

Infektiologie und Mikrobiologie (Schwerpunkt: Bakteriologie)

Redaktion: W. Ehret

Das difficile Clostridium

The difficile Clostridium

Christoph von Eichel-Streiber^{1,*} und Veit Braun²

¹ Konsiliarlabor für *Clostridium difficile* des Robert-Koch-Instituts Berlin, Deutschland

² tgcBIOMICS GmbH, Carl-Zeiss-Str 51, D-55129 Mainz, Deutschland

Zusammenfassung

Clostridium difficile ist nach 3–5 Tagen Krankenhausaufenthalt der bedeutendste Erreger für infektiöse Durchfallerkrankungen und die am häufigsten diagnostizierte Ursache von Durchfällen. Die Epidemiologie der *Clostridium difficile* assoziierten Durchfälle (CDAD) beginnt sich zu ändern. Gehäufte Infektionen werden heute nicht mehr nur im Krankenhaus, sondern auch im Bereich der niedergelassenen Ärzte gefunden und auch andere Medikamente neben den Antibiotika kommen als Auslöser in Betracht. Ab dem Jahr 2002 wurden zunächst in Nordamerika Ausbrüche mit einer höheren Anzahl an fatalen Verläufen beschrieben. Aus Kanada wird berichtet, dass die Mortalität in der klassischen Gruppe der über 60-jährigen Patienten steigt, aber auch jüngere Menschen an schweren Verläufen erkranken. Ursächlich in Zusammenhang mit diesen Ausbrüchen wird ein Fluoroquinolon-resistenter, hypervirulenter *Clostridium difficile* Stamm gebracht, der unter der Bezeichnung Ribotyp-027 im April 2007 erstmals auch in Deutschland isoliert werden konnte. Die Ausbreitung dieses hypervirulenten Stammes auf die Bundesrepublik ist im Gange, so dass absehbar scheint, dass sich nicht nur Inzidenz und Schweregrad CDAD in Deutschland erhöhen wird, sondern auch bei uns zunehmend jüngere Personen betroffen sein werden. Das Robert-Koch-Institut hat auf diese Veränderungen mit einer Verschärfung der Meldepflicht der CDAD reagiert. Im vorliegenden Artikel werden historische sowie aktuelle Aspekte des Keims *Clostridium difficile* und seiner Toxine mit Fokus auf Diagnose, Therapie und Hygienemaßnahmen gegenüber dem

Krankheitserreger zusammengefasst. Als Erfahrungsbericht aus unserer nun 10-jährigen *C. difficile*-Konsiliartätigkeit in Deutschland für das RKI werden häufig gestellte Fragen diskutiert.

Schlüsselwörter: Antibiotika; *Clostridium difficile*; CDAD; Durchfall; Enterotoxin; hypervirulenter Erreger; Meldepflicht; Pseudomembranöse Kolitis; Ribotyp 027; Zytotoxin.

Abstract

Following 3–5 days of hospital stay, *Clostridium difficile* is the most frequent causative agent of infectious diarrhea with high rates of diagnosis. Currently, the epidemiology of *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) is beginning to change. Outbreak is no longer exclusively allocated to the hospital environment, but is also seen in outpatients with increasing incidence. Further, in addition to antibiotic medication inducing the majority of cases, other medications are now known to cause CDAD. Since 2002, severe outbreaks were reported in North America, and in Canada an increased mortality for the typical over 60-year-old patient was found, with even younger patients suffering from fatal causes of the disease. There is a belief in the literature that medication with modern Fluoroquinolones may be a driver of hypervirulent isolates, which are classified 027-ribotype strains. First isolated in April 2007, in an outbreak in Germany, the spread of these hypervirulent strains is now ongoing in Germany. It seems obvious that not only the incidence and the severity of the disease in Germany will increase, but that the group of younger patients will similarly be affected. The German National Health Institute (RKI, Robert-Koch Institute, Berlin, Germany) has responded to this challenge with the obligation to report cases of 027-ribotype infection and the obligation to report fatal/severe cases. The present article focuses on historical aspects of *Clostridium difficile* and its toxins, and summarizes data on diagnosis, therapy and hygiene to manage the disease. Based on 10 years experience in our laboratories as the German consultant for *Clostridium difficile* and its diseases, we further comment on frequently asked questions from everyday practice.

*Korrespondenz: Prof. Dr. Christoph von Eichel-Streiber, Konsiliarlabor für *Clostridium difficile* des Robert-Koch-Instituts Berlin, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Hochhaus am Augustusplatz, D-55101 Mainz, Deutschland
Tel.: +49-6131-3932204
Fax: +49-6131-3933364
E-Mail: veichel@uni-mainz.de

Keywords: Antibiotic; Clostridium difficile (CDAD); cytotoxin; diarrhea; enterotoxin; hypervirulent isolates; obligation to report; Pseudomembranous colitis; 027-ribotype.

Antibiotika – ein Segen!

Antibiotika sind zweifelsohne segensreich, sie haben die Sterblichkeit an Infektionserkrankungen im vergangenen Jahrhundert drastisch gesenkt. Manch einer aus der Elterngeneration wäre heute nicht mehr am Leben, ohne die effektiven Antibiosen, die geholfen haben, selbst schwerwiegende bakterielle Infektion zu überstehen.

Heute weiß man aber auch, dass Antibiotikatherapien mit deutlichen Komplikationen verbunden sein können. Dabei handelt es sich um die spezifischen pharmakologischen Nebenwirkungen der jeweiligen Substanzen sowie die generelle Nebenwirkung, die in der Selektion resistenter Keime beruht – eine zunehmende Bedrohung des medizinischen Alltags, aber auch um Nebenwirkungen, die fast alle Antibiotika hervorrufen, wie etwa Durchfälle im Gefolge der Therapie.

Eine der bekanntesten generellen Nebenwirkungen besteht heute in der Ausprägung eines *Clostridium difficile* assoziierten Durchfalls (CDAD) oder deren fataler Form, der Pseudomembranösen Colitis (PMC) [1]. Seit September 2007 treten auch in Deutschland gefährlichere Varianten der Erreger auf, so dass *C. difficile*-Erkrankungen vom Arzt und von den Patienten heute zu Recht als bedrohliche Erkrankung wahrgenommen werden.

Der vorliegende Artikel verfolgt das Ziel, historische und aktuelle Aspekte des Keims *C. difficile*, seiner Toxine

sowie Fragen zur Diagnose, Therapie und Hygienemaßnahmen zusammenzufassen.

Die Entdeckung der Erkrankung

Ende der 1970er Jahre schlichen sich *Clostridium difficile*-Infektionen mit der Einführung einer neuen Substanzklasse in den klinischen Alltag ein. Die Antibiose mit Clindamycin war mit massiven Nebenwirkungen verbunden, die mitunter zu schwerwiegenden Erkrankungen der behandelten Patienten führten. Massive Durchfälle traten auf, die im Extremfall im klinischen Bild der Pseudomembranösen Colitis mündeten [2, 3]. Der Zusammenhang mit der Clindamycinbehandlung war derart offensichtlich, dass das Krankheitsbild den Namen „Clindamycin assoziierter Durchfall“ erhielt [2, 3]. Bis heute zählt das Antibiotikum zu den potentesten Induktoren der *C. difficile* Erkrankungen (Tabelle 1).

Auf der Suche nach den Ursachen „Clindamycin assoziierter Durchfälle“ wurde beobachtet, dass Überstände des Stuhls von symptomatischen Patienten auf kultivierten Zellen einen zytopathischen Effekt ausübten. Wegen der typischen Zellabrundung wurde initial an eine Viruserkrankung gedacht, doch stellte sich schnell heraus, dass die Aktivität nicht über Zellpassagen propagiert werden konnte. Man dachte dann an ein toxisches Geschehen, und als schließlich die schädigende Wirkung der Überstände durch ein Antiserum gegen *Clostridium sordellii* Toxine verhindert werden konnte [4], wurde klar, dass die Erkrankungen durch die Toxinbildung von Clostridien hervorgerufen werden [5]. Schließlich wurde *Clostridium difficile* als Erreger und Produzent von zwei Toxinen identifiziert, die die Erkrankung verursachen [6,

Tabelle 1 AAD nach *C. difficile* Erkrankung und aus anderer Ursache^a.

Charakteristika	CDAD	Durchfall anderer Ursache
Häufigste Antibiotika	Clindamycin, Cephalosporine, Fluorochinolone, Penicilline	Clindamycin, Cephalosporine, oder Amoxicillin- Clavulansäure
Anamnese	Üblicherweise keine Antibiotika-Unverträglichkeit	Oftmals eine Vorgeschichte von Durchfällen nach Antibiotikagabe
Klinisches Bild		
Durchfall	oft floride Durchfälle; Zeichen der Kolitis mit Krämpfen, Fieber, und Leukozyten im Stuhl	Normal keine massiven Durchfälle, keine Zeichen der Kolitis
Ergebnisse Computertomographie oder Endoskopie	häufig Hinweise auf Kolitis (nicht aber Enteritis)	Üblicherweise normal
Komplikationen	Hypoalbuminaemie, Anasarca, toxisches Megakolon, Rückfälle nach Metronidazol oder Vacomycintherapie	Selten Fälle der Dehydratation
<i>C. difficile</i> Toxin Testung	Positiv	Negativ
Epidemiologie	Epidemisch oder endemisch in Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen	Sporadisch
Behandlung		
Sistieren der Antibiose	Kann sistieren, oft aber anhaltend oder sich steigend	In der Regel abklingen
Antiperistaltische Mittel	Kontraindiziert	Oftmals sinnvoll
Orales Metronidazol/Vancomycin	Prompte Wirkung	Nicht indiziert

^amodifiziert nach Bartlett, 2002.

7]. Mit zunehmender Datenlage, die belegte, dass neben Clindamycin auch andere Antibiotika als Verursacher der Durchfälle in Frage kamen, wurde die Erkrankung in AAD (Antibiotika-assoziiierter Durchfall) geändert.

Heute werden die durch *Clostridium difficile* induzierten Durchfallerkrankungen als CDAD (*Clostridium difficile* assoziierter Durchfall) bezeichnet [8, 9]. Mit dieser Bezeichnung wird betont, dass es sich bei dem Krankheitsbild um Durchfälle handelt, die von *C. difficile* und keinem anderen Erreger ausgelöst werden (Tabelle 1). Etwa 10 bis 20% der nach Antibiotika auftretenden Durchfälle, aber die überwiegende Anzahl der Kolitiden sind auf eine *C. difficile* Infektion zurückzuführen [10]. Aufgrund der Beobachtung, dass *C. difficile* Durchfälle auch im Gefolge von Behandlungen mit Medikamenten jenseits von Antibiotika auftreten, wie zum Beispiel durch Protonenpumpeninhibitoren [11, 12], wurde der Verweis auf die Antibiose aus dem Kürzel gestrichen.

Die hypervirulenten Isolate

Seit wenigen Jahren treten nun neue Stämme auf, zunächst in Kanada und den USA [13, 14], dann aber auch übertragen auf Europa [15]. Die Stämme zeichnen sich durch erhöhte Virulenz aus. Anders als bisher erkranken selbst jüngere gesunde Erwachsene mitunter schwer [16], und unter älteren Patienten wird eine erhöhte Letalität beschrieben [12, 13].

Versuche, die verursachenden Keime zu charakterisieren, mündeten in einem Mosaik von Ziffern und Buchstaben, die auf eine Vielfalt von Typisierungsmethoden zurückzuführen sind. Kaum ein Labor beherrscht gleich-

zeitig mehrere dieser Methoden. Nach Charakterisierung der ribosomalen r-RNA handelt es sich um den Typ 027, die Analyse durch Restriktionsendonukleasen liefert die Klassifizierung NAP1/2, in der PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) zeigt sich ein B1 Muster und bei Betrachtung des Typs der Toxine findet sich die Klassifizierung Toxinotype III [13, 14].

Zusammengefasst handelt es sich bei den hypervirulenten *C. difficile* Erregern um Ribotyp 027, REA-NAP1/2, PFGE-B1 und Toxinotyp III Stämme. Da die Typisierungen nicht eindeutig sind, es auch „normale 027“ Erreger, oder Toxinotyp III Isolate abseits des 027 Ribotypen gibt, reicht die einzelne Typreaktion nicht für die Klassifizierung der Isolate aus. Um „normale Erreger“ von hypervirulenten abzugrenzen, muss auf Besonderheiten der hypervirulenten Erreger zurückgegriffen werden. Sie weisen ein bestimmtes Muster an spezifischen Genen auf (Abbildung 1). Drei Toxingene müssen nachgewiesen werden, das *tcdA* und das *tcdB* Gen, die für das Enterotoxin TcdA und das Zytotoxin TcdB kodieren, sowie das Genpaar *cdtA/B*, das die Information für das binäre Toxin CdtA/B trägt. Darüber hinaus ist das regulatorische Gen *tcdC* in hypervirulenten Stämmen regelmäßig durch Deletion verkürzt.

In Deutschland sind wenige spezialisierte Laboratorien auf die Diagnosestellung eingerichtet. Von den Typisierungsmethoden wird vornehmlich die Ribotypisierung und gegebenenfalls die PFGE eingesetzt. In unserem Labor erfolgt nach Isolierung des Erregers die Befundung innerhalb von 3 bis 5 Tagen.

Für die USA werden Zahlen über die Häufigkeit von CDAD Erkrankungen angegeben. Danach traten in der Zeit von 1987 bis 1998 in Einrichtungen, die an dem

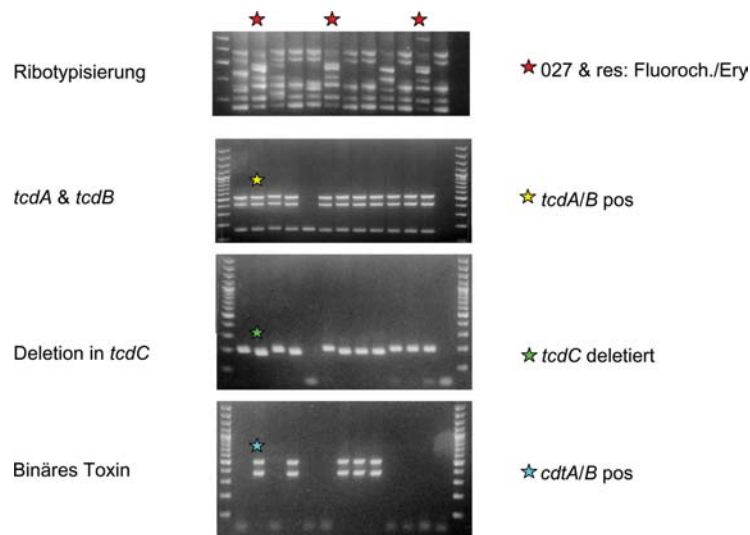


Abbildung 1 Ribotypisierungsmuster und partielle Genotypisierung von klinischen Isolaten.

Das Bild zeigt die Auftrennung von PCR-Amplifikaten im Agarose Gel. Die Angaben links geben die Zielsetzung des Versuchs an; rechts ist die Interpretation der Versuche angeführt, die sich speziell auf die Proben 2, 6 und 11 beziehen, bei denen sich das Muster des hypervirulenten 027 Ribotyps zeigen lässt. Bei der Proben in den Spuren 4,7,8,10,11 handelt es sich um Ribotyp 001 Stämme, die im untersuchten Krankenhaus als zweiter endemischer Stamm auftraten. Auch diese Isolate waren Erythromycin und Moxifloxacin resistent, auch unter diesen Patienten wurden fatale Verläufe beobachtet; das Isolat in Spur 5 enthält keines der drei (vier) Toxingene und ist atoxinogen (d.h. apathogen)!

nationalen Überwachungsprogramm von Infektionskrankheiten teilnehmen, 12,2 Fälle pro 10.000 Patiententage auf [16]. In den USA werden für den stationären Gesundheitssektor jedes Jahr etwa 3 Millionen Fälle gemeldet, in der freien Praxis ca. 20.000 [17].

Im Quebec Ausbruch in Kanada 2004 stieg die Inzidenz der Erkrankung von 35,6 (1991) auf 156,3 Fälle (2003) pro 100.000 Einwohner, verbunden mit einem Anstieg der Mortalitätsrate von 4,7% (1991) auf 22% (2004) [18]. Für Patienten mit einer CDAD wird in zwei Berichten eine Verlängerung der Liegezeit um 18,0 bzw. 16,6 Tage angegeben [19, 20]. Suneshine und MacDonald [16] zitieren Arbeiten, die die Kosten pro CDAD-Patient auf 3669 bis 7234 Dollar beziffern. Diese Zahlen verdeutlichen den erheblichen wirtschaftlichen Schaden, den die Erkrankungen durch *C. difficile* bewirken. Die so erzeugten „stillen Kosten“ dürfen bei Überlegungen über die Kosten für der Diagnose und Therapie der CDAD nicht unberücksichtigt bleiben und müssen als Information bei der Beurteilung der betriebswirtschaftlichen Bedeutung der CDAD (nicht nur im (eigenen) Krankenhaus) für das Gesundheitssystem angemessen Berücksichtigung finden.

Aktuelle Bedrohung für Deutschland

Seit dem Nachweis eines Ausbruchs mit hypervirulenten Erregern im Raum Trier im September 2007 [21], bzw., wie sich erst später herausstellte, erstmals im April 2007 [22], haben wir als Konsiliarlabor hypervirulente 027 Ribotyp Isolate in Proben aus Rheinland-Pfalz, Saarland, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Baden-Württemberg gefunden (Daten bis April 2008). Das bedeutet, dass die hypervirulenten *C. difficile* Erreger des Ribotyps 027 in Deutschland präsent sind. Wie bereits angeführt, sind so neben den über 65-jährigen auch jüngere Patienten (d.h. außer kleinen Kindern alle Altersgruppen) einem erhöhten CDAD-Risiko ausgesetzt.

Das Robert-Koch-Institut hat mit einer Anpassung des Meldewesens auf diese erhöhte Gefährdung reagiert [23]. Für *C. difficile* Erkrankungen wurde die im Vorfeld der Ereignisse vom September 2007 bereits von Experten intensiv diskutierte Meldepflicht eingeführt.

Eine namentliche Meldepflicht [Meldepflicht] an das Gesundheitsamt besteht bei gehäuftem Auftreten von akuter infektiöser Gastroenteritis nach § 6 Abs 1 No 2b sowie bei schwerwiegenden *C. difficile* Erkrankungen nach §6, Abs. 1, Nr. 5a des Infektionsschutzgesetzes. Das Robert-Koch-Institut definiert den Nachweis des Ribotyps 027 und/oder die Erfüllung eines der folgenden vier Kriterien als schwerwiegende Erkrankung:

1. Notwendigkeit einer Wiederaufnahme aufgrund einer rekurrenten Infektion.
2. Verlegung auf eine Intensivstation zur Behandlung der CDAD oder ihrer Komplikationen.

3. Chirurgischer Eingriff (Kolektomie) aufgrund eines Megakolon, einer Perforation oder einer refraktären Kolitis.
4. Tod innerhalb von 30 Tagen nach Diagnosestellung und CDAD als Ursache oder zum Tode beitragende Erkrankung.

Eine nicht namentliche Meldepflicht besteht ferner nach § 6 Abs. 3 IfSG bei gehäuftem Auftreten von nosokomialen Erkrankungen, wie es die *C. difficile*-Erkrankung ist.

Clostridium difficile – der Keim

Historisch-difficile!

Historisch ist der erste dokumentierte Fall auf das Jahr 1893 zu datieren [24]. Der Erregernachweis gelang erstmals 1935 [25]. Seinerzeit zeigte sich das Bakterium als schwierig in der Anzucht, weshalb es die Bezeichnung schwierig (*difficile*) erhalten hat. Heute bedient man sich der CCF-Selektivplatten nach George [26], die Cycloserin und ein Cephalosporin sowie Fruktose als fermentierbaren Zucker enthalten. In kommerziellen Platten fehlt in der Regel das Taurocholat (wirkt nur als Reinsubstanz in p.a.-Qualität!), das das Wachstum vegetativer Bakterien aus den Sporen fördert. Auf CCF-Platten zeigt *C. difficile* ein charakteristisches Wachstum (Abbildung 2) und einen typisch-unangenehmen „difficile“-Geruch nach p-Kresol (Pferdestall).

Gelegentlich wird den Platten Blut zugesetzt, da auch *C. perfringens* auf den CCF-Platten wachsen kann, *C. difficile* aber nicht dessen typische Hämolyse auf-

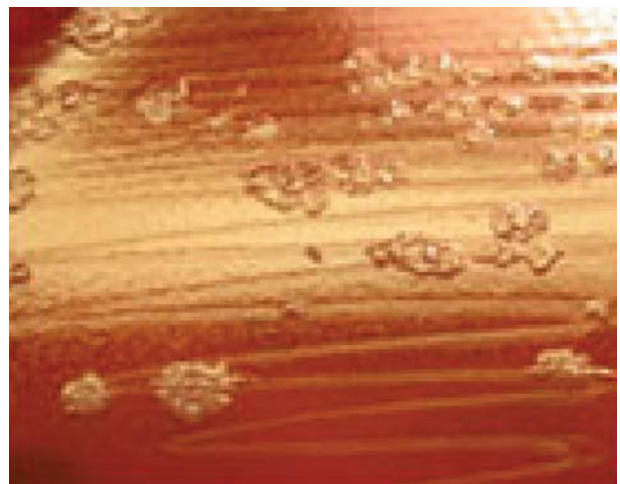


Abbildung 2 Typisches Wachstum von *Clostridium difficile* auf CCF-Agar.

C. difficile wächst leicht grau durchscheinend auf den Selektivplatten nach George. Die Koloniegröße ist heterogen, oft zeigen sich Kolonien mit Ausfransungen am Rand. Der Geruch ist typisch und weist zusammen mit der Gramfärbung den Weg zur Verdachtsdiagnose *C. difficile*.



Abbildung 3 *Clostridium difficile* in der Gram-Färbung. *C. difficile* ist ein zierliches (nie plumpes, kastenförmiges) Stäbchenbakterium, dass sich Gram positiv anfärbt; es erinnert an Bacillus, ist aber nie „Gram-getigert“ und wächst nicht aerob wie Bacillen; die Länge der Bakterien ist nicht einheitlich und kann von Isolat zu Isolat schwanken.

weist. Für *C. difficile* spricht die zierliche Form der nach Gram gefärbten Bakterien (Abbildung 3), mit deren Hilfe eine Abgrenzung vom plumpen *C. perfringens* leicht möglich ist.

Charakteristika

Wie andere Clostridien ist *C. difficile* ein Gram-positives Stäbchenbakterium, das anaerob wächst und Sporen ausbilden kann. Der Erreger wächst nicht unter aeroben Bedingungen, stirbt aber wegen der einsetzenden Sporenbildung unter Sauerstoffeinfluss auch nicht sofort ab. Typisch für Clostridien ist die Produktion von Toxinen und *C. difficile* ist hier keine Ausnahme.

Man unterscheidet *C. difficile* Isolate, die Toxine produzieren von solchen, die das nicht können. Toxinfreie *C. difficile*-Isolate sind generell ungefährlich. Für solche Bakterien wurde sogar beschrieben, dass sie vor Besiedlung mit ihren gefährlichen, toxintragenden Geschwistern schützen können [27]. Die Aussage, es liege ein atoxinogenes *C. difficile*-Isolat vor, bezieht sich heute auf das Fehlen aller drei oben erwähneter Toxingene *tcdA*, *tcdB* und *cdtA/B* (bzw. der entsprechenden Proteine) [28].

Erkrankung nur durch toxische Erreger

Es bedarf der Besiedlung mit Enterotoxin TcdA und/oder Zytotoxin TcdB produzierenden *C. difficile*-Erregern, damit der Mensch erkrankt. Eine solche Besiedlung wird abhängig vom Umfeld und der jeweiligen Studie in ca. 3 bis 5% der asymptomatischen Normalbevölkerung festgestellt. Die Besiedlungsrate steigt auf bis zu 20%, sobald man stationär eingewiesen wird [16].

Der Keim wird auf klassische Weise nosokomial, d.h. im Krankenhaus, übertragen. *C. difficile* ist in Patientenzimmern praktisch überall zu isolieren. Die Übertragung

erfolgt fäkal-oral, durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen ist die Infektkette zu durchbrechen. Rigs et al. [29] konnten zeigen, dass asymptomatische Träger von epidemischen, aber auch nicht-epidemischen Stämmen zur Ausbreitung der Keime in Pflegeeinrichtungen beitragen können. Vorausgehende *C. difficile*-Erkrankungen und kürzliche Antibiotikatherapie erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Trägerschaft.

Die Besiedlung allein ist jedoch nicht mit einer symptomatischen Infektion gleichzusetzen. *C. difficile* ist ein fakultativ pathogener Keim, dessen kultureller Nachweis allein nicht den Beweis einer Erkrankung erbringt!

Die 3-bis-5-Tage-Regel

Beim Auftreten von Symptomen im Krankenhaus gilt die generelle Regel, dass Durchfälle, die 3 bis 5 Tage nach Krankenhauseinweisung erstmalig auftreten, und bei denen keine offensichtliche Exposition gegenüber anderen klassischen Durchfall-Bakterien oder Viren im Krankenhaus anzunehmen ist, in erster Linie auf *C. difficile* als Verursacher zurückzuführen sind! [30].

Toxine – die Hauptpathogenitätsfaktoren von *C. difficile*

Unser Labor hat sich seit vielen Jahren auf die Erforschung der Pathogenitätsfaktoren spezialisiert, die die Erkrankungen als Folge von *C. difficile*-Infektion auslösen, und war an der Erhebung einer Reihe von grundlegenden Erkenntnissen beteiligt.

Der Pathogenitätslokus PaLoc

Das Krankheitsbild wird wesentlich durch die beiden Haupttoxine TcdA und TcdB bestimmt. Stämme, die diese Toxine nicht exprimieren, lösen keine Erkrankung aus. Die Rolle des binären Toxins CdtA/B [31] für die Erkrankung ist weitgehend ungeklärt.

Die Toxingene *tcdA* und *tcdB* finden sich regelmäßig in Gesellschaft von drei weiteren Genen in einem Genabschnitt, der heute weltweit als PaLoc (Abbildung 4) bezeichnet wird [32]. Atoxinogene *C. difficile*-Isolate tragen anstelle des 19.6 Kilobasenpaare (kb) großen PaLoc einen Sequenzabschnitt von lediglich 115 bp [32].

Der PaLoc zeigt eine Reihe von Eigenschaften, wie sie ansonsten nur für echte Pathogenitätsinseln von Bakterien beschrieben werden [33]. Er enthält zusätzlich zu den Toxingenen zwei regulatorische Elemente, den Antisigmafaktor TcdC und den Sigmafaktor TcdR (ursprünglich als TcdD bezeichnet [28]). Einige Details der prinzipiellen regulatorischen Funktion der beiden Proteine TcdC und TcdR sind heute bekannt [34, 35]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Toxinproduktion neben der Regulation auf Ebene des PaLoc einer übergeordneten Regulation unterliegt. Eingriffe, die zur Überproduktion führen, sind noch nicht lückenlos geklärt. Der Zusatz von Antibiotika zum kultivierten Keim ist dazu allerdings nicht ausreichend. Eine Signalkette zwischen den Bakterien

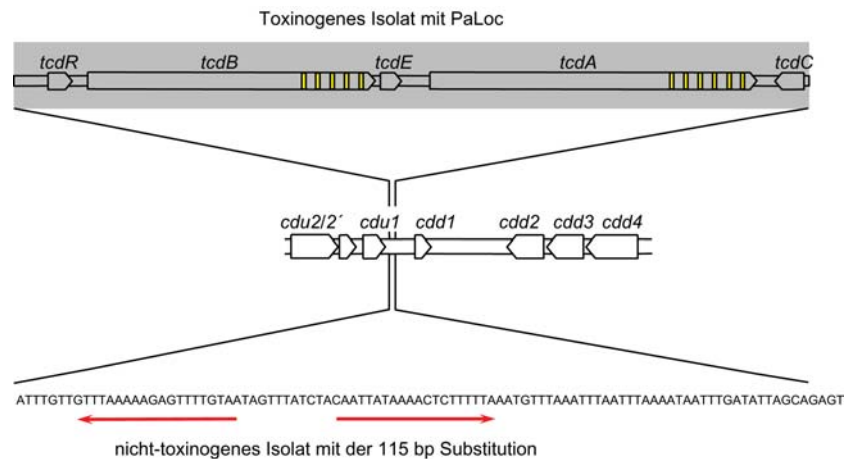


Abbildung 4 Der Pathogenitätslokus PaLoc.

Der PaLoc enthält die Information für die zwei Hauptpathogenitätsfaktoren TcdA (Enterotoxin) und TcdB (Zytotoxin) von *C. difficile*, zusammen mit den Genen für den negativen Regulator TcdC (ein Anti-Sigmafaktor), den positiven Regulator TcdR (früher TcdD genannt, ein Sigmafaktor) und das Holin TcdE; in der Mitte sind die Gene stromauf und stromabwärts (u für up- und d für downstream) schematisch aufgeführt; in toxisfreien *C. difficile* Isolaten ist der PaLoc durch einen kurzen Abschnitt von nur 115 bp ersetzt; die *tcdA*, *tcdB* und die Deletion im *tcdC* Gen sind zusammen mit der Doppelresistenz Ery^r + Mox^r Voraussetzung für die Befundung Ribotyp 027 + hypervirulentes Isolat (hier nicht gezeigt: die Gene *cdtA/B* für das binäre Toxin müssen zusätzlich vorhanden sein, s. Abbildung 1). (Abbildung modifiziert nach [32]).

wird als Basis für die Induktion der Pathogenität diskutiert [36]. Das fünfte Gen des PaLoc kodiert für das Protein TcdE, das der Gruppe der Holine zugerechnet wird, und dessen Funktion offensichtlich die Auflösung der Bakterienzellwand während der Sporulation von *C. difficile* ist [37].

Die Verkürzung der Sequenz des *tcdC* Gens war Grund zu der Annahme, dass im Fall der hypervirulenten *C. difficile* Ribotyp 027 Isolate die Deletion von wenigen Basenpaaren des *tcdC* zu einer Überproduktion der Toxine TcdA und TcdB in hypervirulenten Keimen führt [38]. Es wurde argumentiert, dass die Überproduktion der Toxine TcdA und TcdB eine der Ursachen für die gesteigerte Gefährlichkeit der Erreger sei. Ob dies strikt zutrifft, ist nicht endgültig geklärt. Untersuchungen in unserem Labor haben gezeigt, dass als 027 klassifizierte Isolate des hypervirulenten Genotyps trotz identischer Deletion im *tcdC* Gen über stark unterschiedliche Toxinproduktionen verfügen. Weiterführende Versuche zur Definition der Ursache der Hypervirulenz werden weltweit mit großer Intensität verfolgt.

Struktur und Funktion der Toxine

Die Familie der LCTs

Die beiden Toxine TcdA und TcdB werden heute auf unseren Vorschlag hin zu den großen clostridialen Zytotoxinen (LCT) gerechnet [39]. Zu dieser Gruppe von Toxinen zählen weiterhin das letale (TcsL) und das hämorrhagische (TcsH) Toxin von *Clostridium sordellii*, das alpha-Toxin (TcnA) von *Clostridium novyi*, sowie das TpeL Toxin von *Clostridium perfringens* (Serotyp C) [40]. Alle LCTs weisen ausgeprägte Sequenzhomologien un-

tereinander auf, sie entstammen Clostridien, sind groß (200–308 kDalton) und wirken auf Zellen zytotoxisch.

Die drei Domänenstruktur der Toxine

Die „Großen Clostridialen Zytotoxine“ sind neben den clostridialen Neurotoxinen molekulare Meisterwerke der Clostridien und der Evolution. Bei einer Größe von bis zu 2710 Aminosäuren (für das Enterotoxin TcdA) sind die LCTs komplex und sehr geschickt aufgebaut. Sie enthalten, mit Ausnahme des TpeL von *C. perfringens*, dessen C-terminale Domäne stark verkürzt ist, drei funktionelle Strukturen mit zumindest zwei separaten enzymatischen Funktionen (Abbildung 5).

Die für die Interaktion mit der Zelloberfläche verantwortliche C-terminale Ligandendomäne (grün) setzt sich aus repetitiven Oligopeptiden zusammen [41]. Zentral findet sich eine Translokationsdomäne (rot), die die Prozessierung der Toxine in die Zelle steuert. Das eigentliche Zellgift, die toxisch wirkende Domäne (blau), umfasst die N-terminalen ca. 543 Aminosäuren [42]. Allein dieser Anteil der Toxine muss ins Zytosol der Zelle vordringen, um die volle Giftwirkung zu entfalten.

Die Toxizität

Für die Wirkung der Toxine ist die Glucosyltransferase-Aktivität der zuletzt angesprochenen N-terminalen Domäne verantwortlich [43]. Das Enzym überträgt einen Glukoserest aus zellulärer UDP-Glukose auf kleine GTP-bindende Signalproteine der Ras-Superfamilie. Neben wenigen Ras-Signalproteinen sind vor allem Rho-Analoga Substrate des Enzyms. Es gibt zwei Modifikationsmuster, die mikroskopisch als D-Typ (wie *difficile*) bzw. S-Typ (wie *sordellii*) zytopathischer Effekt beschrieben

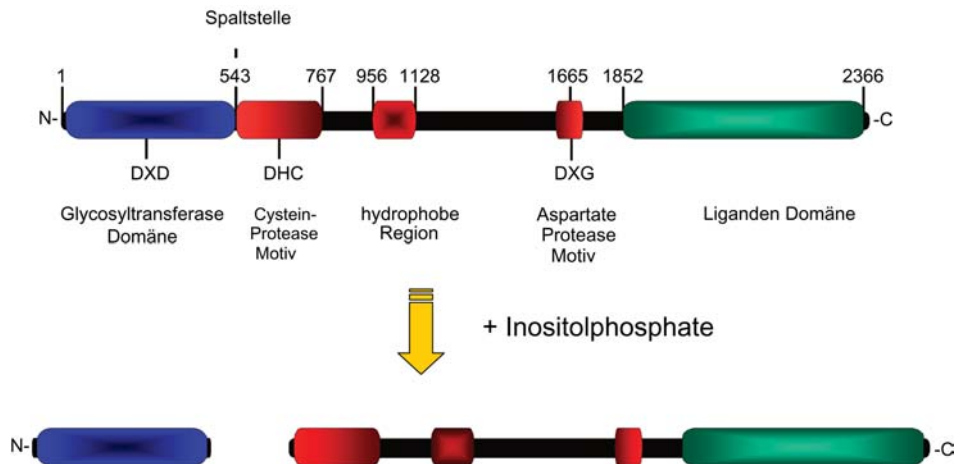


Abbildung 5 Die Drei-Domänenstruktur der Toxine TcdA und TcdB.

Die Toxine TcdA und TcdB weisen wie die anderen Toxine der Familie der „Großen Clostridialen Zytotoxine“ (LCT) eine funktionelle Dreiteilung in eine (grüne) Liganden-Domäne, eine (rote) Translokations-Domäne und eine (blaue) katalytisch-toxische Domäne auf; die „grüne Domäne“ bindet an Zellrezeptoren, die „rote Domäne“ vermittelt dann die Internalisierung der Toxine und die induzierte autoproteolytische Abspaltung der „blauen Domäne“ im Zytosol der Zelle; im Innern der Zellen wirkt die Glycosyltransferase auf kleine GTP-bindende Signalproteine der Ras/Rho Familien und schickt die intoxifizierte Zelle dadurch in den programmierten Zelltod (Apoptose); für die Prozessierung der katalytisch-toxischen Einheit von extra- nach intrazellulär ist der Kontakt zu zytosolischen Inositolphosphaten notwendig, die die intrinsische Protease (Aspartat- oder Cystein-Protease) aktiviert und die Toxine in zwei Fragmente spaltet.

werden [44]. Die kovalente Modifikation der GTPasen bewirkt deren funktionelle Inaktivierung. Damit bricht das Zytoskelett der Zellen zusammen, was sich sehr schön durch Phalloidininfärbung von filamentösem F-Aktin zeigen lässt (Abbildung 6). Derart geschädigte Zellen sind auf dem Weg in den programmierten Zelltod, sie werden apoptotisch [45].

Für die Struktur der Darmzotten bedeutet das, dass die F-Aktin Bündel der „tight junctions“ aufgelöst werden

[46]. Damit geht die Barrierefunktion des Darms verloren, verbunden mit allen Folgezuständen, wie sie in den schweren Verlaufsformen der Pseudomembranösen Colitis klinisch gesehen (Abbildung 7) und pathologisch nachgewiesen werden (Abbildung 8).

Erstmals für *C. difficile* gezeigt [43], wurden Toxine mit Glycosyltransferasefunktion später auch in anderen Clostridien (*C. sordellii*, *C. novyi* [39]) und schließlich in *Legionella pneumophila* [47] beschrieben.

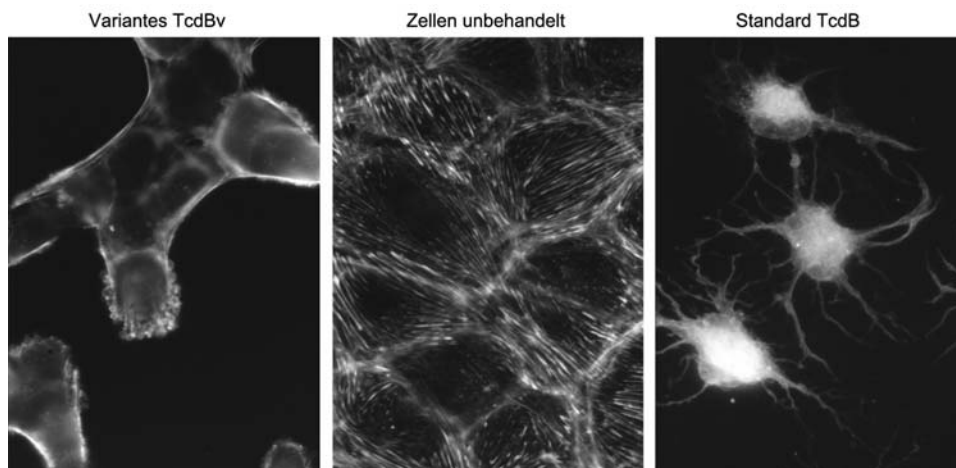


Abbildung 6 Phalloidin Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit und ohne *C. difficile* Toxinbehandlung.

In der Mitte sind Zellen dargestellt, wie sie sich typischerweise nach Färbung des F-Aktin („Zeltstange“) in der Fluoreszenzmikroskopie zeigen; links die selben Zellen nach Zugabe von variantem TcdBv und rechts nach Zugabe von Standard-TcdB zum Zellkulturmedium; nach ca 3 Stunden runden sich die Zellen ab und verlieren in typischer Weise die F-Aktin-Zeltstangen; die beiden Phänotypen werden durch Unterschiede (TcdB Moleküle mit iso-Glycosyltransferase-Funktion) in der Modifikation der Ras-Superfamilie Signalproteine bewirkt (links: Rac, Ral, Rap Modifikation; rechts: Rho, Rac + Cdc42 als Substrate der katalytisch-toxischen Glucosyltransferase-Domäne).

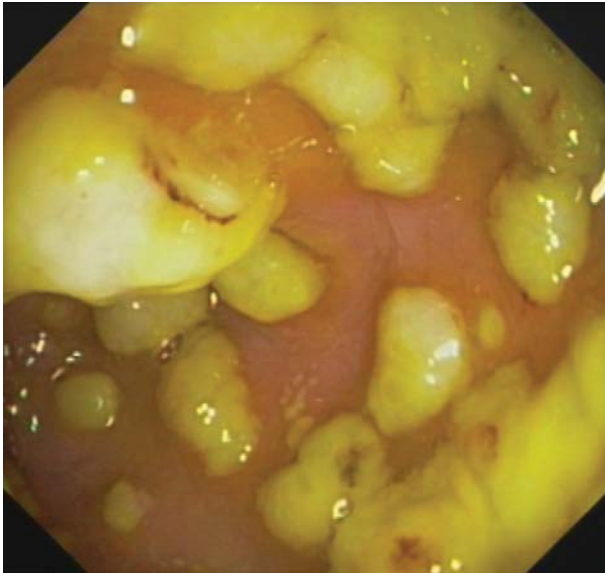


Abbildung 7 Endoskopischer Aspekt einer pseudomembranösen Kolitis.

Bei schwerem Verlauf der CDAD durch toxinbildende *C. difficile* Isolate zeigt sich das Vollbild der Erkrankung, die Pseudomembranöse Colitis; ein großer Teil der Erkrankungen kann durch Rektoskopie diagnostiziert werden. Im Bild sind die typischen weißlichen Auflagerungen auf der Darmschleimhaut zu erkennen; Plaques können groß (wie hier) und weniger zahlreich oder aber klein und zahlreicher sein; oft zeigen sich Einblutungen; es besteht die Gefahr der Ruptur und Peritonitis bei schweren Schädigungen des Kolon.

(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau OÄ Dr. G. Jechart, III. Medizinische Klinik, Klinikum Augsburg).

Der Weg in die Zelle: vom Darmlumen ins Zellinnere

Der Wirkort der Toxine, insbesondere deren N-terminale Glucosyltransferase, ist das Zytoplasma der Zellen [42, 48]. Für den Weg in die Zelle wird eine spezifische Interaktion zwischen den Toxinen TcdA und TcdB und Glykoproteinen der Zelloberfläche angenommen. Für TcdA, das vor allem auf Enterozyten wirkt, wurden entsprechende Strukturen partiell charakterisiert [49, 50]. Für das Zytotoxin B gibt es noch keinen Vorschlag für dessen mögliche Rezeptorstrukturen. Es wirkt auf fast alle Zellen, lediglich eine Zelle zeigte sich gegenüber der TcdB-Wirkung etwas spröde. DON Zellen wurden durch chemische Mutagenese erzeugt und haben einen Defekt in der UDP-Glukose Bereitstellung [51], wodurch die enzymatische Reaktion der Toxinwirkung behindert wird.

Einmal an die Zelle gebunden, erfolgt die Toxin-Aufnahme über coated pits und coated vesicles [52]. Der saure pH der Endosomen spielt eine entscheidende Rolle beim Zelleintritt [53]. Im Endosom findet eine erste Änderung der Konformation der Toxine statt. Durch Neutralisation des endosomalen pH wird die Toxinwirkung blockiert, aus saurem Kulturmedium vermögen die Toxine direkt in das Zytoplasma überzutreten [54].

Nach Kontakt mit zellulären Inositolphosphaten des Zytoplasmas wird eine zweite Konformationsänderung postuliert, die mit der Aktivierung der zweiten Enzymwir-

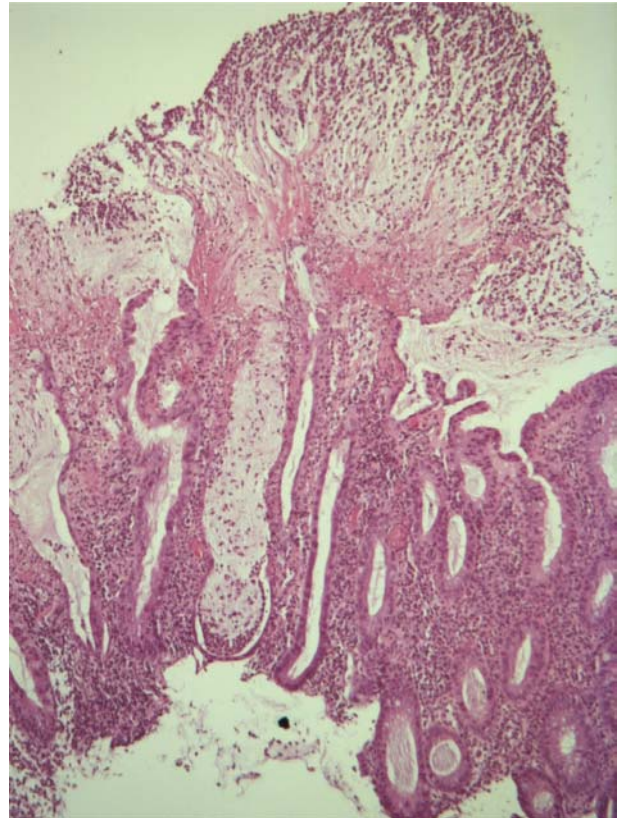


Abbildung 8 Histopathologie der pseudomembranösen Kolitis. Der Verlust der Darmzotten mit dem massiven entzündlichen Geschehen ist deutlich zu erkennen.

(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn CA Prof. Dr. H. Arnholdt, Pathologisches Institut, Klinikum Augsburg).

kung verbunden ist [55]. Es handelt sich um eine intrinsische Protease im Bereich der Translokationsdomäne, die den enzymatisch-toxischen Teil proteolytisch abspaltet und in das Zytoplasma freisetzt [55]. Zwei aktive Zentren wurden beschrieben, der Freisetzungsschritt wird entweder durch eine Aspartat-Protease [55] oder eine Cystein-Protease [56] katalysiert. Das größere Toxinbruchstück aus der Liganden- und Translokationsdomäne verbleibt im Endosom, nur die enzymatisch-toxische Domäne wird im Zytosol frei verfügbar [43, 48].

Kurz nach der Erstbeschreibung der induzierten autolytischen Aktivierung der *C. difficile* Toxine [55] wurde die Reaktion für weitere bakterielle Toxine nachgewiesen [57]. Wie bereits für die Glucosyltransferasefunktion der Wirkung der Toxine gezeigt, wird auch das Prinzip der Toxingiftung durch induzierte autolytische Aktivierung in der Bakterienwelt wiederholt genutzt.

Risikofaktoren und Auslöser der Erkrankung

Bisher galt die CDAD als eine Erkrankung älterer immungeschwächter Patienten, die tendenziell eher das weibliche Geschlecht betrifft. Für die neuen hypervirulenten

Tabelle 2 CDAD – Risikoeinschätzung von Antibiotika^a.

Hohes Risiko
Clindamycin, Zweit- und Dritt-Generations Cephalosporine, Fluorochinolone (Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin), Ampicillin, und Amoxicillin
Mittleres Risiko
Trimethoprim, Tetracycline, Imipenem, und Meropenem
Geringes Risiko
Aminoglycoside, Macrolide (vor allem Clarithromycin und Azithromycin), Breitspektrum-Penicilline — Ticarcillin, Mezlocillin, und Piperacillin, Vancomycin

^aModifiziert nach Kelly und LaMont, 1998.

Stämme ist bekannt, dass sie auch bei jüngeren Menschen schwere Krankheitsbilder auslösen, und mitunter einen fatalen Ausgang zeigen. Faktoren, welche die Erkrankung propagieren sind unverändert: Krankenhausaufenthalt, Antibiose, Zytostase, Abdominalchirurgische und andere gastrointestinale Eingriffe. Die Tabelle 2 enthält eine Zusammenstellung der Antibiotika, mit einer relativen Wichtung des Risikos ihrer Wirkung als Auslöser der CDAD [58].

Symptome und Einschätzung des Schweregrads der CDAD

Die Symptome der CDAD variieren in einem Kontinuum von:

- Asymptomatischer Trägerschaft
- Blandem Durchfall
- Schleimig bis blutig-schleimigen Durchfällen
- Colitis
- Pseudomembranöser Colitis
- Fulminanter Colitis/toxischem Megacolon
- Perforation
- Refraktärer Colitis

Messbare Anzeichen des Schweregrads der CDAD sind in Tabelle 3 zusammengefasst und in ein Punktesystem umgesetzt. Belmares et al. unternahmen damit den Versuch, einen Score einzuführen, mit dem die Wahrscheinlichkeit der Wirksamkeit eines Einsatzes der Metronidazoltherapie abgeschätzt werden soll. Summen größer als 2 waren überhäufig mit dem Versagen der Metonidazolbehandlung korreliert [59].

Wie stellt(e) sich die Labordiagnose dar?

Zum Zeitpunkt der Entdeckung

Nachdem bekannt war, dass die Erkrankung auf der Überwucherung der Darmflora durch *C. difficile* und der damit verbundenen Toxinproduktion beruht, bestand die einfachste Möglichkeit der Diagnose darin, die Überstände des Stuhls der Patienten auf deren Toxizität auf kultivierten Zellen zu testen. Die Spezifität der Schädigung

Tabelle 3 Schweregrad der Clostridium difficile Erkrankung*.

Befund	Punkte
Fieber (38,0°C)	1
Ileus ^a	1
Systolischer Blutdruck < 100 mm Hg ^b	1
Leukozytose	
Leukozyten < 15.000/μL	0
Leukozyten 15.000–30.000/μL	1
Leukozyten > 30.000/μL	2
Computertomographie	
verdickte Darmwand, Erweiterung des Kolon, Ascites	
kein außergewöhnlicher Befund	0
eines der Befunde	1
zwei oder mehr der Befunde	2

*modifiziert nach Belmares et al. 2007.

^aIleus klinisch oder radiographisch bestätigt.

^bJeder einzelne Wert innerhalb von drei Tagen nach CDAD Diagnose.

im Zelltest wurde durch Zugabe von Antiseren nachgewiesen, die die Wirkung auf die Zellen verhindern, sofern es sich um *C. difficile* Toxine handelt, die die Zellabrundung hervorrufen. Der Zytotoxizitätstest galt lange als „Gold-Standard“, wurde aber vor allem aus praktischen Erwägungen zunehmend von immunologischen Nachweisen der Toxine abgelöst, die schneller und mit weniger technischem und personellem Aufwand durchführbar sind. In dieser Phase wurde parallel zu allen Toxinnachweisen auch die Anzucht der Keime betrieben.

Zwischenzeitlich (mit der Entwicklung der Immunnachweise)

Als Antikörper gegen Toxin A zur Verfügung standen, wurde eine Reihe von TcdA-Nachweisen eingeführt, die aus dem Stuhl symptomatischer Patienten allein das Enterotoxin A nachwiesen. Da nur das TcdA die Wirkung im Hamsterversuch hervorruft, bestand seinerzeit die Auffassung, dass der TcdA-Nachweis allein ausreichend ist, um *C. difficile* Infektionen zu bestätigen.

Delmée et al. [60, 61] haben Serotyp F-Stämme beschrieben, die heute als Endemiestämme bekannt sind [62]. Sie produzieren kein Toxin A und verursachten nur in einem Teil der Tiere (statt in allen) und auch erst nach 20 Tagen (statt bereits nach 4 bis 6) den fatalen Ausgang der Infektion. Heute ist allgemein anerkannt, dass nur der Nachweis beider Toxine in den Patientenproben eine ausreichend sichere Diagnosestellung erlaubt. Mit der Einführung der kombinierten TcdA/TcdB-Nachweise wurde die Anzucht der Bakterien zunehmend zurückgedrängt und wird nur noch von wenigen mikrobiologischen Laboratorien durchgeführt.

Heute (im Zeitalter der 027-Infektionen)

Heute basiert die Diagnose einer *C. difficile* assoziierten Erkrankung auf dem kombinierten Nachweis der beiden

Toxine TcdA und TcdB durch immunologische Verfahren. Alle kommerziellen Nachweise (Stand April 2008) detektieren die beiden Toxine in einer „Eintopfreaktion“, derzeit bietet kein Hersteller Assays an, die in der Testung zwischen TcdA und TcdB unterscheiden lassen. Eine derartige Differenzierung wäre vorteilhaft, würde sie doch die schnelle Unterscheidung zwischen einer Reihe von endemischen Isolaten erlauben, wie z.B. dem 027 Ribotyp (TcdA⁺, TcdB⁺) vom 017 Ribotyp (TcdA⁻, TcdB⁺).

Mit der weltweiten Ausbreitung der hypervirulenten Isolate des Ribotyps 027 musste die Vorgehensweise angepasst werden, denn ohne Isolierung der Keime ist jede Typisierung der Bakterien zur Analyse von endemischen Situationen unmöglich. Die Anzucht von *C. difficile* ist heute zwingender und integraler Bestandteil der Diagnose der Erkrankung. Die anaerobe Bebrütung aller Proben, die mit der Verdachtsdiagnose einer *C. difficile*-Erkrankung eingeschickt werden, wird in den meisten Laboratorien die apparativen und personellen Möglichkeiten jedoch überfordern. Um den Aufwand der Diagnosestellung in einem vertretbaren Rahmen zu halten, gehen wir aktuell wie folgt vor:

- Nachweis der Toxine im Stuhl der Erkrankten durch einen TcdA/TcdB EIA,
- wenn positiv: Benachrichtigung des Einsenders über den Nachweis der *C. difficile*-Toxine (Verdachtsdiagnose CDAD) und Versuch der Anzucht der Bakterien aus dem Untersuchungsmaterial,
- bei erfolgreicher Isolierung der Bakterien: Testung auf das Vorliegen der typischen Erythromycin und Moxifloxacin-Resistenz im E-Test (Doppelresistenz ist mit der Häufung von Isolaten verbunden [63], in der Regel wird es sich um relevante Isolate handeln, die sich wegen bestehenden Selektionsdruckes vor Ort etabliert haben und weiter ausbreiten werden),
- bei Resistenznachweis: Ausschluss/Nachweis des Ribotyps 027 nach DNA-Präparation und PCR-Amplifikation der ribosomalen RNA,

Es sind dann vorwiegend die 027-Ribotypen oder aber Isolate, die schwere klinische Verläufe ausgelöst haben, die noch detaillierter untersucht werden:

- wenn es sich um einen 027-Ribotyp handelt: (andere Ribotypen, wenn der Patient massiv erkrankt ist oder der Einsender die umfassende Typisierung beauftragt hat) partielle Genotypisierung, verbunden mit dem Nachweis der beiden Toxingene *tcdA* und *tcdB*, sowie der Gene für das binäre Toxin *cdtA/B* und der Nachweis der Deletion in *tcdC* (Abbildung 1),
- Befundung: bei Vorliegen beider getesteten Antibiotikaresistenzen und aller Merkmale des charakteristischen genotypischen Musters (Abbildung 1) – Diagnose hypervirulenter 027-Ribotyp Stamm.

Über den Gang der Typisierung nach dem vorgenannten Schema ist im Einzelfall zu entscheiden. Jeder Einsender (Krankenhaus) sollte dabei daran interessiert sein, den Stand der aktuellen Besiedlung der Einrichtung zu

kennen, und sich über das Vorliegen von Isolaten des hypervirulenten Musters Klarheit zu verschaffen. Nicht zuletzt kann das Vorliegen von hypervirulenten 027-Ribotyp-Erregern forensisch-medizinische Relevanz erlangen.

In unserer Praxis stellte sich bei der praktischen Durchführung heraus, dass neben 027-Ribotyp Stämmen auch die Ribotypen 001 und 002 gehäuft im Patientenmaterial auftreten und mitunter zu fatalen Verläufen führen. Auch solche Isolate weisen europaweit die beiden Resistenzen gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin auf [63]. In mehreren einsendenden Krankenhäusern waren 001-Keime mit einer endemischen Ausbreitung von *C. difficile* verbunden, wobei sich überdurchschnittlich viele Patienten der Kolektomie unterziehen mussten. International ist beschrieben worden, dass die prädominanten Ribotypen regionalen Unterschieden unterliegen [63].

Diagnose in spe

Ein Teil unserer aktuellen Arbeiten konzentriert sich auf die Entwicklung eines Schnelltests zum Nachweis von *C. difficile*-Stämmen des Ribotyps 027. Ziel des Testprinzips ist der Nachweis, dass es sich im untersuchten Fall um einen hypervirulenten 027 Erreger handelt bzw. dass die Erkrankungen in einer Einheit jeweils von Erregern des identischen Typs hervorgerufen werden. Beide Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer *C. difficile*-Endemie und lassen eine schnelle Beurteilung von Gefährdungssituationen für das jeweilige konkrete Umfeld zu. Eine solche Testmöglichkeit sollte zeitnah verfügbar werden.

Therapieempfehlungen

Zur Behandlung der *C. difficile* Infektionen gibt es drei Ansätze:

- Besteht die Symptomatik in bledem Durchfall, so kann bereits das Absetzen der auslösenden Medikation zum Abklingen der Symptomatik führen. Dabei ist individuell zu beurteilen, ob die Medikation der Grunderkrankung weitergeführt werden muss oder ob das Leben des Patienten durch Sistieren, z.B. einer auslösenden Antibiose, (ggf kann auf ein Antibiotikum mit geringerem CDAD-Auslöserisiko umgestellt werden (aus Tabelle 2)) gefährdet wird.
- Kann die Medikation nicht abgesetzt werden oder treten andere schwere Symptome auf, wie z.B. blutig-schleimiger Durchfall, ist die Behandlung der *C. difficile*-Infektion mit Metronidazol als Präparat der ersten Wahl ratsam. In Europa sind nur sehr wenige *C. difficile*-Stämme gegen Metronidazol resistent [63]. Die Therapie wird in der Regel oral über 10 Tage (4×250 mg oder 3×500 mg pro Tag) erfolgen. Der Gebrauch dieses Antibiotikums hat den Nachteil, dass es vom Keim erst aktiviert werden muss, um die DNA-Schädigung ausüben zu können [64]. Dementsprechend kann die Wirkung der Substanz mitunter

verzögert eintreten. Bei Patienten, denen sofort geholfen werden muss, ist deshalb Vancomycin zu bevorzugen [65].

- Bei zusätzlichen Komplikationen der Erkrankung, wie Pseudomembranöser Colitis, Zustand nach Kolektomie als Folge des Krankheitsgeschehens, aber auch bei Vorliegen hypervirulenter Keime im Umfeld, sollte sofort mit Vancomycin therapiert werden. Wir empfehlen dazu eine Stufentherapie mit 4×125 mg pro Tag für eine Woche, gefolgt von drei Wochen, in denen die Tagesdosis im Wochenrhythmus jeweils um 125 mg reduziert wird. Die Vancomycingabe ist dann in der fünften Woche beendet. Bei schweren Verläufen wird mitunter die doppelte Dosierung (je 250 mg pro Dosis) eingesetzt. Die Kombination mit einer gleichzeitigen Metronidazoltherapie findet ebenfalls Anwendung. Resistenzen von *C. difficile* gegenüber Vancomycin sind noch nicht endgültig bestätigt worden [63]. Die gleichzeitige Gabe von *Saccharomyces boulardii* [66, 67], einer „probiotisch wirkenden Hefe“, reduziert offensichtlich die Rückfallraten gegenüber der Therapie allein mit Antibiotikum, so dass sich diese Empfehlung nach unserer Erfahrung bewährt hat. Literaturberichte entsprechen unseren Erfahrungen vor allem mit „Rückfallpatienten“.

Leider sind bei der Therapie der *C. difficile*-Erkrankungen Rückfälle nicht selten. Der Leidensdruck der Betroffenen ist groß, da anhaltende Durchfälle ein normales Arbeits- und Privatleben unmöglich machen. Jeder Rückfall sollte wie eine komplizierte *C. difficile*-Erkrankung therapiert werden. Für einzelne Patienten schafft bereits die einmalige Gabe einer Vancomycin-Stufentherapie in

Kombination mit der Anwendung von *Saccharomyces boulardii* Abhilfe, bei anderen Patienten wird jedoch mehrfach und selten anhaltend frustriert therapiert.

Hygienemaßnahmen

Seit dem Auftreten der hypervirulenten *C. difficile*-Isolate in Deutschland ist das Bewusstsein über die Gefahr, die von *C. difficile* und der von dem speziellen Keim induzierten schwerwiegenden Erkrankungen ausgeht, deutlich gestiegen. Im Rahmen unserer Konsiliartätigkeit werden wir häufig zu Hygienemaßnahmen kontaktiert und haben feststellen können, dass gut geführte Einrichtungen über „Notfallpläne“ für den Umgang mit *C. difficile*-Ausbrüchen verfügen [68], so dass das Personal nicht unvorbereitet getroffen wird. Ein allgemeiner Maßnahmenkatalog ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

C. difficile-Infektionen werden nosokomial übertragen, so dass Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen ungewollt zur Ausbreitung des Keims beitragen. In unserer Beratungstätigkeit hat sich wiederholt gezeigt, dass in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen, die Verordnung und Gebrauch von Antibiotika unter strenge Richtlinien setzen, die Gefährdung durch *C. difficile* deutlich geringer ist, als in Häusern, die für Antibiotika eine offene Verschreibungspraxis praktizieren. Die Einschränkung des Gebrauchs ist besonders für die Antibiotika zu fordern, die das höchste Gefährdungspotential der CDAC haben (s. Tabelle 2). Entsprechend gehört die eingeschränkte Nutzung der Antibiotika der hohen Gefährdungsklasse zu den Maßnahmen, die ergriffen werden müssen, um endemische Infektionen mit *C. difficile* einzudämmen [8, 69, 70].

Tabelle 4 Richtlinien zur Kontrolle von Ausbrüchen.

Personal

- Fortbildung und Information über CDAD und über die Differenzierung von anderen Durchfallerkrankungen
- Abstimmung der Maßnahmen für verschiedene Erreger aufeinander, um unnötige Diversitäten zu vermeiden
- Training auf die Hygienemaßnahmen (Pflegepersonal UND ärztliche Mitarbeiter)

Hygiene

- Aufsetzen eines CDAD-Notfallprotokolls, Vorgehen nach dieser Anweisung
- Konsequente Isolierung von Erkrankten, Zutritt nur für Befugte und in die Hygiene eingewiesene Personen
- Einmalhandschuhe obligat, Dichtigkeit prüfen, Ablegen und verwerfen im Zimmer
- Schutzkleidung tragen und im Raum belassen
- Desinfektionsplan modifiziert auf Sporenbildner !! Die alkoholische Desinfektion des Keims IST wegen der Selektion von Sporen kontraindiziert
- Händedesinfektion bei Kontamination mit sporoziden Präparaten
- Händewaschung plus alkoholische Desinfektion als Vorbereitung auf den nächsten Kontakt wenn sicher nicht verschmutzt
- Flächendesinfektion mit sporoziden Präparaten
- Gerätedesinfektion mit sporoziden Präparaten
- Konsequente Enddesinfektion von belasteten Umfeldern !!

Antibiotika-Gebrauch

- Richtlinien für die Verordnung und den Gebrauch von Antibiotika beschließen und zwingend befolgen
- Höhere Hürden aufbauen für den Gebrauch der Hochrisiko-Präparate Clindamycin, Cephalosporine (2./3. Gen)
- Strenge Richtlinien für den Einsatz von Fluorochinolonen
- Bei Risikopatienten: Antibiose aus anderer Indikation primär durch Niedrigrisiko-Antibiotika (s. Tabelle 2)
- Periodisches Monitoring der Antibiotikaresistenzentwicklung in der Einrichtung

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Erkrankungshäufigkeit im Bereich niedergelassener Ärzte deutlich ansteigt. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen der Therapie mit Gyrasehemmstoffen und dem Auftreten der Erkrankung beobachtet [70]. Der „modehafte“ Gebrauch dieser „modernen“ Substanzklasse ist sehr kritisch zu hinterfragen. Es ist absehbar, dass die Häufigkeit der Verordnung von Fluorochinolonen zukünftig auch maßgeblich durch das Problem endemischer CDAD Erkrankungen reguliert wird.

Das zentrale Problem der *C. difficile*-Infektion in Einrichtungen des Gesundheitswesens ist die Sporenbildung des Keims. Desinfektion mit den üblichen Mitteln ist nicht ausreichend, es müssen sporozide Präparate eingesetzt werden. Eine besondere Herausforderung stellt die Händedesinfektion dar. Im Routinebetrieb der Notaufnahme, wenn die Diagnose noch nicht gestellt ist, wird es nur eine Anweisung an das Personal geben können. Hier wird die klassische alkoholische Händedesinfektion die Standardprozedur sein müssen. Ist die Diagnose CDAD gestellt, so ist die Anwendung alkoholischer Mittel kontraindiziert, denn Alkoholschock ist die klassische Vorgehensweise für die Abtötung vegetativer Erreger, die Sporen werden durch alkoholische Händedesinfektion sogar noch angereichert werden [71]. Der Erhöhung der Anzahl der Sporen im Umfeld Erkrankter muss gezielt entgegengewirkt werden, um der Ausbreitung von *C. difficile* nicht noch weiter Vorschub zu leisten. Einmal etabliert, lassen sich Sporen aus dem Gebäude nur noch schwer eliminieren. Nochmals: Steht die Diagnose CDAD fest, ist die alkoholische Händedesinfektion KONTRAindiziert, es sollten sporozide Präparate eingesetzt werden! Dies dient auch dem Schutz des Personals!

Der Ausweg aus dieser Situation ist der konsequente Schutz vor der Exposition gegenüber den Sporen (bzw. des vegetativen Keims) durch obligates (und geschlossenes) Tragen von Schutzkleidung sowie Einmalhandschuhen, die nur im Patientenzimmer genutzt werden und dort verbleiben. Dabei ist auf gute Qualität der Handschuhe zu achten, denn von den produzierten Latex-Handschuhen können bis zu 20% undicht sein. Das Personal ist hierüber aufzuklären und sollte die Handschuhe nach dem Anziehen kontrollieren.

Eine effektive Schutzkleidung verhindert die Übertragung der Keime auf die Haut des Personals. Ohne Hautkontamination besteht die Vorbereitung für den nächsten Patienten in einer Beseitigung des Schmutzes auf den Händen durch Händewaschung mit nachfolgender klassischer Desinfektion mit alkoholischen Präparaten. Ist aber eine Kontamination mit Patientenmaterial eingetreten oder nicht sicher auszuschließen, so sind sporozide Desinfektionsmittel (z.B. Wofasteril 0,5% für 1 min) zur Händedesinfektion einzusetzen. Auch die Flächendesinfektion (z.B. 1% Descogen F für 30 Minuten) und die Gerätereinigung (Desmozon 4% für 15–60 min) sind mit sporoziden Mitteln durchzuführen.

Eine weitere dringende Maßnahme ist die frühzeitige Isolierung erkrankter Patienten. In Ländern, in denen

Patienten noch in größeren Krankensälen unterbracht werden (z.B. England), stellt *C. difficile* erfahrungsgemäß ein größeres Problem dar. Im deutschsprachigen Raum steht in der Regel eine ausreichende Zahl von Zimmern mit wenigen Betten zur Verfügung, so dass die Isolierung von Erkrankten praktikabel ist und konsequent betrieben werden sollte!

Diese Maßnahme zusammen mit der Einhaltung der Hygienmaßnahmen durch das gesamte Personal (d.h. auch Ärzte aller hierarchischen Ebenen) und Angehörige ist die Voraussetzung für die Eindämmung der Infektion auf ein begrenztes Umfeld und wenige Patienten.

Internet podcast

Weitere aktuelle Informationen sind im Internet verfügbar unter <http://www.rmei.com/CDAD519/> mit einer Vortragsveranstaltung (Oktober 2007) unter dem Titel: „Clostridium difficile associated Disease: Guidelines and global Experience“.

FAQ (Frequently asked questions)

Zu den Untersuchungsproben:

1. Wie frisch müssen Stuhlproben sein?

Je schneller die untersuchende Stelle in den Besitz der Proben kommt, desto besser werden die Ergebnisse sein. Probenversand über das Wochenende sind fast die Garantie dafür, dass *C. difficile* nicht mehr anzüchtbar ist.

2. Wie lange hält sich das Toxin?

Zur Haltbarkeit der Toxine in den Stuhlproben gibt es unterschiedliche Aussagen. Nach unserer Erfahrung sind die Toxine in Stuhlproben relativ stabil. Es gibt allerdings auch Aussagen ausländischer Kollegen, die großen Wert auf schnelle Einsendung und sofortigen Toxinnachweis legen. Für uns scheint dieser Punkt noch ungeklärt zu sein. Klar ist aber, dass die Proben in keinem Fall eingefroren werden sollten. Einfrieren und Auftauen ist der sichere „Tod“ der Toxine!

3. Wie müssen die Proben eingeschickt werden?

Wir verarbeiten für die Typisierung vor allem angezogene Bakterien. Dabei hat sich Amies-Transportmedium als gute Wahl für den Versand herausgestellt. Die Keime werden zur Typisierung bei uns immer frisch angezogen.

4. Versand von Keimen?

Gut verpackt verschicken wie anderes infektiöses Material oder Stuhlproben. Die Proben sind vor extremen Temperaturen zu schützen – Einfrieren muss vermieden werden! Isolate nie vor einem Wochenende versenden, damit die Lagerungszeit nicht unnötig verlängert wird, die Proben nicht unnötig lange unkontrollierten Bedingungen ausgesetzt werden.

5. Lagerung von Keimen?

Es wurde eine Reihe von Vorschlägen getestet. Für kurze Zeit (bis zu 6 Monate) halten sich die meisten *C. difficile*-Isolate in anaeroben Blutkulturflaschen.

Dazu sollten die Bakterien lange genug angezogen werden, damit sie sporulieren. Längere Lagerung erfolgt mit ca. 50% Glycerin bei -70°C . Vorsicht ist angezeigt, denn nicht alle Isolate lassen sich danach reproduzierbar wieder anziehen.

6. Woher erhalte ich meinen Kontrollstamm?

Scheuen Sie sich nicht, die Ihnen bekannten Kollegen zu fragen. Wachstum und Geruch von *C. difficile* sind so charakteristisch, dass eine „eigene Positivkontrolle“ sehr stark weiterhilft.

Zur Testung:

1. Wie oft muss getestet werden, um eine Erkrankung auszuschließen?

Bei eindeutigen klinischen Zeichen ist bei negativem Toxinnachweis die Einsendung mehrerer Proben, drei innerhalb von 5 bis 7 Tagen, sinnvoll. Der positive Nachweis muss nicht kontrolliert werden, für die Diagnose einer CDAD/PMC ist das klinische Bild entscheidend. Der Toxinnachweis kann auch ohne Symptomatik positiv sein. Solche Fälle bedürfen der Beobachtung, nicht der umgehenden Therapie (außer Überlegungen, welche induzierenden Medikamente ggf. abgesetzt werden können).

2. Dreimal negativer Nachweis, dann erst „Entwarnung“?

C. difficile ist ein fakultativ pathogener Keim, es gibt Träger von toxischen Isolaten, die ohne Symptome bleiben. Auch wird nicht jeder zwangsläufig erkranken, wenn der Keim auf ihn übertragen wird. Beim Fehlen von Symptomen ist die Infektionsgefahr für den gesunden Menschen als gering anzusehen. Mehrfach negative Testung (Anzucht/Toxinnachweis) ist daher nicht erforderlich.

3. Was sind die relevanten MICs für *C. difficile*?

Die Breakpoints für das Vorliegen einer Resistenz ist für Vancomycin $> 32 \text{ mg/L}$, Metronidazol $> 32 \text{ mg/L}$, Erythromycin $> 4 \text{ mg/L}$, Clindamycin $> 4 \text{ mg/L}$, Moxifloxacin $> 4 \text{ mg/L}$, und Tetracycline $> 8 \text{ mg/L}$. (Barbut et al. Microbiology and Infection 13 (11), 1048–1057).

4. Welches Material ist zum Nachweis der hypervirulenten Keime erforderlich?

Ohne Anzucht keine Epidemiologie! Daher ist das Vorliegen der isolierten Keime notwendig. Hierzu sollte die Mikrobiologie die Methoden etabliert haben. Im gegenteiligen Fall ist ein Labor zu kontaktieren, dass auf die Keimanzucht vorbereitet ist.

Diagnose 027 und was dann?

1. Konsequenzen einer 027-Testung?

Es besteht Meldepflicht – siehe oben! Die offensichtlichste Konsequenz einer 027-Befundung ist die namentliche Meldung an die Gesundheitsbehörden. Da die Erkrankung mit hypervirulenten 027 Keimen als schwerwiegend eingestuft wird, ist Vancomycin das Mittel zur Therapie der floriden Infektion. Ferner geht von Patienten mit einem solchen Befund ein erhöhtes Risiko aus. Sie kommen als Quelle für die

Infektion weiterer Personen (Mitpatienten und Personal) in Betracht.

2. Ist nur 027 relevant – was sind die anderen Todbringer?

Patienten müssen nicht an einem „hypervirulenten Isolat“ leiden, um in Gefahr zu kommen. Endemisch finden sich immer wieder Ausbrüche von Ribotypen außer 027, die auch mit schwerwiegenden Komplikationen (toxisches Megacolon, Perforation, Kolektomie, Tod) verbunden sind. In großen Teilen Deutschlands ist Ribotyp 001 der häufigste *C. difficile*-Problemkeim. Hierbei zeigt sich immer wieder, dass bei endemischen Keimen generell eine Erythromycin- UND Moxifloxacinresistenz vorliegt. Der Gebrauch von Antibiotika in einer Einrichtung (auch im Bereich der Niederlassung) beeinflusst die Häufigkeit und Ausprägung der CDAD sehr stark!

3. Was bringt mir die Charakterisierung der Keime?

Krankenhäuser (aber nicht nur diese) sollten sich um einen hohen Hygienestandard bemühen. Es geht um den Ruf des Hauses, schnell ist man in den Medien und kann diese Last nicht so leicht ablegen! Zur Kontrolle des Hygienestatus ist das Monitoring von *C. difficile* dringend angeraten. Ärzte vor Ort sollten wissen, ob hypervirulente *C. difficile*-Isolate lokal vorkommen, ob es sich immer um identische Ribotypen handelt und ob Isolate bereits endemisch gehäuft vorkommen. Ein einheitlicher Ribotyp in hoher Anzahl deutet auf eine endemische Situation hin.

4. Zur Frage Metronidazol vs Vancomycin?

Metronidazol ist das Mittel der Wahl bei unkomplizierten Verläufen mit bledem Durchfall. Das Resultat von Metronidazol-Therapien haben Belmares et al. [59] untersucht und beschrieben, dass nur 71% der Patienten in sechs Tagen auf die Therapie reagiert haben. Insgesamt und bei mehr Geduld waren es dann 91%, also fast alle. Die Daten (s. Tabelle 3) zur Korrelation zwischen Schweregrad und dem Erfolg der Metronidazoltherapie zeigen vorläufig (es bedarf der prospektiven Untersuchung), dass über einem Wert von 2 Vancomycin als Therapeutikum indiziert ist. Unstrittig ist: handelt es sich um einen schweren Verlauf, verstirbt der Patient innerhalb von zwei bis drei Tagen. Unterbleibt die Gabe des sofort wirksamen Vancomycins, hat der Behandler unter Umständen das Schicksal des Patienten bestimmt. Darum: Vancomycin für die schweren Fälle: PMC, Kolektomie, Megacolon, 027 im Umfeld. Zur Definition schwerer Fälle sei auch auf die RKI-Richtlinie zur namentlichen Meldepflicht verwiesen.

Auslöser:

1. Kein Auslöser zu erkennen!

Bitte daran denken, dass die Medikation auch mit starker Verzögerung zur manifesten Erkrankung führen kann! In der Anamnese ist gezielt nach Antibiose vor 4–6 Wochen (im Einzelfall sogar noch weiter zurückliegend) zu fragen. Man stellt sich vor, dass *C. difficile* bei solchen Fällen gegebenenfalls erst aus

der Sporenform wieder anwachsen und die Darmflora übersiedeln muss, um den Durchfall auszulösen.

2. Differentialdiagnose

Der Nachweis von *C. difficile* Toxinen bei Durchfällen kann auch den falschen Weg weisen! Die Toxine sollten eine Veränderung der Darmschleimhaut hervorrufen. Ohne histologischen Befund ist ein kausaler Zusammenhang zu hinterfragen und differentialdiagnostische Überlegungen anzustellen (andere Erreger?, Lebensmittelunverträglichkeit? etc.).

Hygienemaßnahmen

1. Patienten wie lange isoliert halten?

In Gesundheitseinrichtungen (Krankenhäuser, Altersheime, (auch häusliche) Pflegeeinrichtungen) muss für die separate Unterbringung symptomatischer Patienten gesorgt werden, die typischen Hygienemaßnahmen müssen eingehalten werden. Die Isolierung kann bei orientierten Personen nach Abklingen des Durchfalls aufgehoben werden. Für desorientierte Personen gilt das nur eingeschränkt. Hier steht im Vordergrund der Überlegungen, dass fäkale Kontaminationen vermieden werden müssen, um die Ausbreitung von *C. difficile* auf der Station/Etage/Haus zu vermeiden.

2. Was sind Treiber der Infektion?

- „Keine Erkrankung ohne Besiedlung mit toxischen Keimen“ bedeutet, dass effektive Hygienemaßnahmen die Häufigkeit der CDAD niedrig hält. Wer, was, wo – weiß das gut ausgebildete und eingewiesene Personal!
- Übermäßiger Gebrauch von Antibiotika und hier speziell der risikohaften Substanzklassen (Tabelle 2)! Clindamycin, Cephalosporine der zweiten und dritten Generation, Fluorochinolone (als Beispiele) nur nutzen, wenn kein anderer Weg zum Ziel führt. Als Alternative weniger risikohafte Substanzen nutzen! Wie sehen Ihre Richtlinien zum Gebrauch und zur Verschreibung von Antibiotika aus?
- Vorbereitungen treffen für den Ernstfall: Wissen und Können sollten in einen Hygieneplan für den CDAD Notfall umgesetzt werden, der verbindlich für das eigene Umfeld in Kraft gesetzt wird (s. auch AWMF).

3. Ist das Personal gefährdet?

Nicht anders als bei anderen Infektionserkrankungen besteht auch für die CDAD ein Erkrankungsrisiko für das Personal. Noroviren sind bei weitem kontagiöser. Dennoch sind anhaltende Durchfälle beim Personal auf *C. difficile* Erkrankungen zu untersuchen. Dabei sind Hausärzte oftmals überfordert, denn *C. difficile* Erkrankungen spielen in deren Praxis noch eine untergeordnete Rolle. Fälle von 3- bis 4-monatigen Durchfallsepisoden bei Krankenhauspersonal ohne Diagnosestellung der CDAD sind uns aus der Beratungspraxis bekannt.

Das Ausmaß der Erkrankungen wird beim Personal mit der Ausbreitung der hypervirulenten Keime an-

steigen. Bisher schützte das nicht passende Alter von unter 65 Jahren, aber die neuen Erreger befallen nun auch junge Leute!

4. Sind Schwangere gefährdet?

Eine Schwangere besucht Angehörige und erfährt danach von einem *C. difficile*-Durchfall. Akuter Grund zur Besorgnis besteht nicht und ist erst dann gegeben, wenn es bei der Person zu Durchfallsymptomatik kommt. Ohne zeitgleiche Antibiotikatherapie wird das aber die große Ausnahme bleiben.

Epilog: Eine direkte Ansprache an alle Kollegen

Es haben sich wiederholt Pflegedienstleitungen bei uns beklagt, weil sie im Verlauf der Rückverlegung eines Pflegebedürftigen nur durch Zufall und nur unzureichend über eine CDAD-Erkrankung informiert worden sind. „Ihr Angehöriger hat noch ein bisschen Durchfall, seien Sie ein bisschen vorsichtig“ war die Entlassungsinformation an die Angehörigen. Weder Inhalt noch Form entsprechen der Art der Informationsvermittlung beim Vorliegen einer CDAD und nachgewiesenen *C. difficile*-Toxinen! Da hilft dann auch nicht, dass die Pflegekräfte bestens über die einzuhaltenden Hygienemaßnahmen informiert sind. Solche Isolate werden leicht auf alle Älteren verteilt, die von dem betroffenen Dienst versorgt werden.

Für uns als Ärzte besteht die Pflicht, dafür Sorge zu tragen, dass die relevante Information dem zuständigen Umfeld zuverlässig (in Schriftform!) übermittelt wird. Übernehmen Sie im positiven Sinne Verantwortung für Ihr Umfeld, seien Sie Vorbild und geben Sie die notwendigen Informationen an Patienten, Pfleger und nachsorgende Kollegen verlässlich weiter, man wird es Ihnen danken!

Literatur

1. Knoop FC, Owens M, Crocker IC. Clostridium difficile: clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev 1993;6:251–65.
2. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med 1974;81:429–33.
3. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978;298:531–4.
4. Rifkin GD, Fekety FR, Silva J Jr. Antibiotic-induced colitis: implication of a toxin neutralised by Clostridium sordellii antitoxin. Lancet 1977;2:1103–6.
5. Larson HE, Price AB. Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. Lancet 1977;2:1312–4.
6. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978;298:531–4.
7. George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, et al. Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis. Br Med J 1978;1:695.

8. McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile* – associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:40–8.
9. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile* – associated diarrhea: a review. *Arch Intern Med* 2001; 161:525–33.
10. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334–9.
11. Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect* 2003;54:243–5.
12. Cunningham R. Proton pump inhibitors and the risk of *Clostridium difficile*-associated disease: further evidence from the community. *CMAJ* 2006;175:757.
13. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;8:2442–9.
14. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353:2433–41.
15. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006;12 Suppl 6:2–18.
16. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 2006;73:187–97.
17. Razavi B, Apisarnthanarak A, Mundy LM. *Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance. *Infection* 2007;35:300–7.
18. McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:40–8.
19. Riley TV, Codde JP, Rouse IL. Increased length of hospital stay due to *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *Lancet* 1995;345:455–6.
20. MacGowan AP, Feeney R, Brown I, McCulloch SY, Reeves DS, Lovering AM. Health care resource utilization and antimicrobial use in elderly patients with community-acquired lower respiratory tract infection who develop *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:537–41.
21. Zaiss NH, Weile J, Ackermann G, Kuijper E, Witte W, Nübel U. A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. *Euro Surveill* 2007;12: E071115.1.
22. Kleinkauf N, Weiss B, Jansen A, Eckmanns T, Bornhofen B, Kühnen E, et al. Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Germany. *Euro Surveill* 2007;12:E071115.2.
23. www-Seite zu googlen über die Suche nach: RKI *Clostridium difficile* und Meldepflicht http://www.rki.de/cln_049/nn_717602/DE/Content/InfAZ/C/Clostridium_difficile/Flussdiagramm_Meldung,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Flussdiagramm_Meldung.pdf.
24. Finney JM. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1893;4:53–5.
25. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants. *Am J Dis Child* 1935;49:390–402.
26. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1979;9:214–9.
27. Wilson KH, Sheagren JN. Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis* 1983; 147:733–6.
28. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, et al. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol* 2005;54: 113–7.
29. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007;45:992–8.
30. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008;46 Suppl 1:S12–8.
31. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 1997;65:1402–7.
32. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 1996;181: 29–38.
33. Braun V, von Eichel-Streiber C. Virulence-associated mobile elements in Bacilli and Clostridia. In *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*, Eds Kaper JB und Hacker J. American Society for Microbiology Washington DC 1999.
34. Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5844–9.
35. Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 2007;64:1274–88.
36. Carter GP, Purdy D, Williams P, Minton NP. Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a luxS-type signalling system. *J Med Microbiol* 2005;54:119–27.
37. Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2001;50:613–9.
38. Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2002;40:3470–5.
39. von Eichel-Streiber C, Boquet P, Sauerborn M, Thelestam M. Large clostridial cytotoxins – a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol* 1996;4:375–82.
40. Amimoto K, Noro T, Oishi E, Shimizu M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology* 2007;153:1198–206.
41. von Eichel-Streiber C, Laufenberg-Feldmann R, Saringen S, Schulze J, Sauerborn M. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol Gen Genet* 1992;233:260–8.
42. Rupnik M, Pabst S, Rupnik M, von Eichel-Streiber C, Urlaub H, Söling HD. Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology* 2005;151:199–208.
43. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 1995;375:500–3.
44. von Eichel-Streiber C, Meyer zu Heringdorf D, Habermann E, Saringen S. Closing in on the toxic domain through anal-

- ysis of a variant *Clostridium difficile* cytotoxin B. *Mol Microbiol* 1995;17:313–21.
45. Fiorentini C, Fabbri A, Falzano L, Fattorossi A, Matarrese P, Rivabene R, et al. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun* 1998;66:2660–5.
 46. Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 2001;69:1329–36.
 47. Belyi Y, Tabakova I, Stahl M, Aktories K. Lgt: a family of cytotoxic glucosyltransferases produced by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 2008;190:3026–35.
 48. Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer DK, Aktories K, et al. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 2003;278:44535–41.
 49. Teneberg S, Lönnroth I, Torres López JF, Galili U, Halvarsson MO, Angström J, et al. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 1996;6:599–609.
 50. Greco A, Ho JG, Lin SJ, Palcic MM, Rupnik M, Ng KK. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:460–1.
 51. Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Persson B, Pollesello P, Moos M, von Eichel-Streiber C, et al. Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene. *J Biol Chem* 1997;272:23784–91.
 52. von Eichel-Streiber C, Warfholomeow I, Knautz D, Sauerborn M, Hadding U. Morphological changes in adherent cells induced by *Clostridium difficile* toxins. *Biochem Soc Trans* 1991;19:1154–60.
 53. Florin I, Thelestam M. Lysosomal involvement in cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B. *Microb Pathog* 1986;1:373–85.
 54. Henriques B, Florin I, Thelestam M. Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. *Microb Pathog* 1987;2:455–63.
 55. Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schratzenholz A, et al. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 2007;446:415–9.
 56. Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJ, Aktories K. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *J Biol Chem* 2007;282:25314–21. Epub 2007 Jun 25.
 57. Sheahan KL, Cordero CL, Satchell KJ. Autoprocessing of the *Vibrio cholerae* RTX toxin by the cysteine protease domain. *EMBO J* 2007;26:2552–61.
 58. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev Med* 1998;49:375–90.
 59. Belmares J, Gerding DN, Parada JP, Miskevics S, Weaver F, Johnson S. Outcome of metronidazole therapy for *Clostridium difficile* disease and correlation with a scoring system. *J Infect* 2007;55:495–501.
 60. Delmee M, Homel M, Wauters G. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J Clin Microbiol* 1985;21:323–7.
 61. Delmée M, Avesani V. Virulence of ten serogroups of *Clostridium difficile* in hamsters. *J Med Microbiol* 1990;33:85–90.
 62. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M, Kyne L. Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:932–40.
 63. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD)*Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 2007;13:1048–57.
 64. Rafii F, Wynne R, Heinze TM, Paine DD. Mechanism of metronidazole-resistance by isolates of nitroreductase-producing *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* from the human intestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 2003;225:195–200.
 65. Read RC. Editorial commentary: Vancomycin for your mother, metronidazole for your mother-in-law. *J Infect* 2007;55:483.
 66. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:767–78.
 67. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:812–22.
 68. http://www.mhp-verlag.de/bilder/awmf_cd.pdf.
 69. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006;145:758–64.
 70. Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J* 2007;37:561–8.
 71. Clabots CR, Gerding SJ, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. *J Clin Microbiol* 1989;27:2386–7.