

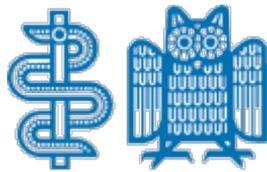
Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institut für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

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

in Kooperation mit der Kinderklinik der Universität des Saarlandes



Bedeutung von *Clostridium difficile* Infektionen im Kindesalter

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

2015

vorgelegt von Markus Steffen Mock

geboren am 24. August 1989 in Merzig

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Fassung	1
1.2 Summary.....	2
2 Einleitung	4
2.1 <i>Clostridium difficile</i>	4
2.2 Diagnostik von <i>Clostridium difficile</i>	11
2.3 Epidemiologie von <i>Clostridium difficile</i>	13
2.3.1 Epidemiologie von <i>Clostridium difficile</i> im Erwachsenenalter.....	13
2.3.2 Epidemiologie von <i>Clostridium difficile</i> im Kindesalter.....	15
2.4 Zielsetzung.....	20
3 Klinische Kohortenstudie	22
3.1 Material und Methoden	22
3.2 Ergebnisse	25
3.2.1 Beschreibung des Patientenkollektives	25
3.2.2 Nosokomiale Infektionen vs. ambulante Infektionen	34
3.2.3 Patienten mit Grunderkrankung vs. Patienten ohne Grunderkrankung ...	38
3.2.4 Patienten mit Therapie vs. Patienten ohne Therapie (der CDI).....	45
3.2.5 Vergleich der Patienten in drei Altersklassen	49
4 Lokale Epidemiologie von <i>Clostridium difficile</i> Infektionen	54
4.1 Material und Methoden	54
4.2 Ergebnisse	55
5 Methodenvergleich: slpAST und PCR-Ribotypisierung	62
5.1 Material und Methoden	62
5.1.1 Anaerobe Kultur.....	62
5.1.2 DNA-Isolierung	62
5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	63
5.1.4 Surface-Layer-Protein-A-Sequenz-Typisierung (slpAST).....	63

5.1.5	Multiplex-PCR.....	65
5.1.6	PCR-Ribotypisierung	68
5.1.7	Geräte, Reagenzien und Software	71
5.2	Ergebnisse	71
5.2.1	Vergleich des Toxinstatus von slpA- und PCR-Ribotypen.....	71
5.2.2	Epidemiologie in Abhängigkeit von der Typisierungsmethode	74
5.2.3	Zuordnung der PCR-Ribotypen zu ihren korrelierenden slpA-Ribotypen	78
6	Diskussion	83
6.1	Klinisches Bild von Patienten im Kindesalter mit einer CDI	83
6.2	Lokale Epidemiologie von <i>Clostridium difficile</i>	98
6.3	Methodenvergleich: slpAST und PCR-Ribotypisierung	102
7	Literaturverzeichnis	106
8	Publikationen	114
9	Danksagung.....	115
10	Anhang.....	114
10.1	Geräte, Reagenzien und Software.....	114
10.2	Einverständniserklärung	119
10.3	Case Report Form	121
10.4	Hausinterne Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der CDI	127

Abkürzungsverzeichnis

(NH ₄)SO ₄	Ammoniumsulfat
(r)RNA	(ribosomale) ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ALL	Akute leukämische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AZ	Allgemeinzustand
bp	Basenpaare
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
CLO-Agar	Clostridium-Agar
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRP	C-reaktives Protein
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E-Test	Epsilometer test
EIA	Enzymimmunoassay (enzyme immuno assay)
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
GLDH	Glutamatdehydrogenase

IQR	Interquartilsabstand (interquartile range)
ISR	intergenetic spacer region
KISS	Krankenhaus-Informations-Surveillance-System
M/LAB-System	laboratory information system
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIB-Programm	laboratory information system
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
n.s.	nicht signifikant
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
SIRS	systemisches inflammatorisches response Syndroms
slpA	Surface-Layer-Protein A
slpAST	Surface-Layer-Protein A Sequence Typing
SLS	sample loading solution
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Clostridium difficile ist die häufigste Ursache von Durchfallerkrankungen in Krankenhäusern. Bisher liegen jedoch nur begrenzte Erkenntnisse über *Clostridium difficile* Infektionen (CDI) im Kindes- und Jugendalter vor. Deshalb wurde die Symptomatik pädiatrischer Patienten (Alter: 1 – 17 Jahre) mit nachgewiesener CDI anhand einer klinischen Kohortenstudie von Januar 2010 bis Oktober 2013 erforscht. Die in die Studie aufgenommenen Patienten mit CDI (N = 118) wiesen selten spezifische Begleitsymptome (z.B. Blutbeimengungen im Stuhl oder Fieber) (29,1 – 44,7%) neben dem Hauptsymptom der dünnflüssigen Stühle (100%) auf und erhielten nur in etwa einem Fünftel aller Fälle eine gegen *C. difficile* gerichtete Therapie (23,9%). Zwei Drittel (69,7%) aller Patienten hatten vor der CDI Antibiotika erhalten. Die nosokomiale CDI sowie das Vorhandensein von Komorbiditäten machten einen protrahierten bzw. schwereren Verlauf wahrscheinlich. Bei den jüngeren Patienten fanden sich häufiger virale Kopathogene des Gastrointestinaltraktes, bei älteren Kindern und Jugendlichen bestanden häufiger Komorbiditäten. Eine gegen *C. difficile* gerichtete Therapie erfolgte meist nur bei Patienten mit Grunderkrankungen und/oder schweren Durchfällen sowie positivem Toxinnachweis. Die Analyse der Epidemiologie von *C. difficile* von 2000 bis 2013 an der Universitätsklinik des Saarlandes ergab zunehmende Fallzahlen seit 2000. Die Anzahl der jährlich bei pädiatrischen Patienten nachgewiesenen CDI verzehnfachte sich im Untersuchungszeitraum. Kinder und Jugendliche (Alter: 0 – 17 Jahre) sowie Erwachsene höheren Alters (Alter: ≥ 65 Jahre) waren besonders häufig von einer CDI betroffen. Der Ribotyp 027 wurde mit steigendem Patientenalter zunehmend häufig, jedoch kein einziges Mal bei Kindern und Jugendlichen nachgewiesen. Die Ribotypisierung der *C. difficile* Isolate ist eine wichtige Voraussetzung für aussagekräftige infektionsepidemiologische Analysen. In dieser Arbeit kamen, erstmals in einer großen systematischen Untersuchung, vergleichend zwei der bedeutendsten Typisierungsmethoden zum Einsatz, die Surface-Layer-Protein-A-Sequenz-Typisierung (slpAST) und eine PCR-basierte Ribotypisierung. Insgesamt

wurden 360 *C. difficile* Isolate mit beiden Methoden genotypisiert. Der Toxinstatus konnte durch eine Multiplex-PCR gesichert werden. Die PCR-Ribotypisierung erwies sich gegenüber der *slpA*-Sequenzierung als überlegen, da sie eine differenziertere Bestimmung des Ribotyps ermöglichte. Die *slpA*-Sequenzierung identifizierte 12 verschiedene Genotypen und eine große Gruppe von Sequenztypen, die in den bekannten Datenbanken bisher noch keinem Ribotyp zugeordnet sind. Hingegen konnten mittels PCR-basierter Ribotypisierung 46 genetisch unterschiedliche *C. difficile* Isolate differenziert werden. Einzig der durch die PCR-Ribotypisierung bestimmte Genotyp weist in 100% der Fälle einen identischen Toxinstatus auf. Die hypervirulenten Stämme 027 und 078 erkannten beide Methoden, mit in 94,7% bzw. 93,7% übereinstimmenden Ergebnissen, zuverlässig.

1.2 Summary

Clostridium difficile is the most common cause of diarrhea in hospitals and other medical facilities. However, there is only limited knowledge about *Clostridium difficile* infections (CDI) in childhood and adolescence so far. Therefore, the symptoms of pediatric patients (aged 1 – 17 years) with proven CDI were explored using a clinical cohort study from January 2010 to October 2013. The patients with CDI (N = 118) enrolled in the study rarely exhibited specific secondary symptoms (e.g. blood particles in the stool or fever) (29,1 – 44,7%) beside the main symptom of thin stools (100%) and only about one-fifth of all cases received special therapy for *C. difficile* (23.9%). Two-thirds (69.7%) of all patients had received antibiotics prior to the CDI. The nosocomial CDI and the presence of comorbidities made a protracted or severe course likely. While there often was a viral copathogen of the gastrointestinal tract in younger patients, in older children and adolescents comorbidities were more frequent. A therapy for *C. difficile* was usually restricted to patients with underlying diseases and/or severe diarrhea and positive toxin detection. The analysis of the epidemiology of *C. difficile* from 2000 to 2013 at the Saarland University Hospital revealed an increasing number of cases since the year 2000. The number of CDI annually detected in pediatric patients increased tenfold during the investigation period. Children, adolescents (aged 0 – 17 years) and adults of a higher age (aged ≥ 65 years) were particularly vulnerable to a CDI. The ribotype 027 was detected with

increasing frequency with increasing patient age, but not once in children and adolescents. The ribotyping of *C. difficile* isolates is an important prerequisite for significant infection-epidemiological analyses. In this study, for the first time in a large systematic investigation, two of the most important typing methods were used comparatively, the Surface-Layer-Protein A Sequence Typing (slpAST) and PCR-based ribotyping. A total of 360 *C. difficile* isolates were genotyped with both methods. The toxin status could be secured by using a multiplex PCR. The PCR-ribotyping proved to be superior to the slpAST because it enabled a more differentiated determination by the different ribotypes. The slpAST identified 12 different genotypes and a large group of sequence types, which have not been assigned yet to a ribotype in the known databases. On the other hand, 46 genetically distinct *C. difficile* isolates could be differentiated by PCR-based ribotyping. Only the genotype indicated by the PCR-based ribotyping shows in 100% of cases an identical toxin status. The hypervirulent strains 027 and 078 were recognized reliably by both methods with 94,7% and 93,3% matching results.

2 Einleitung

2.1 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile ist ein gram-positives und obligat anaerobes Stäbchenbakterium. Es ist in der Lage endständige aerotolerante Sporen auszubilden. Diese führen zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit (Tenazität) gegenüber den äußeren Einflussfaktoren Wärme, Austrocknung und nicht sporiziden Desinfektionsmitteln. Die Infektiosität neu gebildeter Sporen kann über den Zeitraum von mehreren Wochen erhalten bleiben. Charakteristisch für das Bakterium ist sein ubiquitäres Vorkommen, *C. difficile* können sowohl im Erdboden, in Oberflächenwasser als auch im Darmtrakt von Tieren und Menschen nachgewiesen werden. Die Erstbeschreibung des Bakteriums erfolgte 1935 durch O'Toole aus der Darmflora von Neugeborenen [1]. Erstmals wurde *C. difficile* als Erreger der antibiotikaassoziierten Enterokolitis von Bartlett und Kollegen im Jahr 1978 beschrieben [2].

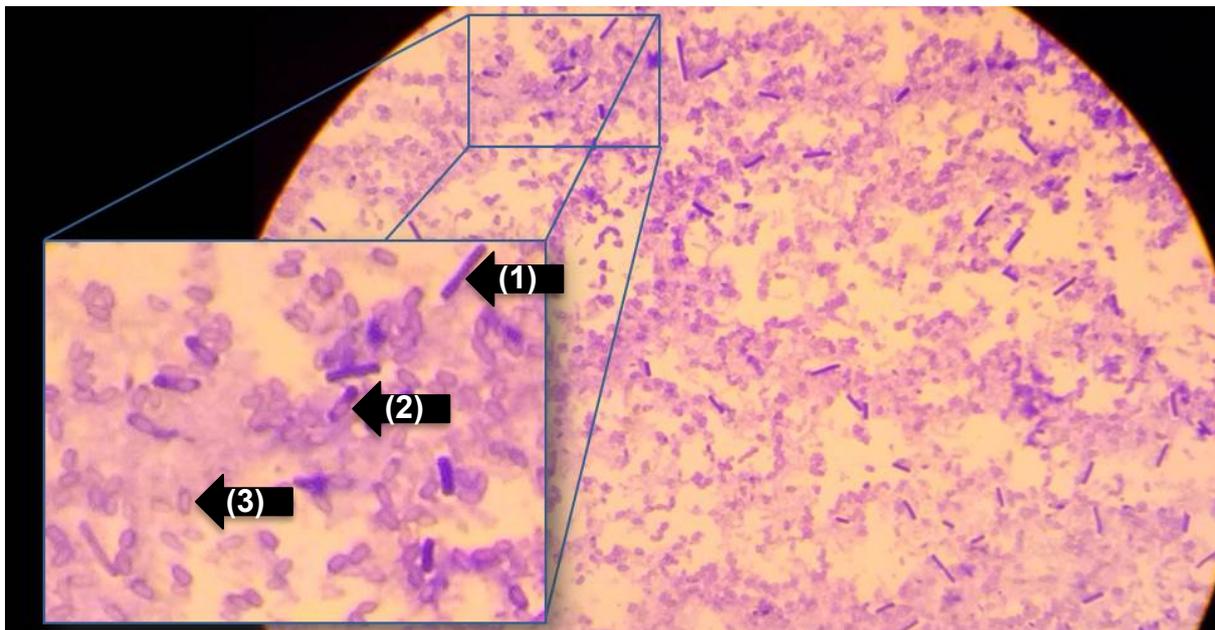


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. difficile*: vegetative Formen (1), beginnende Sporenbildung (2) und Sporen (3); Quelle: Konsiliarlabor des Robert Koch Instituts für *C. difficile* der Universität des Saarlandes

Die Übertragung der Bakterien erfolgt durch die Ingestion von Bakterien oder Sporen, die im Stuhl von mit *C. difficile* infizierten Patienten vorkommen. Auch

asymptomatische Träger von *C. difficile* scheiden *C. difficile* Sporen im Stuhl aus, jedoch in deutlich geringeren Mengen. Deren Übertragung erfolgt über kontaminierte Hände, durch direkte Kontakte und über indirekte Kontakte mit verunreinigten Gegenständen und Oberflächen [3]. Circa 5% aller Erwachsenen sind asymptomatische Träger von *C. difficile*, dagegen sind es bis zu 80% der Säuglinge und Kleinkinder [4].

Risikofaktoren und Pathogenitätsmechanismen

Ob eine Kolonisation mit *C. difficile* zu klinischen Symptomen führt, ist unter anderem davon abhängig, ob das *C. difficile* Isolat Toxine exprimiert. *C. difficile* Isolate, die keine Toxine exprimieren, sind apathogen. Das Enterotoxin A (tcdA) und das Cytotoxin B (tcdB) wirken krankheitsauslösend [5, 6]. Als weiteres Toxin wurde (vor allem bei bestimmten hypervirulenten Isolaten) ein binäres Toxin beschrieben (cdtA, cdtB), dessen Rolle in der Pathogenese jedoch noch nicht vollkommen geklärt ist [7]. Wahrscheinlich erhöht es die Fähigkeit von *C. difficile* zur Adhäsion an den Schleimhautzellen des Darmes [8]. Das Ausmaß der Symptome ist zudem abhängig von dem Vorhandensein einer Störung der gesunden mikrobiellen Darmflora (gestörte Kolonisationsresistenz), die einen Selektionsvorteil für *C. difficile* zur Folge hat [9]. Darüber hinaus kann das Bakterium die Expression bestimmter Pathogenitätsfaktoren, z.B. der Toxingene, an Umgebungsfaktoren anpassen. Die Störung der mikrobiellen Flora (des Mikrobioms im Darm) kann verursacht sein durch [10-12]:

- angeborene oder erworbene Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes
- Operationen am Gastrointestinaltrakt
- chronische Leber- oder Nierenerkrankungen
- antimikrobielle Therapie
- zytostatische Chemotherapie

Ungefähr 1% aller mit einem Antibiotikum behandelten Patienten entwickelt eine CDI. Die Kolonisationsrate der Patienten nach stationärer Aufnahme in ein Krankenhaus steigt von zuvor 5% auf 20 – 50% an [4, 13]. Die meisten Patienten bleiben jedoch asymptomatisch. Daraus lässt sich schließen, dass *C. difficile* vor allem nosokomial übertragen wird, jedoch auch wirtsspezifische Faktoren für das Risiko einer CDI von Bedeutung sind. Als Ursachen dafür werden folgende Faktoren diskutiert:

- vermehrter Einsatz von Antibiotika mit breitem Wirkspektrum gegen aerobe Enterobacteriaceae und Anaerobier, die den Darm natürlicherweise besiedeln
- länger andauernde Antibiotikatherapien
- zunehmender Einsatz von mehreren Antibiotika gleichzeitig

Folglich gelten als Hauptrisikofaktoren für eine CDI:

- vorausgegangene Antibiotika-Therapie [14-21]
- Hospitalisierung [14, 16, 19, 22]
- fortgeschrittenes Alter [23, 24]
- maligne Grunderkrankung mit Immunsuppression und zytostatischer Therapie [25, 26]

Angaben über die Inkubationszeit sind aufgrund der Möglichkeit einer vorausgehenden asymptomatischen Kolonisation nur sehr bedingt möglich. Sie wird mit wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen angegeben. Eine Blockierung der Magensäurebildung durch Protonenpumpeninhibitoren oder H₂-Antagonisten wird in der Literatur kontrovers als Risikofaktor für eine CDI diskutiert [14, 15, 17, 18, 22, 27-32]. Gleiches gilt für die Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika [18, 22]. Besonders häufig wurden in älteren Studien Infektionen mit *C. difficile* nach einer antibiotischen Therapie mit Clindamycin, Ampicillin oder Cephalosporinen beobachtet [33-35]. Neuere Veröffentlichungen zeigen dagegen auf, dass eine Vorbehandlung mit fast jedem Antibiotikum eine CDI auslösen kann. Dies gilt in seltenen Fällen auch für Vancomycin und Metronidazol. Die Antibiotika, welche am

häufigsten eine Infektion mit *C. difficile* verursachen, sind Fluorchinolone, Cephalosporine der dritten Generation, Clindamycin und Carbapeneme [16, 22, 29, 36-41]. Die typischen Symptome können erst mehrere Wochen nach dem Absetzen der Antibiotikatherapie auftreten.

Bei Patienten mit onkologischer Grunderkrankung und Fieber nach Chemotherapie kommt es häufig erst nach Erholung des Blutbildes von der Granulozytopenie zum voll ausgeprägten klinischen Bild der Enterokolitis. Die neu gebildeten Granulozyten wandern in die durch *C. difficile* Toxine geschädigte Darmwand ein und lösen dort eine Entzündung mit Wandverdickung und Pseudomembranen aus [42, 43].

Klinik und Symptome

Der klinische Verlauf einer CDI reicht von milden Durchfällen und Bauchschmerzen bis zu einer foudroyanten pseudomembranösen Kolitis mit sekundärer Sepsis, toxischem Megakolon, Multiorganversagen und Tod [6, 44-46]. Differentialdiagnostisch kommt bei jeder nosokomialen Diarrhoe (symptomatisch ab dem dritten Tag des stationären Aufenthaltes) eine CDI in Frage, da *C. difficile* der häufigste nosokomial erworbene Durchfallerreger ist. Leitsymptom einer Infektion sind plötzlich beginnende wässrige Durchfälle (mindestens drei ungeformte Stühle pro Tag) mit fauligem Geruch, begleitet von:

- Schmerzen in den unteren Quadranten des Abdomens
- Fieber
- stark ausgeprägte Leukozytose
- Hypalbuminämie als Folge eines intestinalen Proteinverlustes
- blutige Stühle und Zeichen eines systemischen inflammatorischen response Syndroms (SIRS) bei sehr schwerem Verlauf

C. difficile ist als Ursache von 15 – 20% aller antibiotika-assoziierten Diarrhoen und 95% aller pseudomembranösen Kolitiden bekannt [47, 48]. Eine pseudomembranöse Kolitis ist endoskopisch charakterisiert durch weißlich gelbe Plaques, welche locker

der Schleimhautoberfläche aufsitzen. Sie bestehen aus Muzin, Immunzellen und abgestorbenen Zellen [49].

Weitere schwere Krankheitsbilder, die durch *C. difficile* verursacht werden können, sind ein Ileus, eine Darmperforation oder eine Sepsis. Die Letalität wird allgemein für die pseudomembranöse Enterokolitis mit 1 – 2% angegeben, sie kann jedoch bei einer CDI durch ein hypervirulentes Isolat bei Patienten fortgeschrittenen Lebensalters bis zu 16% betragen [50, 51].

Therapie

Der Nachweis von Toxin-bildenden *C. difficile* bei einem asymptomatischen Patienten ist kein Grund für eine gegen *C. difficile* gerichtete antibakterielle Therapie. In 15 – 23% führt das Absetzen einer vorbestehenden Antibiotikatherapie innerhalb von 2 – 3 Tagen zum Sistieren der Durchfälle. Gemäß aktueller US-amerikanischer Leitlinien sind die Medikamente der ersten Wahl Metronidazol oder Vancomycin [52, 53]. Ersteres kann i.v. oder p.o. verabreicht werden, die Therapiedauer beträgt in der Regel 10 Tage. Metronidazol wird bevorzugt bei leichteren Krankheitsverläufen verabreicht und scheint seltener als oral verabreichtes Vancomycin zur Selektion Vancomycin-resistenter Enterokokken zu führen [54]. Vancomycin gilt als das wirksamere Medikament und ist deshalb erste Wahl bei schweren Verläufen, bei Immunsupprimierten und (wegen der Teratogenität des Metronidazols) auch bei Schwangeren [55, 56]. Vancomycin wird bei oraler Verabreichung nahezu nicht resorbiert und gelangt daher in hohen Konzentrationen in den Dickdarm. Die intravenöse Verabreichung von Vancomycin ist zur Therapie einer CDI gänzlich ungeeignet, weil auf diesem Wege nur eine sehr niedrige Konzentration im Darm erreicht wird. Die Vorteile einer Therapie mit Vancomycin liegen in einem schnelleren und stärkeren Rückgang der Bakterienlast in den Stuhlproben sowie einer niedrigeren Rezidivrate im Vergleich zu Metronidazol [57].

Für sehr schwere Verläufe, eine pseudomembranöse Colitis oder ein toxisches Megakolon, besteht die Möglichkeit einer kombinierten Therapie aus Vancomycin p.o. (ggf. über eine Magensonde, ggf. auch als Einlauf von rektal oder über ein Colostoma) und Metronidazol i.v..

Als neue Therapieoption steht Fidoxamycin zur Verfügung. Dabei handelt es sich um ein makrozyklisches Antibiotikum, mit einer bakteriziden Wirkung gegenüber vitalen *C. difficile* Bakterien und einem inhibierenden Effekt auf die Sporen- und Toxinproduktion. Es erfolgt nur eine minimale Resorption des Antibiotikums über den Gastrointestinaltrakt. Das Wirkspektrum liegt eng begrenzt im Gram-positiven Bereich. Die Nebenwirkungsprofile von Fidoxamycin und Vancomycin sind ähnlich, jedoch ist Fidoxamycin Vancomycin überlegen bei der Reduktion von rezidivierenden CDI [58, 59]. Deshalb ist Fidoxamycin vor allem für Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko geeignet.

Als Reservetherapie bei Versagen der zuvor genannten Therapieoptionen besteht die Möglichkeit der Behandlung schwerer lebensbedrohlicher CDI mit Tigecyclin (i.v.). Das Wirkungsspektrum des Glycylcyclines umfasst sowohl Gram-positive und Gram-negative Erreger als auch Anaerobier einschließlich *C. difficile* [60, 61].

Als optionale supportive Therapiemaßnahme besteht die Möglichkeit der systemischen Gabe von gepoolten Immunglobulin-Präparaten, da diese IgG-Antitoxin A enthalten [62]. Die Wirksamkeit ist bisher nicht eindeutig geklärt, da bisher keine kontrollierten Studien zu dieser Therapieoption vorliegen.

Der Erfolg bzw. Misserfolg der Therapie wird ausschließlich nach klinischen Kriterien bewertet. Die mikrobiologische Kontrolle der *C. difficile* Ausscheidung bei asymptomatischen Patienten ist nicht vorgesehen. In bis zu 35% kommt es, trotz leitliniengerechter antibiotischer Therapie, zu einem Rezidiv [16, 17, 63, 64]. Dies ist besonders häufig bei Patienten mit chronischen gastrointestinalen Krankheiten, schweren Grunderkrankungen oder anhaltender Exposition gegenüber Antibiotika der Fall.

Tritt ein Rezidiv der CDI auf, wird das erste Rezidiv mit einer Gabe des initialen Antibiotikums behandelt. Die einzige Ausnahme stellt Metronidazol dar, welches in dieser Situation nicht mehr zum Einsatz kommen sollte [65]. Mehrfach rezidivierende CDI werden mit einem langfristigen Therapieschema mit hochdosiertem Vancomycin behandelt [66]. Ab dem zweiten Rezidiv wird empfohlen Vancomycin mit *Saccharomyces boulardii* zu kombinieren, da in einer kontrollierten Studie durch

diese Kombination die Rezidivrate im Vergleich zu einer alleinigen Therapie mit Vancomycin signifikant gesenkt werden konnte [67].

Für Patienten mit häufigen Rezidiven bzw. komplizierten Verläufen erwies sich in mehreren Fallserien eine Stuhltransplantation von einem gesunden Spender als wirksame Alternative zur Antibiotikatherapie [68-73]. Dabei handelt es sich um eine bislang nicht ausreichend standardisierte Behandlung, die kausal in das Infektionsgeschehen eingreift, indem sie die Störung des gastrointestinalen Mikrobioms beseitigt. Eine chirurgische Intervention im Sinne einer Kolektomie kommt bei einer Darmperforation, einem toxischen Megakolon oder einem Ileus als lebensrettende Notfallmaßnahme in Betracht [74-76].

Prävention

Verschiedene Maßnahmen helfen eine Infektion mit *C. difficile* zu verhindern. Zu diesen zählt vor allem ein zurückhaltender, gezielter und rationaler Einsatz von Antibiotika im Sinne eines Antibiotic Stewardship. Dies schließt kurze Verordnungsdauern und - wenn möglich - den Verzicht auf Antibiotika mit sehr breitem Wirkspektrum ein. Besonders kritisch ist in diesem Kontext der zu großzügige Einsatz von Cephalosporinen der Gruppe III und von Fluorchinolonen (vor allem bei älteren Menschen) zu sehen. Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt ist die Verhinderung von Kreuzinfektionen, vor allem durch die Eindämmung einer nosokomialen Übertragung. Zu diesem Zweck ist es sinnvoll Patienten mit einer symptomatischen CDI in einem Einzelzimmer mit eigener Toilette zu isolieren [77]. Darüber hinaus ist das Tragen von sauberen Einmalhandschuhen und die strikte Einhaltung der Handhygiene von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Unwirksamkeit der üblichen Händedesinfektionsmittel gegen Sporen ist zusätzlich zur Händedesinfektion, vor dem Verlassen des Isolierzimmers, das Händewaschen mit Wasser und Seife erforderlich [78, 79].

2.2 Diagnostik von *Clostridium difficile*

Präanalytik

Zur Diagnostik sollten nur dünnflüssige Stühle verwendet werden. Ausnahmen sind bei Verdacht auf einen Ileus möglich. Die Toxine von *C. difficile* sind unter Raumtemperatur für die Dauer von etwa 2 Stunden stabil, danach beginnen sie zu zerfallen. Für die Lagerung bzw. den Transport sollte deshalb die Stuhlprobe bei 2 – 8°C gelagert werden. Dies ermöglicht eine maximale Transportdauer von 48 Stunden mit der Möglichkeit einer anschließenden kulturellen Anzucht des Isolates.

Toxinnachweis

Im Routinebetrieb wird der Toxinnachweis durch einen Enzyme immunoassay (EIA) durchgeführt. Prinzip des EIA ist die Bindung eines enzymmarkierten Antikörpers an ein entsprechendes Antigen. Dieser Antikörper wird Detektionsantikörper genannt. Das Enzym beschleunigt die Reaktion eines Farbstoffes, dessen Farbumschlag registriert werden kann. Das Ergebnis des EIA liegt bereits nach wenigen Stunden vor, allerdings weist es im Vergleich zum Goldstandard, dem Zytotoxizitätstest, eine geringere Sensitivität auf. Die Testung auf Toxin A (tcdA) und Toxin B (tcdB) sollte immer erfolgen, da 2 – 5% aller Proben nur positiv auf Toxin A, aber nicht auf Toxin B sind [52].

Glutamatdehydrogenase-Nachweis

Zum Nachweis der Glutamatdehydrogenase (*C. difficile* common antigen) kommt ebenfalls ein EIA zum Einsatz. Dieser weist eine hohe Sensitivität auf und kann schnell durchgeführt werden. Der Test wird wegen seines hohen negativen prädiktiven Wertes von 99,2% als Screeningtest verwendet [80]. Die Probleme dieser Methode liegen in ihrer geringen Spezifität, da nicht toxinogene Stämme und auch andere Clostridienspezies zu falsch positiven Ergebnissen führen. Deshalb sind bei positiven Befunden weitere Tests (z.B. Toxinnachweis) unumgänglich.

Kultureller Nachweis

Die kulturelle Anzucht von *C. difficile* aus Stuhlproben ist die empfindlichste Methode zum Nachweis des Bakteriums. Da diese sich oft schwierig gestaltete, nannten die Entdecker des Bakteriums Hall und O'Toole das Bakterium 1935 *Clostridium „difficile“*. Der kulturelle Nachweis von *C. difficile* erfordert den Einsatz spezieller Medien (z.B. Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar). Der Erreger wächst nach 24 bis 48 Stunden anaerober Bebrütung in circa 4 – 6 mm großen, unregelmäßig geformten, gelblich glänzenden Kolonien ohne Hämolyse, die unter UV Licht bei 360 nm gelbgrün leuchten. Die Kolonien weisen einen typischen fauligen Geruch auf. Die kulturelle Anzucht ist notwendig für die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung und die genotypische Charakterisierung z.B. die Ribotypisierung des Erregers. Als Nachteil des kulturellen Nachweises in der klinischen Praxis ist die lange Dauer bis zum Erhalt eines Ergebnisses von im Mittel >48 Stunden zu sehen. Bei positivem Kulturbefund müssen nicht toxinogene Stämme von toxinogenen Stämmen unterschieden werden. Die kulturelle Anzucht ist unbedingt zu empfehlen bei Patienten mit hohem Schweregrad der CDI, im Verdachtsfall bei negativem Toxintest, im Rahmen von epidemiologischen Studien und eines Ausbruchsmanagements.

Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen der Antibiotika und zugehörige Einteilung der Empfindlichkeit

Antibiotikum	Minimale Hemmkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	sensibel	intermediär	resistent	
Vancomycin	≤ 4	8	> 8	DIN, EUCAST
Metronidazol	≤ 4	8	> 8	DIN, EUCAST
Erythromycin	≤ 1	1-4	> 4	DIN
Moxifloxacin	≤ 2	4	> 8	CLSI

Zur Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit muss die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt werden. Diese Bestimmung kann mit Hilfe einer Boulliondilution, einer Agardilution oder eines E-Tests erfolgen [81].

2.3 Epidemiologie von *Clostridium difficile*

Zur exakten Beschreibung der Epidemiologie von *C. difficile* ist eine Genotypisierung der Isolate unabdingbar. Nur durch sie können Ausbrüche abgeklärt und Zusammenhänge zwischen den Isolaten verschiedener Patienten erkannt werden.

2.3.1 Epidemiologie von *Clostridium difficile* im Erwachsenenalter

Die Inzidenz von CDI hat sich etwa seit dem Jahr 2000 deutlich geändert. Dies ist unter anderem durch das erstmalige Auftreten eines hypervirulenten Stammes mit dem Ribotyp 027 zu erklären [46]. Im Jahr 2002 wurde eine europaweite Studie zur Inzidenz von CDI an 212 Krankenhäusern in 8 verschiedenen Ländern durchgeführt.

Im Durchschnitt wurde eine CDI Inzidenz von 11/10.000 Krankenhausaufnahmen ermittelt [82]. In der Detailanalyse konnte herausgearbeitet werden, dass die Inzidenz an Universitätskliniken / Kliniken der Maximalversorgung höher war, als an nicht universitären Kliniken. Die Rate der Toxin-positiven Proben variierte jedoch nicht zwischen den an der Studie teilnehmenden Krankenhäusern. In den folgenden Jahren erschienen Berichte über Ausbrüche oder einzelne Fälle von CDI, die auf den Ribotyp 027 zurückzuführen waren, aus mehreren europäischen Ländern [83-86]. In Deutschland wurde der hypervirulente Stamm erstmals im September 2007 beobachtet. Die Letalität lag bei 19% [87]. Barbut et al. führten im Jahr 2005 eine prospektive Studie über 2 Monate an 38 Krankenhäusern in 14 europäischen Ländern durch. Es konnten 411 Isolate gewonnen werden. Die Inzidenz von CDI war in den teilnehmenden Kliniken sehr unterschiedlich und betrug durchschnittlich 2,45/10.000 Patiententage. Insgesamt ließen sich 6,2% der Isolate dem Ribotyp 027 zuordnen, welchem eine Assoziation mit einem besonders schweren Krankheitsverlauf nachgewiesen werden konnte [88]. In einer Nachfolgestudie wurden 2008, für den Zeitraum von 1 Monat, prospektive Daten in 34 verschiedenen europäischen Ländern von 97 Krankenhäusern erhoben. Analysiert wurden 389 Isolate. In dieser Studie ermittelten Bauer et al. im Durchschnitt eine Inzidenz von 4,1/10.000 Patiententage für stationäre Patienten [89]. Insgesamt konnten 65 verschiedene Ribotypen identifiziert werden. Die häufigsten Ribotypen waren: 014 (16%), 001 (9%) und 078 (8%). Der Anteil des Ribotyps 027 betrug 5%. Als prädisponierend für eine schwere CDI wurden die Ribotypen 018 und 056 erkannt. Insgesamt schien der Anteil des Ribotyps 027 an allen schweren CDI in den letzten Jahren eher rückläufig zu sein [90, 91]. Nach dem ersten Ausbruch von *C. difficile* Ribotyp 027 in den Niederlanden im Jahr 2005 startete man dort ein nationales Überwachungsprogramm für *C. difficile* und entwickelte nationale Leitlinien zur Diagnostik und Therapie. Durch dieses Konzept konnte der Prozentsatz der Infektionen mit *C. difficile* Ribotyp 027 auf 3% aller CDI in der ersten Jahreshälfte 2009 reduziert werden [92]. Eine Auswertung der Infektionsschutzgesetz-Surveillancedaten von 2013 zu schwer verlaufenden CDI in Deutschland (außer Sachsen) ergab in fast allen Bundesländern eine deutliche Zunahme der Inzidenz schwerer CDI im Vergleich zum Vorjahr. Darüber hinaus konnte festgestellt werden,

dass der Ribotyp 027 weiterhin eine infektionsepidemiologisch bedeutsame Rolle in Deutschland spielt [93]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *C. difficile* im Verlauf der letzten Jahre zum bedeutendsten nosokomialen Durchfallerreger geworden ist. Die Auswertung des deutschlandweiten Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) mit über 800 teilnehmenden Kliniken im Jahr 2011 ergab, dass die Gefahr einer nosokomialen CDI im Vergleich zu einer nosokomialen Infektion mit einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) doppelt so hoch ist. Die Inzidenzdichte einer nosokomialen CDI lag bei 0,47/1.000 Patiententage, die einer nosokomialen MRSA-Infektion bei 0,24/1.000 Patiententage [94, 95]. CDI sind im Vergleich zu MRSA-Infektionen das viel größere infektionsepidemiologische Problem.

Die Entwicklung der Epidemiologie war geprägt durch die Zunahme der Inzidenzdichte von *C. difficile*, das vermehrte Auftreten schwerer Infektionen mit hoher Morbidität und Mortalität sowie der epidemischen Ausbreitung hypervirulenter Stämme des Ribotyps 027.

2.3.2 Epidemiologie von *Clostridium difficile* im Kindesalter

Neugeborene und Säuglinge

Die erste Studie zur Epidemiologie von *C. difficile* in der Pädiatrie wurde 1982 von Larson und Kollegen veröffentlicht. In dieser Untersuchung analysierte man Stuhlproben von 451 Neugeborenen. In 52% der Fälle wurde eine Besiedelung mit *C. difficile* nachgewiesen. Als Ursprung der Kolonisation wurde eine Kontamination des direkten Patientenumfeldes mit *C. difficile* identifiziert [4]. Diese Erkenntnisse konnten 1984 durch eine ähnliche Studie von Al-Jumaili und Kollegen bestätigt werden [96]. Im Jahr 1997 führten Enad und Kollegen eine vier Monate andauernde prospektive Studie durch. Es gelang 87 Isolate zu analysieren. Als Toxin-positiv stellten sich 52% (45/87) der *C. difficile* Stämme heraus. Erstmals wurden in dieser Studie mikrobiologische Testergebnisse mit klinisch erhobenen Daten verknüpft. Neugeborene, in deren Stuhlproben Toxin-positive *C. difficile* Isolate nachgewiesen werden konnten, waren deutlich kleiner und weniger altersgerecht entwickelt, als

Vergleichspersonen mit dem Nachweis eines Toxin-negativen *C. difficile* Stammes [97].

Neugeborene weisen einen sterilen Darm auf, der innerhalb der ersten Lebensstage und Wochen mit bestimmten Bakterienspezies besiedelt wird. Erst die Darmflora eines einjährigen Kindes ähnelt der eines Erwachsenen [98]. Vor dem 13. Lebensmonat finden sich besonders häufig asymptomatische Besiedelungen mit *C. difficile* (26 – 100%) [3, 99]. Asymptomatische Säuglinge, die *C. difficile* ausscheiden, werden als ein infektionsepidemiologisch bedeutsames Reservoir toxinogener *C. difficile* Stämme in Betracht gezogen [100]. Dennoch ließen sich in einer von Tang und Kollegen 2005 durchgeführten Studie keine Unterschiede in Bezug auf die klinischen Parameter Fieber, Erbrechen und blutige Stühle zwischen Säuglingen mit einer Toxin-positiven CDI im Vergleich zu Kindern mit einem Alter unter 1 Jahr ohne Nachweis von *C. difficile* feststellen [101].

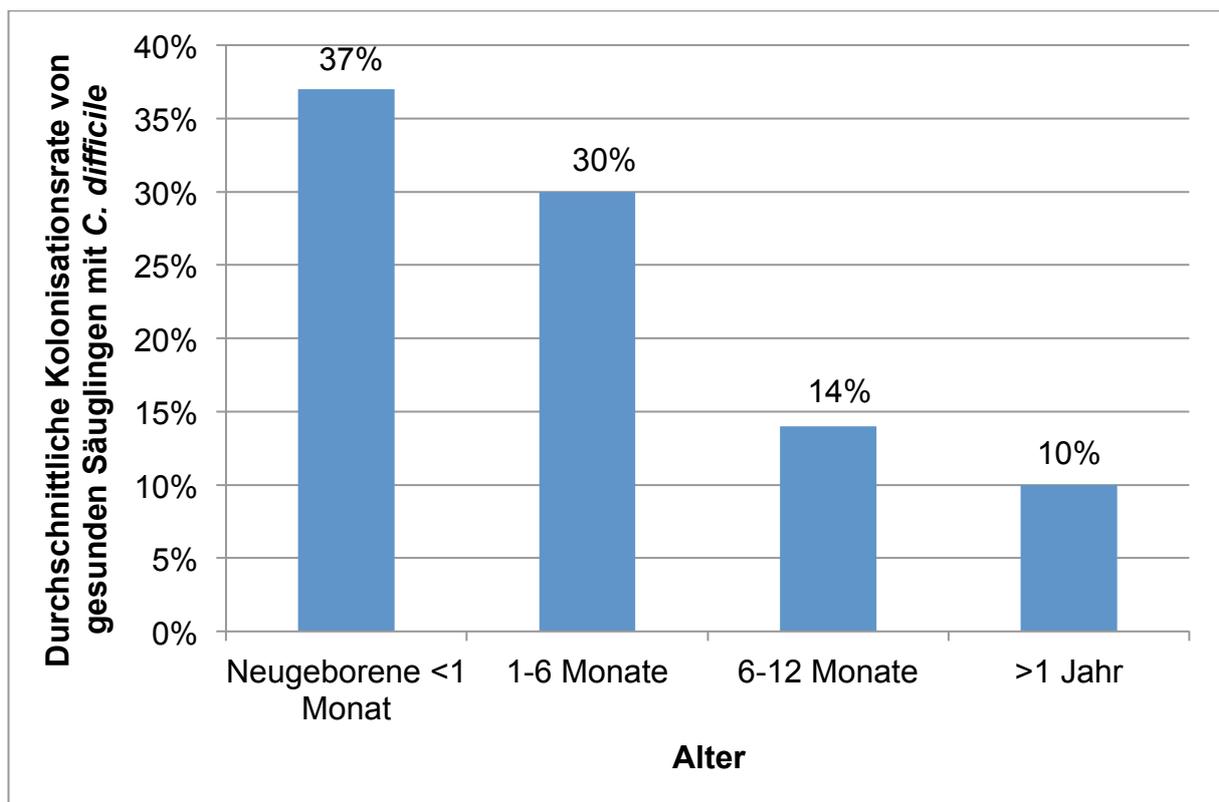


Abbildung 2: *C. difficile* Kolonisationsraten von gesunden Kindern; nach Jangi et al. [98]

Die Häufigkeit der Besiedelung mit *C. difficile* nimmt in der Gruppe der unter einjährigen mit zunehmendem Alter, wie in Abbildung 2 dargestellt ist, ab. Als Ursache für das Ausbleiben von Symptomen werden die Unreife der Enterozyten und das Fehlen bzw. die fehlende Funktion des Toxin A-Rezeptors diskutiert [102].

Kinder und Jugendliche

Nach Langley et al. 2002 ist auch bei Kindern die CDI die häufigste Ursache für eine nosokomiale Diarrhoe [103]. Kim und Kollegen untersuchten in ihrer retrospektiven Studie zwischen 2001 und 2006 insgesamt 4.895 Kinder mit CDI und konnten einen Anstieg der Inzidenz im Untersuchungszeitraum beobachten.

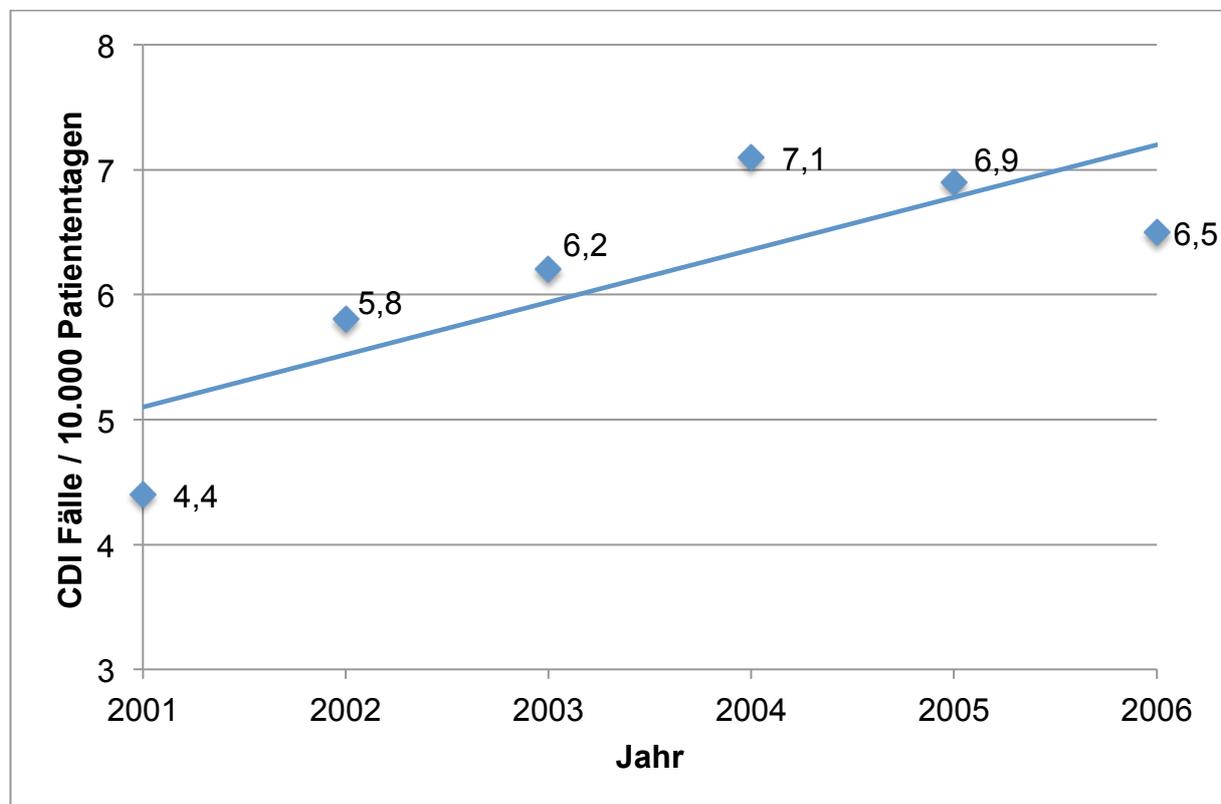


Abbildung 3: Inzidenz von CDI in der Pädiatrie über die Jahre 2001 bis 2006; nach Kim et al. [99]

Die Inzidenz betrug im Jahr 2001 4,4/10.000 Patiententage und erreichte 2006 6,5/10.000 Patiententage. Zwei Drittel der in die Studie eingeschlossenen Patienten wiesen zudem eine chronische Erkrankung auf. Die Mortalität stieg während des Beobachtungszeitraumes nicht an [99]. Khanna und Kollegen führten in den Jahren

von 1991 bis 2009 eine bevölkerungsbezogene Studie bei Kindern und Jugendlichen mit einem Alter von 1 Monat bis 17,6 Jahren in Olmsted County in Minnesota durch, in der es gelang die Isolate von 92 Patienten mit CDI zu gewinnen. In diese Arbeit wurden nur Patienten eingeschlossen, die >3 ungeformte Stühle pro Tag, einen positiven Test auf *C. difficile* (EIA oder PCR) sowie keine andere mögliche Ursache der Durchfälle aufwiesen. Interessanterweise lag bei 75% der eingeschlossenen Patienten eine ambulant erworbene Infektion vor. Auch in dieser Studie konnte ein sehr deutlicher Anstieg der Inzidenz von CDI von 2,6/100.000 Personen (1991 – 1997) auf 32,6/100.000 Personen (2004-2009) nachgewiesen werden [104]. Eine aktuellere retrospektive Studie von Dulęba und Kollegen aus Polen, beschreibt 64 pädiatrische CDI Fälle, die zwischen Dezember 2010 und Februar 2012 diagnostiziert wurden. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass mit 52% die Mehrheit der *C. difficile* Infektionen ambulant erworben wurde. Insgesamt konnten 2,7% aller Durchfallerkrankungen während des Untersuchungszeitraumes auf eine Infektion mit *C. difficile* zurückgeführt werden [64].

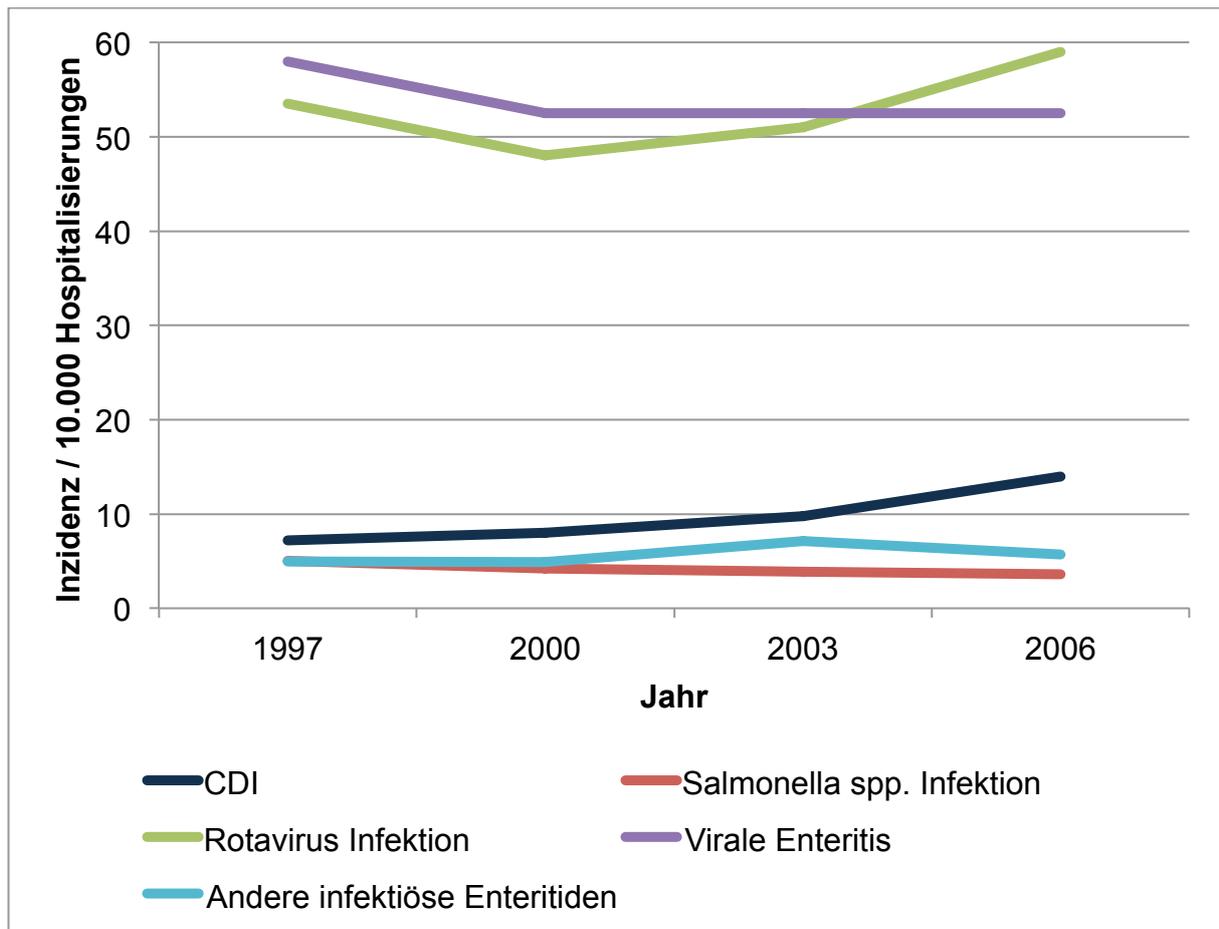


Abbildung 4: Inzidenz infektiöser Durchfälle pro 10.000 Hospitalisierungen; nach Zilberberg et al. [105]

Auch Zilberberg und Kollegen konnten eindrucksvoll die Bedeutung von *C. difficile* nachweisen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass CDI ein häufigerer Grund für Durchfälle im Kindesalter sind als Salmonellen [105]. Dies konnte, wie in Abbildung 4 dargestellt ist, über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet werden. Allen erwähnten Studien zur Epidemiologie von *C. difficile* in der Pädiatrie der letzten Jahre ist gemein, dass sie den Anstieg der Inzidenz und damit die wachsende Bedeutung von *C. difficile* als Durchfallerreger bei Kindern und Jugendlichen belegen. Dies war auch das Ergebnis weiterer Analysen zu diesem Thema [32, 106-108]. Darüber hinaus spielen ambulante Infektionsquellen eine zunehmend wichtiger werdende Rolle. *C. difficile* ist somit bei jeder Art von Durchfallerkrankung als möglicher Verursacher in Betracht zu ziehen.

2.4 Zielsetzung

C. difficile ist der häufigste Durchfallerreger bei erwachsenen Patienten. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren eine steigende Bedeutung von *C. difficile* als Ursache von Durchfällen im Kindesalter beobachtet werden. Für diese Patientengruppe waren bisher nur wenige Daten bezüglich der klinischen Manifestation und der Rolle der verschiedenen Ribotypen von *C. difficile* sowie der Risikofaktoren, die eine Erkrankung begünstigen, bekannt. Angesichts der steigenden Fallzahlen von CDI im Kindesalter sowie der wenigen verfügbaren Erkenntnisse über die Rolle von CDI im Kindesalter, gepaart mit den Möglichkeiten, die das Konsiliarlabor des Robert Koch Instituts für *C. difficile* der Universität des Saarlandes bot, fiel 2012 die Entscheidung, die Bedeutung von *C. difficile* im Kindesalter näher zu untersuchen. Um dieses vielschichtige Thema von möglichst vielen Seiten beleuchten zu können, gliedert sich die vorgelegte Arbeit in drei Teile:

1. Klinische Kohortenstudie
2. Analyse der lokalen Epidemiologie von *C. difficile*
3. Methodenvergleich: slpAST und PCR-Ribotypisierung

Ziel der klinischen Kohortenstudie war es, die in den mikrobiologischen und virologischen Laboren gewonnenen Daten der Patienten, die Laborbefunde sowie die klinische Symptomatik zu erfassen, um ein umfassendes Bild der Patienten gewinnen zu können. Darüber hinaus sollten Unterschiede zwischen bestimmten Patientenuntergruppen analysiert werden. Die retrospektive Datenanalyse hatte zum Ziel langfristige Entwicklungen der Epidemiologie von *C. difficile* in der Pädiatrie zu untersuchen. Zu diesem Zweck konnte auf Daten der vergangenen 13 Jahre zurückgegriffen werden. Fragestellungen, wie die Entwicklung der Verteilung der Ribotypen über das letzte Jahrzehnt, aber auch deren Verteilung im Erwachsenenalter im Vergleich zum Kindesalter standen im Mittelpunkt dieser Analysen. Der Methodenvergleich sollte dazu beitragen, neue Verfahren in der Analyse der gewonnenen *C. difficile* Isolate zu etablieren, die eine exakte und schnelle Bestimmung sowohl des Ribotyps, als auch des Toxinstatus der Proben erlauben.

Da durch die PCR-Ribotypisierung ein detaillierterer Einblick in die Verteilung der Ribotypen ermöglicht wurde, konnten diese Erkenntnisse dazu genutzt werden, den durch die retrospektive Datenanalyse gewonnenen Einblick in die Verteilung der Ribotypen weiter zu vertiefen.

3 Klinische Kohortenstudie

3.1 Material und Methoden

Die retrospektive Datenerfassung erfolgte durch die Analyse der Arztbriefe sowie der digitalen Patientenakten. Im prospektiven Teil der Studie konnten die Daten sowohl durch Begutachtung der Arztbriefe und digitalen Patientenakten gewonnen werden, als auch durch Gespräche mit den Patienten, deren Eltern, den behandelnden Ärzten und dem Pflegepersonal. Die Studie erstreckte sich über den Untersuchungszeitraum von 01.01.2010 bis 31.10.2013. Die Datenerfassung erfolgte vom 01.01.2010 bis 31.10.2012 retrospektiv. Ab 01.11.2012 bis 31.10.2013 wurden alle Stuhlproben der Pädiatrie auf *C. difficile* hin untersucht und die Daten konnten prospektiv gewonnen werden. Um in die Studie eingeschlossen zu werden, mussten die Patienten folgende Merkmale aufweisen:

- Nachweis von *C. difficile* in einer Stuhlprobe
- Patientenalter zwischen 12 Monaten und <18 Jahren
- kein Nachweis von *C. difficile* in den vorausgehenden 4 Wochen
- Einverständniserklärung der Eltern zur Studienteilnahme (siehe Anhang 10.2)

Die Daten wurden mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (Case Report Form) erhoben (siehe Anhang 10.3).

Durchfälle der Studienteilnehmer wurden als schwere Diarrhoe bezeichnet, wenn sie im retrospektiven Abschnitt der Untersuchung im Arztbrief als Diagnose erwähnt wurden. Im prospektiven Teil waren drei ungeformte Stühle an einem Tag das Kriterium für die Vergabe dieser Bezeichnung. Als Infektionsart wurde eine ambulant erworbene Infektion von einer nosokomialen Infektion unterschieden. Ambulant erworben bedeutete, dass der Patient die ersten Symptome einer CDI innerhalb der ersten 48 Stunden nach stationärer Aufnahme aufwies. Unter einer nosokomial erworbenen Infektion verstand man eine Infektion, deren Symptome erst ab dem dritten Tag einer stationären Behandlung auftraten.

Die statistische Auswertung der erhobenen qualitativen Daten erfolgte durch den exakten Chi-Quadrat-Test (Fisher-Yates-Test). Die stetigen Daten konnten bei Gegenüberstellung von zwei Gruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann-Whitney-U-Test) analysiert werden. Wurden drei verschiedene Gruppen miteinander verglichen, so wurde die statistische Auswertung mit einem Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt. Als signifikant wurden Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen ab einem p-Wert $\leq 0,05$ betrachtet.

Soweit im Text nicht anders angegeben, werden die Ergebnisse auf folgende Weise dargestellt:

- Qualitatives Merkmal der Patienten: $x\%$ ($n = y/z$) oder ($n = y/z; x\%$)
 - „x“ entspricht dem Prozentsatz der Patienten, auf die das qualitative Merkmal zutrifft, bezogen auf alle Kinder und Jugendlichen, zu denen Informationen bezüglich dieses Merkmals ermittelt werden konnten
 - „y“ entspricht der Anzahl der Studienteilnehmer, auf die das qualitative Merkmal zutrifft
 - „z“ entspricht der Anzahl der Studienteilnehmer, zu denen Informationen bezüglich des qualitativen Merkmals erhoben werden konnten
- Quantitatives Merkmal: Median (Spannweite: Minimum - Maximum; IQR: Interquartilsabstand)

Die Bestimmung des Ribotyps der *C. difficile* Isolate erfolgte mittels slpA-Sequenzierung (siehe 5.1.4). Der Toxinnachweis erfolgte durch einen EIA oder den Nachweis der Toxingene (tcdA, tcdB, bzw. cdtA, cdtB) mittels PCR.

Die antibiotische Vorbehandlung der Studienteilnehmer wurde nach folgendem Schema den genannten Kategorien zugeordnet:

- Penicilline: unter dieser Antibiotikaklasse wurden erfasst:
 - Penicillin G
 - Piperacillin-Tazobactam
 - Aminopenicilline
- Cephalosporine
- Aminoglykoside
- Andere: diese Kategorie beinhaltete:
 - Makrolide
 - Lincosamide
 - Nitrofurane
 - Glykopeptide
 - Dihydrofolatreduktasehemmer
 - Nitromidazole
 - Sulfonamide

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Beschreibung des Patientenkollektives

Tabelle 2: Beschreibung des Patientenkollektives

	Patientenkollektiv (N=118)
Allgemeine Angaben	
Geschlecht (w m)	(N=43/118) 36,7% (N=75/118) 63,3%
Alter [Median (Range)]	2,9 (1,0-17,9)
Größe [Median (Range)] [Perzentile]	28 (2-97)
Größe <3. Perzentile	(N=13/73) 17,8%
Gewicht [Median (Range)] [Perzentile]	12 (6-70)
Gewicht <3.Perzentile	(N=13/85) 15,3%
Anamnese	
Koinfektion	(n=46/112) 41,1%
Grunderkrankung	(n=83/101) 82,2%
Antibiotika Vorbehandlung	(n=76/109) 69,7%
Antibiotikatage [Median (Range)]	5 (1-38)
Symptomatik	
schwere Durchfälle	(n=43/101) 42,6%
reduzierter AZ	(n=46/103) 44,7%
Erbrechen	(n=39/97) 40,2%
Bauchschmerzen	(n=25/86) 29,1%
Stuhldiagnostik	
virales Kopathogen	(n=31/84) 36,9%
Adenovirus	(n=14/31) 45,2%
Norovirus	(n=11/31) 35,5%
Rotavirus	(n=8/31) 25,8%
Astrovirus	(n=4/31) 12,9%
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=76/118) 64,4%
Laborbefunde	
Leukozyten [Median (Range)] [$\times 10^9/l$]	8,7 (0,1-30,1)
CRP [Median (Range)] [mg/dl]	10,4 (0,3-301,0)
Kalium [Median (Range)] [mmol/l]	4,5 (2,8-6,3)
Therapie	
<i>C. difficile</i> Therapie	(n=27/113) 23,9%
Behandlungstage nach CDI Diagnose [Median (Range)]	4 (1-90)
stationäre Behandlungstage [Median (Range)]	8 (1-154)

Allgemeine Angaben

Insgesamt konnten 118 *C. difficile*-positive Patienten in die Studie eingeschlossen werden, wovon 80 Patienten dem retrospektiven Teil der Studie

(01.01.2010 – 31.10.2012) und 38 dem prospektiven Abschnitt der Untersuchung (01.11.2012 – 31.10.2013) zugehörten, davon 75 Jungen (63,6%) und 43 Mädchen (36,4%).

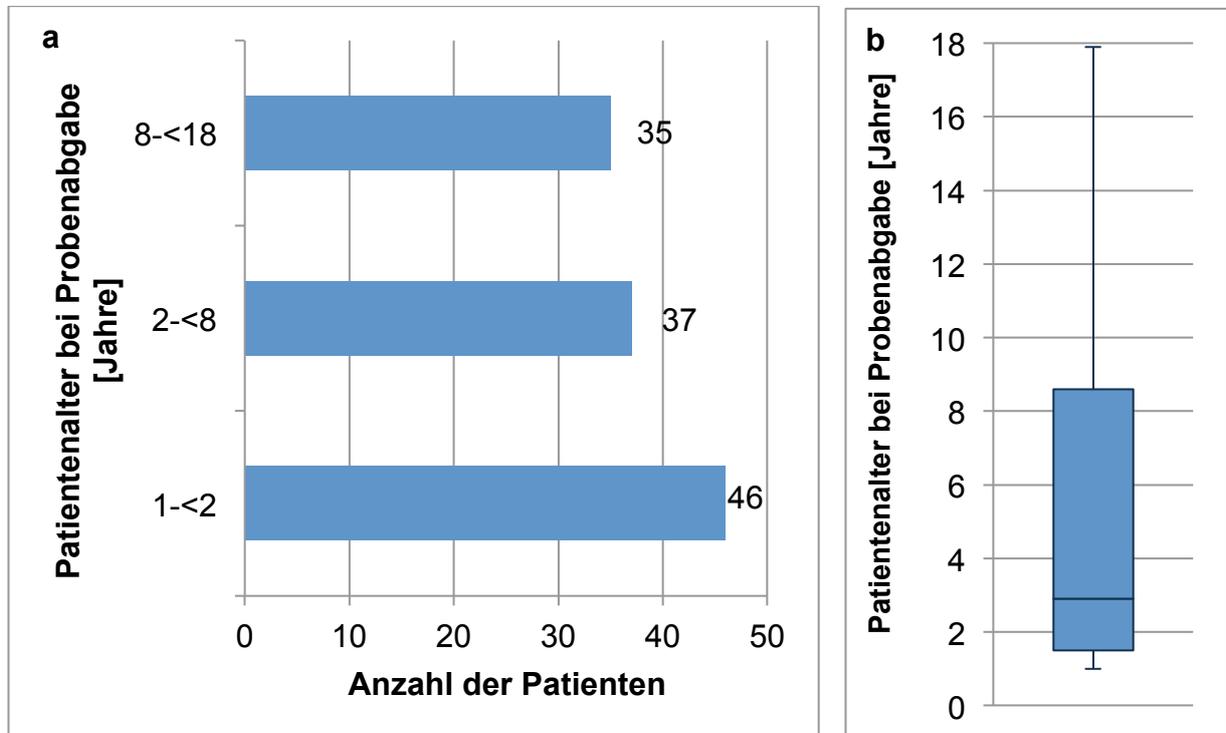


Abbildung 5: Übersicht der Anzahl der Patienten in den Altersgruppen von 12 Monaten bis unter 2 Jahren, von 2 -<8 Jahren und von 8-<18 Jahren (a), Boxplot über Patientenalter zum Zeitpunkt der Probenabgabe (b)

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Abgabe der Stuhlprobe im Median 2,9 Jahre (1,0 – 17,9; IQR: 7,1) alt. Die 25. Perzentile lag bei 1,5 Jahren und die 75. Perzentile bei einem Alter von 8,6 Jahren. Somit befand sich die Mehrheit der in die Studie eingeschlossenen Patienten in einem Alter zwischen 1 und 3 Jahren. Die Studienteilnehmer wurden nach ihrem Alter zum Zeitpunkt der Probenabgabe in drei Altersklassen gruppiert:

- 12 bis 24 Monate
- 2 Jahre bis <8 Jahre
- 8 Jahre bis <18 Jahre

Die größte dieser drei Gruppen war die Altersklasse der Patienten von 12 Monaten bis <2 Jahren mit 46 Mitgliedern, gefolgt von der Gruppe der 2 bis <8-jährigen Studienteilnehmer mit 37 Patienten. Die kleinste Fraktion stellen die Patienten von 8 bis <18 Jahren mit 35 Personen. Der Median der Größe der Studienteilnehmer befand sich auf der 32. Perzentile (3 – 97; IQR: 38). Ein Viertel der Patienten lag unter der 16. Perzentile und ein Viertel war größer als die 54. Perzentile. Kleiner als es die 3. Perzentile angibt waren 3 Patienten. Diese Patienten konnten in der Berechnung des Medians und der Quantile nicht berücksichtigt werden. Bezüglich ihres Gewichtes lagen die Studienteilnehmer im Median auf der 12. Perzentile (6 – 70; IQR: 10). Das 25%-Quantil lag auf der 10. Perzentile und das 75%-Quantil auf der 20. Perzentile. Auch hier befanden sich 3 Patienten unter der 3. Perzentile und konnten deshalb in der Berechnung der statistischen Parameter nicht einbezogen werden. Gleiches gilt für 2 Studienteilnehmer, deren Gewicht oberhalb der 97. Perzentile lag.

In 56 von 118 (47,5%) Fällen lag, nach den oben genannten Definitionen, eine ambulant erworbene und in 62 von 118 (52,5%) Fällen eine nosokomiale CDI vor.

Anamnese

Häufigster Grund für die stationäre Aufnahme der Studienteilnehmer waren akute gastrointestinale Infektionen (n = 20/118; 16,9%) gefolgt von respiratorischen Infektionen (n = 11/118; 9,3%). Das Vorliegen mindestens einer Koinfektion konnte bei 46 Patienten (n = 46/112; 41,1%) beobachtet werden. Demgegenüber standen 66 Patienten (n = 66/112; 58,9%), die keine Koinfektion aufwiesen. Mit 83 Kindern und Jugendlichen (n = 83/101; 82,2%) wies die überwiegende Mehrheit der Patienten mindestens eine Grunderkrankung auf.

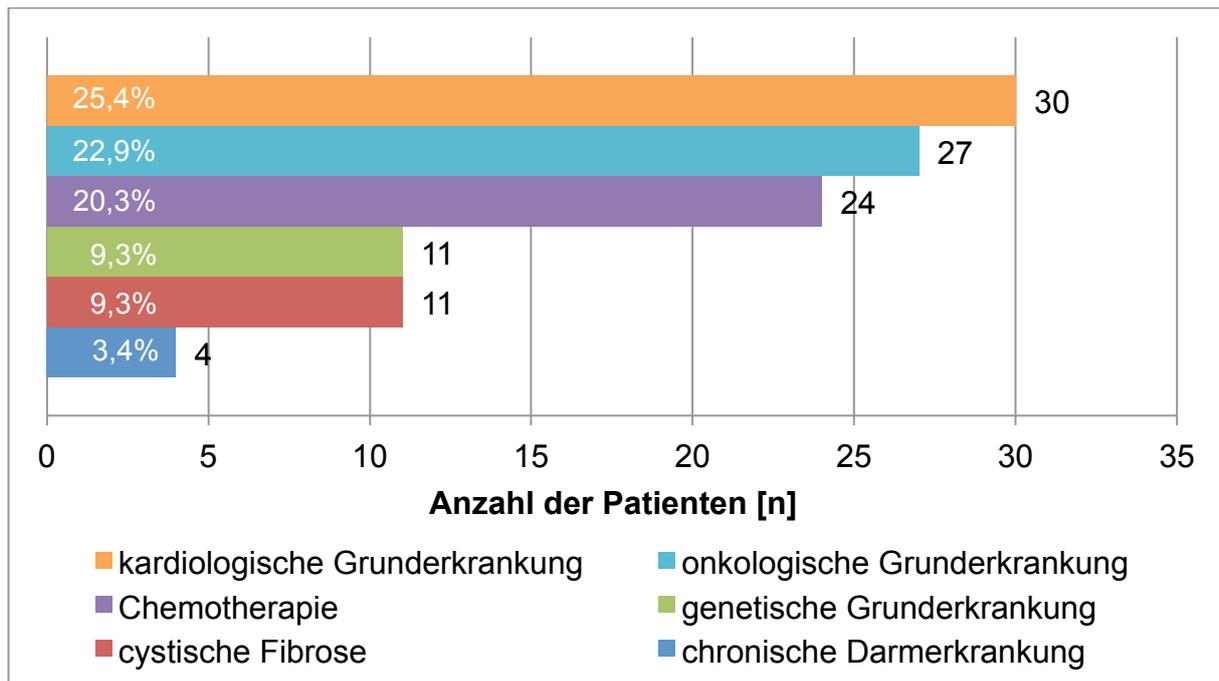


Abbildung 6: Absolute und relative Verteilung der Grunderkrankungen im Patientenkollektiv

Die Gruppe der kardiologischen Grunderkrankungen beinhaltet mit 30 (25,4%) Patienten die meisten Kinder und Jugendlichen, gefolgt von der Gruppe der onkologischen Erkrankungen mit 27 (22,9%) Patienten, von denen 24 (20,3% aller Patienten) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Chemotherapie erhielten. In die Studie wurden 11 (9,3%) Patienten mit cystischer Fibrose (Mukoviszidose) eingeschlossen. Genetische (syndromale) Grunderkrankungen und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen spielten mit 11 (9,3%) bzw. 4 (3,4%) Patienten eine untergeordnete Rolle.

Vier Wochen vor der Abnahme der ersten *C. difficile*-positiven Stuhlprobe wurden 69,7% (N = 76/109) aller Patienten antibiotisch therapiert. Insgesamt 5 Patienten erhielten eine dauerhafte antibiotische Prophylaxe der Pneumocystis-Pneumonie mit Cotrimoxazol aufgrund einer onkologischen Grunderkrankung. Die Anzahl der dokumentierten Antibiotikage bis zur diagnostischen Abklärung von dünnflüssigen Stühlen lag im Median bei 5 Tagen (1 – 38; IQR: 5).

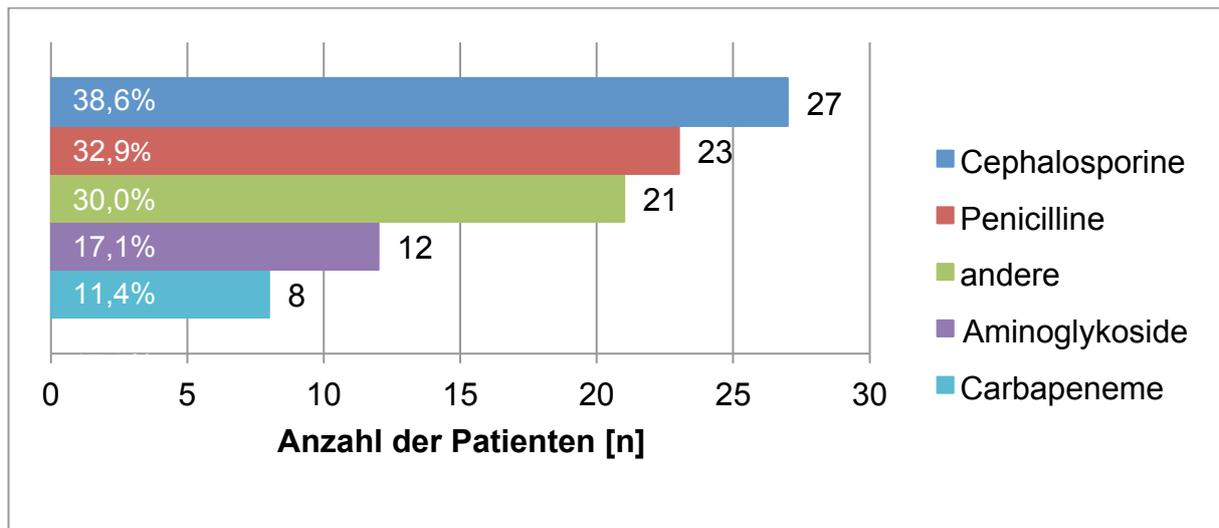


Abbildung 7: Verteilung der in der Vortherapie verwendeten Antibiotikaklassen

Die am häufigsten eingesetzten Antibiotika waren Cephalosporine ($n = 27/70$; 38,6%) gefolgt von Penicillinen ($n = 23/70$; 32,9%) und den anderen Antibiotika ($n = 21/70$; 30,0%). Darüber hinaus wurden Aminoglykoside ($n = 12/70$; 17,1%) und Carbapeneme ($n = 8/70$; 11,4%) eingesetzt. Aus diesen Daten ergibt sich, dass manche Studienteilnehmer eine antibiotische Therapie mit mehr als einem Antibiotikum vor der CDI erhielten.

Symptomatik

Alle, in die Studie eingeschlossenen Patienten, wiesen dünnflüssige Stühle auf, da erst dieses Symptom zur Einleitung der Stuhldiagnostik führte. Schwere Durchfälle konnten mit 42,6% ($n = 43/101$) nur in der Minderheit aller Fälle gefunden werden. Auch Fieber ($n = 25/60$; 41,7%), Bauchschmerzen ($n = 25/86$; 29,1%) und Erbrechen ($n = 39/97$; 40,2%) wurden bei weniger als der Hälfte der Patienten beobachtet. Bezüglich des Allgemeinzustandes der Patienten zeigte sich ein gespaltenes Bild. In gutem Allgemeinzustand präsentierten sich 55,3% ($N = 57/103$) der Kinder und Jugendlichen, dem gegenüber wiesen 44,7% ($N = 46/103$) der Studienteilnehmer einen reduzierten Allgemeinzustand auf. Lebensbedrohliche Komplikationen, wie ein toxisches Megakolon, eine Darmperforation oder eine Peritonitis wurden nicht beobachtet.

Stuhldiagnostik

Im prospektiven Teil der Studie wurden 305 Stuhlproben innerhalb eines Jahres auf *C. difficile* untersucht. Davon waren 49 Tests (16,1%) der Proben von 44 unterschiedlichen Patienten positiv. Die Aufnahmekriterien der Studie erfüllten in diesem Zeitraum 38 Patienten. Alle nicht berücksichtigten Patienten waren <12 Monate alt.

Der Nachweis eines viralen Kopathogens gelang in den Stuhlproben von 36,9% (n = 31/84) aller Kinder und Jugendlichen. Besonders häufig wurden als virale Kopathogene Adenoviren dokumentiert (n = 14/31; 45,2%). An zweiter Stelle folgten Noroviren (n = 11/31; 35,5%). Einen ähnlich großen Anteil bestritten Rotaviren (n = 8/31; 25,8%). Eine untergeordnete Rolle als virale Kopathogene spielten mit 12,9% (n = 4/31) Astroviren.

Der Nachweis eines toxinogenen *C. difficile* Stammes konnte in 64,4% (n = 76/118) aller Fälle durch den EIA oder die PCR geführt werden.

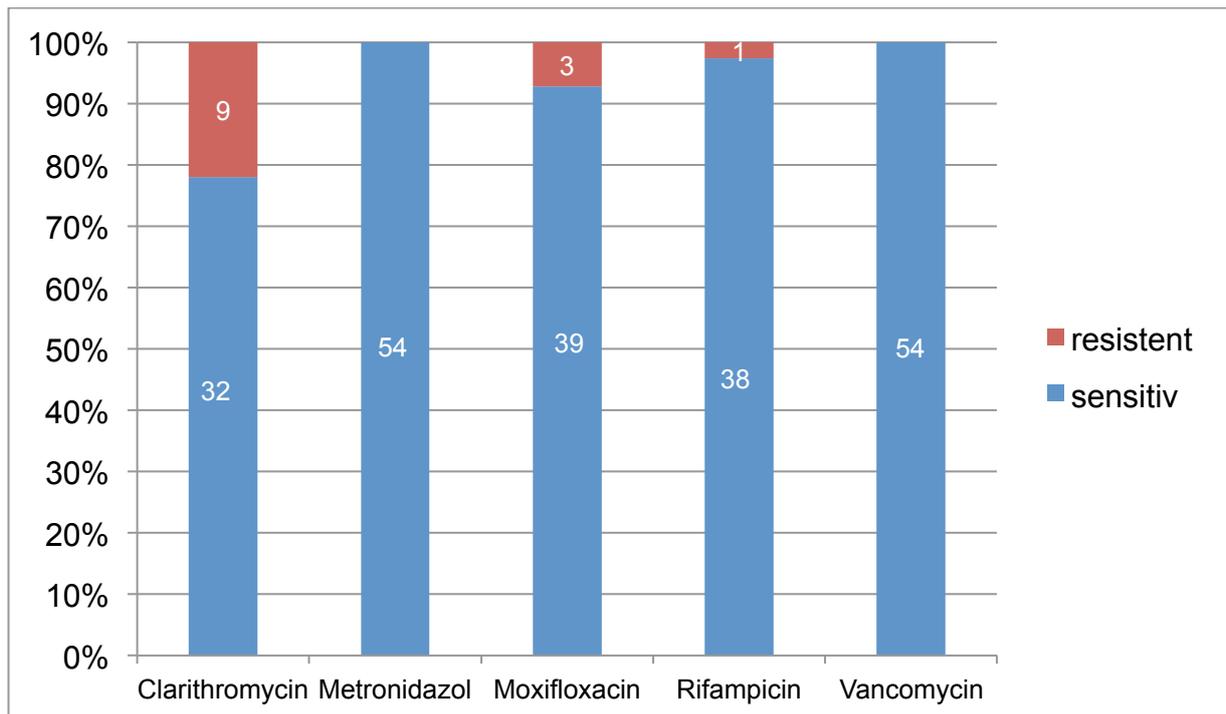


Abbildung 8: Ergebnisse der Resistenztestung der *C. difficile* Isolate auf Clarithromycin, Metronidazol, Moxifloxacin, Rifampicin und Vancomycin

Die Antibiotika-Resistenztestung wurde für fünf verschiedene Antibiotika, sofern verfügbar nach dem EUCAST-Standard, durchgeführt. Alternativ wurde der CLSI-Standard verwendet. Die Resistenztestung ergab folgende Ergebnisse:

- Clarithromycin: 78,0% (n = 32/41) aller getesteten Stämme waren sensibel gegenüber diesem Antibiotikum
- Gegenüber Metronidazol waren alle getesteten Isolate sensibel (n = 54/54; 100%)
- Moxifloxacin: mit Ausnahme von 3 *C. difficile* Stämmen waren alle getesteten Erreger sensibel (n = 39/42; 92,9%)
- Rifampicin: 97,4% (n = 38/39) aller Isolate waren sensibel gegenüber diesem Antibiotikum
- Vancomycin: alle getesteten Stämme waren sensibel (n = 54/54; 100%)

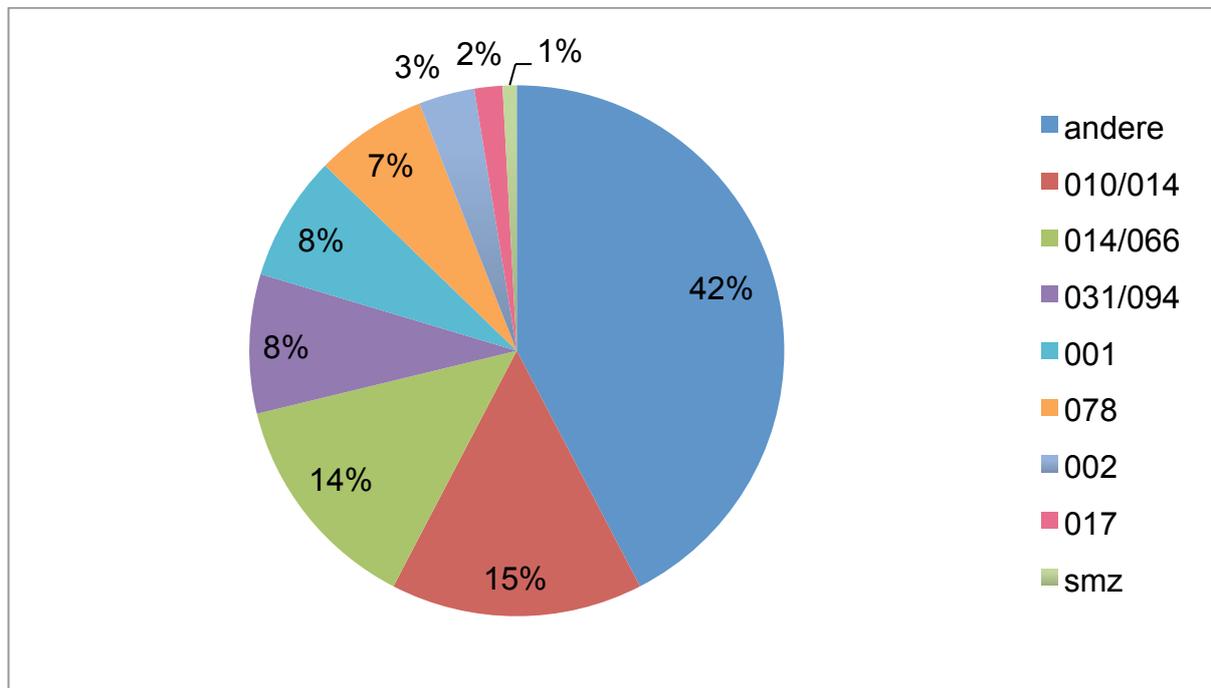
Ergebnisse der Ribotypisierung

Abbildung 9: Relative Verteilung der slpA-Ribotypen im Patientenkollektiv (n = 118)

Den größten Anteil der Infektionen bestritt die Gruppe der anderen slpA-Ribotypen mit 42,4% (n = 50/118). Darin enthalten waren relativ seltene, so genannte nicht epidemische Ribotypen. Zusammen bildeten die slpA-Ribotypen 010/014 mit 15,3% (n = 18/118) und 014/066 mit 13,6% (n = 16/118) eine etwa ähnlich große Gruppe. Die slpA-Genotypen 031/094 mit 8,5% (n = 10/118) und 001 mit 7,6% (n = 9/118) sowie 078 mit 6,8% (n = 8/118) waren wesentlich seltener zu finden. Eine untergeordnete Rolle spielten die slpA-Ribotypen 002 mit 3,4% (n = 4/118), 017 mit 1,7% (n = 2/118) und smz mit 0,8% (n = 1/118). Der hypervirulente slpA-Ribotyp 027 wurde nicht nachgewiesen.

Laborbefunde

Der Median der Leukozyten-Werte lag mit $8,7 \times 10^9/l$ (0,1 – 30,1; IQR: 5,4) innerhalb des altersentsprechenden Normbereiches ($4,0 - 10,0 \times 10^9/l$). Gleiches galt für die dokumentierten Kaliumwerte, mit einem Median von 4,5 mmol/l (2,8 – 6,3 mmol/l; IQR: 0,7) (Normbereich: 3,6 – 5,2 mmol/l).

Der Wert des C-reaktiven Proteins (CRP) befand sich im Median bei 10,4 mg/dl (0,3 – 301,0; IQR: 33,9) und somit außerhalb des sich von 0 - 5 mg/dl erstreckenden Normbereiches.

Die Leukozyten-Werte lagen bei 33,9% (n = 37/109) der Studienteilnehmer oberhalb und bei 14,7% (n = 16/109) unterhalb des Referenzbereiches. Erhöhte Werte für das CRP konnten für 63,3% (n = 69/109) der Kinder und Jugendlichen festgehalten werden. Eine Hypokaliämie wiesen 7,5% (n = 8/106) Patienten auf, eine Hyperkaliämie 10,4% (n = 11/106).

Therapeutische Intervention

Eine gegen die CDI gerichtete Therapie wurde nur selten durchgeführt. Nur 23,9% (n = 27/113) der Patienten wurden aufgrund ihrer CDI behandelt und zwar in 59,3% (n = 16/27) mit Metronidazol i.v. oder p.o., sowie in 33,3% (n = 9/27) der Fälle mit Vancomycin p.o.. In 7,4% (n = 2/27) der analysierten Therapieverläufe genügte das Absetzen des zuvor verabreichten Antibiotikums als therapeutische Intervention. Eine chirurgische Intervention war bei keinem Studienteilnehmer notwendig.

Die Dauer des stationären Aufenthaltes der Studienpatienten betrug nach Diagnose der CDI im Median 4 Tage (1 – 90, IQR: 7,5). Insgesamt wurden die Patienten im Median 8 Tage (1 – 154, IQR: 10,0) hospitalisiert.

3.2.2 Nosokomiale Infektionen vs. ambulante Infektionen

Tabelle 3: Vergleich ambulant erworbener CDI vs. nosokomial erworbener CDI

Infektionsart	ambulant (N=56)	nosokomial (N=62)	Statistik
Allgemein Angaben			
Geschlecht (w m)	(N=22/56) 39,3% (N=34/56) 60,7%	(N=21/62) 33,9% (N=41/62) 66,1%	n.s.
Alter [Median (Range)]	2,2 (1,0-17,9)	4,9 (1,0-17,6)	p=0,042
Größe [Median (Range)] [Perzentile]	23 (3-97)	32 (3-94)	n.s.
Größe <3. Perzentile	(N=4/36) 11,1%	(N=9/37) 24,3%	n.s.
Gewicht [Median (Range)] [Perzentile]	37 (3-92)	42 (3-97)	n.s.
Gewicht <3. Perzentile	(N=4/42) 9,5%	(N=9/43) 20,9%	n.s.
Anamnese			
Koinfektion	(n=28/53) 52,8%	(n=18/59) 30,5%	p=0,021
Grunderkrankung	(n=33/56) 58,9%	(n=50/61) 82,0%	p=0,008
onk. Grunderkrankung	(n=11/56) 19,6%	(n=16/61) 26,2%	n.s.
Chemotherapie	(n=11/56) 19,6%	(n=13/61) 21,3%	n.s.
kard. Grunderkrankung	(n=10/56) 17,8%	(n=20/61) 32,8%	n.s.
Antibiotika Vorbehandlung	(n=29/52) 55,8%	(n=47/57) 82,5%	p=0,003
Penicillin	(n=11/28) 39,3%	(n=12/42) 28,6%	n.s.
Cephalosporin	(n=14/28) 50,0%	(n=29/42) 69,0%	n.s.
Aminoglykosid	(n=2/28) 7,1%	(n=10/42) 23,8%	n.s.
sonstige	(n=5/28) 17,9%	(n=16/42) 38,1%	n.s.
Antibiotikatage [Median (Range)]	3 (1-38)	7 (3-14)	p=0,034
Symptomatik			
schwere Durchfälle	(n=26/51) 51,0%	(n=17/50) 34,0%	n.s.
reduzierter AZ	(n=27/51) 52,9%	(n=19/52) 36,5%	n.s.
Erbrechen	(n=24/46) 52,2%	(n=15/51) 29,4%	p = 0,025
Bauchschmerzen	(n=17/43) 39,5%	(n=8/43) 18,6%	n.s.
Stuhldiagnostik			
virales Kopathogen	(n=19/48) 39,6%	(n=12/37) 32,4%	n.s.
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=36/56) 64,3%	(n=42/62) 67,7%	n.s.
Laborbefunde			
Leukozyten [Median (Range)] [x10 ⁹ /l]	8,8 (0,1-30,1)	8,4 (0,5-16,3)	n.s.
CRP [Median (Range)] [mg/dl]	6,1 (0,1-301,0)	14,3 (0,1-210,4)	p=0,026
Kalium [Median (Range)] [mmol/l]	4,5 (2,8-5,4)	4,4 (2,9-6,3)	n.s.
Therapie			
<i>C. difficile</i> Therapie stat. Behandlungstage nach CDI Diagnose [Median (Range)]	(n=10/53) 18,9% 2 (1-42)	(n=17/60) 28,3% 4 (1-90)	n.s. p=0,002

Allgemeine Angaben

Das Alter der Patienten wies einen signifikanten Unterschied im Vergleich beider Gruppen auf ($p = 0,042$). In beiden Kategorien reichte die Altersspanne von 1 Jahr bis zu fast 18 Jahren. Damit war das gesamte Altersspektrum, welches durch die Einschlusskriterien zugelassen wurde, in beiden Gruppen repräsentiert. Auffallend war, dass in der Klasse der ambulant erworbenen Infektionen die Patienten mit im Median 2,2 Jahren (1,0 – 17,9, IQR: 2,9) deutlich jünger waren als die Studienteilnehmer in der Gruppe der nosokomial erworbenen Infektionen mit 4,9 Jahren (1,0 – 17,6, IQR: 9,0).

Anamnese

Koinfektionen mit anderen Erregern ließen sich in der Gruppe der ambulant erworbenen CDI ($n = 28/53$; 52,8%) signifikant häufiger beobachten als in der Gruppe der nosokomialen Infektionen ($n = 18/59$; 30,5%) ($p = 0,021$). In der Untergruppe der nosokomial erworbenen CDI fanden sich signifikant häufiger Patienten mit einer Grunderkrankung ($n = 50/61$; 82,0%) als in der Klasse der ambulanten Infektionen ($n = 33/56$; 58,9%) ($p = 0,008$).

Eine Antibiotikavorbehandlung in den vier Wochen vor Diagnose der CDI fand signifikant häufiger in der Gruppe der nosokomial erworbenen Infektionen statt. In dieser Gruppe wurden 82,5% ($N = 47/57$) der Studienteilnehmer antibiotisch vorbehandelt, wohingegen dies nur für 55,8% ($N = 29/52$) der Patienten in der Gruppe der ambulanten CDI zutraf ($p = 0,003$).

Untersuchte man die Dauer der antibiotischen Therapie vor der Abgabe der positiven Stuhlprobe, so ließ sich feststellen, dass die Anzahl der Antibiotikitage bei Patienten mit ambulant erworbener CDI mit im Median 3 Tagen (1 – 38, IQR: 5,8) signifikant niedriger war als bei Patienten mit nosokomial erworbener Infektion ($p = 0,034$). Der Median der zuletzt genannten Untergruppe befand sich bei 7 Tagen (3 – 14, IQR: 6,0). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen bezüglich der eingesetzten Antibiotikaklassen.

Symptomatik

Kinder und Jugendliche mit ambulant erworbener CDI litten signifikant häufiger an Erbrechen (n = 24/46; 52,2%) als Studienteilnehmer, die im weiteren Verlauf ihres stationären Aufenthaltes positiv getestet wurden (n = 15/51; 29,4%) (p = 0,025).

Laborbefunde

Die CRP-Werte der Patienten mit einer ambulant erworbenen Infektion lagen mit einem Median von 6,1 mg/dl (0,1 – 301,0, IQR: 22,0) signifikant unter denen, der Kinder und Jugendlichen mit nosokomialen Infektionen, deren CRP-Werte sich im Median bei 14,5 mg/dl (0,1 – 210,4, IQR: 48,6) befanden (p = 0,026).

Therapeutische Intervention

Die Dauer der stationären Behandlung nach der Abgabe einer positiv getesteten Stuhlprobe unterschied sich signifikant zwischen beiden gegenübergestellten Kategorien. Während bei einer ambulant erworbenen CDI im Median 2 Behandlungstage (1 – 42; IQR: 4,0) genügten, benötigten die Kinder und Jugendlichen, welche eine nosokomial erworbene Infektion hatten, im Median 4 Behandlungstage (1 – 90; IQR: 7,0) (p = 0,002). Allerdings lässt sich in der zuletzt genannten Gruppe nicht sicher sagen, ob die CDI sich auf die Dauer der stationären Behandlung ausgewirkt hat. Hierzu wäre eine eigene Fall-Kontroll-Studie nötig.

Ergebnisse der Ribotypisierung: ambulant vs. nosokomial erworbene CDI

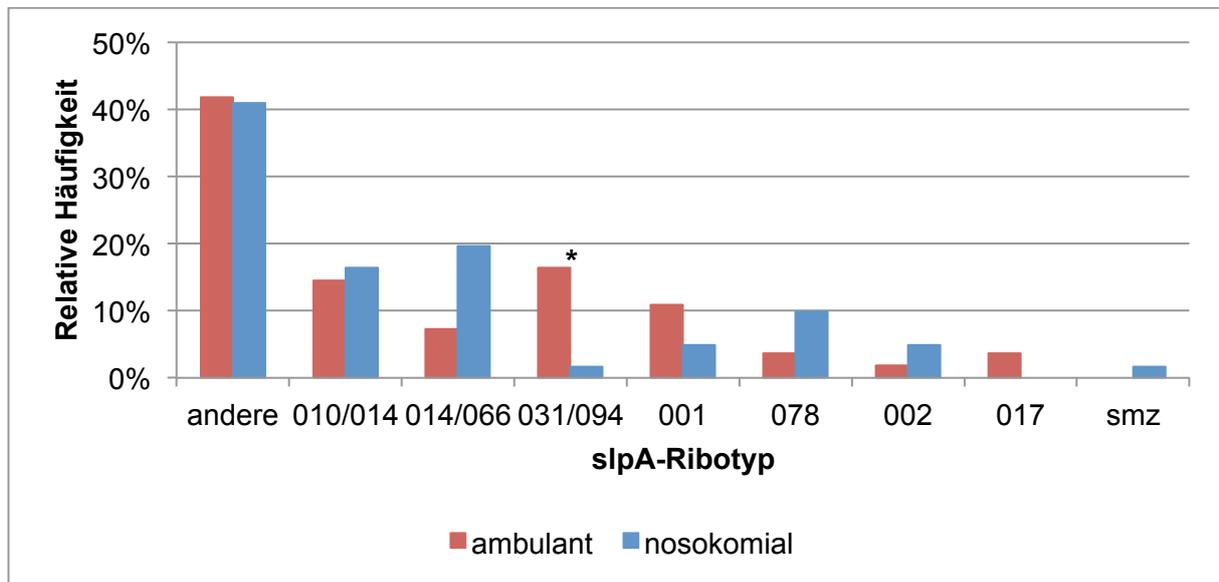


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Ribotypen: ambulant vs. nosokomial, * $p < 0,001$

Am häufigsten konnten in beiden Gruppen die anderen slpA-Ribotypen mit 41,8% ($n = 23/55$) bzw. 41,0% ($n = 25/61$) nachgewiesen werden. Der slpA-Ribotyp 078 trat in 9,8% ($n = 6/61$) aller nosokomialen Infektionen und nur in 3,6% ($n = 2/55$) aller ambulant erworbenen Erkrankungen auf. Ein ähnlicher Trend konnte für den slpA-Ribotyp 014/066 beobachtet werden, mit 19,7% ($n = 12/61$) versus 7,3% ($n = 4/55$). Der slpA-Genotyp 031/094 verursachte 16,4% ($n = 9/55$) der ambulanten Infektionen und damit signifikant mehr als nosokomiale CDI ($n = 1/61$; 1,6%) ($p < 0,001$). Der Anteil des slpA-Ribotyps 001 an den ambulant erworbenen CDI war mit 10,9% ($n = 6/55$) etwa doppelt so hoch im Vergleich zu dessen Anteil an den nosokomial erworbenen Erkrankungen mit 4,9% ($n = 3/61$) der Fälle. Die übrigen slpA-Genotypen waren in beiden Untergruppen etwa gleich stark vertreten.

3.2.3 Patienten mit Grunderkrankung vs. Patienten ohne Grunderkrankung

Tabelle 4: Vergleich der Patienten mit Grunderkrankung vs. ohne Grunderkrankung

	mit Grund- erkrankung (N=83)	ohne Grund- erkrankung (N=34)	Statistik
Allgemeine Angaben			
Geschlecht (w m)	(N=30/83) 36,1% (N=53/83) 63,8%	(N=13/34) 38,2% (N=21/34) 61,8%	n.s.
Alter [Median (Range)]	4,3 (1,1-17,9)	1,5 (1,0-14,0)	p<0,001
Größe [Median (Range)] [Perzentile]	17 (3-94)	43 (9-97)	p=0,001
Größe <3. Perzentile	(N=13/52) 25,0%	(N=0/21) 0%	p=0,014
Gewicht [Median (Range)] [Perzentile]	31 (3-89)	50 (3-97)	p=0,010
Gewicht <3.Perzentile	(N=13/58) 22,4%	(N=0/27) 0%	p=0,007
Anamnese			
Koinfektion	(n=23/81) 27,1%	(n=23/31) 74,2%	p<0,001
Grunderkrankung	(n=83/83) 100%	-	-
onk. Grunderkrankung	(n=27/83) 32,5%	-	-
Chemotherapie	(n=24/83) 28,9%	-	-
kard. Grunderkrankung	(n=30/83) 36,1%	-	-
Antibiotika Vorbehandlung	(n=57/78) 73,1%	(n=19/31) 61,3%	n.s.
Penicillin	(n=18/53) 34,0%	(n=5/17) 29,4%	n.s.
Cephalosporin	(n=29/53) 54,7%	(n=14/17) 82,3%	p=0,049
Aminoglykosid	(n=9/53) 17,0%	(n=3/17) 17,6%	n.s.
Sonstige	(n=17/53) 32,1%	(n=4/17) 23,5%	n.s.
Antibiotikatage [Median (Range)]	5 (1-14)	4 (1-38)	n.s.
Symptomatik			
schwere Durchfälle	(n=27/69) 39,1%	(n=16/32) 50,0%	n.s.
reduzierter AZ	(n=27/73) 37,0%	(n=19/30) 63,3%	p=0,017
Erbrechen	(n=22/66) 33,3%	(n=17/31) 54,8%	p=0,049
Bauchschmerzen	(n=20/59) 33,9%	(n=5/27) 18,5%	n.s.
Stuhldiagnostik			
virales Kopathogen	(n=18/58) 31,0%	(n=13/26) 50,0%	n.s.
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=52/83) 62,6%	(n=26/34) 76,5%	n.s.
Laborbefunde			
Leukozyten [Median (Range)] [$10^9/l$]	7,7 (0,1-26)	10,2 (4,7-30,1)	p = 0,003
CRP [Median (Range)] [mg/dl]	9,1 (0,1-301,0)	9,1 (0,1-101,6)	n.s.
Kalium [Median (Range)] [mmol/l]	4,4 (2,8-6,3)	4,7(3,6-5,6)	p=0,007
Therapie			
<i>C. difficile</i> Therapie stat. Behandlungstage nach CDI Diagnose [Median (Range)]	(n=25/82) 30,5% 5 (1-90)	(n=2/31) 6,4% 1 (1-20)	p=0,007 p<0,001

Allgemeine Angaben

Die beiden gegenübergestellten Untergruppen des Patientenkollektives unterschieden sich statistisch signifikant bezüglich ihres Alters. Patienten mit einer Grunderkrankung waren im Median 4,3 Jahre (1,1 – 17,9; IQR: 7,6) alt. Die Studienteilnehmer ohne Komorbidität waren mit im Median 1,5 Jahren (1,0 – 14,0; IQR: 1,6) wesentlich jünger ($p < 0,001$).

Patienten mit einer Grunderkrankung waren signifikant kleiner als Kinder und Jugendliche, die keine Komorbidität aufwiesen ($p = 0,001$). Der Median der Erstgenannten befand sich auf der 17. Perzentile (3 – 94; IQR: 38,5). Patienten, die nicht auch aufgrund einer chronischen Erkrankung behandelt wurden, erreichten eine mediane Größe, welche der 43. Perzentile (9 – 97; IQR: 45,0) entsprach.

Betrachtete man das Gewicht der Patienten, so zeigte sich ein ähnliches Bild. Studienteilnehmer mit einer Grunderkrankung (31. Perzentile; Spannweite: 3 – 89; IQR: 47) waren signifikant leichter als Patienten ohne chronische Erkrankung (50. Perzentile; Spannweite: 3 – 97; IQR: 36) ($p = 0,010$). Kinder und Jugendliche, deren Größe oder Gewicht unterhalb der 3. Perzentile gemessen wurde, befanden sich ausschließlich in der Kategorie der Patienten mit einer Grunderkrankung.

Anamnese

Insgesamt 74,2% ($N = 23/31$) aller Kinder und Jugendlichen ohne Grunderkrankung wiesen während des stationären Aufenthaltes eine Koinfektion auf. Dieser Nachweis konnte nur für 27,1% ($n = 23/81$) aller Studienteilnehmer mit mindestens einer Komorbidität geführt werden. Somit wurden Koinfektionen signifikant häufiger bei Patienten ohne Grunderkrankungen gefunden ($p < 0,001$).

Für die antibiotische Vorbehandlung mit einem Cephalosporin ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,049$). Insgesamt erhielten 82,3% ($n = 14/17$) der Patienten ohne eine chronische Erkrankung ein Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine. Dies war nur in 54,7% ($n = 29/53$) der Fälle unter den Studienteilnehmern mit einer Grunderkrankung zu beobachten.

Symptomatik

Nur 37,0% (N = 27/73) aller Kinder und Jugendlichen mit einer Grunderkrankung wurde durch den behandelnden Arzt während ihres stationären Aufenthaltes ein reduzierter Allgemeinzustand attestiert. Dies traf für 63,3% (N = 19/30) der Studienteilnehmer ohne chronische Erkrankung zu (p = 0,017). In der Gruppe der Patienten mit einer Komorbidität trat mit 33,3% (n = 22/66) das Symptom Erbrechen signifikant seltener auf (p = 0,049). Im Vergleich dazu konnte es für 54,8% (n = 17/31) der Studienteilnehmer in der Kategorie ohne chronische Erkrankung dokumentiert werden.

Laborbefunde

Patienten mit einer Grunderkrankung wiesen einen signifikant niedrigeren Leukozyten-Wert mit im Median $7,7 \times 10^9/l$ (0,1 – 26; IQR: 5,3) im Vergleich zu Studienteilnehmern ohne chronische Erkrankung mit im Median $10,2 \times 10^9/l$ (4,7 – 30,1; IQR: 6,6) auf (p = 0,003). Die Ergebnisse der Bestimmung des Serumkaliums der Patienten ergaben signifikante Unterschiede zwischen beiden in diesem Kapitel gegenübergestellten Gruppen (p = 0,007). Patienten mit einer Grunderkrankung hatten in 11,0% (n = 8/73) der Fälle eine Hypokaliämie, bei den Jugendlichen ohne chronische Erkrankung trat keine Hypokaliämie auf (n = 0/32).

Therapeutische Intervention

Die beiden Gruppen unterschieden sich bezüglich der Verweildauer der Patienten nach der Diagnose der CDI signifikant (p < 0,001). Während Studienteilnehmer mit einer Grunderkrankung im Median für weitere 5 Tage (1 – 90; IQR: 7) nach Abgabe der positiv getesteten Stuhlprobe hospitalisiert wurden, benötigten die Patienten ohne chronische Erkrankung im Median nur 1 Behandlungstag (1 – 20; IQR: 2) bis zur Entlassung aus der stationären Therapie. Besonders hervorzuheben ist, dass Patienten mit einer Grunderkrankung signifikant häufiger therapiert wurden (n = 25/82; 30,5%) als Kinder und Jugendliche ohne Komorbidität (n = 2/31; 6,4%) (p = 0,007).

Ergebnisse der Ribotypisierung: Isolate von Patienten mit Grunderkrankungen vs. Isolate von Patienten ohne Grunderkrankung

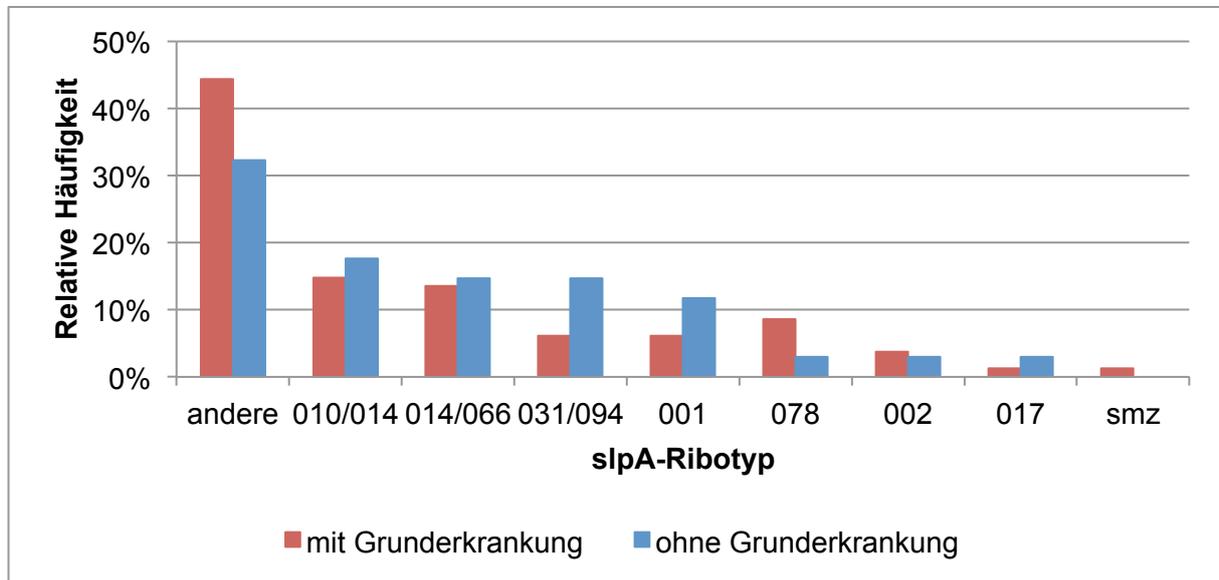


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Ribotypen: mit Grunderkrankung vs. ohne Grunderkrankung

Bei Studienteilnehmern, die eine Grunderkrankung aufwiesen, konnten in 44,4% (n = 36/81) aller Fälle andere slpA-Ribotypen nachgewiesen werden. Dies gelang in der Gruppe der Patienten ohne Grunderkrankung nur in einem Drittel der untersuchten Proben (n = 11/34). Die slpA-Genotypen 031/094 und 001 waren in der Gruppe der chronisch erkrankten Patienten (n = 5/81; 6,2% bzw. n = 5/81; 6,2%) schwächer vertreten als in der Gruppe der Patienten ohne Grunderkrankung (n = 5/34; 14,7%; bzw. n = 4/34; 11,8%). Wesentlich häufiger bei Patienten mit Grunderkrankungen im Vergleich zu Kindern und Jugendlichen, die diese nicht aufwiesen, konnte der slpA-Ribotyp 078 mit 8,6% (n = 7/81) der Fälle im Vergleich zu 2,9% (n = 1/34) dokumentiert werden. Die Verteilung der restlichen slpA-Genotypen wies nur geringfügige Unterschiede in beiden Gruppen auf.

Patienten mit onkologischer Grunderkrankung vs. Patienten ohne onkologische Grunderkrankung

Tabelle 5: Beschreibung der Patienten mit einer onkologischen Grunderkrankung

	mit onkologischer Grunderkrankung (N=27)
Allgemeine Angaben	
Alter [Median (Range)]	8,2 (1,5-17,9)
Anamnese	
ALL	(n=12/27) 44,4%
AML	(n=1/27) 3,7%
Non-Hodgkin-Lymphom	(n=3/27) 11,1%
Hodgkin-Lymphom	(n=0/27) 0%
Solide Tumore außerhalb des ZNS	(n=9/27) 33,3%
ZNS-Tumore	(n=2/27) 7,4%
Rezidive	(n=8/27) 29,6%

Das mediane Alter der Patienten mit einer onkologischen Grunderkrankung lag bei 8,2 Jahren (1,5 – 17,9; IQR: 5,0). Die am häufigsten vertretenen Malignome waren ALL mit 44,4% (n = 12/27) und solide Tumore außerhalb des ZNS mit 33,3% (n = 9/27). Rezidive der onkologischen Grunderkrankungen wurden bei 29,6% (n = 8/27) der Kinder und Jugendlichen mit onkologischer Grunderkrankung diagnostiziert.

Tabelle 6: Vergleich der Patienten mit onkologischer Grunderkrankung vs. Patienten ohne onkologische Grunderkrankung

	mit onk. Grunderkrankung (N=27)	ohne onk. Grunderkrankung (N=90)	Statistik
Anamnese			
Antibiotika Vorbehandlung	(n=24/27) 88,9%	(n=52/82) 63,4%	p=0,015
Chemotherapie	(n=24/25) 96,0%	(n=0/90) 0%	p<0,001
Symptomatik			-
schwere Durchfälle	(n=9/17) 52,9%	(n=34/84) 40,5%	n.s.
reduzierter AZ	(n=14/21) 66,7%	(n=43/82) 52,4%	n.s.
Erbrechen	(n=4/15) 26,7%	(n=35/82) 42,7%	n.s.
Bauchschmerzen	(n=7/14) 50,0%	(n=18/72) 25,0%	n.s.
Mukositis Grad III	(n=8/27) 29,6%	-	-
Febrile Granulozytopenie	(n=8/27) 29,6%	-	-
Stuhl Diagnostik			
virales Kopathogen	(n=3/20) 15,0%	(n=28/64) 43,8%	p=0,032
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=10/27) 37,0%	(n=22/90) 24,4%	n.s.
Laborbefunde			
Neutropenie	(n=1/27) 3,7%	(n=0/82) 0%	n.s.
Therapie			
<i>C. difficile</i> Therapie	(n=16/27) 59,3%	(n=11/86) 12,8%	p<0,001
mit Metronidazol	(n=9/16) 56,3%	(n=7/11) 63,6%	n.s.
mit Vancomycin	(n=7/16) 43,8%	(n=2/11) 18,2%	n.s.

Eine Chemotherapie wurde bei fast allen Kindern und Jugendlichen mit einer onkologischen Grunderkrankung durchgeführt (n = 24/25; 96,0%) und bei keinem Studienteilnehmer ohne onkologischer Grunderkrankung (p <0,001). Ein virales Kopathogen konnte für Patienten ohne Malignom in 43,8% (n = 28/64) der Fälle diagnostiziert werden. Dies gelang in der Vergleichsgruppe signifikant seltener (n = 3/20; 15,0%) (p = 0,032). Eine Neutropenie trat bei 3,7% (1/27) der Studienteilnehmer mit onkologischer Grunderkrankung auf. Eine *C. difficile*-spezifische Therapie wurde signifikant häufiger bei Kindern und Jugendlichen mit onkologischer Grunderkrankung durchgeführt (n = 16/27; 59,3%) im Vergleich zu Patienten, die diese nicht aufwiesen (n = 11/86; 12,8%) (p <0,001).

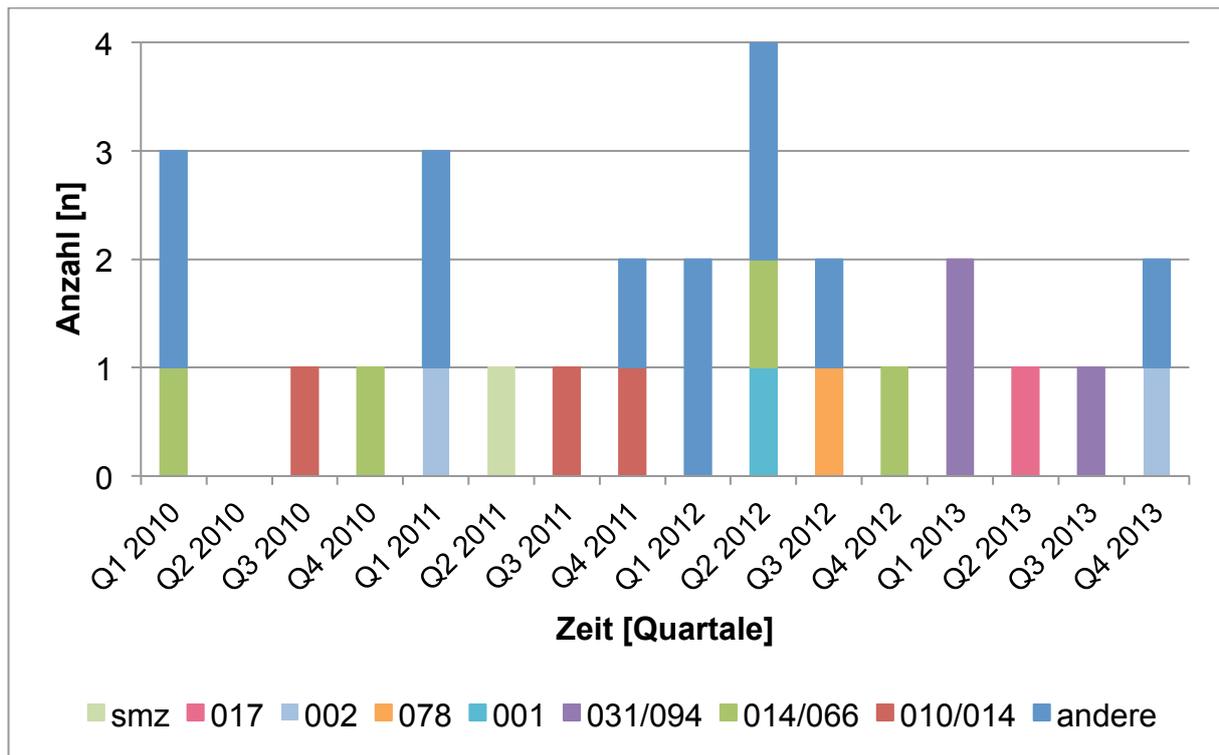


Abbildung 12: Verteilung der slpA-Ribotypen der Isolate von Patienten mit onkologischer Grunderkrankung während des Untersuchungszeitraumes (n = 27)

In den Stuhlproben der Patienten mit einer onkologischen Grunderkrankung wurden über den Untersuchungszeitraum am häufigsten die anderen slpA-Ribotypen festgestellt. Die Anzahl der CDI-Diagnosen pro Quartal schwankte zwischen 0 und 4. Mit Ausnahme des ersten Quartals 2013, trat in einem Quartal nie ein eindeutiger slpA-Ribotyp zweimal auf.

3.2.4 Patienten mit Therapie vs. Patienten ohne Therapie (der CDI)

Tabelle 7: Gegenüberstellung: Patienten mit Therapie vs. Patienten ohne Therapie

	mit Therapie (N=27)	ohne Therapie (N=86)	Statistik
Allgemeine Angaben			
Geschlecht (w m)	N=(10/27) 37,0% N= (17/27) 63,0%	N= (31/86) 36,0% N= (55/86) 64,0%	n.s.
Alter [Median (Range)]	8,3 (1.1-17.9)	2.2 (1.0-17.3)	n.s.
Größe [Median (Range)] [Perzentile]	25 (3-94)	28 (3-97)	n.s.
Größe <3. Perzentile	(N=2/10) 20,0%	(N=11/56) 19,6%	n.s.
Gewicht [Median (Range)] [Perzentile]	29 (3-89)	38 (3-97)	n.s.
Gewicht <3.Perzentile	(N=2/11) 18,2%	(N=11/56) 19,6%	n.s.
Anamnese			
Koinfektion	(n=6/16) 37,5%	(n=40/85) 47,1%	n.s.
Grunderkrankung	(n=25/27) 92,6%	(n=57/86) 66,3%	p=0,007
onk. Grunderkrankung	(n=16/27) 59,3%	(n=11/86) 12,8%	p<0,001
Chemotherapie	(n=13/25) 52,0%	(n=11/86) 12,8%	p<0,001
kard. Grunderkrankung	(n=1/27) 3,7%	(n=29/86) 33,7%	p=0,001
Antibiotika Vorbehandlung	(n=20/26) 77,0%	(n=56/82) 68,3%	n.s.
Penicillin	(n=11/20) 55,0%	(n=12/50) 24,0%	p=0,023
Cephalosporin	(n=8/20) 40,0%	(n=35/50) 70,0%	p=0,029
Aminoglykosid	(n=2/20) 10,0%	(n=10/50) 20,0%	n.s.
Sonstige	(n=8/20) 40,0%	(n=13/50) 26,0%	n.s.
Antibiotikatage [Median (Range)]	6 (4-8)	3 (1-38)	n.s.
Symptomatik			
schwere Durchfälle	(n=12/19) 63,2%	(n=31/81) 38,3%	n.s.
reduzierter AZ	(n=12/23) 52,2%	(n=34/79) 43,0%	n.s.
Erbrechen	(n=9/18) 50,0%	(n=30/79) 38,0%	n.s.
Bauchschmerzen	(n=7/15) 46,7%	(n=18/71) 25,3%	n.s.
Stuhldiagnostik			
virales Kopathogen	(n=6/21) 28,6%	(n=23/59) 39,0%	n.s.
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=24/27) 88,9%	(n=52/86) 60,5%	p=0,009
Laborbefunde			
Leukozyten [Median (Range)] [x10 ⁹ /l]	7,7 (0,1-26,0)	8,8 (0,5-30,1)	n.s.
CRP [Median (Range)] [mg/dl]	24,6 (0,5-301,0)	6,9 (0,1-162,7)	p=0,020
Kalium [Median (Range)] [mmol/l]	3,9 (2,8-5,0)	4,6 (3,2-6,3)	n.s.
Therapie			
<i>C. difficile</i> Therapie	(n=27/27) 100%	-	-
stat. Behandlungstage nach CDI Diagnose [Median (Range)]	6 (1-90)	3 (1-43)	p=0,001

Anamnese

Von 27 therapiebedürftigen Patienten wies lediglich ein Studienteilnehmer eine kardiologische Grunderkrankung (3,7%) auf. In der Gruppe der Patienten ohne Therapie lag der Anteil dieser Patienten mit 33,7% (N = 29/86) signifikant höher ($p = 0,001$). Eine Grunderkrankung konnte für 92,6% (n = 25/27) der Patienten dokumentiert werden, die eine spezifische Therapie der CDI erhielten. In der Gruppe der nicht therapierten Studienteilnehmer wiesen mit 66,3% (n = 57/86) signifikant weniger Kinder und Jugendliche eine Komorbidität auf ($p = 0,007$).

Symptomatik

In 63,2% (n = 12/19) der Fälle gingen einer *C. difficile* spezifischen Therapie schwere Durchfälle voraus. Diese konnten nur bei 38,3% (N = 31/81) der Kinder und Jugendlichen ohne Therapiebedürftigkeit beobachtet werden.

Stuhldiagnostik

Statistisch signifikant häufiger gelang im EIA bzw. der PCR bei negativem Testergebnis des EIA, der Toxinnachweis in der Kategorie der Patienten, die eine *C. difficile* spezifische therapeutische Intervention erhielten (88,9%; n = 24/27), im Vergleich zu den Studienteilnehmern, deren Infektion mit *C. difficile* nur durch symptomatische Maßnahmen behandelt wurde (60,5%; N = 52/86) ($p = 0,009$).

Laborbefunde

Eine signifikante Diskrepanz zwischen beiden Gruppen ließ sich bezüglich der CRP-Werte der Patienten feststellen ($p = 0,025$). Der Median der CRP-Werte der Patienten, die eine spezifische Therapie der CDI erhielten, lag bei 24,6 mg/dl (0,5 – 301,0; IQR: 86,2), die Werte der Vergleichsgruppe lagen deutlich darunter, der Median befand sich bei 6,9 mg/dl (0,2 – 162,7; IQR: 25,7).

Therapie

Patienten mit einer gegen die CDI gerichteten Therapie verbrachten nach der Diagnose der CDI im Median 6 Tage (1 – 90; IQR: 6) stationär bis zu ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus. Kinder und Jugendliche, die ausschließlich symptomatisch therapiert wurden, konnten bereits im Median nach 3 Tagen (1 – 43; IQR: 5) entlassen werden. Der Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen war statistisch signifikant ($p = 0,001$).

Ergebnisse der Ribotypisierung: Isolate von Patienten mit spezifischer CDI Therapie vs. Patienten ohne spezifische Therapie der CDI

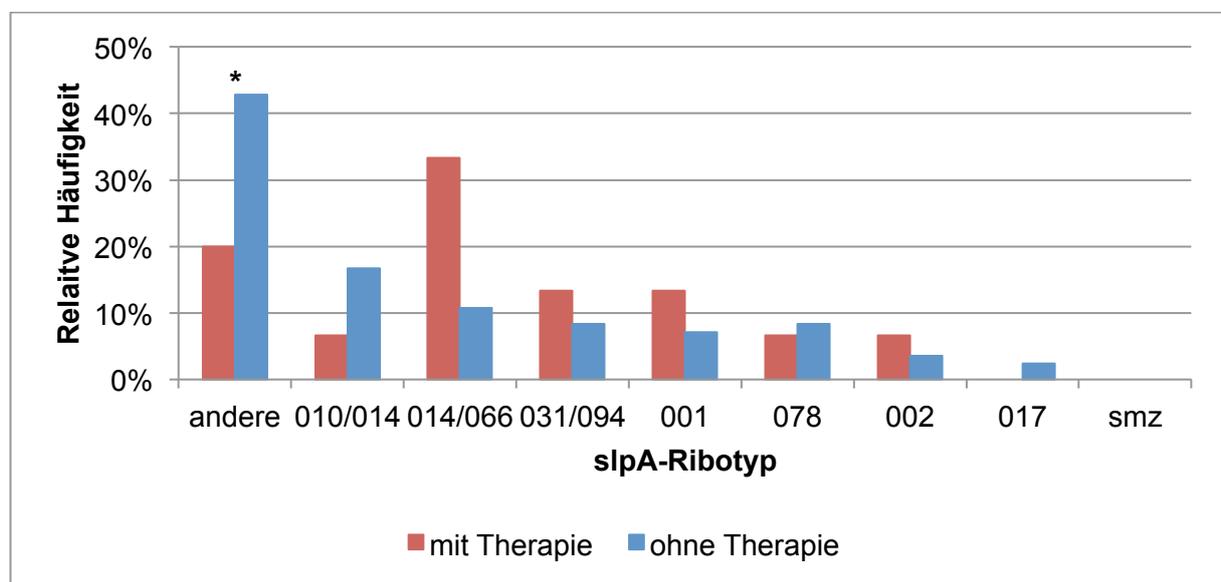


Abbildung 13: Gegenüberstellung der slpA-Ribotypen: Isolate von Patienten mit spezifischer Therapie der CDI vs. Isolate von Patienten ohne spezifische Therapie der CDI, * $p < 0,05$

Patienten, die keine spezifische *C. difficile* Therapie erhielten, waren signifikant häufiger mit einem der anderen slpA-Ribotypen (42,9%; $n = 36/84$) besiedelt als Kinder und Jugendliche, bei denen eine gegen die CDI gerichtete Therapie notwendig war (20,0%; $N = 3/15$) ($p = 0,036$). Des Weiteren ist auffällig, dass der slpA-Genotyp 010/014 mit 16,7% ($n = 14/84$) in der Gruppe der nicht spezifisch therapierten Fälle deutlich häufiger zu finden war als in der Kategorie der Patienten mit einer CDI spezifischen Therapie ($n = 1/15$; 6,7%). Ein Drittel ($n = 5/15$) aller Fälle

mit einer gegen die CDI gerichteten Therapie wurde durch den slpA-Ribotyp 014/066 verursacht. Dieser war im Vergleich nur für 10,7% (n = 14/84) der Infektionen von Kindern und Jugendlichen verantwortlich, die nicht spezifisch therapiert werden mussten. Die bisher nicht genannten slpA-Genotypen waren in den beiden, in diesem Abschnitt gegenübergestellten Vergleichsgruppen, ungefähr gleich stark repräsentiert.

3.2.5 Vergleich der Patienten in drei Altersklassen

Tabelle 8: Vergleich der Studienteilnehmer in drei Altersklassen

Patientenalter [Jahre]	1-<2 (N=46)	2-<8 (N=37)	8-<18 (N=35)	Statistik
Allgemeine Abgaben				
Geschlecht (w m)	(N=18/46) 39,1% (N=28/46) 60,9%	(N=14/37) 37,8% (N=23/37) 62,1%	(N=11/35) 31,4% (N=24/35) 68,6%	n.s.
Alter [Median (Range)]	1,3 (1,0-1,9)	3,4 (2,1-7,9)	10,7 (8,2-17,9)	-
Größe [Median (Range)] [Perzentile]	27 (3-94)	21(3-97)	36 (6-94)	n.s.
Größe <3. Perzentile	(N=7/29) 24,1%	(N=3/24) 12,5%	(N=3/20) 15,0%	n.s.
Gewicht [Median (Range)] [Perzentile]	38 (3-92)	43 (3-88)	41 (3-97)	n.s.
Gewicht <3. Perzentile	(N=5/33) 15,2%	(N=3/30)10,0%	(N=5/22) 22,7%	n.s.
Anamnese				
Koinfektion	(n=24/44) 54,5%	(n=15/34) 44,1%	(n=7/34) 20,6%	p=0,008
Grunderkrankung	(n=24/46) 52,2%	(n=27/36) 75,0%	(n=32/35) 91,4%	p<0,001
onk. Grunderkrankung	(n=1/46) 2,2%	(n=10/36) 27,8%	(n=16/35) 45,7%	p<0,001
Chemotherapie	(n=1/46) 2,2%	(n=9/35) 25,7%	(n=14/34) 41,2%	p<0,001
kard. Grunderkrankung	(n=13/46) 28,3%	(n=10/36) 27,8%	(n=7/35) 20,0%	n.s.
Antibiotika Vorbehandlung	(n=26/40) 65,0%	(n=23/35) 65,7%	(n=27/35) 77,1%	n.s.
Penicillin	(n=5/22) 22,7%	(n=8/22) 36,4%	(n=10/26) 38,5%	n.s.
Cephalosporin	(n=17/22) 77,3%	(n=17/22) 77,3%	(n=9/26) 34,6%	p=0,002.
Aminoglykosid	(n=4/22) 18,2%	(n=4/22) 18,2%	(n=4/26) 15,4%	n.s.
Sonstige	(n=4/22) 18,2%	(n=4/22) 18,2%	(n=13/26) 50,0%	p=0,025
Antibiotikage [Median (Range)]	3 (1-9)	6 (1-38)	5 (1-10)	n.s.
Symptomatik				
schwere Durchfälle	(n=17/42) 40,5%	(n=15/31) 48,4%	(n=11/28) 39,3%	n.s.
reduzierter AZ	(n=21/43) 48,8%	(n=13/29) 44,8%	(n=12/31) 38,7%	n.s.
Erbrechen	(n=20/43) 46,5%	(n=9/28) 32,1%	(n=10/26) 38,5%	n.s.
Bauchschmerzen	(n=4/36) 11,1%	(n=11/29) 37,9%	(n=10/21) 47,6%	p=0,004
Stuhl Diagnostik				
virales Kopathogen	(n=19/36) 52,8%	(n=11/28) 39,3%	(n=1/21) 4,8%	p<0,001
Toxin A (tcdA) und B (tcdB)	(n=30/46) 65,2%	(n=23/37) 62,2%	(n=25/35) 71,4%	n.s.
Laborbefunde				
Leukozyten [Median (Range)] [$\times 10^9/l$]	9,5 (3,7-17,3)	8,8 (0,5-30,1)	7,0 (0,1-16,3)	n.s.
CRP [Median (Range)] [mg/dl]	9,4 (0,1-162,7)	7,9 (0,3-135,9)	9,7 (0,1-301,0)	n.s.
Kalium [Median (Range)] [mmol/l]	4,7 (3,8-6,3)	4,4 (2,9-5,4)	4,3 (2,8-5,7)	n.s.
Therapie				
<i>C. difficile</i> Therapie	(n=5/44) 11,4%	(n=7/34) 20,5%	(n=15/35) 42,9%	p=0,005
stat. Behandlungstage nach CDI Diagnose [Median (Range)]	2 (1-43)	3 (1-90)	6 (1-42)	p=0,002

Anamnese

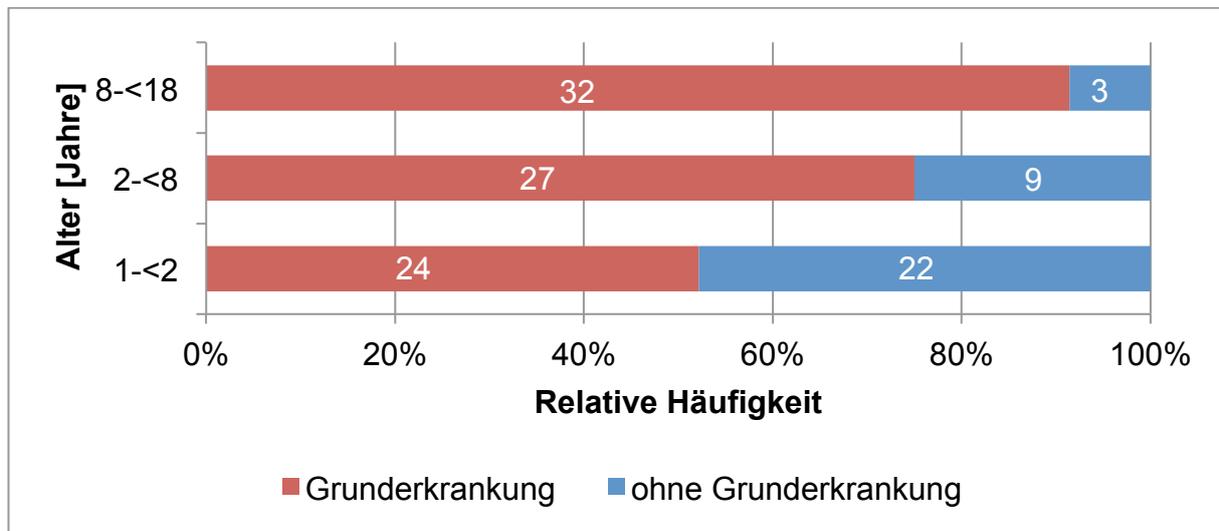


Abbildung 14: Verteilung von Grunderkrankungen: Vergleich der Altersklassen; $p < 0,001$

Der Anteil der Patienten mit mindestens einer Grunderkrankung nahm mit steigendem Lebensalter zu. Allerdings waren bereits in der Gruppe der Patienten mit einem Alter < 2 Jahre bei 52,2% ($N = 24/44$) der Studienteilnehmer chronische Erkrankungen zu finden. Von den 2 bis < 8 -jährigen Patienten bestand bei drei Viertel ($N = 27/36$) eine Grunderkrankung. In der höchsten Altersklasse wiesen mit 91,4% ($N = 32/35$) fast alle Kinder und Jugendlichen eine Grunderkrankung auf. Diese dargestellten Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der gleiche Trend war auch für Patienten mit einer onkologischen Grunderkrankung zu finden. Der Anteil dieser stieg von 2,2% ($N = 1/46$) über 27,8% ($N = 10/36$) auf 45,7% ($N = 16/35$) mit zunehmendem Alter der Patienten. Auch hier konnte eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

Antibiotika der Gruppe der Cephalosporine wurden mit jeweils 77,3% ($n = 17/22$) am häufigsten in der Vorgeschichte der Kinder mit einem Alter von 1 bis 2 Jahren und 2 bis < 8 Jahren gefunden. In der Gruppe der 8 bis < 18 Jahre alten Studienteilnehmer wurden 34,6% ($n = 9/26$) der Studienteilnehmer mit einem Cephalosporin vorbehandelt. Die Unterschiede stellten sich als statistisch signifikant heraus ($p = 0,002$). Der Einsatz von sonstigen Antibiotika wurde am häufigsten

(n = 13/26; 50,0%) in der Kategorie der 8 bis <18-jährigen beobachtet. Die Patienten der jüngsten Altersklasse sowie die Gruppe der 2 bis <8 Jahre alten Patienten wurden in jeweils 18,2% (n = 4/22) der Fälle mit einem sonstigen Antibiotikum vortherapiert (p = 0,025).

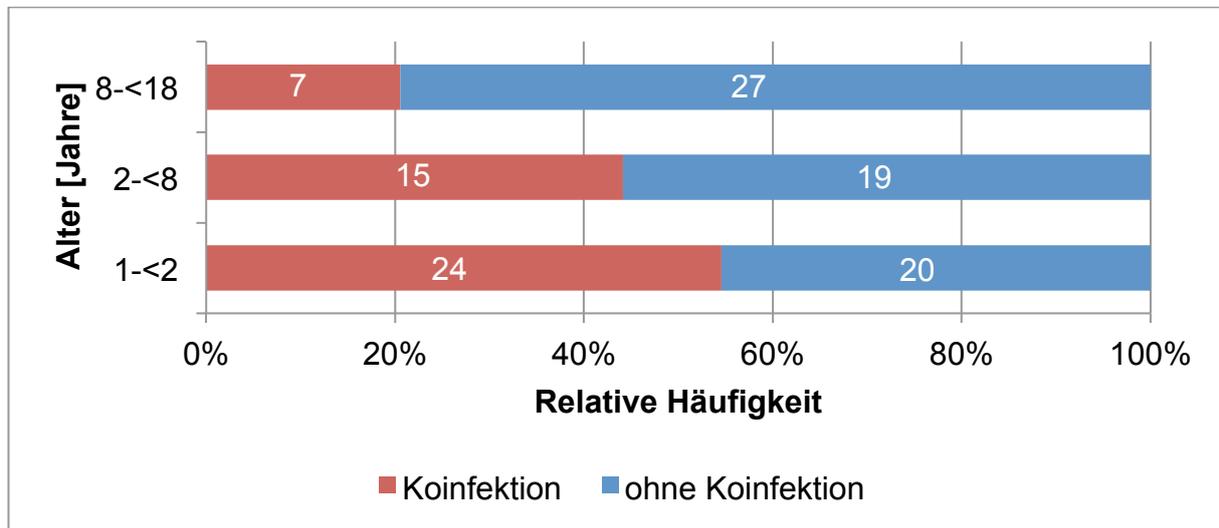


Abbildung 15: Häufigkeit von Koinfektionen: Vergleich der Altersklassen; p = 0,008

Betrachtete man die Verteilung der Koinfektionen in den Altersgruppen, so ließ sich ein deutlicher Trend dahingehend feststellen, dass die jüngeren Patienten signifikant mehr Koinfektionen aufwiesen. Die Patientengruppe mit den meisten Koinfektionen war mit 54,5% (n = 24/44) die Gruppe der Kinder <2 Jahre. Die Kategorie der 2 bis <8-jährigen wies in 44,1% (n = 15/34) und die Gruppe mit den ältesten Studienteilnehmern in 20,6% (n = 7/34) der Fälle Koinfektionen auf (p = 0,008).

Symptomatik

Das Symptom Bauchschmerzen trat in Anhängigkeit der Altersgruppe unterschiedlich häufig auf. In der Kategorie der jüngsten Patienten konnte dies für 11,1% (n = 4/36) der Kleinkinder ermittelt werden. Bei 37,9% (n = 11/29) der Kinder und Jugendlichen zwischen 2 und <8 Jahren konnten Bauschmerzen dokumentiert werden. In der Gruppe der 8 bis <18-jährigen litt mit 47,6% (n = 10/21) fast die Hälfte aller Patienten unter Bauchschmerzen (p = 0,004).

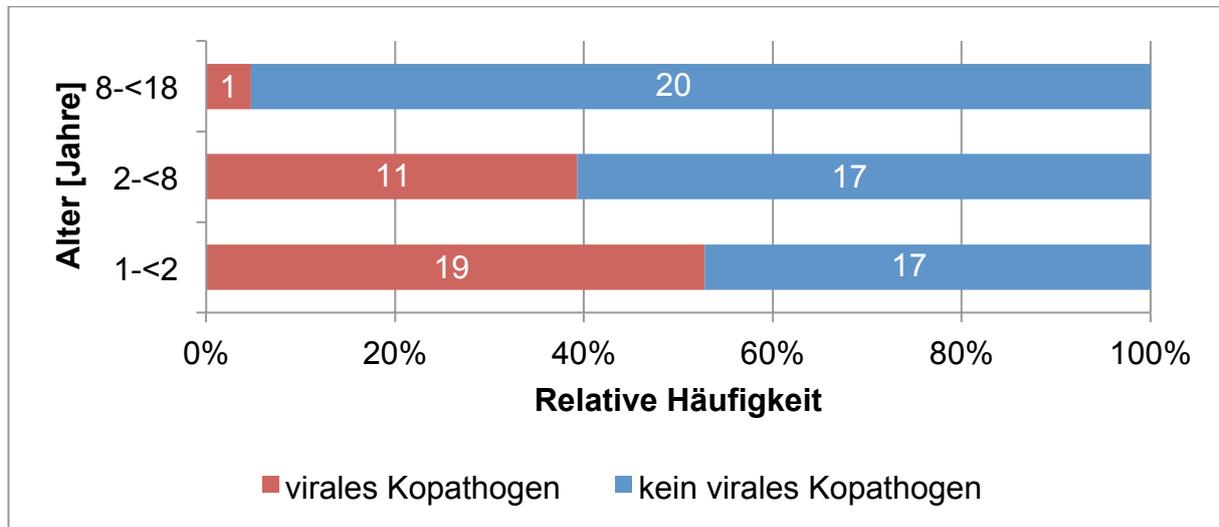
Stuhldiagnostik

Abbildung 16: Häufigkeit von viralen Kopathogenen: Vergleich der Altersklassen; $p < 0,001$

In der jüngsten Patientenklasse traten virale Kopathogene mit 52,8% ($n = 19/36$) aller in die Studie aufgenommenen Kleinkinder besonders häufig auf. In der Gruppe der 2 bis <8-jährigen sank der Anteil dieser Patienten auf 39,3% ($n = 11/28$). Lediglich ein Patient ($n = 1/21$; 4,8%) mit einem Alter zwischen 8 und <18 Jahren wies ein virales Kopathogen auf. Diese deutlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Patientenklassen waren statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Therapie

Die Dauer der stationären Therapie der Patienten nach Abgabe der positiv auf *C. difficile* getesteten Stuhlprobe unterschied sich signifikant in Abhängigkeit der Zugehörigkeit der Studienteilnehmer zu einer der drei analysierten Alterskategorien ($p = 0,002$). Patienten mit einem Alter von 1 bis <2 Jahre verbrachten im Median 2 Tage (1 – 43; IQR: 4,8) nach der Diagnose der CDI im Krankenhaus. Mit zunehmendem Alter der Patienten stieg dieser Wert von im Median 3 Tagen (1 – 90; IQR: 7) für die 2 bis <8-jährigen, auf im Median 6 Tage (1 – 42; IQR: 7,5) für die Kinder und Jugendlichen der höchsten Altersgruppe. Eine spezifische Therapie der CDI wurde mit zunehmendem Patientenalter signifikant häufiger durchgeführt

($p = 0,005$). In der jüngsten Altersklasse erhielten 11,4% (5/44) eine spezifische Therapie der CDI. Dies konnte in den beiden übrigen Altersklassen für 20,6% (7/34) bzw. 42,9% (15/35) der Studienteilnehmer dokumentiert werden.

4 Lokale Epidemiologie von *Clostridium difficile* Infektionen

4.1 Material und Methoden

Untersucht wurden retrospektiv alle in diesem Kontext relevanten mikrobiologischen Labordaten der Jahre 2000 bis 2013. Dies erfolgte von 2000 bis 2010 durch eine Datenabfrage aus dem MIB-Programm, welches im Institut für Mikrobiologie und Hygiene verwendet wurde. Für die Jahre 2011 bis 2013 stammten die Daten aus dem M/LAB-System, welches das MIB-Programm ablöste.

Dabei wurden folgende Daten erhoben:

- Anzahl der Untersuchungen auf *C. difficile*
- Ergebnis der Untersuchungen auf *C. difficile*
- Anzahl der durchgeführten Toxintests
- Ergebnisse der Toxintests
- anfordernde Kliniken
- Patientenalter
- slpA-Ribotyp der Isolate aus positiven Stuhlproben (ab 2011)

Die Analyse der Daten aus den Jahren 2000 bis 2010 erfolgte manuell. Die Auswertung der in den Jahren 2011 bis 2013 gewonnenen Daten wurde mit Microsoft Excel™-(Version 14.0.1) durchgeführt.

4.2 Ergebnisse

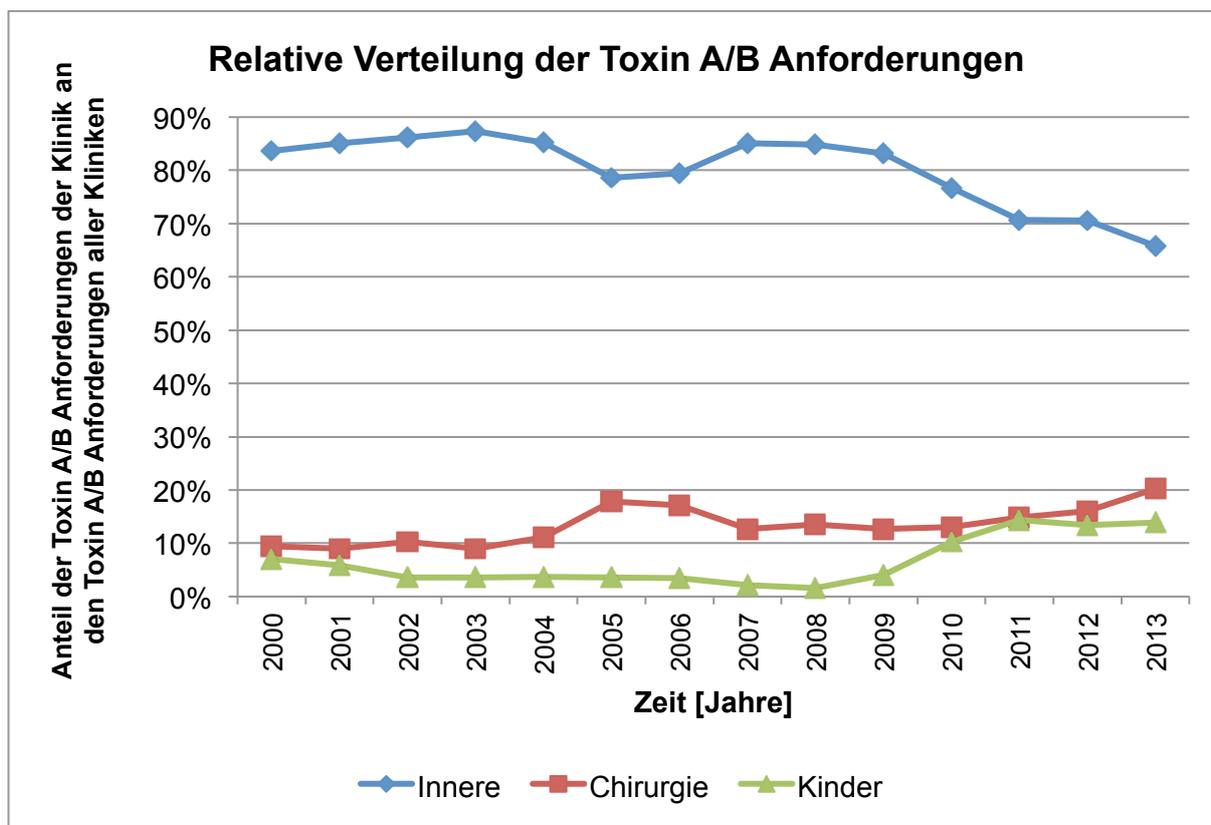


Abbildung 17: Relative Häufigkeit der Toxin A/B Anforderungen der verschiedenen Kliniken

Betrachtet man die relative Verteilung der Anforderung eines Toxin A/B Tests im Vergleich der verschiedenen Einsender, so erkennt man auf den ersten Blick, dass der überwiegende Teil der Anforderungen von den internistischen Kliniken gestellt wurde. Der Anteil dieser Anfragen schwankte über den dargestellten Zeitraum zwischen 87,4% ($n = 758/867$) im Jahr 2003 und 65,8% ($n = 1.533/2.331$) im Jahr 2013. Die Kinderklinik stellte, von allen dargestellten Kliniken, den geringsten prozentualen Anteil an Toxin A/B Anfragen während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Die Pädiatrie bestritt zwischen 1,6% ($n = 33/2.020$) der Anforderungen im Jahr 2008 und 14,4% ($n = 318/2.202$) im Jahr 2011. Auch für die pädiatrischen Anfragen ließ sich in den Jahren 2009 bis 2013 ein ansteigender Trend feststellen. So stieg der Prozentsatz der Anfragen während dieses Zeitraumes von 4,1% ($n = 79/2.914$) auf 13,9% ($n = 325/2.331$) an.

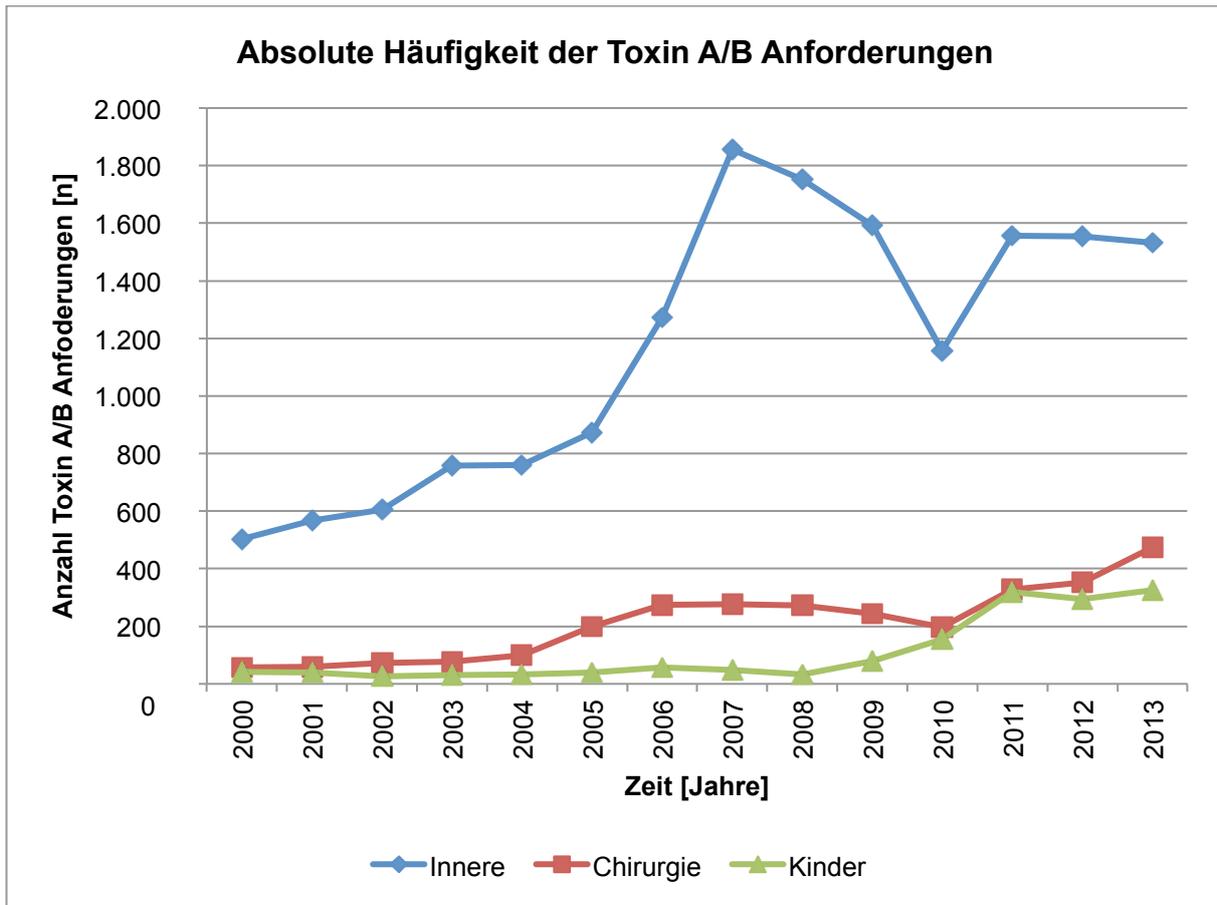


Abbildung 18: Absolute Häufigkeit der Toxin A/B Anforderungen der verschiedenen Kliniken

Den größten Anteil aller Einsendungen bestritten, über den gesamten dargestellten Zeitraum, die Proben der Kliniken für Innere Medizin. Die Zahl ihrer Einsendungen stieg über die Jahre 2000 (n = 503 Anforderungen) bis 2005 (n = 873 Anforderungen) stetig an. Im Jahr 2007 erreichte die Anzahl der Toxin A/B Anforderungen nach einem starken Anstieg einen Wert von 1.855. Bis zum Jahr 2010 sanken die Anfragen der Kliniken für Innere Medizin auf 1.157 ab. In den Jahren 2010 bis 2013 lagen die Anforderungen auf einem konstanten Niveau von etwa 1.550 Anforderungen pro Jahr.

Die Anfragen der beiden übrigen Einsender stiegen über die dargestellten 13 Jahre deutlich an. Im Jahr 2000 kamen circa 50 Einsendungen aus der Kinderklinik bzw. der Chirurgie. Diese Zahl verzehnfachte sich ungefähr im Laufe der Jahre 2004 bis 2013. Im Jahr 2013 stammten 473 Toxin A/B Anforderungen aus den chirurgischen

Kliniken und 325 Untersuchungen wurden aus der Kinderklinik angefragt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum kamen in jedem Jahr die wenigsten Anforderungen aus der Kinderklinik, mit Ausnahme des Jahres 2011.

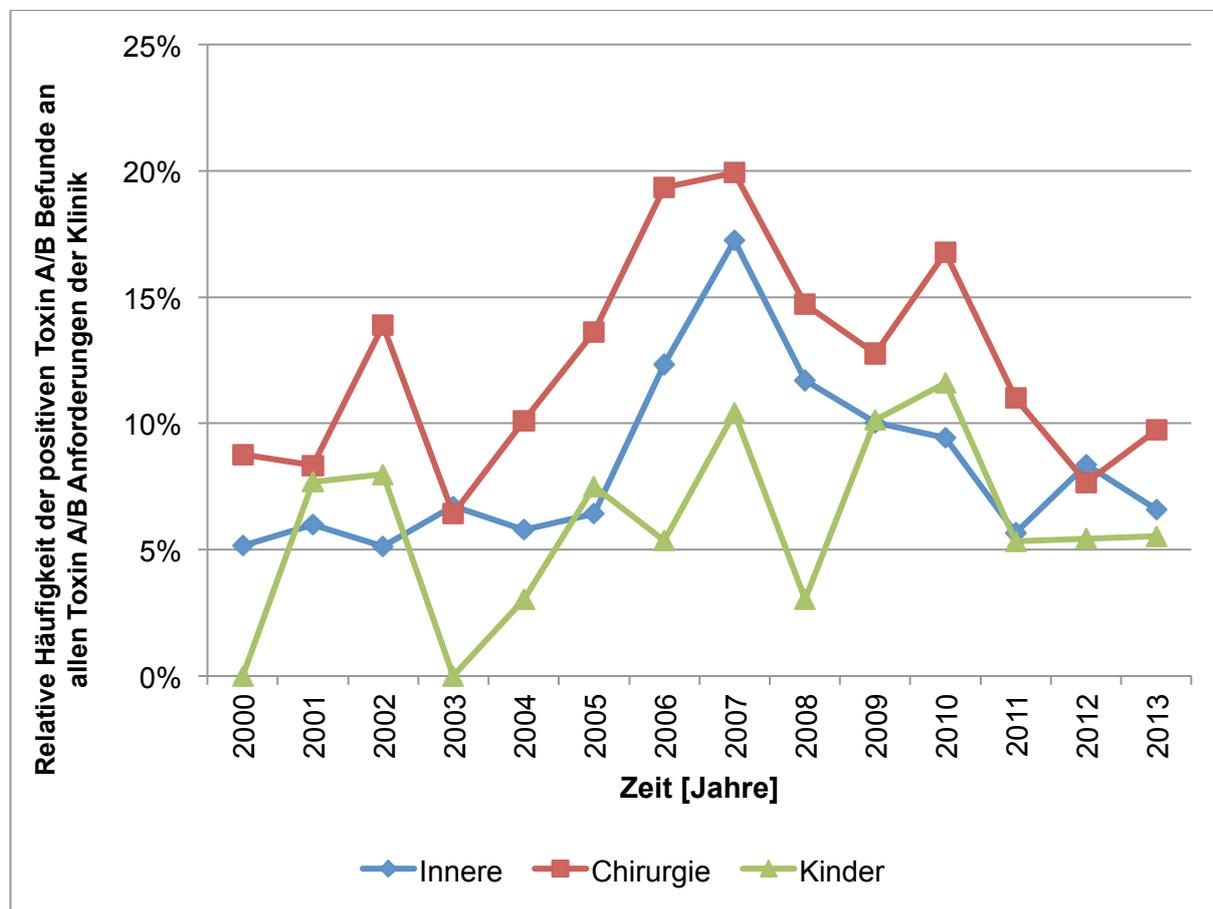


Abbildung 19: Relative Häufigkeit der positiven Toxin A/B Befunde an allen Anforderungen der jeweiligen Klinik

Abbildung 19 stellt den Anteil der positiv auf Toxin A/B (durch den EIA oder Nachweis der Toxingene mittels PCR) getesteten Proben an allen Toxin A/B Anforderungen der jeweiligen Klinik dar. Die Zahlen der Kinderklinik schwankten in den Jahren 2000 bis 2010 stark zwischen Werten von 0% (n = 0/42 bzw. n = 0/31) für die Jahre 2000 sowie 2003 und 11,6% (n = 18/155) im Jahr 2010. Im Zeitraum von 2011 bis 2013 erreichte der Anteil der positiven Toxin A/B Tests ein konstantes Niveau von etwa 5% (n = 17/318, n = 16/294, n = 18/325) der Toxin A/B Anforderungen der pädiatrischen Klinik. Für die Einsendungen der Kliniken für Innere Medizin gelang während den Jahren 2000 bis 2005 in circa 5% der Fälle der

Nachweis eines toxinogenen *C. difficile* Stammes. Dieser Anteil stieg bis 2007 auf 17,2% (n = 320/1.855) an. In den folgenden Jahren gelang der Nachweis zunehmend seltener. Im Jahr 2013 waren 6,6% (n = 101/1.533) der angeforderten Toxintests der Kliniken für Innere Medizin positiv. Über den gesamten Untersuchungszeitraum war ein relativ hoher Anteil der aus der Klinik für Chirurgie eingesendeten Proben positiv auf die Toxine von *C. difficile*. Dieser Anteil stieg von 8,8% (n = 5/57) im Jahr 2000 bis auf 19,9% (n = 55/276) im Jahr 2007 um bis 2013 wieder auf 9,1% (n = 43/474) abzufallen.

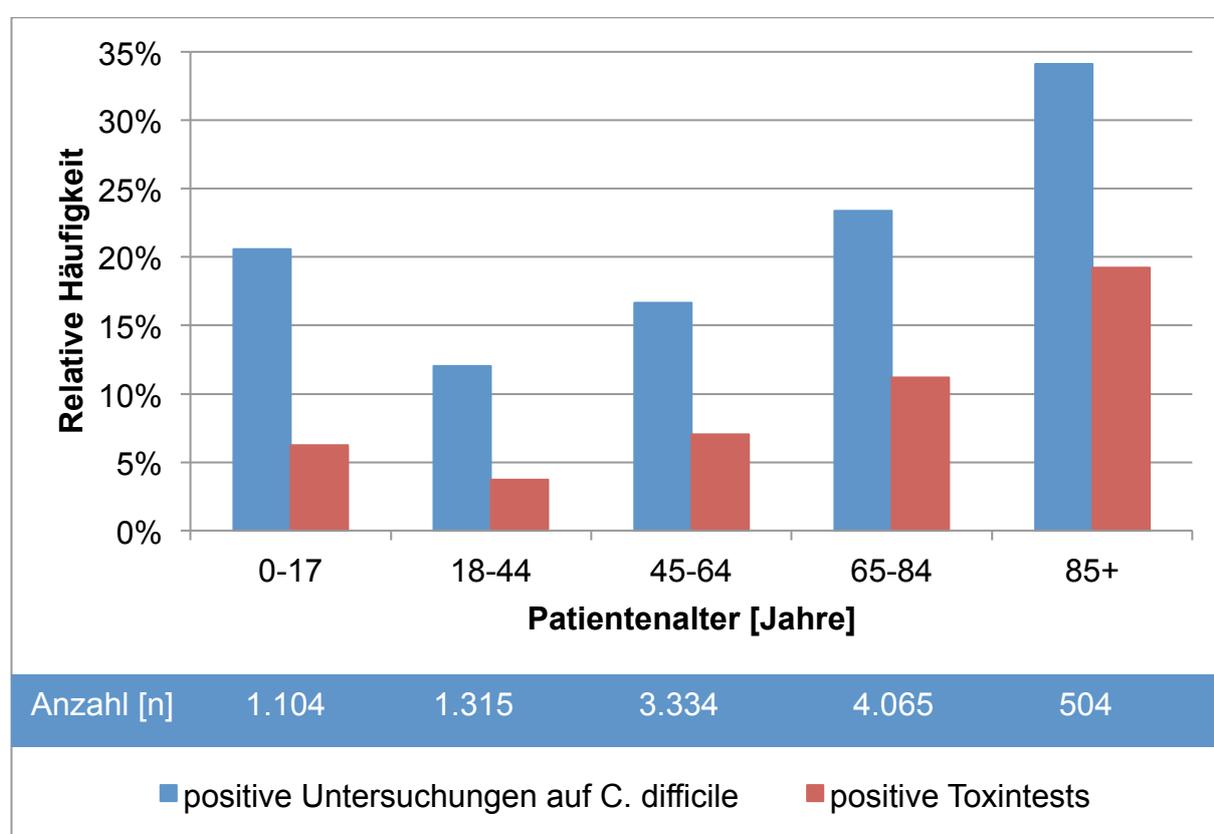


Abbildung 20: Relative Häufigkeit der positiven Untersuchungen auf *C. difficile* und der positiven Toxin-Tests in den verschiedenen Altersklassen bezogen auf alle Untersuchungen auf *C. difficile* bzw. alle Toxin-Tests, (2011-2013)

In der Altersklasse der 0 bis 17-jährigen konnten von 2011 bis 2013 insgesamt 1.104 Proben untersucht werden. In 20,6% (n = 227/1.104) der Fälle fiel der Test auf *C. difficile* positiv aus. Der Toxinnachweis konnte bei 6,3% (n = 69/1.104) aller Proben geführt werden. In der Kategorie der Proben von Patienten mit einem Alter

zwischen 18 und 44 Jahren bei Probenabgabe fiel die Untersuchung auf *C. difficile* nur in 12,0% (n = 158/1.315) aller Anforderungen positiv aus und damit deutlich seltener als in der Gruppe der Kinder. Auch ein toxinogener Stamm konnte nur in 3,7% (n = 49/1.315) der Fälle identifiziert werden. Der Anteil der positiven Untersuchungen auf Toxin A oder B bildende *C. difficile* Isolate stieg mit zunehmendem Alter der Patienten an. Während bei Patienten mit einem Alter zwischen 45 und 64 Jahren der Test auf *C. difficile* in 16,7% (n = 556/3.334) und der Toxintest in 7,0% (n = 235/3.334) der Fälle positiv ausfiel, so konnte dies für 23,4% (n = 950/4.065) bzw. 11,2% (n = 455/4.065) der Patienten der Altersklasse 65 Jahre bis 84 Jahre dokumentiert werden. Darüber hinaus war auch die Anzahl der eingesendeten Proben in der älteren Patientengruppe größer (3.334 von Patienten mit einem Alter von 45 – 64 Jahren vs. 4.065 in der Gruppe, der Patienten mit einem Alter von 65 – 84 Jahren). Am häufigsten gelang der Nachweis von *C. difficile* in den eingesendeten Stuhlproben mit 34,1% (n = 172/504) der Fälle in der Gruppe der Patienten, die 85 Jahre und älter waren. In 19,2% (n = 97/504) der Proben dieses Patientengutes konnte ein toxinogener *C. difficile* Stamm detektiert werden. Die Anzahl der eingesendeten Proben war in dieser Altersklasse mit 504 Proben während der Jahre 2010 bis 2013 deutlich geringer als in allen anderen analysierten Alterskategorien.

Analyse der Verteilung der slpA-Ribotypen in verschiedenen Altersklassen

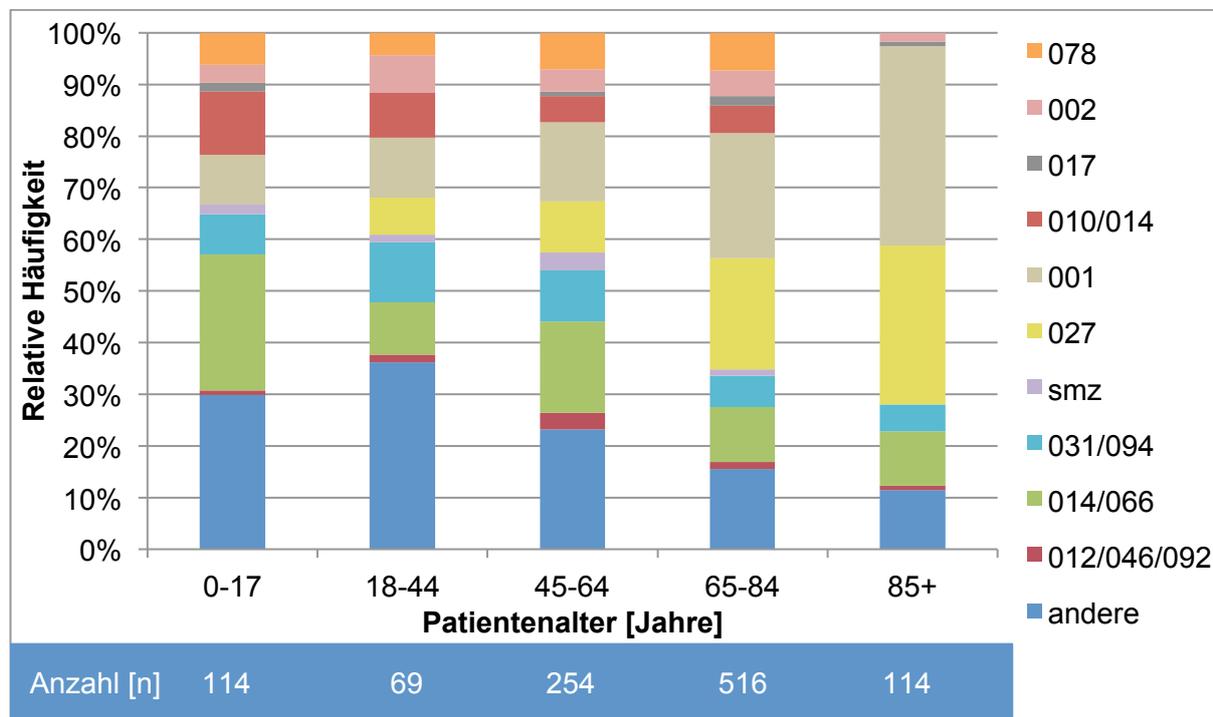


Abbildung 21: Relative Verteilung der Ribotypen in verschiedenen Altersklassen (2011-2013)

Besonders auffällig in Abbildung 21 war, dass der slpA-Ribotyp 027 in der Altersgruppe der Kinder und Jugendlichen mit einem Alter von 0 bis 17 Jahren nicht nachgewiesen wurde. Am höchsten war der Anteil des slpA-Ribotyps 027 mit 30,7% (n = 35/114) in der Altersgruppe der Patienten ≥ 85 Jahre, dagegen betrug er nur 7,2% (n = 5/69) in der Gruppe der 18- bis 44-jährigen.

Eine ähnliche Tendenz ließ sich für den slpA-Ribotyp 001 feststellen, dessen Anteil unterschiedlich in Abhängigkeit des Lebensalters war, mit 38,6% (n = 44/114; Patientenalter ≥ 85 Jahre) bzw. 9,6% der Fälle (n = 11/114; Patientenalter: 0 – 17 Jahre). Im Unterschied zum slpA-Ribotyp 027 wurde der slpA-Ribotyp 001 auch bei Kindern und Jugendlichen nachgewiesen.

Ein umgekehrter Trend war für die anderen slpA-Ribotypen festzuhalten. In den beiden Gruppen der Patienten mit einem Alter von 0 bis 17 Jahren und von 18 bis 44 Jahren bestritten diese Ribotypen 29,8% (n = 34/114) bzw. 36,2% (n = 25/69) aller

nachgewiesenen *C. difficile* Isolate. Mit zunehmendem Alter war ihr Anteil an allen Ribotypen niedriger. In der höchsten Alterskategorie waren die anderen slpA-Ribotypen nur noch in 11,4% (n = 13/114) der Fälle zu finden. Diese Tendenz fand man auch bei der Betrachtung der Anteile des slpA-Ribotyps 010. Bei den jüngsten Patienten bestritt er einen Anteil von 12,3% (n = 14/114) und sank auf 5,2% (n = 27/516) in der Klasse der 65- bis 84-jährigen ab. In der Gruppe der ältesten Patienten konnte er gar nicht nachgewiesen werden. Die übrigen slpA-Ribotypen waren in allen Altersklassen etwa gleich häufig vertreten.

5 Methodenvergleich: slpAST und PCR-Ribotypisierung

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Anaerobe Kultur

Mit einer sterilen Impföse wurde circa 1 ml Probenmaterial von einer nativen Stuhlprobe entnommen, welches durch einen Drei-Ösen-Ausstrich auf eine CLO-Agarplatte aufgetragen wurde. CLO-Agar ist ein Selektivnährboden für *C. difficile*. Anschließend erfolgte für 48 Stunden eine anaerobe Bebrütung in einem GENbox-Anaerobiertopf (Biomérieux) bei 37°C. Konnte auf der Petrischale ein morphologisch typisches Wachstum für *C. difficile*, das heißt circa 4 – 6 mm große, unregelmäßig geformte, gelblich glänzende Kolonien ohne Hämolyse, festgestellt werden, so erfolgte im nächsten Schritt die Sicherung des Nachweises mittels einer massenspektrometrischen Untersuchung mit Hilfe des MALDI-TOF (MALDI-Biotyper, Burkert). Dieses Verfahren beinhaltet eine Kombination aus Laser-Ionisation und Flugzeitmassenspektrometrie. Nach erfolgreicher Bestätigung des Nachweises von *C. difficile* genügte eine anaerobe Bebrütung auf einer Columbia Agar Platte.

5.1.2 DNA-Isolierung

Die Aufreinigung und Isolierung der DNA erfolgte durch den Maxwell 16 MDx Instrument (Promega) und Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit (Promega). Mit einer sterilen 1 µl Impföse wurde eine circa 2 mm³ große Bakterienkolonie in den Lysepuffer der Kartusche eingebracht. Nach Vorbereitung des Gerätes, entsprechend der Herstellerangaben, wurde das Programm „gesamt virale Nukleinsäure“ ausgewählt. Dieses Programm beinhaltete:

1. Lyse der Mikroorganismen
2. DNA-Bindung an paramagnetische Partikel
3. Trocknungsschritte
4. Eluierung der Zielmoleküle

Die auf diese Weise gewonnene DNA-Suspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C eingelagert.

5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Zyklus setzt sich aus folgenden Elementen zusammen:

- Denaturierung (Melting): Bei circa 94 – 96°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge miteinander verbinden, aufgebrochen. Anschließend wird die Temperatur auf circa 65°C abgesenkt. An den offen liegenden Doppelsträngen können nun die Primer binden.
- Primerhybridisierung (Primer-Annealing): Für jeden Primer gibt es eine spezifische Temperatur, die eine optimale Anlagerung an die komplementären Sequenzen zulässt. Diese liegt in der Regel bei 55 – 65°C und wird für etwa 30 Sekunden konstant gehalten.
- Elongation (Amplification): Die DNA-Polymerase füllt die frei liegenden Doppelstränge mit den komplementären Basenpaaren auf. Dies erfolgt vom 3'-Ende in Richtung des 5'-Endes. Die Primer markieren den Beginn des neu zu bildenden Genabschnittes. Die optimale Temperatur für diesen Schritt ist abhängig von der verwendeten Polymerase. Normalerweise liegt sie zwischen 68 und 72°C.

5.1.4 Surface-Layer-Protein-A-Sequenz-Typisierung (slpAST)

Prinzip dieser Typisierung ist es durch Bestimmung der Nukleotid-Abfolge des Surface Layer Protein A's den Genotyp des untersuchten *C. difficile* Stammes zu ermitteln [109, 110]. Im ersten Schritt wurde der spezifische Genabschnitt der aus der Kultur isolierten DNA durch eine PCR vervielfältigt. Der Ansatz dieser PCR setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl 10-fach-PCR-Puffer, 10 µl Q-Lösung, 2,25 µl Nukleotidgemisch (dNTPs), 0,5 µl Primer slpAcom 19, 0,5 µl Primer slpAcom 22, 26,45 µl Nuclease-Free Water, 0,3 µl Taq-Polymerase auf Eis gekühlt. Die dNTPs

bestanden aus: 50 µl dATP, 50 µl dCTP, 50 µl dTTP und 50 µl dGTP und 800 µl Nuclease-Free Water.

Tabelle 9: Übersicht Primer der slpAST-PCR

Target	Primername	Sequenz (5'-3')
slpA	slpAcom 19	GTT GGG AGG AAT TTA AGR AAT G
slpA	slpAcom 22	GCW GTY TCT ATT CTA TCD TYW CC

Dieses Gemisch wurde gleichmäßig à 50 µl aufgeteilt und zusammen mit 5 µl der aufgereinigten DNA zur Durchführung der PCR in den Thermocycler gestellt.

Tabelle 10: Programmierung des Thermocyclers für die slpAST-PCR

Temperatur [°C]	Dauer	
95	5 min	} 29 Wiederholungen
95	20 sec	
60	30 sec	
72	3 min	
72	10 min	
10	∞	

Das gewonnene DNA-Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese bei 150 Volt und einer Laufzeit von 30 Minuten mit einem 1-prozentigen QA-Agarosegel™ (MP North American) der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Amplifikate enzymatisch mit ExoSAP-IT (Affymetrix USB) von freien Nukleotiden und ungenutzten Primern gereinigt. Dies erfolgte, indem 5 µl auf Eis gekühltem Amplifikat 2 µl ExoSAP zugesetzt wurden. Es erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 37°C und 15 weiteren Minuten bei 80°C. Nun konnten die bei -20°C konservierten Isolate an ein externes Labor zur Sequenzierung durch die Didesoxymethode nach Sanger versendet werden. Die Sequenzierungsergebnisse wurden als Datei im FASTA-Format übermittelt und mit Datenbanken abgeglichen. Auf diese Weise konnte der

vorliegende Ribotyp bestimmt werden. Die durch die slpAST bestimmten Ribotypen werden in dieser Arbeit als slpA-Ribotypen bezeichnet.

5.1.5 Multiplex-PCR

Prinzip einer Multiplex-PCR ist es, durch Ansatz einer PCR mit mehreren Primern nicht nur einen, sondern mehrere Genomabschnitte, zu vervielfältigen. In der in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Multiplex-PCR wurden folgende Genabschnitte von *C. difficile* amplifiziert: die Toxingene für das Toxin A bzw. Toxin B (tcdA, tcdB), die Gene für das binäre Toxin (cdtA, cdtB) und das zum Screening nach *C. difficile* eingesetzte Glutamatdehydrogenasegen (GLDH). Das Vorhandensein der Toxingene charakterisiert pathogene *C. difficile* Isolate. Durch die mehrfache Wiederholung der PCR-Zyklen werden die durch die Primer markierten Genabschnitte exponentiell vervielfacht.

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

Tabelle 11: Übersicht Primer der Multiplex-PCR

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

Diesem Ansatz wurden 2,5 µl der aufgereinigten DNA des zu analysierenden *C. difficile* Isolates hinzugefügt.

Für den Ablauf der Multiplex-PCR im Thermocycler wurde folgendes Schema gewählt:

Tabelle 12: Programmierung des Thermocyclers für die Multiplex-PCR

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

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

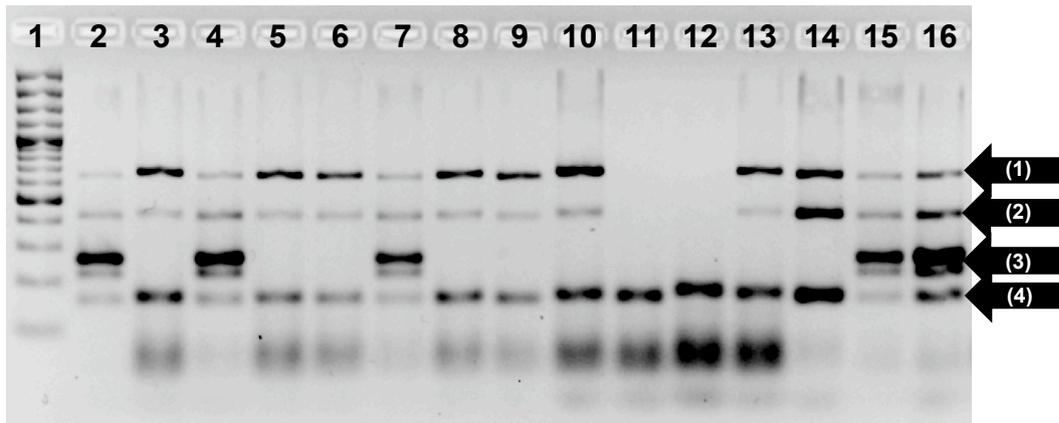


Abbildung 22: Nachweis der Toxingene in der Agarose-Gelelektrophorese; (1) tcdA, (2) tcdB, (3) cdtA und cdtB, (4) GLDH

Mit dem auf diese Weise erzeugten Bild ließ sich nun das Vorhandensein der Toxingene bzw. des GLDH-Gens, wie in Abbildung 22 beispielhaft dargestellt, nachweisen.

5.1.6 PCR-Ribotypisierung

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

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

Tabelle 13: Übersicht Primer der PCR-Ribotypisierung

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

Anschließend konnten die Proben in den Thermocycler gestellt werden, der wie in Tabelle 14 dargestellt ist, programmiert wurde.

Tabelle 14: Programmierung des Thermocyclers für die PCR-Ribotypisierung

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

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Taschen des 1-prozentigen QA-Agarosegels™(MP North American) enthielten: 2,5 µl SYBER Gold Mix und 5 µl PCR-Produkt. Auch hier enthielt jedes Gel einen Ladder und eine Negativkontrolle zusätzlich zu den Amplifikaten. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 100 Volt. Danach konnte eine Aufnahme des Gels durch das Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) erstellt werden.

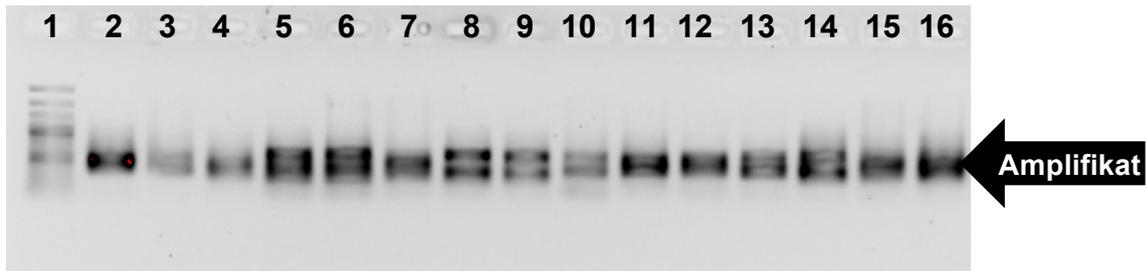


Abbildung 23: Aufnahme eines Gels mit PCR-Ribotypierungs-Amplifikaten

Die Proben, für die die Erfolgskontrolle positiv ausfiel, wurden 1:100 verdünnt, um sie für die DNA-Fragmentanalyse vorzubereiten. Die DNA-Fragmentanalyse wurde durch eine Elektrophorese der PCR-Amplifikate innerhalb der Kapillaren eines Sequencers (GeXP – Genetic Analysis System, Beckmann Coulter) durchgeführt. Dazu wurde mit den Proben wie folgt verfahren: Die 96-Well-Platte, aus welcher der Sequencer das Probenmaterial in die Kapillaren ansaugt, besitzt acht Vertiefungen pro Reihe. Auf diese acht Vertiefungen einer Reihe wurden gleichmäßig verteilt: 0,5 µl GenomeLab DNA size standard Kit-600 (Beckmann Coulter) und 240 µl Sample loading solution (Beckmann Coulter). Darüber hinaus wird in jede Vertiefung 2,5 µl des 1:100 vorverdünnten PCR-Produktes hinzugefügt und jede einzelne Vertiefung mit einem Tropfen Mineralöl (Beckmann Coulter) versiegelt.

Als Ergebnis der DNA-Fragmentanalyse erhält man ein Bandenmuster:

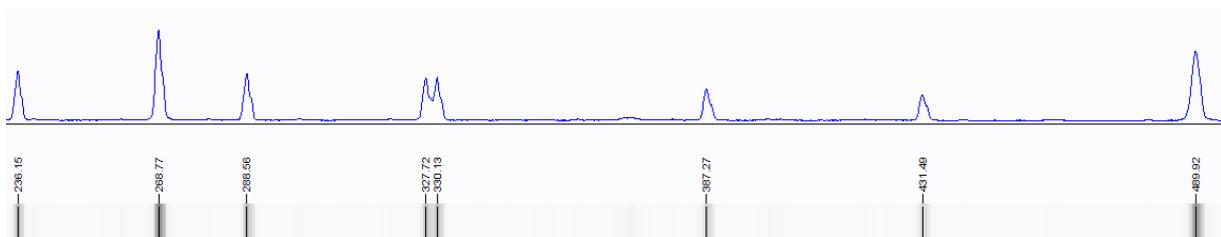


Abbildung 24: Umwandlung des Bandenmusters in Peaks nach Fragmentanalyse der Amplifikate

Diese Banden wurden im Anschluss mit der Software BioNumerics (Applied Maths) in Peaks umgewandelt, welche mit einer Datenbank verglichen wurden. Auf diese Weise wurde die Bestimmung des Ribotyps möglich. Die durch die PCR-Ribotypisierung bestimmten Ribotypen wurden in dieser Arbeit als PCR-Ribotypen bezeichnet.

5.1.7 Geräte, Reagenzien und Software

Siehe Anhang 10.1.

5.2 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 360 verschiedene Isolate von *C. difficile* untersucht. Diese teilten sich wie folgt in fünf verschiedene Altersklassen auf:

- 0 – 18 Jahre (n = 120)
- 18 – 44 Jahre (n = 60)
- 45 – 64 Jahre (n = 60)
- 65 – 84 Jahre (n =60)
- 85+ Jahre (n =60)

5.2.1 Vergleich des Toxinstatus von slpA- und PCR-Ribotypen

Tabelle 15: Toxinstatus der mittels slpA-Sequenzierung bestimmten Ribotypen

slpA-Ribotyp	Anzahl (360)	Nicht-toxinogen (75)	tcdA, tcdB (216)	tcdA, tcdB, cdtA und cdtB (69)
001	68	(n=8/68) 11,8%	(n=60/68) 88,2%	(n=0/68) 0%
002	16	(n=1/16) 6,3%	(n=14/16) 87,5%	(n=1/16) 6,3%
005	1	(n=0/1) 0%	(n=1/1) 100%	(n=0/1) 0%
010/014	32	(n=18/32) 56,3%	(n=14/32) 43,8%	(n=0/32) 0%
012/046/092	4	(n=1/4) 25,0%	(n=3/4) 75,0%	(n=0/4) 0%
027	42	(n=0/42) 0%	(n=1/42) 2,4%	(n=41/42) 97,6%
014/066	46	(n=4/46) 8,7%	(n=42/46) 91,3%	(n=0/46) 0%
017	6	(n=1/6) 16,7%	(n=4/6) 66,7%	(n=1/6) 16,7%
031/094	31	(n=3/31) 9,7%	(n=27/31) 87,0%	(n=1/31) 3,2%
078	19	(n=1/19) 5,3%	(n=2/19) 10,5%	(n=16/19) 84,2%
smz	4	(n=0/4) 0%	(n=4/4) 100%	(n=0/4) 0%
andere	91	(n=38/91) 41,8%	(n=44/91) 48,3%	(n=9/91) 9,9%

Die Analyse der Toxingene erfolgte durch eine Multiplex-PCR. Betrachtete man den Toxinstatus der insgesamt 360 mittels slpAST bestimmten Ribotypen, ergab sich ein heterogenes Bild. So fiel für den slpA-Ribotyp 001 in 11,8% (n = 8/68) der Fälle der Toxinnachweis negativ aus. Die übrigen 88,2% (n = 60/68) dieses slpA-Ribotyps

besaßen sowohl das Toxingen *tcdA*, als auch das Toxingen *tcdB*. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die *slpA*-Ribotypen 010/014, 012/046/092 und 014/066 mit einem negativen Toxinnachweis in 56,3% (n = 18/32), 25,0% (n = 1/4) bzw. 8,7% (n = 4/46) der Fälle. Demgegenüber stand der Nachweis der Toxingene *tcdA* und *tcdB* in 43,8% (n = 14/32), 75,0% (n = 3/4) sowie 91,3% (n = 42/46) der Isolate des jeweiligen *slpA*-Ribotyps. Der *slpA*-Ribotyp 002 zeigte alle möglichen Kombinationen der Toxingene. Insgesamt waren 6,3% (n = 1/16) Toxin-negativ, 87,5% (n = 14/16) positiv auf die Toxingene *tcdA* und *tcdB* und 6,3% (n = 1/16) waren darüber hinaus positiv auf das binäre Toxin (*cdtA*, *cdtB*). Die *slpA*-Ribotypen 005 und *smz* wiesen als einzige *slpA*-Ribotypen einen eindeutigen Toxinstatus auf. Für diese Proben konnten in 100% (n = 1/1 bzw. n = 4/4) der Fälle die Toxingene *tcdA* und *tcdB* nachgewiesen werden. Der *slpA*-Ribotyp 027 war, mit Ausnahme einer Probe, bzw. in 97,6% (n = 41/42) der Fälle, immer positiv auf die drei getesteten Toxingene. Für diesen *slpA*-Ribotyp fanden sich folglich keine Toxin-negativen Proben. Der *slpA*-Ribotyp 078 wies dagegen drei verschiedene Kombinationen der Toxingene auf. Den geringsten Anteil bestritten mit 5,3% (n = 1/19) die Toxin-negativen Proben. Der Nachweis der Toxingene *tcdA* und *tcdB* war in 10,5% (n = 2/19) der Fälle erfolgreich und das binäre Toxin (*cdtA*, *cdtB*) wurde in 84,2% (n = 16/19) aller *slpA*-Ribotypen 078 gefunden. Die Gruppe der anderen *slpA*-Ribotypen zeigte sich erwartungsgemäß am heterogensten mit folgender Verteilung der möglichen Kombinationen:

- 41,8% (n = 38/91) kein Toxingen-Nachweis
- 48,3% (n = 44/91) Nachweis von *tcdA* und *tcdB*
- 9,9% (n = 9/91) Nachweis von *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* und *cdtB*

Tabelle 16: Toxinstatus der mittels PCR-Ribotypisierung bestimmten Ribotypen

PCR-Ribotyp	Anzahl (284)	Toxingene
001	51	tcdA, tcdB (100%)
002	10	tcdA, tcdB (100%)
003	4	tcdA, tcdB (100%)
005	5	tcdA, tcdB (100%)
009	7	nicht-toxinogen (100%)
010	20	nicht-toxinogen (100%)
012	6	tcdA, tcdB (100%)
014	42	tcdA, tcdB (100%)
015	7	tcdA, tcdB (100%)
017	4	tcdA, tcdB (100%)
018	3	tcdA, tcdB (100%)
020	7	tcdA, tcdB (100%)
027	39	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB (100%)
029	3	tcdA, tcdB (100%)
032	4	nicht-toxinogen (100%)
043	3	tcdA, tcdB (100%)
045	3	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB (100%)
046	8	tcdA, tcdB (100%)
057	3	tcdA, tcdB (100%)
070	14	tcdA, tcdB (100%)
078	15	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB (100%)
087	3	tcdA, tcdB (100%)
126	3	tcdA, tcdB, cdtA, cdtB (100%)
140	17	nicht-toxinogen (100%)
258	3	tcdA, tcdB (100%)

Wurde der Genotyp der *C. difficile* Stämme durch eine PCR-Ribotypisierung bestimmt, so ergab sich für alle Proben eines bestimmten Genotyps ein identischer Toxinstatus. Tabelle 16 zeigt den Toxinstatus aller Ribotypen, die in der vorliegenden Arbeit mindestens dreimal mit der Ribotypisierungs- und Multiplex-PCR analysiert werden konnten.

5.2.2 Epidemiologie in Abhängigkeit von der Typisierungsmethode

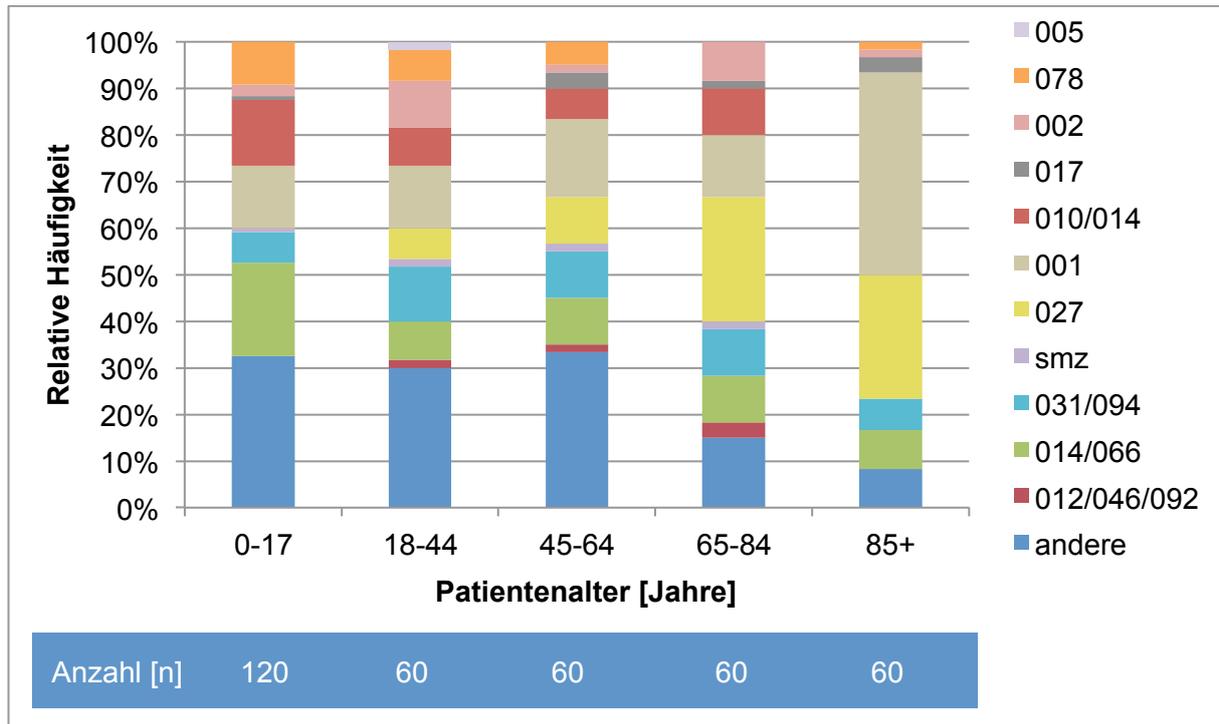


Abbildung 25: Relative Verteilung der durch slpA-Sequenzierung bestimmten Ribotypen in verschiedenen Altersklassen

Abbildung 25 zeigt die Verteilung der durch slpA-Sequenzierung identifizierten Ribotypen in den fünf verschiedenen Altersklassen. Auffallend war die Verteilung des slpA-Ribotyps 027, dessen Bedeutung mit zunehmendem Patientenalter stieg. In den Gruppen der Patienten, die zwischen 65 und 84 Jahren sowie ≥ 85 Jahre alt waren, bestritt er einen Anteil von 26,7% ($n = 16/60$). In den beiden jüngeren Alterskategorien sank der Anteil dieses slpA-Ribotyps auf 10,0% ($n = 6/60$) bzw. 6,7% ($n = 4/60$) ab. In der Gruppe der Kinder und Jugendlichen konnte kein Isolat des hypervirulenten Stammes gewonnen werden. Auch der slpA-Ribotyp 001 war vor allem in der Gruppe der ältesten Patienten zu finden. In dieser Gruppe konnte er bei 43,3% ($n = 26/60$) der Untersuchungen identifiziert werden. Sein Anteil sank mit geringer werdendem Patientenalter kontinuierlich auf 13,3% ($n = 8/60$) in der Gruppe der Patienten mit einem Alter von 0 bis 17 Jahren ab. Die Gruppe der anderen slpA-Ribotypen war in den untersten drei Altersklassen mit 30,0% ($n = 36/120$) bis 33,3% ($n = 20/60$) vertreten und bestritt damit den größten Prozentsatz aller slpA-Ribotypen in diesen Alterskategorien. In der Klasse der 65 bis

84-jährigen nahm ihr Anteil auf 15,0% (n = 9/60) ab und betrug in der höchsten Alterskategorie nur noch 8,3% (n = 5/60). Ein ähnlicher Trend ließ sich für den slpA-Ribotyp 010/014 beschreiben, dessen Anteil von 14,2% (n = 17/120) in der Klasse der Kinder und Jugendlichen auf 10,0% (n = 6/60) in der Kategorie der Patienten mit einem Alter von 65 bis 84 Jahren absank. In der ältesten Alterskategorie trat dieser slpA-Ribotyp nicht auf. Betrachtete man die Verteilung des slpA-Ribotyps 014/010 so fiel auf, dass dieser in der jüngsten Altersklasse mit 20,0% (n = 24/120) aller Fälle wesentlich häufiger zu finden war als in den übrigen Vergleichsgruppen. Der Anteil der übrigen slpA-Ribotypen blieb über die verschiedenen Alterskategorien hinweg etwa konstant.

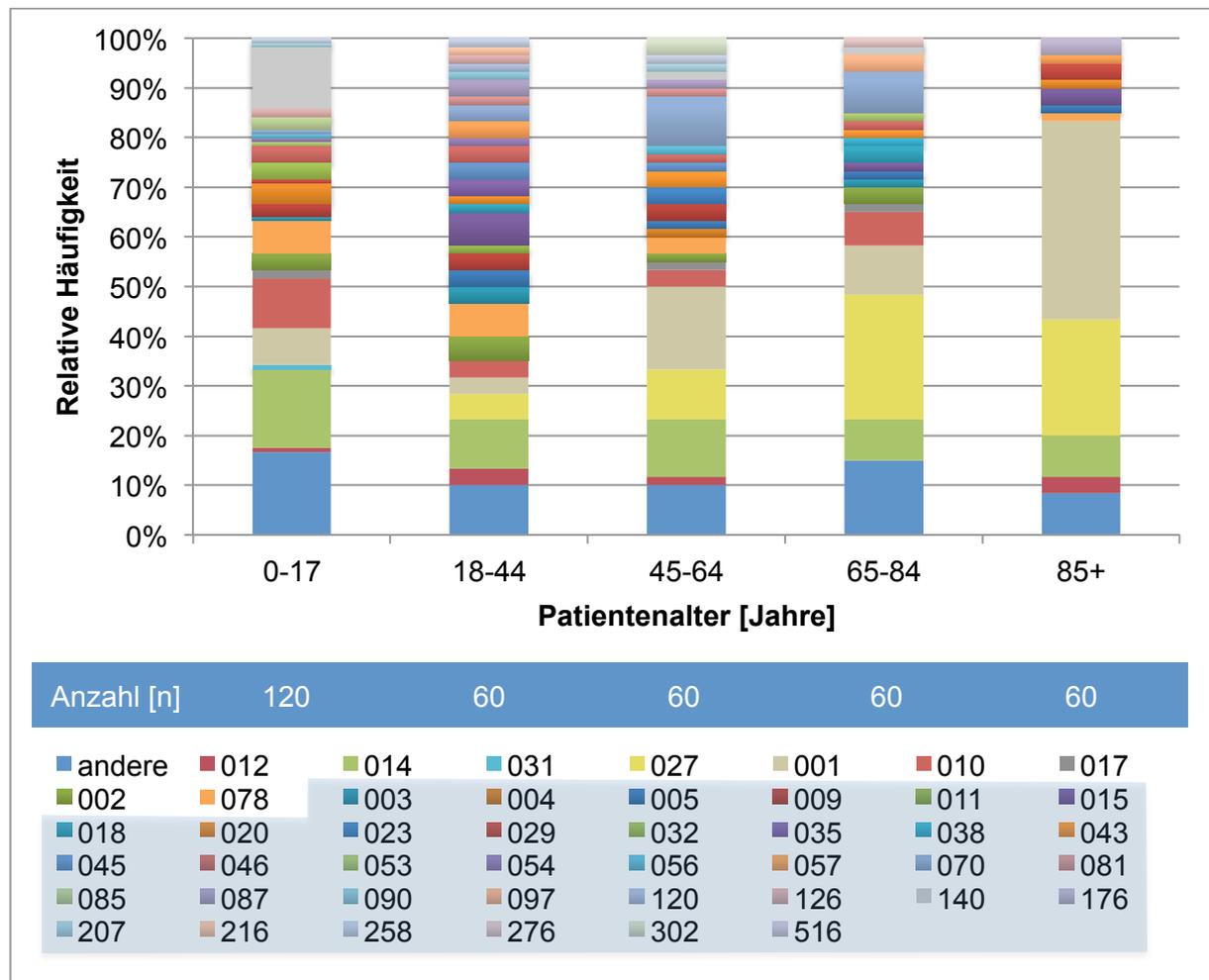


Abbildung 26: Relative Verteilung der PCR-Ribotypen in verschiedenen Altersklassen; PCR-Ribotypen, die im Vergleich zur slpAST neu identifiziert werden konnten, wurden blau markiert

Vergleicht man die in Abbildung 26 dargestellten und mittels PCR-Ribotypisierung ermittelten epidemiologischen Daten mit denen, die durch die slpA-Sequenzierung gewonnen wurden (siehe Abbildung 25), so sind folgende Unterschiede in der Verteilung der Ribotypen besonders erwähnenswert:

- Das Spektrum der ermittelten Ribotypen erweiterte sich drastisch. Konnten mit der slpAST insgesamt 12 verschiedene Gruppen von Ribotypen bestimmt werden, so gelang mittels der PCR-Ribotypisierung die Zuordnung der Isolate zu 46 unterschiedlichen Genotypen. Diese zusätzlichen Ribotypen konnten in der jüngsten Altersklasse in 36,7% (n = 44/120) der Fälle identifiziert werden. In der Gruppe der 18- bis 44-jährigen stellten sie mit 53,3% (n = 32/60) sogar die Mehrheit aller Isolate. In den höheren Altersgruppen sank ihr Anteil stetig ab und betrug in der Gruppe der Patienten, die 85 Jahre und älter waren, nur noch 15,0% (n = 9/60).
- Der Anteil der anderen Ribotypen nahm in den drei jüngsten Altersklassen, im Vergleich der beiden Typisierungsmethoden, stark ab. Wurde mittels slpA-Ribotypisierung noch circa jedes dritte Isolat dieser Gruppe zugeordnet, waren es mittels PCR-Ribotypisierung nur noch circa 10 – 17% aller Proben.
- Der slpA-Ribotyp 031/094, der zuvor über alle Alterskategorien hinweg 31-mal identifiziert wurde, konnte in der PCR-Ribotypisierung nur noch ein einziges Mal detektiert werden und spielte somit nur noch eine untergeordnete Rolle.

Im Vergleich der Ergebnisse der beiden Analysemethoden ergab sich für die Ribotypen 001, 010/014, 014/066 und 027 ein fast unverändertes Bild.

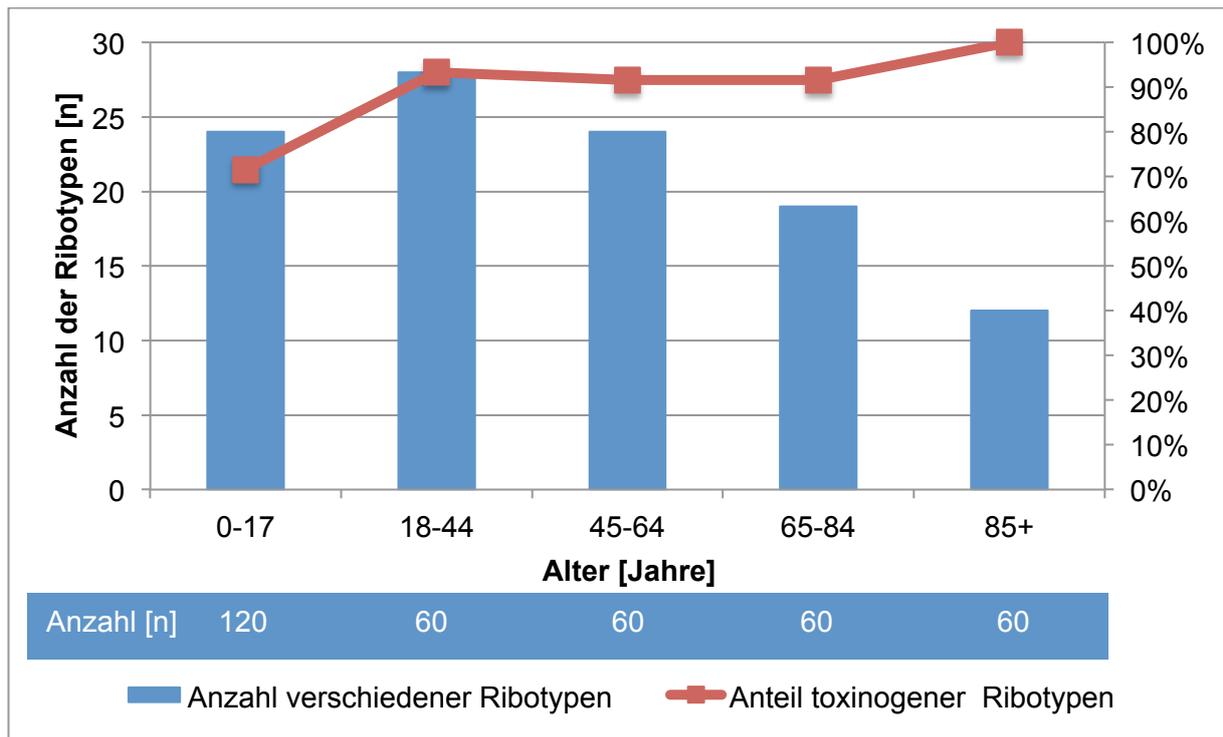


Abbildung 27: Anzahl verschiedener PCR-Ribotypen und Anteil toxinogener Ribotypen in verschiedenen Altersklassen

Die Altersklasse der 18- bis 44-jährigen wies mit 28 verschiedenen PCR-Ribotypen die größte Heterogenität der Genotypen auf. Eine ähnlich große Diversität wiesen die Patienten mit einem Alter von 0 – 17 Jahren und von 45 – 64 Jahren mit jeweils 24 unterschiedlichen PCR-Ribotypen auf. Mit zunehmendem Alter sank die Anzahl der verschiedenen PCR-Ribotypen ab. In der Gruppe der 65- bis 84-jährigen waren es 19 und in der Kategorie der ≥ 85 -jährigen 12 verschiedene PCR-Genotypen. Ein gegensätzlicher Trend zeigte sich für den Anteil der toxinogenen Ribotypen. In der Kategorie der Kinder und Jugendlichen waren 71,7% ($n = 86/120$) der analysierten Isolate toxinogen. Dieser Wert stieg für Patienten mit einem Alter von 18 – 44 Jahren auf 93,3% ($n = 56/60$) und blieb für die Altersklassen der 45- bis 64-jährigen sowie der 65- bis 84-jährigen etwa konstant mit 91,7% ($n = 55/60$) bzw. 93,3% ($n = 56/60$). Die *C. difficile* Isolate der Patienten aus der höchsten analysierten Alterskategorie waren alle ($n = 60/60$; 100%) toxinogen.

5.2.3 Zuordnung der PCR-Ribotypen zu ihren korrelierenden slpA-Ribotypen

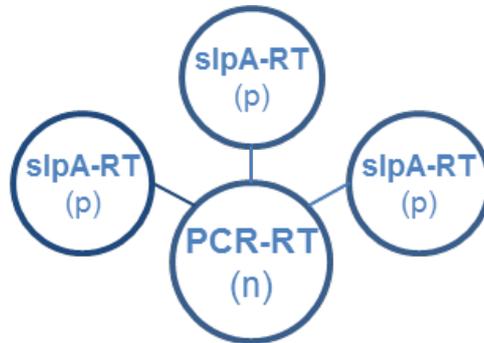


Abbildung 28: Schemazeichnung der Ergebnisdarstellung

In sämtlichen Darstellungen dieses Abschnittes wurde der durch die PCR-Ribotypisierung bestimmte Ribotyp und dessen absolute Häufigkeit (n) im zentralen Kreis der Abbildungen dargestellt. Die peripher davon gelegenen Kreise beinhalteten die Genotypen, welche die slpAST den Isolaten eines einzigen PCR-Ribotypen zuordnete. Dieser PCR-Ribotyp wurde im zentralen Kreis angegeben. Darüber hinaus enthalten die peripheren Kreise zusätzlich den prozentualen Anteil des slpA-Ribotyps an allen Isolaten des im zentralen Kreis genannten PCR-Ribotyps. Der periphere Kreis wurde grün eingefärbt, wenn das Ergebnis der slpAST und der PCR-Ribotypisierung übereinstimmten.



Abbildung 29: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu den PCR-Ribotypen 009 und 020

Alle Isolate (n = 7/7) des PCR-Ribotypen 009 wurden durch die slpA-Sequenzierung der Gruppe der anderen slpA-Ribotypen zugeordnet. Die Proben des PCR-Genotyps 020 erwiesen sich in der Vergleichsmethode zu 100% (n = 7/7) zugehörig zur Gruppe der slpA-Ribotypen 014/066.



Abbildung 30: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu den PCR-Ribotypen 005, 002, 078 und 140

Die 5 Proben des PCR-Ribotyp 005 stellten sich in der slpA-Sequenzierung in 80,0% (n = 4/5) der Fälle als andere slpA-Ribotypen und in 20,0% (n = 1/5) als slpA-Ribotyp 005 heraus. Mit 90,0% (n = 9/10) aller Fälle erwiesen sich die meisten Proben des PCR-Genotyps 002 in der Vergleichsmethode ebenfalls als slpA-Ribotyp 002. Die übrigen 10,0% (n = 1/10) der Proben wurden den anderen slpA-Ribotypen zugeordnet. Auch der PCR-Ribotyp 078 bestätigte sich in 93,3% (n = 14/15) aller untersuchten Proben. Das verbleibende Isolat konnte den anderen slpA-Ribotypen zugeordnet werden. Wenn der Ribotyp 140 mit Hilfe der PCR-Ribotypisierung bestimmt wurde, so ordnete die slpA-Sequenzierung diese Isolate in 94,1% (n = 16/17) der Fälle den anderen slpA-Ribotypen zu. Die übrigen 5,9% (n = 1/17) der Proben ordnete die Vergleichsmethode dem slpA-Ribotyp 001 zu.

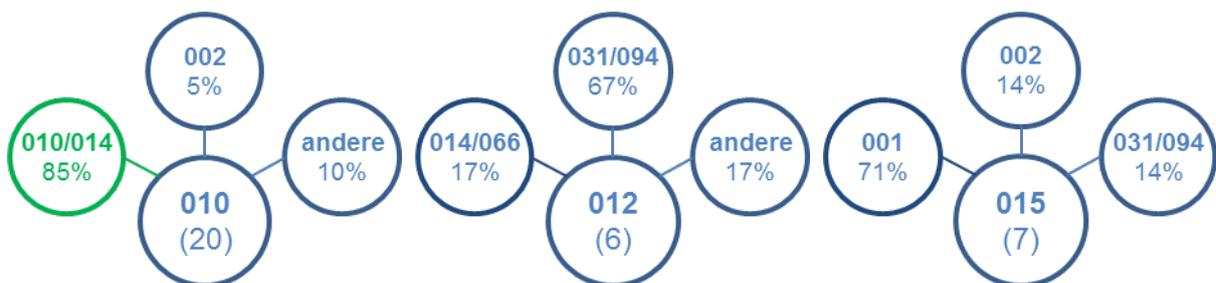


Abbildung 31: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu den PCR-Ribotypen 010, 012 und 015

Der PCR-Ribotyp 010 wurde durch die slpA-Typisierung in 85,0% (n = 17/20) der untersuchten Proben richtig zugeordnet. Nur 10,0% (n = 2/20) bzw. 5,0% (n = 1/20) aller untersuchten Isolate erhielten mit den anderen slpA-Ribotypen bzw. dem slpA-Ribotyp 002 eine abweichende Identifizierung.

Für den PCR-Genotyp 012 erfolgte durch die slpA-Typisierung folgende Zuordnung:

- 16,7% (n = 1/6) slpA-Ribotyp 014/066
- 16,7% (n = 1/6) andere slpA-Ribotypen
- 66,7% (n = 4/6) slpA-Ribotyp 031/094

Damit wurde keines dieser Isolate durch die Vergleichsmethode dem korrespondierenden slpA-Ribotyp des PCR-Ribotyps zugeteilt. Auch der PCR-Ribotyp 015 konnte durch die slpA-Typisierung drei verschiedenen Genotypen zugeordnet. Am häufigsten erfolgte die Zuteilung mit 71,4% (n = 5/7) der Fälle dem slpA-Ribotyp 001 gefolgt von den slpA-Ribotypen 002 (n = 1/7; 14,3%,) und 031/094 (n = 1/7; 14,3%).

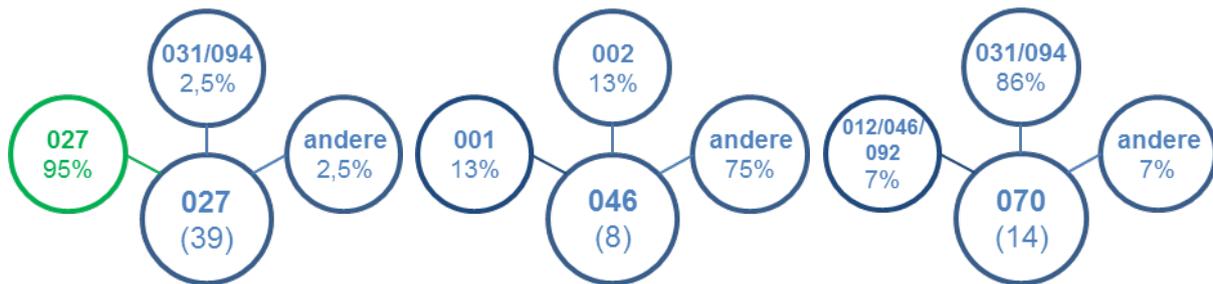


Abbildung 32: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu den PCR-Ribotypen 027, 046 und 070

Der PCR-Ribotyp 027 wurde auch durch die slpA-Typisierung zu 94,7% (n = 36/38) diesem Genotyp zugeordnet. Die übrigen 5,3% identifizierte die Vergleichsmethode zu gleichen Anteilen als andere slpA-Ribotypen (n = 1/38) bzw. als slpA-Ribotyp 031/094 (n = 1/38). Am häufigsten wurde der PCR-Ribotyp 046 den anderen slpA-Ribotypen zugeordnet (n = 6/8; 75,0%). Die restlichen Isolate erhielten die Zuteilung zu den slpA-Ribotypen 001 (n = 1/8; 12,5%) und 002 (n = 1/8; 12,5%). Der PCR-Genotyp 070 erwies sich in 85,7% (n = 12/14) der Fälle als slpA-Ribotyp 031/094. Die übrigen Isolate wurden in 7,1% (n = 1/14) der Fälle als slpA-Ribotyp 012/046/092 identifiziert und weitere 7,1% (n = 1/14) als andere slpA-Ribotypen.

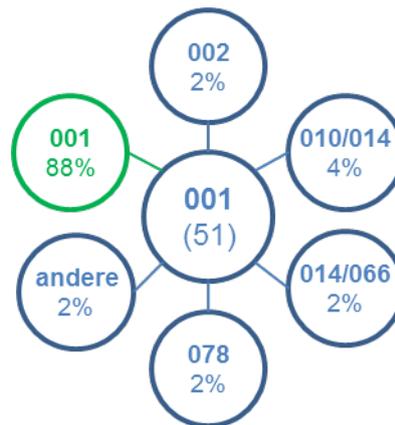


Abbildung 33: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu dem PCR-Ribotypen 001

Zu sechs verschiedenen slpA-Ribotypen konnte der PCR-Ribotyp 001 zugeteilt werden:

- 2,0% (n = 1/51) slpA-Ribotyp 002
- 3,8% (n = 2/51) slpA-Ribotyp 010/014
- 2,0% (n = 1/51) slpA-Ribotyp 014/066
- 2,0% (n = 1/51) slpA-Ribotyp 078
- 2,0% (n = 1/51) andere slpA-Ribotypen
- 88,2% (n = 45/51) slpA-Ribotyp 001

Damit erfolgte in 88,2% (n = 45/51) aller Fälle eine identische Eingruppierung durch beide Methoden.

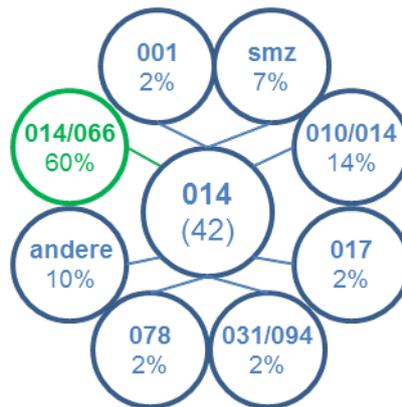


Abbildung 34: Zuordnung der slpA-Ribotypen zu dem PCR-Ribotypen 014

Die meisten verschiedenen slpA-Ribotypen wurden dem PCR-Genotyp 014 zugeordnet:

- 2,4% (n = 1/42) slpA-Ribotyp 001
- 2,4% (n = 1/42) slpA-Ribotyp 017
- 2,4% (n = 1/42) slpA-Ribotyp 031/094
- 2,4% (n = 1/42) slpA-Ribotyp 078
- 7,1% (n = 3/42) slpA-Ribotyp smz
- 9,5% (n = 4/42) anderen slpA-Ribotypen
- 14,3% (n = 6/42) slpA-Ribotyp 010/014
- 59,5% (n = 25/42) slpA-Ribotyp 014/066

Insgesamt identifizierte die slpA-Sequenzierung 59,5% (n = 25/42) der Isolate dieses PCR-Genotyps zutreffend.

6 Diskussion

6.1 Klinisches Bild von Patienten im Kindesalter mit einer CDI

Ziel der klinischen Kohortenstudie war es, die klinische Bedeutung von CDI aus der Perspektive einer universitären Kinderklinik zu untersuchen. Deshalb wurde von Januar 2010 bis Oktober 2013 die Symptomatik pädiatrischer Patienten mit einer nachgewiesenen CDI systematisch untersucht.

Die im Folgenden tabellarisch dargestellten pädiatrischen Vergleichsstudien wurden nach diesen Kriterien ausgewählt:

- Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten >50 (N >50)
- Erfassung der klinischen Symptomatik der Patienten
- keine Fokussierung auf eine Patientenuntergruppe (z.B. onkologische Patienten oder Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen)

Tabelle 17: Übersicht der Vergleichsarbeiten

Studie	Land	Zeitraum	Pat. (n)	Studientyp	Diagnostik	Einschlusskriterien	Komorbidität	Antibiotische Vorthherapie	Therapie der CDI
Kim 2008 [99]	USA	2001 – 2006	4.895	retrospektive Kohortenstudie	Toxintest	Positiver Toxintest Diagnosecode für CDI Antibiotische Therapie der CDI	(n= 3.293/4.895) 67,3%	-	-
Sandora 2011 [14]	USA	Jan – Aug 2008	151	eingebettete Fall-Kontrollstudie	Toxintest	Positiver Toxintest Mindestens drei ungeformte Stühle in 24h Ausschluss anderer GI-Infektionen	-	(n= 114/151) 75,5%	(n= 90/95) 94,7%
Pai 2012 [111]	UK	Jan 2005 – Dez 2009	75	retrospektive Kohortenstudie	Toxintest (EIA) toxigene Kultur	Positiver Toxintest Mindestens drei ungeformte Stühle in 24h	(n= 68/75) 90,7%	(n= 55/75) 73,3%	(n= 35/75) 46,7%
Kim 2012 [17]	USA	Mrz 2008 – Dez 2009	82	eingebettete Fall-Kontrollstudie + prospektive Kohortenstudie	Toxintest (PCR) Bestimmung des Ribotyps 027	Positiver Toxintest Mindestens drei ungeformte Stühle in 24h	-	-	(n= 79/82) 96,3%
Sammons 2013 [112]	USA	Jan 2006 – Aug 2011	5.107	eingebettete retrospektive Kohortenstudie	„validierte“ Nachweismethoden für <i>C. difficile</i>	Nachweis von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben Diagnosecode für CDI	(n= 4.050/5.107) 79,3%	(n= 5.020/5.107) 98,3%	-
Khanna 2013 [104]	USA	1991 – 2009	92	Bevölkerungsbezogene Studie	Toxintest (EIA + PCR)	Positiver Toxintest Mindestens drei ungeformte Stühle in 24h Diagnosecode für CDI keine andere bekannte Ursache der Durchfälle	-	(n= 72/92) 78%	(n= 84/92) 91,3%
Duleba 2014 [64]	PL	Dez 2010 – Feb 2012	64	retrospektive Kohortenstudie	Toxintest (PCR) Bestimmung des Ribotyps 027	Positiver Toxintest Mindestens drei ungeformte Stühle in 24h	(n= 15/64) 23,4%	(n= 61/64) 95,3%	(n= 64/64) 100%
Rhee 2014 [113]	USA	Jan 2010 – Dez 2010	126	Bevölkerungsbezogene Studie	Toxintest (EIA + PCR) PFGE-Ribotypisierung	Nachweis von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben ungeformte/wässrige Stühle	(n= 76/126) 60,3%	(n= 90/126) 71,4%	-
Wendt 2014 [114]	USA	Jan 2010 – Dez 2011	944	Bevölkerungsbezogene Studie	Toxintest PFGE-Ribotypisierung	Nachweis von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben ungeformte/wässrige Stühle	(n= 395/944) 41,8%	(n= 61/84) 72,6%	-
Kumulative Daten	-	2001 – 2012	11.536	-	-	-	(7.897/11.211) 70,4%	(n= 5.473/5.700) 96,0%	(n=352/408) 86,3%
diese Arbeit	D	Jan 2010 – Okt 2012	118	retrospektive + prospektive Kohortenstudie	Toxintest (EIA + PCR) vollständige Ribotypisierung (slpAST) Antibiotika-Resistenztestung	Nachweis von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben ungeformte/wässrige Stühle	(n= 83/101) 82,2%	(n= 76/109) 69,7%	(n= 27/113) 23,9%

Die vorgelegte Arbeit untersucht erstmals in Deutschland das klinische Bild von Kindern und Jugendlichen mit einer CDI. Die meisten Studien, die sich mit diesem Thema befassten, wurden in den USA durchgeführt [14, 17, 99, 104, 112-114]. In Kontinentaleuropa wurde erst eine vergleichbare Studie von Dulęba und Kollegen realisiert, die jedoch im Vergleich zu dieser Arbeit (N = 118) nur eine relativ geringe Anzahl an Patienten (N = 64) analysierte [64]. Darüber hinaus bietet die vorgelegte Arbeit, durch den bis Oktober 2012 reichenden Untersuchungszeitraum, die im Vergleich aktuellsten Daten zur klinischen Bedeutung von CDI bei Kindern.

Betrachtet man den Studientyp der vergleichbaren Arbeiten, so ist auffällig, dass nur zwei Studien eine Vergleichsgruppe aufweisen [14, 17]. Darüber hinaus erfassten, neben der vorgelegten Arbeit, nur zwei weitere Arbeiten die Daten teilweise prospektiv [14, 17]. Die durchgeführte Diagnostik variiert stark zwischen den einzelnen Studien. Alle Arbeiten, mit Ausnahme der Analyse von Sammons und Kollegen, analysierten den Toxinstatus der *C. difficile* Isolate [14, 17, 64, 99, 104, 111-114]. Eine Bestimmung des Ribotyps erfolgte in zwei Studien ausschließlich in Bezug auf den Ribotyp 027 [17, 64] und zwei weitere Studien führten eine PFGE-Ribotypisierung durch [113, 114]. Diese Typisierungsmethode beruht darauf, dass das Gesamtgenom von *C. difficile* durch Restriktionsenzyme in für einen Ribotyp spezifische Fragmente zerteilt wird. Diese erzeugen in einer Gelelektrophorese ein typisches Bandenmuster, anhand dessen der Ribotyp durch Abgleich des Bandenmusters mit einer Datenbank zugeordnet werden kann. Einzig die vorgelegte Arbeit bestimmte den Ribotyp mit Hilfe des slpAST, welche den Ribotyp des *C. difficile* Isolates exakter bestimmen kann, da der Genotyp durch eine Sequenzierung und nicht durch eine vergleichsweise störungsanfällige Gelelektrophorese ermittelt wird. Somit ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen eine detaillierte Bestimmung der Ribotypen der *C. difficile* Isolate mit umfassenden klinischen Daten der Patienten zu verknüpfen. Darüber hinaus stellt die Antibiotika-Resistenztestung ein weiteres Alleinstellungsmerkmal dieser Studie dar.

Die Einschlusskriterien der in der Tabelle 17 aufgeführten Studien unterscheiden sich deutlich. Besonders strenge Einschlusskriterien erhoben z.B. Khanna und Kollegen, indem sie unter anderem verlangten, dass außer der CDI keine andere Ursache für

die Durchfälle der Studienpatienten ermittelt werden konnte [104]. Dies ist sicherlich eine Ursache dafür, dass in dieser Arbeit, trotz des 18 Jahre andauernden Untersuchungszeitraumes, nur 92 Patienten in die Studie aufgenommen wurden. Mit Ausnahme der Arbeiten von Rhee und Kollegen, Wendt und Kollegen sowie der vorgelegten Arbeit, forderten alle übrigen Analysen einen positiven Toxintest als Einschlusskriterium [113, 114]. Eine statistische Analyse der Toxin-positiv getesteten Patienten im Vergleich zu den Toxin-negativen Patienten der vorgelegten Arbeit ergab für keinen der erfassten Parameter, mit Ausnahme der Häufigkeit einer *C. difficile* spezifischen Therapie, einen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen. Daraus lässt sich schließen, dass der Toxinstatus des *C. difficile* Isolates in dem analysierten Patientenkollektiv keine signifikante Auswirkung auf die klinische Symptomatik der Patienten hatte. Bis auf vier Arbeiten sind bei allen Übrigen mindestens drei ungeformte Stühle der Patienten innerhalb von 24 Stunden notwendig gewesen, um in die Studie aufgenommen zu werden. Die vorgelegte Arbeit beschränkte sich auf den Nachweis von ungeformten bzw. wässrigen Stühlen, da insbesondere im retrospektiven Teil der Datenerhebung die Anzahl der Stühle pro Tag nicht zuverlässig nachvollzogen werden konnte. Eine besondere Schwierigkeit bei der Festlegung der Einschlusskriterien einer klinischen Studie liegt darin, die Hürde hoch genug zu wählen, um eine ausreichende Spezifität der Einschlusskriterien zu erreichen, ohne eine zu niedrige Sensitivität zu riskieren. Es ist von entscheidender Bedeutung alle Patienten mit CDI spezifischen Symptomen einzuschließen, ohne zu viele Kinder und Jugendliche in die Studie aufzunehmen, deren Kolonisation mit *C. difficile* keine klinische Symptomatik verursacht.

Die in die vorgelegte Studie eingeschlossenen Kinder und Jugendlichen zeigten kaum spezifische Begleitsymptome (z.B. Blutbeimengungen im Stuhl oder Fieber) einer CDI neben dem Hauptsymptom der dünnflüssigen Stühle, welches alle Studienteilnehmer aufwiesen und insgesamt auch einen milden Verlauf. Auffällig war, dass die Kinder und Jugendlichen mit CDI und zusätzlicher Grunderkrankung oft auch in Bezug auf ihre Größe und Gewicht unterdurchschnittlich waren. Eine über das Absetzen einer vorbestehenden Antibiotikatherapie und einer symptomatischen

Behandlung hinaus reichende gezielte therapeutische Intervention gegen die CDI wurde selten ergriffen. Nur 14,2% aller Patienten erhielten Metronidazol (p.o. oder iv.) und nur 8,0% Vancomycin (p.o.) zur Therapie der CDI. Seit August 2012 (d.h. schon vor Beginn der prospektiven Erfassungsstudie) gibt es für die Kinderklinik eine hausinterne Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der CDI (siehe Anhang 10.4). Diese Leitlinie wurde interdisziplinär im Rahmen des Paed IC Projekts gemeinsam von Pädiatern, pädiatrischen Infektiologen und den Mikrobiologen erarbeitet [115]. In dieser Leitlinie wurde zwar Metronidazol als Mittel der ersten Wahl beschrieben; andererseits wird jedoch für Patienten mit onkologischer Grunderkrankung oder solche mit schwerem Verlauf der CDI primär der Einsatz von Vancomycin (p. o.) empfohlen. Hierzu wurde zudem von Prof. Dr. Lutz von Müller und Prof. Dr. Arne Simon eine interne ärztliche Fortbildung in der Kinderklinik angeboten.

Etwa zwei Drittel (69,7%) aller Kinder und Jugendlichen erhielten in den 4 Wochen vor der Diagnose der CDI eine antibiotische Therapie. In ähnlichen Studien lag dieser Wert zwischen 71,4% und 98,3% [14, 64, 104, 111-114]. Die meisten der in die Studie eingeschlossenen Patienten wiesen Grunderkrankungen auf (82,2%), am häufigsten aus dem Bereich der Kardiologie (25,4%). Die Werte für den Anteil der Patienten mit mindestens einer Grunderkrankung schwankten zwischen den Vergleichsstudien stark zwischen 23,4 – 90,7% [17, 64, 99, 111-114]. Dies ist auch durch die Wahl des Studientyps zu erklären. In bevölkerungsbezogenen Studien sind, aufgrund des im Durchschnitt gesünderen Patientenkollektives, weniger Studienteilnehmer mit Grunderkrankungen zu erwarten, als in einer Studie, die an einem universitären Zentrum der Maximalversorgung durchgeführt wurde.

Virale Kopathogene wurden in 36,9% aller Fälle nachgewiesen und fanden sich signifikant häufiger bei Kleinkindern. Die *in vitro* Resistenztestung der Isolate ergab keinen Hinweis auf Resistenzen gegen Metronidazol oder Vancomycin; vereinzelt allerdings gegenüber Clarithromycin, Moxifloxacin und Rifampicin. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die von Müller et al. 2012 zu den Trends der Antibiotikaresistenzentwicklung von *C. difficile* veröffentlichten [116]. Die molekulare Genotypisierung der Isolate zeigte, dass nicht epidemische slpA-Ribotypen am häufigsten anzutreffen sind, gefolgt von den slpA-Ribotypen

010/014 und 014/06. In völligem Gegensatz dazu dominieren infektionsepidemiologisch bei Erwachsenen die Ribotypen 001 und 027.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *C. difficile* im Bereich der Pädiatrie, trotz steigender Inzidenzen, nur äußerst selten schwere Krankheitsverläufe hervorruft [99, 104]. Diese Erkenntnis bestätigen die Resultate von Nylund und Kollegen, die in ihrer Arbeit 2011 zwar eine Steigerung der Inzidenz, aber im Gegensatz zu der Entwicklung bei Erwachsenen, keine Zunahme der Schwere der Erkrankungen beobachteten [21]. Des Weiteren beschrieben auch Baker und Kollegen bei pädiatrischen Patienten mit einer CDI nur eine geringe Ausprägung der Krankheitssymptome [106].

Die im Median unterdurchschnittlichen Werte für Größe und Gewicht korrelieren mit dem hohen Anteil der Patienten mit mindestens einer chronischen Erkrankung. Es handelt sich hier eben doch um die Patientenpopulation eines universitären pädiatrischen Zentrums der Maximalversorgung. Gerade vor diesem Hintergrund ist der sehr geringe Anteil an schwerwiegenden Erkrankungen (CDI) erstaunlich.

Die Definition von schwerwiegenden Verläufen einer CDI im Bereich der Pädiatrie wird in der Literatur uneinheitlich gehandhabt. So definierten Sandora und Kollegen einen Krankheitsverlauf als schwerwiegend, wenn bei dem Patienten ein toxisches Megakolon, eine gastrointestinale Perforation bzw. eine Sepsis auftrat und / oder der Patient verstarb [14]. Im Vergleich dazu waren in der Arbeit von Dulęba und Kollegen, zusätzlich zu den Kriterien von Sandora und Kollegen, weitere Faktoren kennzeichnend für einen schwerwiegenden Erkrankungsverlauf. Dazu zählten [64]:

- Fieber ($>38,5^{\circ}\text{C}$)
- Leukozyten $>15.000 \times 10^9/\text{l}$
- erhöhte Kreatinin-Werte
- Albumin $<2,5 \text{ mg/dl}$
- Hypotension

- pseudomembranöse Kolitis
- Notwendigkeit der Intensivüberwachung des Patienten
- chirurgische Intervention aufgrund der CDI

Die im Bereich der Erwachsenen verwendeten Kriterien der erhöhten CRP-Werte, der Leukozytose sowie des Fiebers korrelieren jedoch nach Erkenntnissen von Pai und Kollegen als allein verwendete Diagnosekriterien im Bereich der Pädiatrie nicht mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen einer CDI [111]. Sie entwickelten folgendes Scoring-System um schwere pädiatrische Krankheitsverläufe detektieren zu können:

Tabelle 18: Diagnosekriterien einer schwerwiegenden CDI im Kindesalter, nach Pai et al. [111]

Diagnosekriterium	Punkte
Diarrhoe >5/Tag	1
Bauchschmerzen	1
erhöhte Leukozyten-Werte	1
erhöhte CRP-Werte	1
Fieber (>38°C)	1
Pseudomembranöse Kolitis	2
Intensivüberwachung	2
Interpretation:	
1-2 milder Verlauf	
3-4 moderater Verlauf	
≥ 5 schwerwiegender Verlauf	

Wendet man diese Diagnosekriterien auf das Patientenkollektiv der vorgelegten Arbeit an, so werden 28 Krankheitsverläufe als moderat sowie 90 als mild und keine als schwerwiegend eingestuft. Das Kriterium der länger als fünf Tage anhaltenden Durchfälle konnte aus den vorhandenen Patientendaten nicht erhoben werden. Da jedoch nur 6 Patienten eine Punktzahl von 4 erreichten und somit eventuell bei vollständiger Erhebung des Scores als schwerwiegender Verlauf hätten eingestuft werden können, zeigt sich, dass im analysierten Patientenkollektiv schwerwiegende Erkrankungsverläufe eine Rarität darstellten.

Die geringe Anzahl an spezifischen therapeutischen Interventionen (23,9%) könnte auf den Einschluss von Patienten mit Toxin-negativen Isolaten (35,6%) in die Studie und die, wahrscheinlich klinisch oft im Vordergrund stehenden, Grunderkrankungen zurückzuführen sein. Nicht zuletzt ist die Untersuchung sämtlicher Stuhlproben der Pädiatrie im zweiten Abschnitt der Studie, also auch der Proben von Kindern und Jugendlichen, welche außer dünnflüssigen Stühlen keine typischen Symptome für eine CDI hatten, zu berücksichtigen.

In ähnlichen Arbeiten konnte die in dieser Studie am häufigsten durchgeführte symptomatische Therapie nur in 5 – 25% der Fälle dokumentiert werden [14, 17, 64, 104, 111]. Allein in der Arbeit von Pai und Kollegen von 2012 waren die Patienten, die eine *C. difficile* spezifische Therapie erhielten, mit 46,7% ebenfalls in der Minderheit [111]. Ursache dafür könnten die nur schwer vergleichbaren Zusammensetzungen der Patientenkollektive und die abweichenden Einschlusskriterien sein (siehe Tabelle 17). Wenn eine spezifische Therapie der CDI durchgeführt wurde, kam in allen Vergleichsarbeiten sowie auch in der vorgelegten Arbeit Metronidazol am häufigsten zum Einsatz. Zweit häufigste Therapiemethode war eine Gabe von Vancomycin oder eine Kombination von Metronidazol und Vancomycin in den Vergleichsstudien [14, 17, 64, 99, 104, 111]. Letztere konnte in der vorgelegten Arbeit nicht beobachtet werden.

Um ein eindeutigeres Bild der klinischen Symptomatik von pädiatrischen Patienten mit einer CDI zu erhalten, müssten die gesammelten Daten mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Die zum Teil retrospektive und damit nicht immer vollständige Datenerfassung sowie das Fehlen einer Kontrollgruppe sind als Schwachstellen des Studiendesigns zu erwähnen. Daraus ergibt sich, dass ein Teil der analysierten Merkmale nicht von allen in die Studie eingeschlossenen Patienten bekannt ist. Trotzdem verdeutlichen die Ergebnisse, dass bei jeder Durchfallerkrankung im Kindesalter eine CDI stets differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden muss.

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung bestand darin, **Unterschiede zwischen einer ambulant erworbenen CDI und nosokomial erworbenen CDI** bei Kindern und Jugendlichen herauszuarbeiten. Anders als vermutet waren nur wenig mehr als die

Hälfte aller Fälle (52,5%) nosokomialen Ursprungs. Diese Patienten wiesen signifikant häufiger eine chronische Erkrankung sowie einen signifikant stärker erhöhten CRP-Wert auf und eine signifikant längere stationäre Behandlungsdauer nach der CDI Diagnose bis zu ihrer Entlassung. Bei Kindern mit ambulant erworbener CDI wurden tendenziell häufiger (vor allem virale) Kopathogene nachgewiesen. Die Symptome Erbrechen sowie schwere Durchfälle zeigten sich häufiger. Darüber hinaus waren Kinder mit einer ambulant erworbenen CDI signifikant jünger. Zu berücksichtigen ist, dass virale PCR's lange nach Abklingen der klinischen Symptome positiv bleiben können. Damani und Kollegen beschrieben 2011 in ihrer Arbeit eine Reduktion der Anzahl von CDI um 77%, nachdem effektive hygienische Maßnahmen zur Verhinderung eines Norovirus Ausbruches nach einem erfolgten Ausbruch etabliert wurden [117]. El Feghaly und Kollegen untersuchten 2013 erstmals die klinische Bedeutung von viralen Kopathogenen bei pädiatrischen Patienten mit einer CDI. In dieser Studie waren Kinder, die sowohl ein virales Kopathogen als auch eine CDI aufwiesen, jünger als die Vergleichsgruppe und wiesen eine höhere Bakterienlast auf. Die klinische Symptomatik unterschied sich zwischen beiden gegenübergestellten Gruppen nicht [118]. Möglicherweise beeinflussen virale Kopathogene das intestinale Mikrobiom, ähnlich einer antibiotischen Vortherapie, was zu einem erhöhten Risiko für eine CDI führen würde. Andererseits ist es möglich, dass eine CDI die Immunantwort der Kolonschleimhaut in einer Weise beeinflusst, die dazu beiträgt, dass eine Besiedelung mit einem viralen Kopathogen leichter erfolgen kann. Die Frage, ob das Vorhandensein eines viralen Kopathogens einen Risikofaktor für eine CDI darstellt oder umgekehrt muss durch weitere Studien abgeklärt werden.

Eine antibiotische Vortherapie konnte überwiegend in der Gruppe der nosokomial erworbenen CDI beobachtet werden und hier kamen vor der CDI auch häufiger Breitspektrum-Antibiotika wie z.B. Cephalosporine der Gruppe II oder III zum Einsatz. Unterschiede zwischen beiden Infektionsarten eindeutig festzustellen ist, aufgrund der vielen Störfaktoren (Begleiterkrankungen, Koinfektionen), nur sehr bedingt möglich. Die Tatsache, dass Koinfektionen, meist viraler Art, und das Symptom Erbrechen in der Gruppe der ambulant erworbenen CDI überrepräsentiert waren,

könnte mit der früheren Entscheidung für eine Stuhldiagnostik, bei wahrscheinlich akuterer gastrointestinaler Symptomatik, in Zusammenhang stehen. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die vorliegende Studie die Unterscheidung zwischen ambulanten und nosokomialen Infektionen ausschließlich nach Beginn der Symptome vornimmt. Durch diese Einteilung kann der Zeitpunkt der Infektion nicht eindeutig bestimmt werden, da der Symptombeginn keine Rückschlüsse auf den Zeitpunkt bzw. den Ort der Infektion oder einer, der Infektion vorausgegangen, Besiedelung mit *C. difficile* zulässt. Der Anteil bzw. die Bedeutung der ambulant erworbenen CDI nahm in pädiatrischen Studien aus anderen Ländern (v.a. aus den USA) im Laufe der letzten Jahre stark zu. Es wurden Werte von 11 – 75% angegeben [15, 16, 88, 104]. Auch die Tatsache, dass Patienten mit einer ambulant erworbenen CDI, signifikant jünger waren als Kinder und Jugendliche mit einer nosokomialen Infektion ist ein in der Literatur beschriebenes Phänomen [16, 104]. Darüber hinaus sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, dass eine nosokomiale Infektion verantwortlich für einen längeren bzw. eventuell schwereren Krankheitsverlauf sein kann, aufgrund der längeren stationären Verweildauer und der möglicherweise ausgeprägteren systemischen Entzündungsreaktion (Surrogatparameter: CRP-Werte). Zu diesem Ergebnis kamen 2013 auch Sammons und Kollegen [15]. Ganz eindeutig bestätigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass *C. difficile* bei Kindern und Jugendlichen keineswegs ausschließlich als nosokomialer Infektionserreger vorkommt. Auch bei einer ambulant erworbenen Durchfallerkrankung ist eine CDI in Erwägung zu ziehen. Eine nosokomial erworbene CDI betrifft häufiger Patienten mit Grunderkrankungen, was dazu beiträgt, dass eine nosokomiale Infektion einen Risikofaktor für einen komplizierteren Verlauf darstellt.

Kinderonkologische Patienten sind besonders gefährdet an einer CDI zu erkranken. Sie befinden sich häufig in Krankenhäusern und ihr Immunsystem ist durch Chemotherapien in einem geschwächten Zustand. Dies ist der Hauptgrund dafür, dass bei dieser Patientengruppe häufiger Breitspektrum-Antibiotika eingesetzt werden im Vergleich zu Patienten ohne onkologische Grunderkrankung. Auch in der vorgelegten Arbeit wurden Kinder und Jugendliche mit einer onkologischen Grunderkrankung signifikant häufiger antibiotisch vortherapiert als Patienten, die kein

Malignom aufwiesen. Die *C. difficile* spezifische Symptomatik unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht. Eine Mukositis hatten 8 der 27 kideronkologischen Patienten (29,6%). In einer von Simon und Kollegen 2007 veröffentlichten Arbeit war der Anteil dieser Patienten mit 12,5% etwas geringer [119]. Das Vorliegen einer Mukositis erschwert aufgrund der Symptome, die sie hervorrufen kann, die Unterscheidung zwischen einer Kolonisation mit *C. difficile* und einer CDI. Deshalb kann bei diesen Patienten nicht aufgrund der mikrobiologischen Testergebnisse zwischen einer Kolonisation und einer symptomatischen Infektion unterschieden werden. Diese Problematik konnten auch Dominguez und Kollegen in ihrer 2014 veröffentlichten Arbeit beobachten [120]. Eine febrile Granulozytopenie konnte bei 29,6% der in die Studie aufgenommenen Kinder und Jugendlichen der Kinderonkologie festgestellt werden. Folge der Granulozytopenie ist es, dass sich wegen der herabgesetzten Immunantwort kein vollständiges klinisches Bild der Enterokolitis ausprägt. Erst nach Wiederanstieg der Granulozyten entwickelt sich in der Darmwand eine Entzündung mit Wandverdickung und Pseudomembranen [42, 43]. Nur 3,7% der onkologischen Patienten wiesen eine Neutropenie zum Zeitpunkt der Diagnose der CDI auf. Dies steht in vollkommener Übereinstimmung mit der Arbeit von Simon und Kollegen, die beschrieben, dass eine CDI seltener bei neutropenischen Patienten beobachtet werden kann, als bei solchen deren Laborwerte unauffällig sind [119]. Betrachtet man die Analyse der bei den kideronkologischen Patienten auftretenden slpA-Ribotypen während des gesamten Studienzeitraumes, so fällt auf, dass nur im dritten Quartal 2013 ein eindeutiger slpA-Ribotyp zweimal detektiert wurde. Dabei handelte es sich um einen stationär betreuten Patienten sowie einen Patienten, der an die kideronkologische Ambulanz angebunden war. Eine Übertragung des *C. difficile* Stammes zwischen diesen beiden Kindern kann als ausgeschlossen angesehen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass sich trotz der relativ hohen Zahl von CDI bei kideronkologischen Patienten im Untersuchungszeitraum, kein *C. difficile* Ausbruch in dieser Zeit ereignete.

Die Bedeutung von Grunderkrankungen als prädisponierende Faktoren für eine CDI ist bekannt [15, 16, 21]. Jedoch gibt es bisher wenige Erkenntnisse über die Auswirkungen von chronischen Erkrankungen auf den Krankheitsverlauf einer

Infektion mit *C. difficile*. Mit 82,2% aller Studienteilnehmer wies der weitaus größte Teil der Kinder und Jugendlichen eine Komorbidität auf. Patienten mit einer solchen waren, im Vergleich zu Studienteilnehmern ohne chronische Erkrankung, im Durchschnitt bezüglich ihrer Größe und ihres Gewichtes weniger altersentsprechend entwickelt. Kinder und Jugendliche, für welche keine Grunderkrankung dokumentiert werden konnte, wiesen öfter virale Koinfektionen auf und benötigten im Durchschnitt weniger stationäre Behandlungstage nach Diagnosestellung der CDI bis zu ihrer Entlassung. Die hohe Prävalenz von chronischen Erkrankungen im untersuchten Patientenkollektiv deckt sich mit den kumulativen Daten der Vergleichsstudien. In diesen Studien bestand kumulativ bei 70,4% der Patienten mit einer CDI eine chronische Grunderkrankung (siehe Tabelle 17). Die Tatsache, dass Patienten ohne eine chronische Erkrankung häufiger eine virale Koinfektion aufwiesen, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass insgesamt 16,9% der stationären Aufnahmen der Kinder und Jugendlichen wegen einer akuten Gastroenteritis erfolgten. Der längere stationäre Aufenthalt der Patienten mit einer Grunderkrankung nach Diagnose der CDI bis zu ihrer Entlassung, im Vergleich zu Patienten, die diese nicht aufwiesen, ist sicherlich in erster Linie eine Folge der therapeutischen Interventionen, die wegen der Grunderkrankung nötig wurden. Dennoch könnte dies auch als Anzeichen dafür gewertet werden, dass eine Komorbidität einen Risikofaktor für einen schwereren Verlauf der CDI darstellt. Zu dieser Erkenntnis gelangten auch McFarland und Kollegen sowie Valentini et al. in ihren 2007 und 2013 veröffentlichten Studien [16, 121]. Eine chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) wiesen 4 Kinder und Jugendliche des Patientenkollektives auf. Als einzige aller Studienteilnehmer konnte bei 2 dieser Patienten ein blutiger Stuhl beobachtet werden. Retrospektiv lässt sich nicht mehr feststellen, ob dieser durch die CED oder die CDI verursacht wurde. Eine CED gilt als ein Risikofaktor für eine CDI [122]. Darüber hinaus ist eine CDI mit einem schwereren Verlauf der CED assoziiert, indem sie einen Schub der CED imitieren bzw. auslösen kann. Kelsen und Kollegen vermuten sogar, dass die CDI eine Rolle in der Ätiopathogenese der CED spielen könnte [123].

Der überraschend niedrige Anteil der spezifisch wegen der CDI therapierten Patienten und der hohe Anteil der milden bzw. moderaten Krankheitsverläufe, der in die Studie eingeschlossenen Kinder und Jugendlichen, sowie die Tatsache, dass im beobachteten Patientenkollektiv keine schwerwiegenden Komplikationen der CDI auftraten (keine Pseudomembranöse Kolitis, keine Notwendigkeit von Intensivüberwachung, keine Darmperforation, kein toxisches Megakolon) werfen die Frage auf, in welchen Fällen eine spezifische Therapie der CDI notwendig ist. Wann eine CDI als therapiebedürftig angesehen werden sollte, wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Aufgabe dieser Studie war es, Parameter zu detektieren, die **Hinweise auf die Therapiebedürftigkeit** eines Patienten geben können. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Testung der *C. difficile* Isolate lagen in der Regel innerhalb von 24 Stunden vor. War ein Isolat im EIA Toxin-negativ und stellte sich in der anschließend durchgeführten PCR als Toxin-positiv heraus, vergingen maximal 48 Stunden bis alle klinisch relevanten Testergebnisse den behandelnden Ärzten vorlagen. Insgesamt erhielten nur 23,9% der Kinder und Jugendlichen des Patientenkollektives eine spezifische Therapie gegen *C. difficile*. Diese waren tendenziell häufiger an schweren Durchfällen erkrankt und wiesen signifikant häufiger eine Grunderkrankung auf als Patienten, die nur eine symptomatische Therapie erhielten. Des Weiteren gelang der Toxinnachweis in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit einer spezifischen Therapie signifikant häufiger. Patienten mit einer zielgerichteten Therapie gegen *C. difficile* hatten eine signifikant längere stationäre Verweildauer als Studienteilnehmer, bei denen diese als nicht notwendig erachtet wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Entscheidung über die Notwendigkeit einer *C. difficile* spezifischen Therapie, in erster Linie an Hand der klinischen Symptomatik (schwere Durchfälle) unter Berücksichtigung der Grunderkrankungen der Kinder und Jugendlichen, gepaart mit dem positiven Toxinnachweis gefällt wurde. Kinder und Jugendliche, deren *C. difficile* Isolate den anderen slpA-Ribotypen zugeordnet werden konnten, benötigten signifikant seltener eine gegen *C. difficile* gerichtete Therapie. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass diese nicht epidemischen slpA-Ribotypen meist zu milde verlaufenden CDI führen. Da Patienten mit bzw. ohne spezifische therapeutische Intervention bezüglich des einzigen erfassten Outcome-Faktors der stationären Verweildauer, nach der Diagnose der CDI signifikante

Unterschiede aufwies, ist davon auszugehen, dass durch die erwähnten Kriterien Patienten mit einem erhöhten Risiko eines schweren bzw. protrahierten Erkrankungsverlaufes detektiert werden können und somit in diesen Fällen eine spezifische Therapie der CDI sinnvoll erscheint. Da eine spezifische Therapie der häufig durch eine antibiotische Vortherapie mitverursachten CDI nach den aktuellen Leitlinien immer mit Antibiotika erfolgt, hat eine spezifische Therapie der CDI stets auch ein erhöhtes Rezidivrisiko der CDI zur Folge. In einer Studie analysierten Johnson und Kollegen die Effektivität der Behandlung einer CDI mit dem Toxinbindenden Wirkstoff Tolevamer, im Vergleich zu den etablierten Therapieoptionen Metronidazol und Vancomycin. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Tolevamer im Vergleich zu Metronidazol und Vancomycin als ineffektiv in der Therapie einer CDI anzusehen ist. Jedoch führte die nicht antibiotische Therapie mit Tolevamer zu einer signifikanten Protektion der Patienten vor einem Rezidiv der CDI [124]. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass Kinder und Jugendliche, deren CDI ausschließlich symptomatisch therapiert wird, im Vergleich zu Patienten, die eine spezifische Therapie ihrer CDI erhalten, ein geringeres Risiko eines CDI-Rezidives aufweisen. In Anbetracht dieser Ergebnisse erscheint es sinnvoll pädiatrische Patienten mit einer erstmaligen CDI wie in Tabelle 19 dargestellt ist zu differenzieren und zu therapieren.

Tabelle 19: Vorschlag zur Indikationsstellung einer spezifischen Therapie der CDI

Therapie der CDI	Punktzahl nach Pai et al. [111]		Risikofaktor(en) des Patienten
symptomatisch	1-2	und/oder	-
Metronidazol (p.o. oder i.v.)	2-4		chronische komplexe Krankheitsbilder
Vancomycin (p.o)	≥ 5		onkologische Grunderkrankung Immundefizienz-Syndrom

Eine weitere Konstellation, in der eine Therapie einer CDI sinnvoll erscheinen kann, ist der positive Toxinnachweis in einer Stuhlprobe eines Kindes, von dem aufgrund seines anhaltenden stationären Aufenthaltes eine Gefahr für Kreuzinfektionen von anderen Patienten ausgeht, wenn dem Patienten eine dauerhafte strikte Einzelzimmerisolierung während seines Aufenthaltes im Krankenhaus bis zum Rückgang der Symptome der CDI nicht zuzumuten ist.

Um die Frage der Indikationsstellung einer zielgerichteten Therapie gegen *C. difficile* umfassend beantworten zu können, sind weitere Studien nötig.

Bisher haben nur wenige Studien **Unterschiede zwischen verschiedenen pädiatrischen Altersklassen in der Patientencharakteristik einer CDI** untersucht. Ziel dieses Bereiches der Studie war es, die Patientencharakteristik der Kinder und Jugendlichen in den Altersklassen von 12 Monaten bis <2 Jahren, 2 Jahren bis <8 Jahren und 8 bis <18 Jahren zu untersuchen. Mit zunehmendem Alter der Kinder und Jugendlichen stieg die Anzahl sowohl der Grunderkrankungen als auch das Auftreten des Symptoms Bauchschmerzen. Dies konnte, mit Ausnahme der kardialen Grunderkrankungen, für alle analysierten chronischen Erkrankungen beobachtet werden. Darüber hinaus benötigten die älteren Patienten mehr stationäre Behandlungstage nach Diagnose der CDI bis zu ihrer Entlassung. Mit abnehmendem Alter der Studienteilnehmer traten Kopathogene, besonders virale Durchfallerreger, häufiger auf. Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass virale Kopathogene vor allem bei jungen pädiatrischen Patienten als Risikofaktor für eine CDI zu sehen sein könnten. Das vermehrte Auftreten des Symptoms Bauchschmerzen mit steigendem Alter der Patienten, ist wahrscheinlich auf die mit dem Alter zunehmende Fähigkeit der Patienten der Angabe einer exakten Lokalisation ihrer Beschwerden zurückzuführen. Der Umstand der längeren Hospitalisierungsdauer der älteren Kinder und Jugendlichen, im Vergleich zu jüngeren Patienten, ist am ehesten dem häufigeren Vorkommen von Grunderkrankungen in dieser Gruppe von Patienten geschuldet. Die Ergebnisse dieser Studie können als Hinweis darauf dienen, dass virale Kopathogene mit geringerem und Grunderkrankungen mit steigendem Alter der pädiatrischen Patienten als Risikofaktor für eine CDI an Bedeutung gewinnen. Diese Erkenntnis sollte durch weitere kontrollierte Studien überprüft werden.

6.2 Lokale Epidemiologie von *Clostridium difficile*

Angesichts der steigenden Bedeutung von *C. difficile* sowie der Ausbreitung des hypervirulenten Stammes 027, fiel die Entscheidung die Epidemiologie von *C. difficile* am Universitätsklinikum des Saarlandes zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Unterschiede im Vergleich von pädiatrischen mit erwachsenen Patienten gelegt.

Die Anzahl der Anforderungen einer Stuhluntersuchung auf *C. difficile* der Kinderklinik verzehnfachte sich von 2000 bis 2013, wobei ein deutlicher Anstieg erst ab Ende 2008 zu verzeichnen war. Im Vergleich dazu sind die Aufträge aus den Kliniken für Innere Medizin um etwa 300% gestiegen. Die chirurgischen Kliniken stellten circa neunmal mehr Anfragen 2013 im Vergleich mit 2000. Der Anteil der Toxin-positiven Proben an allen eingesendeten Proben der Klinik war für die Kinderklinik im Untersuchungszeitraum tendenziell am niedrigsten (0 – 11,6%). Jedoch erreichte er im Jahr 2013 etwa das Niveau der Kliniken für Innere Medizin. Insgesamt zeigte die Nachweisrate toxinogener *C. difficile* Stämme für alle analysierten Kliniken während des Untersuchungszeitraumes erhebliche Schwankungen (0 – 19,9%) ohne eindeutig erkennbare Tendenz. Das Jahr 2007 wies insgesamt betrachtet die höchsten Nachweisraten im Analysezeitraum auf (10,4 – 19,9%). Diese starken Schwankungen legen nahe, dass die Einsendung der Proben nicht aufgrund einer spezifischen Anamnese oder eines bestimmten Risikoprofils, sondern routinemäßig bei nosokomialer Diarrhoe erfolgt sind, was zu einer niedrigen Spezifität der Indikationsstellung führt. Die CDI ist als eine von mehreren Differentialdiagnosen eines mit Durchfällen einhergehenden (vorwiegend nosokomialen) Krankheitsbildes zu betrachten. Im Jahr 2007 stieg das Bewusstsein für *C. difficile* als Durchfallerreger durch einen Ausbruch in der Region Trier, der durch den hypervirulenten Ribotyp 027 verursacht wurde [125]. Dies erklärt möglicherweise die in diesem Jahr besonders stark gestiegene Zahl von Anforderungen einer Stuhluntersuchung auf *C. difficile*. Bei stark verbesserten diagnostischen Nachweisverfahren und erhöhten hygienischen Standards in den folgenden Jahren, nahm die Nachweisrate von Toxin-positiven Isolaten ab. Angesichts von geringen Nachweisraten toxinogener *C. difficile* Stämme, die

beispielsweise für das Jahr 2013 mit Werten zwischen 5,5% und 9,7% teilweise nur gering oberhalb der Kolonisationsrate von circa 5% lagen, sollte eventuell ein Algorithmus entwickelt werden, der eine höhere Spezifität der Indikation zu einer *C. difficile* spezifischen Diagnostik gewährleistet [4].

Eine eindeutige jahreszeitliche Häufung der *C. difficile* Nachweise, speziell in den Wintermonaten, in denen potentiell aufgrund von Erkältungskrankheiten mehr Antibiotika eingenommen werden, konnte nicht beobachtet werden.

Die stark angestiegene Zahl der Testung auf *C. difficile* über alle Einsender hinweg, besonders aber für die pädiatrischen und chirurgischen Kliniken, beweisen die Zunahme der Inzidenz und damit auch der Bedeutung von *C. difficile* als Infektionserreger am Universitätsklinikum des Saarlandes. Durch die vorgelegten Daten wird klar, dass in sämtlichen Fachdisziplinen *C. difficile* als Durchfallerreger im Verlauf der letzten 13 Jahre extrem an Bedeutung gewonnen hat. Dies ist besonders für den Bereich der pädiatrischen Patienten eine wichtige Erkenntnis. In manchen Kinderkliniken wird bisher keine auf den Nachweis von *C. difficile* ausgerichtete Diagnostik durchgeführt. Grundsätzlich wird der CDI eine zu geringe Bedeutung im Bereich der Pädiatrie zugestanden. Die vorgelegten Daten belegen ein über den Untersuchungszeitraum gewachsenes Bewusstsein (Awareness) für die Bedeutung von CDI im Kindesalter am UKS.

Vergleicht man den prozentualen Anteil positiver Untersuchungen von Stuhlproben auf *C. difficile* und dessen Toxine in den Jahren 2011 – 2013 in **verschiedenen Altersklassen**, so lässt sich festhalten, dass beide Parameter eine altersspezifische Verteilung aufwiesen. Für Patienten mit einem Alter von 0 – 17 Jahren war jede fünfte Untersuchung auf *C. difficile* und etwa jeder 16. Toxintest (EIA bzw. PCR) positiv. Diese Werte waren für Patienten mit einem Alter von 18 bis zu 44 Jahren geringer, stiegen aber mit zunehmendem Patientenalter wieder kontinuierlich an. Diese Daten beweisen indirekt, dass es für eine CDI neben dem bekannten Risikofaktor des hohen Alters auch eine, wenn auch geringer ausgeprägte, Prädisposition im Kindesalter gibt. Auch die Verteilung der *slpA*-Ribotypen wies deutliche Unterschiede zwischen den verglichenen Altersklassen auf. Besonders

hervorzuheben ist, dass der hypervirulente slpA-Ribotyp 027 in der Gruppe, der bis 17 Jahre alten Patienten, nicht aufgetreten ist. Mit steigendem Patientenalter konnte dieser jedoch zunehmend häufiger beobachtet werden. Gleiches gilt für den slpA-Genotyp 001. Eine umgekehrte Tendenz ist für die slpA-Ribotypen 014/066, 010/014 sowie die anderen slpA-Genotypen zu erwähnen. Diese Analyse veranschaulicht erstmals, dass sich die Epidemiologie der Genotypen von *C. difficile* bei Kindern und Jugendlichen im Vergleich zu Patienten eines höheren Alters grundsätzlich unterscheidet. In ihrer 2011 veröffentlichten Arbeit konnten Stoesser und Kollegen ebenfalls kein Isolat des Ribotyps 027 in der Gruppe der pädiatrischen Patienten nachweisen [126]. Goorhuis und Kollegen kamen in ihrer 2007 veröffentlichten Arbeit zu dem Ergebnis, dass Patienten, welche eine CDI aufwiesen, die durch den Ribotyp 027 verursacht war, signifikant älter waren, als solche deren Infektionen durch sonstige Ribotypen hervorgerufen wurden [127]. Diese Tatsache kann erklären, dass ein hohes Patientenalter mit tendenziell schwereren Verläufen und einer höheren Mortalität einer CDI assoziiert ist, wohingegen schwere Verläufe in der Pädiatrie eine Rarität darstellen. Zu gegensätzlichen Ergebnissen bezüglich des Ribotyps 027 gelangten Kim und Kollegen sowie Toltzis et al. in ihren Arbeiten, in denen in 11 – 19% aller pädiatrischen Fälle der Ribotyp 027 nachgewiesen wurde [17, 128]. Beide Studien wurden in Nordamerika durchgeführt (Philadelphia und Ohio). Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte unter anderem dadurch zu erklären sein, dass diese Region bereits länger unter der Ausbreitung des dort zuerst beschriebenen hypervirulenten Ribotyps 027 leidet. Eine weitere Ursache könnte in der unterschiedlichen Häufigkeit des Einsatzes von Fluorchinolonen liegen, welche von Sandora und Kollegen in einer multivarianten Analyse als Risikofaktor für eine CDI im Kindesalter ermittelt werden konnten [14]. Während in internationalen Leitlinien ein Trend zum häufigeren Einsatz von Fluorchinolonen im Bereich der Pädiatrie zu beobachten ist, kommt diese Antibiotikaklasse in Deutschland nur bei sehr spezifischen Indikationen (z.B. cystischer Fibrose, Kinder nach Transplantation eines soliden Organs) zur Anwendung [129].

Welche Faktoren dazu führen, dass bestimmte Ribotypen bevorzugt bei jungen bzw. alten Patienten anzutreffen sind, muss durch weitere Studien erforscht werden.

Auffällig ist jedoch der fließende Übergang der dominanten Ribotypen zwischen den verschiedenen Altersklassen. Die vorgelegte retrospektive Datenanalyse veranschaulicht zum ersten Mal, dass die Charakteristik der *C. difficile* Stämme sich bei erwachsenen Patienten im Vergleich zu Kindern und Jugendlichen stark unterscheidet. Dies ist sicherlich eine der Ursachen für die voneinander abweichenden Krankheitsverläufe beider Patientengruppen.

6.3 Methodenvergleich: slpAST und PCR-Ribotypisierung

In diesem Abschnitt der vorgelegten Arbeit wurden die molekularen Analysemethoden der slpA-Sequenzierung und der PCR-Ribotypisierung hinsichtlich ihrer Bestimmung des Genotyps von *C. difficile* Isolaten miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden 360 Isolate aus fünf verschiedenen Altersklassen (0 – 17, 18 – 44, 45 – 64, 65 – 84 und ≥ 85 Jahre) mit beiden Methoden typisiert. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung des Toxinstatus durch eine Multiplex-PCR. Darüber hinaus wurde die Epidemiologie der Isolate der Patienten in den fünf verschiedenen Altersklassen analysiert. In der Literatur ist keine vergleichbare Arbeit beschrieben, die zwei der bedeutendsten Typisierungsmethoden von *C. difficile* Isolaten, anhand einer vergleichbaren Zahl von Isolaten von Patienten aus allen Altersklassen, systematisch miteinander vergleicht. Während die slpA-Typisierung insgesamt 12 verschiedene Genotypen identifizierte, waren es in der PCR-Ribotypisierung 46. Dies ist ein deutlicher Beleg für die bedeutend bessere Identifizierung von verschiedenen Stämmen durch die PCR-Ribotypisierung. Die durch slpA-Sequenzierung bestimmten Ribotypen wiesen äußerst unterschiedliche Toxinstatus auf. Im Gegensatz dazu konnte allen Isolaten eines PCR-Genotyps ein identischer Toxinstatus zugeordnet werden. Diese Tatsache wird zum ersten Mal in der vorliegenden Arbeit beschrieben und ist beweisend dafür, dass jedem Genotyp ein für ihn typischer Toxinstatus zugewiesen werden kann. Diese Erkenntnis konnte erst durch die wesentlich genauere Trennung zwischen verschiedenen Ribotypen durch die PCR-Ribotypisierung im Vergleich zur slpA-Sequenzierung gewonnen werden. Vergleicht man die durch beide Methoden gewonnenen epidemiologischen Daten miteinander, so fällt auf, dass durch den Einsatz der PCR-Ribotypisierung im Vergleich zur slpA-Sequenzierung der Anteil der anderen Ribotypen stark zurückgegangen ist und sich ein exakteres Bild der Ribotypen der verschiedenen Altersklassen freilegt. Darüber hinaus veränderten sich die Zahlen für die einzelnen Ribotypen nur in geringem Umfang, mit Ausnahme des Genotyps 031/094, welcher durch die slpA-Sequenzierung häufiger als durch die PCR-Ribotypisierung nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die PCR-Ribotypisierung im Vergleich zur slpA-Sequenzierung wesentlich besser zur Erhebung von epidemiologischen Daten geeignet ist, da sie ein detaillierteres Bild

der Verhältnisse wiedergeben kann. Nutzt man die mit der PCR-Ribotypisierung gewonnenen Daten dazu die Häufigkeit verschiedener Ribotypen in den analysierten Altersklassen dazustellen, so fällt auf, dass die Patienten mit einem Alter von 18 – 44 Jahren die größte Diversität aufwiesen, gefolgt von der Gruppe der Kinder und Jugendlichen sowie der Kategorie der 45- bis 64-jährigen. Mit steigendem Alter sank die Anzahl der beobachteten Ribotypen pro Altersklasse stark ab. Einen gegensätzlichen Trend zeigte der Anteil der toxinogenen Isolate auf. Dieser war in der Gruppe der jüngsten Altersklasse am geringsten, befand sich für Patienten mit einem Alter von 18 – 84 Jahren auf einem konstant hohen Niveau und stieg für Patienten, die 85 Jahre oder älter waren, auf 100% an. Dies spricht dafür, dass Kinder und Jugendliche andere Infektionsquellen aufweisen als erwachsene Patienten, da die Rate der toxinogenen Stämme in dieser Patientengruppe wesentlich geringer als in allen anderen Altersklassen war. Daraus ergibt sich das Vorliegen vieler verschiedener Infektionsquellen, welche vorwiegend im ambulanten Bereich zu suchen sind, so z.B. das häusliche Umfeld [130]. Dies führt dazu, dass in dieser Alterskategorie viele verschiedene Ribotypen auftreten. Dennoch waren in den Altersklassen der 18- bis 44-jährigen mehr bzw. bei Patienten mit einem Alter von 45 – 64 Jahren ähnlich viele verschiedene Ribotypen bei höherem Anteil toxinogener Stämme zu beobachten. Dies verdeutlicht, dass in diesen Altersklassen zwar eine hohe Heterogenität der vorkommenden Genotypen vorherrscht, diese sich jedoch fast ausschließlich auf toxinogene *C. difficile* Isolate beschränkt. Die weiter abnehmende Vielfalt der Genotypen in den beiden ältesten analysierten Alterskategorien (65 – 84, ≥85 Jahre) ist ein Indiz dafür, dass die Infektionsquellen sich im Vergleich zu den pädiatrischen Patienten auf wenige Orte beschränken, welche eine Selektion von wenigen toxinogenen Ribotypen begünstigen. Dies gilt besonders für Pflegeheime und Krankenhäuser. Diese Erkenntnisse widersprechen der These, dass asymptomatische Kleinkinder und Säuglinge als infektionsepidemiologisch bedeutsames Reservoir für CDI bei Erwachsenen dienen, da die dominierenden Ribotypen in den Altersklassen der Erwachsenen bei Kindern und Jugendlichen nur selten anzutreffen sind [100]. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Kinder in Kindertagesstätten, Schulen und weiteren Gemeinschaftseinrichtungen mit *C. difficile* kolonisiert werden, indem sie die

Bakterienstämme untereinander verbreiten. Ein weiteres Indiz, welches gegen die These der asymptomatischen Kleinkinder und Säuglinge als Erregerreservoir spricht, ist der geringe Anteil der toxinogenen Ribotypen (71,7%) in dieser Alterskategorie im Vergleich zu den deutlich höheren Werten der Erwachsenen (91,7 – 100%).

In der Einzelanalyse der Isolate fällt auf, dass die *slpA*-Typisierung einem bestimmten PCR-Ribotyp meist mehrere verschiedene Genotypen zuweist. Eine Übereinstimmung des Typisierungsergebnisses beider Methoden in >80% aller Fälle ergab sich für die PCR-Ribotypen 001, 002, 010/014, 027 und 078. Für alle übrigen PCR-Ribotypen lag der Anteil der übereinstimmenden Testergebnisse darunter. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass sowohl die *slpA*-Sequenzierung, als auch die PCR-Ribotypisierung, die hypervirulenten Stämme 027 (94,7% Übereinstimmung) und 078 (93,3% Übereinstimmung) mit einer relativ hohen Zuverlässigkeit identifiziert. Killgore und Kollegen verglichen in ihrer 2008 erschienen Arbeit sieben verschiedene Typisierungsmethoden für *C. difficile* anhand von 42 verschiedenen Isolaten, welche durch verschiedene Analysemethoden, unter anderen auch der *slpA*-Sequenzierung und der PCR-Ribotypisierung analysiert wurden, miteinander. Sie gelangten zu dem Ergebnis, dass die *slpA*-Sequenzierung die überlegenere Methode bezüglich der Zuordnung verschiedener Isolate zu einzelnen Ausbrüchen sei [131]. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass die *slpA*-Sequenzierung im Gegensatz zur PCR-Ribotypisierung in dieser Studie dazu in der Lage war verschiedene Subtypen der Ribotypen 001, 014 und 027 zu bestimmen. Im Übrigen kamen beide Methoden in dieser Studie immer zu identischen Ergebnissen bezüglich des Ribotyps. Die Ursache für dieses Ergebnis ist darin zu sehen, dass die relativ geringe Anzahl an untersuchten Isolaten ($n = 42$) mit Ausnahme von 7 Isolaten aus den Ribotypen 001, 002, 010/014, 027 und 078 bestand. Darüber hinaus wurden in dieser Studie lediglich 11 verschiedene Ribotypen analysiert. Der vorliegende Methodenvergleich umfasst dagegen, wie bereits erwähnt, 360 Isolate und 42 verschiedene PCR-Genotypen. Insgesamt betrachtet legen die ermittelten Ergebnisse dieses Methodenvergleiches nahe, dass die *slpA*-Sequenzierung zwar für die Erfassung epidemiologischer Daten bezüglich der hypervirulenten Stämme 027 und 078 geeignet ist, aber darüber hinaus in

Einzelfällen keine exakte Bestimmung des Ribotyps ermöglicht. Im Vergleich dazu bietet die deutlich überlegene PCR-Ribotypisierung eine zuverlässigere und differenziertere Bestimmung des Ribotyps. Des Weiteren weist ein durch die PCR-Ribotypisierung ermittelter Ribotyp in 100% der Fälle einen identischen Toxinstatus auf, welcher entscheidenden Einfluss auf den klinischen Verlauf der CDI hat [64].

7 Literaturverzeichnis

1. Hall IC, O.T.E., *Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerob, Bacillus difficile*. Arch Pediatr Adolesc Med 1935: p. 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. Matsuki, S., et al., *Colonization by Clostridium difficile of neonates in a hospital, and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan*. Int Microbiol, 2005. **8**(1): p. 43-8.
4. Larson, H.E., et al., *Epidemiology of Clostridium difficile in infants*. J Infect Dis, 1982. **146**(6): p. 727-33.
5. Voth, D.E. and J.D. Ballard, *Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 247-63.
6. Kelly, C.P., C. Pothoulakis, and J.T. LaMont, *Clostridium difficile colitis*. N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 257-62.
7. Rupnik, M., et al., *Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 2): p. 113-7.
8. 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.
9. Rousseau, C., et al., *Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(3): p. 858-65.
10. Reichardt, C., et al., *[Dramatic increase of Clostridium difficile-associated diarrhea in Germany: has the new strain PCR-ribotype 027 already reached us?]*. Dtsch Med Wochenschr, 2007. **132**(5): p. 223-8.
11. Elliott, B., et al., *Clostridium difficile-associated diarrhoea*. Intern Med J, 2007. **37**(8): p. 561-8.
12. Högenauer, C., *Clostridium-difficile-Infektion – Prävention, Diagnose, Therapie/Christoph Högenauer.- 1. Auflage - Bremen: UNI-MED. 2013.*
13. Bartlett, J.G., *Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease*. Ann Intern Med, 2006. **145**(10): p. 758-64.
14. Sandora, T.J., et al., *Epidemiology and risk factors for Clostridium difficile infection in children*. Pediatr Infect Dis J, 2011. **30**(7): p. 580-4.
15. Sammons, J.S., P. Toltzis, and T.E. Zaoutis, *Clostridium difficile Infection in children*. JAMA Pediatr, 2013. **167**(6): p. 567-73.
16. McFarland, L.V., et al., *Fluoroquinolone use and risk factors for Clostridium difficile-associated disease within a Veterans Administration health care system*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(9): p. 1141-51.
17. Kim, J., et al., *Risk factors and outcomes associated with severe clostridium difficile infection in children*. Pediatr Infect Dis J, 2012. **31**(2): p. 134-8.
18. 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.

19. Weiss, B., et al., *Risk factors related to a hospital-associated cluster of Clostridium difficile PCR ribotype 027 infections in Germany During 2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(3): p. 282-4.
20. Oguz, F., et al., *The role of Clostridium difficile in childhood nosocomial diarrhea*. Scand J Infect Dis, 2001. **33**(10): p. 731-3.
21. Nylund, C.M., et al., *Clostridium difficile infection in hospitalized children in the United States*. Arch Pediatr Adolesc Med, 2011. **165**(5): p. 451-7.
22. 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.
23. Johnson, S., *Recurrent Clostridium difficile infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes*. J Infect, 2009. **58**(6): p. 403-10.
24. Bartlett, J.G., *Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea*. N Engl J Med, 2002. **346**(5): p. 334-9.
25. Gorschluter, M., et al., *Clostridium difficile infection in patients with neutropenia*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(6): p. 786-91.
26. Vehreschild, M.J., et al., *Clostridium difficile infection in patients with acute myelogenous leukemia and in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and risk factor analysis*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(6): p. 823-8.
27. Lowe, D.O., et al., *Proton pump inhibitors and hospitalization for Clostridium difficile-associated disease: a population-based study*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(10): p. 1272-6.
28. Shah, S., et al., *Gastric acid suppression does not promote clostridial diarrhoea in the elderly*. QJM, 2000. **93**(3): p. 175-81.
29. Aldeyab, M.A., et al., *Quasiexperimental study of the effects of antibiotic use, gastric acid-suppressive agents, and infection control practices on the incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea in hospitalized patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 2082-8.
30. Cunningham, R., et al., *Proton pump inhibitors as a risk factor for Clostridium difficile diarrhoea*. J Hosp Infect, 2003. **54**(3): p. 243-5.
31. Dial, S., et al., *Risk of Clostridium difficile diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies*. CMAJ, 2004. **171**(1): p. 33-8.
32. Dial, S., et al., *Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease*. JAMA, 2005. **294**(23): p. 2989-95.
33. Bartlett, J.G., *Antimicrobial agents implicated in Clostridium difficile toxin-associated diarrhea of colitis*. Johns Hopkins Med J, 1981. **149**(1): p. 6-9.
34. Finegold, S.M., *Anaerobic infections and Clostridium difficile colitis emerging during antibacterial therapy*. Scand J Infect Dis Suppl, 1986. **49**: p. 160-4.
35. Dancer, S.J., *The problem with cephalosporins*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48**(4): p. 463-78.
36. Szczesny, A. and G. Martirosian, *[Treatment of infections associated with Clostridium difficile]*. Wiad Lek, 2003. **56**(5-6): p. 278-82.
37. Vestevinsdottir, I., et al., *Risk factors for Clostridium difficile toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(10): p. 2601-10.

38. Dhalla, I.A., et al., *Are broad-spectrum fluoroquinolones more likely to cause Clostridium difficile-associated disease?* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 3216-9.
39. Fowler, S., et al., *Successful use of feedback to improve antibiotic prescribing and reduce Clostridium difficile infection: a controlled interrupted time series.* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(5): p. 990-5.
40. Paterson, D.L., *"Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy.* Clin Infect Dis, 2004. **38 Suppl 4**: p. S341-5.
41. Muto, C.A., et al., *A large outbreak of Clostridium difficile-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. **26**(3): p. 273-80.
42. Simon, A., et al., *Nosocomial infection: a risk factor for a complicated course in children with respiratory syncytial virus infection--results from a prospective multicenter German surveillance study.* Int J Hyg Environ Health, 2008. **211**(3-4): p. 241-50.
43. Dettenkofer, M., et al., *Surveillance of nosocomial infections in adult recipients of allogeneic and autologous bone marrow and peripheral blood stem-cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2003. **31**(9): p. 795-801.
44. Rubin, M.S., L.E. Bodenstein, and K.C. Kent, *Severe Clostridium difficile colitis.* Dis Colon Rectum, 1995. **38**(4): p. 350-4.
45. Kyne, L., et al., *Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to Clostridium difficile.* Age Ageing, 1999. **28**(2): p. 107-13.
46. Kuipers, E.J. and C.M. Surawicz, *Clostridium difficile infection.* Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1486-8.
47. Barbut, F. and J.C. Petit, *[Epidemiology of Clostridium difficile nosocomial infections].* Presse Med, 1996. **25**(8): p. 385-92.
48. Bartlett, J.G., *Antibiotic-associated diarrhea.* Clin Infect Dis, 1992. **15**(4): p. 573-81.
49. Mylonakis, E., E.T. Ryan, and S.B. Calderwood, *Clostridium difficile--Associated diarrhea: A review.* Arch Intern Med, 2001. **161**(4): p. 525-33.
50. Pepin, J., L. Valiquette, and B. Cossette, *Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec.* CMAJ, 2005. **173**(9): p. 1037-42.
51. Loo, V.G., et al., *A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality.* N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2442-9.
52. 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.
53. Schutze, G.E., et al., *Clostridium difficile infection in infants and children.* Pediatrics, 2013. **131**(1): p. 196-200.
54. Hospital Infection Control Practices Advisory, C., *Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1995. **16**(2): p. 105-13.

55. Zar, F.A., 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): p. 302-7.
56. Gerding, D.N., C.A. Muto, and R.C. Owens, Jr., *Treatment of Clostridium difficile infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 1**: p. S32-42.
57. Al-Nassir, W.N., et al., *Comparison of clinical and microbiological response to treatment of Clostridium difficile-associated disease with metronidazole and vancomycin*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(1): p. 56-62.
58. Cornely, O.A., et al., *Treatment of first recurrence of Clostridium difficile infection: fidaxomicin versus vancomycin*. Clin Infect Dis, 2012. **55 Suppl 2**: p. S154-61.
59. Louie, T.J., et al., *Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(5): p. 422-31.
60. El-Herte, R.I., T.A. Baban, and S.S. Kanj, *Recurrent refractory Clostridium difficile colitis treated successfully with rifaximin and tigecycline: a case report and review of the literature*. Scand J Infect Dis, 2012. **44**(3): p. 228-30.
61. Herpers, B.L., et al., *Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory Clostridium difficile infection*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(12): p. 1732-5.
62. Abougergi, M.S. and J.H. Kwon, *Intravenous immunoglobulin for the treatment of Clostridium difficile infection: a review*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(1): p. 19-26.
63. Barbut, F., et al., *Epidemiology of recurrences or reinfections of Clostridium difficile-associated diarrhea*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2386-8.
64. Duleba K, P.M., Wietlicka-Piszc M, *Clostridium difficile infection in children hospitalized due to diarrhea*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014: p. 201–209.
65. Maroo, S. and J.T. Lamont, *Recurrent clostridium difficile*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1311-6.
66. McFarland, L.V., G.W. Elmer, and C.M. Surawicz, *Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent Clostridium difficile disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(7): p. 1769-75.
67. Surawicz, C.M., et al., *The search for a better treatment for recurrent Clostridium difficile disease: use of high-dose vancomycin combined with Saccharomyces boulardii*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1012-7.
68. Aas, J., C.E. Gessert, and J.S. Bakken, *Recurrent Clostridium difficile colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(5): p. 580-5.
69. Brandt, L.J., et al., *Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(7): p. 1079-87.
70. Davidovics, Z.H. and J.S. Hyams, *Fecal transplantation: re-discovering the value of stool*. Curr Opin Pediatr, 2013.
71. Kleger, A., et al., *Fecal transplant in refractory Clostridium difficile colitis*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(7): p. 108-15.
72. Russell, G., et al., *Fecal bacteriotherapy for relapsing Clostridium difficile infection in a child: a proposed treatment protocol*. Pediatrics, 2010. **126**(1): p. e239-42.
73. Lübbert C, J.E., von Müller L, *Clostridium difficile infection— guideline-based diagnosis and treatment*. Dtsch Arztebl Int 2014, 2014. **111**: 723–31.

74. Berman, L., et al., *Defining surgical therapy for pseudomembranous colitis with toxic megacolon*. J Clin Gastroenterol, 2008. **42**(5): p. 476-80.
75. Dallal, R.M., et al., *Fulminant Clostridium difficile: an underappreciated and increasing cause of death and complications*. Ann Surg, 2002. **235**(3): p. 363-72.
76. Osman, K.A., et al., *Emergency colectomy for fulminant Clostridium difficile colitis: Striking the right balance*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(10): p. 1222-7.
77. Robert Koch Institut. *Clostridium difficile - RKI Ratgeber für Ärzte*. 2014; Available from:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html.
78. Monaghan, T., T. Boswell, and Y.R. Mahida, *Recent advances in Clostridium difficile-associated disease*. Gut, 2008. **57**(6): p. 850-60.
79. Vonberg, R.P., et al., *Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14 Suppl 5**: p. 2-20.
80. Fenner, L., et al., *Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(1): p. 328-30.
81. Schaumann RR, e.a., *Diagnostik, Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von obligaten Anaerobiern*. Chemotherapy Journal, 2007: p. 75-86.
82. Barbut, F., et al., *A European survey of diagnostic methods and testing protocols for Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect, 2003. **9**(10): p. 989-96.
83. Kuijper, E.J., et al., *Update of Clostridium difficile infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008*. Euro Surveill, 2008. **13**(31).
84. Bacci, S., et al., *Outbreak of Clostridium difficile 027 in North Zealand, Denmark, 2008-2009*. Euro Surveill, 2009. **14**(16).
85. Coignard, B., et al., *Emergence of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France, 2006*. Euro Surveill, 2006. **11**(9): p. E060914 1.
86. Indra, A., et al., *Outbreak of Clostridium difficile 027 infection in Vienna, Austria 2008-2009*. Euro Surveill, 2009. **14**(17).
87. Jansen, A., et al., *[Emergence of clostridium difficile ribotype 027 in Germany: epidemiological and clinical characteristics]*. Z Gastroenterol, 2010. **48**(9): p. 1120-5.
88. Barbut, F., et al., *Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(11): p. 1048-57.
89. Bauer, M.P., et al., *Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey*. Lancet, 2011. **377**(9759): p. 63-73.
90. Robert Koch Institut, *Schwer verlaufende Clostridium-difficile-Infektionen: IfSG-Surveillancedaten von 2011 und 2012*. Epidemiologisches Bulletin, 2013: p. 8.
91. Mock M, H.A., Herrmann M, Von Müller L, *Aktuelles zur Epidemiologie von Clostridium difficile - Bericht aus dem Konsiliarlabor C. difficile*. Epidemiologisches Bulletin, 2013. **26**: **241-4**.
92. Hensgens, M.P., et al., *Decrease of hypervirulent Clostridium difficile PCR ribotype 027 in the Netherlands*. Euro Surveill, 2009. **14**(45).
93. Institut, R.K., *Schwer verlaufende Clostridium-difficile-Infektionen: IfSG-Surveillancedaten von 2013*. Epidemiologisches Bulletin, 2014. **27**: **233-40**.

94. Geffers, C. and P. Gastmeier, *Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System)*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(6): p. 87-93.
95. Meyer, E., et al., *Associations between nosocomial meticillin-resistant Staphylococcus aureus and nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhoea in 89 German hospitals*. J Hosp Infect, 2012. **82**(3): p. 181-6.
96. Al-Jumaili, I.J., et al., *Incidence and origin of Clostridium difficile in neonates*. J Clin Microbiol, 1984. **19**(1): p. 77-8.
97. Enad, D., et al., *Is Clostridium difficile a pathogen in the newborn intensive care unit? A prospective evaluation*. J Perinatol, 1997. **17**(5): p. 355-9.
98. Jangi, S. and J.T. Lamont, *Asymptomatic colonization by Clostridium difficile in infants: implications for disease in later life*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. **51**(1): p. 2-7.
99. Kim, J., et al., *Epidemiological features of Clostridium difficile-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006*. Pediatrics, 2008. **122**(6): p. 1266-70.
100. Rousseau, C., et al., *Clostridium difficile carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(9): p. 1209-15.
101. Tang, P., M. Roscoe, and S.E. Richardson, *Limited clinical utility of Clostridium difficile toxin testing in infants in a pediatric hospital*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **52**(2): p. 91-4.
102. Eglow, R., et al., *Diminished Clostridium difficile toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 822-9.
103. Langley, J.M., et al., *The role of Clostridium difficile and viruses as causes of nosocomial diarrhea in children*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. **23**(11): p. 660-4.
104. Khanna, S., et al., *The epidemiology of Clostridium difficile infection in children: a population-based study*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(10): p. 1401-6.
105. Zilberberg, M.D., G.S. Tillotson, and C. McDonald, *Clostridium difficile infections among hospitalized children, United States, 1997-2006*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(4): p. 604-9.
106. Baker, S.S., et al., *Increasing incidence of community-associated atypical Clostridium difficile disease in children*. Clin Pediatr (Phila), 2010. **49**(7): p. 644-7.
107. Benson, L., et al., *Changing epidemiology of Clostridium difficile-associated disease in children*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007. **28**(11): p. 1233-5.
108. Zilberberg, M.D., A.F. Shorr, and M.H. Kollef, *Increase in Clostridium difficile-related hospitalizations among infants in the United States, 2000-2005*. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(12): p. 1111-3.
109. Kato, H., T. Yokoyama, and Y. Arakawa, *Typing by sequencing the slpA gene of Clostridium difficile strains causing multiple outbreaks in Japan*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 2): p. 167-71.
110. Joost, I., et al., *Characterisation of Clostridium difficile isolates by slpA and tcdC gene sequencing*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **33** Suppl 1: p. S13-8.

111. Pai, S., et al., *Five years experience of Clostridium difficile infection in children at a UK tertiary hospital: proposed criteria for diagnosis and management*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51728.
112. Sammons, J.S., et al., *Clostridium difficile infection is associated with increased risk of death and prolonged hospitalization in children*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(1): p. 1-8.
113. Rhee Susan M., T.R., Nelson Deborah S. , van Wijngaarden Edwin , Dumyati Ghinwa, *Clostridium difficile in the Pediatric Population of Monroe County, New York*. J Ped Infect Dis, 2014. **3**: p. 183-8.
114. Wendt, J.M., et al., *Clostridium difficile infection among children across diverse US geographic locations*. Pediatrics, 2014. **133**(4): p. 651-8.
115. Simon A., K.P., Berner R et al., *The Paed IC project - Antibiotic stewardship and hospital hygiene to prevent infection with resistant pathogens*. Klin Padiatr, 2013. **225**: p. 93-95.
116. von Muller, L., A. Halfmann, and M. Herrmann, *[Current data and trends on the development of antibiotic resistance of Clostridium difficile]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2012. **55**(11-12): p. 1410-7.
117. Damani, N. and S. Wallace, *Does viral gastroenteritis really increase the reports of Clostridium difficile infection?* J Hosp Infect, 2011. **77**(2): p. 171-2.
118. El Feghaly, R.E., et al., *Viral co-infections are common and are associated with higher bacterial burden in children with clostridium difficile infection*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013. **57**(6): p. 813-6.
119. Simon A., B.G., Engelhart S., Exner M., Kramer M., Bode U., Fleischhack G. und die Studiengruppe Onkopaed 2001, *Nosokomiale Clostridium-difficile-assoziierte Erkrankungen bei pädiatrisch-onkologischen Patienten – Ergebnisse einer prospektiven Surveillancestudie*. Hyg Med, 2007. **5/2007**: p. 170-6.
120. Dominguez, S.R., et al., *High colonization rate and prolonged shedding of Clostridium difficile in pediatric oncology patients*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(3): p. 401-3.
121. Valentini, D., et al., *Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013. **32**(7): p. 909-15.
122. Pascarella, F., et al., *Impact of Clostridium difficile infection on pediatric inflammatory bowel disease*. J Pediatr, 2009. **154**(6): p. 854-8.
123. Kelsen, J.R., et al., *Recurrence rate of clostridium difficile infection in hospitalized pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 50-5.
124. Johnson, S., et al., *Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for Clostridium difficile infection: results from two multinational, randomized, controlled trials*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(3): p. 345-54.
125. Kleinkauf, N., et al., *Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Germany*. Euro Surveill, 2007. **12**(11): p. E071115 2.
126. Stoesser, N., et al., *Molecular epidemiology of Clostridium difficile strains in children compared with that of strains circulating in adults with Clostridium difficile-associated infection*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3994-6.

127. Goorhuis, A., et al., *Spread and epidemiology of Clostridium difficile polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(6): p. 695-703.
128. Toltzis, P., et al., *Presence of the epidemic North American Pulsed Field type 1 Clostridium difficile strain in hospitalized children*. J Pediatr, 2009. **154**(4): p. 607-8.
129. Bradley, J.S., et al., *The use of systemic and topical fluoroquinolones*. Pediatrics, 2011. **128**(4): p. e1034-45.
130. Alam, M.J., et al., *Investigation of potentially pathogenic Clostridium difficile contamination in household environs*. Anaerobe, 2014. **27**: p. 31-3.
131. Killgore, G., et al., *Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of Clostridium difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(2): p. 431-7.

8 Publikationen

- Teile dieser Arbeit wurden auf der 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. in Rostock 2013 als Poster vorgestellt
- Teile dieser Arbeit wurden auf der 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. in Dresden 2014 als Poster vorgestellt.
- Mock M, H.A., Herrmann M, Von Müller L, Aktuelles zur Epidemiologie von Clostridium difficile - Bericht aus dem Konsiliarlabor C. difficile. Epidemiologisches Bulletin, 2013. **26: 241–4.**
- Weitere Publikationen sind zur Zeit in Vorbereitung

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte allen danken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Zu aller erst möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern, dafür bedanken, dass sie es mir ermöglicht haben, überhaupt erst soweit zu kommen, dass ich die Möglichkeit hatte eine eigene Dissertation verfassen zu können. Ihr habt mich, wo es euch möglich war, unterstützt und mir oft den Rücken frei gehalten, damit ich Zeit zum Schreiben meiner Doktorarbeit hatte. Vielen vielen Dank dafür!

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Lutz von Müller, der in den letzten drei Jahren immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei Problemen stets schnell und unkompliziert geholfen hat. Ohne seine Ideen, seine aufmunternden Worte, sowie die vielen konstruktiven Gespräche, die wir in den vergangenen Jahren geführt haben, wäre die vorgelegte Arbeit in ihrer nun entstanden Form undenkbar gewesen.

Ebenfalls sehr bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Arne Simon dafür, dass er immer für mich mit meinen Fragen und Problemen da war und mir stets weitergeholfen hat, wenn ich vor einer für mich scheinbar unlösbaren Aufgabe stand. Vor allem mit Blick auf die klinische Kohortenstudie hätte ich mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Sehr dankbar bin ich Anna Nimmesgern für die schöne Zeit, die ich mit Dir als meiner Betreuerin im Labor verbringen durfte. Die gute Laune, die du jeden Tag auf's neue verbreitet hast, hat sehr dazu beigetragen, dass ich gerne im Labor gearbeitet habe. Vielen Dank auch für die zahllosen Tipps, die du mir gegeben hast, ohne sie hätte ich zweifellos wesentlich länger an meinen Versuchen gesessen, wenn sie überhaupt gelungen wären. Ein großer Dank geht an Tabea Kramer, die wie Anna Nimmesgern, dafür sorgt, dass man sich nur darauf freuen kann ins PCR-Labor der Mikrobiologie zu kommen. Ihr beiden habt mir immer weitergeholfen, wenn es irgendwo gehakt hat, ganz egal wie viel eigene Arbeit ihr gerade hattet!

Diana Velten, Teresa Kassel und Sabine Freis möchte ich ebenfalls danken für die Unterstützung bei meinen Versuchen im PCR-Labor, die ich von Euch bekommen habe. Es hat mich sehr gefreut für einige Monate ein Teil eures Teams zu sein.

Nicolas Seiwert danke ich sehr für seine Hilfe im Umgang mit Microsoft Excel. Wörter wie „Makro“ oder „VBA-Editor“ wären ohne Dich für mich wohl für immer ein Rätsel geblieben.

Sehr bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Kristin Kaspar, die mir beim Übersetzen von Texten ins Englische geholfen hat, was mir viele Stunden Suchen nach den besten Formulierungen erspart hat.

Ein großer Dank geht an Kathrin Schmitt, die mir sehr dabei geholfen hat, meine erhobenen Daten mit dem SPSS-Programm durch die verschiedenen statistischen Tests zu schleusen.

Philip Rauber möchte ich herzlich für den Crashkurs in der Benutzung der Endnote-Software danken, der mir den Umgang mit diesem, nicht immer auf den ersten Blick logischen Programm, vereinfacht hat.

Bei Dr. Alexander Halfmann möchte ich mich für die Unterstützung im Bezug auf alle Fragen der EDV in der Mikrobiologie bedanken.

An letzter Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, deren Hilfe ich am Ende der Erstellung meiner Dissertation benötigt habe; allen Korrekturlesern. Vielen Dank, dafür, dass Ihr Euch die Zeit dazu genommen habt, mir zu helfen die verbliebenen kleineren und größeren Fehler in meiner Doktorarbeit auszumerzen.

10 Anhang

10.1 Geräte, Reagenzien und Software

Tabelle 20: Übersicht Geräte, Reagenzien und Software

Kultur	
Name	Hersteller
COS (Columbia Agar + 5% Schafsblut)	Biomérieux
Anaerobiertopf 2,5 l	Merck
Plattenkorb	Merck
Anaerobier-Sicherheitskatalysator	Oxoid
Macs mics jar gassing system	Don Whitley Scientific
CLO (Selektivmedium zur Anzucht von <i>C. difficile</i>)	Biomérieux
GENbox Anaerobiertopf 7,0 l	Biomérieux
GENbox anaer	Biomérieux
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus
Surface-Layer-Protein A Sequenzierung	
Name	Hersteller
Primer (siehe Tabelle 9)	Biomers
Taq DNA Polymerase Kit Cat. No. 201207	Qiagen
Inhalt: 10x PCR-Puffer	
Q-Lösung	
Taq-Polymerase	
PCR grade Aqua destillata	Braun Melsungen AG

dNTP-Set	Roth
Name	Hersteller
Multiply- μ Strip Pro 8er Kette (0,2 ml PCR-Gefäße)	Sarstedt
UNOII-Thermoblock (Thermocycler)	Biometra
TBE Puffer (1:10) (Tris-Borat-EDTA Puffer)	Merck
QA-Agarose TM Cat. No. AGAH0500	MP North American
Laufpuffer (1:10 TBE Puffer)	Merck
Gelelektrophoresekammer SubCell GT	BioRad
Transilluminator	Ultra-Violet Products
ExoSAP – IT	USB
Safelock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf
Mikrowelle	Elektrolux
FinchTV Software	Geospiza
NCBI BLAST Datenbank (Basic Local Alignment Search) Tool:	
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	
<u>Stuhl-/Kultur-Aufreinigung</u>	
Name	Hersteller
Maxwell 16 MDx Instrument	Promega
Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	Promega
Inhalt: Maxwell 16 LEV RNA Cartridges	
Nuclease free water	
Elution tubes 0,5ml	

LEV Plungers	
Multiplex-PCR und PCR-Ribotypisierung	
Name	Hersteller
Galaxy Mini Star (Zentrifuge)	VWR
Multiply-Pro Gefäße (0,2 ml)	Sarstedt
PeqStar (Thermocycler)	PeqLab
peqGold PCR Hot Start-Mix Y (25 µl)	PeqLab
Inhalt : 1,25 u 'Hot- Start' Taq-DNA Polymerase 0,4 mM dNTPs 40 mM Tris-HCL 32 mM (NH ₄)SO ₄ 0,02% Tween 20 4 mM MgCl ₂	
PCR grade Aqua destillata	Braun Melsungen AG
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Filter Tips 0,5-10 µl	Biospehere
Filter Tips 2-100 µl	Biospehere
Filter Tips 100-1000 µl	Biospehere
Research Plus (Pipette) 0,5-10 µl	Eppendorf
Research Plus (Pipette) 10-100 µl	Eppendorf
Reference (Pipette) 100-1000 µl	Eppendorf
Vasco Nitril white (Handschuhe)	Braun
Power Pac 1000	BioRad

Sub-Cell GT	BioRad
Name	Hersteller
Gel Doc XR +	BioRad
Image Lab (Software)	BioRad
A0972,1000 (TBE Puffer (10x))	Panreac
Laboratory film	Parafilm
Mikrowelle	Elektrolux
peq GOLD 100bp DNA Ladder Plus	PeqLab
440-30N (Waage)	Kern
QA-Agarose™ Cat. No. AGAH0500	MP North American
Hera safe (Sicherheitswerkbank)	Heraeus
Premium NoFrost (Gefrierschrank)	Liebherr
Primer (siehe Tabellen 11 und 13)	Biomers
<u>Fragmentanalyse der PCR-Ribotypisierungs-Amplifikate</u>	
Name	Hersteller
SLS (Sample Loading Solution)	Beckman Coulter
Size Standard 600	Beckman Coulter
Seperation Buffer	Beckman Coulter
Gel Cartridge (10 ml)	Beckman Coulter
Mineral Oil	Beckman Coulter
Capillary Array	Beckman Coulter
Buffer Plates	Beckman Coulter
Sample Plates	Beckman Coulter

GenomLab GeXP (Sequencer)	Beckman Coulter
Name	Hersteller
Mineralöl	Beckman Coulter
Bionumerics (Software)	Applied Maths

10.2 Einverständniserklärung



Information und Einverständniserklärung zur Teilnahme
an der *Clostridium difficile* Studie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Universitätskinderklinik Homburg Saar

Sehr geehrte Eltern,

bei Ihrem Kind wurde im Stuhl *Clostridium difficile* nachgewiesen. *C.difficile* ist ein gegenüber Umweltbedingungen und Desinfektionsmitteln sehr stabiles Bakterium, das Durchfall und eine Entzündung des Darmes auslösen kann. Besonders häufig betroffen sind Kinder und Jugendliche, die mit Antibiotika vorbehandelt wurden. Clostridien bilden Dauerformen (Sporen) und sind daher gegenüber vielen Antibiotika unempfindlich. Unter einer Antibiotikatherapie haben sie oft gegenüber anderen Darmbakterien einen Selektionsvorteil.

Im Rahmen der *Clostridium difficile* Studie möchten wir (eine Forschungsgruppe des Universitätsklinikums des Saarlandes, spezialisiert auf diesem Gebiet) diese Infektion bei Kindern und Jugendlichen systematisch untersuchen und dabei neben vorbestehenden Grunderkrankungen und Risikofaktoren auch den Verlauf während des Krankenhausaufenthaltes sorgfältig dokumentieren und auswerten. Ihr Kind erhält unabhängig von dieser Studie die bestmögliche Behandlung, die in einer internen Leitlinie unserer Klinik festgeschrieben ist.

Alle für die Dokumentation erforderlichen Laborwerte werden im Rahmen der üblichen Behandlung gewonnen, es ist also keine zusätzliche Blutentnahme (kein zusätzlicher Pieks) erforderlich.

Im Rahmen der Studie werden Informationen zur Vorgeschichte, zur Symptomatik und zum Verlauf der Infektion zusammengetragen. Die in einer geschützten Datenbank gespeicherten Informationen werden ausschließlich zum Zwecke der wissenschaftlichen Forschung ausgewertet. Nur die behandelnden Ärztinnen und Ärzte und die Mitarbeiter der Forschungsgruppe haben Zugriff auf diese Daten. Alle Mitarbeiter der Forschungsgruppe unterliegen der medizinischen Schweigepflicht. In der Datenbank steht nicht der Name und Vornahme oder das Geburtsdatum Ihres Kindes, sondern nur eine Identifikationsnummer, d.h. die Daten sind anonymisiert. Der für diese Studie zuständige Doktorand ist Herr Markus Mock. Es kann sein, dass er mit Ihnen während des stationären Aufenthalts Ihres Kindes Kontakt aufnimmt.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig, Ihr Kind muss als Patient keine Nachteile befürchten, wenn Sie die Teilnahme ablehnen. Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an die behandelnden Ärzte Ihres Kindes oder direkt an die Koordinatoren der Studie:

Prof. Dr. med. Arne Simon Tel.: 06841-1628399

Prof. Dr. med. Ludwig Gortner Tel.: 06841-1628300

- Vielen Dank für Ihre freundliche Unterstützung ! -



**Information und Einverständniserklärung zur Teilnahme
an der Clostridium difficile Studie**
Universitätsklinikum des Saarlandes, Universitätskinderklinik Homburg Saar

Name des Patienten: _____

Geburtsdatum: _____

Datum der stationären Aufnahme: _____

Ich erkläre, dass ich die Elterninformation zur wissenschaftlichen Untersuchung
Clostridium difficile Studie Homburg/Saar erhalten, gelesen und verstanden habe.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung erhobenen Krankheitsdaten in einer geschützten Datenbank aufgezeichnet werden. Die gespeicherten Daten werden ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. Alle Personen, die Einblick in die Datenbank haben, sind zur Wahrung des Datenschutzes verpflichtet und unterliegen der medizinischen Schweigepflicht. Bei der Veröffentlichung wird aus den Daten nicht hervorgehen, welcher Patient an dieser Untersuchung teilgenommen hat.

Ich kann jederzeit meine Einwilligung ohne Angaben von Gründen widerrufen, ohne dass dies für mich oder mein Kind nachteilige Folgen hat.

Ich bin ausreichend mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Untersuchung informiert worden. Falls ich im Verlauf weitere Fragen habe, werde ich diese den behandelnden Ärztinnen und Ärzten stellen.

Homburg, den _____._____._____

_____ Unterschrift eines Elternteils oder eines Sorgeberechtigten

Homburg, den _____._____._____

_____ Unterschrift Ärztin / Arzt

Das Original verbleibt bei den Unterlagen. Eine Kopie wird den Eltern ausgehändigt.

10.3 Case Report Form

Einverständnis der Sorgeberechtigten liegt vor Ja

Dokumentationsnummer (=Fallnummer) _____

Name: _____ **Vorname:** _____

Allgemeine Angaben

Geburtsdatum: _____._____._____

Geschlecht: m / w

Stationäre Behandlung von _____._____._____ bis _____._____._____ (Datum)

Größe ____ cm / Perzentile (____), Gewicht bei Aufnahme ____ kg / Perzentile (____)

Hauptdiagnose (in Bezug auf den stationären Aufenthalt): _____

Nosokomiale Infektion : _____ Ja Nein

Komorbidityäten

Frühgeburlichkeit (<37 SSW bei Geburt) Ja Nein

Chronische Darmerkrankung Ja Nein

Cystische Fibrose Ja Nein

Onkologische Grunderkrankung Ja Nein

Chemotherapie Ja Nein

Kardiale Grunderkrankung Ja Nein

Genetische Grunderkrankung Ja Nein

Ernährungssonde Ja Nein

Sonstige Grunderkrankung Ja Nein

Vorliegen einer Grunderkrankung Ja Nein

Sonstige:

Aktuelle Anamnese

Beginn der Durchfälle (> 3 dünne Stühle/Tag) _____ (Datum)

ambulant erworben (<48 h nach Aufnahme) nosokomial (>48 h nach Aufnahme)

Chronische Durchfälle (>7 Tage)? Ja Nein keine Angabe

Rezidivierende Durchfälle? (mind. 3 Wochen Symptombfreiheit) Ja Nein keine Angabe

Wenn ja wie häufig in den vergangenen 6 Monaten? _____

Durchfallerkrankungen im persönlichen Umfeld Ja Nein keine Angabe

Krankenhausaufenthalt in den vergangenen 3 Monaten? Ja Nein keine Angabe

Auslandsaufenthalt in den vergangenen 4 Wochen?

Ernährungsgewohnheiten? Mischkost kein Schweinefleisch vegetarisch

andere? _____

Stillzeit: Muttermilch Formula

Anamnese Antibiotika

Vorbehandlung mit Antibiotika Ja Nein keine Angabe

Wenn ja, ab wann: _____

Wenn ja, welche: _____

Antibiotikage: _____

Antibiotikaty: Penicilline (Penicilin/Aminopenicillin)

..... Cephalosporin

..... Aminoglykoside

..... andere

Symptomatik bei Diagnose

- Allgemeinzustand: gut reduziert septisch
- Temperatur (°C) _____ → Fieber (>38 °C) Ja Nein nicht auswertbar/nicht bekannt
- Erbrechen..... Ja Nein nicht auswertbar/nicht bekannt
- Gewichtsverlust > 10% des Körpergewichts Ja Nein nicht auswertbar/nicht bekannt
- Bauchschmerzen Ja Nein nicht auswertbar/nicht bekannt
- Sichtbares Blut im Stuhl Ja Nein nicht auswertbar/nicht bekannt

Sonstiges:

Diagnostik Bildgebung:**Sonographie** Ja Nein

Datum:

Ergebnis:

Abdomen Übersicht (Röntgen) Ja Nein

Datum:

Ergebnis:

MRT oder CT Ja Nein

Datum:

Ergebnis:

Laborbefunde bei Diagnose:

Datum des Laborbefundes: ____ . ____ . ____

Leukozyten ($\times 10^9/l$): _____ nicht analysiertAnteil der Granulozyten: _____ % nicht analysiertCRP (mg/l): _____ nicht analysiertProcalcitonin: _____ nicht analysiertSerum Albumin: _____ nicht analysiertBase excess (Astrup): _____ nicht analysiertLaktat: _____ nicht analysiert

Elektrolytwerte:

Na⁺: _____ nicht analysiertK⁺: _____ nicht analysiert**Stuhldiagnostik****Virologisches Panel (PCR)**

- Adenovirus Ja Nein nicht untersucht
- Rotavirus Ja Nein nicht untersucht
- Norovirus Ja Nein nicht untersucht
- Astrovirus Ja Nein nicht untersucht

-
- Virale Infektion Ja Nein nicht untersucht

Diagnostik Mikrobiologie

Auftragsnummer: _____

Kultur auf enteropathogene Bakterien Ja Nein Salmonellen, Campylobacter, EPEC, EHEC, Shigellen, Yersinien, ParasitenC. difficile Diagnostik: **GLDH**: Ja Nein, **Toxin A/B** Ja Nein,**Kultur** Ja Nein, **slpA-Genotyp**: _____**Mikrobiologisch dokumentierte zusätzliche Infektion:**Blutstrominfektion mit nativer Blutkultur..... Ja NeinHarnwegsinfektion..... Ja Neinandere Ja Nein

(Co-)Pathogene:

Analyse C. difficileToxingene: Toxin A (tcd A) Ja NeinToxin B (tcd B) Ja NeinBinäres Toxin (cdt A/cdt B) Ja NeinResistenzen: Clarithromycin sensitiv intermediär resistentMetronidazol sensitiv intermediär resistentMoxifloxacin sensitiv intermediär resistentVancomycin sensitiv intermediär resistentRifampicin sensitiv intermediär resistent

Therapeutische InterventionenTherapie Ja NeinAbsetzen der Antibiotika(Vorbehandlung) Ja NeinMetronidazol (p.o. oder i.v.) Ja Nein

Dosierung [mg]: _____

Dauer der Therapie: _____ Tag(e)

Vancomycin (p.o.) Ja Nein

Dosierung [mg]: _____

Dauer der Therapie: _____ Tag(e)

Weitere Antibiotika:

Probiotika Ja Nein

(z.B. Saccharomyces oder Lactobacillen)

Intensivüberwachung oder -therapie Ja NeinOperative Intervention Ja Nein

Wenn ja,

a) wann:

b) welche:

Sonstiges / Kommentar zum Fall

10.4 Hausinterne Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der CDI

<i>Clostridium difficile</i> (CD) Infektionen im Kindesalter	
Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (AAD), nosokomiale Diarrhoe, (pseudomembranöse) Enterkolitis, toxisches Megakolon (auch ohne Diarrhoe!)	
<p>Diagnostik [7]: Stuhl für GLDH Test sowie Toxinnachweis (CDT A+B; Alere, Combi Test), Kultur (CLO-Agar). Bei diskrepantem Befund erfolgt die PCR mit Nachweis der Toxin Gene als Bestätigungstest innerhalb eines weiteren Werktags. Bei allen Isolaten wird die in vitro Empfindlichkeit gegen Vancomycin, Metronidazol, Rifampicin, Clarithromycin und Moxifloxacin getestet (E-Test bzw. Agar Diffusionstest). Die Proben sollten für die Toxinbestimmung so schnell wie möglich verarbeitet werden. Das Toxin zerfällt bei Raumtemperatur und kann innerhalb von 2 Stunden nach Stuhlprobennahme nicht mehr nachweisbar sein. Bei 2–8 °C können die Proben maximal 3 Tage gelagert werden.</p> <p>Kontrolluntersuchungen sind bei wieder genesenen Patienten in der Regel <u>nicht</u> erforderlich. Ausnahmen: hochgradig immunsupprimierte Patienten und Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung [12].</p> <p>Besonderheiten: Neugeborene und Säuglinge im ersten Lebensjahr scheiden sehr häufig Toxin-bildende CD aus, ohne zu erkranken. Gefährdet sind immunsupprimierte Patienten, Patienten der Intensivstationen (außer Neo), Patienten mit CF, angeborenen Fehlbildungen des Darms (z.B. M. Hirschsprung) und Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung.</p> <p>Eine spezifische Diagnostik und Therapie ist ausschließlich bei symptomatischen Patienten indiziert. Wenn irgend möglich sollte eine vorbestehende antibakterielle Therapie abgesetzt werden. Dies ist bei AAD oft ausreichend. Hygiene- und Isolierungsstandard beachten!</p>	
	1. Wahl [3,8]
Unkomplizierte AAD (ohne/mit CDT Nachweis)	alternativ
	Symptomatische Therapie, wenn möglich Antibiotika absetzen
Mittelschwere AAD Diarrhoe mit CDT Nachweis	Antibiotika absetzen Metronidazol po. für 7 Tage ¹
	Bemerkungen
	Spontanverlauf abwarten
	Andere nosokomiale Infektionserreger ausschließen (z.B. Rota, Noro, Adeno, Astro PCR)

¹ Aus der Metronidazol iv. Lösung kann in der Klinikapotheke eine orale Zubereitung mit Geschmacksstoffen hergestellt werden, die sich bei Kindern unter 25kg leichter dosieren lässt (kleinste Filmtablette: 250mg)

Enterokolitis mit CDT Nachweis	Metronidazol p.o. für 10 Tage	Vancomycin p.o. für 10 Tage	Vancomycin bei dieser Indikation nur per os! Metronidazol kann bei schweren Verläufen zusätzlich zu Vancomycin auch intravenös gegeben werden, als Monotherapie aber ausschließlich po.
Toxisches Megakolon oder sehr schwere Enterokolitis	Metronidazol intravenös plus Vancomycin po (ggfl. über Magensonde)	Immer zusätzlich Sepsistherapie mit Piperacillin-Tazobactam intravenös Intravenöse Immunglobulin-Gabe (0,5 g/kg/Tag über 6 h an 2 konsekutiven Tagen)	Frühzeitig die Kinderchirurgen mit involvieren. MRT oder CT Abdomen mit KM.
Symptomatisches Rezidive*	Vancomycin p.o. für 14 Tage plus Probiotika #	Nitazoxanid [13,14] Alina® Suspension 100mg/5ml Alina® Tbl. 500mg [§] 1-3 Jahre 2 x 100mg p.o. 4 – 11 Jahre 2 x 200mg p.o. ≥ 12 Jahre 2 x 500mg p.o. Therapiedauer 10 Tage plus Probiotika #	Bei Patienten mit schwerer, chronisch rezidivierender <i>C.difficile</i> assoziierter Erkrankung: Stuhltransplantation von einem gesunden Angehörigen erwägen (Protokoll und Details der Donor-Testung bei Russell et al. Pediatrics 2010) [16]
Metronidazol		30mg/kg/Tag per os in 3 Einzeldosen, intravenös als Infusion über eine Stunde [für eine tägliche Einmalgabe von Metronidazol iv. liegen bei dieser Indikation keine Daten vor [10]]	
Vancomycin		40mg/kg/Tag in 4 Einzeldosen po. (max. 4 x 250mg po.). Die iv. Lösung kann po verabreicht werden.	

* Wiederauftreten einer CD-Toxin-positiven Diarrhoe (> 3 ungeformte Stühle pro Tag) nach vollständiger Genesung oder rasche Zunahme der Symptomatik nach Absetzen der gegen *C.difficile* gerichteten Antibiotika mit weiterhin positivem Toxinnachweis

Saccharomyces boulardii oder *Lactobacillus rhamnosus GG*; beides kontraindiziert bei hochgradig immunsupprimierten Patienten (Chemotherapie) § Muss über die Apotheke aus den USA importiert werden. Preise 30 Tbl. ca. 870 €, 60ml Saft ca. 150 € (Stand August 2012)

Literatur [1,2,4-7,9,11,15,17-22]

1. Abougergi MS, Kwon JH. Intravenous immunoglobulin for the treatment of Clostridium difficile infection: a review. *Dig Dis Sci* 2011;56:19-26
2. Barbut F, Jones G, Eckert C. Epidemiology and control of Clostridium difficile infections in healthcare settings: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24:370-376
3. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for Clostridium difficile infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1067-1079
4. Berman L, Carling T, Fitzgerald TN, et al. Defining surgical therapy for pseudomembranous colitis with toxic megacolon. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:476-480
5. Bryant K, McDonald LC. Clostridium difficile infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:145-146
6. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, 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;31:431-455
7. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1053-1066
8. Enoch DA, Butler MJ, Pai S, Aliyu SH, Karas JA. Clostridium difficile in children: colonisation and disease. *J Infect* 2012;63:105-113
9. Enoch DA, Butler MJ, Pai S, Aliyu SH, Karas JA. Clostridium difficile in children: Colonisation and disease. *J Infect* 2011;in press
10. Friedenberf F, Fernandez A, Kaul V, Niemi P, Levine GM. Intravenous metronidazole for the treatment of Clostridium difficile colitis. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1176-1180
11. Gerding DN, Muto CA, Owens RC, Jr. Treatment of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 2008;46 Suppl 1:S32-42
12. Mezzoff E, Mann EA, Hart KW, Lindsell CJ, Cohen MB. Clostridium difficile infection and treatment in the pediatric inflammatory bowel disease population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:437-441
13. Musher DM, Logan N, Bressler AM, Johnson DP, Rossignol JF. Nitazoxanide versus Vancomycin in Clostridium difficile infection: A Randomized, Double-Blind Study. *Clin Infect Dis* 2009
14. Musher DM, Logan N, Hamill RJ, et al. Nitazoxanide for the treatment of Clostridium difficile colitis. *Clin Infect Dis* 2006;43:421-427
15. Robert Koch-Institut. Empfehlungen des Robert Koch-Institutes zu Hygienemaßnahmen bei Patienten mit Durchfällen aufgrund von toxinbildendem Clostridium difficile. *Epidemiol Bulletin des Robert Koch-Instituts*, Berlin 2008;11.12.2008
16. Russell G, Kaplan J, Ferraro M, Michelow IC. Fecal bacteriotherapy for relapsing Clostridium difficile infection in a child: a proposed treatment protocol. *Pediatrics* 2010;126:e239-242
17. Sandora TJ, Fung M, Flaherty K, et al. Epidemiology and Risk Factors for Clostridium difficile Infection in Children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:580-584
18. Shetler K, Nieuwenhuis R, Wren SM, Triadafilopoulos G. Decompressive colonoscopy with intracolonic vancomycin administration for the treatment of severe pseudomembranous colitis. *Surg Endosc* 2001;15:653-659
19. Simon A, Bierbaum G, Engelhart S, et al. Nosokomiale Clostridium difficile-assoziierte Erkrankungen bei pädiatrisch-onkologischen Patienten - Ergebnisse einer prospektiven Surveillancestudie. *Hygiene & Medizin* 2007;32:170-176

20. Simon A, Büttcher M. Clostridien Infektionen. In: Scholz H BB, Bialek R, Heininger U, Kreth W, Roos R, ed ed, Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie - DGPI Handbuch Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009:190-200
21. Simon A, Fleischhack G, Hasan C, Marklein G, Bode U. Clostridium difficile-assoziierte Diarrhoe bei pädiatrischen Patienten. Vorkommen, Therapieindikationen und Behandlungsstrategie. Hygiene und Medizin 1998;23:109-114
22. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect 2008;14 Suppl 5:2-20