridium difficile nucleic acid assay. Journal of clinical microbiology. 2013;51(12):4120-5.

54. Chong PM, Lynch T, McCorrister S, Kibsey P, Miller M, Gravel D, et al. Proteomic analysis of a NAP1 Clostridium difficile clinical isolate resistant to metronidazole. PloS one. 2014;9(1):e82622.

55. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in Clostridium difficile. International journal of antimicrobial agents. 2009;34(6):516-22.

56. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, et al. Update of Clostridium difficile-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2007;12(6):E1-2.

57. Richardson C, Kim P, Lee C, Bersenas A, Weese JS. Comparison of Clostridium difficile isolates from individuals with recurrent and single episode of infection. Anaerobe. 2015;33:105-8.

58. Kim HH, Kim YS, Han DS, Kim YH, Kim WH, Kim JS, et al. Clinical differences in Clostridium difficile infection based on age: a multicenter study. Scandinavian journal of infectious diseases. 2014;46(1):46-51.

59. Clayton JJ, McHale-Owen J. Outbreak of Clostridium difficile ribotype 027 in a residential home. J Hosp Infect. 2014;88(4):222-5.

60. Zarowitz BJ, Allen C, O'Shea T, Strauss ME. Risk Factors, Clinical Characteristics, and Treatment Differences Between Residents With and Without Nursing Home- and Non-Nursing Home-Acquired Clostridium difficile Infection. J Manag Care Spec Pharm. 2015;21(7):585-95.

61. Arvand M, Moser V, Schwehn C, Bettge-Weller G, Hensgens MP, Kuijper EJ. High prevalence of Clostridium difficile colonization among nursing home residents in Hesse, Germany. PloS one. 2012;7(1):e30183.

62. Akerlund T, Svenungsson B, Lagergren A, Burman LG. Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with Clostridium difficile-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. Journal of clinical microbiology. 2006;44(2):353-8.

63. Stewart DB, Berg A, Hegarty J. Predicting recurrence of C. difficile colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract. 2013;17(1):118-24; discussion p 24-5.

64. Stewart DB, Berg AS, Hegarty JP. Single nucleotide polymorphisms of the tcdC gene and presence of the binary toxin gene predict recurrent episodes of Clostridium difficile infection. Annals of surgery. 2014;260(2):299-304.

65. Hung YP, Ko WC, Chou PH, Chen YH, Lin HJ, Liu YH, et al. Proton-Pump Inhibitor Exposure Aggravates Clostridium difficile-Associated Colitis: Evidence From a Mouse Model. The Journal of infectious diseases. 2015;212(4):654-63.

66. Novack L, Kogan S, Gimpelevich L, Howell M, Borer A, Kelly CP, et al. Acid suppression therapy does not predispose to Clostridium difficile infection: the case of the potential bias. PloS one. 2014;9(10):e110790.

67. Abou Chakra CN, Pepin J, Sirard S, Valiquette L. Risk factors for recurrence, complications and mortality in Clostridium difficile infection: a systematic review. PloS one. 2014;9(6):e98400.

68. Biswal S. Proton pump inhibitors and risk for Clostridium difficile associated diarrhea. Biomedical journal. 2014;37(4):178-83.

69. Marsh JW, Arora R, Schlackman JL, Shutt KA, Curry SR, Harrison LH. Association of relapse of Clostridium difficile disease with BI/NAP1/027. J Clin Microbiol. 2012;50(12):4078-82.

70. Eyre DW, Walker AS, Wyllie D, Dingle KE, Griffiths D, Finney J, et al. Predictors of first recurrence of Clostridium difficile infection: implications for initial management. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;55 Suppl 2:S77-87.

71. Guastalegname M, Grieco S, Giuliano S, Falcone M, Caccese R, Carfagna P, et al. A cluster of fulminant Clostridium difficile colitis in an intensive care unit in Italy. Infection. 2014;42(3):585-9.

72. Balassiano IT, Dos Santos-Filho J, de Oliveira MP, Ramos MC, Japiassu AM, Dos Reis AM, et al. An outbreak case of Clostridium difficile-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2010;68(4):449-55.

# 6. Anhang

## Fragebogen

| **Merkmal** | **Antwort** |
|---|---|
| Fallnummer | |
| Geburtsdatum | |
| Alter | |
| Geschlecht | |
| Beginn der Diarrhoe | |
| Datum der Probenentnahme | |
| War Blut im Stuhl? | |
| Hatte der Pat. bei Probenentnahme Fieber? | |
| Hatte der Pat. bei Probenetnahme abd. Schmerzen? | |
| Intensität der Diarrhoe (mild/moderat/stark) | |
| Hatte der Pat. bereits ein *C. diff.* Infektionen? | |
| Wenn ja, wie viele im letzten Jahr? | |
| Hatte der Patientin eine CT Abdomen? | |
| Wenn ja, war sie auffällig? | |
| Wurde der Pat. auf Norovirus getestet? | |
| Wenn ja, war es positiv? | |
| War der Pat. im letzten Jahr im Krankenhaus? | |
| Wenn ja, wie oft? | |
| Lebt der Pat. in einer Pflegeeinrichtung? | |
| Erhielt der Pat. im letzten Jahr Antibiotika? | |
| Erhielt der Pat. PPIs? | |
| Erhielt der Pat. Antidiarrhoika? | |
| Wurde der Pat. aktuell mit oralem MTZ behandelt? | |
| Wenn ja, wie lange? | |
| Wurde der Pat. aktuell mit i.v. MTZ behandelt? | |
| Wenn ja, wie lange? | |
| Wurde der Pat. mit Vancomycin behandelt? | |

| | |
|---|---|
| Wenn ja, wie lange? | |
| War die Diarrhoe am Ende der Behandlung noch vorhanden? | |
| Erhielt der Pat. in den folgenden 3 Monaten Antibiotika? | |
| Rezidive im 1. Monat nach der Infektion | |
| Rezidive in den 3 Monaten nach Infektion | |
| Wurde der Pat. in den ersten 3 Monaten nach Infektion auf der Intensivstation behandelt? | |
| Erhielt der Pat. eine Kolektomie? | |

## 7. Danksagung

Vielen Dank an das gesamte Institut für Medizinische Mikrobiologie für die Ermöglichung dieser Arbeit. Das größte Dankeschön geht an meinen Doktorvater Colin MacKenzie, für die unendliche Geduld, das immer offene Ohr und die ganzen Hilfestellungen. Ich kann mir keinen besseren Doktorvater vorstellen.