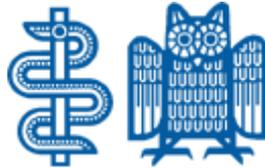


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institut für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

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



**Verbreitung von *Clostridium difficile* bei Bewohnern von
Alters- und Pflegeheimen des Saarlandes**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER
MEDIZIN DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016**

vorgelegt von Charlotte Meyer,

geboren am 03.11.1990 in Steinheim

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
1. Zusammenfassung:	1
1.1. Deutsche Zusammenfassung	1
1.2. Summary.....	2
2. Einleitung:	4
2.1. Erregercharakteristika	4
2.2. Diagnostik	10
2.3. Epidemiologie.....	13
2.4. Zielsetzung.....	16
3. Methoden und Materialien:	17
3.1. Studienproben.....	17
3.2. Klinische Datenerhebung	17
3.3. Anzucht	18
3.3.1. Kulturelle Anzucht.....	19
3.3.2. Erscheinungsbild der Kolonien.....	20
3.4. Typisierung mit MALDI-TOF	21
3.4.1. Aufreinigung.	21
3.4.2. Auswertung.....	22
3.5. Antibiotikaresistenztestung.....	22
3.6. Genotypisierung	24
3.6.1. DNA Aufreinigung	24
3.6.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	24

3.6.3. Multiplex-PCR.....	25
3.6.4. Ribotypisierungs-PCR.....	27
4. Ergebnisse:	31
4.1. <i>Clostridium difficile</i> in verschiedene Altersklassen.....	31
4.2. Geschlechterverteilung.....	33
4.3. Ribotypen in den verschiedenen Alters- und Pflegeheimen.....	34
4.4. Ribotypen der verschiedenen Kreisgebieten des Saarlandes.....	38
4.5. Verteilung der Toxingene	40
4.6. Ribotypen innerhalb der Altersklassen	41
4.7. Risikofaktoren	43
4.7.1 Risikofaktoren der häufigsten Ribotypen.....	45
4.7.2 Risikofaktoren innerhalb der Altersklassen	47
4.8. Antibiotikaresistenztestung.....	48
4.9. Verlaufsuntersuchungen der positiven Befunde	50
4.9.1. Antibiotikaresistenztestung der Verlaufsuntersuchung	51
4.9.2. Risikofaktoren der Verlaufsuntersuchung zum Zeitpunkt der ersten Entnahme	53
5. Diskussion	55
6. Literaturverzeichnis	69
7. Publikationen	78
8. Danksagung	79
9. Anhang	80
9.1. Materialien, Geräte, Software	80
9.2. Anleitung Chrom-Agarplatten für <i>C. difficile</i>	83
9.3. Bewohnerfragebogen der Datenerhebung.....	84

Abkürzungen

AAD	Antibiotika-assoziierte Diarrhoe
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> assoziierte Diarrhoe
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cdtA/cdtB	binäres Toxin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
et al.	und andere
E-Test	Epsilometertest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GLDH	Glutamatdehydrogenase
IgA	Immunglobulin A

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IQR	Interquartilsabstand
Iso-Platte	Isolierung-Platte
NAP1	North American Pulsed field type 1 (RT 027)
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p-value	p-Wert/Signifikanzwert
REF	Referenznummer
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Ribotyp
tcdA	Toxin A
tcdB	Toxin B
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VRE	Vancomycin resistente <i>Enterokokken</i>
vs.	Versus
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung:

1.1. Deutsche Zusammenfassung

C. difficile ist der häufigste Erreger von Durchfallerkrankungen im Krankenhaus. Eine besondere Bedeutung gewinnt *C. difficile* jedoch auch bei Menschen in Alters- und Pflegeheimen. Deshalb stellen die Bewohner einerseits ein Risikokollektiv für *C. difficile* Infektionen (CDI) dar, andererseits sind sie aber auch gleichzeitig eine mögliche Ansteckungsquelle für andere Bewohner sowie bei Verlegungen in Kliniken.

Bei dieser multizentrischen Punktprävalenzstudie in Alters- und Pflegeheimen im Saarland wurden Analabstriche von den Altersheimbewohnern gesammelt und kulturell auf *C. difficile* untersucht.

Die Kultur erfolgte mit einem *C. difficile*-Selektivmedium und die Reinkultur wurde mit MALDI-TOF identifiziert (Bruker Daltonics). Anschließend wurden die Isolate molekulargenetisch mit Kapillargelelektrophorese ribotypisiert und die Toxingene (tcd A, tcd B, cdt A und B) mit Multiplex-PCR untersucht (BioNumerics).

Insgesamt konnten 1301 Proben aus 38 Altersheimen eingeschlossen werden. Davon waren 66 Proben *C. difficile* positiv. Das entspricht einem prozentualen Anteil von 5,1 %. Die toxischen Ribotypen 001 (n= 7, 10,6 %), 014 (n= 7, 10,6 %), 027 (n= 5, 7,6 %), RT 126 (n= 4, 6,1 %), RT 015 (n= 3, 4,5 %) und RT 106 (n= 3, 4,5 %) konnten dabei besonders häufig nachgewiesen werden. Bei jeweils 2 Patienten wurden die toxischen Ribotypen RT 002, RT 003, RT 010, RT 018, RT 026, RT 043, RT 053, RT 073 und RT 328 detektiert (n= 2, 3,0 %) und jeweils bei einem die RT 012, RT 017, RT 020, RT 024, RT 050, RT 070, RT 078, RT 140 und RT 226 (n= 1, 1,5 %). Folgende toxischen negativen Ribotypen konnten bei Bewohnern der saarländischen Altersheime nachgewiesen werden:

RT 010 (n= 2, 3,0 %) und RT 140 (n= 1, 1,5 %). 15,2 % der Isolate (n= 10) entsprachen bislang nicht klassifizierten Ribotypen.

54 Ribotypen (81,8 %) waren toxischen, 63,6 % (n= 42) tcd A und tcd B positiv; 18,2 % (n= 12) trugen zusätzlich die Gene cdtA und cdtB für das binäre Toxin und nur 12 (18,2 %) waren nicht toxischen.

Jeweils einer der Isolate war resistent gegen Vancomycin (MHK: Median:0,5 mg/l, Range 0,125-8 mg/l) und Metronidazol (MHK: Median 0,38 mg/l, Range 0,125-256 mg/l), 2 der Isolate waren resistent gegen Rifampicin. Abhängig von den Ribotypen

konnten charakteristische Resistenzmuster gegen Moxifloxacin (MHK: Median: 1,0 mg/l, Range 0,125-32 mg/l) und Clarithromycin nachgewiesen werden.

Verlaufsuntersuchungen ergaben, dass 5 von 30 untersuchten Proben weiterhin einen positiven Befund aufwiesen. Die asymptomatische Besiedlungen beinhaltete folgenden Ribotypen: RT 001, RT 010, RT 014, RT 073 und RT 106. Davon waren 4 persistente Ribotypen.

Insgesamt entsprachen die gefundenen RT den RT der Normalbevölkerung. Somit kann angenommen werden, dass Alters- und Pflegeheimbewohner keine besondere Ansteckungsquelle für andere Bewohner oder im Krankenhaus darstellen.

1.2. Summary

Colonization of inhabitants in nursing homes by *Clostridium difficile* in the State of Saarland

Clostridium difficile is the most prevalent pathogens causing diarrhea in hospitals. However, there is also emerging relevance for *C. difficile* infections (CDI) when considering nursing homes. The exact root of *C. difficile* infection remains elusive in the majority of cases; however, inhabitants of nursing homes could be one potential source.

In the present point prevalence study anal swabs from people in nursing homes (State of Saarland) were routinely screened for *C. difficile* by anaerobic culture using selective media (Chrom-Agar, MAST DIAGNOSTICA). Samples were incubated in anaerobic atmosphere and isolates were identified by MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Then the isolates were characterized by PCR Ribotyping using capillary gel electrophoresis and automated pattern recognition analysis (BioNumerics), by the detection of toxin genes (tcd A, tcd B, cdt A and B) using multiplex-PCR and by anaerobic resistance testing using E-test and agar diffusion assay.

A total number of 1301 anal swabs from 38 different nursing homes were included. Thereof 66 (5.1 %) were tested positive on *C. difficile*. Toxigenic ribotypes 001 (n=7, 10.6%), 014 (n=7, 10.6 %), 027 (n=5; 7.6 %), 126 (n=4, 6.1 %), 015 and 106 (n=3, 4.5 %) were predominantly found while other toxigenic ribotypes as 002, 003, 010, 018, 026, 043, 053, 073, 328 (n=2; 3.0 %) and 012, 017, 020, 024, 050, 070, 078, 140 226 (n=1, 1,5 %) sporadically occurred. The most abundant non-toxigenic ribotypes 010 and 140 were found in the present cohort: RT 010 (n=2, 3.0 %) and RT

140 (n=1, 1.5 %). 15.2 % of the isolates (n=10) could not be assigned to common ribotypes (non-classified).

54 of the ribotypes (81.8 %) were toxigenic and 12 (18.2 %) were non toxigenic. Out of the toxigenic 42 (63.6 %) tcd A and tcd B were positive and 12 (18.2 %) additionally carried cdtA and cdtB for the binary toxin.

One isolate was resistant to vancomycin (MHK median: 0.50 mg/l, range: 0.125-8) and one to metronidazol (MHK median: 0.38 mg/l, range: 0.125-256); twice were resistant to rifampicin. Antibiotic resistance to Moxifloxacin (MHK median: 1.0 mg/l, range: 0.125-32) and clarithromycin could be assigned to specific ribotypes.

The follow-up study resulted in 5 of 30 swabs were positive. Following ribotypes were found: RT 001, RT 010, RT 014, RT 073 and RT 106. 4 of the RT were persistent.

However, the predominant ribotypes included hypervirulent 027 strains and corresponded to the ribotypes in hospitals. Therefore asymptomatic carriers are not a particularly source to transmission of nosocomial ribotypes in their local environment.

2. Einleitung:

2.1. Erregercharakteristika

C. difficile ist ein gram-positives, sporenbildendes Stäbchenbakterium, welches unter anaeroben Bedingungen wächst. Durch die Fähigkeit Sporen zu bilden ist es besonders umweltresistent gegenüber Austrocknung, Wärme und gegen viele gängige Desinfektionsmittel.

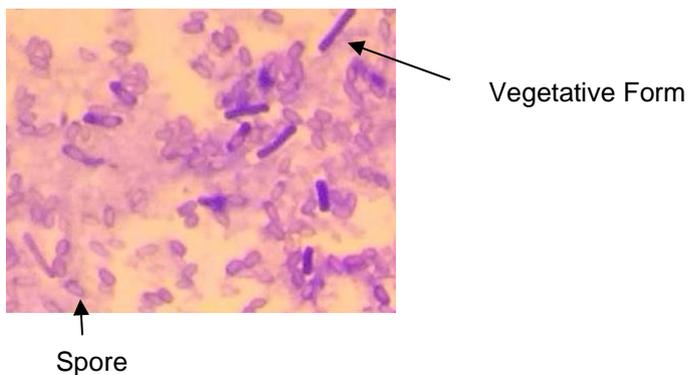


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. difficile*

Erstmals wurde *C. difficile* 1935 von Hall und O'Toole in der intestinalen Flora bei gesunden Neugeborenen beschrieben [1]. Erst 1978 wurde das Bakterium von Bartlett und Kollegen als Auslöser der pseudomembranösen Kolitis (antibiotikaassoziierte Kolitis) identifiziert [2].

Es kommt ubiquitär in der Umwelt (im Boden, Oberflächenwasser) sowie im Darm von Menschen und Tieren vor und wird fäkal-oral als Spore aufgenommen. Der Kontakt mit Gallensäure erleichtert das Entkapseln der Sporen im Darm [12]. Auch asymptomatische Träger scheiden die Sporen in geringer Menge aus und können so wiederum andere Menschen anstecken. Die Sporen werden im Krankenhaus durch die Umgebung oder durch das medizinische Personal übertragen und können dann zur *Clostridium difficile*-Infektion (CDI) führen [3]. Bei Neugeborenen und Kindern wird eine Besiedlung von 2 % bis 80 % beschrieben [4, 57], wohingegen eine asymptomatische Besiedlung bei Erwachsenen deutlich geringer ausfällt, aber in verschiedenen Studien von weniger als 2 % bis zu 15 % variiert [5, 6, 7, 8, 35].

Pathogenität

C. difficile besitzt die Fähigkeit Toxine zu bilden. Darüber hinaus gibt es Stämme, die kein Toxin produzieren und deshalb als apathogen gelten. Die toxigenen Stämme produzieren das Enterotoxin A (tcd A) und das Cytotoxin B (tcd B) (codiert auf dem Pathogenitätslocus PaLoc). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren Stämme entdeckt, die das binäre Toxin (tcdA, tcdB, cdt A, cdt B) besitzen, z.B. Ribotyp 027, welches eine Mutation im Toxinrepressorgen tcdC trägt [9]. Die Toxine führen zu einer Unterbrechung des Aktinzytoskeletts und der Tight Junctions mit der Folge der Zerstörung des intestinalen Epithels. Dadurch werden Zytokine frei, die zu einem Einwandern von Entzündungszellen führen. In der Folge kommt es zur Flüssigkeitssekretion (Diarrhoe), intestinale Entzündung und Einwanderung von Neutrophilen [10].

Risikofaktoren

Die Inzidenz der durch *C. difficile* verursachten Diarrhoe im Krankenhaus liegt bei 5-21 %, wobei 7-25 % der Patienten besiedelt sind ohne Symptome zu zeigen [11, 12, 13]. Seit Beginn 2000 wird von einer steigenden Zahl schwerer CDI Verläufe in den USA, Kanada und Europa berichtet [10, 14-18].

2005 konnte ein neuer Stamm identifiziert werden: RT 027 (in Amerika: NAP1) [10]. Dieser wird, bedingt durch sein binäres Toxin, u.a. für die schweren Verläufe verantwortlich gemacht, wobei noch nicht abschließend geklärt werden konnte, welchen Einfluss das binäre Toxin auf den Krankheitsverlauf und auf die Schwere der Erkrankung hat [10, 32].

Als Risikofaktoren gelten:

- Krankenhausaufenthalt,
- Antibiotikatherapie,
- fortgeschrittenes Alter,
- Komorbiditäten,
- gastrointestinale Grunderkrankungen,
- intestinale Eingriffe [11, 12, 13, 24, 35]

Besonders häufig tritt die antibiotikaassoziierte Diarrhoe nach der Therapie mit Clindamycin, Breitbandpenicillinen, Cephalosporinen, Flourchinolonen und Makroliden auf [19-23,34]. Aber ebenso jede andere Art von Antibiotikatherapie, auch die prophylaktische Therapie vor operativen Eingriffen, kann eine

antibiotikaassoziierte Diarrhoe auslösen [13]. Durch den Einsatz des eigentlich therapeutisch wirksamen Antibiotikums gegen *C. difficile*, Vancomycin kann es ebenfalls zur CDI kommen [26]. Lediglich die vegetative Form wird dabei abgetötet, die Sporen aber bleiben erhalten. Nach dem Absetzen der Therapie kann es zur Auskeimung der verbleibenden Sporen kommen. Gelegentlich tritt die antibiotikaassoziierte Diarrhoe auch bei Chemotherapie von Tumoren mit Methotrexat und Paclitaxel auf [13].

Protonenpumpenhemmer (PPI) kommen als Risikofaktor in Frage, werden aber in weltweiten Studien kontrovers diskutiert. Nur die Sporen, nicht das Bakterium selbst, sind säurestabil und können die Magenpassage überstehen. Durch PPI wird der pH-Wert der Magensäure herabgesetzt, wodurch das Bakterium selbst die Passage überstehen und im Darm kolonisieren könnte [12, 25, 27, 28, 34, 77]. Da im Krankenhaus häufig Antibiotika in Kombination mit PPI gegeben werden, ergibt sich hier ein additiver Effekt beider Medikamente, wobei den Antibiotika die weitaus größere Rolle in der Entstehung von CDI zukommt [12, 25]. Nicht-steroidale Antiphlogistika stehen ebenfalls im Verdacht eine CDI zu begünstigen [33, 34].

Besonders problematisch sind die Rezidive der CDI zu bewerten. In verschiedenen weltweiten Studien wurden Rezidivraten zwischen 5-47 % beschrieben [12]. Eine große europäische Studie konnte zeigen, dass die Rezidivrate in Europa bei 18 % liegt [29].

Zu den Risikofaktoren eines Rezidivs gehören:

- fortschreitendes Alter > 65 Jahre
- Störung der Darmflora
- unzureichende Antikörperbildung gegen die *C. difficile*-Toxine
- Therapie mit PPI während der Erstinfektion mit *C. difficile*
- länger andauernder Krankenhausaufenthalt
- Fortsetzung der Antibiotikatherapie (nicht *C. difficile* spezifisch) nach Diagnose *C. difficile* [12, 24, 30, 31]

Die regelrechte Darmflora, bestehend aus verschiedenen Bakterien, stellt bei gesunden Menschen eine natürliche Barriere für pathogene Keime da, was als „Kolonisationsresistenz“ bezeichnet wird. Ist der Darm besiedelt von *C. difficile*, ob als Erstmanifestation oder als Rezidiv, ist die gesunde Darmflora gestört. Dies kann schneller zu einem Ausbruch von *C. difficile* und somit zur Infektion führen.

Klinische Manifestation

Das klinische Bild der CDI ist sehr breit. Es reicht von leichten Durchfällen bis hin zu schweren Verläufen wie der pseudomembranösen Kolitis, dem toxischen Megakolon, der Perforation des Kolons mit septischem Schock, Multiorganversagen oder dem Tod [6, 36].

Am Anfang der Infektion besteht meist nur eine leichte Schmerzsymptomatik und es kommt zu Durchfall mit typisch süß-fauligem Geruch mit bis zu 10 Stuhlentleerungen pro Tag [38].

Die milden Verläufe präsentieren sich mit subfebrilen Temperaturen, wässrig-breiigen Stühlen und abdominalen Krämpfen [36, 37]. Oft besteht leichter lokaler Druckschmerz im linken Unterbauch.

Bei den schweren Verläufen tritt typischerweise die pseudomembranöse Kolitis begleitet von Fieber, Leukozytose, Hypoalbuminämie und C-reaktives Protein-Erhöhung auf. Das Verschwinden der Darmperistaltik, ein akut auftretender Stuhlverhalt, eine extreme Leukozytose und hohes Fieber gehören zu den Zeichen einer komplizierten CDI [15, 37, 38].

Die Sterblichkeit bei einer *C. difficile*-Infektion schwankt zwischen 3-30 %, wobei im Durchschnitt die Rate bei etwa 5-10 % liegt [36, 37].

Therapie

Die Behandlung der CDI richtet sich nach der Schwere der Infektion. Für die Wahl des geeigneten Antibiotikums wird die milde von der schweren Infektion unterschieden sowie das erstmalige Auftreten eines Rezidivs von multiplen Rezidiven. Für die Therapie stehen vor allem Metronidazol und Vancomycin zur Verfügung.

Milde Verläufe:

Bei den milden Verläufen weist Vancomycin bessere Heilungschancen auf als Metronidazol (beides jeweils per os): 98 % vs. 90 % [41]. Andere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass Vancomycin eine bessere Wirksamkeit aufweist, insgesamt waren die Heilungschancen in dieser Studie jedoch niedriger. Sie lagen bei nur 79 % und 71 % [40]. Trotzdem wird Metronidazol bevorzugt, da bei Vancomycin ein Problem mit der Entwicklung der VRE besteht [39, 41].

Metronidazol wird über 10 Tage mit einer Dosierung von 3 x 500 mg und Vancomycin mit einer Dosierung von 4 x 125 mg gegeben, beides per os. Sofern der Patient bereits ein Antibiotikum erhalten hat, sollte dieses abgesetzt und der Patient für 48

Stunden beobachtet werden [39, 40]. Es existieren neben den beiden gängigen Antibiotika weitere Behandlungsmöglichkeiten: Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, Probiotika sowie die Möglichkeit die Toxine im Darm zu binden. Von diesen Therapien wird aber abgeraten bzw. es bestehen nur bedingte Empfehlungen, da es hierzu noch keine hinreichenden Belege bezüglich der Wirksamkeit in Studien gibt [39, 40].

Schwere Verläufe:

Folgende laborchemische Hinweise gelten richtungsweisend für schwere Verläufe:

- Leukozytose ($> 15000/\mu\text{l}$),
- Hypalbuminämie ($< 30 \text{ g/L}$)
- Kreatinin-Erhöhung ($> 1,5 \text{ mg/dl}$) [15, 39]

Hier sollte eine orale Therapie mit Vancomycin 4 x 125 mg für 10 Tage erfolgen. Alternativ ist seit Januar 2013 Fidaxomicin (Makrozyklin) in Deutschland für die Behandlung der CDI zugelassen (2 x 200 mg für 10 Tage p.o.). Besonders bei Patienten mit mehreren Risikofaktoren kann eine Therapie mit Fidaxomicin von Vorteil sein, da hier die Rezidivrate geringer ist. Beide Medikamente haben ein vergleichbares Ansprechen der Behandlung [39, 73].

Zu den Komplikationen der schweren CDI gehören:

- Perforation des Kolons
- Toxisches Megakolon
- akutes Abdomen
- schwerer Ileus [39, 40, 45]

Hierbei ist die komplette Kolektomie mit endständigem Ileostoma die Therapie der Wahl. Diese sollte möglichst früh erwogen werden, da es sonst zu einem Therapieversagen mit Todesfolge kommen kann [39, 40]. Die Rückverlegung des Ileostomas gelingt nur bei einer geringen Anzahl der betroffenen Patienten (20 %) [39, 74]. Ein anderer möglicher Ansatz ist die Anlage eines doppelläufigen Ileostoma mit Kolonlavage kombiniert mit zusätzlicher Antibiotikatherapie (Vancomycin wird antegrad direkt in den Kolon gegeben und Metronidazol zusätzlich intravenös) [40].

Rezidive:

Beim ersten Rezidiv wird mit Vancomycin 125 mg (10 Tage p.o.) oder mit Fidaxomicin 200 mg (10 Tage p.o.) behandelt.

Problematisch ist es bei Patienten mit schweren bzw. wiederholten Rezidiven. Hier beinhaltet die Therapie neben der antibiotischen auch eine nicht-antibiotische Behandlung.

Bei der antibiotischen Therapie kommt Vancomycin 4 x 125 mg (10 Tage p.o.) mit anschließender Pulstherapie für mindestens 3 Wochen oder mit anschließendem Reduktionsschema für ca. 5 Wochen zum Einsatz. Alternativ kann auch Fidaxomicin 2 x 200 mg für 10 Tage oral verabreicht werden.

Die nicht-antibiotische Therapie beinhaltet die Stuhltransplantation (Mikrobiom) d.h. Stuhl wird dem Empfänger von einem geeigneten Spender transplantiert. Dies sollte nur von erfahrenen Zentren übernommen werden. Für Patienten mit multiplen therapieresistenten Rezidiven ist dies eine mögliche Therapieoption [39, 40].

Auch hier kann der Versuch mit Probiotika und passiver Immuntherapie gemacht werden; wird aber nicht von den Leitlinien empfohlen.

Für den Fall, dass die Antibiotika oral nicht verabreicht werden können, kann Metronidazol 500 mg für 10 Tage intravenös gegeben werden [40].

Prävention

Ein restriktiver Einsatz von Antibiotika hat gezeigt, dass das Risiko für eine CDI reduziert werden kann [59, 60].

Da die alleinige alkoholische Händedesinfektion die Sporen nicht abtötet, wird das Waschen der Hände mit warmen Wasser und Seife empfohlen um die Sporen mechanisch zu entfernen.

Symptomatische Patienten sollten in Einzelzimmern mit eigenem Nassbereich isoliert werden. Kontaminierte Gegenstände (Bettgestell, Türklingen) sollten täglich desinfiziert werden (bevorzugt mit z.B. Peressigsäure oder Natrium-Hypochlorit). Das Tragen von Schutzkitteln und Einmalhandschuhen wird empfohlen, diese sollten nach Möglichkeit vor Verlassen des Patientenzimmers entsorgt werden [59].

2.2. Diagnostik

Für die Diagnostik in der Klinik sollten nur symptomatische Patienten berücksichtigt werden. Nachuntersuchungen nach erfolgreicher Behandlung werden nicht empfohlen. Eine asymptomatische Besiedlung hat keine Bedeutung in der Diagnostik und dient nur dem wissenschaftlichen Zweck [59].

Die Stühle müssen frisch sein, da die Toxine bei Raumtemperatur zerfallen. Deshalb sollten die Proben innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme verarbeitet werden. Bei 2-8 °C ist eine Lagerung für 3 Tage möglich. Bei -80 °C können sie längere Zeit aufbewahrt werden, sollten aber nicht zu häufig aufgetaut und wieder eingefroren werden [55]. Am besten eignen sich ungeformte, wässrige Stühle [56]. Die schnelle Stufendiagnostik ist von besonderer Bedeutung im klinischen Alltag um mit einer adäquaten Therapie reagieren zu können. Die Testverfahren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Schnelligkeit.

Glutamat-Dehydrogenase-(GDH)Antigentest

Als sensitiver und schneller Screeningtest im klinischen Alltag eignet sich der GDH-Antigentest. Dieser unterscheidet aber nicht zwischen toxischen und nicht-toxischen Stämmen. Aufgrund dieser geringen Spezifität muss er mit weiteren Tests bestätigt werden.

Kultur

Die anaerobe Anzucht auf speziellen Nährböden z.B. Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar gilt als Goldstandard, da dieser Test eine hohe Sensitivität aufweist. Dies kann als Bestätigungstest genutzt werden. Die Bebrütungszeit beträgt 24-48 Stunden, weshalb die Kultur in der Akutdiagnostik nur eingeschränkt gebraucht wird. Die Kolonien erscheinen flach, gelb und ausgefranst, die einen typisch faulen Geruch besitzen [57]. Da auch andere *Clostridium*-Spezies z.B. *Clostridium innocuum* auf dem Agar wachsen können, müssen weitere Test angeschlossen werden [57]. Zur weiteren Differenzierung und Bestätigung der kulturellen Anzucht wurde in dieser Arbeit der MALDI-TOF(Bruker Daltonics) genutzt.

Für die Antibiotikaresistenztestung und die Ribotypisierung ist die kulturelle Anzucht Voraussetzung. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit bei der kulturellen Anzucht von *C. difficile* und der einfachen Durchführung wurde die Kultur zum Nachweis als

Testverfahren für diese Arbeit ausgewählt. Dazu wurde ein Selektivmedium (Chrom-Agar) verwendet.

Zellkultur-Zytotoxizitätstest

Der Nachweis erfolgt über sterilfiltriertem Stuhlüberstand mit Hilfe einer Zellkultur. Nach dem Beimpfen wird diese inkubiert (> 24 Stunden). Als Ergebnis einer positiven Zellkultur bilden sich charakteristische Rundzellen aus. Dieser Test gilt als Goldstandard für den Nachweis toxin-bildender *C. difficile*-Stämme, wird aber selten angewandt, da er wenig standardisierbar und sehr zeitaufwendig ist [12].

Toxin-Immunoassay

Als weiterer Bestätigungstest eignet sich der Nachweis der Toxine A (tcdA) und B (tcdB). Dieser beruht auf dem enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA). Das Ergebnis liegt nach wenigen Stunden vor. Es muss aber mit einer geringeren Sensitivität als beim Zytotoxizitätstest gerechnet werden. Da einige Stämme nur Toxin B (tcdB) produzieren (1-2 %), muss immer auf beide Toxine getestet werden. [56, 57, 59].

Aufgrund des hohen Aufwandes und der geringeren Empfindlichkeit im Vergleich zur kulturellen Anzucht wurde in dieser Arbeit auf beide Verfahren verzichtet. Stattdessen fand eine Identifizierung der Keime im Rahmen der Genotypisierung mit Hilfe der Multiplex-PCR und der Ribotypisierungs-PCR statt.

Ribotypisierung

Zur weiteren Differenzierung wird die Genotypisierung mit Ribotypisierungs-PCR oder die surface-layer protein A Sequenzierung vorgenommen sowie die Multiplex-PCR. Damit können die einzelnen Ribotypen und entsprechende Toxingene bestimmt werden.

Antibiotikaresistenztestung

Die Antibiotikaresistenztestung kann Hinweise auf das Vorliegen hochvirulenter Stämme z.B. RT 027 geben. Dieser zeigt in der Regel spezifische Resistenzmuster gegen Makrolide und Flourchinolone. Der Test beruht auf der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Boulliondilution, Agardilution oder

E-Test [58]. Dieses Verfahren detektiert Resistenzentwicklungen. Der E-Test wurde in Hinblick auf die Resistenzsituation im Saarland ausgewählt.

MALDI-TOF:

Der MALDI-TOF wird mittlerweile häufig in der Routinediagnostik für Bakterien und Pilze eingesetzt. Mit seiner Hilfe können schnell Ergebnisse erzielt werden. In dieser Arbeit wurde diese Testverfahren zur Bestätigung der kulturellen Anzucht genutzt. Somit konnte im zeitlichen Verlauf der Laborarbeit ein Lerneffekt im Hinblick auf die Differenzierung des morphologischen Aussehens von *C. difficile* gegenüber anderen auf der Kultur gewachsenen Bakterien erzielt werden.

2.3. Epidemiologie

Seit Anfang 2000 wird eine zunehmende Zahl von CDI in Nordamerika beobachtet. In Quebec, Kanada konnte in einer großen Studie gezeigt werden, dass die Inzidenz von CDI von 35,6 pro 100.000 Einwohner (1991) auf 156,3 pro 100.000 Einwohner (2003) gestiegen ist. Komplizierte Verläufe stiegen von 7,1 % (1991) auf 18,2 % (2003) [15].

Auch in den USA ist ein Anstieg zu verzeichnen. 2000 lagen weniger als 150.000 Fälle im Jahr vor. 2006 stieg die Zahl auf 300.000 Fälle pro Jahr und 2009 auf 500.000 [10, 43].

In Deutschland wird ebenfalls eine steigende Anzahl von CDI-Fällen beobachtet.

In Sachsen schwankte die Zahl der CDI-Fälle 2002/2003 zwischen 1,7 bis 3,8 pro 100.000 Einwohner und stieg 2006 auf 14,8 Fälle pro 100.000 Einwohner an. Sachsen ist das einzige Bundesland mit bestehender Meldepflicht (milde Verläufe werden somit in die Gesamtanzahl auch mit eingerechnet) und dient somit als guter Vergleichsparameter gegenüber andern Ländern [39, 44, 45]. In den übrigen Bundesländern Deutschlands lag die Zahl zwischen 0,7 pro 100.000 Einwohner und 2,9 pro 100.000 Einwohner [45].

Der Anstieg wird vor allem mit der Ausbreitung des hochvirulenten Ribotyps 027 in Zusammenhang gebracht. In vielen Teilen Deutschlands ist dieser mittlerweile präsent und die Anzahl nimmt laufend zu. Der erste CDI Fall mit Todesfolge verursacht durch RT 027 wurde in Stuttgart im Jahr 2007 nachgewiesen [46]. Der erste Ausbruch von RT 027 wurde 2007 in Rheinland-Pfalz (Trier) beschrieben [47, 49].

Eine deutschlandweite Studie in 84 Krankenhäusern ergab 2008, dass 8 % der *C. difficile*-Stämme RT 027 waren [48]. In Hessen lag die Anzahl der RT 027 in Krankenhäusern bei 26,6 % (2011 bis 2013) [49].

Epidemiologie im Alters- und Pflegeheimen

An Bedeutung gewinnt *C. difficile* auch zunehmend in Alters- und Pflegeheimen. Immer wieder wird in Altersheimen über Ausbrüche in verschiedenen Ländern weltweit berichtet [50, 53, 54]. Ältere Patienten haben ein höheres Risiko sich zu infizieren als Jüngere. Dies liegt einer verminderten Immunoseneszenz, einem gehäuften Vorkommen von Komorbiditäten, der veränderten Inestinalflora im Alter sowie dem häufigeren Gebrauch von Antibiotika zu Grunde [50, 51, 52, 65].

In den wenigen Studien über die Situation der *C. difficile* Besiedlung/CDI in Alters- und Pflegeheimen schwanken die Zahlen innerhalb der Länder erheblich.

In den USA wurden Werte von über 50 % getestet. Während in Maryland, Virginia und Ohio die Werte zwischen 46,1 % bis 51,5 % lagen, waren sie in New York und Pennsylvania deutlich geringer: zwischen 0,52-0,67/10.000 Bewohner und 0,04-0,028/1000 Bewohner [3, 61-65]. In Frankreich waren 2,39/10.000 Bewohner mit *C. difficile* besiedelt [66] und in Schottland ergab sich eine Prävalenz von 0,80 % [67]. Hier sind aber vor allem die symptomatischen Infektionen in Heimen untersucht worden, weniger die rein asymptomatische Besiedlung.

Bei der asymptomatischen Besiedlung erreichte Irland einen Wert von 10 % [68].

In Hessen/Deutschland ergab eine Studie von 2011, dass 4,6 % der Altersheimbewohner und 0,8 % der Normalbevölkerung *C. difficile* positiv waren, obwohl diese keine Symptome zeigten. Häufigster Ribotyp war RT 001 und RT 014. Der hypervirulente Stamm 027 wurde nicht gefunden [50].

Insgesamt ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien jedoch eingeschränkt, da sie sich in der Fragestellung, den Methoden und der Probenanzahl erheblich unterscheiden [65]. Außerdem wurde in vielen Studien die CDI untersucht und nicht die rein asymptomatische Besiedlung. Dies war lediglich in Hessen, in Irland, in Australien und in Ohio der Fall. Da Altenheimbewohner häufiger ins Krankenhaus kommen, besteht dort eine mögliche Ansteckungsquelle. Mylotte et al. fanden heraus, dass 2/3 der CDI 30 Tage nach Krankenhausaufenthalt auftraten [63, 65].

Tabelle 1: Übersicht über die Prävalenzen von *C. difficile*-Besiedlung und CDI-Fällen in Alters- und Pflegeheimen zu unterschiedlichen Zeiten; nach Rodriguez et al [65]. Fett unterlegt und mit A gekennzeichnet sind die Studien, in denen die asymptomatische Besiedlung untersucht wurde

Land	Wohnstätte Bewohner	der	<i>C. difficile</i>	%/asymptomatische Besiedlung (A)	CDI- Fälle	Haupt- RT	Durchschnitts alter (in Jahren)	Zeit- raum	Referenzen
Deutschland/H essen	Altenheime		11/240	A 4,6	1	RT 014 RT 001	83	2010- 2011	Arvand et al. [50]
Frankreich	Altenheime		2,39/10.000 Aufenthalts- tage	0,02	25	RT 027	80	2006- 2009	Birgand et al. [66]
Schottland	Pflegeheime		19/2385	0,80	19	-	> 65	2008- 2009	Marwick et al. [67]
Irland/Cork	Pflegeheime		10/100	A 10,0	0	-	82	-	Ryan et al. [68]
Australien/ Melbourne	Pflegeheime		1/119	A 0,84	0	-	79		Stuart et al. [69]
USA/Marylan d	Langzeitpflege für Ältere		119/258	46,12	119	-	78	2005- 2010	Garg et al. [61]
USA/New York	Altenheime		0,52- 0,67/10.000	-	102	-	83	2009- 2011	Mylotte et al. [63]
USA/ Virginia	Altenheime		235/489	48,06	225	RT 027	-		Boone et al. [62]
USA/ Pennsylvania	Langzeitpflege Veteranen		0,04- 0,028/1000	-	66	-	77	2004- 2009	Kim et al. [64]
USA/Ohio	Altenheime		1,7- 2,9/10.000	-	11.20 0	-	-		Campbell et al. [70]
USA/Ohio	Langzeitpflege		35/68	A 51,5	5	RT 027	70		Riggs et al. [3]
USA/ Rhode Island	Altenheime		11/172	6,40	11	-	81,4-85,8		Rotjanapan et al. [71]
Canada/ Ontario	Altenheime		-	2,1-8,1	-	-	-	-	Simor et al. [51]

2.4. Zielsetzung

Obwohl die Anzahl der CDI-Fälle in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen hat und trotz des hohen Risikoprofils der Altersheimbewohner gibt es wenige Untersuchungen auf diesem Gebiet. Mit Hilfe des regionalen MRSAar-Netztes konnte mit dieser Arbeit ein Überblick über die Prävalenz und das epidemiologische Auftreten von *C. difficile* in Alters- und Pflegeheimen bei asymptomatischen Bewohnern erbracht werden.

Der Gedanke dabei war, dass hochvirulente Stämme von *C. difficile* leicht durch asymptomatische Träger verbreitet werden können. Diese Träger sind im Falle einer antibiotischen Therapie potentielle Risikopatienten für CDI und gleichzeitig mögliche Ansteckungsquelle innerhalb der Heime und bei Verlegung in Krankenhäuser für andere Bewohner, Patienten und das Personal. Durch die Übertragung auf das Personal kann ein Kreislauf entstehen und eine zunehmende Inzidenz ist zu befürchten.

Durch den zeitlichen Verlauf dieser Studie konnte eine Unterscheidung zwischen persistenten und sporadischen Stämmen erbracht werden besonders im Hinblick auf die hochvirulenten RT.

Als empfindliche Methode zur Typisierung der Keime wurde die anaerobe Kultur gewählt. Anschließend fand eine genotypische Differenzierung mittels Multiplex-PCR und Ribotypisierungs-PCR statt um das Keimprofil zu ermitteln. Vervollständigt wurde das Protokoll durch die Antibiotikaresistenztestung der einzelnen Stämme.

Durch die statistische Auswertung mittels „fisher exact test“ konnte der Signifikanzwert der klinischen Daten errechnet und die besonderen Risikofaktoren ermittelt werden.

3. Methoden und Materialien:

3.1. Studienproben

Es wurden 65 von 136 Alters- und Pflegeheime im Saarland im Rahmen des MRSAar-Netzes in die Studie einbezogen. Davon konnten 38 Alters- und Pflegeheime ausgewertet. Um teilzunehmen mussten Analabstriche von den Bewohnern genommen werden, die abgeholt und im Kühlhaus bei 2-8°C gelagert wurden.

Insgesamt konnten aus den 38 Heimen 1301 Abstriche gewonnen werden. Zum Zeitpunkt der Studie belief sich die Zahl der Bewohner auf 2508 Personen, verteilt auf die 38 Heime. Die Belegung war in diesen Heimen mit 95 % fast ausgelastet.

Von 4 Alters- und Pflegeheimen fehlten die Angaben zur Belegung zum Entnahmezeitpunkt.

Für Verlaufswerte wurden nach einem Jahr Kontrollabstriche genommen. Dafür nahmen 30 Bewohner ein zweites Mal an dieser Studie teil.



Abbildung 2: Foto eines Analabstriches (Rektalabstrich)

3.2. Klinische Datenerhebung

Zusätzlich zu den Stuhlproben wurden bei den Bewohnern mit Hilfe eines standardisierten Erhebungsbogens Angaben zum Alter, Geschlecht, zur Demenz, Durchfall in den letzten drei Monaten, Infektionen des Gastrointestinaltraktes, zum Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage) und zu *C. difficile* im Vorbefund erfragt, um diese später als mögliche Risikofaktoren bestimmen zu können. Diese Angaben wurden nur nach Zustimmung der Bewohner erfasst und fehlen daher bei einigen.

3.3. Anzucht

Zur kulturellen Anzucht wurden Chrom-Agar-Platten speziell für *C. difficile* von MAST DIAGNOSTICA verwendet (CHROMagar *C. difficile*). Diese wurden von der Nährbodenküche des mikrobiologischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes angelegt und bestanden aus einer Basis (Ref.: X151 B) und einem Supplement (Ref.: X151 S). Ein Paket beinhaltete immer 5000 ml *C. difficile* Basis und 5 x 1000 ml gefriergetrocknete Ampullen *C. difficile* Supplement.

Zusammensetzung:

- Agar: 15,0 g/L
- Peptonextract: 25,0 g/L
- Hefeextract: 25,0 g/L
- NaCL/Mineralsalze: 9,0 g/L
- Wachstumsfaktoren: 4,0 g/L
- Chromogener/selektiver Mix: 2,1 g/L

pH: 7,8 +/- 0,2

Die Basis musste bei 15-30°C, d.h. Zimmertemperatur, und das Supplement bei 2-8°C, d.h. Kühlschrank/Kühlhaus, gelagert werden.

Anleitung zum Anlegen der Agarplatten:

Basis: 54,8 g der Basis wurden mit 1 Liter gereinigtem Wasser gemischt bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte. Um dies zu erreichen musste das Gemisch langsam geschwenkt werden. Es sollte eine zähe Masse entstehen. Als nächster Schritt erfolgte das Erhitzen: bei 100°C wurde die Masse zum Kochen gebracht (cave: nicht heißer werden lassen als 100°C), um dann im Wasserbad auf 45-50°C abgekühlt zu werden.

Supplement: 1 Ampulle *C. difficile* Supplement musste mit 3 ml sterilem Wasser rehydriert und so lange gerührt werden bis es sich komplett auflöste (cave: das Gemisch aus Supplement und sterilem Wassers darf nur am gleichen Tag der Herstellung verwendet werden).

Der nächste Schritt, nach dem Umrühren, bestand darin 3 ml vom hergestellten Supplement mit der abgekühlten Basis zu mischen. Es musste ca. 1-2 Minuten gerührt werden bis eine homogene Masse entstanden ist.

Die sterilen Petrischalen wurden daraufhin mit der entstandenen Masse befüllt (siehe Anhang Abbildung 22).

Die fertigen Agar-Platten konnten bei 2-8°C bis zu 2 Monate gelagert werden.

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, hat die Agar-Platte ein ockerfarbenes Aussehen. Der Geruch der nativen Platte erinnert an Maronen und riecht süßlich.

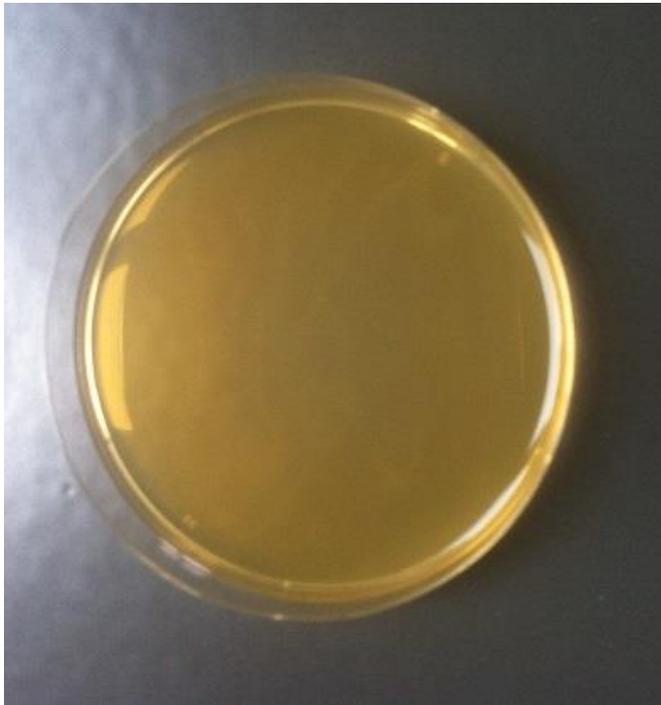


Abbildung 3: Foto einer nativen Chrom-Agar-Platte mit typischem ockerfarbenem Aussehen

3.3.1. Kulturelle Anzucht

Zum Beimpfen der Agar-Platten wurde ein typischer 3-Ösen-Ausstrich mit einer Impföse vorgenommen. Die erste Ebene konnte mit dem Watteträger des Analabstriches direkt aus dem Röhrchen beimpft werden, damit genügend Material zur Anzucht gewonnen wurde.

Nach dem Ausstreichen wurden die Platten in AnaeroPack Rectangular Jar (Mitsubishi Gas Chemical Company) für 2-5 Tage bei $36\pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet, um anschließend beurteilt zu werden.

3.3.2. Erscheinungsbild der Kolonien

Die angezüchteten Kolonien waren etwa 1-2 cm groß, weißlich bis durchsichtig von der Farbe, rund mit radikulären Ausläufern oder mit wolkenartigem Aussehen. Der Geruch war stechend, aber charakteristisch.

Es wuchsen oft noch andere Kolonien, die klein, rund und weiß waren. Diese ließen sich als Enterkokken klassifizieren.

Desweiteren wurde oft *C. innocuum* gefunden, die ebenfalls 1-2 cm groß waren, aber weiß, rund, ohne Ausläufer und in der Mitte erhaben. Obwohl einige andere Bakterien auch auf der Platte wuchsen, konnte *C. difficile* letztendlich gut von diesen unterschieden werden.

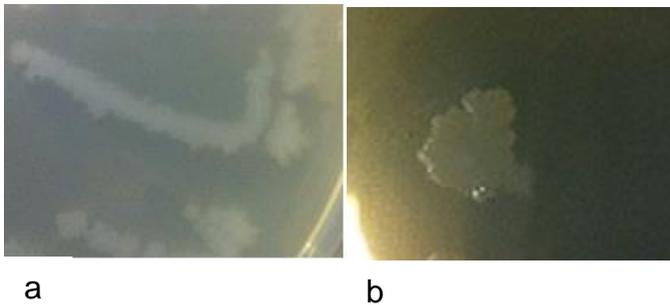


Abbildung 4 a, b: *C. difficile* Kolonien, unterschiedliches morphologisches Aussehen zweier *C. difficile*-Stämme, gewachsen auf der Chrom-Agar-Platte für *C. difficile*

3.4. Typisierung mit MALDI-TOF

3.4.1. Aufreinigung.

Der MALDI-TOF (Bruker Daltonics) kann nur mit reinen Kolonien arbeiten, weshalb unbedingt eine Reinkultur (d.h. nur *C. difficile* Kulturen) benötigt wurde. Deshalb war das Anlegen einer Iso-Platte (d.h. man legt eine weitere Platte nur mit *C. difficile* an) in einigen Fällen nötig.

Zur Aufreinigung wurden möglichst viele Kolonien mittels Impföse aufgenommen und mit 300 µl reinem Wasser in einem Microtube (1,5 ml) gemischt. Dazu kamen 900 µl 100 % Ethanol, die dann mit dem Vortexer gut durchmischt und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Der entstandene Überstand musste verworfen werden. Von Bedeutung war das am Boden entstandene Pellet. Dann wurde mit den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Erneut wurde der entstandene Überstand verworfen. Durch die Zugabe von 20 bis 50 µl 70 % Ameisensäure (formic acid), je nach Größe des Pellets, sollte die Membran der Bakterien aufgebrochen werden. Durch Auf- und Abpipettieren (ohne Blasenbildung) sollte eine gute Durchmischung gewährleistet werden. Nachdem das Gemisch maximal 4 Minuten geruht hatte, wurde Acetonitril in der entsprechenden Menge der Ameisensäure hinzugefügt. Nach erneutem Zentrifugieren entstand ein klarer Überstand, der auf ein spezielles Target (MSP 96 target polished steel microscout target) pipettiert wurde. Dazu war 1 µl Überstand nötig. Im nächsten Schritt wurde die gleichen Targetpositionen mit jeweils 1 µl Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)) bedeckt. Beide Substanzen mussten die Möglichkeit haben bei Zimmertemperatur zu trocknen.

Mittels eines Computerprogrammes (BioMérieux-Cassette Docking Station V1.2.0) wurden die entsprechenden Daten (Probennummern) eingegeben damit später eine Zuordnung der Proben möglich war. Mittels der Schnellauswertung des MALDI-TOFs konnten die neuen Proben mit den vorhandenen Bakterien abgeglichen und somit bestimmt werden (MALDI-Biotyper Echtzeit-Klassifikation).

3.4.2. Auswertung

Beim MALDI-TOF wird in einem Hochvakuum mit einem Laser auf die einzelnen Targetpositionen geschossen. Dadurch verdampfen die Probenproteine und ionisieren. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Die exakte Flugzeit kann gemessen werden (abhängig von der Masse und dem Ionisierungsgrad der Proben) und als Gesamtspektrum dargestellt werden. Es folgt ein Abgleich mit vorhandenen Datenbanken. Das Prinzip beruht auf den unterschiedlichen Massen der Bakterien [95].

3.5. Antibiotikaresistenztestung

Die Antibiotikaresistenztestung wurde mit Hilfe des Antibiotikagradiertest (E-Test) durchgeführt. Dafür musste möglichst viel Material gewonnen und mit Hilfe eines Wattestäbchens in 0,45 % Natrium Chlorid gelöst werden. Wichtig war es einen McFarland-Trübungsstandard von über 4 (Zelldichte: 12×10^8 Zellen) zu erreichen, d.h. dass eine hohe Zellzahl in der Flüssigkeit war, sodass diese sich langsam trübte. Dies ist von Bedeutung, da *C. difficile* sehr anspruchsvoll bei der kulturellen Anzucht ist und eine höhere Zelldichte das Anwachsen wahrscheinlicher macht. Nun wurde das Stäbchen in das Gemisch getaucht und auf Columbia-Platten (BD Columbia Agar mit 5 % Sheep Blood) in drei Ebenen ausgestrichen. Sorgfältiges und genaues Arbeiten war dabei sehr wichtig, da *C. difficile* auch hier sonst Schwierigkeiten beim Wachstum machte.

Getestet wurden die Antibiotika Vancomycin und Metronidazol, die therapeutisch von Interesse sind und Clarithromycin, Rifampicin und Moxifloxacin. Vancomycin, Metronidazol und Moxifloxacin waren E-Teststreifen. Anhand des entstandenen Hemmhofes konnte die minimale Hemmkonzentration direkt vom Teststreifen abgelesen werden. Mittels bestimmter Hemmkonzentrations-Kriterien konnte das Resistenzverhalten ermittelt werden (siehe Tabelle 2). Verwendet wurden die Werte nach EUCAST und nicht nach DIN. Somit konnte eine strengere Selektion vorgenommen werden. Clarithromycin und Rifampicin wurden als Plattendiffusionstest durchgeführt. Das Ergebnis ließ sich durch den Hemmhofdurchmesser und die vorher definierte Menge des Antibiotikums

bestimmen. Daraus ergab sich die Einteilung für sensibel und resistent. Die verwendeten Werte sind dazu aus Tabelle 3 zu entnehmen.

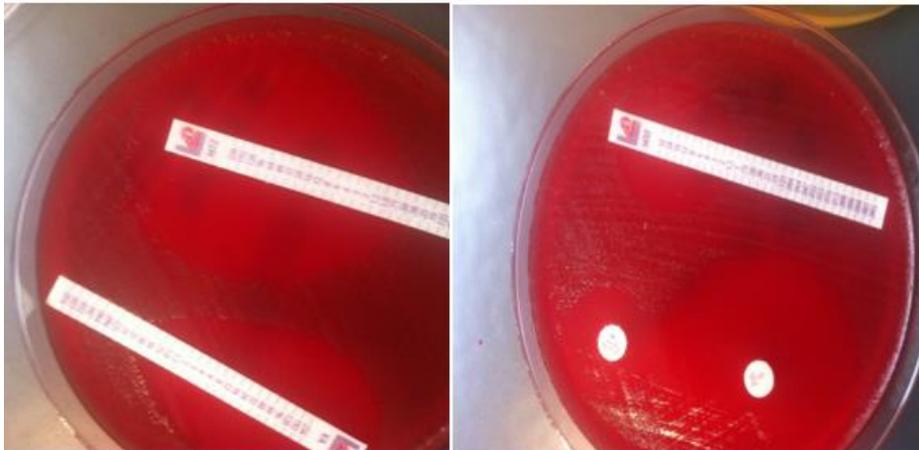


Abbildung 5: Foto der Antibiotikaresistenztestung auf Columbia-Platten; zu sehen sind die helleren Hemmhöfe bei den einzelnen Antibiotika

Tabelle 2: Darstellung der verwendeten Grenzwerte für die minimale Hemmkonzentration der einzelnen Antibiotika nach verschiedenen Normen

Antibiotika:	Minimale Hemmkonzentration (µg/ml):		Kriterien-Norm:
	Sensibel	Resistent	
Metronidazol	≤ 2	> 2	EUCAST
Vancomycin	≤ 2	> 2	EUCAST
Moxifloxacin	≤ 4	> 4	CLSI

Tabelle 3: Übersicht über die Konzentration beim Blättchentest für Clarithromycin und Rifampicin

Antibiotika	Menge (µg/Plättchen)	Hemmhof
Clarithromycin	15	Ja/Nein
Rifampicin	5	Ja/Nein

3.6. Genotypisierung

3.6.1. DNA Aufreinigung

Zuerst musste die DNA der Proben aufgereinigt und isoliert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Maxwell 16 MDx Instrument und des Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit (beides Promega). Mittels einer 1 µl Impföse wurde eine etwa 2 mm³ große Kolonie in den Lysepuffer eingebracht.

Dazu wurde das Programm „gesamt virale Nukleinsäure“ genutzt, dies beinhaltet: Lyse der Mikroorganismen, DNA-Bindung an paramagnetische Partikel, Trocknungsschritte und Eluierung der Zielmoleküle.

Die gewonnen DNA-Suspension wurde bis zu weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.6.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR läuft nach einem bestimmten Prinzip in 3 Phasen ab: Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation.

Denaturierung: Um die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufzubrechen erhitzt die PCR auf 94-96°C. Dies führt zu einer Trennung der DNA-Stränge. Der erste Zyklus läuft oft am längsten, damit kann sicher gestellt werden, dass alle Stränge einzeln vorliegen. Einige Polymerasen (sogenannte hot start Polymerasen) benötigen eine längere Zeit um aktiviert zu werden.

Primerhybridisierung: Als nächstes folgt eine Abkühlung auf 55-65°C für einige Sekunden, um das Anlagern der Primer zu ermöglichen. Die Temperatur variiert hier, da diese von der Länge und der Sequenz der Primer abhängt.

Elongation: Die entstandenen Lücken werden von der DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden aufgefüllt, beginnend am 3'OH-Ende. Die angelagerten Primer bleiben erhalten und bilden den Anfang des neuen Genabschnittes. Die dafür erforderliche Temperatur liegt bei etwa 68-72°C.

Am Ende des Programms kühlt der Thermocycler auf 4-8°C runter.

3.6.3. Multiplex-PCR

Die Toxine wurden mit Hilfe der Multiplex-PCR ermittelt. Der Vorteil hierbei ist, dass mehrere Primer zur Vervielfältigung mehrerer Genabschnitte eingesetzt werden können.

Dazu war ein bestimmter Ansatz aus Hotstart PCR Mastermix (1 x 12,5 µl), Primern für Toxingen A und B sowie für das binäre Toxin und die Glutamatdehydrogenase (tcdA-F3345, tcdA-F3969, tcdB-F5670, tcdB-R6079A, tcdB-R6079B, cdtA-F739A, cdtA-F739B, cdtA-R958, cdtB-F617, cdtB-R878, 908CLD_gluDs, 909CLD_gluDas; insgesamt sollte die Primerkonzentration bei 100 µmol liegen) und Nuklease-Free Water (1 x 9 µl) notwendig, sodass am Ende ein Ansatz mit einer Menge von 1 x 22,5 µl hergestellt wurde. Von den Proben war 2,5 µl DNA erforderlich, die mit 22,5 µl Ansatz gemischt wurden.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer und die dazugehörigen Sequenzen für die Toxinbestimmung der *C. difficile*-Stämme

Gentarget	Primername	Sequenz	bp
tcdA	tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	629
	tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
tcdB	tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	410
	tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	
	tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	
cdtA	cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	221
	cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	
	cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
cdtB	cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262
	cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	
GLDH	908CLD_gluDs	GTCTTGGATGGTTGATGAGTAC	158
	909CLD_gluDas	TTCCTAATTTAGCAGCAGCTTC	

Tabelle 5: Ablauf des zu wählenden Programmes des Thermocyclers für die Multiplex-PCR

Temperatur	Zeit	Durchläufe
95°C	15 min	1x
94°C	45 sec	35x
50°C	45 sec	
72°C	1 min	1x
72°C	10 min	
15°C	∞	

Als nächstes folgte die Bestimmung der Toxingene mit Hilfe einer 2 %igen Agarosegelelektrophorese (MP North American). Dazu wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese in Banden aufgetrennt.

2 µl SYBR Gold Mix und 5 µl Probe wurden gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Der Mix bestand aus SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, welches 1:100 mit Dimethylsulfoxid verdünnt wurde. 70 µl dieser Verdünnung wurden mit 1000 µl Loading dye (Fermentas) gemischt.

Bei jedem Durchlauf wurden eine Negativkontrolle (H₂O) und ein DNA-Leiter (Größenmarker) mitbestimmt.

Das Gerät wurde auf 100 Volt und 90 Minuten Laufzeit eingestellt. Am Ende konnte mit Hilfe des Gel Doc XR System (Bio-Rad) ein Abbild von dem Ergebnis gemacht werden.

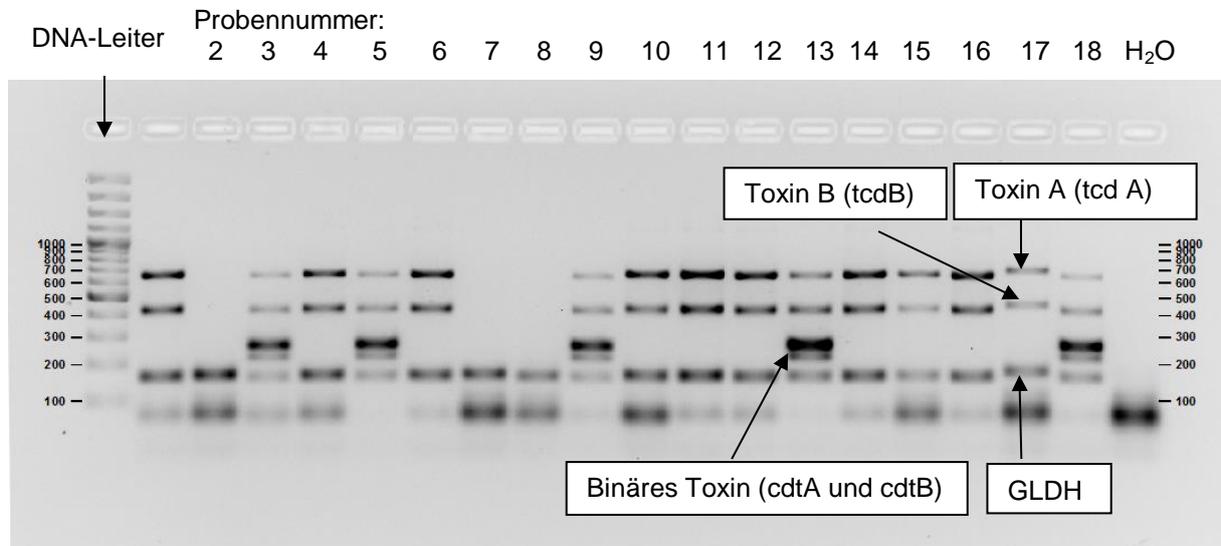


Abbildung 6: Ergebnis einer abgelaufenen Toxintestung; dargestellt ist das Toxin A, Toxin B, das binäre Toxin zu wie die Glutamatdehydrogenase

3.6.4. Ribotypisierungs-PCR

Hier wurde ebenfalls ein Ansatz benötigt. Dazu musste als erstes die DNA 1:10 vorverdünnt werden, d.h. 45 µl Nuklease-Free Water und 5 µl DNA wurden gemischt. Folgende Komponenten ergaben den Ansatz: Hotstart PCR Mastermix (1 x 12,5 µl), Primer 23 s (1 x 0,25 µl), Primer 16s BMN5 (1 x 0,25 µl) und Nuklease-Free Water (1 x 9 µl), insgesamt kam eine Menge von 22 µl heraus (die Primerkonzentration lag bei 100 µmol). Für die PCR wurden 22 µl Mix und 3 µl verdünnte DNA gemischt. Anschließend konnte die DNA des Gemisches aus Ansatz und Proben mit Hilfe des Thermocycler mit dem in Tabelle 7 gezeigtem Programm vervielfältigt werden.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Primer und ihren dazugehörigen Sequenzen für die Ribotypisierung der *C. difficile*-Stämme

Gentarget	Primername	Sequenz	bp
23S	23S	CCC TGC ACC CTT AAT AAC TTG ACC	200-600
16S	16S BMN5	GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT -BMN5	

Tabelle 7: Ablauf des zu wählenden Programmes des Thermocyclers für Ribotypisierungs-PCR

Temperatur	Zeit	Durchläufe
95°C	5 min	1x
92°C	1 min	26x
55°C	1 min	
72°C	1,5 min	1x
95°C	1 min	
55°C	45 sec	1x
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

Zur Erfolgskontrolle wurde eine Gelelektrophorese mit 1 %igem QA-Agarosegel™ (MP North American) durchgeführt. Dazu wurden ebenfalls 2 µl SYBR Gold und 5 µl Probe gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Neben den DNA-Proben liefen wieder eine Negativkontrolle und ein DNA-Leiter mit. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 100 Volt. Danach konnte eine Aufnahme mit Hilfe des Gel Doc XR System (Bio-Rad) gemacht werden.

Kapillarelektrophorese (Sequenzierung)

Nach der PCR kam die Sequenzierung der Proben. Das Prinzip der Sequenzierung ist eine vollautomatische Kapillarelektrophorese. Dazu mussten die Proben vorher 1:100 verdünnt werden.

Der Ansatz für die Sequenzierung bestand aus 0,5 µl GenomeLab DNA size standard Kit 600 und 240 µl Sample loading solution (Backmann Coulter). Beides wurde mit 2,5 µl der verdünnten Probe gemischt und einem Tropfen Mineralöl versiegelt und auf die 96-Well-Platte verteilt. Von dieser Platte saugte das Gerät das Probenmaterial in die Kapillaren an.

Aus den Banden wurden dann mit Hilfe der Software BioNumerics (Applied Maths) Peaks erstellt (Abbildung 7) und mit bereits bekannten Referenzstämmen verglichen. Den Vorgang kann man der Abbildung 8 entnehmen. Falls die getesteten Proben gleiche Peaks wie die bekannten Referenzstämmen aufwiesen, konnten sie den entsprechenden RT zu geordnet werden. Falls keine vergleichbaren Stämme im System vorhanden waren, wurden diese Stämme in der Arbeit als nicht klassifiziert bezeichnet.

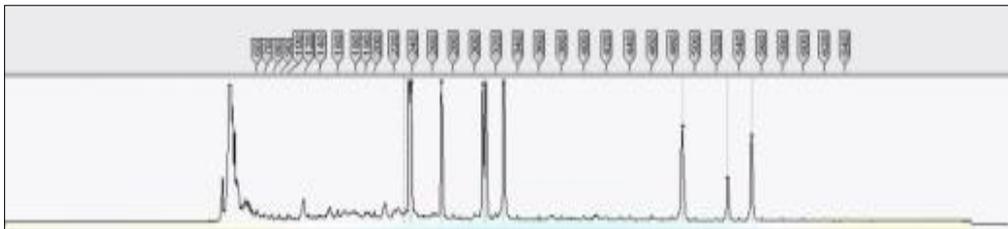


Abbildung 7: Prinzip einer Sequenz mit den charakteristischen Peaks; berechnet durch die BioNumerics (Applied Maths)

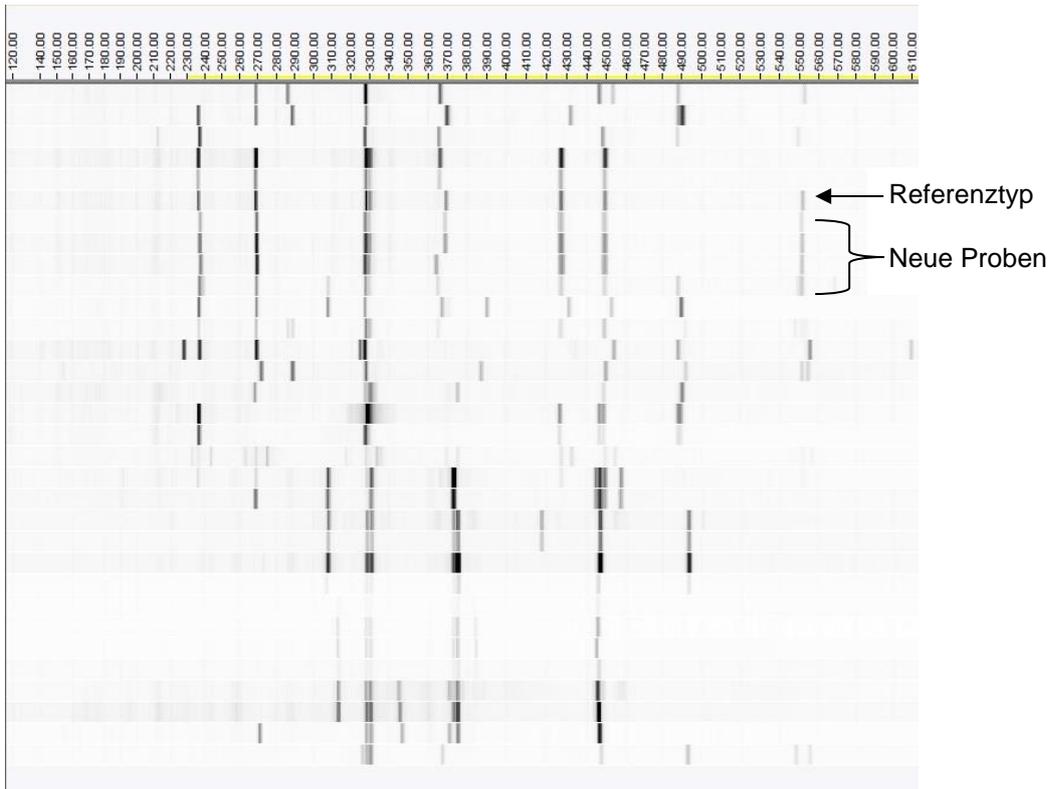


Abbildung 8: Comparison der getesteten Proben mit Referenzstämmen

4. Ergebnisse:

Von den 1301 Stuhlproben aus 38 Alters- und Pflegeheimen im Saarland wurden 66 positiv auf *C. difficile* getestet. Das macht einen prozentualen Anteil von 5,1 % aus. Von den 30 Kontrollproben im zweiten Umlauf waren 5 erneut positiv.

4.1. *Clostridium difficile* in verschiedene Altersklassen

In dieser Studie wurde eine Einteilung in 3 Altersklassen vorgenommen.

- < 65 Jahre
- 65-84 Jahre
- ≥ 85 Jahre

Bei den positiven Befunden befanden sich die meisten *C. difficile*-Besiedlungen in der Altersklasse zwischen 65-84 Jahren (n= 36, 54,5 %). Mit 34,8 % war die Altersklasse über 84 Jahre die zweithäufigste Gruppe (n= 23). Bei den < 65 Jahren waren lediglich 7 Probanden besiedelt (n= 7, 10,6 %).

Bei den negativen Befunden befanden sich in der Altersklasse über 84 Jahre mit 562 Teilnehmern die meisten Probanden (46,0 %). Die Altersklasse von 65 bis 84 Jahre war mit 544 Teilnehmern am Zweithäufigsten vertreten (44,5 %). Die Gruppe der unter 65-Jährigen war relativ gesehen ähnlich häufig vertreten wie in der Gruppe der positiven Befunde (n= 116, 9,5 %) (vgl. Abbildung 9).

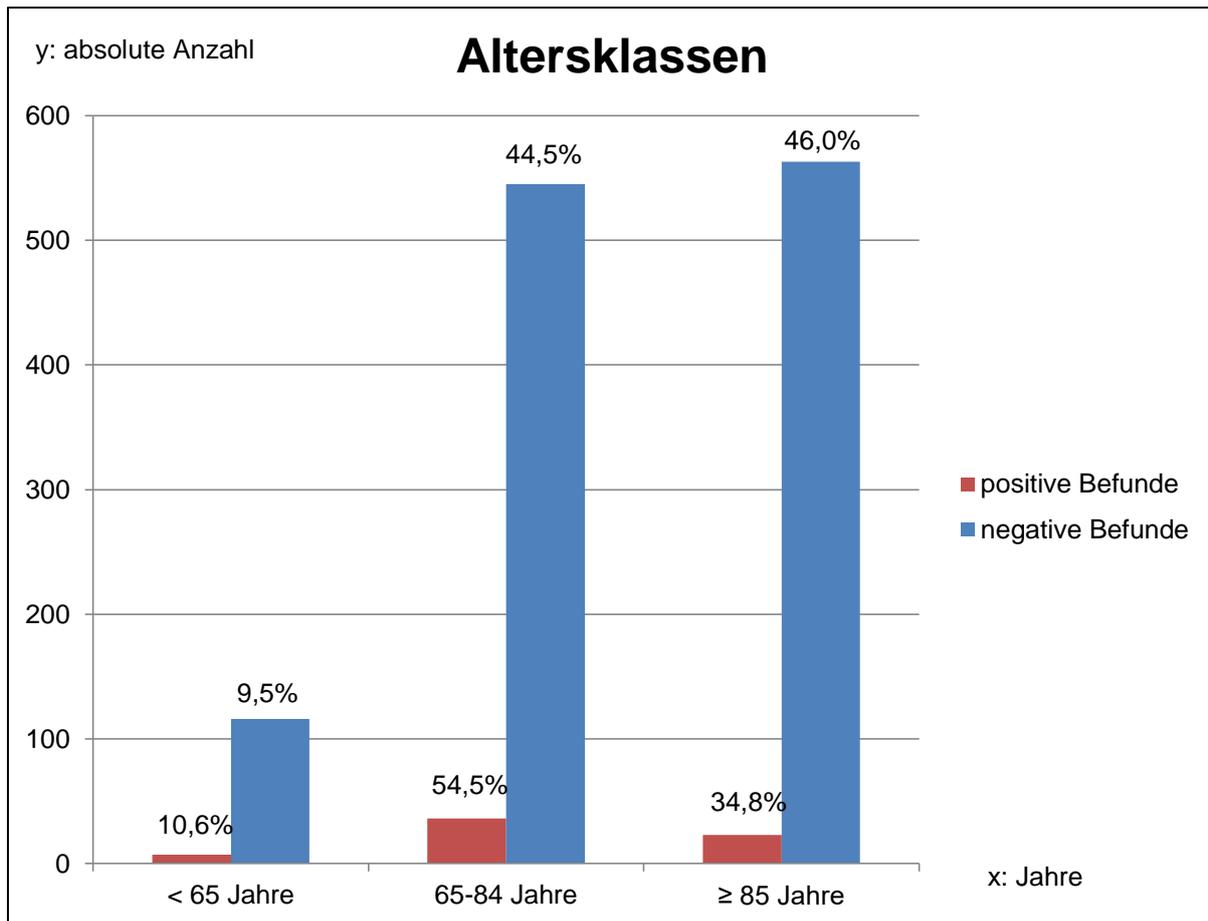


Abbildung 9: Verteilung der positiven und negativen Proben innerhalb der 3 Altersklassen: < 65 Jahre; 65-84 Jahre; ≥ 85 Jahre

Der Anteil der Probanden in der Altersklasse unter 65 Jahre lag bei beiden Gruppen bei 123 von 1288 (9,5 %). Da bei einigen Probanden die Angaben zum Alter fehlten, lag der Wert der Population des Alters unter der Gesamtsumme aller Proben (1288 statt 1301).

Die Summe der negativen und positiven Befunde in den Altersklassen 65-84 Jahre und ≥ 85 Jahre ergibt eine ähnliche Anzahl:

- 65-84 Jahre (n= 580; 45,0 %)
- ≥ 85 Jahre (n= 585; 45,4 %)

Der Median des Alters lag bei der Gruppe der positiven Befunde bei 83 Jahren. Die Spanne des Alters war in dieser Gruppe 40–96 Jahre (IQR: 14). In der Gruppe der negativen Befunde lag der Median des Alters bei 83,5 Jahren. Hier verlief die Spanne des Alters von 22–102 Jahre (IQR: 13). Insgesamt ist somit eine gleichmäßige Verteilung des Alters zu erkennen.

4.2. Geschlechterverteilung

Insgesamt haben mehr Frauen an der Studie teilgenommen. Besonders in den höheren Altersklassen ist der Anteil weiblicher Probanden am größten.

Da die Lebenserwartung der Frauen höher ist und es in der Bevölkerung mehr Frauen als Männer über 80 Jahre gibt, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Zwischen den Geschlechtern gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich positiver und negativer Befunde: p-value 0,3370 (fisher exact test).

Insgesamt haben 70,3 % (n= 907/1289) Frauen und 29,7 % (n= 383/1289) Männer teilgenommen. In den einzelnen Altersklassen waren 72 Männer < 65 Jahre, 209 Männer zwischen 65-84 Jahre und 99 Männer ≥ 85 Jahre vertreten. Bei den Frauen waren 51 < 65 Jahre, 362 zwischen 65 und 84 Jahre und 484 ≥ 85 Jahre alt.

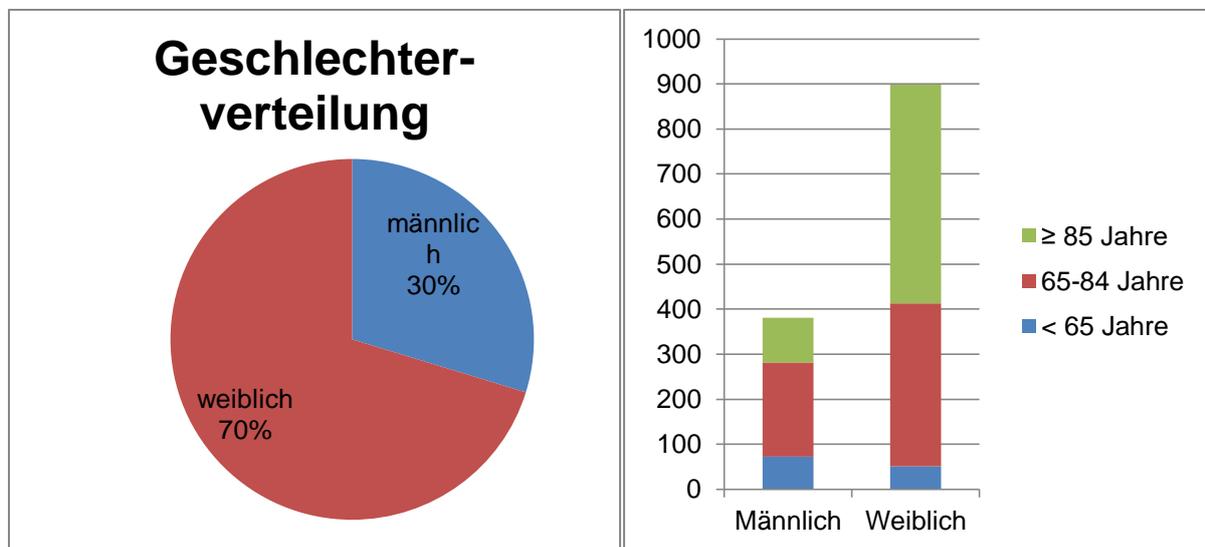


Abbildung 10: Geschlechterverteilung der Studie insgesamt und aufgeteilt in die einzelnen Altersklassen: < 65 Jahre, 65-84 Jahre, ≥ 85 Jahre

4.3. Ribotypen in den verschiedenen Alters- und Pflegeheimen

Tabelle 8: Übersicht über die einzelnen Ribotypen mit ihrer absoluten und relativen Anzahl, den dazu gehörigen Toxingenen und die Verteilung der nicht klassifizierten Ribotypen

PCR-RT	Anzahl (n)	%	Toxine (Anzahl)
RT 014	7	10,6	tcdA, tcdB
RT 001	7	10,6	tcdA, tcdB
RT 027	5	7,6	tdcA, tdcB, cdtA, cdtB
RT 126	4	6,1	tdcA, tdcB, cdtA, cdtB
RT 015	3	4,5	tcdA, tcdB
RT 106	3	4,5	tcdA, tcdB
RT 002	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 003	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 010	2	3,0	nicht toxigen
RT 018	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 026	2	3,0	tcdA, tcdB/ nicht toxigen
RT 043	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 053	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 073	2	3,0	nicht toxigen
RT 328	2	3,0	tcdA, tcdB
RT 012	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 017	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 020	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 024	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 050	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 070	1	1,5	tcdA, tcdB
RT 078	1	1,5	tdcA, tdcB, cdtA, cdtB
RT 140	1	1,5	nicht toxigen
RT 226	1	1,5	tcdA, tcdB
andere	6	9,1	nicht toxigen
andere	2	3,0	tcdA, tcdB
andere	2	3,0	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB

andere: nicht klassifizierte Ribotypen

Am häufigsten waren die RT 001 und 014 vertreten: beiden hatten einen prozentualen Anteil von 10,6 % (n= 7/66). RT 001 kam im Heim 045 zweimal vor, ansonsten verteilte er sich gleichmäßig jeweils einmal auf verschiedene Heime.

Der RT 014 trat dagegen häufiger zweimal in einem Heim auf. Der RT 027 schloss sich mit 7,6 % (n= 5/66) an, dreimal stammte er aus dem gleichen Heim (Heim 012).

RT 126 machte 6,1 % (n= 4/66) aus und verteilte sich gleichmäßig auf 4 verschiedene Heime. RT 015 und RT 106 kamen jeweils zu 4,5 % (n= 3/66) vor.

Alle 3 Bewohner von RT 106 kamen aus einem Heim, das Gleiche gilt für die Probanden mit dem RT 015.

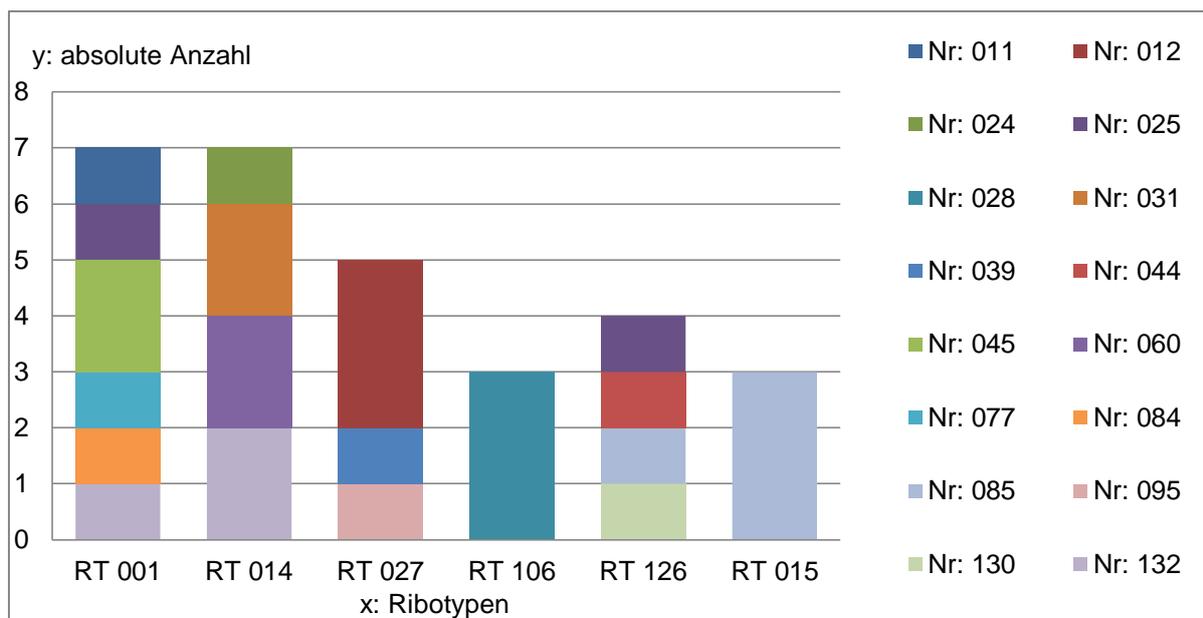


Abbildung 11: Vorkommen der häufigsten toxischen RT (RT 001, RT 014 RT 015, RT 106) und hypervirulenten RT (RT 027, RT 126) in verschiedenen Heimen

RT 002, RT 003, RT 010, RT 018, RT 026, RT 043, RT 053, RT 073 und RT 328 machten jeweils 3,0 % (n= 2/66) der Fälle aus. RT 012, RT 017, RT 020, RT 024, RT 050, RT 070, RT 078, RT 140 und RT 226 kamen zu 1,5 % (n= 1/66) vor. Die restlichen 15,2 % (n= 10/66) der positiv getesteten Proben konnten keinem bestimmten Ribotyp zu geordnet werden und gelten als nicht-klassifizierte Ribotypen (vgl. Tabelle 8).

Der Tabelle 9 kann man die Anzahl der Teilnehmer sowie die positiv getesteten Proben der einzelnen Heime entnehmen. Das Heim mit den meisten positiven Befunden abhängig von der Gesamtanzahl an eingesendeten Material war das Heim 012 (19 %; n= 4/21). 3 davon waren der RT 027. Heim 136 folgte mit 16,7 % (n= 1/6) direkt dahinter, hier ist einmal der RT 026 vertreten. Dieser gilt als nicht toxisch. Dann folgte Heim 130 mit 12,5 % (n= 2/16) positiver Proben, beide RT gehörten der Gruppe der nicht-klassifizierten Typen an. Einen positiven Anteil von 11,1 % hatten Heim 044 (n= 3/27) und Heim 085 (n= 4/36).

In dem Intervall von 5-10 % konnten 12 Heime positiv getestet werden: Heim 008, Heim 011, Heim 024, Heim 025, Heim 028, Heim 039, Heim 045, Heim 060, Heim 077, Heim 089, Heim 095 und Heim 132. Einen positiven Anteil von weniger als 5 % hatten folgende Heime: Heim 002, Heim 021, Heim 026, Heim 031, Heim 064, Heim 083, Heim 103, Heim 112, Heim 129. 11 Heime waren ohne *C. difficile* Befund (28,9 %, n= 11/38).

Tabelle 9: Übersicht über die Verteilung der RT innerhalb der einzelnen Heime

HeimNr	Proben anzahl	Anzahl Positive n (%)	Toxigen positiv (%)	Ribotypen (Anzahl)
Nr: 002	44	1 (2,3)	0	RT 073
Nr: 008	73	4 (5,5)	3 (4,1) a	RT 010, RT 026, RT 003, Andere (abc)
Nr: 011	15	1 (6,6)	1 (6,6)	RT 001
Nr: 012	21	4 (19,0)	4 (19,0)b	RT 027 (3); RT 012
Nr: 021	38	1 (3,0)	0	Andere (0)
Nr: 024	67	5 (7,5)	4 (6,0)	RT 010, RT 014, RT 018, RT 226, Andere (ab)
Nr: 025	54	4 (7,4)	4 (7,4) c	RT 001, RT 002, RT 078, RT 126,
Nr: 026	75	3 (4,0)	3 (4)	RT 002, RT 018, RT 053
Nr: 028	41	3 (7,3)	3 (7,3)	RT 106 (3)
Nr: 031	87	3 (3,4)	3 (3,4) a	RT 014 (2), Andere (abc)
Nr: 039	27	2 (7,4)	1 (3,7) a	RT 027, RT 073
Nr: 044	27	3 (11,1)	2 (7,4) a	RT 017, RT 126, Andere (0)
Nr: 045	26	2 (7,7)	2 (7,7)	RT 001 (2)
Nr: 060	36	3 (8,3)	2 (5,6)	RT 014 (2), Andere (0)
Nr: 064	66	2 (3,0)	2 (3,0)	RT 003, RT 043
Nr: 077	12	1 (8,3)	1 (8,3)	RT 001
Nr: 083	23	1 (4,3)	1 (4,3)	RT 328
Nr: 084	70	3 (4,3)	3 (4,3)	RT 001, RT 050, RT 053
Nr: 085	36	4 (11,1)	4 (11,1)	RT 015 (3), RT 126
Nr: 089	30	2 (6,6)	0	Andere (2, 0)
Nr: 095	55	4 (7,3)	4 (7,3) a	RT 020, RT 027, RT 043, RT 070
Nr: 103	27	1 (3,7)	1 (3,7)	RT 024
Nr: 112	21	1 (4,8)	1 (4,8)	RT 328
Nr: 129	36	1 (2,8)	0	RT 140
Nr: 130	16	2 (12,5)	2 (12,5) a	RT 126, Andere (ab)
Nr: 132	41	4 (9,8)	3 (7,3)	RT 001, RT 014 (2), Andere (0)
Nr: 136	6	1 (16,7)	0	RT 026

a: Einmal binäres Toxin
b: 3-mal binäres Toxin
c: 2 binäres Toxin

ab: Toxingen A + B
abc: Binäres Toxin
0: Toxingen negativ

Andere: nicht-klassifizierte
RT

4.4. Ribotypen der verschiedenen Kreisgebiete des Saarlandes

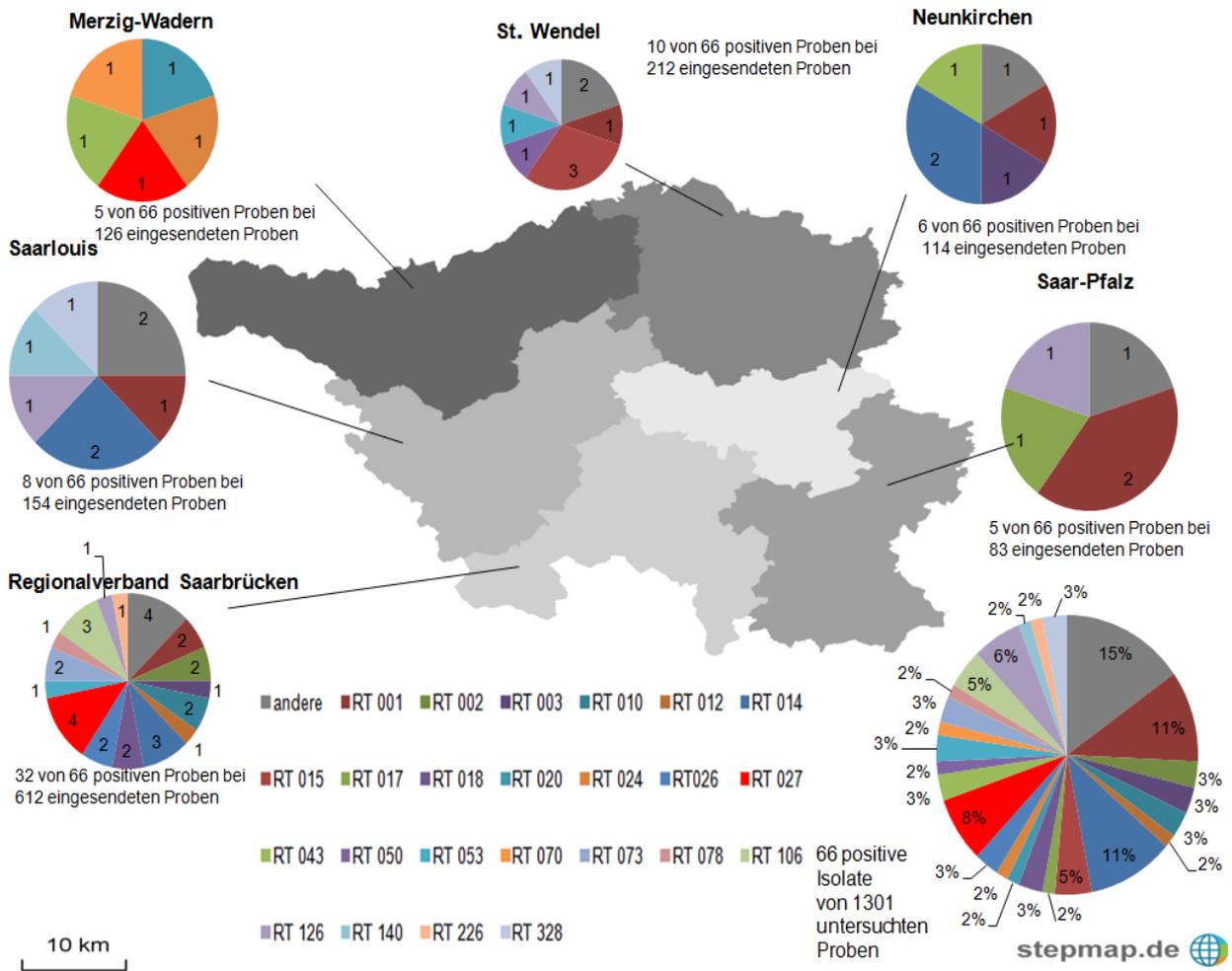


Abbildung 12: Übersichtskarte des Saarlandes mit der Zuordnung der gefundenen *C. difficile*-Stämme zu den 6 Landkreisen; andere: nicht-klassifizierte Ribotypen

Die meisten positiven Proben kamen aus dem Regionalverband Saarbrücken, insgesamt 32 von 66 (48,5 %). Hier war der RT 027 (6,1 %, n= 4/66) am häufigsten vertreten, gefolgt von RT 014 und 106 mit jeweils 3 positiven Proben (4,5 %, n= 3/66). Der RT 001 kam zweimal vor (3,0 %, n= 2/66) sowie RT 002, RT 010, RT 018, RT 026 und RT 073. RT 003, RT 012, RT 053, RT 078, RT 126 und RT 226 war jeweils einmal (1,5 %, n= 1/66) vertreten. 4 von 66 (6,1 %) Proben konnten nicht klassifiziert werden.

Es konnten Proben aus 14 verschiedenen Heimen gewonnen werden. In 2 Heimen wohnten Bewohner ohne *C. difficile*-Besiedlung.

Im Landkreis St. Wendel gab es 10 positive Proben (15,2 %, n= 10/66). RT 015 kam dreimal vor (4,5 %, n= 3/66), zweimal ein nicht klassifizierter RT (3,0 %, n= 2/66) und jeweils einmal der RT 001, RT 050, RT 053, RT 126 und RT 328 (1,5 %, n= 1/66).

5 verschiedene Heime hatten Proben eingeschickt, davon war ein Heim ohne positive Befunde.

Im Landkreis Saarlouis gab es insgesamt 8 positive Proben (12,1 %, n= 8/66).

RT 014 und die nicht klassifizierten RT kamen zweimal vor (3,0 %, n= 2/66). RT 001, RT 126, RT 140 und RT 328 jeweils einmal (1,5 %, n= 1/66). Die Teilnehmerzahl der Heime lag hier insgesamt bei 9 Heimen, wobei 5 Heimen ohne *C. difficile* Befunde waren.

Im Landkreis Neunkirchen wurde der RT 014 zweimal gefunden (3,0 %, n= 2/66), RT 001, RT 003, RT 043 und ein nicht klassifizierte RT einmal (1,5 %, n= 1/66). Insgesamt konnten 6 positive Proben detektiert werden (9,1 %, n= 6/66).

In allen 3 teilnehmenden Heimen wurde *C. difficile* gefunden.

Aus dem Saar-Pfalz-Kreis gab es 5 positive Proben (7,6 %, n= 5/66): RT 001 kam zweimal vor (3,0 %, n= 2/66), RT 017, RT 126 und ein nicht-klassifizierter RT einmal (1,5 %, n= 1/66). In zwei von vier Heimen konnte *C. difficile* nachgewiesen werden.

Im Landkreis Merzig-Wadern konnten ebenfalls 5 Proben aus 2 Heimen nachgewiesen werden (7,6 %, n= 5/66). Jeweils einmal kam der RT 027, RT 020, RT 024, RT 043 und RT 070 vor (1,5 %, n= 1/66). Insgesamt hatten 3 Heime Proben eingesandt, davon konnte in einem Heim keinen *C. difficile* Befunde festgestellt werden

4.5. Verteilung der Toxingene

Bei der Toxingen-Bestimmung wurden 81,8 % (n= 54/66) toxigen-positiv getestet. 63,6 % (n= 42/66) wurden dabei als Toxin A/Toxin B (tcdA, tcdB) und 18,2 % (n= 12/66) als binäre Toxin (tcdA, tcdB, cdtA, cdtB) detektiert. Die restlichen 18,2 % (n= 12/66) fallen auf die toxigen-negativen Stämme.

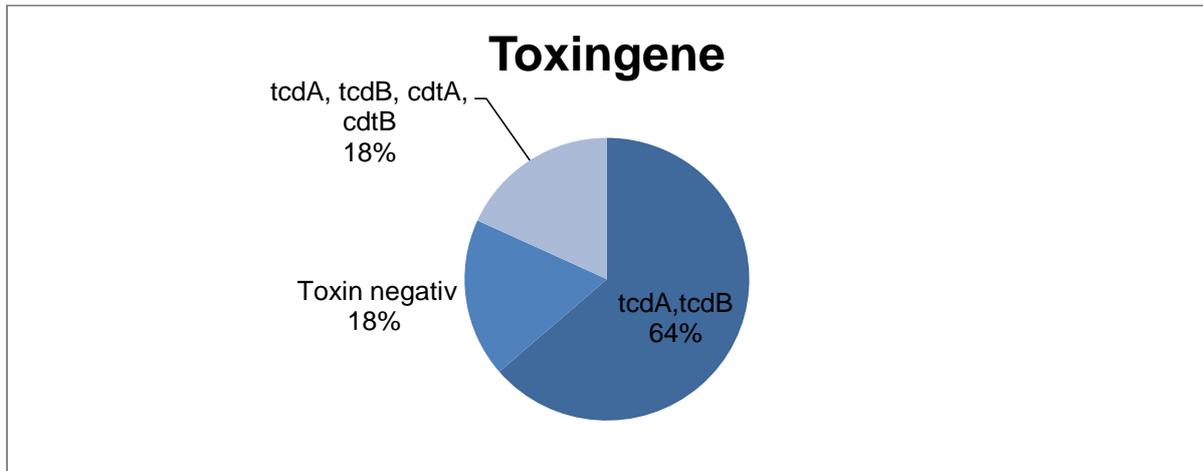


Abbildung 13: Kreisdiagramm der Verteilung der getesteten Toxingene

Das binäre Toxin (tcdA, tcdB, cdtA, cdtB) wurde bei den RT 027, 078 und 126 nachgewiesen. Die Stämme RT 010, 073 und 140 waren nicht toxigen. Bei RT 026 trat sowohl ein Stamm auf, der nicht toxigen war und einer mit Toxin A und Toxin B (tdcA, tdcB). Alle anderen Stämme besaßen Gene für das Toxin A und B (tdcA, tdcB).

Bei den nicht klassifizierten RT konnte folgende Toxingene erfasst werden:

- tcdA, tcdB (n= 2)
- tcdA, tcdB, cdtA, cdtB (n= 2)
- nicht toxigen (n= 6)

4.6. Ribotypen innerhalb der Altersklassen

In der Altersklasse < 65 Jahre traten der RT 001, 014, 015 und 070 jeweils einmal auf sowie einmal ein nicht klassifizierter RT (n= 1/7). Der RT 027 kam zweimal (n= 2/7) vor. Neben dem nicht klassifizierten RT, welcher kein Toxingen besaß, konnten insgesamt 5 verschiedene RT detektiert werden.

In der Klasse 65-84 Jahren kam 17 verschiedene Ribotypen vor. Besonders häufig der RT 014 (n= 5/36) und RT 001 (n= 4/36). Die hypervirulenten RT 027 und RT 078 wurden jeweils einmal nachgewiesen (n= 1/36), der RT 126 zweimal (n= 2/36).

Die RT 002, 003, 026, 043 und 073 kamen jeweils zweimal vor (n= 2/36) sowie die RT 010, 017, 020, 024, 053, 106 und 328 jeweils einmal (n= 1/36).

Bei den nicht klassifizierten RT traten 6 (n= 6/36) auf: 3 davon besaßen kein Toxin, 2 trugen das Toxin tcdA und tcdB und 1 das binäre Toxin (tcdA, tcdB, cdtA, cdtB).

In der Klasse ≥ 85 Jahre nahm die Zahl der RT wieder ab. Hier waren 14 verschiedene Typen vertreten. Insgesamt war die Verteilung gleichmäßig.

Jeweils zweimal (n= 2/23) kamen die RT 001, RT 015, RT 018. RT 027, RT 106 und RT 126. 3 nicht klassifizierte RT traten auf: zweimal (n= 2) wurden keine Toxingene gefunden und einmal (n= 1) das binäre Toxin. RT 010, 014, 012, 050, 053, 140, 226 und 328 traten jeweils einmal (n= 1/23) auf.

Näheres zu diesem Sachverhalt kann der Abbildung 14 entnommen werden.

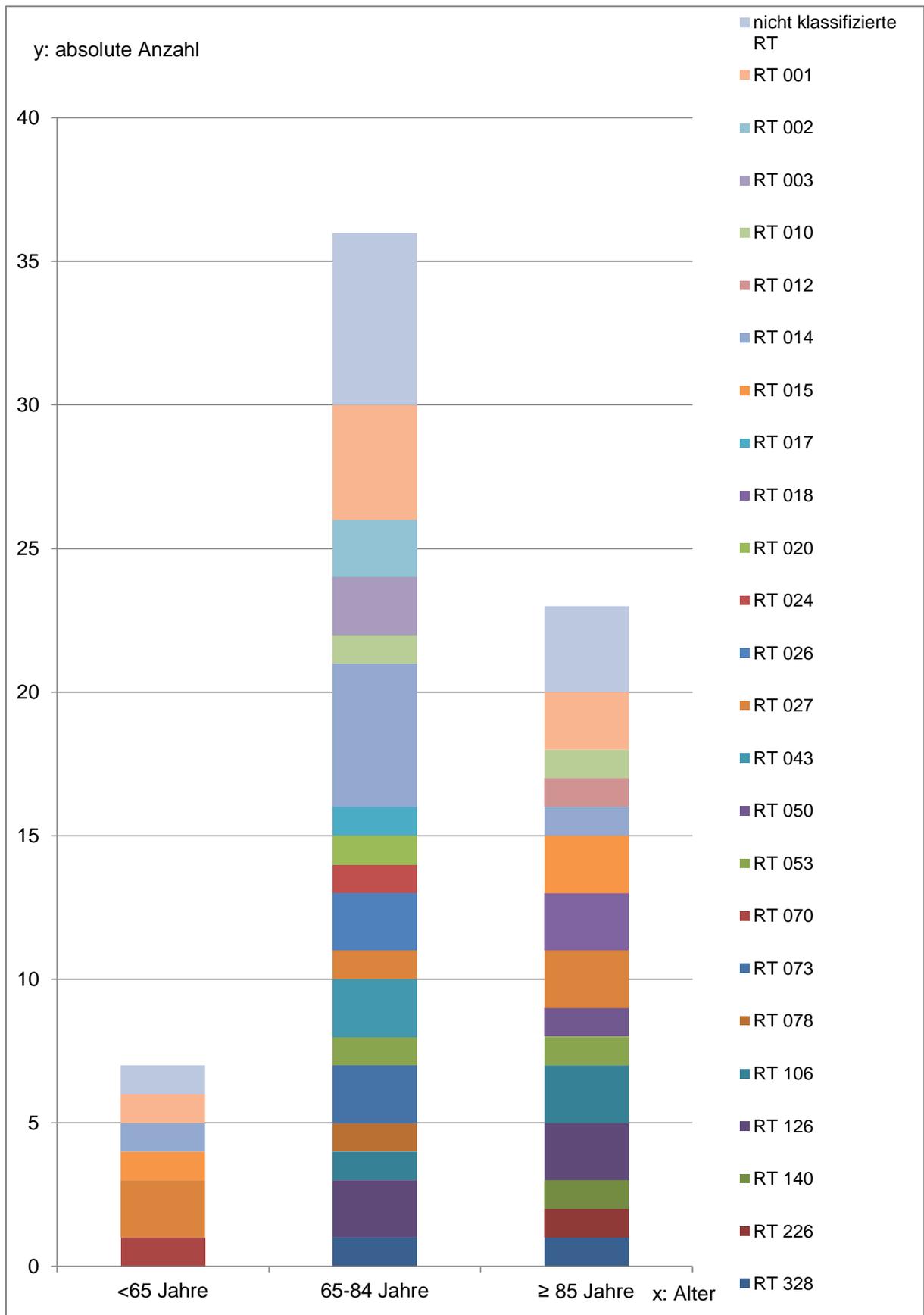


Abbildung 14: Überblick über die verschiedenen RT in den 3 Altersklassen

4.7. Risikofaktoren

Mittels Fragebogen wurden standardisiert klinische Daten der Bewohner erfasst. Dazu zählten:

- Demenz
- Durchfall in den letzten drei Monaten
- Infektionen des Gastrointestinaltraktes
- Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage)
- *Clostridium difficile* im Vorbefund

Demenz trat sowohl bei den negativen Befunden (55 %, n= 625/1137) als auch bei den positiven Befunden (56,6 %, n= 35/62) gehäuft auf. Es besteht keine Signifikanz zwischen den Gruppen (p-value: 0,8959) und somit kann die Demenz als Risikofaktor für die *C. difficile* Besiedlung ausgeschlossen werden.

Durchfall in den letzten drei Monaten kam bei 3,2 % (n= 40/1235) der negativen Befunde und bei 13,6 % (n= 9/66) der positiven Befunde vor. Der p-value ergibt einen Wert von 0,0005; somit liegt ein signifikanter Unterschied vor. Folglich kann Durchfall in den letzten 3 Monaten als Risikofaktor angesehen werden.

Infektionen des Gastrointestinaltraktes machten 1,1 % (n= 14/1235) der negativen Befunde und 3,0 % (n= 2/66) der positiven Befunde aus. Auch hier ist keine Signifikanz zu erkennen. Der p-value liegt bei 0,1930.

Ein Krankenhausaufenthalt für mehr als 3 Tage wurde bei 10,6 % (n= 131/1235) der negativen Befunde und bei 27,3 % (n= 18/66) der positiven Befunde angegeben. Es errechnet sich ein p-value von 0,0002. Es herrscht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, was bedeutet, dass der Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage) als Risikofaktor für eine *C. difficile* Besiedlung angenommen werden kann.

Clostridium difficile im Vorbefund kam bei 0,9 % (n= 11/1235) der negativen und bei 9,1 % (n= 6/66) der positiven Befunde vor. Der p-value beträgt 0,0002. Damit liegt ein signifikanter Unterschied vor mit der Folge, dass *C. difficile* im Vorbefund als Risikofaktor gilt.

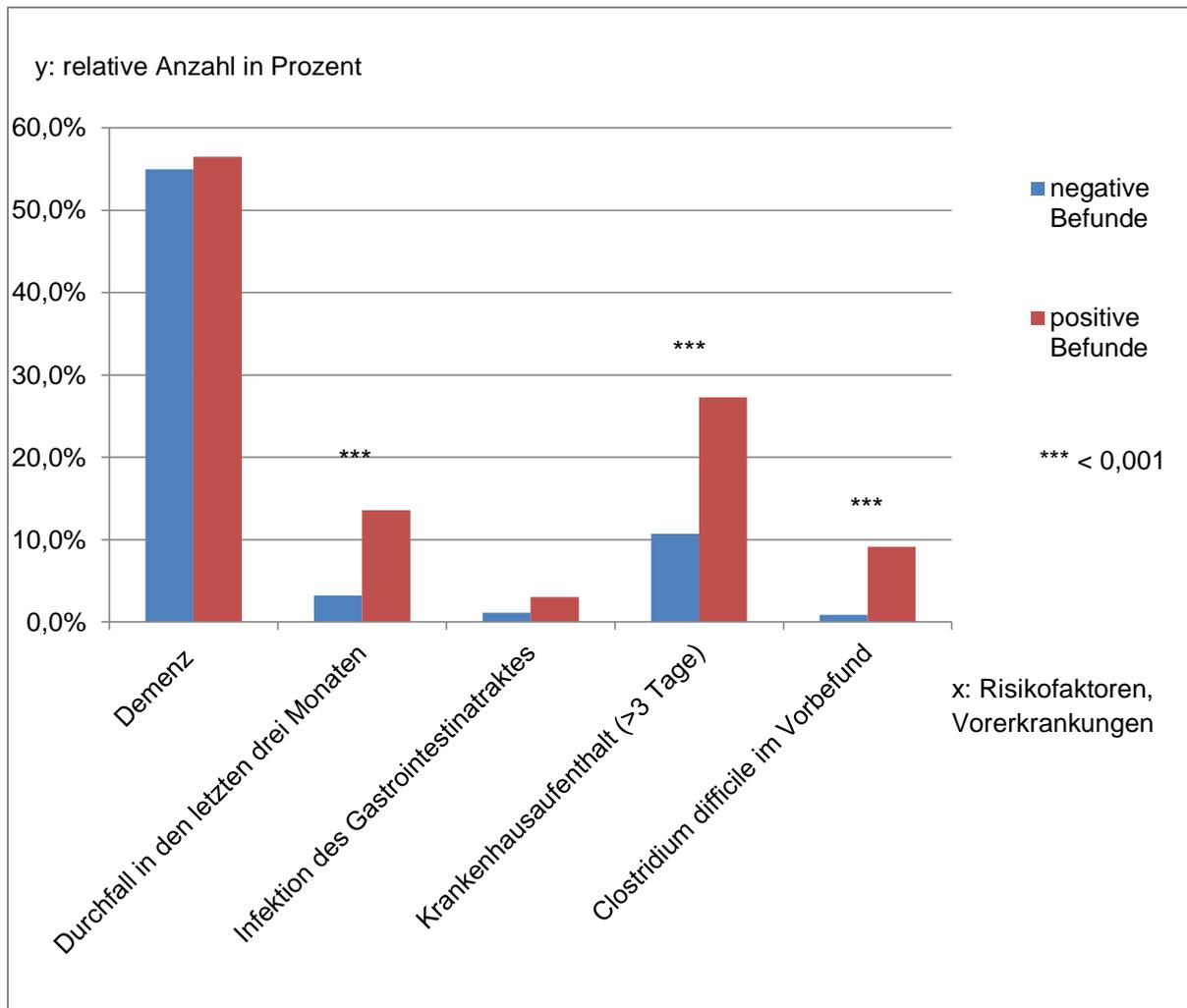


Abbildung 15: Überblick über die Verteilung der negativen und positiven Befunde bezüglich der klinischen Daten sowie der Risikofaktoren. Die Risikofaktoren Durchfall in den letzten drei Monaten, Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage) und C. difficile im Vorbefund traten signifikant gehäuft auf und sind mit Sternchen mit folgender Bedeutung gekennzeichnet: *** < 0,001

Zusammenfassend können folgende Risikofaktoren in dieser Arbeit für die asymptomatische C. difficile Besiedlung angenommen werden:

- Durchfall in den letzten 3 Monaten
- Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage)
- *Clostridium difficile* im Vorbefund

Das Alter konnte nicht als Risikofaktor nachgewiesen werden. Sowohl das Alter über 64 Jahre als auch das Alter über 84 ergab keinen signifikanten Unterschied im „fisher exact test“: der p-value in der Altersklasse ≥ 65 Jahre betrug $p= 0,6710$ und der p-value in der Altersklasse ≥ 85 Jahre betrug $p= 0,0772$.

Insgesamt war die Verteilung des Alters bei den negativen und positiven Befunden in allen Altersgruppen im Verhältnis gleich.

4.7.1 Risikofaktoren der häufigsten Ribotypen

Bei den drei häufigsten RT kam folgende Verteilung der klinischen Daten heraus:

Bei RT 001 (N= 7) trat fünfmal Demenz auf (n=5). Ein Krankenhausaufenthalt von mehr als 3 Tagen kam zweimal vor (n= 2) und einmal *C. difficile* im Vorbefund (n= 1). Die Gesamtanzahl lag hier bei 8, weil ein Proband sowohl im Krankenhaus war als auch *C. difficile* im Vorbefund hatte. Der Median des Alter betrug 84 Jahre und der Mittelwert 81 Jahre (IQR: 10).

Beim RT 014 (N= 7) lag Demenz ebenfalls am häufigsten vor (n= 3). Durchfall in den letzten drei Monaten trat einmal auf (n= 1) und Infektionen des Gastrointestinaltraktes zweimal (n= 2). Da bei einem Probanden die Angaben fehlten, konnten hier nur 6 positive Befunde einbezogen werden. Der Median des Alters betrug 74 Jahre und der Mittelwert 77 Jahre (IQR: 9).

Beim RT 027 (N= 5) konnte sowohl Durchfall in den letzten drei Monaten als auch Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage) besonders häufig detektiert werden: beides jeweils dreimal (n= 3). Demenz kam einmal vor (n= 1). 2 Probanden hatten Durchfall und waren ebenfalls im Krankenhaus gewesen. Der Median des Alters lag bei 74 Jahren und der Mittelwert bei 68,4 Jahren (IQR: 44).

Der RT 078 (N= 1) war einmal mit Demenz vertreten (n= 1). Das Alter des Probanden lag bei 71 Jahren.

RT 126 (N= 4) war zweimal mit Demenz und zweimal mit Krankenhausaufenthalt vertreten (jeweils n=2). Auf einen Probanden traf kein Risikofaktor zu. Ein anderer Proband hatte Demenz und war gleichzeitig im Krankenhaus. Bei den anderen beiden Bewohnern hatte jeweils einer Demenz und einer war im Krankenhaus gewesen. Der Median des Alters lag bei 85 Jahren und der Mittelwert bei 86 Jahren (IQR: 10,5).

Bei den 2 nicht klassifizierten RT mit dem binäre Toxin trat zweimal Demenz (n= 2), einmal Durchfall (n= 1), Krankenhausaufenthalt (n= 1) und *C. difficile* im Vorbefund (n= 1) auf. Ein Bewohner hatte gleichzeitig Demenz, Durchfall und war im Krankenhaus, der andere hatte gleichzeitig Demenz und *C. difficile* im Vorbefund. Das Alter des Probanden lag bei 84 Jahren und des anderen bei 89 Jahren.

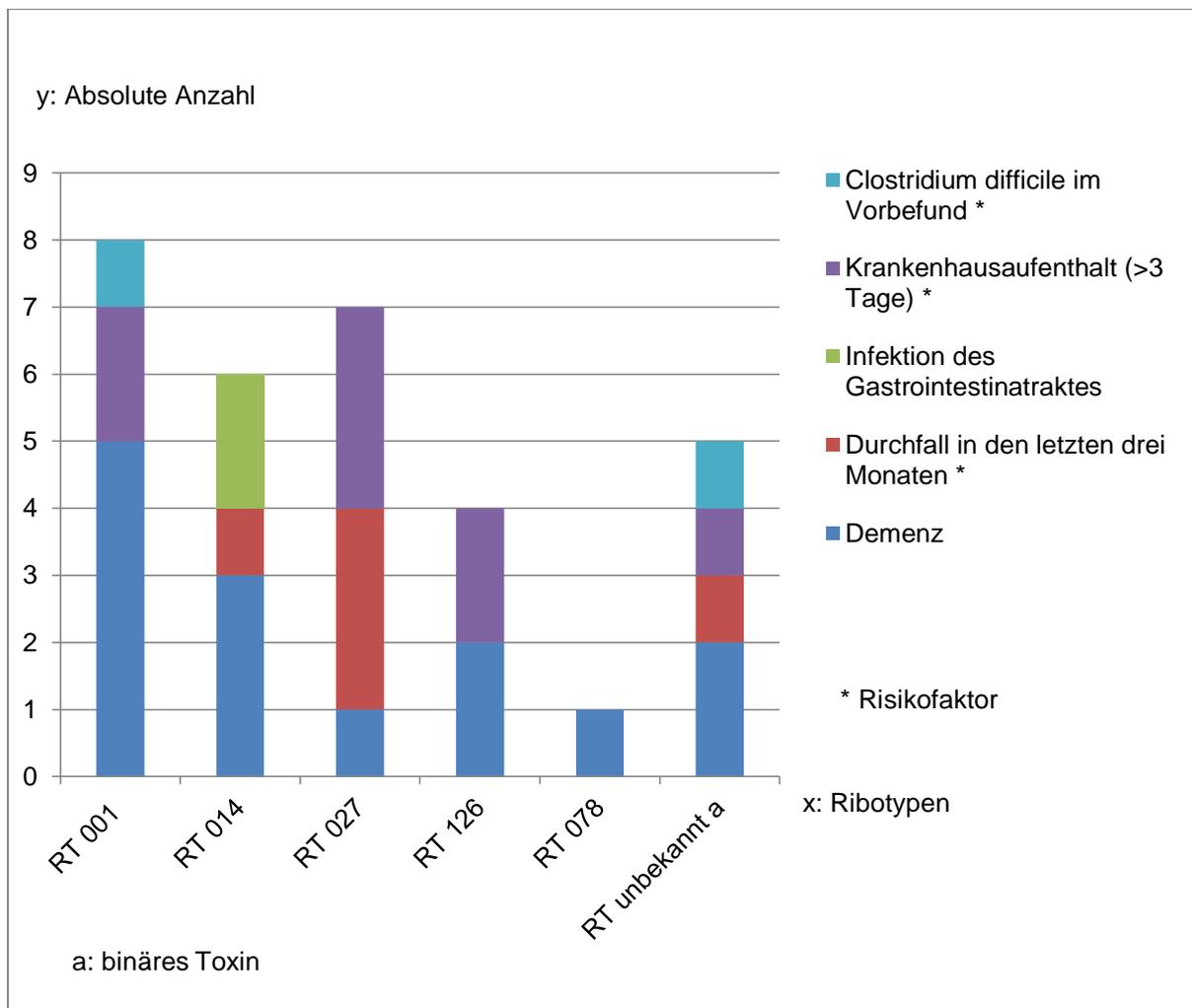


Abbildung 16: Überblick über die Verteilung der Risikofaktoren; sowie Demenz und Infektionen des Gastrointestinaltraktes der häufigsten RT, der hypervirulenten RT, sowie der nicht klassifizierte RT mit binärem Toxin

4.7.2 Risikofaktoren innerhalb der Altersklassen

Betrachtet man die Risikofaktoren in den einzelnen Altersklassen der positiven *C. difficile* Befunde, traten bei Patienten in der Altersklasse < 65 Jahren einmal (n= 1) Durchfall auf und zweimal (n= 2) Krankenhausaufenthalt. In der Altersklasse 65-84 Jahre waren alle 3 Risikofaktoren (Durchfall (n= 5), Krankenhausaufenthalt (n= 9), *C. difficile* im Vorbefund (n= 1)) sowie Demenz (n= 21) und Infektionen des Gastrointestinaltraktes (n= 2) vertreten. In der Klasse \geq 85 Jahre wurden Demenz (n= 14), Durchfall (n= 3), Krankenhausaufenthalt (n= 7) und *C. difficile* im Vorbefund (n= 5) nachgewiesen.

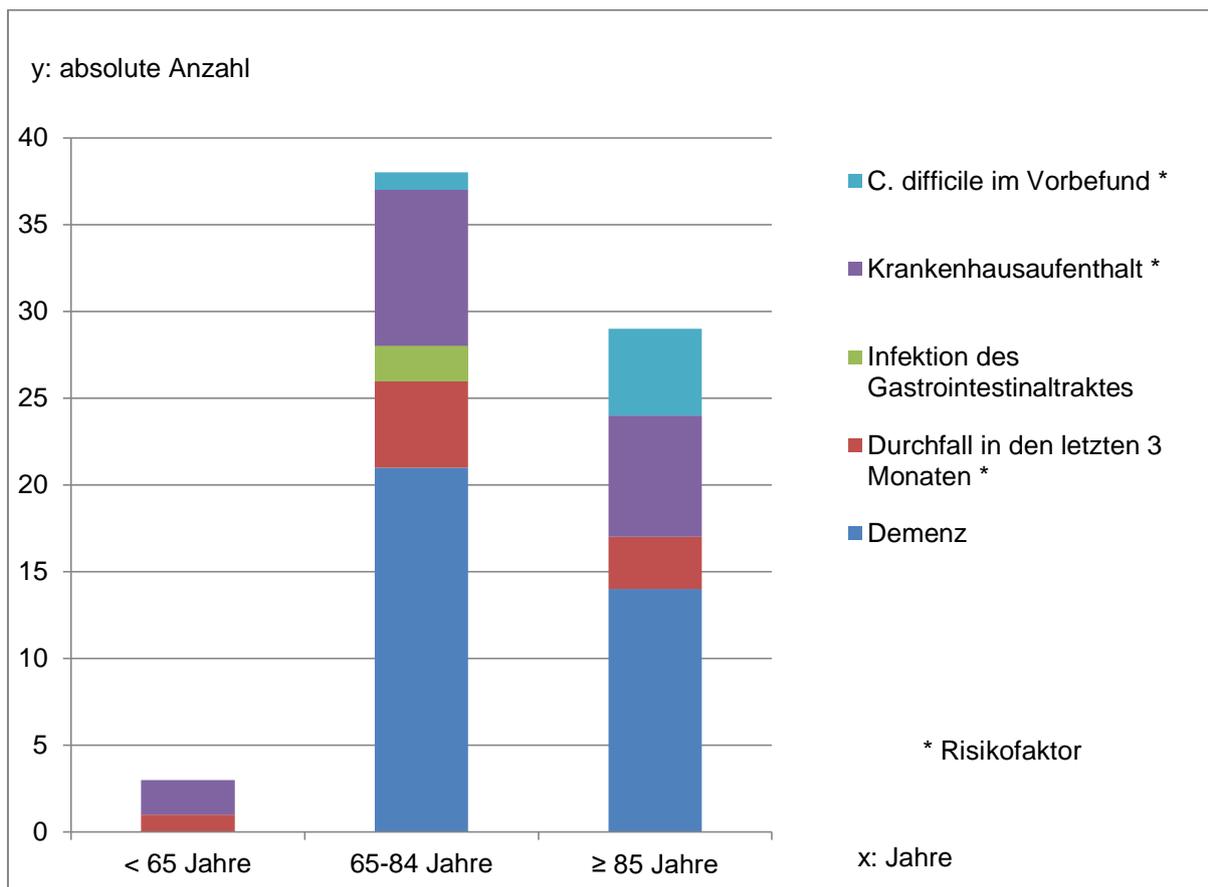


Abbildung 17: Risikofaktoren sowie Demenz und Infektionen des Gastrointestinaltraktes der 3 Altersklassen

4.8. Antibiotikaresistenztestung

Tabelle 10: Übersicht über die Antibiotikaempfindlichkeit der einzelnen Ribotypen in Prozent für Metronidazol, Vancomycin, Moxifloxacin, Clarithromycin und Rifampicin

Ribotyp	Anzahl (n)	Toxingene	Antibiotikaempfindlichkeit				
			Metronidazol (%)	Vancomycin (%)	Moxifloxacin (%)	Clarithromycin (%)	Rifampicin (%)
RT 001	7	tcdA, tcdB	86	100	71	86	100
RT 014	7	tcdA, tcdB	100	100	100	86	100
RT 027	5	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB	100	100	20	40	60
RT 126	4	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB	100	100	100	25	100
RT 015	3	tcdA, tcdB	100	100	100	67	100
RT 106	3	tcdA, tcdB	100	100	100	67	100
RT 002	2	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 003	2	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 010	2	nicht toxisch	100	100	100	0	100
RT 018	2	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 026	2	tcdA, tcdB/ nicht toxisch	100	100	100	100	100
RT 043	2	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 053	2	tcdA, tcdB	100	100	50	100	100
RT 073	2	non toxisch	100	100	100	100	100
RT 328	2	tcdA, tcdB	100	100	100	50	100
RT 012	1	tcdA, tcdB	100	100	100	0	100
RT 017	1	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 020	1	tcdA, tcdB	100	100	100	0	100
RT 024	1	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 050	1	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 070	1	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
RT 078	1	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB	100	100	0	100	100
RT 140	1	nicht toxisch	100	100	100	100	100
RT 226	1	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
nicht klassifizierte RT	2	tcdA, tcdB	100	100	100	100	100
nicht klassifizierte RT	2	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB	100	100	100	100	100
nicht klassifizierte RT	6	nicht toxisch	100	86	100	100	100
Gesamtempfindlichkeit			98,5	98,5	87,9	77,3	97,0

Tabelle 10 zeigt die Antibiotikaempfindlichkeit der einzelnen Ribotypen. Getestet wurden Metronidazol, Vancomycin, Moxifloxacin, Clarithromycin und Rifampicin.

Bei Metronidazol konnte ein resistenter Stamm RT 001 nachgewiesen werden. Alle anderen Stämme entsprachen den Kriterien nach EUCAST und hatten eine MHK ≤ 2 mg/l und konnten somit als sensibel deklariert werden (MHK-Median: 0,38 mg/l; Spannweite: 0,125-256 mg/l).

Bei Vancomycin gab es ein ähnliches Bild. Auch hier war ein Stamm resistent, der der Klasse der nicht klassifizierten RT angehörte. Die restlichen RT waren empfindlich gegenüber Vancomycin (MHK-Median: 0,5 mg/l, Spannweite: 0,125-8 mg/l). Insgesamt konnte eine Antibiotikaempfindlichkeit von 98,5 % bei Vancomycin und Metronidazol festgestellt werden.

Bei Moxifloxacin traten deutlich mehr Resistenzen auf. Das Muster schwankte zwischen 29 %-100 % resistenter Stämme: RT 001 (29 %, n= 2/7), RT 027 (80 %; n= 4/5), RT 053 (50 %, n= 1/2) und RT 078 (100 %, n= 1/1). Im Ganzen waren 87,9 % der Stämme sensibel gegenüber Moxifloxacin (MHK-Median: 1 mg/l, Spannweite: 0,125-32 mg/l).

Bei Clarithromycin traten Resistenzen bei RT 001 (14 %, n= 1/7), RT 014 (14 %, n= 1/7), RT 027 (60 %, n= 3/5), RT 010 (100 %, n= 2/2), RT 015 (33 % n= 1/3), RT 106 (33 %, n= 1/3), RT 126 (75 %, n= 3/4), RT 012 (100 %, n= 1/1), RT 020 (100 %, n= 1/1) und RT 328 (50 %, n= 1/2) auf. 77,2 % der *C. difficile*-Stämme waren sensibel.

Bei Rifampicin existierten Resistenzen gegen RT 027 (40 %, n= 2/5). Gegen alle anderen Stämme wirkte Rifampicin sehr gut. Insgesamt lag hier die Antibiotikaempfindlichkeit bei 97 %.

4.9. Verlaufsuntersuchungen der positiven Befunde

Nach einem Jahr wurden Kontrollproben von den vorher positiv getesteten Abstrichen genommen. Insgesamt haben nochmals 30 Probanden teilgenommen.

Die Auswertung ergab, dass 5 Proben positiv auf *C. difficile* getestet wurden. Alle anderen Abstriche waren in der Kultur sowie im GDH-Schnelltest negativ. Der GDH-Schnelltest wies in diesem Fall allerdings Schwächen auf, da auch bei den in der Kultur und durch den MALDI-TOF bestätigten positiven Befunden 3 von 5 als negativ eingestuft wurden. Lediglich 2 der positiven Abstriche waren im Schnelltest eindeutig positiv.

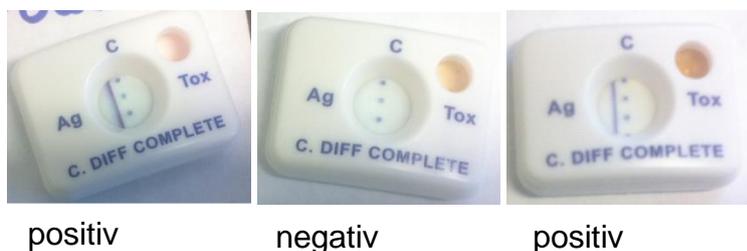


Abbildung 18: Beispiele des GDH-Schnelltestes bei den Kontrollproben. Die zwei positiven Befunde und einer der drei negativen Befunde als Beispiel

Dieses Ergebnis liegt wahrscheinlich an den Störfaktoren der Rektalabstriche. Einmal war nicht in jedem Abstrich Stuhl, zum anderen befand sich in dem Abstrichröhrchen eine teils flüssige, teils gelartige Masse. Um ein zuverlässiges Ergebnis bei dem GDH-Schnelltest zu erzielen, sind weiche bis flüssige Stühle erforderlich.

Bei den 5 positiven wurde zweimal der RT 001 (n= 2) und jeweils einmal der RT 014 (n= 1), RT 010 (n= 1), RT 106 (n= 1) im Vorbefund gefunden. Bei den Kontrollproben ergab sich lediglich bei einem eine Änderung bezüglich des Ribotypes. Die Änderung betraf den RT 001: Ein Jahr später war dort der nicht toxigene RT 073 zu finden. Bei den restlichen Proben konnte der gleiche Ribotyp wie im Vorjahr nachgewiesen werden. Die Verteilung der Ribotypen kam gleichmäßig jeweils einmal vor.

RT 010 und RT 073 waren nicht toxigen, wohingegen die Ribotypen 001, 014 und 106 Gene für das Toxin A und das Toxin B besaßen (tcdA, tcdB). Stämme mit dem binären Toxin wurden nicht mehr detektiert.

Tabelle 11: Übersicht über die Änderung der Ribotypen im Vergleich zum Vorjahr

			Kontrollproben (nach 1 Jahr):			
Ribotyp	Anzahl (n)	Toxingene		Ribotyp	Anzahl (n)	Toxin Gene
RT 001	1	tcdA, tcdB	→	RT 073	1	nicht toxigen
RT 001	1	tcdA, tcdB	→	RT 001	1	tcdA, tcdB
RT 014	1	tcdA, tcdB	→	RT 014	1	tcdA, tcdB
RT 010	1	nicht toxigen	→	RT 010	1	nicht toxigen
RT 106	1	tcdA, tcdB	→	RT 106	1	tcdA, tcdB

4.9.1. Antibiotikaresistenztestung der Verlaufsuntersuchung

Aus der Tabelle 12 kann man entnehmen, dass sich bei der Änderung des Ribotypen auch die Antibiotikaempfindlichkeit geändert hat. RT 073 ist im Gegensatz zu RT 001 bei allen Antibiotika sensibel. Der RT aus dem Vorjahr hat Resistenzen gegenüber Metronidazol und Clarithromycin. Bei dem übrigen RT 001 gab es im Verlauf auch eine Änderung. Zwar wurde nach einem Jahr derselbe RT wieder getestet, doch die Antibiotikaempfindlichkeit hat sich zum Vorjahr verschlechtert, da Resistenzen bei Moxifloxacin und bei Clarithromycin gefunden wurden. Die Empfindlichkeit von Moxifloxacin hat sich auch beim RT 106 verschlechtert. Bei den übrigen RT ergab sich weder eine Änderung bei den Ribotypen noch bei der Antibiotikaempfindlichkeit. Die Gesamtsensibilität hat sich bei Metronidazol, bedingt durch den RT-Wechsel, von 80 % auf 100 % verbessert.

Für Moxifloxacin hat sie sich von 100 % auf 60 % verschlechtert.

Tabelle 12: Übersicht über die Antibiotikaempfindlichkeit der einzelnen Ribotypen in Prozent für Metronidazol, Vancomycin, Moxifloxacin, Clarithromycin und Rifampicin in beiden Jahren; rot unterlegte Werte entsprechen den Veränderungen gegenüber dem Vorjahr

Kontrollproben nach 1 Jahr													
Ribo- typ	n	Metro- nidazol (MHK)	Vanco- mycin (MHK)	Moxi- floxacin (MHK)	Rif- ampicin (Hemm- hof)	Clarithro- mycin (Hemm- hof)	Ribo- typ	n	Metro- nidazol (MHK)	Vanco- mycin (MHK)	Moxi- floxacin (MHK)	Rif- ampicin (Hemm- hof)	Clarithro- mycin (Hemm- hof)
RT 014	1	0,38	0,75	1,25	ja	nein	RT 014	1	0,75	0,75	1,5	ja	nein
RT 001	1	>256	2	0,19	ja	nein	RT 073	1	0,25	0,75	1,5	ja	ja
RT 001	1	0,38	0,38	1,5	ja	ja	RT 001	1	0,5	0,5	>32	ja	nein
RT 010	1	0,19	1	0,5	ja	nein	RT 010	1	0,75	0,5	2	ja	nein
RT 106	1	0,5	0,5	1	ja	nein	RT 106	1	0,32	0,38	>32	ja	nein
E in %:	5	80	100	100	100	20		5	100	100	60	100	20

n= Anzahl, MHK= mg/L, E= Empfindlichkeit

4.9.2. Risikofaktoren der Verlaufsuntersuchung zum Zeitpunkt der ersten Entnahme

Bei den 5 erneut positiv getesteten Proben ließen sich folgende klinische Daten bei der ersten Entnahme feststellen: bei RT 010 konnte Demenz und Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage)* nachgewiesen werden, bei einem RT 001 Krankenhausaufenthalt (> 3 Tage)* und *C. difficile* im Vorbefund*, bei RT 106 Durchfall in den letzten drei Monaten* und bei dem anderen RT 001 Demenz. Bei RT 014 lag kein Risikofaktor vor sowie keine Demenz oder Infektionen des Gastrointestinaltraktes. Bei den permanenten RT traten zum Zeitpunkt der ersten Abnahme keine Besonderheiten auf (* Risikofaktoren).

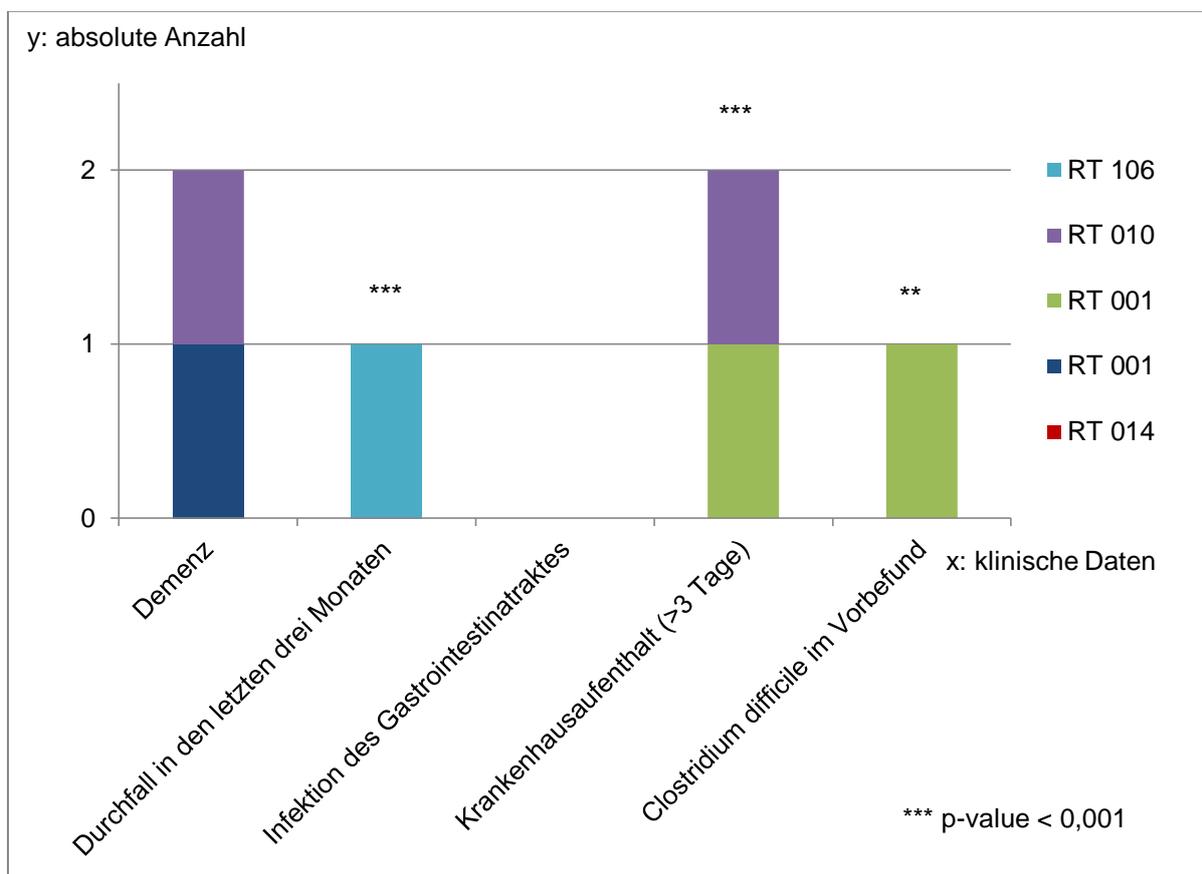


Abbildung 19: Verteilung der Risikofaktoren sowie Demenz und Infektionen des Gastrointestinaltraktes bezogen auf die 5 positiven *C. difficile*-Stämme zum Zeitpunkt der ersten Abnahme

Die 5 Proben kamen aus 4 verschiedenen Heimen. Die RT 001 und RT 073 waren einmal im selben Heim aus dem Saar-Pfalz-Kreis vertreten.

Die 3 anderen RT (RT 010, RT 014, RT 106) kamen aus dem Regionalverband Saarbrücken. Alle anderen Landkreise des Saarlandes waren bei den erneut positiv getesteten Proben nicht vertreten.

Insgesamt nahmen 16 Heime aus dem Saarland bei der zweiten Runde erneut teil. Davon 7 Heime aus dem Regionalverband Saarbrücken, 4 aus dem Landkreis Saarlouis, 2 aus dem Landkreis St. Wendel und aus dem Saar-Pfalz-Kreis und 1 Heim aus dem Landkreis Neunkirchen. Landkreis Merzig-Wadern schickte zum Zeitpunkt der zweiten Abnahme keine Proben mehr ein.

5. Diskussion

In dieser Studie wurde die Prävalenz der asymptomatischen *C. difficile*-Träger in Alters- und Pflegeheimen im gesamten Saarland erfasst. Diese Informationen sind bezüglich möglicher Ansteckungsquellen durch asymptomatische Träger für andere Bewohner und das Personal von großer Bedeutung. Auch in Hinblick auf eine etwaige Krankenhauseinweisung ist mit der Gefahr zu rechnen, dass andere Patienten angesteckt werden bzw. eine mögliche Antibiotikatherapie zum Ausbruch der Besiedlung führen kann. Insgesamt sind 20-30 % der erwachsenen Krankenhauspatienten mit *C. difficile* besiedelt [13]. Außerdem wird *C. difficile* in 20-25 % der Fälle für die AAD verantwortlich gemacht [80].

Zacharioudaki et al. konnten in einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2014 zeigen, dass besiedelte Patienten ein sechsfach höheres Risiko hatten eine Infektion zu entwickeln als nicht besiedelte Patienten. Zudem waren 8 % der eingelieferten Patienten asymptomatische Träger von toxischen *C. difficile*-Stämmen [83].

Die Heime zeigten ein großes Interesse an der Teilnahme an dieser Studie, was sich in der Teilnehmerzahl widerspiegelt. Obwohl die Anzahl innerhalb der Heime ganz unterschiedlich war, belief sich die Quote insgesamt auf erfreuliche 48,2 %. Ein Heim schickte beispielsweise 87 Proben ein, im Vergleich dazu ein anderes Heim 3 Proben (6,7 % vs. 0,23 %: prozentualer Anteil des jeweiligen Heimes an der Gesamtanzahl der teilnehmenden Probanden).

Das Durchschnittsalter in den in der Einleitung erwähnten Studien (vgl. Tabelle 1) lag zwischen dem 70. und dem 86. Lebensjahr (70-85,6 Jahre). In dieser Studie beteiligten sich Bewohner mit einem ähnlichen Durchschnittsalter. Dieses lag bei 80,12 Jahren, somit ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit des Alters.

Die Bedeutung der gesunden Träger von *C. difficile* wurde weltweit wenig untersucht. Eine Studie aus Boston/USA konnte zeigen, dass asymptomatische Träger einen signifikant höheren IgG-Antikörperspiegel ($p < 0,001$) gegen das Toxin A aufweisen als Patienten, die an CDI erkrankten. Daher ist anzunehmen, dass reine Träger eine stärkere Immunantwort auf *C. difficile* zeigen und der Patient daher keine Symptome entwickelt.

Der IgG-Spiegel gegen Toxin B und gegen Stämme, die keine Toxingene aufwiesen, war ebenfalls, aber nicht signifikant, erhöht. Der IgM-Spiegel gegen Stämme, die kein Toxin zeigten, war leicht erhöht bei asymptomatischen Trägern von

C. difficile-Stämmen. Die IgA- und IgM-Spiegel gegen Toxin A, Toxin B und das binäre Toxin waren nicht signifikant erhöht [75]. Trotzdem können asymptomatische Träger die Quelle möglicher Ausbrüche sein.

Nicht nur die direkte Umgebung des Patienten (u.a. Telefon, Bettgitter, Klingelknopf und Nachttisch) birgt die Gefahr der Infizierung, da dort eine hohe Kontaminationsrate herrscht. Die Haut des Patienten stellt ein ähnliches Risiko da. Riggs et al. nahmen Abstriche von Brust, Bauch und Leiste sowie der direkten Umgebung und haben eine signifikant höhere Rate an Haut- und Umgebungskontamination bei CDI-Patienten als bei asymptomatischen Trägern gefunden ((78 % zu 61 % Hautkontamination; 78 % zu 59 % Umgebungskontamination) ($p \leq 0,007$)). Asymptomatische Träger besaßen wiederum eine signifikant höhere Rate als nicht besiedelte Bewohner (61 % zu 19 % Hautkontamination; 59 % zu 24 % Umgebungskontamination) (($p \leq 0,004$)). Es konnte gezeigt werden, dass in 87 % der Fälle die gleichen Stämme in Haut- und Stuhlabstrichen nachgewiesen wurden und in 58 % der Fälle der gleiche Stamm in Umgebungs- und Stuhlabstrich. Die niedrige Übereinstimmung in der Umgebungs- und Stuhlkontamination gab Hinweise darauf, dass die Stämme entweder von einem anderen Bewohner stammten, der sich vorher in dem Zimmer befand oder dass die Patienten mit mehreren Stämmen besiedelt waren [3, 79].

In dieser Arbeit wurden 5,1 % der asymptomatischen Heimbewohner positive auf *C. difficile* getestet. In verschiedenen Studien lag die Rate der *C. difficile* Besiedlungen in Alters- und Pflegeheimen bei 0-51,5 % (vgl. Tabelle 1) [50, 51, 72, 76]. Arvand et al. wies 4,6 % ($n= 11/240$) positive *C. difficile* Befunde in den Jahren 2010 und 2011 in Altersheimen in Hessen/Deutschland nach [50]. In Irland betrug die Prävalenz der asymptomatischen *C. difficile* Kolonisierung in Alters- und Pflegeheimen 10 % ($n= 10/100$) [68].

Die im klinischen Alltag relevanten Ribotypen sind spezielle Stämme, die gehäuft auftreten und vermehrt Symptome hervorrufen. Die RT in dieser Arbeit sind vergleichbar mit denen im klinischen Alltag nur dass die detektierten Stämme in dieser Arbeit keine Symptome hervorriefen.

Die häufigsten Ribotypen im Saarland waren der RT 001 und der RT 014 (10,6 %, $n= 7/66$); gefolgt von den hypervirulenten RT 027 (7,6 %, $n= 5/66$) und RT 126 (6,1 %, $n= 4/66$), der RT 078 kam einmal vor (1,5 %, $n= 1/66$).

In Hessen traten am häufigsten RT 001 (18,2 %, n= 2/11) und RT 014 (27,3 %, n= 3/11) auf. Die hypervirulenten RT 027 und 078 kamen dagegen nicht vor [50]. Im Unterschied zu dieser Arbeit wurden auch Probanden aus der Normalbevölkerung getestet. Dabei konnte bei 2 von 249 Personen eine *C. difficile* Besiedlung festgestellt werden (0,8 %, n= 2/249). Der Anteil positiver Besiedlungen lag damit unter den Angaben in der Literatur. Der Anteil der positiven Besiedlung der Normalbevölkerung in der Literatur schwankt von 2 % bis 15 % [5, 6, 7, 8, 27, 35, 50, 81]. Arvand et al. Studie ist die erste veröffentlichte Arbeit zu diesem Thema in Deutschland. Die Fallzahl war dabei deutlich kleiner als in dieser Arbeit: lediglich 240 Heimbewohner hatten daran teilgenommen. Riggs et al. konnte in der Gruppe der asymptomatischen Trägern 13 NAP1-Stämme (37 %, n= 13/35) nachweisen [3].

In anderen Studien, vor allem aus den USA, wurde ebenfalls hauptsächlich der RT 027 in Heimen gefunden (Tabelle 1), oft begleitet mit *C. difficile* Ausbrüchen oder vereinzelt auftretenden *C. difficile* Fällen.

Der häufigste Ribotyp bei schweren CDI in deutschen Krankenhäusern war mit Abstand der RT 001 (70 %). RT 078 (23 %), RT 027 (15 %), RT 014 (15 %) und RT 046 (10 %) folgten auf den weiteren Plätzen [48]. Eine andere Studie aus Europa aus dem Jahr 2011 zeigte, dass der RT 014/020 am häufigsten auftrat (15,7 %). RT 001 kam in 9,3 % der Fälle vor, RT 078 in 7,8 % und RT 027 in 4,8 % der Fälle. Der RT 014/020 und RT 001 konnte in fast allen Ländern Europas nachgewiesen werden, während der RT 027 vor allem in Irland, Großbritannien, Finnland, Polen und der Schweiz auftrat [29]. Die beiden Studien zeigten die Anzahl und Verteilung der Ribotypen bezogen auf alle CDI-Fälle in Krankenhäusern, beinhalten aber nicht die asymptomatische Besiedlung in Alters- und Pflegeheimen.

In einer weiteren Studie aus Hessen/Deutschland, machte der RT 001 den größten Anteil bei CDI-Fällen aus (31,8 %), der RT 027 kam in 26,6 % der Fälle vor, RT 014 in 9,8 % sowie RT 078, RT 002 und RT 029 in jeweils 2,8 % der Fälle. Die restlichen RT hatten einen prozentualen Anteil von weniger als 2 % [49].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die RT 001 und 014 den größten Anteil der nicht hypervirulenten RT ausmachten und der RT 027 und RT 078 den größten Anteil der hypervirulenten RT. Diese Angaben beruhten alle auf CDI-Fälle in Krankenhäusern und nicht auf der asymptomatischen Besiedlung in Alters- und Pflegeheimen. Trotzdem ähnelten sich die Ergebnisse beim Auftreten der häufigsten

RT im Saarland/Deutschland und Hessen/Deutschland und bieten somit eine gute Vergleichbarkeit. Mit dieser Arbeit aus Alters- und Pflegeheimen aus dem Saarland konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der RT 126 dort gehäuft auftrat (6,1 %, n= 4), aber asymptomatisch blieb.

Lediglich die Studie aus Hessen/Deutschland von Arvand et al. entsprach dieser Arbeit im Bezug auf die Vorgehensweise am meisten [50]. In den anderen Studien wurde zwar die genaue Zahl der asymptomatischen Besiedlung in Alters- und Pflegeheimen ermittelt, es kam aber zu keiner weiteren Differenzierung bezüglich der Ribotypen.

Die weitere Differenzierung bezüglich der Ribotypisierung der einzelnen Stämme ist wichtig um mögliche Ausbrüche erkennen zu können. Der RT 027 wurde in dieser Arbeit dreimal in dem gleichen Altenheim gefunden. Alle 3 Probanden hatten in den letzten 3 Monaten Durchfall. Zwei der Bewohner waren weiblich und haben sich möglicherweise ein Zimmer geteilt. Einer der beiden war vor der ersten Entnahme länger als 3 Tage im Krankenhaus und hat sich eventuell dort angesteckt.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich aber nicht ermitteln, ob die Bewohner erst Durchfall hatten und daraufhin ins Krankenhaus gekommen sind oder ob sie im Krankenhaus waren und danach Durchfall entwickeln haben. Die anderen zwei positiven RT 027 hatten in der Zeit vor der ersten Entnahme keinen Durchfall. Zwei der weiteren hypervirulenten RT, RT 078 und RT 126 kamen in einem Fall aus dem gleichen Heim. Keiner der Bewohner mit diesen Stämmen hatte Durchfall in den letzten 3 Monaten vor der ersten Entnahme. Zwei waren für mehr als 3 Tage im Krankenhaus gewesen. Die anderen Risikofaktoren trafen nicht zu. Interessant ist, dass der RT 126, obwohl er mit seinem binären Toxin als besonders virulent gilt, niemals mehrfach in einem Heim auftrat, sondern immer nur vereinzelt und somit nicht für einen Ausbruch verantwortliche war.

Von großer Bedeutung bei der Bewertung der Anzahl und Verteilung der besiedelten Bewohner sind die Heimgröße und Begleiterkrankungen. Die Zahl der Bewohnerplätze variierte zwischen 21 und 170 Plätzen. 11 von 38 Heimen waren ohne *C. difficile*-Befund (28,9 %). Somit waren 27 von 38 getesteten Heimen (71,1 %) mit *C. difficile* befallen. Das Auftreten der *C. difficile*-Besiedlung variierte in den einzelnen Heimen zwischen 0 % und 19 %. 5 Heime hatten einen prozentualen Anteil von > 10 %, die restlichen 33 einen von 0 %-10 %. Besonders interessant war,

dass sich bei der Prävalenz über 10 % oft die gleichen RT in einem Heim finden ließen. Besonders in Heim 012 (19 %) wurde dreimal der RT 027 gefunden. In der Studie aus Hessen/Deutschland war das Auftreten von *C. difficile*-Besiedlung deutlich niedriger. Hier variierte es zwischen 0 % und 10 %. Zudem waren 3 von 11 Heimen in Hessen ohne *C. difficile*-Befund (27,3 %) [50]. Der prozentuale Anteil der Heime ohne Besiedlung deckten sich in der Arbeit aus Hessen/Deutschland und dem Saarland/Deutschland (27,3 % vs. 28,9 %).

Ein möglicher Grund für das Fehlen der hypervirulenten RT in Hessen kann der Zeitunterschied von 3 Jahren (Hessen 2010-2011; Saarland 2013-2014) gewesen sein. Deren Hypothese, dass die hypervirulenten RT lediglich bei der Infektion und nicht bei der asymptomatischen Besiedlung auftreten, kann mit dieser Arbeit widerlegt werden. Trotzdem sind auf diesem Gebiet weitere Studien nötig um eine Verteilung der RT und das Auftreten bestimmter Stämme in Alters- und Pflegeheimen in ganz Deutschland und Europa feststellen zu können.

Um ein Auftreten innerhalb Deutschlands, besonders innerhalb des Saarlandes aufzeichnen zu können, wurde die regionale Verteilung über die einzelnen Landkreise im Saarland untersucht und ausgewertet, mit dem Ergebnis, dass sich die Ribotypen gleichmäßig über die einzelnen Landkreise im Saarland verteilen. Eine Häufung war im Regionalverband Saarbrücken zu finden, welche sich durch die größte Anzahl an Teilnehmern in dieser Region erklären lässt. Insgesamt war hier die Dichte der Bevölkerung im Saarland am größten. In allen Landkreisen, außer in Merzig-Wadern, waren noch nicht klassifizierte RT zu finden. Hypervirulente RT kamen in allen Landkreisen, außer in Neunkirchen, vor. Der RT 126 (n= 4) verteilte sich auf 4 verschiedene Kreise (Saarlouis, St. Wendel, Saar-Pfalz, Regionalverband Saarbrücken), während der RT 027(n= 5) sich auf 2 Kreise beschränkte (Regionalverband Saarbrücken, Merzig-Wadern). Die Landkreise ließen somit keine Rückschlüsse bezüglich Virulenz und Auftreten der einzelnen Ribotypen zu.

An Hand des Toxinprofils lässt sich bereits eine erste Bewertung der Stämme und des möglichen Verlaufs bezüglich der Schwere der Erkrankung vornehmen.

Von den positiv getesteten Proben waren 54 von 66 (81,8 %) toxisch, bei den Verlaufskontrollen 60 % (n= 3/5). Im Vergleich dazu waren es in Hessen 10 von 11

(90,9 %) [50]. In Ohio/USA waren 52 % der asymptomatischen Träger mit toxischen *C. difficile*-Stämmen besiedelt [3]. In Irland wurden von Ryan et al.

9 von 10 *C. difficile*-Stämme positiv auf Toxin B und 7 von 10 positiv auf Toxin A getestet. Bei einem Stamm war kein Toxin nachweisbar [68].

Die toxischen Stämme bildeten auch unter den asymptomatischen Trägern den größten Teil der *C. difficile*-Stämme. Da diese Stämme für die CDI und seine Symptome verantwortlich sind, besteht eine größere Gefahr eines Ausbruchs durch Übertragung auf nicht betroffene Bewohner/Patienten. Die hypervirulenten Stämme, die das binäre Toxin (tcdA, tcdB, cdtA, cdtB) tragen, sind besonders für die schweren Verläufe der CDI verantwortlich. Trotzdem gibt die Toxizität keine Aussage über den Verlauf. Diese Arbeit hat gezeigt, dass auch asymptomatische Träger *C. difficile*-Stämme mit dem binären Toxin tragen können ohne Symptome zu zeigen

(18 %; n= 12/66). In Hessen wurde kein *C. difficile*-Stamm gefunden, welcher dieses Toxin trug [50]. Die Toxin-negativen Stämme haben ein geringes infektiöses Profil und gelten als apathogen. Für die asymptomatischen Träger gilt generell, dass keine Behandlung empfohlen wird, da keine Symptome auftreten und die Nebenwirkungen der Behandlung und mögliche Folgen zu groß wären. Eine Isolation der betroffenen Bewohner ist nicht nötig.

Vom klinischen Aspekt her ergeben sich für die Patienten/Bewohner einige besondere Umstände bzw. Risikofaktoren. Das Alter an sich ist kein Risikofaktor für die Besiedlung mit *C. difficile* [77]. Die Begleitumstände jedoch sorgen dafür, dass es für ältere Menschen ein höheres Risiko gibt an CDI zu erkranken oder besiedelt zu werden. Dazu gehören:

- Immunoseneszenz
- veränderte Darmflora
- verminderte Antikörper-Antwort auf *C. difficile* Toxin
- Komorbiditäten
- erhöhte Antibiotikagabe
- vermehrte und längere Krankenhausaufenthalte [77, 78]

Folgende Risikofaktoren haben sich für die Besiedlung mit *C. difficile* in dieser Arbeit herausgestellt:

- Durchfall in den letzten 3 Monaten
- Krankenhausaufenthalt > 3 Tage
- *Clostridium difficile* im Vorbefund

Dies spiegelt sich auch in anderen Studien wider [3, 27, 50, 68, 77, 81]. Neben den oben genannten Risikofaktoren spielt natürlich auch die Antibiotikagabe eine wesentliche Rolle [77].

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2014 von Ziakas et al [77] konnte ermittelt werden, dass es weltweit 14,8 % asymptomatische Träger für toxisches *C. difficile* Stämme in Alten- und Pflegeheimen gab, basierend auf 9 geeigneten Studien. Hier konnte gezeigt werden, dass CDI im Vorbefund im Durchschnitt eine Odds Ratio (OR) von 6,07, basierend auf den Studien von Riggs et al., Ryan et al. und Arvand et al. [3, 50, 68] hat, d.h. CDI im Vorbefund trat 6,07-mal häufiger bei besiedelten Probanden auf. Beim Krankenhausaufenthalt lag die OR im Schnitt bei 2,11, basieren auf Riggs et al., Arvand et al. und Walker et al. [3, 51, 77, 81]. Antibiotikagabe kam auf ein OR von 3,68, basierend auf den oben genannten Studien. Protonenpumpenhemmer, männliches Geschlecht und Harninkontinenz hatten eine OR von 0,80, 0,86 und 0,84. Stuhlinkontinenz und Diabetes kamen auf eine OR von 1,50 und 1,18. Diese Punkte traten nicht häufiger bei besiedelten als bei nicht besiedelten Probanden auf [77].

Von besondere Bedeutung sind die Risikofaktoren Durchfall in den letzten 3 Monaten, Krankenhausaufenthalt > 3 Tage und *C. difficile* im Vorbefund zu. Ersterer kam deutlich öfter bei den positiven als bei den negativen Befunden vor (13,6 % vs. 3,2 %). Durchfall hat bei den besiedelten Probanden ein 4,72-fach höheres Auftreten (OR=4,72), Krankenhausaufenthalt und *C. difficile* im Vorbefund konnte ebenfalls deutlich häufiger bei den positiven als bei den negativen Befunden detektiert werden (27,3 % vs. 10,6 % / OR=3,16); (9,1 % vs. 0,9 % / OR=11,3). Arvand et al. stellte fest, dass CDI im Vorbefund bei 10 % positiven Befunden auftritt und bei 0,43 % negativen Befunden (10 % vs. 0,43 %). Die Prävalenz betrug 13,2, d.h. es lag ein 13,2-fach höheres Auftreten für CDI im Vorbefund bei besiedelten Probanden vor als bei nicht besiedelten Probanden. Krankenhausaufenthalt betraf 50 % der positiven

Proben und 13 % der negativen Befunde (50 % vs. 13 %). Die Prävalenz lag bei 5,85. Antibiotikatherapie war bei 50 % der positiven Fällen angegeben und bei 15,2 % der negativen Fällen (50 % vs. 15,2 %). Die Prävalenz lag hier bei 5,00. Bei allen 3 Faktoren betrug der p-value $\leq 0,01$, womit ein signifikanter Unterschied bestand und die Punkte als Risikofaktoren zu bewerten waren [50].

Demenz, Harn- und Stuhlinkontinenz, chronische Wunden, PEG-Sonde und das Alter wurden nicht als Risikofaktoren eingestuft [50].

Insgesamt nehmen Alter, Geschlecht, Demenz, Infektionen des Gastrointestinaltraktes und Komorbiditäten folglich eine untergeordnete Rolle bei der Besiedlung und Infektion ein. Hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den besiedelten und den nicht besiedelten Probanden der Studien. Auch die zeitliche Länge des Aufenthalts in einem Alters- und Pflegeheim stellte keinen Risikofaktor da (($p=0,19$) [3], $p=0,54$) [68]) [77].

Im direkten Vergleich der beiden Studien zeigte sich, dass bei den negativen Befunden dem Krankenaufenthalt eine ähnliche Bedeutung im Saarland und in Hessen zukommt (10,6 % vs. 13 %), bei den positiven Befunden lag ein deutlicher Unterschied vor: 27,3 % im Saarland vs. 50 % in Hessen. CDI im Vorbefund in Hessen kam bei den positiven Befunden auf 10 % und *C. difficile* im Vorbefund im Saarland auf 9,1 %. Bei den negativen Fällen waren das in Hessen 0,43 % und im Saarland 0,9 %. Die Vergleichbarkeit der untersuchten Risikofaktoren ist jedoch kritisch zu bewerten, da unterschiedliche klinische Daten erfasst wurden. Antibiotikatherapie wurde in dieser Arbeit nicht erfragt. Durchfall als einzelnes Symptom wurde in Hessen nicht abgefragt. Hier wurden der Kontakt zu Durchfallpatienten und eine Infektion mit *C. difficile* im Vorbefund erfragt. Im Saarland dagegen wurde nicht konkret nach einer Infektion durch *C. difficile* gefragt, sondern lediglich nach dem Bakterium im Vorbefund. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist damit aber auch die Infektion erfasst worden, da es kein spezielles Screening auf *C. difficile* im Stuhl gibt. Leitliniengerecht wird eine Stuhlprobe erst dann untersucht, wenn auch Symptome wie Durchfall auftreten. Der Risikofaktor dieser Arbeit „Durchfall in den letzten 3 Monaten“ ist ebenfalls kritisch zu beurteilen, da genauere Zeitangaben fehlen. Der Durchfall konnte zu jeder Zeit in den 3 Monaten aufgetreten sein, d.h. theoretisch auch zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Womit die Probanden eigentlich nicht als asymptomatisch gelten würden. Garg et al. fand heraus, dass nur 15,2 % der Alters- und Pflegeheimbewohner Durchfall überhaupt als Symptom bei

CDI haben, womit es nicht als zuverlässiger Indikator gelten kann [61]. Häufiger traten ein veränderter Geisteszustand, Fieber und Bauchschmerzen mit weichem Stuhl auf. McFarland konnte ebenfalls oft Fieber (30 %) und Bauchschmerzen (69 %) feststellen [82].

Insgesamt ist zu Zeiten der Zunahme an multiresistenten Keimen eine Antibiotikaempfindlichkeitstestung in Hinblick auf die therapeutischen Maßnahmen von besonderer Bedeutung. Darüber hinaus werden einige Standardantibiotika mit der Entstehung von CDI in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund wurden neben den therapeutisch relevanten Antibiotika auch einige Antibiotika untersucht, die als Therapie von beispielsweise Atemwegserkrankungen zum Einsatz kommen. Die Antibiotikaempfindlichkeit lag in dieser Studie für Vancomycin und Metronidazol bei 98,5 %, die für Moxifloxacin bei 87,9 %, für Clarithromycin bei 78,8 % und für Rifampicin bei 97 %. Es gibt keine vergleichbaren Studien zur Antibiotikaempfindlichkeit speziell bei asymptomatischen Trägern. Dafür gibt es Studien, die die Antibiotikaempfindlichkeit bei symptomatischen *C. difficile*-Stämmen untersuchten.

In einer Studie aus dem Saarland/Deutschland von 01.2011- 02.2012 wurden 99,7 % der Stämme sensibel auf Metronidazol und Vancomycin getestet. Lediglich ein Stamm war jeweils resistent. In beiden Fällen war es ein nicht klassifizierter RT [84]. In dem Universitätsklinikum Heraklion/Griechenland wurden von 2004-2010 alle eingegangenen Stuhlproben von Durchfallpatienten auf *C. difficile* untersucht. Insgesamt waren 263 (6 %) positiv. Die Antibiotikaresistenztestung ergab eine Resistenz von 3 % für Metronidazol und keine Resistenz für Vancomycin, jedoch waren 3 Isolate auffällig, da der MHK bei 2 µg/ml lag [85]. Insgesamt ist die Empfindlichkeit von *C. difficile* auf Metronidazol und Vancomycin weltweit sehr gut, obwohl zunehmend über steigende MHK für Vancomycin und Heteroresistenz bei Metronidazol berichtet wird [86].

Rifampicin schnitt ähnlich gut ab. 97 % der Stämme waren sensibel. Auffällig war eine Häufung der Resistenz beim RT 027. Dieser war signifikant erhöht gegenüber anderen Ribotypen ($p=0,0047$). Gleiches wurde in einer anderen Studie aus dem Saarland herausgefunden. Hier trat der RT 027 ebenfalls gehäuft bei Rifampicinresistenzen auf ($p=0,005$) [84]. Huang et al. stellte heraus, dass in verschiedenen Studien die Resistenzen bei Rifampicin/Rifaximin (beide Antibiotika

haben eine äquivalente Antibiotikaempfindlichkeit [84, 92]) sehr unterschiedlich waren [86]. Während in einer Studie aus den USA lediglich 2,7 % und aus Kanada keine Stämme resistent waren, wiesen dagegen die Stämme aus China Resistenzen von 25 % auf [86, 87, 88, 89].

Clarithromycin und Moxifloxacin haben in dieser Arbeit deutlich schlechter abgeschnitten. 21,2 % der Stämme waren resistent gegen Clarithromycin. Besonders die RT 027 und RT 126 waren davon betroffen (RT 027 60 % resistent; RT 126 75 % resistent). Aber auch andere Stämme hatten eine verminderte Sensibilität (RT 001, RT 010, RT 012, RT 014, RT 015, RT 020, RT 106). Im Schnitt lagen hier die Resistenzen weltweit bei über 50 % [86]. Im Saarland lagen sie dagegen bei 42 % [84]. Die RT der resistenten Stämme weltweit sind vergleichbar mit denen in dieser Arbeit.

12,1 % der Stämme wiesen in dieser Studie Resistenzen gegenüber Moxifloxacin auf, betroffene Stämme waren: RT 001, RT 027, RT 053 und RT 078.

Bei von Müller et al. waren es mit 57 % deutlich mehr [84]. In der Studie von Huang et. al waren es im Schnitt 36 % [86]. Hiervon waren, neben den bereits oben genannten, besonders der RT 017 betroffen. In Schottland und Großbritannien war dies der RT 106 [86, 90, 91]. Besonders kombinierte Resistenzen von Clarithromycin und Moxifloxacin konnten bei den epidemischen Stämmen 001, 027 und 078 gefunden werden [84], in dieser Arbeit bei RT 001 und RT 027.

Insgesamt sind die Resistenzen gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin in dieser Arbeit deutlich geringer als bei vergleichbaren Studien weltweit. Daraus kann man schließen, dass die Stämme asymptomatischer Träger im Moment noch eine größere Sensibilität gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin aufweisen als die CDI verursachenden Stämme.

Möglicher Grund dafür kann die Tatsache sein, dass sich vermehrte Patienten im Krankenhaus z.B. nach einer Antibiotikatherapie anstecken und Symptome entwickelt. Durch vermehrten Einsatz von Antibiotika und Auftreten von *C. difficile* im Krankenhaus konnten sich Resistenzen entwickelt. Möglicherweise sind die Krankenhauskeime davon mehr betroffen als die Keime in Alters- und Pflegeheimen. In der Studie von Müller et al. aus dem Saarland traten die epidemischen RT häufiger auf als in dieser Arbeit; oft hatten die epidemischen Stämme vermehrt Resistenzen gegenüber Moxifloxacin und Clarithromycin entwickelt [84]. Somit stellte die

niedrigere Anzahl an epidemischen Stämmen einen möglichen Grund für die geringere Resistenzrate da.

In den kommenden Jahren wird es aber noch zu Änderung im Resistenzverhalten der Stämme in Alters- und Pflegeheimen kommen. Eine große Rolle würde dies jedoch nicht spielen, da die reine Besiedlung nicht therapiebedürftig ist.

Makrolide (z.B. Clarithromycin) werden generell nicht zur Behandlung der CDI eingesetzt, werden aber häufig gegen andere Infektionen verschrieben. Darüber hinaus haben sie einen Effekt auf die Erregerbesiedlung im Darm [84, 94]. Flourchinolone, besonders Moxifloxacin, haben ein breites Wirkspektrum, das auch Anaerobier mit einschließt. Trotzdem wird dem Antibiotikum eine CDI auslösende Wirkung zugesprochen [34]. Rifampicin hat in vitro eine gute Wirksamkeit gegen *C. difficile*. Eine Kombinationstherapie mit Metronidazol hat keine besseren Ergebnisse als eine Monotherapie mit Metronidazol erbracht [93]. Wobei hier weitere Studien erforderlich wären. Zumindest könnte Rifampicin eine mögliche Alternative beim Therapieversagen der gängigen Antibiotika sein. Insgesamt ist die Antibiotikaempfindlichkeit für die beiden wichtigen Behandlungsmöglichkeiten Metronidazol und Vancomycin sehr erfreulich und auch Rifampicin schneidet sehr gut ab. Trotzdem ist es wichtig die Resistenzentwicklung in den kommenden Jahren weiterhin zu untersuchen um die Empfehlungen für die Therapie anpassen zu können. Die Resistenzmechanismen sind bei beiden Medikamenten nicht ausreichend bekannt, was u.a. mit dem geringen Auftreten dieser einhergeht. Trotz der Nähe von *C. difficile* zu Vancomycinresistenten Darmkeimen konnte das Bakterium deren Resistenzmuster glücklicherweise noch nicht übernehmen [84]. Zusammenfassend ist somit eine Routinetestung der Empfindlichkeit therapeutischer Antibiotika bislang nicht notwendig.

Verlaufsuntersuchungen sind interessant, um eine Entwicklung der Besiedlung beobachten zu können, da eine persistierende Kolonisation anders zu bewerten wäre, als eine temporäre Besiedlung. In keinen der angegebenen Studien wurde eine Verlaufskontrolle der Proben vorgenommen.

Da in dieser Arbeit nur noch 5 (von 30 untersuchten Proben) positive *C. difficile* Befunde auftraten, kann man von einer temporären Besiedlung der Bewohner ausgehen. Die vorher getesteten hypervirulenten Stämme konnten bei den Kontrollen nicht mehr nachgewiesen werden. Hier gab es möglicherweise in der Zwischenzeit eine Behandlung derer (falls diese doch noch Symptome entwickelt hätten). In einem Fall wurde die Eradikation innerhalb der zwei Entnahmezeitpunkte vorgenommen und konnte mit einem negativen kulturellen Ergebnis bestätigt werden. Von den vormals 12 Stämmen mit binärem Toxin konnten nur noch 4 Probanden teilnehmen. Einige dieser Teilnehmer werden in der Zwischenzeit wahrscheinlich verstorben sein. Die 4 Proben trugen nicht das binäre Toxin. Darüber hinaus konnten keine neuen hypervirulenten Stämme getestet werden. Bei den apathogenen, toxin-negativen Stämmen wurden nach einem Jahr folgende gefunden: der eine Stamm war der Gleiche wie im Vorjahr, bei dem anderen hatte es einen RT-Wechsel gegeben. Daraus lässt sich folgern, dass die Toxigenität nicht der ausschlaggebende Punkt für die Dauer der Besiedlung ist und keine direkte Aussagekraft darüber hat. Ein RT-Wechsel kann entweder damit zusammenhängen, dass das Zimmer gewechselt wurde und der Bewohner zwischenzeitlich behandelt worden ist und sich wieder kolonisiert hat oder dass der Bewohner vorher schon mit mehreren Stämmen besiedelt war.

Dank der guten Vorarbeit des MRSAar Netzes konnte in dieser Studie erfreulicherweise ein großer Anteil der Bewohner in Alters- und Pflegeheime im Saarland eingebunden werden (48,2 %). Das Netz besteht aus einem Team, welches sich durch Beratung, ständiger Bereitschaft durch ein Notfalltelefon und Informationsveranstaltungen auszeichnet.

Obwohl sich weniger als 50 % der Alters- und Pflegeheimbewohner im Saarland bereit erklärt hatten an dieser Studie teilzunehmen, konnte eine ausreichende Anzahl an Proben gesammelt werden um Aussagen über Verteilung und Auftreten von *C. difficile* zu treffen. Eine große Zahl der Bewohner war zwar bereit für einen Nasen-Rachen-Abstrich im Rahmen der MRSA-Studie des MRSAar Netzes, aber ein

Analabstrich wurde oft abgelehnt. Problem dabei war sicherlich auch, dass einige Bewohner gesetzlich betreut waren. Für Viele wird ein Analabstrich als unangenehm und belastend empfunden, weshalb die Teilnahme verweigert wurde.

Einige Heime hatten eine Teilnahme von vornherein abgelehnt. Möglicherweise lag hier kein Interesse an der Studie vor oder die zusätzliche Arbeit, die Entnahme der Abstriche, konnte nicht bewältigt werden. Beim 2. Umlauf war das Interesse an einer Verlaufsuntersuchung seitens der zuständigen Mitarbeiter und Bewohner in den Heimen groß. 30 von 66 (45,5 %) Bewohner stimmten einer 2. Teilnahme zu.

Von den Übrigen waren einige Heime und Bewohner zu keiner 2. Teilnahme bereit, viele waren aber in der Zwischenzeit bereits verstorben oder in ein anderes Heim umgezogen. Bei einigen Heimen ließ die personelle Situation zu diesem Zeitpunkt keine weitere Teilnahme zu.

Abschließend sind im Folgenden die Stärken und limitierenden Faktoren kurz aufgeführt:

- die Rekrutierung durch das MRSAar Netz verlief komplikationslos
- eine große Teilnehmerquote und Probenanzahl konnte erreicht werden
- der diagnostische Standard, die kulturelle Anzucht, erwies sich als sehr gut geeignetes Mittel zur Kultivierung der *C. difficile* Stämme
- aufgrund eingeschränkter Mittel wurde die Feintypisierung der einzelnen Stämme, die mehrmals in einem Heim auftraten, nicht vorgenommen, somit fehlt der Nachweis, woher der Stamm stammt (Krankenhaus vs. Altersheim)
- die klinischen Aspekte der Bewohner wurden nur oberflächlich erfragt, detailliert Angaben fehlen, würden aber auch den Rahmen dieser Arbeit sprengen

Insgesamt liegt die Prävalenz der asymptomatischen Besiedlung in Alters- und Pflegeheimen im Saarland auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie in der Normalbevölkerung. Die typischen nosokomialen Stämme können als Besiedlungskeime bei Bewohnern von Altersheimen nachgewiesen werden, insgesamt ist aber die Diversität der nachgewiesenen Ribotypen hoch und das Gesamtspektrum der Ribotypen unterscheidet sich grundlegend von dem Erregerspektrum bei symptomatischen älteren Patienten mit CDI.

Dass gleiche Stämme gehäuft in den einzelnen Heimen auftraten ist eine Rarität und spricht gegen eine relevante Ausbreitung in den einzelnen Einrichtungen.

Die meisten Bewohner sind nur passager mit *C. difficile* besiedelt und verlieren den Stamm innerhalb weniger Monate. Nur in einzelnen Fällen wurde eine chronische Besiedlung mit demselben Stamm oder eine Neubesiedlung mit einem anderen *C. difficile* Stamm beobachtet.

Das Handeln nach den aktuell empfohlenen Standards der Hygiene wird durch die Ergebnisse dieser Studie für die Bewohner von Altenheimen nachhaltig unterstützt:

- Asymptomatische Heimbewohner brauchen nicht gezielt auf *C. difficile* getestet, da sich die Prävalenz von *C. difficile* positiven gesunden Trägern nicht von der Prävalenz in der Normalbevölkerung unterscheidet und es innerhalb von Heimen in der Regel nicht zu einer besonderen Verbreitung epidemischer Ribotypen und Klonen kommt
- Nur Bewohner mit Durchfallerkrankung sollen auf *C. difficile* getestet und bei positivem Nachweis isoliert werden.
- Die besonderen Hygienemaßnahmen können aufgehoben werden sobald die Bewohner > 48 Stunden symptomfrei sind.
- Angehörige und Besucher können darüber informiert werden, dass in Altenheimen kein erhöhtes Risiko für die Übertragung von CDI besteht.
- Unabhängig davon sollten aber auch in allen Gemeinschaftseinrichtungen, d.h. auch in Altenheimen, die allgemeinen Regeln der Basishygiene eingehalten werden, um das gesunde Zusammenleben sicherzustellen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Hall IC, O'Toole E., *Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe. Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935;49:390-402
- [2] Bartlett, J.G., et al., *Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing Clostridia*. New England Journal of Medicine, 1978. 298(10): p. 531-534.
- [3] Riggs, M.M. et al, *Asymptomatic Carriers Are a Potential Source for Transmission of Epidemic and Nonepidemic Clostridium difficile Strains among Long-Term Care Facility Residents*, Clinical Infectious Diseases 2007; 45:992–8
- [4] Larson, H.E., et al., *Epidemiology of Clostridium difficile in infants*. J Infect Dis, 1982. 146(6): p. 727-33.
- [5] Friedman, N.D., et al, *Prevalence of Clostridium difficile colonization among healthcare workers*, BMC Infectious Diseases 2013, 13:459
- [6] Viscidi, R., Willey, S., Bartlett, J.G., *Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient populations*. Gastroenterology 1981, 81(1):5-9
- [7] Ozaki, E., Kato, H., Kita, H., Karasawa, T., Maegawa, T., Koino, Y., Matsumoto, K., Takada, T., Nomoto, K., Tanaka, R., et al.: *Clostridium difficile colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization*. J Med Microbio 2004, 53(Pt2):167-172.
- [8] Kato, H., Kita, H., Karasawa, T., Maegawa, T., Koino, Y., Takakuwa, H., Saikai, T., Kobayashi, K., Yamagishi, T., Nakamura, S., *Colonisation and transmission of Clostridium difficile in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis*. J Med Microbiol 2001, 50(8):720-727.
- [9] Joost, I., Speck, K., Herrmann, M., von Müller, L., *Characterisation of Clostridium difficile isolates by slpA und tcdC gene sequencing*, Int J Antimicrob Agents, 2009; 33 Suppl 1: 13-8
- [10] Rupnik, M. et al, *Clostridium difficile infections: new developments in epidemiology and pathogenesis*, Nat Rev Microbiol. 2009 Jul;7(7):526-36
- [11] Stein, J., Schröder, O., *Antibiotikaassoziierte Diarrhö und pseudomembranöse Kolitis*. In: Infektiologie des Gastrointestinaltraktes. WF Caspary, M Kist, J Stein (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006, pp. 265-276.
- [12] Högenauer, C., *Clostridium-difficile-Infektion – Prävention, Diagnose,*

Therapie/Christoph Högenauer.- 2. Auflage - Bremen: UNI-MED. 2014

- [13] Bartlett, J.G., (2002) *Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea*. N Engl J Med 346: 334–339
- [14] Dallal, R.M. et al., *Clostridium difficile: an underappreciated and increasing cause of death and complications*. Ann. Surg. 235, 363-372, 2002
- [15] Pepin, J. et al., *Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity*. Can. Med. Assoc. J. 171, 466-472, 2004
- [16] Loo, V.G. et al., *A predominantly clonal multiinstitutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality*. N Eng J Med 353, 2442-2449, 2005
- [17] Kuijper, E.J. et al., *Update of Clostridium difficile infections due to PCR ribotyp 027 in Europe 2008*, Euro Surveill. 13, pii: 18942, 2008
- [18] Kuijper, E.J., Coignard, B & Tull, P. *Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe*. Clin Microbiol Infect 12 (Suppl. 6), 2-18, 2006
- [19] Bartlett, J.G., *Antibiotic-associated diarrhea*. Clin Infect Dis 1992;15:573-581
- [20] Kelly, C.P., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., *Clostridium difficile colitis*. N Engl J Med 1994; 330:257-262
- [21] Gerding, D.N., *Disease associated with Clostridium difficile infection*. Ann Intern Med 1989; 110:255-257
- [22] Fekety, R., Shah, A.B., *Diagnosis and treatment of Clostridium difficile colitis*. JAMA 1993; 269:71-75
- [23] Bartlett, J.G., *Antimicrobial agents implicated in Clostridium difficile toxin-associated diarrhea or colitis*. Johns Hopkins Med J 1981;149:6-9
- [24] Johnson, S., *Recurrent Clostridium difficile infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes*. J Infect, 2009. 58(6): p. 403-10.
- [25] Bavishi, C., Dupont, H.L., *Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection*. Aliment Pharmacol Ther 2011;34(11-12):1269-81.
- [26] Fordtran, J.S., *Colitis due to Clostridium difficile toxins: underdiagnosed, highly virulent, and nosocomial*. Proc (Bayl Univ Med Cent) 2006;19(1):3-12.
- [27] Loo, V.G., Bourgault, A.M., Poirier, L., Lamothe, F., Michaud, S., Turgeon, N., Toye, B., Beaudoin, A., Frost, E.H., Gilca, R., Brassard, P., Dendukuri, N., Béliveau,

- C., Oughton, M., Brukner, I., Dascal, A., *Host and pathogen factors for Clostridium difficile infection and colonization*. N Engl J Med 2011; 365(18):1693-703.
- [28] Deshpande, A., Pant, C., Pasupuleti, V., Rolston, D.D., Jain, A., Deshpande, N., Thota, P., Sferra, T.J., Hernandez, A.V., *Association between proton pump inhibitor therapy and Clostridium difficile infection in a meta-analysis*. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10(3):225-33.
- [29] Bauer, M.P., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Brazier, J.S., Wilcox, M.H., Rupnik, M., Monnet, D.L., van Dissel, J.T., Kuijper, E.J., ECDIS Study Group. *Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey*. Lancet 2011; 377(9759):63-73
- [30] Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P., *Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea*. Lancet 2001; 357(9251):189-93.
- [31] Chang, J.Y., Antonopoulos, D.A., Kalra, A., Tonelli, A., Khalife, W.T., Schmidt, T.M., Young, V.B., *Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. J Infect Dis 2008;197(3):435
- [32] Schwan, C., et al., *Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria*. PLoS Pathog, 2009. 5(10): p. e1000626.
- [33] Soes, L.M., et al., *Risk factors for Clostridium difficile infection in the community: a case-control study in patients in general practice, Denmark, 2009-2011*. Epidemiol Infect, 2013: p. 1-12.
- [34] Pepin, J., et al., *Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for Clostridium difficile-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec*. Clin Infect Dis, 2005. 41(9): p. 1254-60
- [35] Surawicz, C.M. et al., *Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile infections*, Am J Gastroenterol 2013, 108; 478-498; doi:10.1038
- [36] Kuipers, E.J. and Surawicz, C.M., *Clostridium difficile infection*. Lancet, 2008. 371(9623): p. 1486-8.
- [37] Grünewald, T., Kist, M., Mutters, R., Ruf, B.R., Kern, W.V., *Clostridium-difficile-Infektion* Dtsch med Wochenschr 2010; 135(14): 699-703 DOI: 10.1055/s-0030-1251918

- [38] Weis, S., John, E., Lippmann, N., Mössner, J., Lübbert, C., *Clostridium-difficile-Infektionen (CDI) im Wandel der Zeit – ein Thema nur für den Internisten?* Zentralbl Chir 2014; 139(4): 460-468 DOI: 10.1055/s-0032-1328623
- [39] Lübbert, C, Endres, J., von Müller, L., *Übersichtsarbeit Clostridium-difficile-Infektion Leitliniengerechte Diagnostik- und Behandlungsoptionen*, Dtsch Arztebl Int. 2014 Oct 24; 111(43):723-31. doi: 10.3238/arztebl.2014.0723
- [40] Debast, S.B., Bauer, M.P., Kuijper, E.J., *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium difficile Infections*, Clin Microbiol Infect 2014; 20 Suppl 2: 1-26
- [41] Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M. et al, *A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea, stratified by disease severity*. Clin Infect Dis 2007, 45(3):302–307
- [42] Ebigbo, A., Messmann, H., *Problemfeld Clostridium-difficile-Infektion*, Med Klin Intensivmed Notfmed 2013, 108:624–627
- [43] Kuehn, B., *Scientists Seek Strategies to Prevent Clostridium difficile Infections* JAMA. 2011; 306(17):1849-1850. doi:10.1001/jama.2011.1569
- [44] Burckhardt, F., Friedrich, A., Beier, D., Eckmanns, T., *Clostridium difficile surveillance trends, Saxony, Germany*, Emerg Infect Dis 2008; 14: 691-2
- [45] Weiss, B., *Schwer verlaufende Clostridium-difficile-Infektionen: IfSG-Surveillancedaten von 2013*. Epidemiologische Bulletin 2014:27
- [46] Zaiss, N.H., Weile, J., Ackermann, G., Kuijper, E., Witte, W., Nübel, U., *A case of Clostridium difficile-associated disease due to the highly virulent clone of Clostridium difficile PCR ribotype 027, March 2007 in Germany*. Euro Surveill. 2007; 12(11):E071115.1.
- [47] Kleinkauf, N., Weiss, B., Jansen, A., Eckmanns, T., Bornhofen, B., Kuehnen, E., et al., *Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Germany*. Euro Surveill. 2007;12:E0711152
- [48] Zaiss, N.H., Witte, W., Nubel, U., *Fluoroquinolone resistance and Clostridium difficile, Germany*. Emerg Infect Dis. 2010; 16(4):675-677
- [49] Arvand, M., Vollandt, D., Bettge-Weller, G., Harmanus, C., Kuijper, E., *Clostridium difficile study group H: Increased incidence of Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Hessen, Germany, 2011 to 2013*. Eurosurveillance 2014; 19. pii: 20732

- [50] Arvand, M., Moser, V., Schwehn, C., Bettge-Weller, G., Hensgens, M.P., Kuijper, E.J., *High Prevalence of Clostridium difficile Colonization among Nursing Home Residents in Hesse, Germany* PLoS One. 2012; 7(1): e30183. Published online 2012 Jan 11. doi: 10.1371/journal.pone.0030183
- [51] Simor, A.E., Bradley, S.F., Strausbaugh, L.J., Crossley, K., Nicolle, L.E., *Clostridium difficile in long-term-care facilities for the elderly*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002; 23:696–703
- [52] Crogan, N.L., Evans, B.C., (2007) *Clostridium difficile: an emerging epidemic in nursing homes*. Geriatr Nurs 28: 161–164
- [53] Hensgens, M.P., Goorhuis, A., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Kuijper, E.J., (2010) *Changing epidemiology of infections in the Netherlands in 2008/09*. Ned Tijdschr Geneesk 2010.
- [54] Birgand, G., Blanckaert, K., Carbonne, A., Coignard, B., Barbut, F. et al., (2010) *Investigation of a large outbreak of Clostridium difficile PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006–2007 and associated clusters in 2008–2009*. Euro Surveill 15(25): 19597.
- [55] Freeman, J., Wilcox, M.H., *The effects of storage conditions on viability of Clostridium difficile vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces*. J Clin Pathol 2003; 56(2): 126-8 MeyerKM
- [56] Cohen, S.H., et al., *Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. 31(5): p. 431-55.
- [57] Ackermann, G., *Clostridium difficile - Aktueller Stand Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe*, MIKROBIOLOGE 14.Jg. 2004, 123-129
- [58] Schaumann, R.R., et al., *Diagnostik, Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von obligaten Anaerobiern*. Chemotherapy Journal, 2007: p. 75-86
- [59] RKI: Ratgeber für Ärzte: *Clostridium difficile*, 2009
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html
- [60] Valiquette, L., et al., *Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of Clostridium difficile-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain*. Clin Infect Dis 2007; 45 Suppl 2: S112-21

- [61] Garg, S., Mirza, Y.R., Girotra, M., Kumar, V., Yoselevitz, S., Segon, A., et al., *Epidemiology of Clostridium difficile-associated disease (CDAD): a shift from hospital acquired infection to long-term care facility-based infection* Dig Dis Sci, 58 (2013), pp. 3407–3412
- [62] Boone, J.H., Goodykoontz, M., Rhodes, S.J., Price, K., Smith, J., Gearhart, K.N., et al., *Clostridium difficile prevalence rates in a large healthcare system stratified according to patient population, age, gender, and specimen consistency* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31 (2012), pp. 1551–1559
- [63] Mylotte, J.M., Russell, S., Sackett, B., Vllone, M., Antalek M., *Surveillance for Clostridium difficile infection in nursing homes* J Am Geriatr Soc, 61 (2013), pp. 122–125
- [64] Kim, V., Muder, R.R., *Clostridium difficile enteritis: a review and pooled analysis of the cases* Anaerobe, 17 (2011), pp. 52–55
- [65] Rodriguez, C., Korsak, N., Taminiau, B., Avesani, V., Van Broeck, J., Delmée, M., Daube, G., *Clostridium difficile infection in elderly nursing home residents* doi:10.1016/j.anaerobe.2014.08.007
- [66] Birgand, G., Blanckaert, K., Carbonne, A., Coignard, B., Barbut, F., Eckert, C., et al., *Investigation of a large outbreak of Clostridium difficile PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006-2007 and associated clusters in 2008-2009*. Euro Surveill, 24 (2010), p. 19597
- [67] Marwick, C.A., Yu, N., Lockhart, M.C., McGuigan, C.C., Wiuff, C., Davey, P.G., et al., *Community-associated Clostridium difficile infection among older people in Tayside, Scotland, is associated with antibiotic exposure and care home residence: cohort study with nested case-control* J Antimicrob Chemother, 68 (2013), pp. 2927–2933
- [68] Ryan, J., Murphy, C., Twomey, C., Ross, R.P., Rea, M.C., MacSharry, J., et al. *Asymptomatic carriage of Clostridium difficile in an Irish continuing care institution for the elderly: prevalence and characteristics* Ir J Med Sci, 179 (2010), pp. 245–250
- [69] Stuart, R.L., Kotsanas, D., Webb, B., Vandergraaf, S., Gillespie, E.E., Hoog, G.G., et al. *Prevalence of antimicrobial-resistant organisms in residential aged care facilities* Med J Aust, 7 (2011), pp. 530–533
- [70] Campbell, R.J., Giljahn, L., Machesky, K., Cibulskas-White, K., Lane, L.M., Potter, K., et al. *Clostridium difficile infection in Ohio hospitals and nursing homes during 2006* Infect Control Hosp Epidemiol, 30 (2009), pp. 526–533

- [71] Rotjanapan, P., Dosa, D., Thomas, K.S., *Potentially inappropriate treatment of urinary tract infections in two Rhode Island nursing homes* Arch Intern Med, 14 (2011), pp. 438–443
- [72] Simor, A.E., Yake, S.L., Tsimidis, K., *Infection due to Clostridium difficile among elderly residents of a long-term-care facility* Clin Infect Dis, 17 (1993), pp. 672–678
- [73] Louie, T.J., Miller, M.A., Mullane, K.M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., Shue, Y.K.; *Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection*. N Engl J Med. 2011 Feb 3;364(5):422-31. doi: 10.1056/NEJMoa0910812.
- [74] Miller, A.T., Tabrizian, P., Greenstein, A.J., Dikman, A., Byrn, J., Divino, C., *Long-term follow-up of patients with fulminant Clostridium difficile colitis* J Gastrointest Surg. 2009 May;13(5):956-9. doi: 10.1007/s11605-009-0819-5. Epub 2009 Feb 18.
- [75] Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P., *Asymptomatic Carriage of Clostridium difficile and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A*, M.D. N Engl J Med 2000; 342:390-397 February 10, 2000 DOI: 10.1056/NEJM200002103420604
- [76] Campbell, R.R., Beere, D., Wilcock, G.K., Brown, E.M., (1988) *Clostridium difficile in acute and long-stay elderly patients*. Age Ageing 17: 333–336.
- [77] Ziakas, P.D., Zacharioudakis, I.M., Zervou, F.N., Grigoras, C., Pliakis, E.E., Mylonakis, E., *Asymptomatic Carriers of Toxigenic C. difficile in Long-Term Care Facilities: A Metaanalysis of Prevalence and Risk Factors*, PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0117195 February 23, 2015
- [78] Simor, A.E. (2010), *Diagnosis, management and prevention of Clostridium difficile infection in long-term care facilities: a review*. J Am Geriatr Soc 58: 1556-1564. Doi: 10.1111/j. 1532-5415.2010.02958.x PMID: 20646106
- [79] *Clostridium Difficile Infections in Nursing Homes*, Pennsylvania Patient Safety Authority Vol. 7, Suppl. 1—March 18, 2010
- [80] Thomas, D.R., Bennett, R.G., Laughon, B.E., Greenough, W.B. 3rd, Bartlett, J.G. *Postantibiotic colonization with Clostridium difficile in nursing home patients* J Am Geriatr Soc. 1990 Apr;38(4):415-20.
- [81] Walker, K.J., Gilliland, S.S., Vance-Byran, K., Moody, J.A., Larsson, A.J., et al., (1993) *Clostridium difficile colonization in residents of long-term care facilities: prevalence and risk factors*. J AM Geriatr Soc 41:940-946. PMID: 8104968

- [82] McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Rubin, M., et al. *Recurrent Clostridium difficile disease: epidemiology and clinical characteristics*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20(1):43–50
- [83] Zacharioudakis, I.M., Zervou, F.N., Pliakos, E.E., Ziakas, P.D., Mylonakis E. *Colonization With Toxinogenic C. difficile Upon Hospital Admission, and Risk of Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis* Am J Gastroenterol 2015; 110:381–390; doi:10.1038/ajg.2015.22; published online 3 March 2015
- [84] von Müller, L., Halfmann, A., Herrmann, M., *Current data and trends on the development of antibiotic resistance of Clostridium difficile* Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012 Nov;55(11-12):1410-7. doi: 10.1007/s00103-012-1556-6.
- [85] Samonis, G., Vardakas, K.Z., Tansarli, G.S., Dimopoulou, D., Papadimitriou, G., Kofteridis, D.P., Maraki, S., Karanika, M., Falagas, M.E., *Clostridium difficile in Crete, Greece: epidemiology, microbiology and clinical disease*. Epidemiol Infect. 2015 May 20:1-10. [Epub ahead of print]
- [86] Huang, H., Weintraub, A., Fang, H., Nord, C.E., *Antimicrobial resistance in Clostridium difficile*. Int J Antimicrob Agents. 2009 Dec;34(6):516-22. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.09.012. Epub 2009 Oct 13.
- [87] Huang, H., Wu, S., Wang, M., Zhang, Y., Fang, H., Palmgren, A.C. et al., *Clostridium difficile infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes* Int J Antimicrob Agents, 33 (2009), pp. 339–342
- [88] Hecht, D.W., Galang, M.A., Sambol, S.P., Osmolski, J.R., Johnson, S, Gerding, D.N., *In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic Clostridium difficile clinical isolates collected from 1983 to 2004* Antimicrob Agents Chemother, 51 (2007), pp. 2716–271
- [89] Bourgault, A.M., Lamothe, F., Loo, V.G, Poirier, L., *In vitro susceptibility of Clostridium difficile clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada* Antimicrob Agents Chemother, 50 (2006), pp. 3473–3475
- [90] Mutlu, E., Wroe, A.J., Sanchez-Hurtado, K., Brazier, J.S., Poxton, I.R., *Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of Clostridium difficile strains isolated from hospitals in south-east Scotland* J Med Microbiol, 56 (2007), pp. 921–92
- [91] John, R., Brazier, J.S., *Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of Clostridium difficile commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK* J Hosp Infect, 61 (2005), pp. 11–14

- [92] Huhulescu, S., Sagel, U., Fiedler, A., Pecavar, V., Blaschitz, M., Wewalka, G., Allerberger, F., Indra, A., *Rifaximin disc diffusion test for in vitro susceptibility testing of Clostridium difficile* J Med Microbiol. 2011 Aug; 60(Pt 8): 1206–1212. doi: 10.1099/jmm.0.028571-0 PMID: PMC3167878
- [93] Lagrotteria, D., Holmes, S., Smieja, M., Smail, F., Lee, C., *Prospective, Randomized Inpatient Study of Oral Metronidazole versus Oral Metronidazole and Rifampin for Treatment of Primary Episode of Clostridium difficile –Associated Diarrhea* Clin Infect Dis. (2006) 43 (5): 547-552. doi: 10.1086/506354
- [94] Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., et al (2010) *Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome*. PLoS One 5:e983
- [95] Schubert S., Wiesermax A., *Molekulare Speziesdifferenzierung: MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik*, Biospektrum 16. Auflage 7.10

7. Publikationen

- Teile dieser Arbeit wurden auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. in Dresden 2014 als Poster vorgestellt
- Teile dieser Arbeit befinden sich in der Vorbereitung für eine Publikation

8. Danksagung

Einem besonderen Dank gilt Professor von Müller, der mich immer unterstützt und motiviert hat und bei Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne sein Engagement wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit umzusetzen und zu schreiben.

Das Gleiche gilt für Frau Dr. Nillius. Sie konnte mich durch konstruktive Kritik und zahlreiche Ideen immer voran bringen.

Ohne die gute Zusammenarbeit und Förderung durch das MRSAar-Netz wäre es mir nie möglich gewesen diese Arbeit zu verfassen. Deshalb gilt diesem ein großes Dankeschön.

Dem gesamtem Team aus dem Mikrobiologischen Institut bin ich sehr dankbar, die einem bei größeren und kleineren Problemen immer zur Seite standen und bei aufkommenden Fragen hinsichtlich praktischer Ausführung und theoretischen Wissen immer eine große Unterstützung waren.

Besonders wichtig waren natürlich die Bewohner der Alters- und Pflegeheime ohne die diese Arbeit niemals zu Stande gekommen wäre. Das Gleiche gilt für das Pflegepersonal der Heime, die die Rektalabstriche abgenommen haben. Vielen Dank an dieser Stelle für das Engagement.

Vielen Dank auch an die fleißigen Korrekturleser, die mir ein bisschen Klarheit in Bezug auf die Rechtschreibfehler, Grammatik und Inhalt gebracht haben, von dem ich selber einiges übersehen hatte.

9. Anhang

9.1. Materialien, Geräte, Software

Tabelle 13 Übersicht der verwendeten Materialien, Geräte und Software

Produkt	Hersteller
Vasco Nitril white (Handschuhe)	Braun
Softe-Man acute	Braun
Stirillium-classic	Braun
Software: M/Lab	Dorner
Kultur und Antibiotiksresistenztestung	
Chrom-Agar-Platten für <i>C. difficile</i>	MAST DIAGNOSTIKA
COS (Cloumbia Agar mit 5 % Schafsblut)	Biomérieux
AnaeroPack Rectangular Jar 2,5 l	Mitsubishi™ Gas Chemical Company, Inc.
GENbox anaer	Biomérieux
Brutschrank Typ B 5050 E	Heraeus
Analabstrich: FecalSwab™	COPAN Innovation
Impfösen 10 ml	Greiner Bio-One
Wattestäbchen steril- medical applicator	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH
AirLife™ 0.45 % Sodium Chlorid-Inhalation Solution USP	Care Fusion
Dispensette®	Brandt
Gefrierschrank	Liebherr
Röhren 5 ml	Sarstedt
DensiCHEK plus	Biomérieux
Werkbank: Hera-Safe	Heraeus
Clarithromycin 15 µg	Oxoid
Rifampicin 5 µg	BD
MIC Test Strip:	Liofilchem
Vancomycin 0.016-256 mg/L	
Metronidazol 0.016-256 mg/L	
Moxifloxacin 0.002-32 mg/L	
CRYOBANK™	MAST DIAGNOSTIKA
CRYOBANKBOXEN	MAST DIAGNOSTIKA
Mikrotube 2ml	Sarstedt
Nuklease-free water	Promega
Transferpipetten	Sarstedt
MALDI-TOF	
MALDI-TOF microflex™ Serie	Bruker Daltonics
MSP 96 target polished steel	Bruker Daltonics
HCCA, portioned (Matrix)	Bruker Daltonics
Microtubes 1,5 ml	Sarstedt
Ansatz:	
Ethanol absolut	Apotheke UKS

Formic acid 98-100 % A0748,0500	AppliChem Panreac
Acetonitrile 34967 250ml	Fluka Analytical
Water LC-MS CHROMASOLV®	Sigma-Aldrich
Vortexer: VF2	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
Zentrifuge: Pico 21	Heraeus Thermo Scientific
Software:	
Cassette Docking Station V1.2.0	Biomérieux
MALDI-Biotyper Echtzeit-Klassifikation	Bruker Daltonics
Pipettenspitzen:	
Biosphere Filter Tips 0,5-10 µl	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 2-100 µl	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt
Pipetten:	
Reference 1 µl	Eppendorf
Reference 0,5-10 µl	Eppendorf
Reference 10-100 µl	Eppendorf
Reference 100-1000 µl	Eppendorf
DNS Aufreinigung	
Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	Promega
Zusammensetzung:	
Maxwell 16 LEV RNA Cartridges	
LEV Plungers	
Elution tubes 0,5ml	
Nuclease free water	
Maxwell 16 MDx Instrument	Promega
Multiplex-PCR und Ribotypisierung-PCR	
Zentrifuge: Galaxy Mini Star	VWR
Multiply-Pro Gefäße 0,2 ml	Sarstedt
Thermocycler: PeqStar	PeqLab
Power Pac 1000	BioRad
Werkbank: Hera safe (Sicherheitswerkbank)	Heraeus
peqGold PCR Hot Start-Mix Y 25 µl	PeqLab
Zusammensetzung :	
1,25 u 'Hot- Start' Taq-DNA Polymerase	
0,4 mM dNTPs	
40 mM Tris-HCL	
32 mM (NH4)SO4	
0,02 % Tween 20	
4 mM MgCl2	
Primer:	biomers
Tabelle 4	
Tabelle 6	
PCR grade Aqua destillata	Braun Melsungen AG
QA-Agarose TM Cat. No. AGAH0500	MP North American
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Gefrierschrank	Liebherr
Pipettenspitzen:	
Biosphere Filter Tips 0,5-10 µl	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 2-100 µl	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt
Pipetten:	
Research Plus 0,5-10 µl	Eppendorf
Research Plus 10-100 µl	Eppendorf
Reference 100-1000 µl	Eppendorf
Mikrowelle	Elektrolux
Sub-Cell GT	BioRad
TBE Puffer (10x): A0972,1000	Panreac
Waage: 440-30N	Kern
Laboratory film	Parafilm
peq GOLD 100bp DNA Ladder Plus	PeqLab
Sequenzierung	
SLS (Sample Loading Solution)	Beckman Coulter
Size Standard 600	Beckman Coulter
Buffer Plates	Beckman Coulter
Sample Plates	Beckman Coulter
Mineralöl	Beckman Coulter
Capillary Array	Beckman Coulter
GenomLab GeXP	Beckman Coulter
Gel Cartridge 10 ml	Beckman Coulter
Seperation Buffer	Beckman Coulter
Software: Bionumerics	Applied Maths

9.2. Anleitung Chrom-Agarplatten für *C. difficile*

CHROMagar™ C.difficile

Chromogenic medium for the detection and differentiation of *Clostridium difficile*

Composed of :
ref. X151(B) : CHROMagar™ C. difficile base
→ 5000ml bottle
ref. X151(S) : CHROMagar™ C. difficile supplement
→ 5x1000ml freeze-dried vial

STORAGE
Store the powder base at 15/30°C and the supplement at 2/8°C until the shelflife date indicated on the label.

COMPOSITION in g/L
Agar 15.0; Peptones and yeast extract 25.0; NaCl and mineral salts 9.0; Growth factors 4.0; Chromogenic, and selective mix 2.1; pH : 7.8 +/- 0.2 (Classical formula adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria).

PREPARATION → for 1L of final media :

- **BASE :**
 1. Suspend 54.8 g of the CHROMagar C.difficile base into 1L of purified water.
 2. Disperse powder slowly in water by rotating for swelling of the agar.
 3. Heat and bring to boiling (100°C) while swirling or stirring regularly.
If using an autoclave, do so without pressure. DO NOT HEAT TO MORE THAN 100°C. The mixture may also be brought to a boil in a microwave oven: after initial boiling, remove from oven, stir gently, then return to oven for short repeated bursts of heating until complete fusion of the agar grains (large bubbles replacing foam).
 4. Cool in a water bath to 45-50°C.
- **SUPPLEMENT :**
 1. Aseptically rehydrate 1 vial of CHROMagar C.difficile supplement with 3 ml of sterile water.
 2. Gently stir until complete dissolution.

Warning: Reconstituted supplement solution must be used the same day. Do not store and re-use a supplement solution.

- **MIXING OF BASE AND SUPPLEMENT :**
 1. Place the melted 45-50°C-cooled CHROMagar C.difficile base under gentle stirring.
 2. Aseptically add the 3 ml of the reconstituted CHROMagar C.difficile supplement to the melted CHROMagar C.difficile base, keeping the gentle stirring during 1 or 2 minutes until complete homogenisation.
 3. Pour IMMEDIATELY into sterile Petri dishes and let them cool. Let dry. Store in the dark.

Prepared plates can be kept for one day at room temperature, or for up to two months at 2/8°C if properly prepared and protected from light and dehydration.

INOCULATION

1. If the agar plate has been refrigerated, allow to warm to room temperature before inoculation.
2. Streak sample onto plate and incubate at 37°C for 24 hours in anaerobic conditions.

INTERPRETATION *

C.difficile
→ colourless colonies with fluorescence*

Other microorganisms
→ colourless, or inhibited colonies, without any fluorescence*

* under UV light at 365 nm.

LIMITATIONS
Definite identification may require additional testing.

DISPOSAL OF WASTE
After interpretation all plates should be destroyed by autoclaving at 121°C for at least 20 minutes.

English. For Research Use Only. Laboratory product to be used only by trained personnel.

Available from CHROMagar :

- CHROMagar™ Candida**
Differentiation of major pathogenic *Candida* species
- CHROMagar™ Orientation**
Differentiation of urinary tract pathogens
- CHROMagar™ Salmonella**
Detection of *Salmonella* including *S. Typhi*
- CHROMagar™ O157**
Detection of *E.coli* O157
- CHROMagar™ Staph aureus**
Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*
- CHROMagar™ MRSA**
Detection of MRSA including low level MRSA
- CHROMagar™ VRE**
Detection of *E.faecium* VRE & *E.faecalis* VRE
- CHROMagar™ StrepB**
Detection of *Streptococcus agalactiae* (GBS)
- CHROMagar™ KPC**
Detection of Carbapenem-resistant bacteria
- CHROMagar™ Acinetobacter**
Detection of *Acinetobacter*

CHROMagar™ and Rambach™ are Trademarks of Dr. A. Rambach

Visit CHROMagar on internet via <http://www.chromagar.com>

CHROMagar
Microbiology
4, place du 18 Juin 1940
75006 Paris France
Fax: (33-1) 45 48 06 06

130924 Version 2

Abbildung 21: Anleitung zur Anlage der Chrom-Agarplatten für *C. difficile*

9.3. Bewohnerfragebogen der Datenerhebung

Bewohnerfragebogen

Prävalenz-Untersuchung von MRSA und MRE in saarländischen Alten- und Pflegeheimen

MRSA ar-netz

Liebe Teilnehmerin, lieber Teilnehmer,

wir bedanken uns bei Ihnen für Ihre Teilnahme an unserer Untersuchung. Das Ausfüllen des Fragebogens ist freiwillig; die Daten unterliegen dem Datenschutz und werden nur dann verarbeitet, wenn eine Einwilligungserklärung vorliegt.

Dieser Bogen wird maschinell ausgewertet. Markieren Sie eine Antwort bitte folgendermaßen: .

Möchten Sie eine Antwort korrigieren, füllen Sie bitte den falschen Kreis noch etwas darüber hinaus aus, ungefähr so: .

Ziffern sollen ungefähr so aussehen (pro Kästchen eine Ziffer):

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

; Korrekturen so:

Bewohner-Etikett	
------------------	--

Studie

Einverständniserklärung liegt vor	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein
durchgeführte bzw. mitgeschickte Abstriche (Mehrfachantworten möglich.)	<input type="checkbox"/> Nase / Rachen (auf MRSA) <input type="checkbox"/> anal (multiresistente Darmbakterien)

Bewohnerdaten

Geburtsjahr	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table>				
Geschlecht	<input type="radio"/> männlich <input type="radio"/> weiblich				
Pflegestufe	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3				
Demenz	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein				
Barthel-Index	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table>				
Wohnsituation (Mehrfachantworten möglich.)	<input type="checkbox"/> Einzelzimmer <input type="checkbox"/> eigenes Bad / Sanitäreinrichtung <input type="checkbox"/> Mehrfachzimmer <input type="checkbox"/> mit anderen geteilte Sanitäreinrichtung				
Körperliche Aktivität	<input type="radio"/> unabhängiger Bewohner <input type="radio"/> mit Gehhilfe unabhängig <input type="radio"/> eingeschränkte Mobilität / Rollstuhl <input type="radio"/> bettlägerig, Lagenänderung selbstständig <input type="radio"/> bettlägerig, abhängig von anderen				
Ernährung	<input type="radio"/> selbstständig <input type="radio"/> unterstützte Nahrungsaufnahme ("füttern") <input type="radio"/> nasogastrale Sonde <input type="radio"/> PEG-Sonde <input type="radio"/> parenterale Ernährung				

Vorerkrankungen und Risikofaktoren

Hat der Bewohner direkten körperlichen (und regelmäßigen) Kontakt zu Haustieren? Wenn ja, zu welchen? (Mehrfachantworten möglich.)			
<input type="checkbox"/> Hund	<input type="checkbox"/> Katze	<input type="checkbox"/> Kaninchen	<input type="checkbox"/> Vogel
<input type="checkbox"/> Meerschweinchen	<input type="checkbox"/> Pferd	<input type="checkbox"/> Fische	<input type="checkbox"/> andere

Abbildung 22: Seite 1 des Bewohnerfragebogens zur Datenerhebung. Dieser Fragebogen enthält neben den Angaben, die in dieser Studie verwendet wurden auch Daten für die MRSA-Studie des MRSAar-Netztes

Vorhandensein von: (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> fäkale Inkontinenz	<input type="checkbox"/> Urin-Inkontinenz
<input type="checkbox"/> Dialysekatheter	<input type="checkbox"/> Tracheostoma
<input type="checkbox"/> Enterostoma	<input type="checkbox"/> Gangrän / Gewebs-Nekrose
<input type="checkbox"/> andere chronische Wunde	<input type="checkbox"/> Dekubitus
<input type="checkbox"/> Harnblasenkatheter	<input type="checkbox"/> Gastrostoma
<input type="checkbox"/> Ulcus / tiefe Weichteil-Infektion	
Vorerkrankungen in den letzten drei Monaten: (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> Durchfall (wässrig, öfter als 3x am Tag)	<input type="checkbox"/> Infektion des Gastrointestinaltraktes
<input type="checkbox"/> Infektion der Atemwege	<input type="checkbox"/> Infektion des Urogenitalsystems / HWI
<input type="checkbox"/> Infektion der Haut / Weichteilinfektion	<input type="checkbox"/> Infektion von Mund / Nase / Auge / Ohr
Mögliche Risikofaktoren (zutreffend für die letzten drei Monate): (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> vorliegende COPD	<input type="checkbox"/> vorliegende Gefäßerkrankung
<input type="checkbox"/> vorliegender Diabetes	<input type="checkbox"/> vorliegendes Krebsleiden
<input type="checkbox"/> Einnahme von Säurehemmern / PPI (z.B. Omepr, Pantozol)	<input type="checkbox"/> Kontakt zu einem MRSA-Träger (gleiche Zimmer-Unterbringung)
<input type="checkbox"/> Krankenhausaufenthalt (>3 Tage)	<input type="checkbox"/> vorliegende Autoimmunerkrankung
	<input type="checkbox"/> Einnahme vom Immunsuppressiva
	<input type="checkbox"/> (prophylaktische) Einnahme von Antibiotika
Folgende Antibiotika wurden in den vergangenen Monaten eingenommen (gegebenenfalls beim behandelnden Arzt / Ärztin erfragen): (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> Penicilline	<input type="checkbox"/> Cephalosporine
<input type="checkbox"/> Makrolide	<input type="checkbox"/> Tetracycline
<input type="checkbox"/> Carbapeneme	<input type="checkbox"/> Co-Trimoxazol
<input type="checkbox"/> Fluorchinolone	<input type="checkbox"/> Clindamycin
Sie können die drei zuletzt verordneten Antibiotika des Bewohners auch hier in Blockbuchstaben aufschreiben.	
Antibiotikum 1 (wird vom MRSAar-Netz codiert)	<input type="text"/>
Antibiotikum 2 (wird vom MRSAar-Netz codiert)	<input type="text"/>
Antibiotikum 3 (wird vom MRSAar-Netz codiert)	<input type="text"/>

Besiedelung durch MRE (multiresistente Erreger)

Folgende multiresistente Erreger wurden bei dem Bewohner bereits festgestellt: (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> MRSA (Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>)	<input type="checkbox"/> VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)
<input type="checkbox"/> ESBL (Enterobakterien mit erweitertem Spektrum an beta-Laktamasen)	<input type="checkbox"/> MRGN (multiresistente Gram-negative Stäbchen)
<input type="checkbox"/> <i>Clostridium difficile</i>	
Wurde der Versuch / Versuche zur MRSA-Sanierung (Entfernung des Keims) unternommen?	
<input type="radio"/> ja, ein Versuch	<input type="radio"/> ja, mehrere Versuche
<input type="radio"/> nein	
War der Versuch / die Versuche der MRSA-Sanierung erfolgreich?	
<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
<input type="radio"/> unbekannt	
Welcher ESBL-Keim wurde bei dem Bewohner festgestellt? (Mehrfachantworten möglich.)	
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> / <i>E. coli</i>	<input type="checkbox"/> <i>Klebsiella</i>
<input type="checkbox"/> <i>Citrobacter</i>	<input type="checkbox"/> <i>Acinetobacter</i>
<input type="checkbox"/> <i>Morganella</i>	<input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas</i>
<input type="checkbox"/> <i>Enterobacter</i>	<input type="checkbox"/> unbekannt
Sie können den identifizierten Keim auch hier in Blockbuchstaben aufschreiben.	
Keim (wird vom MRSAar-Netz codiert)	<input type="text"/>

Wir bedanken uns bei Ihnen für Ihre Zeit und Mühe, die Sie in unsere gemeinsame Prävalenz-Untersuchung investieren, und wünschen gutes Gelingen.

Ihr MRSAar/netz-Team

Abbildung 23: Seite 2 des Bewohnerfragebogens zur Datenerhebung. Dieser Fragebogen enthält neben den Angaben, die in dieser Studie verwendet wurden auch Daten für die MRSA-Studie des MRSAar-Netzes