

Aus dem Bereich medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Molekulare Verwandtschaftsbeziehungen von  
*Clostridioides difficile*-Isolaten der Ribotypen 015, 027, 046, 106 und  
176 bei Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes und  
phylogenetischer Vergleich mit Stämmen aus Deutschland**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von: Christian Strauß

Geb. am: 31.01.1995 in Saarlouis

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Epidemiologisches Bulletin, 10:93-95, „Auftreten von *Clostridium difficile* Ribotyp 176 in Deutschland“ 09.03.2017, Dr. Fabian Berger, Prof. Markus Bischoff, Christian Strauß, Prof. Lutz von Müller und Prof. Barbara Gärtner.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben meinen großen Dank aussprechen.

Allen voran meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Bischoff ohne den ich vermutlich nie auf die spannende Welt der Mikrobiologie aufmerksam geworden wäre. Ihm möchte ich für die Überlassung meines Promotionsthemas, sowie für die produktiven Gespräche und hilfreichen Anregungen danken, mit denen er mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat. Besonderer Dank gebührt auch meinem hervorragenden Betreuer Herrn Dr. Fabian Berger, welcher mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Unterstützung über die letzten Jahren machte die Umsetzung der vorliegenden Arbeit überhaupt erst möglich.

Außerdem möchte ich Frau Anna Nimmesgern für ihre Unterstützung bei der Umsetzung des gesamten praktischen Teils dieser Arbeit, sowie ihrer fantastischen Einarbeitung in meinen ersten Wochen im PCR-Labor danken.

Auch möchte ich Frau Prof. Dr. Barbara Gärtner meinen Dank aussprechen, die sich die Zeit genommen hat mir die Grundlagen des wissenschaftlichen Schreibens näher zu bringen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

## Zusammenfassung

Das vermehrte Auftreten von Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen stellt eine zunehmende Herausforderung für unser Gesundheitssystem dar. Der Großteil dieser Erkrankungen wird durch *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) ausgelöst, ein Bakterium, welches sich häufig über nosokomiale Infektionen verbreitet. Von besonderem Interesse sind hierbei einige im Verlauf der letzten Jahre zunehmend vorkommende Isolattypen, welche meist zu schwerer verlaufenden *C. difficile* Infektionen (CDI) führen. Diese werden in der Fachliteratur als „hypervirulente Ribotypen (RTs)“ bezeichnet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Verwandtschaftsbeziehungen unter einer Auswahl an Isolaten relevanter RTs darzustellen und die genetische Vernetzung dieser, sowie ihre Tendenz zum Clustering am Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) und auf bundesdeutscher Ebene zu erfassen. Hierbei wurde sich vor allem auf RTs konzentriert, welche bereits in der Vergangenheit mit schwer verlaufenden CDI in Verbindung gebracht werden konnten (z.B. RT027, RT176). Parallel hierzu wurde der Großteil der untersuchten Isolate einer Resistenztestung unterzogen, um Einblicke in die Tendenz der RTs zur Ausbildung von im klinischen Alltag relevanten Antibiotikaresistenzen zu gewinnen. Durch diese Surveillance-Maßnahme konnten die Ausbreitung der untersuchten Stämme erfasst und Aussagen über die Wirksamkeit von Hygienemaßnahmen getroffen werden. Die Typisierung erfolgte mittels „multi-locus-variable-number-tandem-repeat-analysis“ (MLVA).

Insgesamt wurden 234 Isolate der RTs RT015, RT027, RT046, RT106 und RT176 vom UKS und externen Einsendern aus Deutschland analysiert. Zusätzlich wurden für alle aus dem UKS stammenden Isolate, welche höhergradige Verwandtschaftsbeziehungen, also eine Summed-Tandem-Repeat-Differenz (STRD) von  $\leq 5$  zueinander aufwiesen, die Verlegungshistorien der entsprechenden Patienten während ihrer Behandlung ausgewertet. Hierdurch konnten Rückschlüsse auf potentielle Übertragungswege gezogen werden. Insgesamt erwiesen sich 146 der typisierten Isolate als verwandt (STRD  $\leq 10$ ). Diese ließen sich für Deutschland, bzw. das UKS teilweise zu aus mehreren genetisch ähnlichen Isolaten bestehenden Clustern zusammenfassen. Für 202 der typisierten Isolate (202/234) erfolgte eine Resistenztestung gegenüber den Antibiotika Clarythromycin, Rifampicin, Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin. Hierbei fielen weit verbreitete Resistenzen gegenüber Clarithromycin und Moxifloxacin auf. Weiter lagen in mehreren Fällen Resistenzen gegenüber Rifampicin vor. Die Auswertung der Verlegungshistorien bestätigte, dass fulminant verlaufende CDIs häufig auf nosokomiale Geschehen zurückzuführen sind. Gleichzeitig fanden sich Hinweise darauf, dass auch ambulante Übertragungen und Übertragungen durch teilstationäre Behandlungen eine relevante Rolle bei der Verbreitung von hypervirulenten RTs spielen. Dies lässt ein zukünftiges Monitoring des Erregers auch in diesen Settings als sinnvoll erscheinen.

## Abstract

The increased occurrence of antibiotic-associated dysentery is an important challenge for our health system. The majority of these diseases are caused by *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), a bacterium common cause for nosocomial infections. Certain lineages of *C. difficile* which increasingly occurred over the last few years and usually cause more severe infections are of special interest. The literature is referring to these as „hypervirulent ribotypes (RTs)“.

The aim of this thesis was to show relationships among a selection of isolates of clinically relevant RTs and to record the genetic similarities of these, as well as their tendency towards clustering at the Saarland University Hospital (UKS) and at state level. The focus was put mainly on RTs which, in the past, had been associated with fulminant CDIs (e.g RT027, RT176). At the same time, the majority of the isolates were examined in order to recognize antibiotic resistances of clinical relevance in patient care, like resistances against antibiotics used for therapy. This surveillance measure allowed us to record the distribution of the RTs examined and to judge the effectiveness of hygienic measures. The analyses were done by using multi-locus-variable-number-tandem-repeat-analysis (MLVA).

A total of 234 isolates from the RTs RT015, RT027, RT046, RT106 and RT176 were analyzed. All isolates were provided by the UKS and by other hospitals from Germany. In addition, all transfer histories of patients infected by isolates which showed a close genetic relationship by MLVA were evaluated to identify potential transmission routes.

A total of 146 of the typed isolates were found to be more closely related, which means that their summed-tandem-repeat-difference (STRD) was five or lower. For both, the UKS and Germany, these isolates could be organized into clusters of several isolates which showed high genetic similarities.

202 of the typed isolates (202/234) were tested for resistance to the antibiotics clarithromycin, rifampicin, metronidazole, vancomycin and moxifloxacin. These tests identified high resistance rates for clarithromycin and moxifloxacin. In addition, moderate resistances rates for rifampicin were found. The evaluation of the transfer histories confirmed that CDIs with a fulminant progression were often traced back to nosocomial events. At the same time, indications were found suggesting that outpatient transmissions and transmissions through day-care treatment might be also relevant for the dissemination of hypervirulent RTs. These findings indicate that a future monitoring of these patient groups will support a valid evaluation of the epidemiologic situation of *C. difficile* in Germany.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	3
Zusammenfassung .....	4
Abstract .....	5
Tabellenverzeichnis .....	9
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1. Einleitung .....	12
1.1. Relevanz und Geschichte .....	12
1.2. Epidemiologie .....	14
1.1.1 Prävalenz .....	14
1.1.2 Risikofaktoren und Übertragung .....	15
1.2 Pathogenese .....	16
1.2.1 Toxine .....	16
1.2.2 Sporulationstendenz .....	16
1.2.3 Pathogenitätsfaktoren .....	16
1.3 Klinik .....	17
1.4 Therapie und Prävention .....	19
1.5 Diagnostik .....	19
1.5.1 Toxinnachweis .....	20
1.5.2 Kultur .....	20
1.5.3 PCR-Ribotypisierung .....	20
1.5.4 Multiple-Locus-Variable-Number-Tandem-Repeat-Analyse (MLVA) .....	21
1.5.5 Ganzgenomsequenzierung .....	22
1.6 Ziele der Arbeit .....	23
2. Material und Methoden .....	24
2.1 Material .....	24
2.1.1 Chemikalien .....	24
2.1.2 Verwendete Primer .....	24
2.1.3 Verbrauchsgegenstände .....	25
2.1.4 Laborgeräte .....	26
2.1.5 Software .....	26
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Einschlusskriterien Proben/Patienten .....	27
2.2.2 Probensammlung und Datenerhebung .....	27
2.2.3 Anzucht von <i>C. difficile</i> und DNS-Gewinnung .....	27
2.2.4 Resistenztestungen .....	28
2.2.5 Multi-Loci-Variable-Number-Tandem-Repeat-Analysis (MLVA) .....	28

2.2.6 Datenauswertung und Clustering.....	30
3. Ergebnisse .....	31
3.1 Durchgeführte Analysen.....	31
3.2 RT015 (intern) .....	32
3.3 RT027 (intern) .....	34
3.3.1 Isolate mit einer STRD $\leq 5$ .....	35
3.4 RT046 (intern) .....	42
3.5 RT106 (intern) .....	44
3.6 RT027 (extern) .....	45
3.6.1 RT027 .....	46
3.7 RT176 (gesamt) .....	47
3.7.1 RT176 .....	48
3.8 Zusammenfassung der MLVA Analysen und der Verlegungshistorien.....	49
3.9 Resistenztestungen .....	50
4. Diskussion.....	51
4.1 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte der am UKS gesammelten Isolate.....	51
4.1.1 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT015.....	53
4.1.2 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT027 .....	54
4.1.3 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT046.....	55
4.1.4 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT106.....	56
4.2 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte der von extern stammenden Isolate.....	57
4.2.1 RT027 .....	57
4.2.2 RT176 .....	58
4.3 Antibiotikaresistenz .....	59
4.4 Limitierungen der Studie .....	61
4.5 Fazit.....	61
5. Anhang.....	63
6. Literaturverzeichnis .....	65

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Mikroskopische Darstellung von <i>Clostridioides difficile</i> in der Gramfärbung ...	12
<b>Abbildung 2:</b> links: endoskopische Darstellung der Pseudomembranösen Kolitis, rechts: Situs Abdomen, Darstellung des toxischen Megakolons.....	13
<b>Abbildung 3:</b> Endoskopische Darstellung der pseudomembranösen Kolitis .....	18
<b>Abbildung 4:</b> MLVA aller 22 RT015 von aus dem UKS stammenden Isolaten.....	32
<b>Abbildung 5:</b> Verlegungshistorie der RT015 positiven Patienten RT015/7 und RT015/13 in den Jahren 2014 und 2015 am UKS.....	33
<b>Abbildung 6:</b> MLVA aller 47 von intern stammenden RT027 Isolaten .....	34
<b>Abbildung 7:</b> Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 1 zusammengefasst wurden.....	36
<b>Abbildung 8:</b> Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 2 zusammengefasst wurden.....	38
<b>Abbildung 9:</b> Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 3 zusammengefasst wurden.....	40
<b>Abbildung 10:</b> Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 4 zusammengefasst wurden.....	41
<b>Abbildung 11:</b> MLVA aller 10 intern stammenden RT046 Isolaten. ....	42
<b>Abbildung 12:</b> Verlegungshistorie der RT046 positiven Patienten.....	43
<b>Abbildung 13:</b> MLVA aller 6 von intern stammenden RT106 Isolaten .....	44
<b>Abbildung 14:</b> MLVA aller 119 RT027 Isolate von externen Einsendern .....	45
<b>Abbildung 15:</b> Geografische Verteilung der von extern stammenden RT027-Isolaten.....	46
<b>Abbildung 16:</b> MLVA aller 30 RT176 Isolate von internen und externen Einsendern.....	47
<b>Abbildung 17:</b> Geografische Verteilung der RT176-Isolate .....	48

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien .....	24
<b>Tabelle 2:</b> zur MLVA verwendete Primer.....	24
<b>Tabelle 3:</b> verwendete Verbrauchsgegenstände .....	25
<b>Tabelle 4:</b> verwendete Laborgeräte .....	26
<b>Tabelle 5:</b> verwendete Software .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Ansatz 1(Loci: AHG) .....	28
<b>Tabelle 7:</b> Ansatz 2 (Loci: BF).....	29
<b>Tabelle 8:</b> Ansatz 3 (Loci: CE) .....	29
<b>Tabelle 9:</b> Konditionen des PCR-Cycler.....	30
<b>Tabelle 10:</b> erfolgte Analysen .....	31
<b>Tabelle 11:</b> Resistenzverhalten von sämtlichen getesteten <i>C. difficile</i> -Isolaten .....	50
<b>Tabelle 12:</b> Darstellung der höherverwandten Isolate, bei welchen nosokomiale Ereignisse wahrscheinlich oder unwahrscheinlich waren. ....	52
<b>Tabelle 13:</b> Einsenderstationen von aus dem UKS stammenden Isolaten .....	63
<b>Tabelle 14:</b> Zusammenfassung der MLVA-Typisierung.....	64

## Abkürzungsverzeichnis

<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
cd	Cluster of differentiation
CDAD	<i>Clostridioides difficile</i> assoziierte Diarrhoe
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> Infektionen
CLO-AGAR	<i>Clostridium difficile</i> Agar
ClosER	Three year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent <i>Clostridium difficile</i> ribotypes
DNS	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESCMID	European society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCLID	European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of <i>Clostridium difficile</i> infection in hospitalized patients with diarrhea
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
ISR	Intergenetic spacer regions
i.v.	Intravenös
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MLST	Multi-Locus-Sequence-Typing
MLVA	Multi-Loci-Variable-Number-Tandem-Repeat-Analysis
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NAP1	nucleosome assembly protein 1
NRW	Nordrhein-Westfalen
NRZ	Nationales Referenzzentrum
paLoc	Pathogener Locus
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Puls-Feld-Gelelektrophorese
p.o.	Per os
RFPL	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen
RT	Ribotyp
<i>slpAST</i>	Surface layer protein A sequence typing
SNVs	Single nucleotide-variants

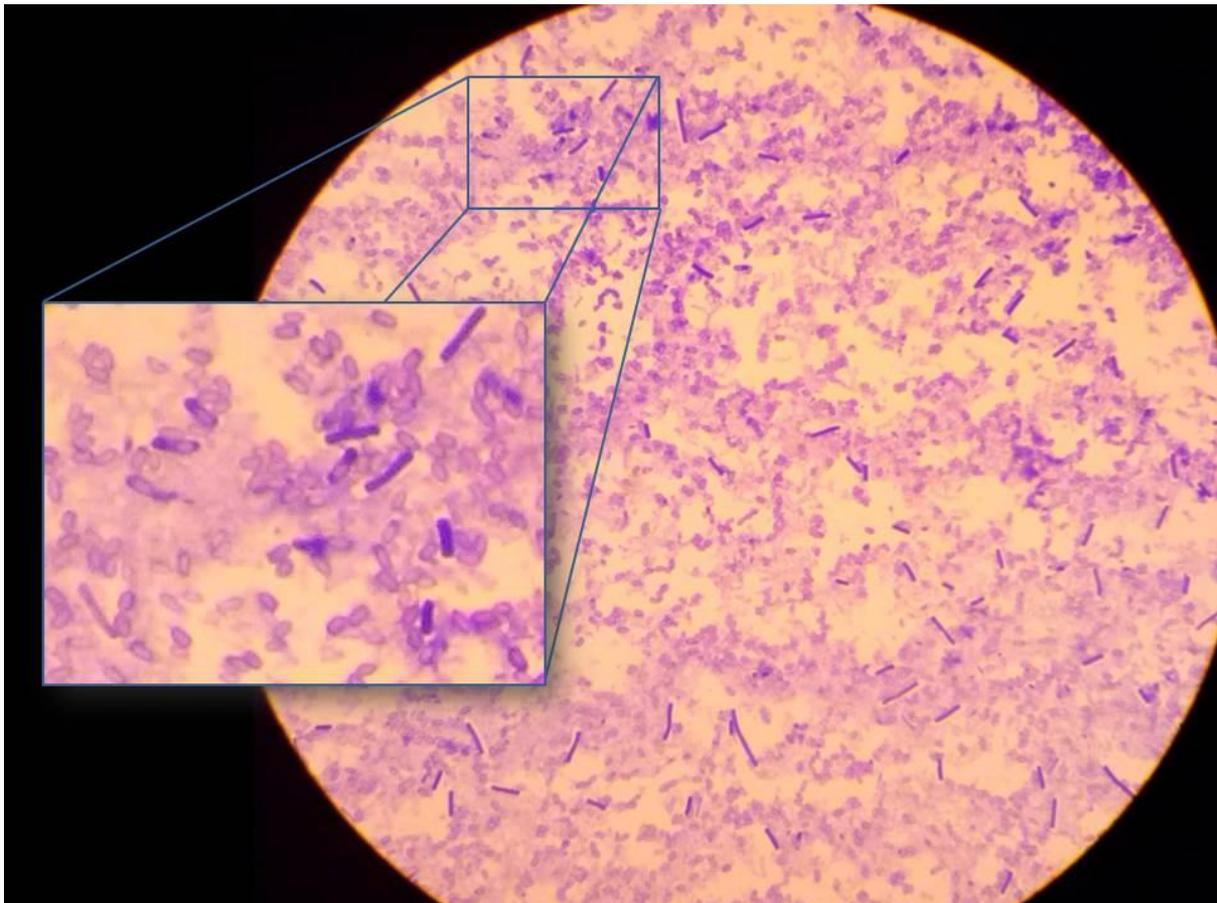
STRD	Summed tandem-repeat difference
<i>tcdA</i>	<i>Clostridioides difficile</i> -toxino-gene A
<i>tcdB</i>	<i>Clostridioides difficile</i> -toxino-gene B
<i>tcdC</i>	<i>Clostridioides difficile</i> -toxino-gene C
<i>tcdR</i>	<i>Clostridioides difficile</i> -toxino-gene R
TcdA	<i>Clostridioides difficile</i> Toxin A
TcdB	<i>Clostridioides difficile</i> Toxin B
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes

# 1. Einleitung

## 1.1. Relevanz und Geschichte

*Clostridioides difficile* (früher *Clostridium difficile*) [74] ist ein obligat anaerobes, grampositives Stäbchenbakterium, welches zur Bildung umweltresistenter Sporen in der Lage ist. Das Bakterium ist ubiquitär verbreitet und kann vor allem im Darm von Mensch und Tier nachgewiesen werden [2] (Abb.1).

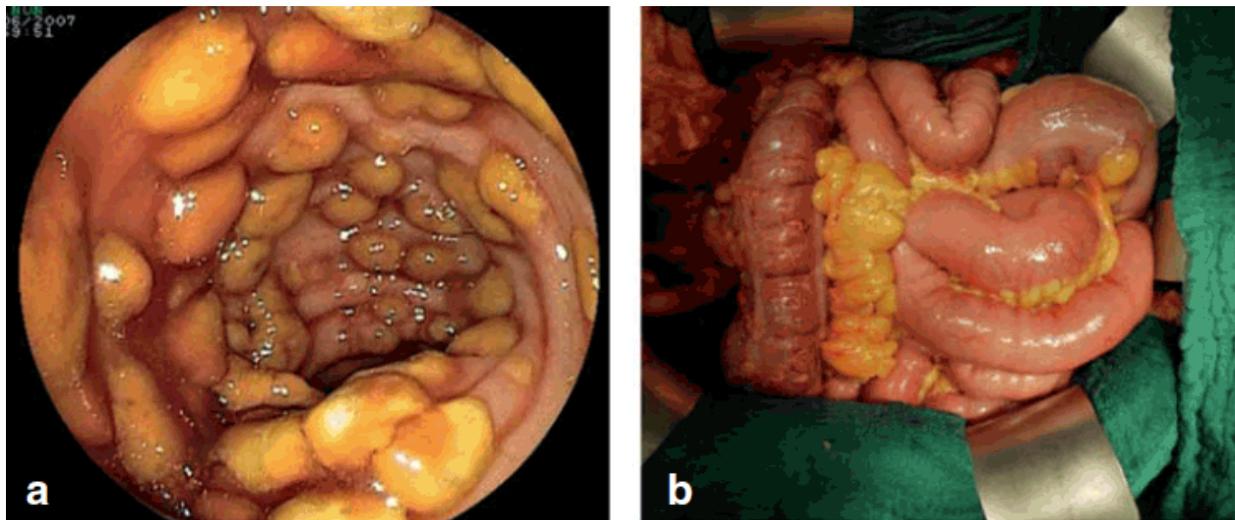
Weiter sind einige Isolattypen in der Lage, Toxine zu bilden. Diese sind für die meist gastrointestinal assoziierten Krankheitsbilder verantwortlich [45,88,110].



**Abbildung 1:** Mikroskopische Darstellung von *Clostridioides difficile* in der Gramfärbung (Quelle: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Aufnahme: Anna Nimmesgern)

Nachdem *C. difficile* 1935 erstmalig aus dem Stuhl von Säuglingen isoliert und als apathogen eingestuft wurde, erhielt es wegen der anspruchsvollen Anzucht den Namen *Bacillus difficilis* [50]. Die Erstbeschreibung von *C. difficile* als Auslöser der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe erfolgte 1978, als bei Patienten unter Clindamycin-Therapie gehäuft schwere Durchfallerkrankungen auftraten [125]. In den Folgejahren konnte ein Zusammenhang zwischen der Besiedelung mit *C. difficile* und der Ausbildung von teils

fulminanten Krankheitsbildern, wie der pseudomembranösen Kolitis (Abb. 2) und dem toxischen Megakolon hergestellt werden [8].



**Abbildung 2:** links: endoskopische Darstellung der Pseudomembranösen Kolitis, rechts: Situs Abdomen, Darstellung des toxischen Megakolons (Quelle: C. Lübbert, J. Endres, L. von Müller (2014) Deutsches Ärzteblatt, 111:723-31)

*C. difficile*-assoziierte Erkrankungen, wie die *C. difficile* assoziierte Diarrhoe (CDAD) bergen ein immenses nosokomiales Risikopotential [53,85,124]. In einer 2010 in 89 deutschen Krankenhäusern durchgeführten Studie wurde *C. difficile* bei nosokomialen Infektionen fast doppelt so häufig wie MRSA als Ursache erfasst [87]. Die mit *C. difficile* assoziierten Krankheitsbilder reichen von einer leichten, wässrigen Diarrhoe bis hin zu schwerwiegenden Komplikationen wie der pseudomembranösen Kolitis, dem toxischen Megakolon (Abb. 2) oder einer durch Darmperforation bedingten Sepsis [44,69]. Oftmals benötigen Patienten mit einer *C. difficile* Infektion (CDI) eine intensivere Betreuung und neigen zu verlängerten Krankenhausaufenthalten, so wie einer erhöhten Sterblichkeit [139]. Dies stellt das Gesundheitssystem vor stetig wachsende Aufgaben. In den USA betragen die jährlichen Gesundheitsausgaben im Zusammenhang mit CDI um das Jahr 2002 jährlich mehr als 1,1 Milliarden US-Dollar [72]. In Europa wurden sie um das Jahr 2006 auf ca. 3 Milliarden Euro geschätzt [70]. In diesem Zusammenhang gewinnen vor allem die sogenannten „hypervirulenten“ Ribotypen (RT) immer mehr an Bedeutung. Diese bergen ein erhöhtes pathogenes Potential und führen häufiger zu fulminanten Krankheitsverläufen [137]. Seit 2003 wurde vor allem in Nordamerika zunehmend von einer erhöhten Inzidenz, schwerer verlaufenden CDI mit erhöhter Mortalität und Ausbrüchen mit einem neuen „hypervirulenten“ Isolotyp, dem RT027 berichtet [70]. In Deutschland wurde der RT027 erstmals bei Ausbrüchen in Trier und Stuttgart beschrieben [64,141]. Momentan geht man von 125 in Europa verbreiteten RTs aus (Stand 2016) [29]. Auffallend ist, dass auch in Deutschland die

Anzahl an schweren, intensivpflichtigen CDI mit Komplikationen im Behandlungsverlauf zunimmt [111].

## 1.2. Epidemiologie

### 1.1.1 Prävalenz

Es wird geschätzt, dass etwa 5 % der erwachsenen Bevölkerung Träger von *C. difficile* sind [9]. Bei Patienten einer stationären Einrichtung und Pflegeheimbewohnern lässt sich hingegen eine weit höhere Anzahl besiedelter Menschen nachweisen [62,85,130]. Sind bei Krankenhausaufnahme ca. 5% der Patienten Träger von *C. difficile* [73], so steigt diese Zahl, in Abhängigkeit von der Dauer des Aufenthaltes, der Schwere der Grunderkrankung und Antibiotikaeinnahmen im Laufe des Aufenthaltes auf 15% bis 30% an [5,9,10]. Während die Mehrzahl der bei Aufnahme *C. difficile* positiven Patienten asymptomatisch bleiben, entwickeln 15% bis 71% der Patienten, welche den Erreger erst im Krankenhaus erwerben, eine behandlungsbedürftige CDI [10,85]. Obwohl bei Kindern vor dem zweiten Lebensjahr ebenfalls eine hohe Besiedlungsrate mit *C. difficile* vorliegt, ist dieser Umstand bei epidemiologischen Erhebungen zu vernachlässigen, da nur in den seltensten Fällen Erkrankungen auftreten [112]. Es wird geschätzt, dass 15%-20% aller Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen und >95% aller Fälle der pseudomembranösen Kolitis auf *C. difficile* zurückgehen [9]. Weitere häufige Erreger von Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen stellen Wurmspezies [140] oder das Bakterium *Staphylococcus aureus* [98] dar.

Die in den Jahren 2012 und 2013 durchgeführte europaweite, multizentrische, prospektive, biannuale Studie zur Punktprävalenz von CDI bei stationären Patienten mit Durchfall (European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhea), oder kurz EUCLID-Studie, identifizierte 125 in Europa verbreitete RTs. Davon wiesen der RT027 mit 19%, die RT001/RT072 mit je 11% und der RT014 mit 10% die höchsten Prävalenzen auf. Insgesamt wurden 1196 Isolate aus 482 Krankenhäusern in 20 europäischen Ländern untersucht, wobei über 400 Isolate von Deutschland beigesteuert wurden [29].

Parallel hierzu ließen sich auch in Deutschland ein Anstieg an schweren CDI, sowie ein vermehrtes Auftreten von hypervirulenten RTs nachweisen [4,59,64].

Sollten sich die Trends der letzten Jahre fortsetzen, so ist anzunehmen, dass hypervirulente RTs, wie der RT027 [70], oder ähnlich pathogene RTs wie z.B. der RT078 [47], der RT176 [95] oder der in den USA weit verbreitete RT106 [22,113], zukünftig weiter von hoher klinischer Relevanz sein werden [64,70].

### 1.1.2 Risikofaktoren und Übertragung

Patienten scheiden den Keim in seiner Sporenform mit dem Stuhl aus. Dadurch kommt es zu einer ständigen Kontamination des Patienten und seiner direkten Umgebung. Hieraus resultiert eine erhöhte Gefahr fäkal-oralen Besiedelungen bisher *C. difficile* negativer Personen. Dieser Umstand wird durch die hohe Temperatur- und Desinfektionsmittelunempfindlichkeit der Sporen (sporozytische Desinfektionsmittel werden nicht routinemäßig eingesetzt) noch verstärkt [53,124]. Dementsprechend kann das in der direkten Umgebung betroffener Patienten tätige medizinische Personal einen bedeutenden Vektor darstellen [85].

Die Ingestion des Erregers alleine führt in der Regel nicht zur Ausbildung einer CDI. Erst durch ein auslösendes Ereignis mit einhergehender Schädigung des Darmmikrobioms steigt das Risiko, Symptome zu entwickeln, an. Den Hauptrisikofaktor stellt hierbei die Gabe von Antibiotika dar. Als besonders relevant gelten die sogenannten 4C-Antibiotika. Diese umfassen Clindamycin, Cephalosporine, Aminopenicilline mit Betalaktamaseinhibitor und Fluorchinolone. Grundsätzlich können aber alle Antibiotikaklassen eine CDI auslösen [99]. Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer CDI gelten die Dauer der Unterbringung in einem Krankenhaus oder Pflegeheim, gastrointestinale Grundkrankheiten, hohes Alter, Immunsuppression, die Einnahme von Protonenpumpenhemmern und nicht-steroidale Antiphlogistika. [34] Obwohl die meisten Fälle von CDI bei stationär betreuten Patienten auftreten, ließ sich in der jüngeren Vergangenheit das vermehrte Auftreten von ambulant erworbenen CDI bei jungen, ansonsten gesunden Patienten ohne offensichtliche Risikofaktoren feststellen [71].

Die Mortalität der CDAD beträgt 1% bis 2%. Betrachtet man allerdings nur die Fälle mit schwerem Verlauf (z.B. toxisches Megakolon, pseudomembranöse Kolitis), so kann sie auf bis zu über 30% ansteigen [102].

## 1.2 Pathogenese

### 1.2.1 Toxine

Einige *C. difficile* Stämme sind in der Lage, Toxine zu bilden. Man unterscheidet Toxin A (TcdA, Enterotoxin) und Toxin B (TcdB, Zytotoxin). Beide Toxine wirken direkt im Gastrointestinaltrakt. TcdA wirkt hierbei permeabilitätserhöhend und proinflammatorisch [110], TcdB wirkt zytotoxisch und erhöht dadurch ebenfalls die intestinale Permeabilität [88]. Während Toxin A seine Wirkung primär über die Induktion der Enzyme Adenylat- und Guanylatzyklase entfaltet, führt Toxin B zu einer direkten Zerstörung der Darmzellen. Weiter wird Toxin B als das für Abstand potentere der beiden Toxine angesehen [110]. Die Fähigkeit zur Bildung von Toxin B gilt folglich auch als der für die Entwicklung einer CDI entscheidendere Faktor [110]. Zusätzlich sind manche Stämme zur Bildung eines weiteren, des so genannten binären Toxins (kodiert durch die Gene *tcdA*, *tcdB*) in der Lage. Die Prävalenz dieser Stämme wird auf ca. 6% geschätzt [23,46]. Das binäre Toxin führt über Aktindepolymerisation zum Zelltod und einer verstärkten bakteriellen Adhärenz. „Hypervirulente“ Stämme fallen häufig durch die Bildung des binären Toxins auf [45]. Stämme, welche keine der drei Toxine bilden, können als apathogen angesehen werden [90].

### 1.2.2 Sporulationstendenz

Als Anpassungsreaktion auf seine Umgebung ist das Bakterium dazu in der Lage, in eine Sporenform überzuwechseln. Diese ermöglicht ihm ein ubiquitäres Vorkommen und das Überdauern verschiedenster Widrigkeiten, vor allem aber das Überleben außerhalb eines Organismus unter aeroben Bedingungen. Weiter gestattet die Sporenform die Kontamination der direkten Umgebung von *C. difficile* ausscheidenden Patienten. Wie weiter oben beschrieben, erhöht dieser Umstand das Infektionspotential des Keimes vor allem bei stationären Klinikaufenthalten enorm [2,53,124].

Obwohl die genauen Auslöser der Sporulation vegetativer *C. difficile* Zellen noch nicht abschließend identifiziert werden konnten, geht man von unspezifischen Stressfaktoren, wie z.B. Nahrungsmangel aus [100].

### 1.2.3 Pathogenitätsfaktoren

Wichtig für die Pathogenität des Keimes ist ein fünf Gene umfassender Abschnitt im sogenannten pathogenen Lokus (PaLoc). Dieser enthält die genetische Information zur Bildung der oben erwähnten Toxine. Die Sequenzierung des Genoms ergab, dass sich 11% der genetischen Informationen von *C. difficile* auf mobilen Genabschnitten befinden. Dies könnte genetische Anpassungen hinsichtlich Pathogenität und Resistenzen begünstigen [117]. Die Expression der Toxingene wird weiterhin durch Regulatoren beeinflusst, die wie *tcdR* die Expression fördern, oder wie *tcdC* diese hemmen [23,82]. Die

Aktivität dieser Regulatoren entscheidet zusammen mit der Sporulationstendenz maßgeblich über die Virulenz des betreffenden Stammes. Letztere wird bei *C. difficile* über den Transkriptionsregulator „Spo0A“ bestimmt. Dessen Aktivität wird wiederum über mehrere Histidinkinasen reguliert, ein Mechanismus, der sich bei einem Großteil der *Bacillus* und *Clostridium* Spezies findet [51,121].

Hypervirulente RTs, wie der RT027, zeichnen sich häufig durch die Produktion des binären Toxins und/oder die erhöhte Produktion der Toxine A und/oder B aus [13]. Isolate des RT027 produzieren auf Grund einer 18 Basenpaare (bp) umfassenden Deletion im *tcdC*-Gen eine 16- bis 23-fach höhere Toxinmenge, welche als Grund für die gesteigerte Pathogenität dieses RTs vermutet wird [137].

Weiter werden hypervirulente Stämme vermehrt mit Antibiotikaresistenzen in Verbindung gebracht [42].

Die Verbreitungsmuster von Stämmen mit gesteigerter Pathogenität, sowie ihr Resistenzprofil sind von großem Interesse für jede *C. difficile* betreffende epidemiologische Untersuchung.

### **1.3 Klinik**

Wie weiter oben beschrieben, ist *C. difficile* per se kein obligat pathogener Mikroorganismus. Nur Toxin-produzierende Stämme führen zur klinischen Symptomatik. Das Bakterium gelangt in der Regel durch orale Aufnahme der Sporen in den Intestinaltrakt, wo es sich unter günstigen Verhältnissen zu seiner vermehrungsfähigen Form entwickelt. Sollten die entsprechenden genetischen Anlagen vorhanden sein, ist diese zur Toxinbildung in der Lage. Normalerweise schützt die natürliche Darmflora vor einer solchen Besiedelung des Intestinaltraktes mit der vegetativen Form dieses Bakteriums. Falls diese allerdings, z.B. durch eine antibiotische Therapie, gestört sein sollte, findet *C. difficile* in der daraus resultierenden Dysbiose ein ideales Habitat, um sich in seiner vegetativen Form auszubreiten [116].

Bei Toxin-bildenden Isolaten werden die in das Darmlumen sezernierten Toxine von den Epithelzellen der Colonmukosa aufgenommen. Sowohl TcdA als auch TcdB verursachen über die Auflösung von „tight junction-“ Strukturen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Hieraus resultiert ein teils immenser Flüssigkeitsverlust. In einigen Fällen kann es zudem zu Blutungen kommen [17,109]. Des Weiteren wird die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und weiterer proinflammatorischer Interleukine induziert, welche erheblich zur folgenden Entzündungsreaktion und Pseudomembranbildung beitragen (Abb. 3) [17].



**Abbildung 3:** Endoskopische Darstellung der pseudomembranösen Kolitis (Quelle: Lübbert C., John, E., Müller, L., (2014) Deutsches Ärzteblatt, 111: 723-31)

Klinisch manifestiert sich eine CDI meist als akute, wässrige Diarrhoe, welche oft als „von breiiger Konsistenz mit fauligem Geruch“ beschrieben wird [11]. Begleitend können Allgemeinsymptome wie Unterbauchschmerzen und Fieber auftreten [136].

In seltenen Fällen kann eine CDI zu Komplikationen wie der pseudomembranösen Kolitis [44], dem toxischen Megakolon, einem paralytischen Ileus oder Darmperforationen mit einhergehender Sepsis führen [69]. Diese schweren Verlaufsformen gehen häufig mit umfassenden Darmoperationen, Intensivpflichtigkeit oder dem Tod des Patienten einher. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives nach Absetzen der oralen Antibiose beträgt etwa 20% und steigt nach jedem Rezidiv weiter an [10,61,86,115].

## 1.4 Therapie und Prävention

Der erste Schritt in der CDI-Therapie besteht darin, die ursprüngliche Antibiose des Patienten zu unterbrechen, da diese durch Schädigung der Mikroflora des Darmes maßgeblich dazu beiträgt, dass sich *C. difficile* in seiner vegetativen Form auszubreiten vermag. Weiter empfehlen die aktuellen Leitlinien die orale Gabe von Vancomycin zur Eradikation der vegetativen *C. difficile* Population. Metronidazol (per os) findet aktuell keine Verwendung mehr in der Primärmedikation und wird nur noch supportiv verwendet [80,132]. Für Patienten mit trotz gezielter antibiotischer Therapie wiederkehrenden Rezidiven ist die Transplantation von fäkalen Mikrobiota möglich [83]. Diese stellt eine potente Alternative zu antibiotikabasierenden Rezidivprophylaxen dar [19].

Außerdem muss im Verlauf der, meist stationären, Behandlung von CDI-Patienten stark auf Hygiene und die Vermeidung der Ansteckung weiterer Patienten geachtet werden. Es wird empfohlen, symptomatische Patienten in ein privates Zimmer mit eigener Toilette zu verlegen [83]. Die Kontakte zu Patienten mit begründetem Verdacht auf eine CDI sollten bis zum Vorliegen der Ergebnisse, auf ein Minimum begrenzt werden. Sollten mehr Patienten als Einzelzimmer vorhanden sein, müssen inkontinente Patienten bei der Zimmervergabe bevorzugt werden. Die Isolierung sollte bis mindestens 48 Stunden nach Abklingen der Durchfälle aufrechterhalten werden. Das gesamte in die Behandlung eingebundene Personal muss dazu angehalten werden, im Umgang mit den Patienten Handschuhe und langärmelige Kittel zu tragen. Zur Wertigkeit von Kopfhäuben und Mundschutz liegen laut der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) bisher keine Studien vor, die das Tragen solcher Schutzausrüstungskomponenten empfehlenswert erscheinen lassen [126]. Generell sollten aufgrund der Sporen bei der Handreinigung Wasser und Seife alkoholhaltigen Desinfektionsmitteln vorgezogen werden. Patienten sollten zu regelmäßigem Händewaschen und Duschen angehalten werden, um die Sporenlast auf Haut und Händen zu reduzieren. Ebenso sollte die Wäsche der Betroffenen regelmäßig und desinfizierend gewaschen werden [126]. Die Händedesinfektion mit herkömmlichen Desinfektionsmitteln hat zwar keinen positiven Effekt auf die Rate an CDI, allerdings sollte sie dennoch regelmäßig durchgeführt werden, da sie diese Rate auch nicht negativ beeinflusst, gleichzeitig aber die Übertragung weiterer, potentiell infektiöser, Mikroorganismen reduziert [18]. Auch die feste Zuordnung von Personal zu CDI-Patienten sollte erwogen werden, um die Ausbreitungswahrscheinlichkeit innerhalb der Station zu reduzieren [83].

## 1.5 Diagnostik

Da eine asymptomatische Besiedlung mit *C. difficile* keinen Krankheitswert hat, ergibt sich die Indikation zur speziellen Diagnostik bei Patienten mit begründetem Verdacht auf eine CDI in erster Linie aus dem klinischen Bild. Die gezielte Diagnostik von *C. difficile* zielt meist auf den

Nachweis des Erregers, seiner Antigene oder seiner Toxine aus Stuhlproben ab. Hierbei sollte sich standartmäßig an den von Crobach *et. al.* [25,26] aufgestellten und von der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID) empfohlenen Diagnostik-Leitlinien für *C. difficile* orientiert werden. Diese sehen erst einen Suchtest mit hoher Sensitivität (beispielsweise den Nachweis von *C. difficile* DNS mittels PCR) und eine anschließende Bestätigung mittels Toxinnachweis vor [25,26]. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Verfahren kurz vorgestellt.

### **1.5.1 Toxinnachweis**

Das Zytotoxizitätsassay nutzt die (überwiegend durch Toxin B verursachte) Schädigung des Zytoskelettes von Indikatorzellen (beispielsweise Vero oder Hep2 Zellen) zum Toxinnachweis [26,104]. Dies lässt sich unter dem Phasenkontrastmikroskop als Abrundung der Zellen erkennen. So kann das Toxin bereits im Picogramm-Bereich nachgewiesen werden [12]. Das Zytotoxizitätsassay verfügt über eine Sensitivität und Spezifität von je >98% und stellt damit ein sehr effizientes Instrument zum Toxinnachweis dar [97]. Große Nachteile des Verfahrens sind der hohe technische Anspruch und die benötigte Zeit (24 bis 48 Stunden). Dementsprechend ist es für die Laborroutine nicht geeignet [16]. Es wird daher in der Regel serologischen Testverfahren der Vorzug gegeben. Beim Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), werden die Toxine innerhalb weniger Stunden im nativen Stuhl nachgewiesen. Die Spezifität wird mit 95-100% und die Sensitivität mit 65-85% angegeben [21,49,108]. Gründe für falsch negative ELISA-Verfahren können in Mängeln bei Lagerung oder Transport, bzw. der geringen Stabilität der Toxine bei Raumtemperatur liegen [28].

### **1.5.2 Kultur**

Für den kulturellen Nachweis wird in der Literatur eine Sensitivität von >95% angegeben [120]. Die Anzucht des Keimes erfolgt auf Selektivnährmedien unter strikt anaeroben Bedingungen. Der typische Geruch, das Wachstum der Kolonien und der mikroskopische Nachweis erlauben bereits die phänotypische Identifizierung von *C. difficile* [120]. Eine Bestätigung kann z.B. mittels Massenspektrometrie erfolgen [40,77]. Zum Toxinnachweis sind ELISA-Verfahren oder eine Toxin-PCR möglich [12,97]. Die Kultur bildet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, wie etwa eine Resistenztestung oder Genotypisierung.

### **1.5.3 PCR-Ribotypisierung**

Vor allem in Europa hat sich als Goldstandard der Typisierungsverfahren die PCR-Ribotypisierung etabliert [65]. Hierzu werden die so genannten „intergenic spacer Regionen“ (ISR) amplifiziert [122]. Bei den ISR handelt es sich um nicht kodierende DNS-Abschnitte zwischen den Operons (kodierende Abschnitte) in Genen für die ribosomale RNA [122]. Bei der Ribotypisierung werden die 16s und 23s ISR vervielfältigt und per

Gelelektrophorese aufgetrennt. Die so entstehenden Bandenmuster lassen eine Zuordnung des Isolats zu einem Ribotypen zu [14].

Ähnliche Methoden wie z.B. die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) nutzen die gezielte Sequenzierung einzelner Gene [76]. An Hand welcher ein individuelles Profil der Probe erstellt und mit bestehenden Datenbanken verglichen werden kann [48].

#### **1.5.4 Multiple-Locus-Variable-Number-Tandem-Repeat-Analyse (MLVA)**

Die Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analyse (MLVA) nutzt die so genannten „repeat“ Regionen innerhalb des *C. difficile* Genoms. Hierbei handelt es sich um DNS-Regionen, welche aus Wiederholungen bestimmter DNS-Motive bestehen und in meist nicht kodierenden Regionen des Genoms vorkommen [78]. Diese sich unterscheidenden Regionen werden als „Variable-Number-Tandem-Repeats“ (VNTR) bezeichnet [129]. Durch diese Eigenschaften wurden die VNTR-Regionen zum Ansatzpunkt der modernen, auf Genetik basierenden, Verwandtschaftsdiagnostik [46]. Durch die Sequenzierung von bakteriellen Genomen wurde klar, dass das Vorkommen von VNTR-Regionen nicht auf das menschliche Genom beschränkt ist. Weiterhin konnte man nachweisen, dass Variationen dieser Regionen oftmals das genomische Korrelat zu phänotypischen Anpassungsreaktionen darstellen. Dies erlaubt, bei Ähnlichkeiten zu bekannten Stämmen, Rückschlüsse über die Pathogenität der analysierten Probe zu ziehen. Aus diesen Überlegungen heraus entwickelten sich VNTR-basierte Analyse Verfahren, wie die in dieser Arbeit genutzte MLVA [78,127,129].

Seit seiner Einführung wurde das MLVA-Verfahren für immer mehr Bakterienarten etabliert, wie zum Beispiel der Analyse von *Escherichia coli* (*E. coli*) [91] oder *C. difficile* [14,128].

Das Ziel der MLVA ist die Subtypisierung und Darstellung von Verwandtschaftsbeziehungen unter einzelnen Isolaten (z.B. bei Ausbruchsuntersuchungen und vermehrtem Auftreten eines RTs). Hierzu werden bestimmte Tandem-Repeat Regionen der bakteriellen Genome mittels spezieller Primer an vordefinierten Stellen miteinander verglichen (Tab. 2). Wie bereits zuvor beschrieben, kommen Tandem-Repeats in vielen nicht kodierenden Regionen des Genoms vor und zeichnen sich durch die Wiederholung bestimmter Basenpaarmuster aus. Die MLVA-Methode ermöglicht es, diese Wiederholungen an bestimmten Lesepunkten innerhalb dieser Regionen zu quantifizieren. An der Varianz zwischen den Proben lässt sich die potentielle genetische Nähe der beiden zu vergleichenden Isolate festmachen [60,91].

Vorteile des MLVA-Verfahrens liegen in der hohen Verlässlichkeit und schnellen sowie kostengünstigen Durchführbarkeit [78]. Weiter wurde ihr in einer Untersuchung von Eyre *et al.* [35] *C. difficile* betreffend eine ähnlich hohe Qualität wie dem „whole genome sequencing“, jedoch bei wesentlich geringerem Aufwand und Kosten, nachgewiesen.

Generell stellt das MLVA-Verfahren eine hoch diskriminatorische Methode zur Genotypisierung und ein effektives Werkzeug zur Subtypisierung von Stämmen mit erhöhter

epidemiologischer Relevanz dar [128]. Daher eignete sich diese Methode perfekt als Verfahren für die vorliegende Arbeit.

### **1.5.5 Ganzgenomsequenzierung**

Seit einigen Jahren wird die Ganzgenomsequenzierung (engl. *whole genom sequencing*, WGS) auch erfolgreich bei *C. difficile* Stämmen angewandt. Hierbei wird das gesamte Genom der Probe sequenziert [15,35,36]. Im Anschluss ist es möglich, Varianzen in der Basensequenz zwischen den Isolaten zu detektieren. Dies ermöglicht es, anhand von Datenbanken die einzelnen Proben zu typisieren. Die WGS Methode ist hoch diskriminativ und kann Varianzen von einzelnen Nukleotiden nachweisen [36]. Obwohl die Methode momentan noch als sehr zeit- und materialaufwändig gilt, gibt es Prognosen, die vorhersagen, dass sich dies in den nächsten Jahren ändern und das WGS zu einem diagnostischen Standard wird [67].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, etwaige Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Isolaten einer Auswahl an relevanten RTs von *C. difficile* darzustellen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Isolate aus dem Einzugsgebiet des UKS gelegt. Im speziellen sollten Isolate der RTs RT015, RT027, RT048, RT106 und RT176, die alle in der Vergangenheit vermehrt mit nosokomialen Infektionen assoziiert wurden, mittels MLVA typisiert und zueinander in Beziehung gesetzt werden, um Aussagen über die genetische Vernetzung der Isolate und ihr Potential zur Bildung von Clustern aus höher verwandten Isolaten zu treffen. Im Anschluss sollten für alle vom UKS stammenden Isolate, welche eine STRD von  $\leq 5$  zueinander aufwiesen, die Verlegungshistorien der entsprechenden Patienten während ihrer stationären und teilstationären Behandlung am UKS ausgewertet werden. Ziel hiervon war es, Aussagen über die Transmissionstendenz und das nosokomiale Potential der RTs treffen zu können. Hierfür wurden die Verlegungshistorien im Zeitraum um den Erregernachweis auf zeitliche und/oder räumliche Berührungspunkte untersucht. Letzteres Vorgehen sollte es ermöglichen, etwaige nosokomiale Übertragungen zu ermitteln oder auszuschließen. Die genetische Vernetzung und Transmissionstendenzen der Isolate stellen einen aussagekräftigen Indikator für die Wirksamkeit von örtlichen Hygienemaßnahmen dar. Für die hypervirulenten RTs RT027 und RT176 sollten zusätzlich Isolate aus dem gesamten Gebiet Deutschlands, die an das NRZ für *C. difficile* gesendet wurden, per MLVA untersucht werden, um eine Darstellung von Verwandtschaftsbeziehungen und der Tendenz zum Clustering auf nationaler Ebene zu ermöglichen. Im Falle des RT176 sollte dabei ein besonderes Augenmerk auf eine mögliche Etablierung dieses RTs in Deutschland gelegt werden.

Weiter sollte für die MLVA-typisierten Isolate nach Möglichkeit eine Resistenztestung gegenüber den Antibiotika Clarythromycin, Rifampicin, Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin durchgeführt werden, um Aussagen über die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen am UKS bzw. in Deutschland treffen zu können, sowie mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den Isolaten der einzelnen RTs identifizieren zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Eine Auflistung der verwendeten Reagenzien findet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH; Madison; USA
Hot Start Mix (PCR Mastermix)	VWR International Radnor; USA
MgCl <sub>2</sub>	VWR International Radnor; USA
Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	Promega GmbH; Madison; USA
Größenmarker Size Standard 600	Beckman Coulter; Brea; USA
NaCl 0,9% (isoton)	Care Fusion; San Diego; USA

#### 2.1.2 Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Um eine Detektion durch den Sequenzer zu ermöglichen wurden mit den Farbstoffen DMN5, BMN6 oder DY751 fluoreszenzmarkierte Primer genutzt. Eine Auflistung der zur MLVA verwendeten Primer findet sich in Tabelle 2.

**Tabelle 2:** zur MLVA verwendete Primer

Primer	Sequenz
Aas	AAATACTTTTCCCCTTTTCATAA
As*	BMN5-TTAATTGAGGGAGAATGTTAAA
Bas	TTATATTTTATGGGCATGTTAAA
Bs*	BMN5- CTTAATACTAACTAACTCTAACCAGTAA
Cas	ATTGGAATTGAATGTAACAAAA
Cs*	BMN6- GTTTAGAATCTACAGCATTATTTGA
Eas	CAAATACATCTTGCATTAATTCTT
Es*	BMN5-TGGAGCTATGGAAATTGATAA
Fas	ACAAAAGACTGTGCAAATATACTAA
Fs*	BMN6-TTTTTGAACTGAACCAACATA

Gas2	ACCAAAAATTTCTAACCCAAC
Gs*	DY751-TGTATGAAGCAAGCTTTTTATT
Has	GATGAGGAAATAGAAGAGTTCAA
Hs*	BMN6-GTTTTGAGGAAACAAACCTATC

### 2.1.3 Verbrauchsgegenstände

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsgegenstände findet sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3:** verwendete Verbrauchsgegenstände

Name	Hersteller
<i>Clostridium difficile</i> -AGAR (CLO-AGAR); Selektivmedium zur Anzucht von <i>C. difficile</i> aus Stuhlproben*	Biomerieux; Marcy l'Etoile; Frankreich
Columbia AGAR (5% Schafsblut)	Biomerieux; Marcy l'Etoile; Frankreich
Genbox ANAER; Sicherungsbox zur Gewährleistung anaerober Verhältnisse	Biomerieux; Marcy l'Etoile; Frankreich
Sensidisk Disc diffusion test; Diffusionstest für Clarithromycin	Oxoid; Basingstoke; Hampshire; UK
Sensidisk Disc diffusion test; Diffusionstest für Rifampicin	Becton Dickinson; Franklin Lakes; USA
Epsilometer; Resistenztest	Liofilchem; Roseto degli Abruzzi; Italien
Safelock Tubes	Sarstedt; Nürnbrecht; Deutschland
Pipetten	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitzen; Biosphere Filter Tips	Sarstedt; Nürnbrecht; Deutschland

\*enthält tierisches Pepton 21 g/l, Hammelblut 50 ml/l, Cycloserin 0,1 g/l, Cefoxitin 0,008 g/l, Amphotericin B 0,002 g/l

### 2.1.4 Laborgeräte

Eine Auflistung der verwendeten Laborgeräte findet sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4:** verwendete Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Densicheck Plus Instrument	Biomerieux, Marcy l'Etoile; Frankreich
DNS Extraktor; Maxwell 16 MDx Instrument	Promega, Madison; USA
DNS-Sequencer; GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (GeXP)	Beckman Coulter; Brea; USA
Thermocycler; „peqstar“	VWR International Radnor; USA
Vortexer; Vortex Genie 2	Scientific Industries; Bohemia; USA
Zentrifuge; Galaxy Ministar	VWR International Radnor; USA

### 2.1.5 Software

Eine Auflistung der verwendeten Software findet sich in Tabelle 5.

**Tabelle 5:** verwendete Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
M/LAB32; M/LAB Software; Version 32	Dorner Health IT Solutions; Müllheim; Deutschland
BioNumerics 7.5; BioNumerics Software; Version 7.5	Applied Maths NV Frankreich Sint-Martens-Latem; Belgium
SAP C21; SAP Software	SAP SE Company; Walldorf; Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Einschlusskriterien Proben/Patienten**

Die vorliegende Studie wurde in der Zeit vom 26.10.2016 bis zum 10.02.2018 durchgeführt. Während dieser Zeit wurden DNS-Proben von *C. difficile* Isolaten aufbereitet und mittels MLVA subtypisiert. Sämtliche Experimente und Auswertungen fanden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (IMMH) des UKS statt. Um eine ausreichende Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, welche es ermöglichen würde, die Hygienemaßnahmen am UKS zu evaluieren, Verwandtschaftsbeziehungen darzustellen und mögliche Ausbruchscluster auf regionaler und auf Bundesebene darzustellen, wurden nur Proben ausgewählt, welche die nachfolgenden Charakteristika aufwiesen. Die Proben mussten von Patienten stammen, bei welchen im Zeitraum von 2006 bis 2016 eine CDI diagnostiziert wurde. Weiter mussten die Proben durch das NRZ für *C. difficile* mittels Ribotypisierung charakterisiert worden und einem der unter Punkt 2.2.2 genannten RTs zugeordnet worden sein. Eine Aufstellung sämtlicher analysierter Isolate findet sich in Tabelle 10.

### **2.2.2 Probensammlung und Datenerhebung**

Insgesamt wurden 276 Isolate der RTs RT015, RT027, RT046, RT106 und RT176 mittels MLVA analysiert. Sämtliche analysierten Proben stammen aus der Stammsammlung des NRZ für *C. difficile* in Homburg (Saar). Insgesamt stammten 128 Isolate von internen und 148 Isolate von externen Einsendern. Es wurden nur Proben ausgewählt, welche den weiter oben genannten Kriterien entsprachen. Zur Auswahl geeigneter Proben und zur patientenbezogenen Datenerhebung wurde die SAP C21 Software (Tab. 5) des UKS genutzt. Hierbei bezogen sich sämtliche erhobenen Patientendaten lediglich auf die Verlegungshistorie am UKS und wurden vorab so anonymisiert, dass keine Rückschlüsse auf Personen möglich waren. Dies war dem Surveillance-Aspekt dieser Arbeit geschuldet, um mögliche nosokomiale Übertragungsereignisse zu eruieren und Rückschlüsse auf die Effektivität der am UKS getroffenen Hygienemaßnahmen zu erhalten. Patientendaten von Isolaten externer Einsender wurden nicht ausgewertet. Auch wurden keine Versuche an Patienten oder mit menschlichem Probenmaterial durchgeführt.

### **2.2.3 Anzucht von *C. difficile* und DNS-Gewinnung**

Isolate der Kulturen wurden im Rahmen der Stammsammlung des NRZ routinemäßig bei -80°C eingelagert. Die für die Versuche dieser Arbeit verwendete DNS wurde bei -20°C gelagert. Zur Anzucht der Bakterien wurde ein *Clostridium difficile*-AGAR (CLO-AGAR) der Firma Biomerieux genutzt (Tab. 3). Die Bakterien wurden für 48 Stunden unter strikt anaeroben Bedingungen bebrütet.

Im Anschluss wurde bei allen 276 *C. difficile* Isolaten eine Ribotypisierung und bei 202 (73,2%) eine Resistenztestung, wie an anderer Stelle beschrieben [54,133], durchgeführt (Tab. 10). Die DNS wurde mittels „DNS-Extraktor“ aus den Kulturen gewonnen. Der Vorgang wurde nach Herstellerangaben mittels Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit durchgeführt. Für die Mehrzahl der Proben erfolgten die kulturelle Anzucht und die Ribotypisierung im Rahmen der Patientenbehandlung, nach positivem Screeningtest.

#### 2.2.4 Resistenztestungen

Mehrere Kolonien der zu testenden Isolate wurden von bebrüteten Agarplatten per Wattetupfer aufgenommen und in isotoner NaCl-Lösung resuspendiert. Der Wattetupfer wurde dazu so lange verrührt, bis ein Trübungsgrad entsprechend McFarland von 4,0 eintrat. Im Anschluss wurden die Bakterienzellen homogen auf einen Columbia-Agar aufgebracht. Daraufhin wurden Testblättchen für die Antibiotika Clarithromycin, Rifampicin, auf den Agar aufgebracht. Die Tests von Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin erfolgten mittels Epsilometrie, entsprechend den Herstellerangaben. Die Tests auf Resistenzen gegenüber Clarithromycin und Rifampicin erfolgten mittels Sensi-Disk Diffusionstest, jeweils nach Herstellerangaben. Die Resistenzassays wurden über Nacht bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die minimale Hemmkonzentration ausgewertet. Im Falle von Clarithromycin und Rifampicin wurde Resistenz als Fehlen eines Hemmhofs gewertet [133].

#### 2.2.5 Multi-Loci-Variable-Number-Tandem-Repeat-Analysis (MLVA)

Bei sämtlichen in der Arbeit angegebenen Proben wurde eine MLVA durchgeführt. Dazu wurden sieben Loci (CdA6, CdB7, CdC6, CdE7, CdF3, CdG8 und CdH9) in „Tandem-Repeat-Regionen“ des Bakteriums bezüglich der Anzahl ihrer Wiederholungen miteinander verglichen. In der Auswahl der Primer wurde sich an den sieben in der Literatur gängigsten Primern orientiert (Tab. 2) [47,81,128]. Alle Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/l vor. Die PCR wurde in 3 Ansätzen zu je einem Volumen von insgesamt 22,5 µl und jeweils 2,5 µl DNS (die Konzentration wurde im Vorfeld nicht bestimmt) durchgeführt. Die DNS wurde aus den vorher gezogenen Kulturen mittels „DNS-Extraktor“ nach Herstellerangaben gewonnen. Die Zusammensetzung des PCR-Volumens findet sich in den Tabellen 6 bis 8.

**Tabelle 6:** Ansatz 1(Loci: AHG)

Reagenz	Volumen
DNS	2,5 µl
Hotstart Mix Y	12,5 µl
Primer A (forward)	0,5 µl
Primer A (reverse)	0,5 µl

Primer H (forward)	0,5 µl
Primer H (reverse)	0,5 µl
Primer G (forward)	0,5 µl
Primer G (reverse)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,75 µl
Destilliertes Wasser	6,25 µl

**Tabelle 7:** Ansatz 2 (Loci: BF)

Reagenz	Volumen
DNS	2,5 µl
Hotstart Mix Y	12,5 µl
Primer B (forward)	0,5 µl
Primer B (reverse)	0,5 µl
Primer F (forward)	0,5 µl
Primer F (reverse)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
Destilliertes Wasser	7,25 µl

**Tabelle 8:** Ansatz 3 (Loci: CE)

Reagenz	Volumen
DNS	2,5 µl
Hotstart Mix Y	12,5 µl
Primer C (forward)	0,5 µl
Primer C (reverse)	0,5 µl
Primer E (forward)	0,5 µl
Primer E (reverse)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
Destilliertes Wasser	7,25 µl

Die angewandten PCR-Cycler Konditionen finden sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9:** Konditionen des PCR-Cycler

Anzahl Zyklen	Dauer	Temperatur
1	12 min	94°C
35	30 sek	94°C
	30 sek	51°C
	30 sek	72°C
1	10 min	72°C

Die fluoreszenzmarkierten PCR Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde das „DNS-Sequencer; GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (GeXP)“ verwendet. Im Anschluss wurden die Größen der Loci unter Zuhilfenahme des oben genannten Größenmarkers bestimmt (Tab. 1). Diese wurden zwischen den einzelnen Stämmen verglichen und die Anzahl der Varianzen dokumentiert. Mittels Bionumerics Software Version 7.5 (Tab. 5) wurde auf diesen Ergebnissen der „minimum spanning tree“ nach Marsh *et al.* [81] erstellt und zur phylogenetischen Analyse genutzt.

## 2.2.6 Datenauswertung und Clustering

Bei der Darstellung der genetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Isolaten wurde sich auf den von Marsh *et al.* [81] beschriebenen „minimum spanning tree“ bezogen, welcher mittels Bionumerics Software (BioNumerics 7.5) auf Grundlage der STRD aller sieben VNTR Loci die Proben nach dem Grad ihrer Differenz zu Clustern organisiert. Isolate mit einer STRD von  $\leq 10$  wurden dabei als genetisch verwandt und Isolate mit einer STRD von  $\leq 2$  als klonal definiert [13,47]. Dabei wurde nicht mit einbezogen, in wie vielen verschiedenen Loci die Differenzen auftraten. Als Cluster wurden zwei oder mehr Proben bezeichnet welche eine STRD von  $\leq 10$  zueinander aufwiesen. Für alle Proben vom UKS, bei denen eine STRD von  $\leq 5$  detektiert wurde, wurden die Verlegungshistorien der entsprechenden Patienten auf Berührungspunkte hin untersucht. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde sich auf diese engere Auswahl an Proben für die Auswertung konzentriert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Durchgeführte Analysen

Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit 234 Isolate von fünf verschiedenen RTs (RT015, RT027, RT046, RT106 und RT176) in den Jahren 2016 und 2017 mittels MLVA subtypisiert. Dabei erwiesen sich 184 der typisierten Isolate (184/234) als höhergradig verwandt (STRD  $\leq$  5) (siehe Anhang, Tab. 14).

Eine Übersicht über die Stationen, auf welchen die Patienten zum Diagnosezeitpunkt lagen, findet sich in Tabelle 13 (siehe Anhang). Eine Auflistung aller durchgeführten Analysen findet sich in Tabelle 10.

Sämtliche untersuchten Isolate der RT078, RT017 und RT126 ließen sich nicht mittels MLVA typisieren. Ähnliche Probleme traten im Vorfeld auch bei anderen Arbeitsgruppen auf [7,47], von Bakker *et al.* [7] beschriebene Lösungsansätze zeigten allerdings keinen Erfolg.

Für die Patienten, deren Proben eine STRD  $\leq$  5 aufwiesen, wurde die Verlegungshistorie des relevanten Zeitraumes um die Infektion erhoben und ausgewertet. Schwerpunkt wurde dabei auf mögliche zeitliche und örtliche Berührungspunkte der Patienten während ihres stationären Aufenthaltes gelegt.

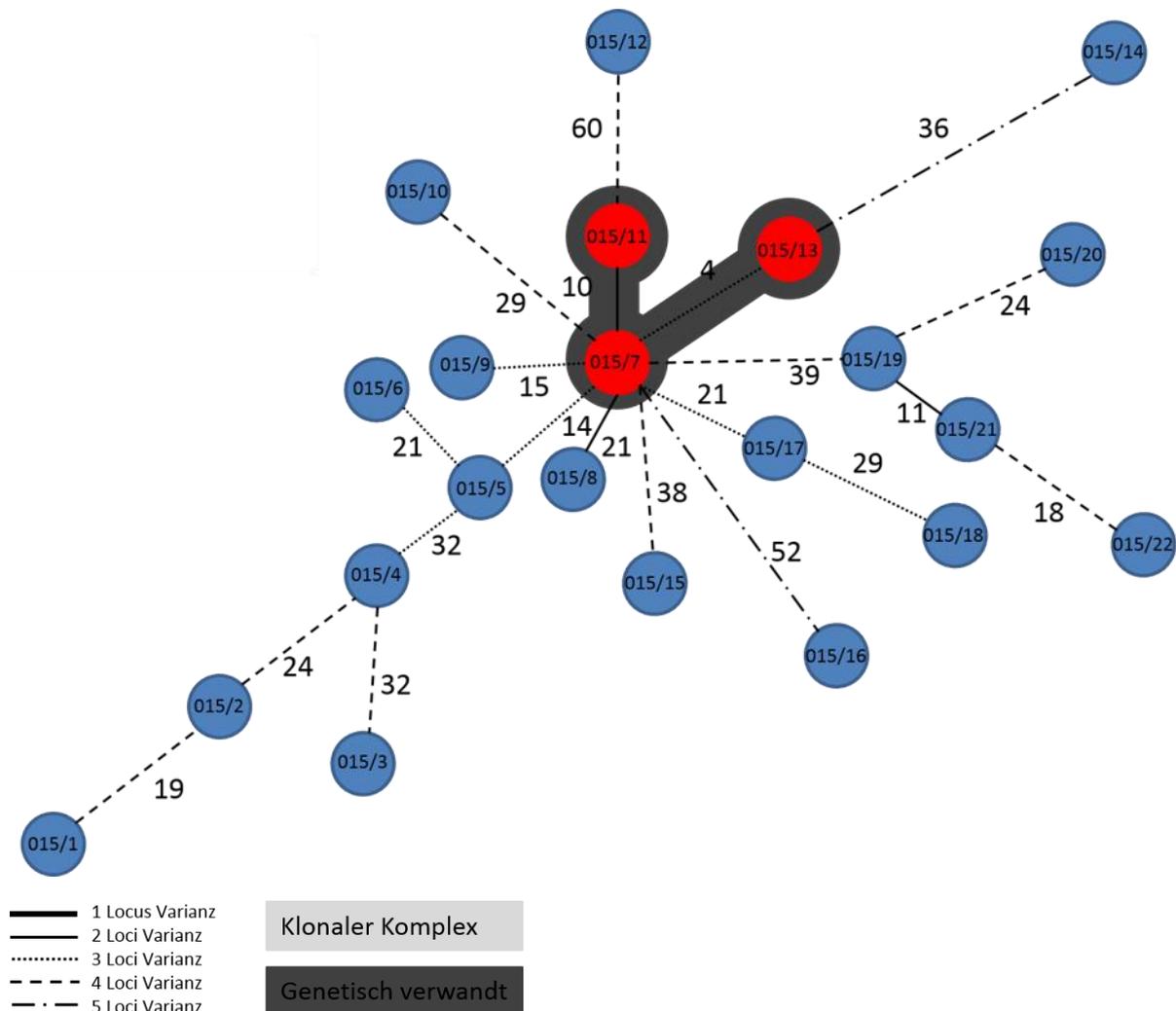
Da für sämtliche von externen Einsendern stammenden Proben keine Patientendaten vorlagen, war eine Aufarbeitung von Patientenhistorien nur für die aus dem UKS stammenden Proben möglich.

**Tabelle 10:** erfolgte Analysen

<b>Ribotyp</b>	<b>Gesamtanzahl der untersuchten Isolate*</b>	<b>extern</b>	<b>intern</b>	<b>Resistenztestung</b>
RT015	22	0	22	22
RT 027	166	119	47	145
RT 046	10	0	10	10
RT 106	6	0	6	6
RT 176	30	29	1	19

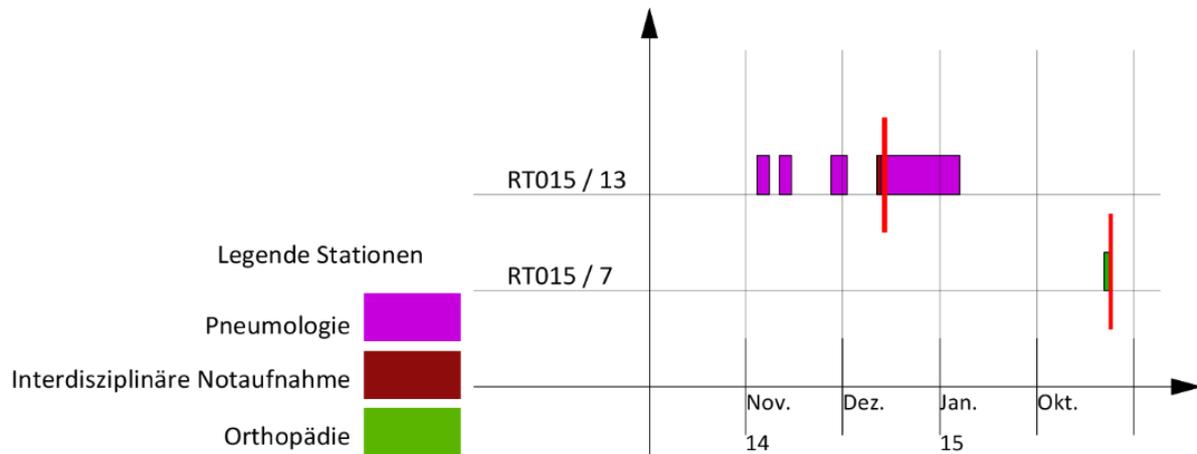
### 3.2 RT015 (intern)

Bei der Betrachtung der STRD Resultate für die Isolate des RT015 konnten innerhalb von einem Cluster bei drei Isolaten genetische Verwandtschaftsbeziehungen ( $\text{STRD} \leq 10$ ) nachgewiesen werden (Abb. 4). Zwei dieser Isolate wiesen dabei unter einander eine STRD von vier auf, was eine relative hohe genetische Verwandtschaft nahelegt. Bei der Aufarbeitung der Verlegungshistorien der entsprechenden Patienten zeigten sich bemerkenswerterweise aber weder zeitliche noch örtliche Berührungspunkte während des stationären Aufenthaltes am UKS. Auch die Zeitpunkte der mikrobiologischen Nachweise von *C. difficile* lagen in einem Abstand von mehr als zehn Monaten auseinander (Abb. 5).



**Abbildung 4:** MLVA aller 22 RT015 von intern stammenden Isolaten von 2006 bis 2016. Die roten, dunkelgrau unterlegten Kreise stellen verwandte Isolate dar. Alle übrigen Isolate stellten sich divers dar. Die Zahlen in den Kreisen bezeichnen die einzelnen Patienten, von denen die Isolate stammen. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an. Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci.

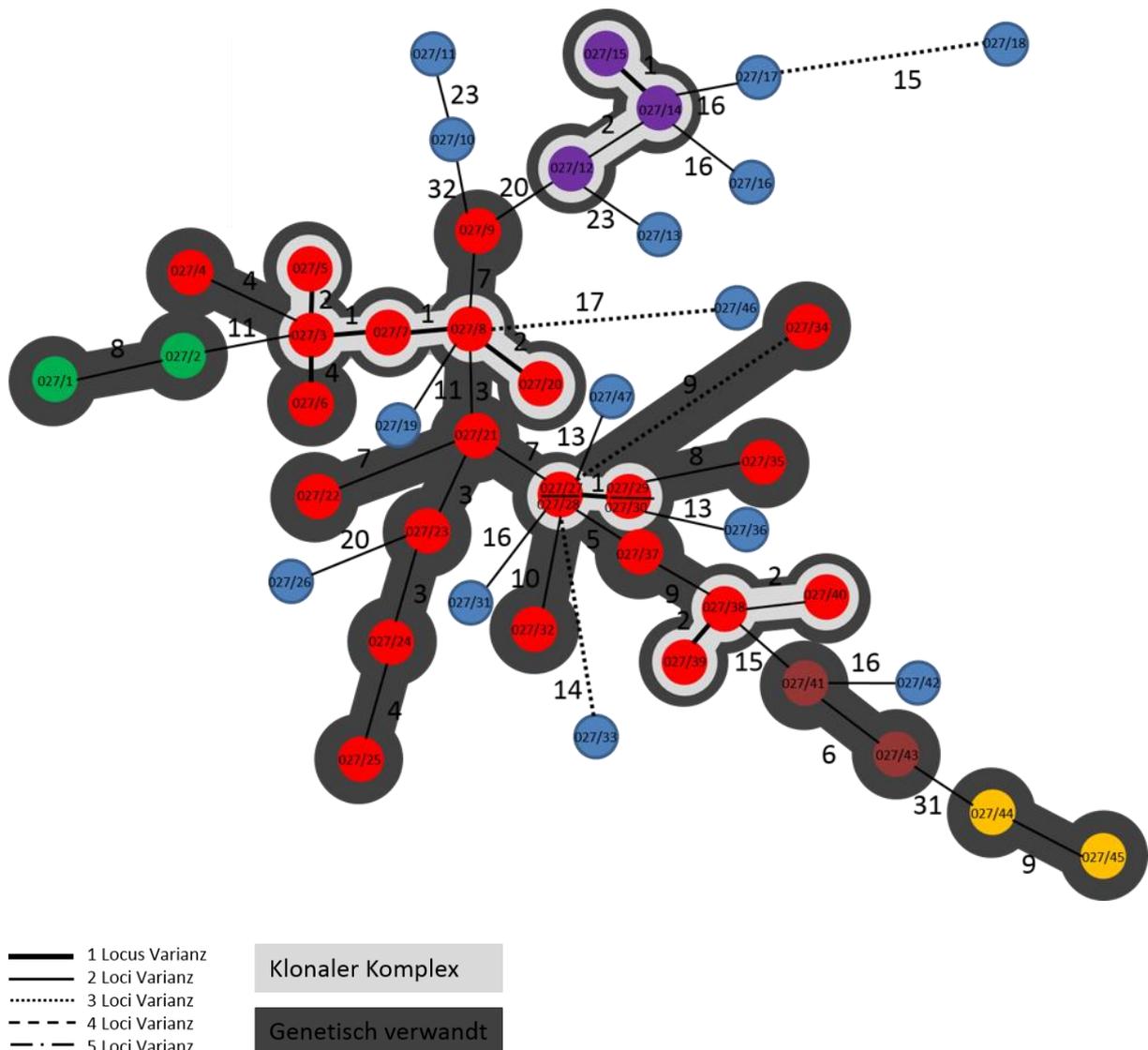
## RT 015 Verlegungshistorie UKS



**Abbildung 5:** Verlegungshistorie der RT015 positiven Patienten RT015/7 und RT015/13 in den Jahren 2014 und 2015 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT015 an. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

### 3.3 RT027 (intern)

Unter den vom UKS stammenden 47 RT027 Proben ließen sich innerhalb von fünf Clustern bei 33 der Proben genetische Verwandtschaftsbeziehungen ( $STRD \leq 10$ ) und bei 15 Proben klonale Verwandtschaftsbeziehungen ( $STRD \leq 2$ ) beobachten. In zwei Fällen erwiesen sich je zwei Proben in Hinblick auf die getesteten Regionen als genetisch identisch. Insgesamt ließen sich innerhalb von vier Clustern mehrere Isolate finden, welche zueinander eine STRD von  $\leq 5$  aufwiesen (Abb. 6). Diese Isolate werden im Folgenden genauer betrachtet.



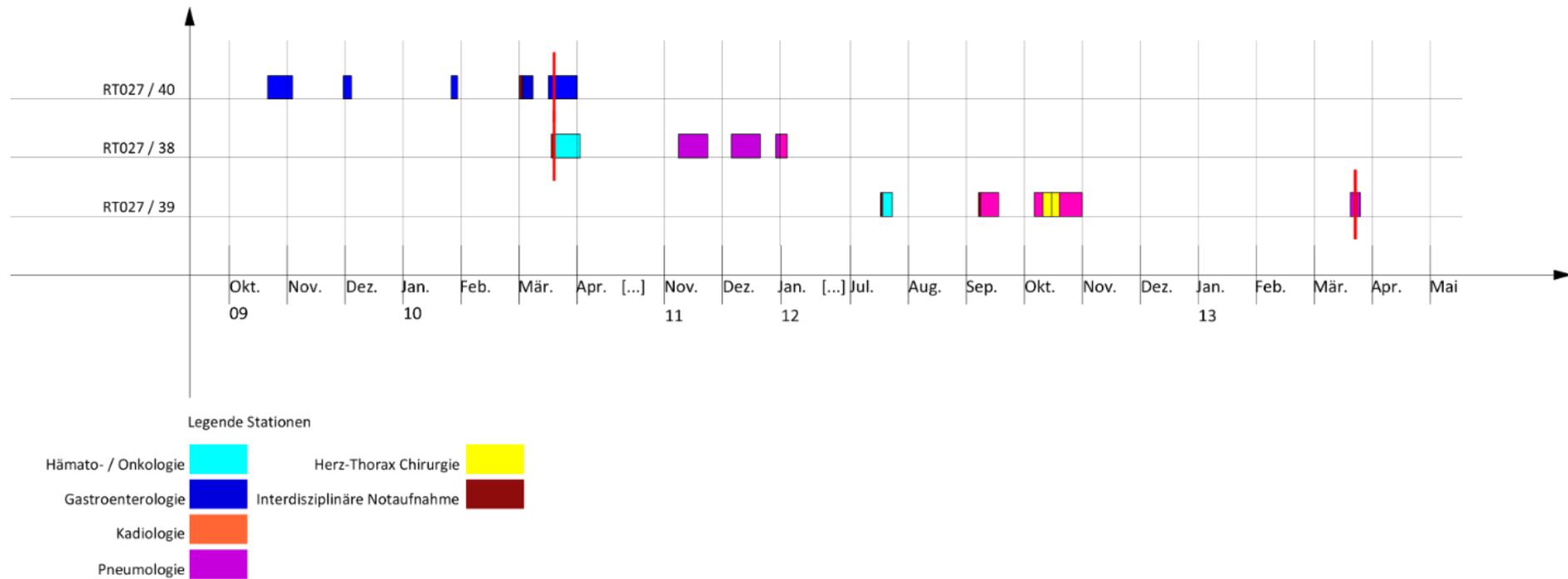
**Abbildung 6:** MLVA aller 47 von intern stammenden RT027 Isolaten aus den Jahren 2006 bis 2016. Dunkelgrau unterlegte Kreise stellen verwandte Isolate dar. Hellgrau unterlegte Kreise stellen klonale Isolate dar. Die Farben Kennzeichnen die Zugehörigkeit der Proben zu den einzelnen Clustern. Alle blau gekennzeichneten Proben stellten sich divers dar. Die Nummern in den Kreisen bezeichnen die Patienten, von denen die Isolate stammen. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an. Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci.

Die Abbildungen 7 bis 10 zeigen die Verlegungshistorien der entsprechenden Patienten während ihrer Behandlung am UKS.

### **3.3.1 Isolate mit einer STRD $\leq$ 5**

Die Isolate der Patienten RT027/40, RT027/38 und RT027/39 wiesen untereinander eine erhöhte genetische Verwandtschaft auf (STRD  $\leq$  5). Wie Abbildung 7 zeigt, fallen innerhalb der Verlegungshistorie mehrere Berührungspunkte während des stationären Aufenthaltes am UKS auf. So befanden sich die Patienten RT027/40 und RT027/38 im März des Jahres 2010 zeitgleich in stationärer Behandlung auf derselben internistischen Station des UKS, sowie kurzzeitig auf der interdisziplinär geführten Notaufnahme. Des Weiteren wurden die mikrobiologischen Nachweise von *C. difficile* an zwei aufeinander folgenden Tagen erbracht. In der Verlegungshistorie des Patienten RT027/39 finden sich jedoch keine Überschneidungen mit denen der beiden anderen Patienten (Abb. 7).

### RT 027 Verlegungshistorie UKS (Cluster 1)

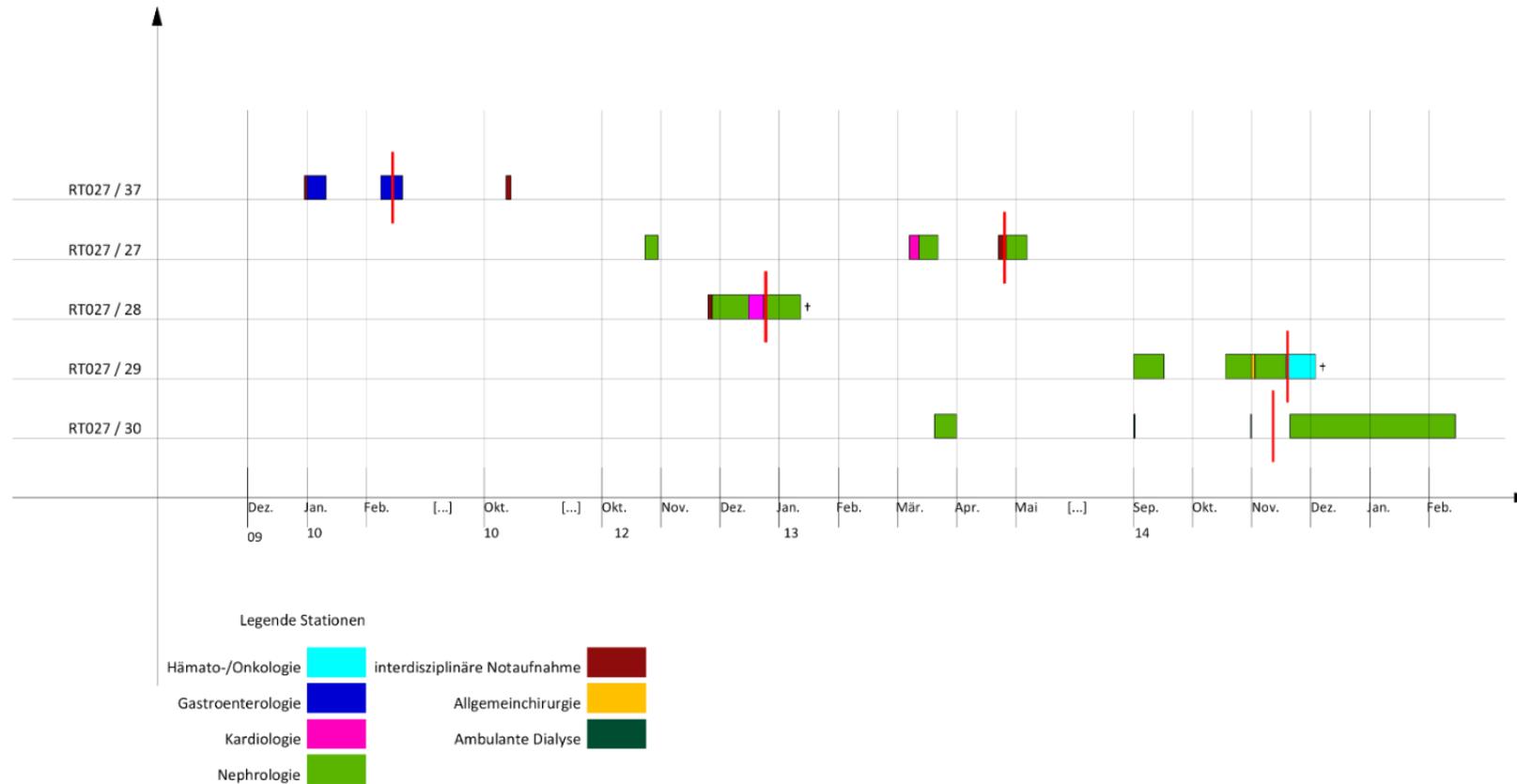


**Abbildung 7:** Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 1 zusammengefasst wurden in den Jahren 2009-2013 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT027 an. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

Die Proben der Patienten RT027/30, RT027/27, RT027/28, RT027/29 und RT027/37 wiesen ebenfalls untereinander zumindest zu einem weiteren Isolat einen erhöhten Verwandtschaftsgrad ( $\text{STRD} \leq 5$ ) auf. Wie Abbildung 8 zeigt, liegen jeweils bei den Patienten RT027/27 und RT027/28, den Patienten RT027/27 und RT027/30, sowie den Patienten RT027/29 und RT027/30, welche alle in den Jahren 2012 bis 2014 auf derselben internistischen Station behandelt wurden, die Nachweisdaten des Erregers zeitlich eng beieinander. In diesem Kontext fällt auf, dass die bei diesen Paaren isolierten Erreger sich innerhalb der MLVA mit einer STRD von null als genetisch klonal darstellten (Abb. 6). Weiter fällt auf, dass die Patienten RT027/28, RT027/29 und RT027/30 dialysepflichtig waren und sich die ambulanten bzw. stationären Hämodialysen der Patienten RT027/29 und RT027/30 teilweise zeitlich und räumlich überschneiden.

Die Verlegungshistorie von Patient RT027/37 zeigt keine zeitlichen oder räumlichen Berührungspunkte mit denen der anderen Patienten (Abb. 8).

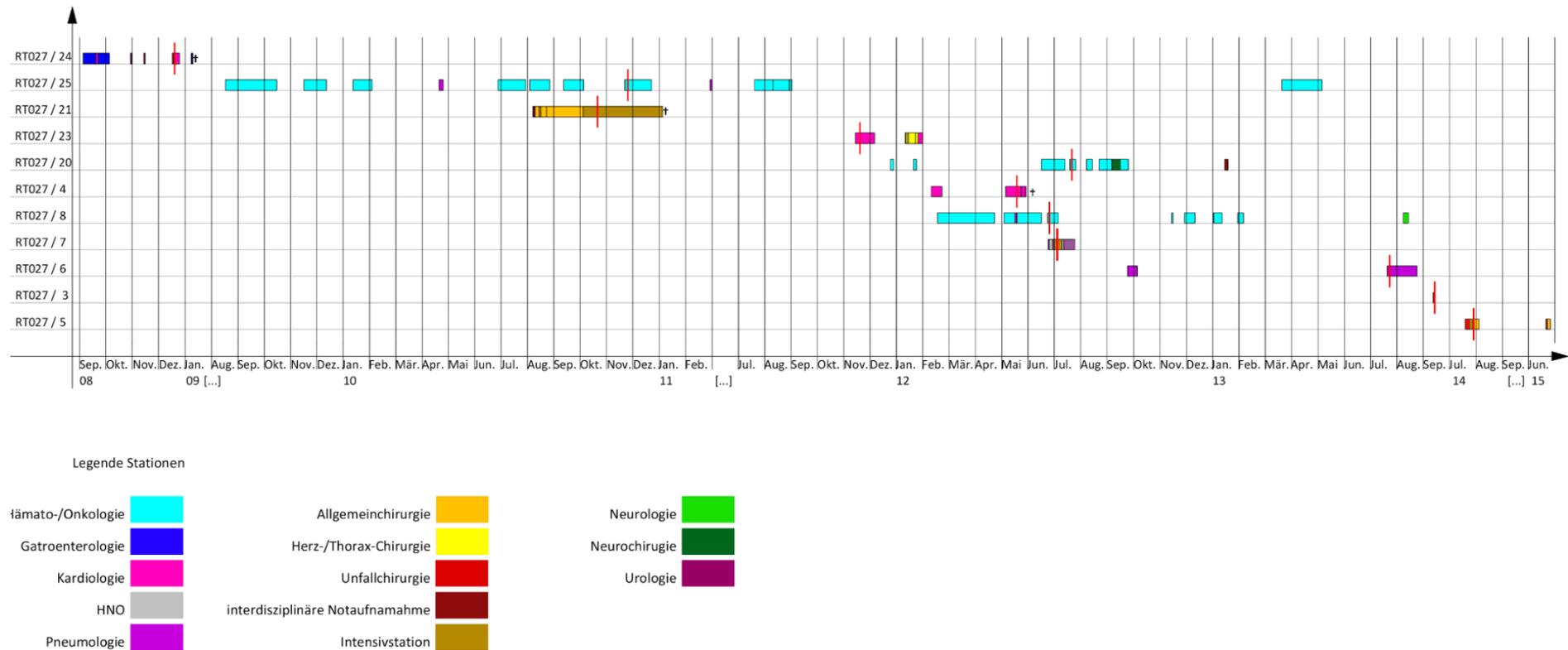
### RT 027 Verlegungshistorie UKS (Cluster 2)



**Abbildung 8:** Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 2 zusammengefasst wurden, in den Jahren 2009-2010, sowie 2012-2015 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT027 an. Kreuze am Ende eines Balkens stehen für das Versterbedatum des entsprechenden Patienten. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

Die Proben der Patienten RT027/3, RT027/4, RT027/5, RT027/6, RT027/7, RT027/8, RT027/20, RT027/21, RT027/23, RT027/24 und RT027/25 weisen ebenfalls einen erhöhten Verwandtschaftsgrad ( $\text{STRD} \leq 5$ ) auf. Die Patienten RT027/25 und RT027/21 befanden sich im Zeitraum von August 2010 bis Dezember 2010 beide in stationärer Behandlung am UKS, jeweils aber auf unterschiedlichen Stationen (Abb. 9). Die Patienten RT027/23, RT027/8, RT027/20, RT027/7 und RT027/4 befanden sich im Zeitraum vom November 2011 bis zum September 2013 mit diversen zeitlichen und räumlichen Überschneidungen in stationärer Behandlung am UKS. Darüber hinaus wurden die Patienten RT027/8 und RT027/20 beide in den Monaten Juni und Juli des Jahres 2013 auf derselben internistischen Station behandelt. Auch weisen die Nachweisdaten von *C. difficile*, besonders in den Fällen der Patienten RT027/8, RT027/20 und RT027/7 eine zeitliche Korrelation auf (Abb. 9). Bei den Patienten RT027/3 und RT027/6 hingegen lagen keine zeitlichen oder räumlichen Überschneidungen in ihren stationären Aufenthalten vor. Allerdings lagen die Nachweisdaten von *C. difficile* weniger als 2 Monate auseinander (Abb. 9). Die Verlegungshistorien der Patienten RT027/24 und RT027/5 wiesen keine zeitlichen oder räumlichen Berührungspunkte zueinander, oder zu anderen Patienten des Clusters auf (Abb. 9).

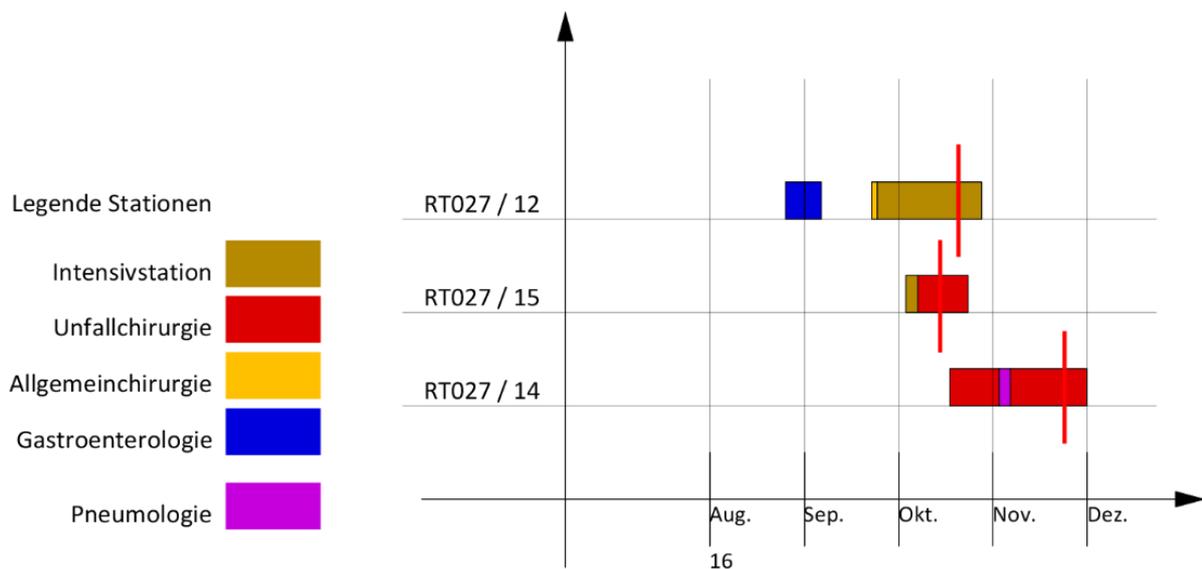
### RT 027 Verlegungshistorie UKS (Cluster 3)



**Abbildung 9:** Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 3 zusammengefasst wurden in den Jahren 2008-2015 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT027 an. Kreuze am Ende des Balkens stehen für das Versterbedatum des entsprechenden Patienten. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

Die Patienten RT027/15, RT027/14 und RT027/12 befanden sich alle im Zeitraum vom August bis Dezember 2016 in stationärer Behandlung am UKS. In diesem Zeitraum waren die Patienten RT027/15 und RT027/12 zeitlich überschneidend auf der interdisziplinär geführten Intensivstation und die Patienten RT027/15 und RT027/14 auf derselben chirurgischen Station untergebracht. Ebenfalls wurden die jeweiligen mikrobiologischen Nachweise von *C. difficile* in zeitlich geringem Abstand zueinander erbracht (Abb. 10).

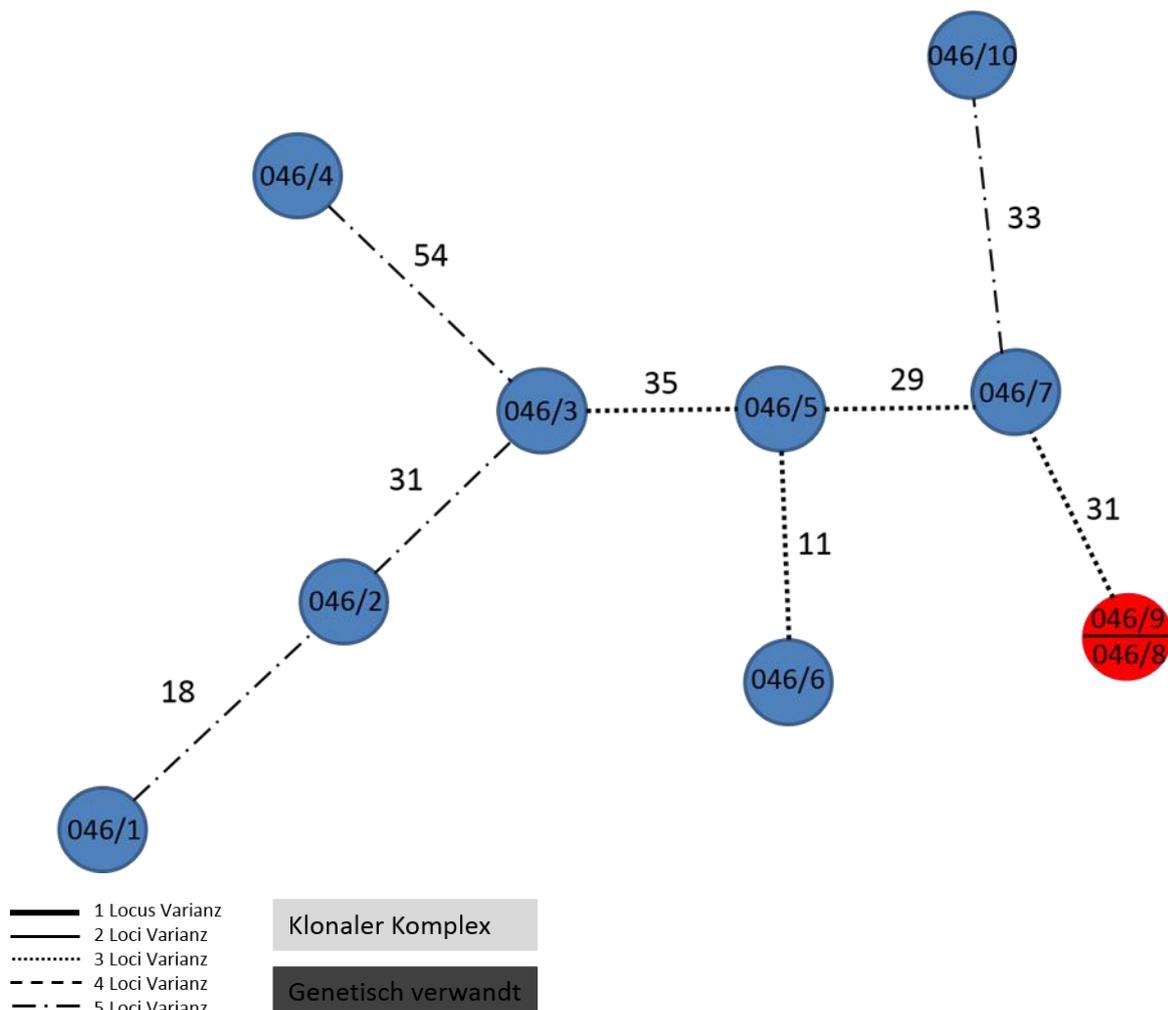
### RT 027 Verlegungshistorie UKS (Cluster 4)



**Abbildung 10:** Verlegungshistorie der RT027 positiven Patienten die zu Cluster 4 zusammengefasst wurden im Jahr 2016 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT027 an. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

### 3.4 RT046 (intern)

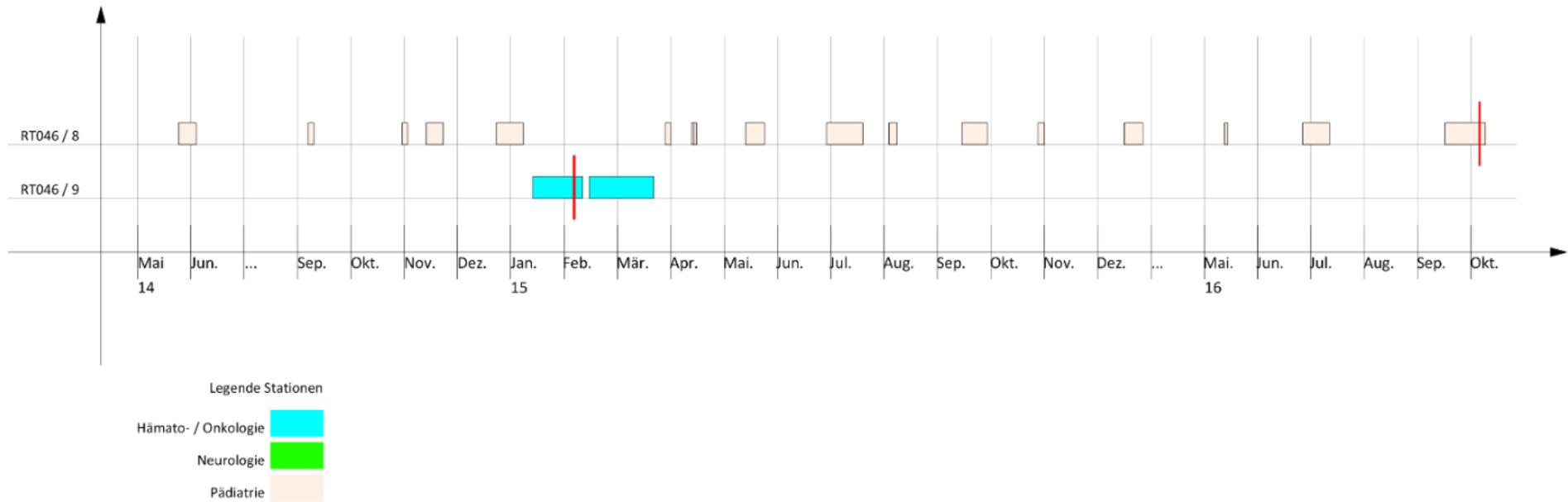
Von den 10 untersuchten Isolaten des RT046 erwiesen sich zwei als genetisch klonal (STRD  $\leq 2$ ). Eine Klonalität oder weitergehende Verwandtschaft (STRD  $\leq 10$ ) konnten sonst zwischen keinen der Isolate nachgewiesen werden (Abb. 11).



**Abbildung 11:** MLVA aller 10 von intern stammenden RT046 Isolaten, aus den Jahren 2006 bis 2016. Der rote, geteilte Kreis stellt 2 genetisch identische Isolate dar. Die von unterschiedlichen Patienten stammen. Alle übrigen Isolate stellten sich divers dar. Die Nummern in den Kreisen bezeichnen die Patienten, von denen die Isolate stammen. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an. Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, wiesen die Verlegungshistorien der beiden Patienten weder zeitliche noch örtliche Berührungspunkte während ihres stationären Aufenthaltes am UKS auf. Auch liegen die Nachweisdaten des Erregers mehr als ein Jahr auseinander.

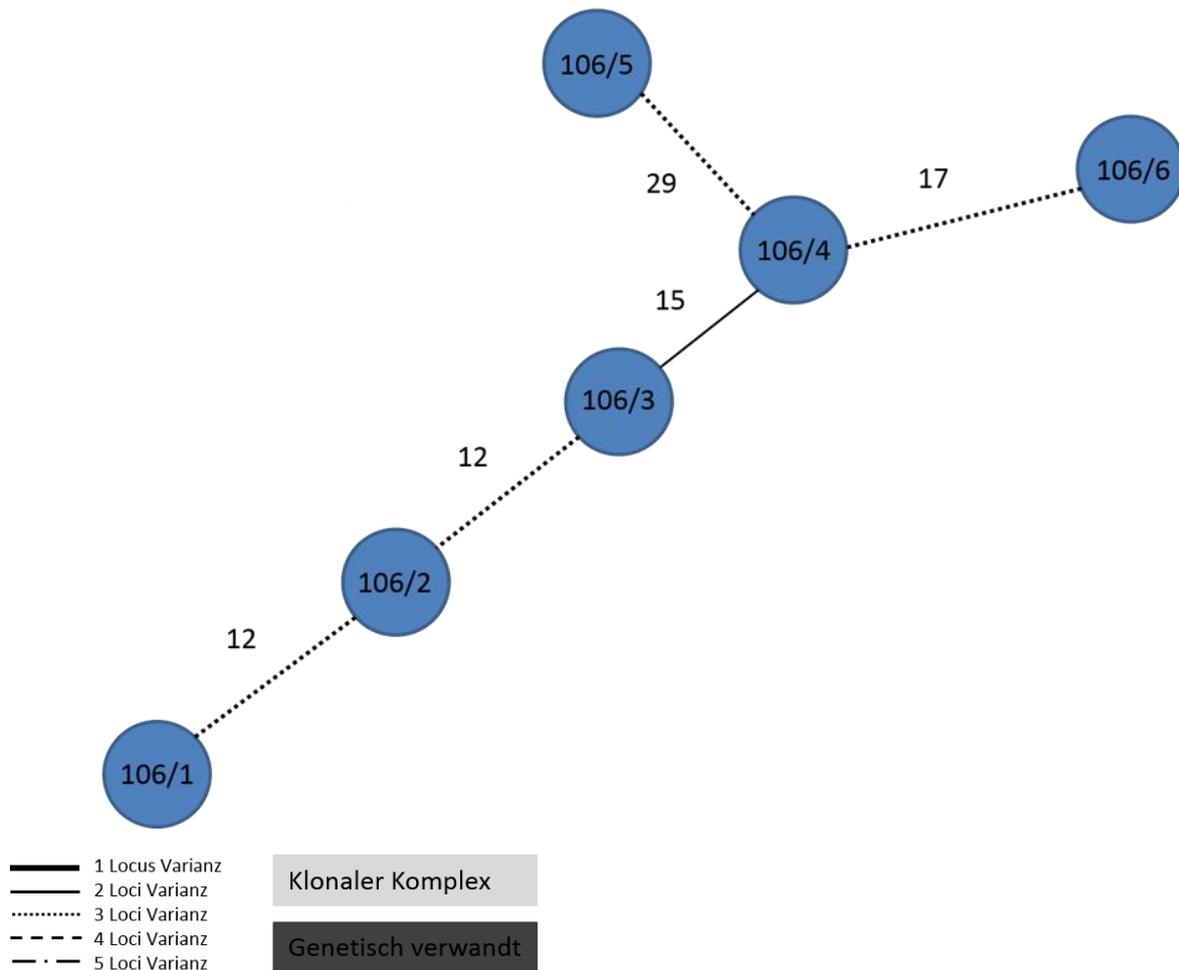
## RT 046 Verlegungshistorie UKS



**Abbildung 12:** Verlegungshistorie der RT046 positiven Patienten RT046/8 und RT046/9 in den Jahren 2014-2016 am UKS. Die Balken geben den zeitlichen Verlauf der stationären Historie am UKS an. Die Farben der Balken entsprechen den Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden. (siehe Legende) Der rote Strich gibt das Nachweisdatum des Erregers *C. difficile* RT046 an. Die X-Achse beschreibt die Zeit, die Y-Achse gibt die zu den Balken gehörenden Patienten an.

### 3.5 RT106 (intern)

Unter den 6 analysierten Isolaten des RT106 ließen sich weder zueinander klonale, noch verwandte Isolate nachweisen. Die Ergebnisse der Typisierung sind in Abbildung 13 dargestellt.

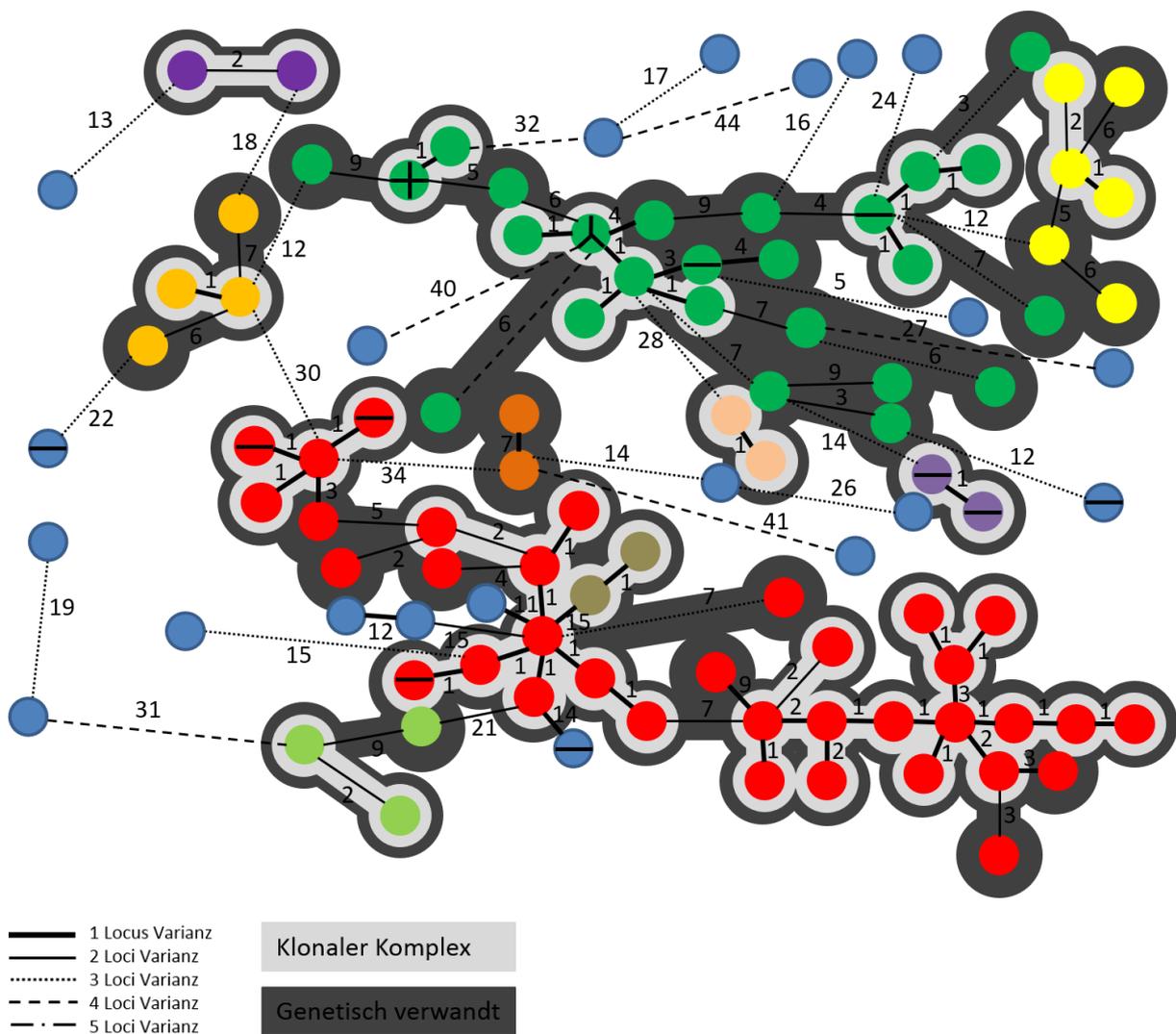


**Abbildung 13:** MLVA aller 6 von intern stammenden RT106 Isolaten, aus den Jahren 2006 bis 2016. Alle Isolate stellten sich divers dar. Die Nummern in den Kreisen bezeichnen die Patienten von denen die entsprechenden Isolate stammen. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an. Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci.

### 3.6 RT027 (extern)

Die Mehrzahl der 119 untersuchten RT027 Isolate stammten aus den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Bayern (Abb. 15).

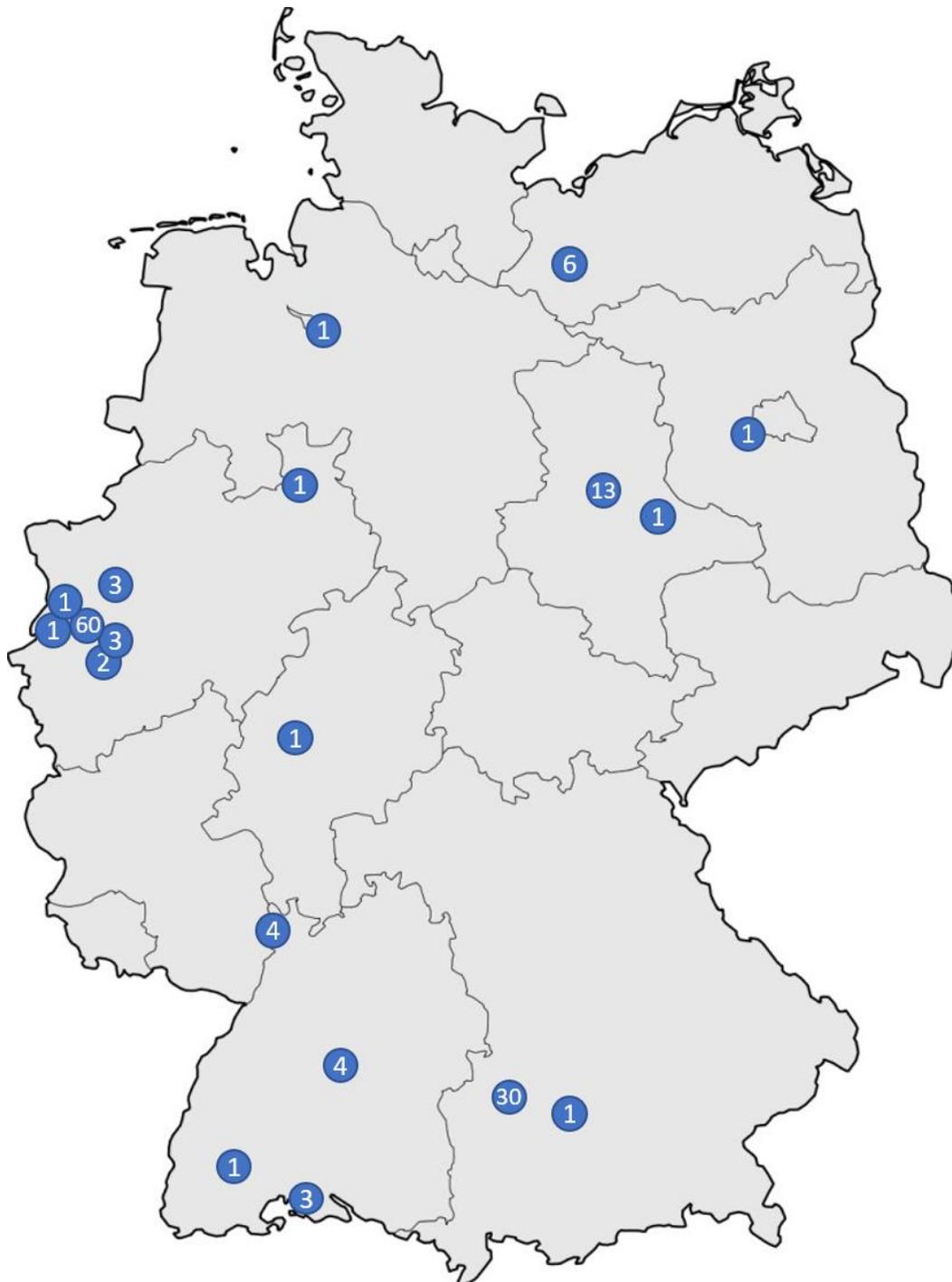
Insgesamt wiesen 95 der Isolate innerhalb von zehn Clustern nähere Verwandtschaftsbeziehungen zueinander auf. Davon erwiesen sich 67 als klonal (STRD  $\leq 2$ ) zu mindestens einem weiteren Isolat des jeweiligen Clusters auf. Des Weiteren erwiesen sich in acht Fällen je zwei Isolate und in je einem Fall drei bzw. vier Isolate als in den untersuchten Genregionen identisch (Abb. 14). Die beiden größten Cluster wurden in den Farben Rot ( $n=38$ ) und Grün ( $n=32$ ) dargestellt.



**Abbildung 14:** MLVA aller 119 RT027 Isolate von externen Einsendern. Dunkelgrau unterlegte Kreise stellen verwandte Isolate dar. Hellgrau unterlegte Kreise stellen klonale Isolate dar. Die Farben Kennzeichnen die Zugehörigkeit der Proben zu den einzelnen Clustern Alle blau gekennzeichneten Proben stellten sich divers dar. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci. Durch Striche geteilte Kreise stehen für mehrere genetisch identische Proben.

### 3.6.1 RT027

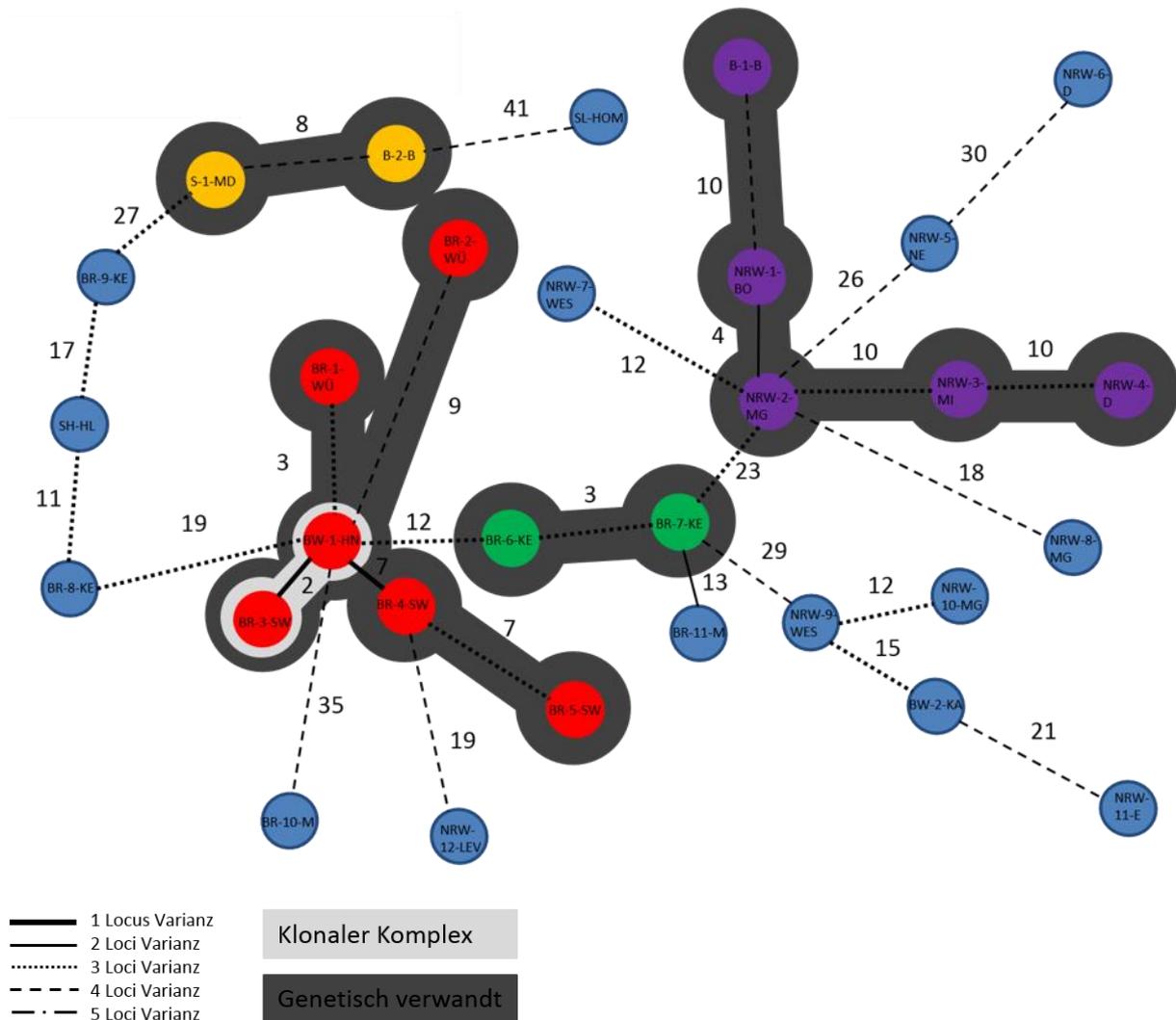
Auf Abbildung 15 findet sich eine graphische Darstellung der Einsendestandorte aller von extern stammenden RT027 Isolate. Die Mehrzahl der Proben stammt aus den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Bayern.



**Abbildung 15:** Geografische Verteilung der von extern stammenden RT027-Isolaten; Zahlen in den Kreisen entsprechen Anzahl an Patienten ( $n=166$ ); (2006-2017)

### 3.7 RT176 (gesamt)

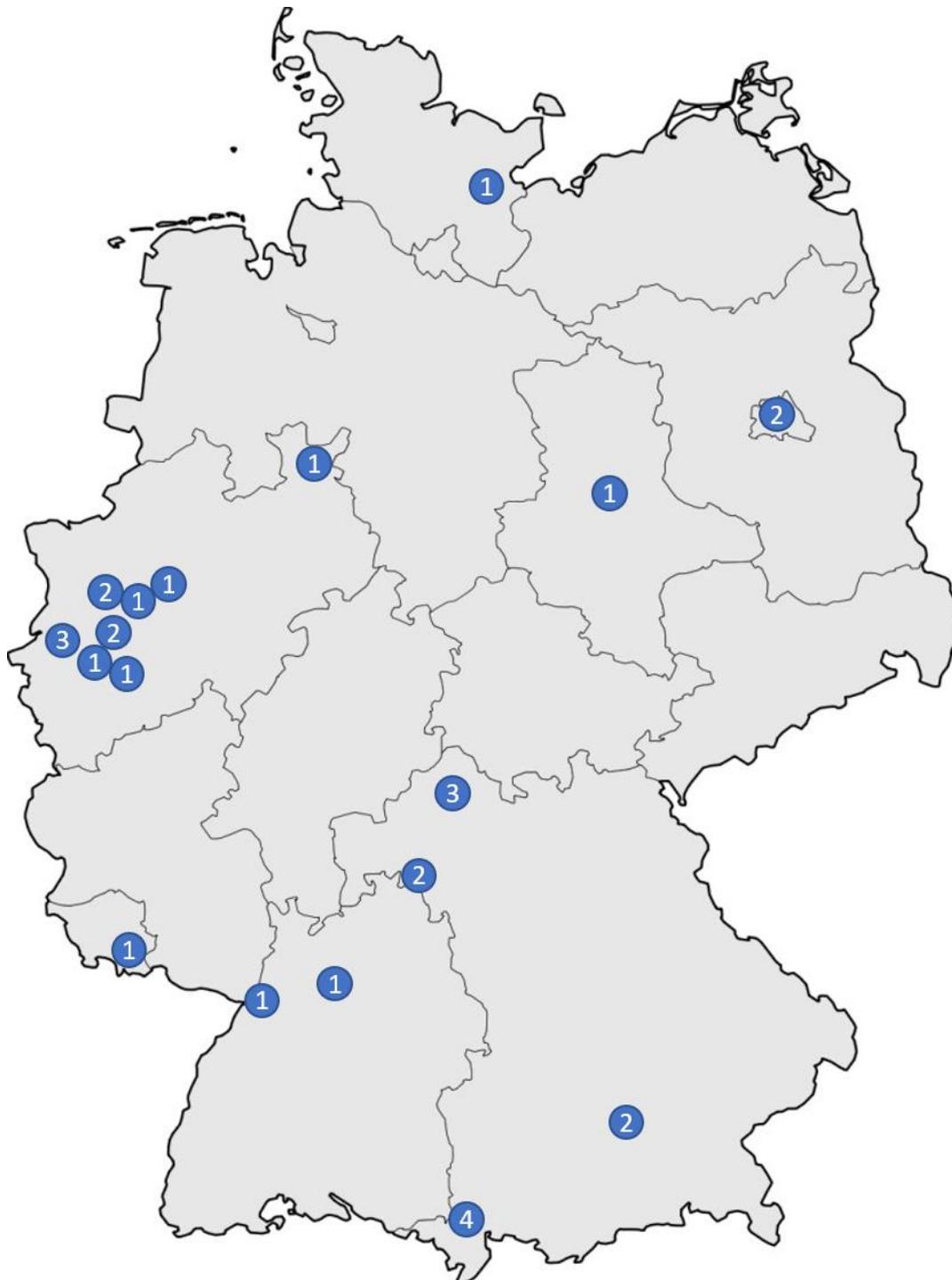
Die Mehrzahl der 30 untersuchten RT176 Isolate stammt aus den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Bayern, (Abb. 17). Innerhalb von vier Clustern ließen sich insgesamt 15 miteinander verwandte (15/30) und zwei klonale (2/30) Isolate identifizieren (Abb. 16).



**Abbildung 16:** MLVA aller 30 RT176 Isolate von internen und externen Einsendern aus den Jahren 2006 bis 2016, wobei gelb, rot, grün und violette markierten Kreise klonale oder verwandte Isolate darstellen. Die unterschiedlichen Farben entsprechen den einzelnen Clustern. Dunkelgrau hinterlegte Isolate weisen Verwandtschaft, hellgrau unterlegte Klonalität auf. Alle blau markierten Isolate stellten sich divers dar. Die Buchstaben und Zahlen in den Kreisen entsprechen den Autokennzeichen der jeweiligen Landkreise. Die Zahlen neben den Strichen geben die STRD an. Die Stärke der Striche entspricht der Anzahl an varianten Loci.

### 3.7.1 RT176

Auf Abbildung 17 findet sich eine graphische Darstellung der Einsendestandorte aller von extern stammenden RT176 Isolate. Die Mehrzahl stammt aus den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Bayern. Das Verbreitungsmuster zeigt keine spezifische regionale Verteilung.



**Abbildung 17:** Geografische Verteilung der RT176-Isolate; Zahlen in den Kreisen entsprechen Anzahl an Patienten ( $n=30$ ); (2013-2016), (Quelle: Berger F, Bischoff M, Strauß C, von Müller L, Gärtner B: Auftreten von *C. difficile* Ribotyp 176 in Deutschland, Epid Bull 2017; 10:93 – 95)

### **3.8 Zusammenfassung der MLVA Analysen und der Verlegungshistorien**

Insgesamt war es möglich, anhand der durch die MLVA gewonnenen Ergebnisse Verwandtschaftsbeziehungen einiger der klinisch und epidemiologisch relevantesten RTs von *C. difficile* zu erarbeiten. Von allen typisierten Proben (234) erwiesen sich 184 als verwandt ( $\text{STRD} \leq 10$ ) und 105 als klonal ( $\text{STRD} \leq 2$ ). Es lässt sich festhalten, dass ein Großteil der untersuchten Isolate der Ribotypen RT027, RT046 und RT176 untereinander weitreichende genetische Vernetzungen aufwiesen, ein Umstand, welcher sich sowohl unter den von intern als auch den von extern stammenden Proben beobachten ließ. Weiter stellten sich die per MLVA typisierten Isolate der RTs RT015, RT046 und RT106 als weitestgehend nicht miteinander verwandt dar. In 18 Fällen konnten innerhalb der 85 aufgearbeiteten Verlegungshistorien aber zeitliche und/oder räumliche Berührungspunkte nachgewiesen werden.

### 3.9 Resistenztestungen

Für 202 der 234 per MLVA typisierten Isolate erfolgte durch das NRZ für *C. difficile*, Homburg (Saar) eine Resistenztestung gegenüber den Antibiotika Clarythromycin, Rifampicin, Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin (Tab. 10 und 11). Während sich hierbei die Isolate des RT106 gegenüber keinem der getesteten Antibiotika als resistent erwiesen und bei den RT015 Isolaten nur sehr selten Resistenzen gegen Clarithromycin (1/22) oder Moxifloxacin (1/22) vorgefunden wurden, zeigten die Isolate alle anderen getesteten RTs diversere Resistenzmuster. Die Isolate des RT027 erwiesen sich fast alle als resistent gegenüber Clarithromycin (134/145) und Moxifloxacin (142/145). Des Weiteren waren etwas mehr als ein Drittel der Isolate dieses RTs gegenüber Rifampicin resistent (50/145) und wenige Isolate wiesen eine Resistenz gegen Metronidazol auf (10/145).

Die Isolate des RT046 erwiesen sich als mittelgradig resistent gegenüber Clarithromycin (40%), Rifampicin (30%) und Moxifloxacin (50%) und als vollständig sensibel gegenüber Metronidazol. Die Isolate des RT176 wiesen hohe Resistenzen gegenüber Clarithromycin (16/19) und Moxifloxacin (18/19), sowie in Einzelfällen eine Resistenz gegenüber Rifampicin (3/19) auf. Resistenzen gegenüber Metronidazol ließen sich in den Isolaten dieses RTs nicht feststellen. Sämtliche getesteten Proben erwiesen sich gegenüber dem Antibiotikum Vancomycin als sensibel. Die Ergebnisse der Resistenztestungen werden in Tabelle 11 noch einmal zusammengefasst:

**Tabelle 11:** Resistenzverhalten von sämtlichen getesteten *C. difficile*-Isolaten

<b>Ribotyp</b>	<b>015</b>	<b>027</b>	<b>046</b>	<b>106</b>	<b>176</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Getestet</b>	22	145	10	6	19	202
<b>Clarithromycin (resistent)</b>	1 (4,5%)	134 (92,4%)	4 (40%)	0 (0%)	16 (84,2%)	155 (76,7%)
<b>Rifampicin (resistent)</b>	0 (0%)	50 (34,9%)	3 (30%)	0 (0%)	3 (15,7%)	56 (27,7%)
<b>Metronidazol (resistent)</b>	0 (0%)	10 (6,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (5%)
<b>Vancomycin (resistent)</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Moxifloxacin (resistent)</b>	1 (4,5%)	142 (97,9%)	5 (50%)	0 (0%)	18 (94,7%)	166 (82,2%)

## 4. Diskussion

2010 wurde in einer 89 deutsche Krankenhäuser umfassenden Studie *C. difficile* fast doppelt so häufig wie MRSA als Auslöser von nosokomialen Infektionen erfasst [87]. Die Autoren sahen in der Anzahl an neuauftretenden CDI einen möglichen Indikator für Defizite in der Infektionskontrolle, bzw. für einen erhöhten Einsatz von Antibiotika. Parallel hierzu ließ sich im gleichen Zeitraum ein Anstieg an schweren CDI, sowie ein vermehrtes Auftreten von hypervirulenten RTs nachweisen [4,59,64]. Eine kontinuierliche Überwachung der hypervirulenten RTs ist somit von hoher Relevanz für den klinischen Alltag. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Verwandtschaftsbeziehungen für eine Auswahl an relevanten RTs aufgearbeitet und die Verlegungshistorien sämtlicher intern behandelte Patienten, deren *C. difficile* Isolate eine höhergradige Verwandtschaft ( $\text{STRD} \leq 5$ ) zueinander aufwiesen, ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 200 Isolate von fünf verschiedenen RTs (RT015, RT027, RT046, RT106 und RT176) mittels MLVA subtypisiert und die Verlegungshistorien von 26 Patienten aufgearbeitet.

### 4.1 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte der am UKS gesammelten Isolate

Insgesamt erwiesen sich 51 der 86 am UKS gesammelten Isolate als verwandt ( $\text{STRD} \leq 10$ ) und 17 der Isolate als klonal ( $\text{STRD} \leq 2$ ) zu mindestens einem weiteren Isolat. In einigen Fällen erwiesen sich zwei oder mehrere Isolate in Hinblick auf die untersuchten VNTR Regionen als genetisch identisch (siehe Anhang, Tab. 14). Auffallend war, dass sich die Mehrzahl an verwandten und/oder klonalen Isolaten dem RT027 zuordnen ließ (Abb. 6). Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Literatur, in welcher für den RT027 eine ausgeprägte Tendenz zum Clustering beobachtet wurde [57]. Im Gegensatz hierzu zeigten alle anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RTs nur eine geringe Neigung zur Clusterbildung. Für die Isolate des RT106 konnte sogar keine nähere Verwandtschaft zueinander beobachtet werden (Abb. 4, 11 und 13). Weiter wiesen 26 der am UKS gesammelten Isolate eine STRD von  $\leq 5$  auf. Von diesen konnten durch die Aufarbeitung der entsprechenden Patientenhistorien 18 Fälle (18/86) mit einem möglichen nosokomialen Ereignis in Verbindung gebracht werden. Dies deckt sich ebenfalls mit dem in der Fachliteratur beschriebenen nosokomialen Potential von *C. difficile*. So konnte die Arbeitsgruppe um Rudensky *et al.* [114] Ende des letzten Jahrhunderts bei einer Erhebung zur Durchseuchungsrate bei geriatrischen Patienten mit *C. difficile* den Erreger bei 20,4% der Probanden nachweisen. Als Hauptrisikofaktor für eine Besiedelung mit *C. difficile* wurde die Länge des stationären Aufenthaltes identifiziert. Weiter konnte der Erreger bei 20% des Krankenhauspersonals und in knapp 50% der Fälle in der Patientenumgebungen festgestellt werden [85]. Ähnliche Durchseuchungsraten wurden auch

in einer weiteren Arbeit aus diesem Zeitraum ermittelt [17]. Dies lässt insgesamt darauf schließen, dass nosokomiale Übertragungen, zumindest zum Zeitpunkt der Studien, eine signifikante Quelle für CDI darstellten. Interessanterweise ergab sich innerhalb der hier vorliegenden Arbeit in knapp 30% der Fälle mit zueinander höherverwandten Isolaten und in ca. 80% aller erfassten CDI am UKS kein Anhalt auf nosokomiale Geschehen. Ein Umstand, welcher umso mehr an Bedeutung gewinnt, da Arbeiten der jüngeren Vergangenheit vereinzelt nahelegen, dass der Anteil an nosokomial erworbenen CDI am Anteil aller behandlungsbedürftigen CDI vermutlich geringer ist als weithin angenommen [30,36,135]. So konnten Eyre *et al.* [36] in einer auf Ganzgenomsequenzierung basierenden Arbeit nur ca. 38% der höher verwandte Isolate aller über einen dreieinhalbjährigen Zeitraum charakterisierten Proben direkt mit einem nosokomialen Ereignis in Verbindung bringen und bei ca. 36% ein solches sicher ausschließen. Weiter wurden ca. 45% aller Isolate als genetisch divers eingestuft. Im Rahmen der Arbeit wurden Proben, deren Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single-nucleotide variants, SNVs) eine Varianz von  $\leq 2$  aufwiesen als genetisch höher verwandt und Proben mit einer Varianz von  $> 10$  als genetisch divers bezeichnet. Eine auf Gesamtgenomsequenzierungen basierende Studie, die von Didelot *et al.* [30] durchgeführt wurde, konnte zudem eine direkte Übertragung für die Mehrheit der untersuchten Fälle ausschließen. Vor allem die Bedeutung von asymptomatischen Trägern von *C. difficile* wurde von den Autoren der letzteren Studie hervorgehoben. Ähnliches gilt wahrscheinlich auch für die am UKS gesammelten und hier typisierten Proben, welche, wie oben bereits erwähnt, insgesamt gesehen nur in einem Fünftel aller Fälle (18/86) mit nosokomialen Geschehen in Verbindung gebracht werden konnten (Abb. 5, 7-10 und 12). Allerdings zeigte sich bei den genetisch höherverwandten Isolaten, die im Rahmen dieser Arbeit per MLVA identifiziert wurden, mit 69% ein wesentlich höherer Anteil an wahrscheinlichen nosokomialen Ereignissen, als dies bei den Studien von Eyre und Kollegen [30,36,135] beobachtet wurde. Dies mag unter anderem der Tatsache geschuldet sein, dass im Rahmen dieser Arbeit mit einem  $n$  von 26 eine vergleichsweise geringe Anzahl an höherverwandten Isolaten untersucht wurde, während von Eyre *et al.* [36] mit 333 höherverwandten Isolaten ein wesentlich größeres Kollektiv analysiert wurde. Die Ergebnisse beider Studien zu höherverwandten Isolaten werden in Tabelle 12 noch einmal in Bezug zueinander gesetzt.

**Tabelle 12:** Darstellung der höherverwandten Isolate, bei welchen nosokomiale Ereignisse wahrscheinlich oder unwahrscheinlich waren. Prozentzahlen geben nur Näherungswerte an.

<b>Studie</b>	<b>Anzahl hochverwandter Isolate</b>	<b>Nosokomiale Ereignisse wahrscheinlich</b>	<b>Nosokomiale Ereignisse unwahrscheinlich</b>
Eyre [36,135]	333	126 (28%)	120 (30%)
interne Proben	26	18 (69%)	8 (31%)

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Didelot *et. al.* [30] ergab eine bereits Anfang des Jahrhunderts in Schweden durchgeführte Studie, dass stationär behandelte Patienten zwar über eine wesentlich höhere Inzidenz an CDI verfügen, die Ursache für diese aber eher bei schon endogen in den Patienten vorhandenen *C. difficile* Isolaten und weniger bei im Krankenhaus erworbenen *C. difficile* Isolaten zu suchen war [92]. Dieser Befund könnte eine weitere Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern. So ließen sich teilweise große Zeitspannen zwischen dem Auftreten von CDI bei Patienten, welche zuvor auf ähnlichen Stationen untergebracht waren, feststellen (Abb. 5, 7-10 und 12). Dies ließe sich, ähnlich wie in der zuletzt erwähnten Studie, durch eine endogene Verschleppung des Erregers erklären. Betrachtet man die Ergebnisse der zuvor zitierten Studien in Verbindung mit den am UKS erhobenen Zahlen, so lässt sich vermuten, dass ambulanten Übertragungen erhebliche Bedeutung in der Verbreitung von CDI zukommen dürfte. Erhebungen zu ambulanten Übertragungswegen und asymptomatischen Trägern dürften damit für die zukünftige Eindämmung von Infektionen von hohem Interesse sein.

#### **4.1.1 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT015**

In einigen nationalen Erhebungen gehörten Isolate des RT015 zu den häufigsten Erregern einer CDI [29,119,140] wobei diesem RT in der Fachliteratur eine im Vergleich zu anderen RTs niedrigere Mortalität, sowie ein niedrigeres nosokomiales Potential zugesprochen werden [55]. Weiter wurden vereinzelt bei Erhebungen mittels MLST kleinere Cluster an höherverwandten Isolaten gefunden [119]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Von den 22 hier untersuchten Isolaten des RT015 erwiesen innerhalb eines Clusters drei Isolate als verwandt zueinander ( $\text{STRD} \leq 10$ ), klonale Isolate fanden sich hingegen nicht (Abb. 4). Unter den Patienten des Clusters fanden sich jedoch keine zeitlichen oder räumlichen Berührungspunkte (Abb. 5). Somit decken sich die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten mit denen der Fachliteratur, welche dem RT015 eine eher geringe Tendenz zu nosokomialen Geschehen zuschreiben [29]. Da im Rahmen einiger Arbeiten zuletzt allerdings ein Vermehrtes Auftreten von Isolaten des RT015 beobachtet wurde, scheint ein weiteres Monitoring dennoch sinnvoll [140].

#### 4.1.2 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT027

Bereits seit längerem werden Isolate von RTs, welche zur Bildung der Toxine A und B in der Lage sind, mit fulminanten *C. difficile* Ausbrüchen in Verbindung gebracht [84]. Hierbei wird vor allem der RT027 in der Fachliteratur besonders häufig im Zusammenhang mit schwereren Ausbruchsgeschehen genannt [24,79]. Dies gilt sowohl für Nordamerika [103], als auch für Europa [137]. Gründe hierfür stellen einerseits die weite Verbreitung des RTs (dieser war in der EUCLID Studie der am häufigsten nachgewiesene RT innerhalb Europas [29]) und zum anderen die im Vergleich mit anderen RTs erhöhte Virulenz dar [23,137]. Weiterer begünstigender Faktor ist eine gesteigerte Unempfindlichkeiten gegen Antibiotika und Desinfektionsmittel [63]. Der Erregertyp wurde in mehreren nachgewiesenen Fällen bereits außerhalb von Krankenhäusern erworben und führte bei jungen und vormals gesunden Personen in einigen Fällen zu einer letal verlaufenden Infektion [24,106]. Bereits kurz nach der Erstbeschreibung des RT027 im deutschsprachigen Raum fielen vermehrt *C. difficile* Fälle in den Regionen Saarland und Rheinland-Pfalz auf, bei welchen der RT027 nachgewiesen werden konnte [56]. In einer 2013 veröffentlichten Studie wurden einzelne Clostridien Stämme mittels „single locus sequence typing“ des „Surface layer“ Protein A Gens (slpAST) typisiert und ein deutschlandweites Profil erstellt. Hierbei machten Isolate des RT027 knapp 25% der vom UKS stammenden Isolate aus. Auf nationaler Ebene waren es etwa 11%. Sowohl im Saarland als auch in Deutschland war der RT027 nach dem RT001 der am zweithäufigsten nachgewiesene RT [89]. Dementsprechend ist die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von Isolaten dieses RTs zueinander von großem Interesse für die Identifikation und Nachverfolgung von Ausbruchsgeschehen. Von den 47 am UKS gesammelten Isolaten des RT027 erwiesen sich 33 innerhalb von fünf Clustern als verwandt zueinander und 15 als klonal zu mindestens einem anderen Isolat. In jeweils zwei Fällen ließen sich per MLVA keine genetischen Unterschiede zwischen den Isolaten darstellen. Diese recht hohe Anzahl an verwandten Isolaten (~70%), sowie die in Abbildung 6 graphisch dargestellte Neigung zum Clustering der Isolate ähneln den Ergebnissen einer internationalen Erhebung [57], in welcher ebenfalls von einer erhöhten genetischen Vernetzung des RT027 gesprochen wird. Dem entgegengesetzt steht jedoch eine Studie, welche auf lokaler Ebene nur eine geringe Tendenz zum Clustering für RT027 Isolate nachweisen konnte [37]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse werfen die Frage auf, ob diese unterschiedliche Neigung zum Clustering durch lokale Präventionsmaßnahmen oder den Aufbau der entsprechenden Studien erklärt werden kann? Bei der überwiegenden Mehrzahl der am UKS behandelten Patienten, von welchen die hochverwandten RT027 Isolate stammen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, ließen sich großflächige zeitliche und räumliche Überschneidungen im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes am UKS nachweisen (Abb. 7-10). Dieser Umstand und die große genetischen Ähnlichkeit der Proben (Abb. 6) lassen eine nosokomiale Übertragung bei 18

Isolaten (18/33) vermuten, eine Annahme, die sich mit dem in der Fachliteratur beschriebenen hohen nosokomialen Potential des RT027 deckt [24,79,131]. Dennoch fanden sich in fast jedem der RT027 Cluster ein oder mehrere Isolate von Patienten, welche keinerlei Kontaktpunkte während ihres Aufenthaltes am UKS zueinander aufwiesen (Tab. 12). In diesen Fällen scheinen ambulante Infektionen wahrscheinlicher. Zusammen mit der bereits erwähnten Literatur [30,36,92] lassen die hier gewonnen Ergebnisse darauf schließen, dass zwar vor allem nosokomiale Infektionen zur Verbreitung des RT027 beitragen, aber auch ambulant erworbene Infektionen eine nicht zu vernachlässigende Rolle im klinischen Alltag spielen.

Dialysebehandlungen über längere Zeiträume sind schon länger als potenter Übertragungsweg von nosokomialen Keimen bekannt [3]. Auch werden sie immer wieder als Quelle der Übertragung von antibiotikaresistenten Keimen diskutiert und gelten als gesicherter Risikofaktor für eine Besiedelung mit *C. difficile* [33,75]. Bereits 2013 wurden chronische Dialysen als einer von drei Hauptrisikofaktoren (neben einer stationären Aufnahme und der Verwendung von Corticosteroiden) für eine Besiedelung mit *C. difficile* herausgearbeitet. Die Odd's Ratio für eine Besiedelung mit *C. difficile* unter chronischen Dialysen betrug hierbei 3,09 [75]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten bei einem RT027 Cluster drei Patienten (die Patienten RT027/28, RT027/29 und RT027/30) identifiziert werden, welche Dialysepflichtig waren. Die ambulanten bzw. stationären Dialysebehandlungen der Patienten RT027/29 und RT027/30 überschneiden sich hierbei sowohl zeitlich, als auch räumlich (Abb. 8). Die geringe STRD-Differenz, so wie die zeitlichen und räumlichen Kontaktpunkte der oben erwähnten Patienten legen die Möglichkeit einer Übertragung im Rahmen der teilstationären Dialysebehandlung nahe. Ein künftiges Monitoring von teilstationären Dialysepatienten am UKS könnte hier tiefere Erkenntnisse zum Übertragungsrisiko von *C. difficile* in diesem Bereich liefern.

Abschließend lässt sich für RT027 zusammenfassen, dass die erhobenen Daten neben der nosokomialen Übertragung auch auf eine ambulante Verbreitung des RT027 hindeuten. Besonders teilstationäre Settings, wie etwa Dialysebehandlungen, sind potentielle Infektionswege, denen bei zukünftigen Überwachungsstudien erhöhte Aufmerksamkeit eingeräumt werden sollte.

#### **4.1.3 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT046**

In der *C. difficile* betreffenden Fachliteratur wurde die nosokomiale Transmissionstendenz von Isolaten des RT046 bisher kaum behandelt. Ebenso machten Isolate des RT046 in den Erhebungen der jüngeren Vergangenheit nur eine Minderheit der CDI Fälle aus [41,66]. Allerdings wird der RT mit einer erhöhten Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika in Verbindung gebracht [96]. Da der Erreger in mehreren Schweinemastbetrieben mit

Ausbruchsgeschehen in Verbindung gebracht werden konnte, besteht jedoch der Verdacht, dass es sich um einen potentiell zoonotischen Erreger handelt [66,94,138]. Weiter wurden vereinzelte Häufungen des RTs, beispielsweise in Schweden beschrieben [94]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich lediglich zwei Isolate als genetisch im Bereich der untersuchten VNTR identisch (Abb. 11). Die Aufarbeitung der Verlegungshistorie beider Patienten ergab zwar keine direkten örtlichen Berührungspunkte, aber eine zeitliche Nähe der stationären Aufenthalte (Abb. 12). In diesem Kontext muss allerdings der Altersunterschied der Patienten erwähnt werden. Es handelte sich um einen pädiatrischen und einen geriatrischen Patienten. Auf Grund des großen zeitlichen Abstandes der Isolierung des Erregers und des Fehlens jeglicher räumlichen Berührungspunkte (Abb. 12) erscheint eine nosokomiale Übertragung eher unwahrscheinlich. Diese Annahme ist in Einklang mit der Literatur, in der RT046 Isolate bisher nur selten mit größeren Ausbruchsgeschehen in Verbindung gebracht wurden [28,29,105].

#### **4.1.4 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte des RT106**

Die Anzahl an Untersuchungen zum RT106 ist für Deutschland sehr überschaubar. In mehreren internationalen Arbeiten wird jedoch auf eine starke lokale Relevanz hingewiesen [22,113,123]. So spielt dieser RT vor allem im Vereinten Königreich eine gewichtige Rolle [123]. Ebenso waren Isolate des RT106 in jüngeren Erhebungen in den USA teilweise der am häufigsten nachgewiesene *C. difficile* RT [22,113]. Bei den sechs im Rahmen dieser Arbeit getesteten RT106 Isolaten, welche alle von stationären Patienten des UKS stammten, konnten mittels MLVA keine höhergradigen Verwandtschaftsbeziehungen untereinander nachgewiesen werden (Abb. 13). Dementsprechend scheint ein breiter und diverser Eintrag von außen als wahrscheinlich. Diese Ergebnisse decken sich mit der Fachliteratur, in der diesem RT ein eher geringes nosokomiales Potential zugeschrieben wird [28].

## **4.2 Verwandtschaftsbeziehungen und Berührungspunkte der von extern stammenden Isolate**

Insgesamt erwiesen sich 110 der 149 von Extern stammenden Isolate als verwandt und 69 der Isolate als klonal zu mindestens einem anderen Isolat. In einigen Fällen erwiesen sich zwei oder mehrere Isolate als im Bereich der untersuchten VNTR genetisch identisch (31/149) (siehe Anhang, Tab. 14). Vor allem die Isolate des RT027 erwiesen sich hierbei als genetisch stark vernetzt. Dies deckt sich mit Literaturangaben, in welchen dem RT027 eine ausgeprägte Tendenz zum Clustering bestätigt wird [57]. Im Gegensatz zu den im UKS gesammelten Isolaten konnten auf Grund der Limitierungen der Studie für die von Extern eingesendeten Isolate keine Verlegungshistorien erhoben werden.

### **4.2.1 RT027**

Nachdem der RT027 im Jahre 2007 erstmals in Deutschland nachgewiesen wurde [64], sorgte er fortwährend für fulminante Verläufe von CDI und etablierte sich zunehmend deutschlandweit [64]. Der bis zu obigem Zeitpunkt noch relativ unbekanntes Isolattyp gewann in den Folgejahren stetig an Relevanz im klinischen Alltag. Bereits 2008 zeigten Arbeitsgruppen mögliche Zusammenhänge zwischen der zunehmenden Inzidenz schwerer CDI und der wachsenden Verbreitung von RT027 in Deutschland [64,134]. Im Rahmen der 2012/2013 durchgeführten EUCLID Studie stellten RT027 Isolate mit 19% aller untersuchten Isolate mit Abstand den verbreitetsten RT, sowohl in Europa, als auch in Deutschland, dar [29]. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 67 der 119 Isolate des RT027 als klonal und 95 als verwandt. Weiter konnten in 31 Fällen im Bereich der untersuchten VNTR genetisch nicht unterscheidbare Isolate identifiziert werden (Abb. 6 und 14). Die hier beobachteten ausgeprägten Verwandtschaftsbeziehungen bestätigen den bereits in der Fachliteratur beschriebenen Trend des RT027 zur ausgeprägten Vernetzung [39,64,134]. Weiter stützen sie auch die 2016 in der EUCLID-Studie aufgestellten Vermutungen für Deutschland [29]. Unter anderem, dass sich der RT027 durch seine zunehmende Prävalenz und ausgeprägte Tendenz zur genetischen Vernetzung innerhalb Deutschland etablieren und zu einer Verdrängung anderer RTs führen könnte [28,29]. Erwähnenswert sind hierbei die Ergebnisse einer weiteren Untersuchung in Deutschland, die gezielt *C. difficile* Isolate untersuchte, welche von Patienten mit osteoartikulären Verletzungen stammten [37]. Die mittels MLVA betrachteten Verwandtschaftsbeziehungen in letzterer Studie ergaben, dass nur eine geringe Anzahl der RT027 Isolate nähere genetische Verwandtschaft zueinander aufwiesen. Dies steht im Gegensatz zu den hier erhobenen Zahlen. Dennoch weißt die Mehrzahl von Arbeiten auf die ausgeprägte Tendenz des RT027 zur genetischen Vernetzung hin [28,29,39,64]. Vor allem Arbeiten, welche Proben aus dem Vereinten Königreich einschlossen, wiesen stark ausgeprägte Verwandtschaftsbeziehungen unter den RT027 Isolaten auf [39]. Bei

Erhebungen in England und Nordirland stellten sich 55% aller untersuchten RT027 Isolate als ununterscheidbar oder hoch verwandt dar. Weiter wiesen die Isolate des RT027 ein wesentlich stärkeres Clustering auf, als dies bei allen anderen vorgefundenen RTs zu beobachten war [39]. Innerhalb einer weiteren englischen Studie konnten unter den mittels MLVA analysierten RT027 Isolaten insgesamt 68,2% der Isolate zu sieben höherverwandten Clustern zugeordnet werden [38]. Dieses Phänomen wurde, ebenso wie in einer Untersuchung aus Frankreich [32], auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet. Der Umstand, dass sich mehrere Cluster einzelnen Krankenhäusern, bzw. Stationen zuordnen ließen, legt die Vermutung nahe, dass die Bildung der Cluster durch nosokomiale Geschehen begünstigt wurde. Sollten sich diese Trends wie bisher fortsetzen, dürfte der RT027 auch in Zukunft einen signifikanten Teil aller behandlungsbedürftigen CDI in Deutschland und den Nachbarländern ausmachen.

#### **4.2.2 RT176**

Isolate des RT176 wurden am NRZ erstmals 2013 beobachtet [13]. Davor fanden *C. difficile* Isolate dieses RTs hauptsächlich in auf polnischem, bzw. tschechischem Gebiet durchgeführten Arbeiten Erwähnung. Dort konnte der Erreger bereits 2008/2009 mit zwei Ausbruchsgeschehen in der Region Mazovia in Verbindung gebracht werden [95]. In einer 2016 veröffentlichten Arbeit mit Fokus auf die Verbreitung diverser RTs auf dem Gebiet der Tschechischen Republik ließen sich 57,7% ( $n=64$ ) der untersuchten Isolate dem RT176 zuordnen. Des Weiteren fiel in letzterer Studie eine hohe Anzahl an klonalen Clustern auf. Obwohl diese nicht die Ausmaße oder Häufigkeit der Vernetzungen des RT027 erreichten, überstiegen sie doch bei weitem den Durchschnitt anderer RTs [107].

Im Vergleich hierzu stellten sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate des RT176 als größtenteils divers dar (Abb. 16). Dennoch lagen innerhalb von vier Clustern insgesamt 15 miteinander verwandte (15/30) und zwei klonale (2/30) Stämme vor. Das innerhalb der verwandten Cluster eine starke regionale Häufung vorlag, deutet darauf hin, dass sich der RT176 bereits in einigen Regionen Deutschlands etabliert hat. Dem Umstand geschuldet, dass sich Isolate des RT176 mittels Ribotypisierung nur sehr schwer von Isolaten des RT027 unterscheiden lassen, könnte der RT176 jedoch von vielen Laboren falsch klassifiziert worden sein. Dies fiel im Rahmen vergangener Studien bereits mehrfach auf [119]. Die hier gesammelten Daten lassen vermuten, dass es in Zukunft vermehrt zu Ausbrüchen, einer erhöhten Inzidenz an CDIs oder sogar einem Replacement von bereits etablierten RTs in Deutschland kommen könnte. Ursachen dafür, warum RT176 Isolate, ähnlich wie RT027 Isolate, eine erhöhte Tendenz zum lokalen Clustering aufweisen, könnten in einer ähnlichen genetischen Struktur der beiden RTs liegen, die mittels Ribotypisierung und anderer Typisierungsverfahren nur schwer auseinandergehalten werden können. Um die genauen

Hintergründe dieses Umstandes zu ermitteln, dürften weitere Studien zu Struktur und Verbreitungstendenzen beider RTs nötig sein.

#### 4.3 Antibiotikaresistenz

Erreger mit unterschiedlichen Resistenzprofilen erfordern unterschiedliche Behandlungsstrategien. Dementsprechend lassen sich aus Antibiotikaresistenztestungen und der Erstellung von Erregerprofilen direkte Konsequenzen für die empirische, klinische Therapie ziehen [93]. Im Rahmen der Prävention und Behandlung von CDI kommt der Umstand hinzu, dass eine antibiotikabedingte Zerstörung der natürlichen Flora des Gastrointestinaltrakts eine Besiedelung durch *C. difficile* begünstigt, bzw. deren Vermehrung im Darm ermöglicht. Folglich verfügen Stämme, die Resistenzen gegenüber im Klinikalltag gebräuchlicher Antibiotika aufweisen, über einen relevanten Selektionsvorteil. Weiter können durch die Kombination von Resistenztestungen und Genotypisierungsverfahren wertvolle Informationen über die Pathogenität und Verbreitung einzelner *C. difficile* Isolattypen gewonnen werden [27]. So zeigt die Vergangenheit, dass Isolate, welche sich mittels MLVA zu höherverwandten Clustern zusammenfassen lassen, häufig über ähnlichen Eigenschaften, wie beispielsweise einer Resistenz gegenüber Clindamycin verfügen [31]. Betrachtet man einzelne RTs von *C. difficile*, so fällt auf, dass diese ein sehr diverses Resistenzmuster gegenüber Antibiotika aufweisen. Im Rahmen von Ausbruchsgeschehen wurde vermehrt von Resistenzen gegenüber Tetracyclinen, Erythromycin und Beta-Laktam-Antibiotika berichtet [117]. Des Weiteren liegen Untersuchungen vor, welche für einige RTs eine erhöhte Resistenzhäufigkeit der Isolate gegenüber Clindamycin [58], bzw. Rifampicin und Moxifloxacin bestätigen [42,118]. Im klinischen Alltag war die Behandlung der CDI, bis zur Einführung von Fidaxomicin, in den meisten Fällen auf die Gabe von Metronidazol oder Vancomycin limitiert. Beide Antibiotika stellen auch heute noch die Basistherapie der CDI dar [42]. Aktuelle Studien berichten jedoch bei *C. difficile* bereits von Resistenzen gegen Metronidazol [6,20,101], sowie vereinzelt gegen Vancomycin [1]. In der Praxis werden, trotz besserem Ansprechen der meisten Patienten auf Metronidazol, Vancomycin und Metronidazol als gleichwertig angesehen. Ausnahme bilden hierbei schwere CDI, bei welchen Vancomycin als überlegen beschrieben wird [142].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Resistenzprofile von 202 Isolaten der RTs RT015, RT027, RT046, RT106 und RT176 gegenüber Clarythromycin, Rifampicin, Metronidazol, Vancomycin und Moxifloxacin untersucht. Diese Antibiotika wurden ausgewählt, da in jüngerer Vergangenheit ein gehäuftes Auftreten entsprechender Resistenzen mit der Ausbreitung hypervirulenter RTs in Verbindung gebracht wurde [42]. So wurde in den Jahren 2011-2014 unter der Leitung von Freeman *et al.* [42,43] mit der „*C difficile* European Resistance“ Studie (ClosER-Studie) eine 3-jährige, pan-europäische und multizentrische Überwachungsstudie

durchgeführt, um die Empfindlichkeit von *C. difficile* Isolaten gegenüber der zur Behandlung der CDI genutzten Antibiotika zu identifizieren und longitudinal zu überwachen. Unter den aus Deutschland eingesendeten Proben fanden sich dabei Isolate, welche unter anderem Resistenzen gegen Metronidazol, Rifampicin und/oder Moxifloxacin aufwiesen. Resistenzen gegen Vancomycin konnten in diese Studie keine festgestellt werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen der ClosER-Studie [42,43], sowie andern Arbeiten zu Antibiotikaresistenzen von *C. difficile* [6,20,31,52,58,68,96,101,118,133]. Ähnlich dem hier beobachteten Muster, wurden bei RT015 Isolaten bis dato Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika meist als wenig ausgeprägt bis nicht vorhanden beschrieben [42,52]. Die hier getesteten Isolate des RT027 erwiesen sich nahezu alle als resistent gegenüber Clarithromycin (92%) und Moxifloxacin (98%), was andernorts beschriebenen Erhebungen ähnelt [42,43,133]. Gleiches gilt für die eher geringgradige Ausprägung von Resistenzen gegenüber Metronidazol (7%) und das Fehlen von Vancomycin-Resistenzen. Die ermittelte Verteilung der Resistenzmuster gleicht somit dem in der ClosER-Studie und weiteren Erhebungen aus dem europäischen Raum angegebenen Mustern [42,43,133]. Überraschenderweise ließen sich im Rahmen dieser Arbeit für RT027 Isolate nur bei 35% der Isolate eine Resistenz gegenüber Rifampicin feststellen, obwohl diese in anderen Erhebungen unter den Isolaten dieses RTs als relativ weit verbreitet beschrieben werden [42].

Die Ergebnisse der Resistenztestungen der RT046 Isolate decken sich mit Berichten über einen Ausbruch in Polen [96]. Dort erwiesen sich die meisten der dem RT046 zugeordneten Isolate als resistent gegenüber Moxifloxacin und Rifampicin. Auch stimmen die ermittelten Profile mit denen der ClosER-Studie überein. Das in der ClosER-Studie als neuer Vertreter der Makrolidantibiotika untersuchte Fidaxomicin erwies sich im Gegensatz zu dem hier untersuchten Clarithromycin allerdings in den meisten Fällen noch als wirksam [42]. Unter den hier untersuchten Isolaten fielen hingegen sowohl beim RT046 als auch bei anderen RTs gesteigerte Resistenzmuster gegen Clarithromycin auf (Tab. 11).

Interessanterweise unterscheiden sich die hier erzielten Resistenzmuster der RT106 Isolate von anderen Arbeiten. Dort wird gelegentlich von einer erhöhten Resistenzhäufigkeit des RTs gegen Metronidazol, Clindamycin [42], bzw. weiterer Antibiotika berichtet [133]. Diese Diskrepanz könnte sich aus der geringen Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten RT106 Proben ergeben ( $n = 6$ ).

Die hier untersuchten RT176-Isolate wiesen eine hohe Resistenzhäufigkeit gegenüber Fluorchinolonen (Moxifloxacin) und Makroliden (Clarithromycin) auf. Resistenzen gegenüber den zur CDI Therapie eingesetzten Antibiotika Metronidazol und Vancomycin fanden sich hingegen nicht. Dieses Resistenzmuster deckt sich weitgehend mit den für diesen RT in anderen Arbeiten ermittelten Mustern [68,107]. Überraschenderweise konnte jedoch nur bei

~16% der hier untersuchten RT176-Stämme eine Resistenz gegenüber Rifampicin beobachtet werden, während in Tschechien (mit etwa 65-90%) eine deutlich höhere Anzahl an Stämmen als resistent gegen Rifampicin beschrieben wurden [68,107]. Ob sich diese Differenz aus geographischen Standortfaktoren oder Unterschieden unter den jeweils heimischen Stämmen ergeben, ist durch weiterführende Untersuchungen zu klären.

Vor allem im Hinblick auf Berichte der jüngeren Vergangenheit über die vermehrte Resistenzentwicklung unter *C. difficile* Stämmen [1,6,20,101] sollte auch weiterhin ein konstantes Monitoring erfolgen, um eine evidenzbasierte antimikrobielle Therapie der CDI zu ermöglichen.

#### **4.4 Limitierungen der Studie**

Aufgrund ihres Aufbaus und der angewendeten Verfahren weist die vorliegende Studie einige Limitierungen auf. Da die gesamte Studie am NRZ für *C. difficile* in Homburg durchgeführt wurde, war es nur möglich, auf die Verlegungshistorien der am UKS behandelten Patienten zuzugreifen. Eine Auswertung der Verlegungshistorien der extern behandelten Patienten war nicht möglich. In Hinblick auf die RTs RT015, RT046 und RT106 konnte im Rahmen des Studienzeitraums nur eine geringe Anzahl an Proben gesammelt werden (siehe Anhang, Tab.13). Durch die überschaubare Anzahl an Proben ist die Aussagekraft in Hinblick auf das Clustering der Isolate und die relative Häufigkeit der Antibiotikaresistenzen somit gewissen Einschränkungen unterworfen.

#### **4.5 Fazit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Isolaten einer Auswahl an klinisch relevanten RTs mittels MLVA dargestellt werden. Die MLVA erwies sich hierbei als valides Werkzeug zur Subtypisierung von *C. difficile* Isolaten. Allerdings erwies sich die von anderen Laboren bereits beschriebene Typisierung des RT078 per MLVA [7], als für mich nicht replizierbar. Bei sämtlichen erfolgreichen Typisierungen erlaubte die MLVA ein hohes Maß an Diskrimination bei der Subtypisierung. Dementsprechend scheint sie insbesondere zur Aufarbeitung von Ausbruchsgeschehen besser geeignet zu sein als die in vielen Laboren noch standardmäßig genutzte Ribotypisierung. Die MLVA ermöglichte es, Aussagen über die genetische Vernetzung und die Tendenz zum Clustering der einzelnen RTs zu treffen. Insgesamt konnten für den RT027 und den RT176 mehrere Isolate zu genetisch höher verwandten Clustern zusammengefasst werden. Diese ließen sich für das UKS bzw. Deutschland einzelnen Stationen, bzw. geographischen Regionen zuordnen. Die Ergebnisse stützen die bereits an anderen Stellen für den europäischen Raum und Deutschland erhobenen Daten zur Epidemiologie von *C. difficile* und den hypervirulenten RTs. Außerdem legen sie den Schluss nahe, dass sich die für Europa bzw. Deutschland beobachteten Trends betreffend der genetischen Vernetzung von *C. difficile* und speziell den hypervirulenten RTs

auch in naher Zukunft weiter fortsetzen. Vor diesem Hintergrund erbrachten die aufgearbeiteten Patientenhistorien in Verbindung mit den Ergebnissen der MLVA tiefgehende Einblicke in das Übertragungsverhalten sowie die Verbreitungstendenzen von *C. difficile* am UKS. Wiewohl diese Ergebnisse nosokomiale Geschehen im Rahmen stationärer Klinikaufenthalte als wahrscheinlichen Hauptübertragungsweg von *C. difficile* vermuten lassen, ergaben sich zusätzlich Hinweise auf alternative Verbreitungswege. Besonders seien hier teilstationäre Dialysebehandlungen und der ambulante Übertragungsweg erwähnt. Tiefgehende Untersuchungen auf diesem Gebiet könnten zukünftig von hoher Relevanz für den klinischen Alltag sein. In Anbetracht der teils fulminanten Krankheitsverläufe der CDI erscheint es sinnvoll, die epidemiologischen Entwicklungen am UKS und in Deutschland auch weiterhin zu überwachen.

Sämtliche Isolate der RTs RT015, RT046 und RT106 stellten sich als so divers dar, dass sich ihr Vorkommen am UKS wahrscheinlich durch einen breiten Eintrag von außen erklären lässt. Diese Vermutung wird durch die für die Isolate dieser RTs ergebnislos verlaufenden Auswertungen der betreffenden Verlegungshistorien bekräftigt.

Das Auftreten von Isolaten des RT176 erwies sich für Deutschland von eher sporadischer Natur. Allerdings deuten die regionalen Cluster näher verwandter RT176 Isolate auf eine mögliche Etablierung dieses RTs in einigen Regionen Deutschlands hin. Eine Erhöhung der Inzidenz von durch RT176 Isolate ausgelösten CDIs oder sogar eine Verdrängung etablierter RTs scheint möglich.

Im Rahmen der Auswertung der Resistenzprofile fielen bei den RTs RT027, RT046 und RT176 erhöhte Resistenzhäufigkeiten gegen Rifampicin, aber vor allem gegen Clarithromycin und Moxifloxacin auf. Dies unterstreicht die Wichtigkeit eines restriktiven Antibiotikaverbrauchs, insbesondere da Antibiotikaresistenzen für *C. difficile* sowohl einen wichtigen Selektionsfaktor darstellen, als auch in der Antibiotikatherapie oftmals der führende Auslöser einer CDI liegt. Resistenzen gegenüber den zur Therapie der CDI eingesetzten Antibiotika, wie zum Beispiel Metronidazol, fanden sich nur bei RT027 Isolaten und dies auch nur in sehr wenigen Fällen. In Hinblick auf das CDI Therapeutikum Vancomycin konnte bei keinem RT eine Resistenz nachgewiesen werden, so dass mit diesem Antibiotikum zumindest in absehbarer Zeit noch ein effektives Mittel zur Behandlung der CDI zur Verfügung steht.

Mit Blick auf die Zukunft ist anzunehmen, dass sowohl die klinische als auch epidemiologische Relevanz der hypervirulenten RTs sowohl am UKS, als auch in Deutschland in den nächsten Jahren noch weiter ansteigen werden. Viele der in der Fachliteratur beobachteten Trends zur Vernetzung der *C. difficile* Isolate bei bestimmten RTs konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Vor diesem Hintergrund sind fortlaufende Erhebungen und ein flächendeckendes Monitoring von *C. difficile* Isolaten auf Klinikseite wie nationaler Ebene empfehlenswert.

## 5. Anhang

**Tabelle 13:** Einsenderstationen von aus dem UKS stammenden Isolaten

<b>Station</b>	<b>Gesamt</b>	<b>RT015</b>	<b>RT027</b>	<b>RT046</b>	<b>RT106</b>	<b>RT176</b>
Stationen für Hämato-Onkologie	17	5	9	3	0	0
Stationen für Gastroenterologie	13	6	4	2	1	0
Stationen für Kardiologie	6	0	6	0	0	0
Stationen für Nephrologie	6	1	5	0	0	0
Stationen für Pneumologie	5	1	2	1	1	0
Stationen für Allgemein Chirurgie	9	1	7	0	0	1
Stationen für Unfallchirurgie	5	0	4	1	0	0
Stationen für Herz-/Thorax-Chirurgie	3	1	1	0	1	0
interdisziplinäre Notaufnahme	6	2	3	1	0	0
gynäkologische Stationen	1	0	1	0	0	0
Stationen für HNO	3	3	0	0	0	0
dermatologische Stationen	2	0	2	0	0	0
neurologische Stationen	2	0	2	0	0	0
orthopädische Stationen	1	1	0	0	0	0
pädiatrische Stationen	5	1	0	1	3	0
urologische Stationen	2	0	1	1	0	0

**Tabelle 144:** Zusammenfassung der MLVA-Typisierung. Identische Isolate wurden in der Form 2x2 aufgelistet. Zu lesen: „Zwei mal zwei jeweils zueinander identische Isolate“.

<b>Ribotyp</b>	<b>Anzahl analysierter Isolate</b>	<b>Anzahl verwandter Isolate</b>	<b>Anzahl klonaler Isolate</b>	<b>Anzahl identischer Isolate</b>
RT015	22	3 (13,7%)	0 (0%)	0 (0%)
RT027 (intern)	47	33 (70,2%)	15 (31,9%)	2x2 (8,5%)
RT027 (extern)	119	95 (79,8%)	67 (56,3%)	12x2(20,2%), 1x3 (2,5%), 1x4 (3,4%)
RT046	10	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)
RT106	6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
RT176	30	15 (50%)	2 (6,7%)	0 (0%)

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, Block C, Mendelson B, Parizade M, Paitan Y, Schwartz D, Peled N, Carmeli Y, Schwaber MJ (2015) A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83:21–24
2. Al Saif N, BRAZIER JS (1996) The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol* 45:133–137+
3. Alter MJ, Tokars JI (2001) Preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. *Nephrology Nursing Journal* 537-543
4. Arvand M, Vollandt D, Bettge-Weller G, Harmanus C, Kuijper EJ, *Clostridium difficile* study group Hesse (2014) Increased incidence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Hesse, Germany, 2011 to 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 19:
5. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM (2005) Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 5:549–557
6. Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P, Kuijper EJ, Wilcox MH (2008) Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 62:1046–1052
7. Bakker D, Corver J, Harmanus C, Goorhuis A, Keessen EC, Fawley WN, Wilcox MH, Kuijper EJ (2010) Relatedness of Human and Animal *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078 Isolates Determined on the Basis of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Tetracycline Resistance. *J Clin Microbiol* 48:3744–3749
8. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med* 298:531–534
9. Bartlett JG (2002) *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Curr Infect Dis Rep* 4:477–483
10. Bartlett JG (2006) Narrative Review: The New Epidemic of *Clostridium difficile* – Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 145:758
11. Bartlett JG (2008) Historical Perspectives on Studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 46:4–11
12. Bartlett JG, Gerding DN (2008) Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 46 Suppl 1:12-18
13. Berger F, Bischoff M, Strauß C, von Müller L, Gärtner B (2017) Auftreten von *Clostridium difficile* Ribotyp 176 in Deutschland. *Epidemiol Bull* 10:93–95
14. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC (1999) Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 175:261–266

15. Bletz S, Janezic S, Harmsen D, Rupnik M, Mellmann A (2018) Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Genome-Wide Typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 56:
16. Borek AP, Aird DZ, Carroll KC (2005) Frequency of Sample Submission for Optimal Utilization of the Cell Culture Cytotoxicity Assay for Detection of *Clostridium difficile* Toxin. J Clin Microbiol 43:2994–2995
17. Borriello SP (1998) Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother 41 Suppl C:13–19
18. Boyce JM, Ligi C, Kohan C, Dumigan D, Havill NL (2006) Lack of association between the increased incidence of *Clostridium difficile*-associated disease and the increasing use of alcohol-based hand rubs. Infect Control Hosp Epidemiol 27:479–483
19. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, Stollman N, Rohlke F, Surawicz C (2012) Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *clostridium difficile* infection. Am J Gastroenterol 107:1079–1087
20. Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH (2001) Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. J Antimicrob Chemother 48:741–742
21. Burnham CAD, Carroll KC (2013) Diagnosis of *clostridium difficile* infection: An ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clin Microbiol Rev 26:604–630
22. Carlson TJ, Blasingame D, Gonzales-Luna AJ, Alnezary F, Garey KW (2020) *Clostridioides difficile* ribotype 106: A systematic review of the antimicrobial susceptibility, genetics, and clinical outcomes of this common worldwide strain. Anaerobe 62:102142
23. Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI (2007) Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. J Bacteriol 189:7290–7301
24. Chernak E, Johnson C, Weltman A, Wiggs L, Killgore G, Thompson A, LeMaile-Williams M, Tan E, Lewis F (2005) Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 54:1201–1205
25. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect 15:1053–1066
26. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 22 Suppl 4:S63-81
27. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH (2007) tcdC Genotypes Associated with Severe TcdC Truncation in an Epidemic Clone and Other Strains of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 45:215–221
28. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller

- L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH (2014) Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis* 14:1208–1219
29. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, Group on behalf of the E study (2016) Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance* 21:30294
  30. Didelot X, Eyre DW, Cule M, Ip CL, Ansari MA, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Golubchik T, Batty EM, Piazza P, Wilson DJ, Bowden R, Donnelly PJ, Dingle KE, Wilcox M, Walker AS, Crook DW, A Peto TE, Harding RM (2012) Microevolutionary analysis of *Clostridium difficile* genomes to investigate transmission. *Genome Biol* 13:R118
  31. Drudy D, Goorhuis B, Bakker D, Kyne L, Berg R van den, Fenelon L, Fanning S, Kuijper EJ Clindamycin-Resistant Clone of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027, Europe - Volume 14, Number 9—September 2008 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
  32. Eckert C, Vromman F, Halkovich A, Barbut F (2011) Multilocus variable-number tandem repeat analysis: a helpful tool for subtyping French *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates. *J Med Microbiol* 60:1088–1094
  33. Eliopoulos G, D'Agata EMC (2002) Antimicrobial-Resistant, Gram-Positive Bacteria among Patients Undergoing Chronic Hemodialysis. *Clin Infect Dis* 35:1212–1218
  34. Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV (2007) *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J* 37:561–568
  35. Eyre DW, Fawley WN, Best EL, Griffiths D, Stoesser NE, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, Wilcox MH (2013) Comparison of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Investigation of *Clostridium difficile* Transmission. *J Clin Microbiol* 51:4141–4149
  36. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip CLC, Golubchik T, Batty EM, Finney JM, Wyllie DH, Didelot X, Piazza P, Bowden R, Dingle KE, Harding RM, Crook DW, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS (2013) Diverse Sources of *C. difficile* Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. *N Engl J Med* 369:
  37. Färber J, Illiger S, Berger F, Gärtner B, von Müller L, Lohmann CH, Bauer K, Grabau C, Zibolka S, Schlüter D, Geginat G (2017) Management of a cluster of *Clostridium difficile* infections among patients with osteoarticular infections. *Antimicrob Resist Infect Control* 6:
  38. Fawley WN, Freeman J, Smith C, Harmanus C, van den Berg RJ, Kuijper EJ, Wilcox MH (2008) Use of highly discriminatory fingerprinting to analyze clusters of *Clostridium difficile* infection cases due to epidemic ribotype 027 strains. *J Clin Microbiol* 46:954–960
  39. Fawley WN, Wilcox MH (2011) An Enhanced DNA Fingerprinting Service To Investigate Potential *Clostridium difficile* Infection Case Clusters Sharing the Same PCR Ribotype. *J Clin Microbiol* 49:4333–4337

40. Florea D, Huhulescu S, Indra A, Badicut I, Rafila A, Oțelea D, Adrian Popescu G (2015) PCR coupled with mass-spectrometry for detection of *Clostridium difficile* virulence markers during the emergence of ribotype 027 in Bucharest area. *Rev Romana Med Lab* 23:449–456
41. Foster NF, Collins DA, Ditchburn SL, Duncan CN, van Schalkwyk JW, Golledge CL, Keed ABR, Riley TV (2014) Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in two tertiary-care hospitals in Perth, Western Australia: a cross-sectional study. *New Microbes New Infect* 2:64–71
42. Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, Wilcox MH, Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group (2015) Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 21:248.e9-248.e16
43. Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicholson S, Shearman S, Longshaw C, Wilcox MH (2018) The ClosER study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011–2014. *Clin Microbiol Infect* 24:724–731
44. Gerding DN (1989) Disease Associated with *Clostridium difficile* Infection. *Ann Intern Med* 110:255
45. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes* 5:15–27
46. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, Burghoffer B, Petit J-C (2004) Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 42:1933–1939
47. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 47:1162–1170
48. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJM, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE (2010) Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 48:770–778
49. Guerrero DM, Chou C, Jury LA, Nerandzic MM, Cadnum JC, Donskey CJ (2011) Clinical and Infection Control Implications of *Clostridium difficile* Infection With Negative Enzyme Immunoassay for Toxin. *Clin Infect Dis* 53:287–290
50. Hall IC, O'toole E (1935) Intestinal Flora in New-Born Infants: With a Description of a New Pathogenic Anaerobe, *Bacillus Difficilis*. *Am J Dis Child* 49:390–402
51. Higgins D, Dworkin J (2012) Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* 36:131–148
52. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE (2009) Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents* 34:516–522
53. Hull MW, Beck PL (2004) *Clostridium difficile*-associated colitis. *Can Fam Physician* 50:1536-1545

54. Indra A, Schmid D, Huhulescu S, Hell M, Gattringer R, Hasenberger P, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F (2008) Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. *J Med Microbiol* 57:702–708
55. Inns T, Gorton R, Berrington A, Sails A, Lamagni T, Collins J, Perry J, Hill K, Magee J, Gould K (2013) Effect of ribotype on all-cause mortality following *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 84:235–241
56. Jansen A, Kleinkauf N, Weiß B, Zaiss NH, Witte W, Bornhofen B, Kist M, Eichel-Streiber C von, Neumann M, Michels H, Eckmanns T (2010) *Clostridium-difficile*-Ribotyp 027: Epidemiologie und Klinik des erstmaligen endemischen Auftretens in Deutschland. *Z Für Gastroenterol* 48:1120–1125
57. Jia H, Du P, Yang H, Zhang Y, Wang J, Zhang W, Han G, Han N, Yao Z, Wang H, Zhang J, Wang Z, Ding Q, Qiang Y, Barbut F, Gao GF, Cao Y, Cheng Y, Chen C (2016) Nosocomial transmission of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a Chinese hospital, 2012–2014, traced by whole genome sequencing. *BMC Genomics* 17:
58. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, Killgore GE, Tenover FC, Lyras D, Rood JI, DeGirolami P, Baltch AL, Rafferty ME, Pear SM, Gerding DN (1999) Epidemics of Diarrhea Caused by a Clindamycin-Resistant Strain of *Clostridium difficile* in Four Hospitals. *N Engl J Med* 341:1645–1651
59. Kaffarnik M, Isner C, Hamsen U (2018) *Clostridium-difficile*-Infektionen: Epidemiologie, Klinik, Therapieoptionen und Prävention. *Zentralblatt Für Chir - Z Für Allg Visz Thorax-Gefäßchirurgie* 143:241–249
60. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182:2928–2936
61. Kelly CP, LaMont JT (2008) *Clostridium difficile* — More Difficult Than Ever. *N Engl J Med* 359:1932–1940
62. Kim K, Fekety R, Batts D, Brown D, Cudmore M, Silva JJr, Waters D (1981) Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 143(1):42-50
63. Kist M, Von Eichel-Streiber Chr, Mielke M, Rodloff AC (2006) *Clostridium-difficile*-Infektionen: Nosokomiale Ausbrüche durch einen neuen besonders virulenten Stamm in den USA, Kanada, England, Belgien, Holland und Frankreich. *Epid Bull* 309–311
64. Kleinkauf N, Weiss B, Jansen A, Eckmanns T, Bornhofen B, Kuehnen E, Weil H-P, Michels H (2007) Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Germany. *12:3307*
65. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ (2013) Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Eurosurveillance* 18:20381
66. Knight DR, Squire MM, Riley TV (2015) Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal pigs shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. *Appl Environ Microbiol* 81:119–123

67. Koeser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, Holden MTG, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ (2012) Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 8
68. Krutova M, Matejkova J, Tkadlec J, Nyc O (2015) Antibiotic profiling of *Clostridium difficile* ribotype 176--A multidrug resistant relative to *C. difficile* ribotype 027. *Anaerobe* 36:88–90
69. Kuijper E, T van Dissel J, H Wilcox M (2007) *Clostridium difficile*: Changing epidemiology and new treatment options. *Curr Opin Infect Dis* 20:376–83
70. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*, EU Member States, European Centre for Disease Prevention and Control (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 12 Suppl 6:2–18
71. Kuijper EJ, van Dissel JT (2008) Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. *CMAJ Can Med Assoc J* 179:747–748
72. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP (2002) Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 34:346–353
73. Larson HE, Barclay FE, Honour P, Hill ID (1982) Epidemiology of *Clostridium difficile* in Infants. *J Infect Dis* 146:727–733
74. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016) Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40:95–99
75. Leekha S, Aronhalt KC, Sloan LM, Patel R, Orenstein R (2013) Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization in a tertiary care hospital: admission prevalence and risk factors. *Am J Infect Control* 41:390–393
76. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland J-F, Pons J-L (2004) Multilocus Sequence Typing Analysis of Human and Animal *Clostridium difficile* Isolates of Various Toxigenic Types. *J Clin Microbiol* 42:2609–2617
77. Li R, Xiao D, Yang J, Sun S, Kaplan S, Li Z, Niu Y, Qiang C, Zhai Y, Wang X, Zhao X, Zhao B, Welker M, Pincus DH, Jin D, Kamboj M, Zheng G, Zhang G, Zhang J, Tang Y-W, Zhao J (2018) Identification and Characterization of *Clostridium difficile* Sequence Type 37 Genotype by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 56:e01990-17
78. Lindstedt B-A (2005) Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26:2567–2582
79. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault A-M, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, Vibien A, Brassard P, Fenn S, Dewar K, Hudson TJ, Horn R, René P, Monczak Y, Dascal A (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353:2442–2449
80. Lübbert C, Lippmann N, Braun A von (2018) Neue Leitlinien und Daten zu *Clostridium difficile* – Was ändert sich? *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 143:787–792

81. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, Muto CA, Harrison LH (2006) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J Clin Microbiol* 44:2558–2566
82. Martin-Verstraete I, Peltier J, Dupuy B (2016) The Regulatory Networks That Control *Clostridium difficile* Toxin Synthesis. *Toxins* 8:
83. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C, Loo V, Sammons JS, Sandora TJ, Wilcox MH (2018) Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66:987–994
84. McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW, Zheng L (2005) A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 40:265–272
85. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY, Stamm WE (1989) Nosocomial Acquisition of *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 320:204–210
86. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM (2002) Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 97:1769–1775
87. Meyer E, Gastmeier P, Weizel-Kage D, Schwab F (2012) Associations between nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in 89 German hospitals. *J Hosp Infect* 82:181–186
88. Mitchell MJ, Laughon BE, Lin S (1987) Biochemical studies on the effect of *Clostridium difficile* toxin B on actin in vivo and in vitro. *Infect Immun* 55:1610–1615
89. Mock M, Halfmann A, Herrmann M, vom Müller L (2013) Aktuelles zur Epidemiologie von *Clostridium difficile*. *Epid Bull* 241–244
90. Natarajan M, Walk ST, Young VB, Aronoff DM (2013) A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 22:1–5
91. Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AGF, Boxrud DJ, Harrison LH (2003) Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Distinguishes Outbreak and Sporadic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates. *J Clin Microbiol* 41:5389–5397
92. Norén T, Åkerlund T, Bäck E, Sjöberg L, Persson I, Alriksson I, Burman LG (2004) Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired *Clostridium difficile* infection in a Swedish county. *J Clin Microbiol* 42:3635–3643
93. Norén T, Alriksson I, Åkerlund T, Burman LG, Unemo M (2010) In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993–2007 in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 16:1104–1110
94. Norén T, Johansson K, Unemo M (2014) *Clostridium difficile* PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 20:O2-6

95. Nyč O, Pituch H, Matějková J, Obuch-Woszczatynski P, Kuijper EJ (2011) *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *Lancet Lond Engl* 377:1407
96. Obuch-Woszczatyński P, Dubiel G, Harmanus C, Kuijper E, Duda U, Wultańska D, van Belkum A, Pituch H (2013) Emergence of *Clostridium difficile* infection in tuberculosis patients due to a highly rifampicin-resistant PCR ribotype 046 clone in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 32:1027–1030
97. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M (2001) Evaluation of Methods for Detection of Toxins in Specimens of Feces Submitted for Diagnosis of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. *J Clin Microbiol* 39:2846–2849
98. Ogawa Y, Saraya T, Koide T, Kikuchi K, Ohkuma K, Araki K, Makino H, Yonetani S, Takizawa H, Goto H (2014) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enterocolitis sequentially complicated with septic arthritis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes* 7:21
99. Owens RC, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA (2008) Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 46:S19–S31
100. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014) *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 22:406–416
101. Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, García-Lechuz JM, Bouza E (2002) Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1647–1650
102. Pépin J, Valiquette L, Cossette B (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ Can Med Assoc J* 173:1037–1042
103. Pépin J, Valiquette L, Cossette B (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ Can Med Assoc J* 173:1037–1042
104. Planche T, Wilcox M (2011) Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? *J Clin Pathol* 64:1–5
105. Plaza-Garrido Á, Barra-Carrasco J, Macias JH, Carman R, Fawley WN, Wilcox MH, Hernández-Rocha C, Guzmán-Durán AM, Alvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D (2016) Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. *Epidemiol Infect* 144:976–979
106. Plößer P (2007) *Clostridium difficile* im Überblick - Hygienemaßnahmen. *Hyg Med* 403–405
107. Polivkova S, Krutova M, Petrlova K, Benes J, Nyc O (2016) *Clostridium difficile* ribotype 176 - A predictor for high mortality and risk of nosocomial spread? *Anaerobe* 40:35–40
108. Poutanen SM, Simor AE (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ Can Med Assoc J* 171:51–58
109. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G (2001) The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 7:421–427

110. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, Cosentini E, Feil W, Schiessel R, LaMont JT (1995) *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest* 95:2004–2011
111. Robert-Koch-Institut R, Seedat J (2013) Schwer verlaufende *Clostridium-difficile*-Infektionen: IfSG-Surveillancedaten von 2011 und 2012. *Epidemiol Bull* 25:8
112. Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault A-C, Le Monnier A, Collignon A (2012) *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 55:1209–1215
113. Roxas BAP, Roxas JL, Claus-Walker R, Harishankar A, Mansoor A, Anwar F, Jillella S, Williams A, Lindsey J, Elliott SP, Shehab KW, Viswanathan VK, Vedantam G (2020) Phylogenomic analysis of *Clostridiodes difficile* ribotype 106 strains reveals novel genetic islands and emergent phenotypes. *bioRxiv* 2020
114. Rudensky B, Rosner S, Sonnenblick M, van Dijk Y, Shapira E, Isaacsohn M (1993) The prevalence and nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* in elderly hospitalized patients. *Postgrad Med J* 69:45–47
115. Schneider T, Eckmanns T, Ignatius R, Weist K, Liesenfeld O (2007) *Clostridium-difficile*-assoziierte Diarrhö. *Deutsches Ärzteblatt*. 104
116. Schroeder MS (2005) *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Am Fam Physician* 71:921–928
117. Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeño-Tárraga AM, Wang H, Holden MTG, Wright A, Churcher C, Quail MA, Baker S, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, Dowd L, Fraser A, Feltwell T, Hance Z, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Price C, Rabbinowitsch E, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Unwin L, Whithead S, Dupuy B, Dougan G, Barrell B, Parkhill J (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet* 38:779–786
118. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2011) Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 66:2227–2234
119. Stabler RA, Dawson LF, Valiente E, Cairns MD, Martin MJ, Donahue EH, Riley TV, Songer JG, Kuijper EJ, Dingle KE, Wren BW (2012) Macro and Micro Diversity of *Clostridium difficile* Isolates from Diverse Sources and Geographical Locations. *PLoS ONE* 7
120. Staneck JL, Weckbach LS, Allen SD, Siders JA, Gilligan PH, Coppitt G, Kraft JA, Willis DH (1996) Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. *J Clin Microbiol* 34:2718–2721
121. Steiner E, Dago AE, Young DI, Heap JT, Minton NP, Hoch JA, Young M (2011) Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol* 80:641–654
122. Stubbs SLJ, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI (1999) PCR Targeted to the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region of *Clostridium difficile* and Construction of a Library Consisting of 116 Different PCR Ribotypes. *J Clin Microbiol* 37:461–463

123. Sundram F, Guyot A, Carboo I, Green S, Lilaonitkul M, Scourfield A (2009) *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors. *J Hosp Infect* 72:111–8
124. Sunenshine RH, McDonald LC (2006) *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 73:187–197
125. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH (1974) Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med* 81:429–433
126. Trautmann H, Briesch M, Gemein S, Leiß O, Müller L von (2019) Hygienemaßnahmen bei *Clostridioides difficile*-Infektion (CDI): Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 62:906–923
127. Tuntiwechapikul W, Salazar M (2002) Mechanism of in vitro expansion of long DNA repeats: effect of temperature, repeat length, repeat sequence, and DNA polymerases. *Biochemistry* 41:854–860
128. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CHW, Kuijper EJ (2007) Typing and Subtyping of *Clostridium difficile* Isolates by Using Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. *J Clin Microbiol* 45:1024–1028
129. Vergnaud G, Denoëud F (2000) Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Res* 10:899–907
130. Viscidi R, Willey S, Bartlett J (1981) Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* 81:5-9
131. Vollandt D, Arvand M (2013) Zur Verbreitung des hochvirulenten *Clostridium difficile* Ribotyps 027 in Hessen. *Hess Ärztebl* 2013:16–18
132. von Braun A, Lübbert C (2018) Therapie akuter und rezurrenter *Clostridium-difficile*-Infektionen. *Internist* 59:505–513
133. von Müller L, Halfmann A, Herrmann M (2012) Aktuelle Daten und Trends zur Antibiotikaresistenzentwicklung von *Clostridium difficile*. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 55:1410–1417
134. Vonberg RP, Gastmeier P (2008) *Clostridium difficile*: Zum Stand der Meldungen schwer verlaufender Infektionen in Deutschland. *Epid Bull* 117–119
135. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Harding RM, O'Connor L, Griffiths D, Vaughan A, Finney J, Wilcox MH, Crook DW, Peto TEA (2012) Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Med* 9:e1001172
136. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM (2002) Conditions Associated with Leukocytosis in a Tertiary Care Hospital, with Particular Attention to the Role of Infection Caused by *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 34:1585–1592
137. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald L (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366:1079–84

138. Werner A, Mölling P, Fagerström A, Dyrkell F, Arnellos D, Johansson K, Sundqvist M, Norén T (2020) Whole genome sequencing of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 046 suggests transmission between pigs and humans. PLOS ONE 15:e0244227
139. Wilcox MH, Cunniffe JG, Trundle C, Redpath C (1996) Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 34:23–30
140. Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN, Shemko M, Coen P, Birtles A, Cairns M, Curran MD, Dodgson KJ, Green SM, Hardy KJ, Hawkey PM, Magee JG, Sails AD, Wren MWD (2012) Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection Following the Introduction of a National Ribotyping-Based Surveillance Scheme in England. Clin Infect Dis 55:1056–1063
141. Zaiss NH, Weile J, Ackermann G, Kuijper EJ, Witte W, Nuebel U (2007) A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. Wkly Releases 1997–2007 12:3306
142. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KMLST, Davis MB (2007) A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 45:302–307

## **Lebenslauf**

Aus Datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf in der Online-Version entfernt.

## **Kolloquiumsvermerk**

Tag der Prüfung:

05.10.2021

Dekan:

Univ. Prof. Dr. med Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. Markus Bischoff

Prof. Dr. Thomas Volk