

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Karch

**Inzidenz von *Clostridium difficile* an einem Universitätsklinikum und
Untersuchungen zum Nachweis von *C. difficile* in der
Krankenhausumgebung**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

Vorgelegt von Günther, Andreas
aus Bad Driburg
2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms -
Universität Münster

Dekan:

Univ.- Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Alexander W. Friedrich

2. Berichterstatter

Prof. Dr. med. Karsten Becker

Tag der mündlichen Prüfung:

09.12.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Direktor: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Karch

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander W. Friedrich

Koreferent: Prof. Dr. med. Karsten Becker

ZUSAMMENFASSUNG

Inzidenz von *Clostridium difficile* an einem Universitätsklinikum und Untersuchungen zum Nachweis von *C. difficile* in der Krankenhausumgebung

von Günther, Andreas

Clostridium difficile ist der häufigste Erreger nosokomial erworbener, Antibiotika- assoziierter Durchfallerkrankungen und häufigster Auslöser der pseudomembranösen Enterokolitis. Daneben berichten einige Länder über eine steigende Inzidenz von *C. difficile* assoziierten Diarrhoen in der Allgemeinbevölkerung. Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb retrospektiv die Fallzahl und Inzidenzdichte von *C. difficile* bei Patienten am Universitätsklinikum Münster in den Jahren 2007 und 2008 unter Nutzung von mikrobiologischen Labordaten. In diesem Zeitraum werden insgesamt n=536 Fälle von *C. difficile* Nachweisen aus Stuhlproben festgestellt. Die Inzidenzdichte beträgt somit 0,66/1.000 Patiententage in 2007 und 0,61/1.000 Patiententage in 2008. In 2007 sind 21% der Fälle ambulant und 79% nosokomial erworben (Nachweis aus >48h nach Krankenhausaufnahme gewonnenem Material); für 2008 gibt es 70% nosokomiale und 30% ambulante Fälle. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 45,45 Jahre. 47% der Patienten sind weiblichen Geschlechts. 48% der Patienten mit *C. difficile* Nachweis werden in der Inneren Abteilung, 17% in der Intensivmedizin, 11% in chirurgischen Kliniken, 15% in anderen operativen Abteilungen und 10% in anderen konservativen Bereichen behandelt.

Vor dem Hintergrund der nosokomialen Morbidität der Patienten und den damit verbundenen gesundheitsökonomischen Kosten (erhöhte Krankenhausliegedauer) kommt der Prävention *C. difficile* assoziierter Erkrankungen eine wichtige Bedeutung zu. Präventive Maßnahmen umfassen die Kontaktisolation von Patienten, sowie die konsequente Umsetzung Hände- und Flächenhygienischer Maßnahmen. Aus krankenhaushygienischer Sicht ist deshalb der Nachweis von *C. difficile* in der Krankenhausumgebung ein Surrogatmarker für die Umsetzung und Effektivität von Präventionsmaßnahmen. In der vorliegenden Arbeit werden deshalb Umgebungsuntersuchungen zum Nachweis von *C. difficile* auf verschiedenen transmissionsrelevanten Oberflächen in Patientenzimmern des UKM durchgeführt. Insgesamt wurden n=240 Proben von definierten Stellen aus Patientenzimmern in denen n=60 Patienten mit *C. difficile* Nachweis untergebracht waren, untersucht. Parallel wurde eine äquivalente Zahl (n=240) von gleichartig gewonnenen Umweltproben aus Patientenzimmern untersucht, in denen keine Patienten mit Diarrhoe oder *C. difficile* Nachweis versorgt wurden. *C. difficile* wurde dabei in n=2 Proben nachgewiesen; in n=4 Proben wurde *C. perfringens* gefunden, in n=1 Probe *C. barati*.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine stabile Inzidenz von *C. difficile* Fällen am UKM in den Jahren 2007 und 2008. Die Inzidenzdichte entspricht den im Rahmen nationaler Surveillancedaten erhobenen Werten. Die Ergebnisse der Umgebungsuntersuchungen weisen auf eine Effektivität der Präventivmaßnahmen hin.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
2 ZIELSETZUNG.....	10
3 MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 EPIDEMIOLOGIE VON <i>C. DIFFICILE</i> AM UKM	11
3.1.1 Fallzahlen zum Nachweis von <i>C. difficile</i> bei Patienten des UKM in den Jahren 2007 & 2008 .	11
3.1.2 Populationsuntersuchung und verwendetes Material.....	13
3.2 UMGEBUNGSUNTERSUCHUNGEN / NACHWEIS VON <i>C. DIFFICILE</i> AUS UMWELTPROBEN AUS ZIMMERN VON PATIENTEN MIT CDAD.	14
3.2.1 Koloskope: Nachweis von <i>C. difficile</i> aus Spülflüssigkeit bei der Untersuchung aufbereiteter Koloskope.....	16
3.2.2 Sporen und Bakterien- Aufnahme über Polywipe Oberflächenträger.....	16
3.2.3 Herstellung von <i>C. difficile</i> Selektivmedien.	17
3.3 WEITERFÜHRENDE DIAGNOSTIK MITTELS UNTERSCHIEDLICHER FÄRBEMETHODEN.....	18
3.3.1 Färbeprozess der Gram- Färbung.	19
3.3.2 Färbedurchführung der Malachitgrün- Färbung zum Direkt- Nachweis von Sporen.	20
3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS VON <i>C. DIFFICILE</i> (SEQUENZIERUNG UND TOXINNACHWEIS).....	20
3.4.1 Speziesidentifikation mittels partieller 16S- ribosomaler DNA- Sequenzierung.....	20
3.4.2 Durchführung der partiellen 16S- ribosomalen DNA (rDNA)- Sequenzierung.....	21
4 ERGEBNISSE	23
4.1 UNTERSUCHUNGSZEITRAUM UND PATIENTENKOLLEKTIV.....	23
4.2 DARSTELLUNG DER <i>C. DIFFICILE</i> POSITIVEN PATIENTEN.	23
4.2.1 Altersstruktur der <i>C. difficile</i> positiven Patienten am UK Münster.	23
4.2.2 Geschlechterverteilung.	25
4.2.3 Betroffene Kliniken und Abteilungen mit der Verteilung der <i>C. difficile</i> positiven Patienten....	27
4.2.4 Aufenthaltsdauer von <i>C. difficile</i> positiven Patienten am UKM.	29
4.2.5 Aufenthaltsdauer bis zur <i>C. difficile</i> - Diagnose.	31
4.2.6 Nosokomiale versus ambulante <i>C. difficile</i> Fälle.....	32
4.2.7 Inzidenzraten am UKM für 2007 und 2008.....	35
4.2.8 Vergleich mit nationalen Referenzdaten und statistische Unterschiede	37
4.3 DETEKTION VON <i>C. DIFFICILE</i> AUF OBERFLÄCHEN.	38
4.4 UNTERSUCHUNG DER KOLOSKOPE AUF BAKTERIENWACHSTUM, DIE AUF EINE BESIEDLUNG MIT <i>C. DIFFICILE</i> ODER DESSEN SPOREN SCHLIEßEN LASSEN.....	40
5 DISKUSSION	41
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	53
7 LEBENS LAUF UND DANKSAGUNG	65
8 ANHANG	I
8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
8.2 TABELLENVERZEICHNIS	I
8.3 DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	II

1 Einleitung

Clostridium difficile (*C. difficile*), eine Spezies der Gattung *Clostridium* (Familie Bacillaceae), ist ein obligat anaerob wachsendes, aerotolerantes, sporenbildendes gram-positives Stäbchenbakterium. Sein natürliches Habitat ist der Darm von Mensch und Tier, es kann aber auch im Erdboden und in Gewässern nachgewiesen werden.

C. difficile ist die Hauptursache für Antibiotika- assoziierte Erkrankungen (CDAD) sowie nosokomial erworbene Diarrhoen [42] [39] [13].

Bei etwa 3% der gesunden Erwachsenen kommt *C. difficile* als Kommensale in der Kolonflora vor, ohne dass eine obligat pathogene Bedeutung bestünde [3] [11] [79]. Allerdings ist *C. difficile* eine der wichtigsten Ursachen für nosokomial erworbene, Antibiotika-assoziierte Durchfallerkrankungen und verantwortlich für nahezu alle Fälle von pseudomembranöser Kolitis [11] [33] [47] [60] [95]. Neben endogenen Infektionen durch Vermehrung des Erregers unter Nutzung eines Selektionsvorteils gegenüber den anderen Darmkommensalen während einer antimikrobiellen Therapie, spielen nach neueren Erkenntnissen orale Infektionen mit Sporen die entscheidende Rolle in der Pathogenese der toxinbedingten *C. difficile* assoziierten Diarrhoe (CDAD).

Abhängig vom Vorhandensein von Risikofaktoren wie der Dauer des Krankenhausaufenthaltes, Alter des Patienten, Schwere der Grunderkrankung und Antibiotikatherapie steigt die *C. difficile*- Kolonisationsrate bei hospitalisierten Patienten auf 16% bis 35% [12] [29] [59] [61]. Die Kolonisation wird durch die Elimination der anderen physiologischen Keime in der Darmflora infolge von Antibiotikatherapie, invasiven chirurgischen Eingriffen, Tumoren oder Immunsuppression eines vorgeschädigten Organismus gefördert. Am häufigsten werden die Erkrankungen nach oraler Gabe von Clindamycin, Ampicillin, Fluorochinolonen und Cephalosporinen beobachtet [71] [98].

Während die Mehrzahl der bei Aufnahme mit *C. difficile* besiedelten Patienten asymptomatisch bleibt, entwickeln 15% bis 71% derer, die im Krankenhaus den Erreger erwerben, eine symptomatische CDAD [61]. *C. difficile* kann von mindestens 12% bis 30 % aller Patienten mit Antibiotika- assoziierter Diarrhoe, von 50% bis 70% der Patienten mit Antibiotika- assoziierter Kolitis und von über 90% der Patienten mit pseudomembranöser Kolitis isoliert werden [40] [12] [29].

Einleitung

Die Latenzzeit bis zum Auftreten von Symptomen beträgt in der Regel vier bis zehn Tage ab Beginn der antibiotischen Behandlung. Das *C. difficile* assoziierte Erkrankungsspektrum reicht von milder Diarrhoe bis zur fulminanten Kolitis mit einem schweren Krankheitsverlauf, vermehrten Komplikationsraten und erhöhter 30 Tage- Mortalität von bis zu 7% [55]. Neben den Diarrhoen und abdominalen Schmerzen und Kolitiden können dem bedrohlichen Krankheitsbild auch Fieber, Schock und ein toxisches Megakolon hinzutreten [59] [66]. Die Letalität der CDAD beläuft sich auf 1% bis 2%, steigt jedoch auf 6% bis 30% bei nachgewiesener pseudomembranöser Kolitis [12] [77].

Die Behandlung erfolgt, sofern klinisch vertretbar, möglichst nach Absetzen der auslösenden Antibiotika, mit Vancomycin (p.o.) oder Metronidazol (p.o.) bzw. mit Metronidazol (i.v.). Eine Besserung ist nach drei bis zehn Tagen zu erwarten, allerdings gibt es bei 10- 20% der Fälle Rezidive [9] [11] [47].

Als Therapiealternativen zu Vancomycin bzw. Metronidazol können Präparate aus der Gruppe der Nitrazonamide verwendet werden [63].

Allerdings wird auch von Resistenzen berichtet. So beweisen *Razavi et al.*, dass bereits jetzt resistente *Clostridien* Stämme gegen Fluorchinolone (Gyrasehemmer) der dritten Generation (z.B. Moxifloxacin) auftreten, die besonders hypervirulente Eigenschaften mit Bildung des *Toxin c* aufweisen und dadurch die Zahlen zu Morbidität, Mortalität und den damit assoziierten Kosten erhöhten [71].

Wichtig bleibt zu dem allerdings, notwendige Antibiotika- Therapien von Zeitdauer und verabreichter Menge / Dosis zu optimieren, dass CDAD durch antibiotische Wirkmechanismen nicht zusätzlich getriggert zum Ausbruch gelangt [14].

In letzter Zeit kann in Deutschland eine Zunahme von *C. difficile* assoziierten Diarrhoen (CDAD) beobachtet werden. Die Inzidenz von CDAD stieg von 7,4 pro 100.000 stationärer Aufnahmen in 2000 auf 39,3 im Jahre 2004 an [72].

Neben der gesundheitlichen Gefährdung der Patienten, verursacht die steigende Inzidenz von CDAD eine hohe finanzielle Belastung der betroffenen Krankeneinrichtungen [96]. Der Krankenhausaufenthalt eines CDAD- Patienten ist bis zu 3 Wochen länger als bei Patienten ohne die entsprechende Symptomatik [54]. Zudem umfasst das Management von CDAD- Fällen im Krankenhaus Hygienemaßnahmen wie die Kontaktisolierung der Patienten,

Einleitung

Dekontamination von Krankenzimmern bis hin zur Schließung ganzer Stationen in Ausbruchsfällen. So belaufen sich die durch *C. difficile* verursachten Kosten im Gesundheitswesen auf circa 3 Milliarden Euro pro Jahr in Europa und etwa 1,1 Milliarden Dollar in den USA [53] [54].

Der Pathomechanismus von *C. difficile* beruht auf der Bildung von Toxinen. Toxin A (TcdA) ist ein Enterotoxin, das zu vermehrter Sekretion von Elektrolyten und Flüssigkeit führt. Toxin B (TcdB) ist ein Zytotoxin, das die Mukosa des Kolons schädigt und zur Fibrin-Aggregation führt [47] [10]. Beide Toxine binden über Epithelzellrezeptoren an die Darmschleimhaut. Neben dichten, entzündlichen Mukosainfiltraten findet man über dem geschädigten Epithel- Areal zahlreiche Erosionen, die von einer granulozytär durchsetzten Fibrin- und Detritusschicht (= Pseudomembran) bedeckt sind [10] [8] [73] [75].

Ein weiteres Toxin ist das Binäre Aktin- ADP- ribosylierende Toxin (CDT A/B), welches zusätzlich bei bestimmten Stämmen auftreten kann, dessen Funktion als ADP-Ribosyltransferase bis jetzt allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden konnte [68].

Atoxinogene *C. difficile* Stämme sind in der Regel apathogen. Wird jedoch TcdB alleine oder eine Kombination von TcdB und TcdA produziert, ist das Bakterium pathogen. Solche Stämme lassen sich sowohl bei Symptomlosen wie auch bei CDAD- Patienten nachweisen. Jedoch ist zu beachten, dass es zum klinischen Vollbild der CDAD nur durch Produktion von TcdB oder beider Varianten TcdB und TcdA kommt [92] [56] [87] [4].

Gegenwärtig erlangt ein neuer *C. difficile*- Subtyp mit erhöhter Virulenz und veränderten Resistenzeigenschaften zunehmende Bedeutung. Seit 2005 werden immer mehr Fälle bekannt, an denen dieser hochvirulente *C. difficile* - Stamm beteiligt ist. Er wird in der Restriktions-Endonukleasen Analyse als Typ B1 und in der PCR als Ribotyp 027, Toxinotyp III und in der Pulsfeldgelelektrophorese als North American Profile 1 (NAP I) charakterisiert [92].

Isolate des Ribotyps 027 verfügen über die Toxingene (*tcdA* und *tcdB*) für die Produktion von Toxin A und Toxin B. Als weiteren Virulenzfaktor besitzen sie das Gen für CDT A/B. Ein besonderes Merkmal ist eine 18 bp (Basenpaar) -Deletion im *tcdC*- Gen, welches das Regulatorprotein TcdC kodiert und so die Expression der Toxine negativ herab reguliert. Eine Deletion im *tcdC*- Gen und die dadurch bedingte verminderte Aktivität des TcdC werden als Ursache für die stark erhöhte Toxin- Produktion dieses Stammes diskutiert [91].

Einleitung

Besonders auf dem amerikanischen Kontinent hat sich mit dem vermehrten Auftreten des *C. difficile* Ribotyps 027 in den letzten fünf Jahren die Prävalenz der symptomatischen *C. difficile* Infektionen verändert. Im Zeitraum von 1996 bis 2003 haben sich die Patientenzahlen in den USA mit dieser Entlassungsdiagnose von 31 pro 100.000 auf 61 pro 100.000 nahezu verdoppelt [60].

In Kanada werden nosokomiale Ausbrüche mit einer 5- bis 20- fachen Zunahme der Inzidenz von CDAD durch *C. difficile* des Ribotyps 027 beobachtet (2002- 2005), die durch eine etwa 3- bis 5- fach erhöhte Letalität (13,8- 22% vs. 4,7%) symptomatischer *C. difficile* Infektionen durch vermehrte Toxinbildung charakterisiert waren [55] [59]. Im Jahr 2003 gelangen solche Epidemiestämme auch nach Europa. Betroffen sind bisher unter anderem England (2003) [80], Belgien (2005) [45], die Niederlande (2005) [53] [52], Frankreich (2006) [85] und Deutschland (2007) [72] [90].

Im Krankenhaus erfolgt die Übertragung von *C. difficile* fäkal-oral, über die Hände des Personals oder durch direkte Schmierinfektion von einem kolonisierten oder infizierten Patienten ausgehend [61]. Daneben spielt für die Weiterverbreitung von *C. difficile* im Krankenhaus die Übertragung über kontaminierte Oberflächen und Geräte (Bettschüsseln, Koloskope und Endoskope) eine wichtige Rolle [18]. Die Übertragung wird dabei durch die große Umweltresistenz von *C. difficile* begünstigt.

Durch seine Fähigkeit bei ungünstigen Umweltbedingungen in das Sporulationsstadium überzugehen und Endosporen zu bilden, kann *C. difficile* die für ihn extremen Umweltbedingungen überstehen und in inaktiver Form überdauern. Als extrem widerstandsfähige, metabolisch inaktive Dauerformen besitzen die Endosporen eine hohe Resistenz gegenüber physikalischen Einflüssen (v.a. Hitze) und chemischen Reagenzien (Desinfektionsmitteln etc.). Unter lebensgünstigen Bedingungen keimen die Sporen aus und das Bakterium kann als vegetative Zellform weiterleben und neue Kolonien ausbilden [47].

Präventivmaßnahmen zur Verhütung einer Weiterverbreitung von *C. difficile* im Krankenhaus fokussieren deshalb vor allem auf die konsequente Umsetzung krankenhaushygienischer Maßnahmen welche direkte und indirekte Schmierinfektionen vermeiden sollen. Besonders während der symptomatischen Phase der Erkrankung (akute Diarrhoen) sind dabei Barrieremaßnahmen von Bedeutung (z.B. Kontaktisolierung des Patienten und Tragen von Handschuhen beim Umgang mit potentiell infektiösen Materialien). Zum anderen kommt der

Einleitung

Dekontamination der patientennahen und patientenfernen Umgebung eine besondere Rolle zu.

Dabei kann bedingt durch die Sporen- Resistenz, die Entfernung von *C. difficile* aus der Umgebung mit Hilfe herkömmlicher Flächendesinfektionsmitteln bei der Scheuer- Wisch- Desinfektion erschwert sein. Eine effektive Dekontamination von Händen und anderen kontaminierten Flächen kann dabei nur durch eine zusätzlich vorhergehende und gründliche mechanische Reinigung respektive Händewaschung effektiv erfolgen. Auch ist der Einsatz von speziellen sporoziden Flächendesinfektionsmitteln (z.B. *Hydrogen- Peroxid*, *Natrium- Hypochlorid*) zu bedenken [7] [21].

Auf Grund dieser Bedingungen sind kontrollierte und konsequent durchgeführte hygienische Maßnahmen bei Patient und Therapeut notwendig, um schwerwiegende Erkrankungen und die Wahrscheinlichkeit einer übergreifenden Infektion auf weitere Patienten möglichst gering zu halten [18].

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen von *C. difficile* bei Patienten des Universitätsklinikums Münsters untersucht werden. Dazu werden aus der mikrobiologischen Routinediagnostik vorliegende Daten über einen Zeitraum von zwei Jahren (2007 und 2008) epidemiologisch ausgewertet. Dabei soll neben der absoluten Fallzahl, die Inzidenzdichte von *C. difficile* in verschiedenen klinischen Bereichen ermittelt werden. Außerdem wird die Patientenstruktur (Alter, Geschlecht) der an *C. difficile* erkrankten Patienten dargestellt. Die so ermittelten Daten werden mit Daten der nationalen nosokomialen Surveillancesysteme (CDAD- KISS) verglichen.

Aufgrund der in einigen Ländern steigenden Inzidenz außerhalb der Krankenhäuser erworbener CDAD wird der Anteil der ambulant und nosokomial erworbenen *C. difficile* Nachweise am UKM bestimmt.

Desweiteren soll die Umgebung von an *C. difficile* erkrankten Patienten hinsichtlich des Vorkommens von *C. difficile* in vegetativer Form und vor allem der Sporen untersucht werden. Dabei sollen sowohl handnahe und –ferne Bereiche untersucht werden. Zum Vergleich soll das Vorkommen von *Clostridien*- Sporen in der Umgebung von Patienten ohne Diarrhoe und ohne *C. difficile* Nachweis bestimmt werden.

Auf diese Weise sollen Erkenntnisse über die Verbreitung von *C. difficile* in der stationären Umgebung gewonnen und ggf. potentielle transmissionsrelevante Oberflächen identifiziert werden. Desweiteren können ggf. Schwachpunkte der flächendesinfizierenden Maßnahmen in der Umgebung von Patienten mit CDAD identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Epidemiologie von *C. difficile* am UKM

3.1.1 Fallzahlen zum Nachweis von *C. difficile* bei Patienten des UKM in den Jahren 2007 & 2008

Im Folgenden werden die Kriterien zur Auswertung der epidemiologischen Daten zum Nachweis von *C. difficile* dargestellt.

Folgende Maßzahlen sollen berechnet werden:

- Gesamt- Inzidenzdichte: Gesamtzahl der *C. difficile*- Fälle pro 1.000 Patiententage
- Inzidenzdichte der nosokomialen *C. difficile*- Nachweise: Anzahl nosokomialer *C. difficile*- Nachweise pro 1.000 Patienten- Tage
- *C. difficile* Prävalenz bei Aufnahme: Anzahl mitgebrachter *C. difficile*- Fälle im Krankenhaus pro 100 Patienten des Krankenhauses

Die gezählten *C. difficile* Fälle werden nicht patientenbereinigt registriert; d.h. wenn ein "*C. difficile*- Patient" nach Entlassung aus der stationären Behandlung erneut aufgenommen und *C. difficile* erneut nachgewiesen wird, gilt dies als neuer, zu beschreibender Fall. Dabei wird der Patient der Station zugeordnet, auf dem der *C. difficile*- Nachweis diagnostiziert wurde, auch wenn anschließend eine hausinterne Verlegung in andere Fachbereiche/ -abteilungen oder Stationen erfolgt.

Die Unterscheidung von mitgebrachtem und nosokomialem *C. difficile* Fall definiert sich wie folgt: Erfolgt der Nachweis von *C. difficile* aus einem Material, das > 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme des Patienten gewonnen wurde, so gilt dies als „nosokomialer Fall“ (*gr. von Nosokomeion: Krankenhaus*). Dagegen gilt jeder Fall, bei dem der *C. difficile* Nachweis aus einem Material erfolgt, welches in den ersten 48 Stunden nach Hospitalisierung des Patienten gewonnen wurde, als importierter bzw. „mitgebrachter Fall“.

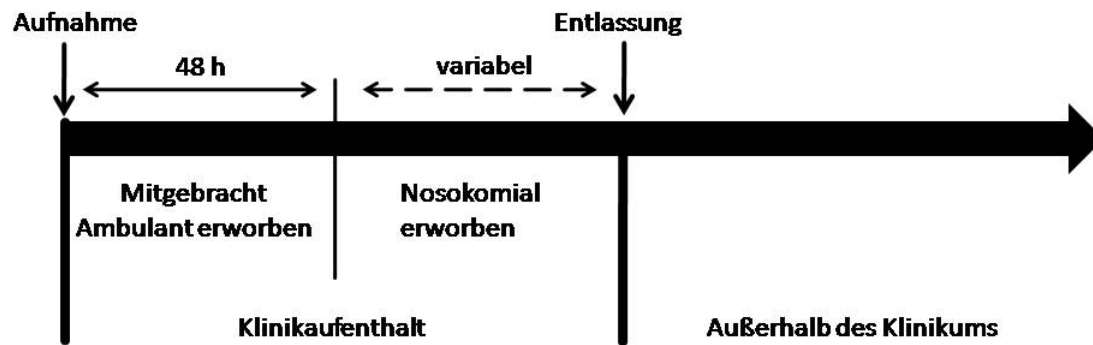


Abbildung 1 Begriffsdefinition bei *C. difficile* Fällen: mitgebrachte vs. nosokomial erworbene *C. difficile* Fälle

Desweiteren gelten folgende Definitionen:

- Patiententage: Aufnahmetag ist der erste Patiententag; der Entlassungstag wird nicht mehr gezählt.
- Anzahl der Patienten: Gesamtzahl aller stationären Patienten von 1. Januar bis 31. Dezember
- Die einzelnen Fachkliniken des UKM werden folgenden fünf Bereichen zugeordnet:
 - Intensivmedizinische Betreuung
 - Innere Medizin (Onkologie, Gastroenterologie, Kardiologie, Nephrologie)
 - Chirurgie: Abdominal-, Viszeral-, Gefäß-, Herz- und Thoraxchirurgie sowie Traumatologie und Unfallchirurgie
 - andere operative Fächer: Orthopädie, Urologie, Ophthalmologie, HNO- Kunde, Gynäkologie, Kinderchirurgie, Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie, Neurochirurgie und Dermatologie
 - andere konservative Fächer: Neurologie, Psychiatrie, Psychosomatik, Strahlentherapie, Nuklearmedizin, Pädiatrie und Geriatrie

3.1.2 Populationsuntersuchung und verwendetes Material

Die Erhebung der Patientendaten zur Erfassung der Inzidenz des *C. difficile* Nachweises am Universitätsklinikum Münster (UKM) für das Jahr 2007 und 2008 erfolgt retrospektiv und umfasst alle Patienten mit Nachweis von *C. difficile* in Stuhlproben. Dazu werden alle zwischen dem 1. Januar und dem 31. Dezember 2007 und dem 1. Januar und dem 31. Dezember 2008 am Universitätsklinikum in Münster stationär aufgenommenen Patienten erfasst bei denen ein Nachweis von Toxin-bildendem *C. difficile* aus Stuhlproben erfolgt. Gleichzeitig erfolgt bei den ambulanten Patienten eine Recherche der Grunderkrankung dieser Patienten mittels des Patientenverwaltungssystems ORBIS.

Zur Errechnung epidemiologischer Kennziffern werden die Zahl der während des Jahres 2007 und 2008 am UKM behandelten Patienten und die Zahl der Belegtage für das Gesamtklinikum mittels der Reportfunktion des zentralen Patientenerfassungssystems des UKM (Orbis) extrahiert.

Des Weiteren werden die am UKM gefundenen Daten mit denen des *Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes* (NRZ) (<http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/cdad.htm>) verglichen; zur vergleichenden statistischen Analyse wird der Chi² Test nach Pearson (SPSS 17.8) durchgeführt.

Als epidemiologische Kennziffern werden die Gesamt- Inzidenzdichte pro 1.000 Patienten an der Gesamtzahl der *C. difficile*- Fälle und die Inzidenzdichte der nosokomialen *C. difficile*- Nachweise pro 1.000 Patiententage erfasst. Desweiteren wird die Anzahl der Belegtage für jeden Patienten mit *C. difficile* Nachweis als Differenz zwischen Aufnahme- und Entlassungsdatum bestimmt. Der Aufnahmetag ist dabei der erste Patiententag, der Entlasstag wird nicht mehr gezählt.

Die mikrobiologische Diagnostik erfolgte dabei am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster mittels Toxinnachweis per ELISA (*RIDASCREEN Clostridium difficile Toxin A/ B*® der Firma R- Biopharm AG, Rhône Ltd, St. Didier au Mont d'or, Frankreich). Zusätzlich erfolgte parallel bei allen Proben die Anlage von anaeroben Kulturen zum Nachweis von *C. difficile* nach Ethanolbehandlung des Stuhls zur Unterdrückung der Kommensalflora. Bei kultureller Anzucht von *C. difficile* erfolgte die Speziesbestätigung mittels biochemischem Identifizierungssystem für anaerob wachsende Bakterien (ApiA™, BioMérieux) sowie erneutem Toxin-ELISA von der Kultur.

3.2 Umgebungsuntersuchungen / Nachweis von *C. difficile* aus Umweltproben aus Zimmern von Patienten mit CDAD

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Verbreitung von *C. difficile* Sporen und Bakterien in Patientenzimmern symptomatischer und asymptomatischer Patienten untersucht. Dabei soll zum einen die Verbreitung von *C. difficile* Sporen abgeschätzt werden. Zum anderen soll die Effektivität der Anwendung sporozider Flächendesinfektionsmittel überprüft werden.

Die Umgebungsuntersuchung erfolgt zunächst bei nachgewiesenen *C. difficile*- Trägern direkt im Patientenzimmer. *C. difficile*- Träger werden aufgrund der Befunde der Routinediagnostik aus Stuhlproben symptomatischer Patienten durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie mittels *C. difficile* Toxin-ELISA (RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/ B©) und kultureller Anzucht identifiziert.

Die Umgebungsuntersuchung erfolgt jeweils zeitnah (innerhalb von ≤ 72 h) nach positivem *C. difficile* Nachweis. Dabei werden die Proben vor der täglichen Routinedesinfektion der Patientenzimmer gewonnen. Vergleichend wird zusätzlich zu jeder Umgebungsuntersuchung im Zimmer eines *C. difficile* Patienten eine Untersuchung im Zimmer eines asymptomatischen Patienten durchgeführt. Dazu wird immer ein auf derselben Station gelegenes Zimmer ausgewählt, in dem kein Patient mit Diarrhoe oder mit Verdacht auf *C. difficile* assoziierte Erkrankung (CDAD) untergebracht ist.

Die Probenentnahmen erfolgen sowohl bei der Fallgruppe als auch in der asymptomatischen Vergleichsgruppe an folgenden standardisierten Stellen, die nachfolgend detailliert aufgeführt sind:

1. Beistell- / Nachttisch / Bettgalgen / Schwestern- Klingel (patientennah)
2. Bad- Armatur + WC- Spülung + Spülbecken
3. Waagerechte Flächen außerhalb der Reichweite des Patienten (patientenfern)
4. Fußboden

Material und Methoden



Abbildung 2 Typisches untersuchtes Patientenzimmer am UKM, in welchem Proben an den unterschiedlich eingefärbten Bereichen zur Umgebungsuntersuchung + Sporenaufnahme durch Oberflächenträger gewonnen werden (Vergleich Tabelle 1 : rot = 1. Position; blau 2. Position; grün 3. Position)

3.2.1 Koloskope: Nachweis von *C. difficile* aus Spülflüssigkeit bei der Untersuchung aufbereiteter Koloskope

Auch soll im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Besiedlung mit *C. difficile* an Koloskopen nachgewiesen bzw. untersucht werden. Dazu werden gemäß den Anforderungen an die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen (Quelle RKI) maschinell aufbereitete Koloskope auf eine evtl. Sporenlast und damit auf eine potentielle Infektions- respektive Kontaminationsquelle hin untersucht. Als Untersuchungsmaterial dient dabei Spülflüssigkeit aus den Arbeitskanälen der aufbereiteten Endoskope.

Bei der manuellen Vorreinigung noch im Untersuchungsraum werden grobe Verunreinigungen mit einem Einwegtuch abgewischt und anschließend mit Gigazym 2% mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten behandelt. Generell erfolgt die Aufbereitung von flexiblen Koloskopen und dessen endo-/ koloskopischem Zusatzmaterial dann in speziellen Reinigungs- und Aufbereitungsgeräten (z.B. Olympus RDG-E und BHT- RDG-E) mit Gigazym 2%.

Nach dieser Maßnahme werden die Kolo- und Endoskope mitsamt Zubehör mit Trinkwasser durchgespült und vom Reinigungsmittel und dessen Resten befreit; abschließend werden alle Kanäle mit Druckluft freigeblasen und mit desinfizierten Händen zur Aufbewahrung zusammengesetzt und vollständig trocken, staubgeschützt, vorzugsweise hängend, in einem speziellen Koloskopschrank gelagert.

3.2.2 Sporen und Bakterien- Aufnahme über Polywipe Oberflächenträger

Zur Flächenuntersuchung werden Polywipe- Oberflächenträger (Polywipe[®] Premoistened sponge swab der Firma Medical Wire & Equipments[®]) verwendet. Dabei handelt es sich um ein 50 cm² messendes Schwämmchen, welches mit einem sterilen Phosphat- Puffer getränkt und für eine Aufnahmefläche von bis zu einem m² Grund- bzw. Oberfläche geeignet ist. Nach der Probenentnahme, bei welcher sterile Handschuhe getragen werden, werden die Schwämmchen sofort in ein steriles Probengefäß aufgenommen. Es wird unverzüglich ein

Material und Methoden

Flüssignährmedium zur selektiven Anzucht von Clostridien hinzugegeben (CCFB-Medium, Herstellung siehe unten) und die Probe wird für 48h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Anschließend erfolgt die Ausplattierung von 10 µl dieser Bakteriensuspension mittels einer Mikropipette (*Eppendorf Standard*[®]) auf Schaedler- Platten, die für 48h bei 37°C anaerob inkubiert werden.

3.2.3 Herstellung von *C. difficile* Selektivmedien

Um den gezielten Nachweis von *C. difficile* zu erbringen, ist es notwendig, die Umgebungs- und Normalbakterienflora bei Probenentnahme und Kultivierung möglichst stark zu reduzieren. Dazu werden zum einen Natrium- Taurocholat (Ochsengalle) und zum anderen, die dem Lysozym ähnlichen antibiotischen Substanzen Cefoxitin und Cycloserin zugesetzt.

Substanzen	CCFB- Medium
Proteose Pepton 2	40g
Agar	0g
Na ₂ HPO ₄	5g
KH ₂ PO ₄	1g
NaCl	2g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12g
Fruktose	6g
Neutral Rot (1%) in Ethanol	3ml
Na Taurocholat	1g
Cefoxitin (8mg/ml)	2ml
Cycloserin ((62,5 mg/ml) 250 µg/ml)	4 ml
H ₂ O dest.	1liter

Tabelle 1 Rezept der modifizierten Medien: Bouillon (CCFB) [27]

Lysozym spaltet beta -1,4- glykosidische Bindungen von Murein. Unter den verschiedenen Bestandteilen der bakteriellen Zellwand ist dieses Peptidoglykan (auch Glycopeptid oder Mucopeptid) für das Überleben der Bakterien wichtig. Es ist ein einzelnes, sehr großes Makromolekül, das je nach Bakterienart 3-60 nm Länge besitzt. Grundbaustein des Mureins ist ein aus N- Acetylglucosamin und N- Acetylmuraminsäure bestehendes Disaccharid. Muraminsäureketten und damit die Mucopeptidschicht der Bakterienwand, d.h. damit auch der vegetativen Umweltflora bei der Umgebungsuntersuchung, werden spezifisch durch Muraminidasen wie dem Lysozym gespalten. Aus physiologischer Sicht betrachtet findet sich dieses Enzym in vivo z.B. auf der Nasenschleimhaut und in der Tränenflüssigkeit und hat die Aufgabe, die mit der Luft eindringenden Mikroorganismen zu zerstören. Es trägt so zur unspezifischen Immunabwehr im Organismus gegen die Umweltflora bei. Auch wichtige Antibiotika (z.B. Bacitracin und Penicillin) entfalten ihre bakteriostatische Wirkung durch die Hemmung der Mureinbiosynthese [32] [30].

So ist **Cefoxitin** ein systemisches Antibiotikum. Es hemmt die Zellwandbiosynthese und damit die Murein- Aggregation. Es ist gegen viele grampositive und gramnegative Bakterien; *Staphylokokken* (auch bei Betalaktamase- bildenden Stämmen); *Hämophilus influenzae*, *Proteus spp.*, *A-Streptokokken*, *Pneumokokken*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Gonokokken*, aber auch gegen *Salmonellen*, *Shigellen* und Anaerobier (inklusive *B. fragilis*) wirksam.

Das verwendete **Cycloserin** wirkt gegen entsprechend empfindliche Stämme Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sowie gegen *Mycobacterium tuberculosis* je nach Konzentration bakteriostatisch oder bakterizid. D-Cycloserin inhibiert sowohl die Alanin-Racemase als auch die D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase; beides Enzyme, die für die Synthese der bakteriellen Zellwand essentiell sind. Sein Wirkoptimum liegt bei einem pH-Wert von 6,4 bis 7,4.

Natrium- Taurocholol (Ochsengalle) führt durch die hervorgerufene ph- Verschiebung in das Wirkspektrum der Antibiotika zur Umsatzsteigerung dieser Substanzen und Erhöhung der katalytischen Aktivität.

3.3 Weiterführende Diagnostik mittels unterschiedlicher Färbemethoden

C. difficile verdächtige Kolonien werden zunächst isoliert. Es erfolgt daraufhin die mikroskopische Untersuchung der kultivierten Präparate auf sporenbildende gram- positive Stäbchen. Hierzu werden zwei unterschiedliche, sich ergänzende Färbetechniken angewandt.

Die **Gram- Färbung** stellt eine wichtige Differentialfärbung dar. Grampositive Bakterien erscheinen blau, gramnegative rot. Die grampositive Zellwand verhindert das Auswaschen des Farbstoff- Jod- Komplexes durch Alkohol. *Clostridien* imponieren somit als grampositive, ihrer Morphologie, Größe und Form nach als plumpe Stäbchen. In älteren Kulturen, in denen autolytische Enzyme die Zellwand abzubauen beginnen, können grampositive Zellen oft gramnegativ sein. Hierbei spricht man dann von einer gewissen Gram- Labilität, die sich umso stärker ausprägt, je weiter das Sporulationsstadium fortgeschritten ist.

Hier kommt dann die spezielle Färbung mit **Malachitgrün zum Nachweis von Sporen** zum Tragen. Nach der Malachit/ Safranin - Behandlung erscheinen die Sporen grün und die noch vorhandenen Bakterien in ihrer vegetativen Form rot.

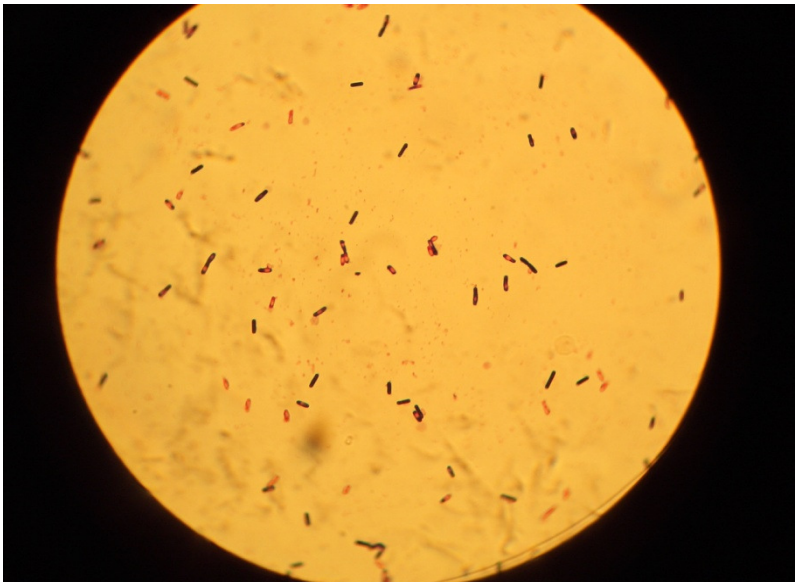


Abbildung 3 Gram- Präparat von *C. difficile* (Vergrößerung bei 10x100); vegetative Formen imponieren hier als dunkel- violette Stäbchen; die tennisschlägerartig aufgeweiteten Endkappen einiger Stäbchen deuten bereits auf die freigesetzten Sporen hin

3.3.1 Färbeprozess der Gram- Färbung

Um die auf dem gläsernen Objektträger aufgebrachten Bakterien zu fixieren, müssen die luftgetrockneten Präparate zunächst hitzefixiert werden. Dazu ist ein drei- bis viermaliges Schwenken durch die offene Flamme eines handelsüblichen Bunsen- Gas Brenners

ausreichend. Als nächstes werden die abgekühlten Präparate komplett mit Kristallviolett überschichtet und anschließend mit ca. 5 Tropfen Natrium- Bikarbonat betropft und durch „Verblasen“ im Kristallviolett verteilt; die Einwirkzeit beträgt 15 Sekunden.

Danach wird das Kristallviolett mit Grams Jod zunächst abgespült, anschließend wird der Objektträger mit Grams Jod für 30 Sekunden bedeckt. Zum Differenzieren wird ein Alkohol- Aceton- Gemisch verwendet; dabei wird das Grams Jod abgegossen und unter laufendem Alkohol- Aceton- Gemisch wird der Objektträger so lange abgespült, bis keine Farbwolken vom Material mehr abgehen. Der Objektträger wird nun vorsichtig mit Leitungswasser gespült, um kein Untersuchungsmaterial abzuwaschen und in einem weiteren Schritt auf der Färbepank mit Fuchsin überschichtet. Die Einwirkzeit beträgt 10 – 15 Sekunden. Danach wird nochmals vorsichtig mit Leitungswasser abgespült und der Objektträger in einem letzten Schritt zwischen Filterpapier getrocknet. Dieser ist nun direkt zum Betrachten unter dem Mikroskop bereit.

3.3.2 Färbedurchführung der Malachitgrün- Färbung zum Direkt- Nachweis von Sporen

Zur speziellen Sporen- Färbung wird der Ausstrich der zu betrachtenden Bakterien auf dem Objektträger ebenfalls nach Lufttrocknung hitzefixiert und anschließend für 5 Minuten über dem siedenden Wasserbad mit Malachitgrün überschichtet und damit gefärbt. Folgend wird der Objektträger kurz mit Wasser abgespült und über einen Zeitraum von 30 Sekunden mit Safranin gegengefärbt, nochmal mit Wasser abgespült und zwischen Filterpapier getrocknet.

3.4 Molekularbiologischer Nachweis von *C. difficile* (Sequenzierung und Toxinnachweis)

3.4.1 Speziesidentifikation mittels partieller 16S- ribosomaler DNA- Sequenzierung

Zur Spezies- Diagnostik der im Rahmen der Umgebungsuntersuchungen isolierten Bakterienkolonien wird die partielle 16S- ribosomale DNA (rDNA)- Sequenzierung der Kulturoisolate angewendet.

Auf Grund der ermittelten Sequenz der 16S- rDNA Gens, welches für die Mehrheit der Bakterien- Spezies spezifisch ist, können viele der bekannten Bakterien auf dem Niveau der

Gattung und Spezies identifiziert werden. Das Verfahren stützt sich auf die partielle Sequenzierung eines speziellen Genlocus mit einer 500 Basenpaaren umfassenden variablen Zone, der gleichsam einem Fingerabdruck, jede Spezies unterscheidbar macht.

Ein hier erhaltenes Gen- Amplifikat wird durch Sequenzanalyse und Vergleich mit der Gen-Datenbank *RIDOM*- Server (Ribosomal Differentiation of Microorganisms) identifiziert (<http://www.ridom.com/> <http://www.ridom-rdna.de/>) [38]. Die Methode dient zur Identifikation der Spezies und macht keine Aussage über einen eventuellen Krankheitswert, noch über Pathogenität und Toxizität [34] [37].

3.4.2 Durchführung der partiellen 16S- ribosomalen DNA (rDNA)- Sequenzierung

Zur DNA-Extraktion wird eine Impföse Bakterienkolonien in 400 µl Tris- EDTA Puffer (Tris- HCl, 10 mmol; EDTA, 1 mmol; pH 7,0) homogenisiert und 30 Minuten bei 80 °C inaktiviert. Zum Aufschluss der Zellwand erfolgt eine Inkubation mit Lysozym bei 37 °C für 1- 12 h und 10 % SDS/Proteinase K- Lösung bei 65 °C für 10 Minuten. Zum Binden von Zellwandresten und überschüssigen Polysacchariden erfolgt eine zehnmünütige Behandlung mit N- acetyl- N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl- Lösung. Nach Zentrifugation mit Chloroform/ Isoamylalkohol, 30 min Inkubation bei -20°C und Zentrifugation 14000 g präzipitiert die freigesetzte DNA in Isopropanol. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wird die DNA getrocknet und in 20 µl TE- Puffer gelöst.

Zur Amplifikation eines Teilabschnitts der ribosomalen 16S- Untereinheit der extrahierten und gereinigten DNA werden die Primer 16S- 27forward (5´- AGA GTT TGA TCM TGG CTG AG- 3´) und 16S- 907reverse (5´- CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT- 3´) verwendet. Für die PCR wird die DNA in TE- Puffer 1:10 verdünnt. Der PCR- Ansatz besteht aus 1 ng DNA, 10 pmol der beiden Primer, 200 µmol Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µmol 10x PCR- Puffer (Tris- HCl, 100 µmol; KCl, 500 mmol; MgCl₂, 15 mmol; pH = 8,3), 250 mM MgCl und 1,25 U *Taq*-Polymerase.

Die PCR-Bedingungen werden wie folgt gewählt: „Hot- Start“ bei 80 °C (10 min), 28 Zyklen (45s 94°C, 60s 53°C, 90s 72°C), 10 min à 72°C. Die Produktaufreinigung erfolgte mittels Exonuclease I (ExoI), Shrimp Alkalische (SAP) Phosphatase. Dazu werden 5 µl des Amplifikationsprodukts mit je 1 µl ExoI und SAP versetzt und die Aufreinigung mit folgendem Cyclerprogramm durchgeführt: 30 min à 37°C, 15 min à 80°C, anschließende Kühlung auf 4°C. Die

Material und Methoden

Sequenzierungs- PCR erfolgt analog zur Amplifikations-PCR mittels je 10pmol der o.g. Primer (PCR: Bedingungen für Sequenzierungs-PCR: 25 Zyklen à 10s 96°C, 5s 53°C, 240s, 60°C).

Anschließend werden die Reaktionsprodukte mittels eines Kunstharzes (*Sephadex G50*) aufgereinigt und getrocknet und in 20 µl Formamid aufgenommen. Die automatisierte Sequenzierung erfolgt mittels eines ABI Prism TM 3100 Avant Genetic Analyzer. Die erhaltenen Sequenzen werden mittels der Software SeqSphere (Ridom GmbH, Würzburg) ausgewertet und mit den Referenzdaten der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen [78].

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungszeitraum und Patientenkollektiv

Während des jeweils 12-monatigen Untersuchungszeitraumes für die Jahre 2007 / 2008 konnten Toxin- bildende *C. difficile* in Stuhlproben von 282 / 254 Patienten identifiziert werden. Dabei gelang bei 179 / 191 Patienten (63% / 75%) neben dem Nachweis von *C. difficile* Toxin auch eine kulturelle Erregeranzucht aus eingesandtem Stuhlprobenmaterial.

4.2 Darstellung der *C. difficile* positiven Patienten

4.2.1 Altersstruktur der *C. difficile* positiven Patienten am UK Münster

Das durchschnittliche Alter der Patienten liegt im Mittel bei 45,46 / 45,44 Jahren, wobei ein Peak für 2007 bei den 71- 75 jährigen Patienten mit einem prozentualen Anteil von 14,18% zu verzeichnen ist, wie in *Diagramm 1* mit absoluten Zahlen und *Diagramm 2* in relativen Anteilen gezeigt wird. Ein vergleichbarer Peak für das Jahr 2008 mit einer Gesamtstärke von 44 Patienten (17,32%) findet sich bei den 66- 70 jährigen. Die Altersgruppen von 6- 10 Jahren bis hin zu der mit den 66-70 Jährigen zeigt eine sukzessiv steigende Zunahme von durchschnittlich 2% im 5 Jahres- Rhythmus in beiden Jahren.

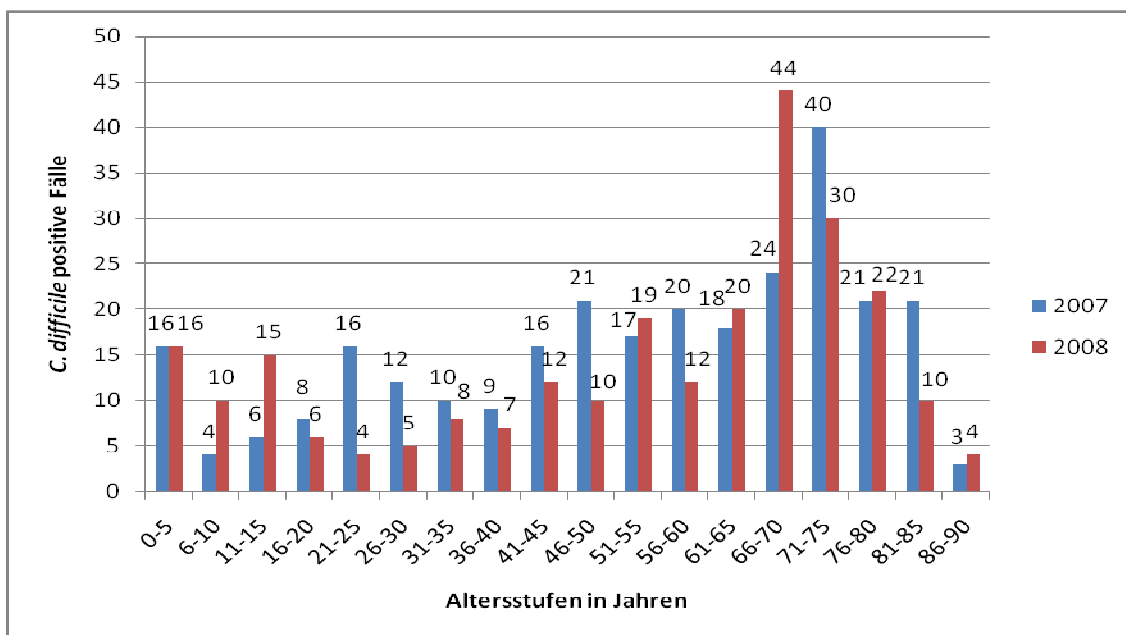


Diagramm 1 Altersstufen mit absolutem Anteil von *C. difficile* positiven Patienten

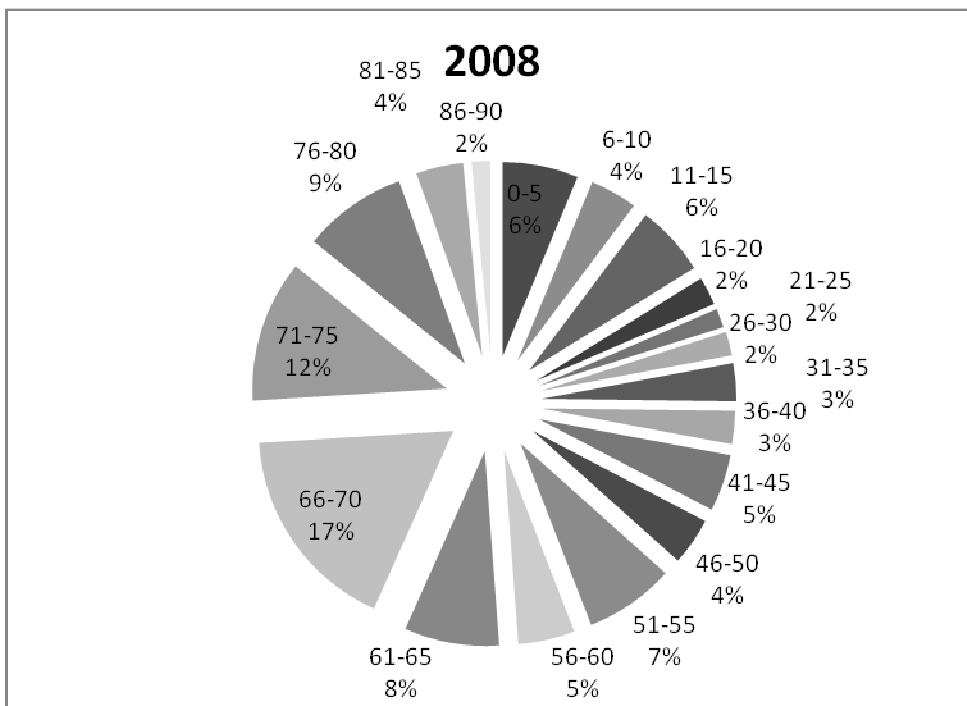
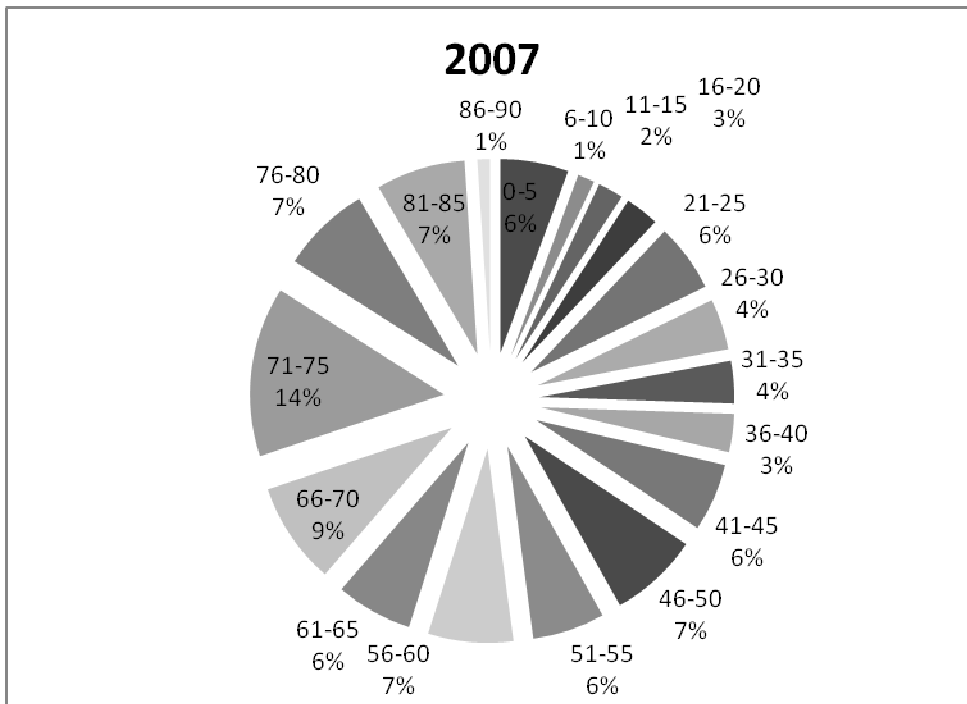


Diagramm 2 prozentuale Anteile der betroffenen Patienten in den verschiedenen Altersgruppen für die Jahre 2007 und 2008

Diagramm 3 zeigt die Gruppe der 0 bis 5 Jährigen im Ein- Jahres- Intervall. Gemessen an der Gesamtzahl aller Patienten ist diese Gruppe mit einem prozentualen Anteil von 5,67% / 6,30% vertreten.

Ergebnisse

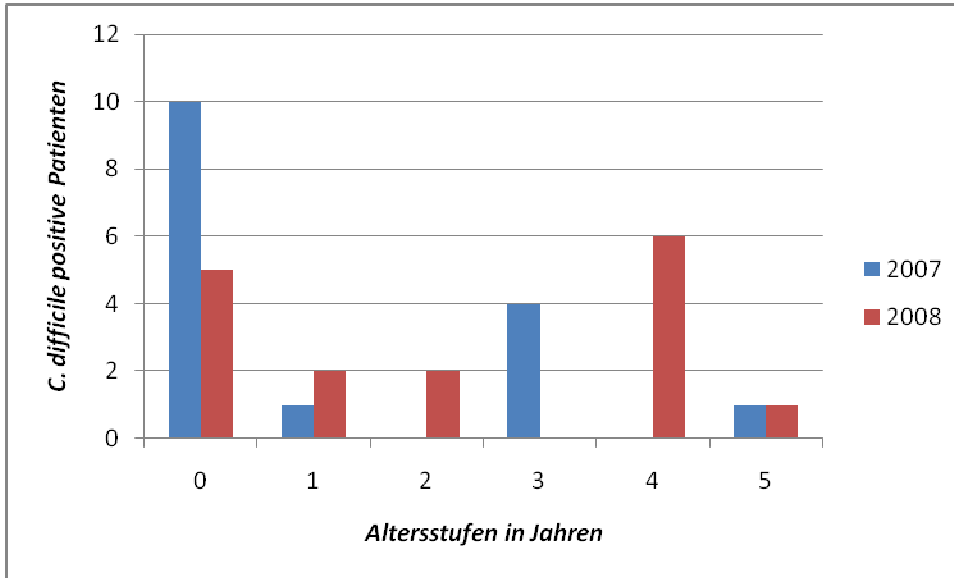
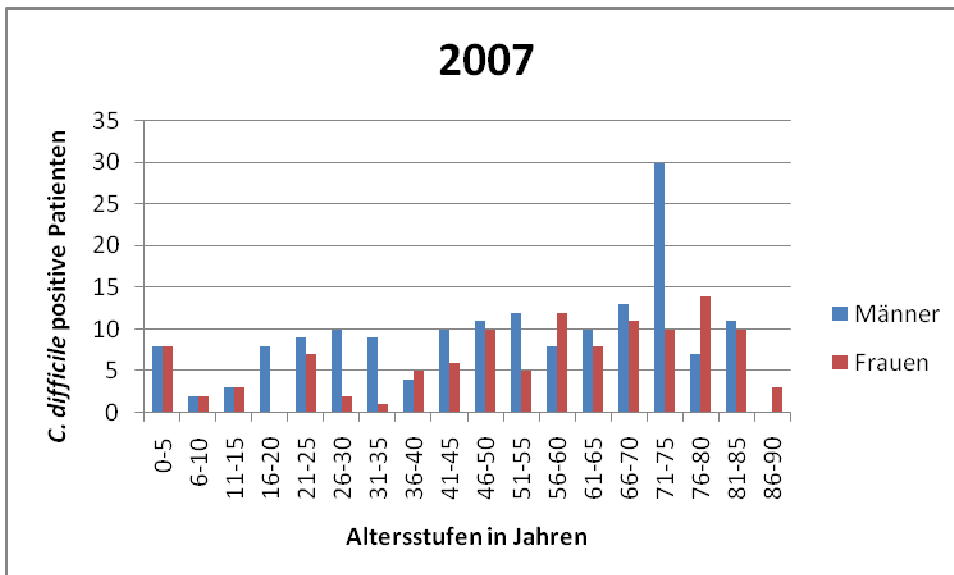


Diagramm 3 Gruppe der 0- 5 Jährigen im Ein- Jahres- Intervall

4.2.2 Geschlechterverteilung

Bei der Geschlechterverteilung liegen die betroffenen männlichen Patienten insgesamt mit 58,51% / 50,79% leicht vor den Frauen mit 41,89% / 49,21% für die Jahre 2007 / 2008 wie dies in *Diagramm 4* dargestellt ist.



Ergebnisse

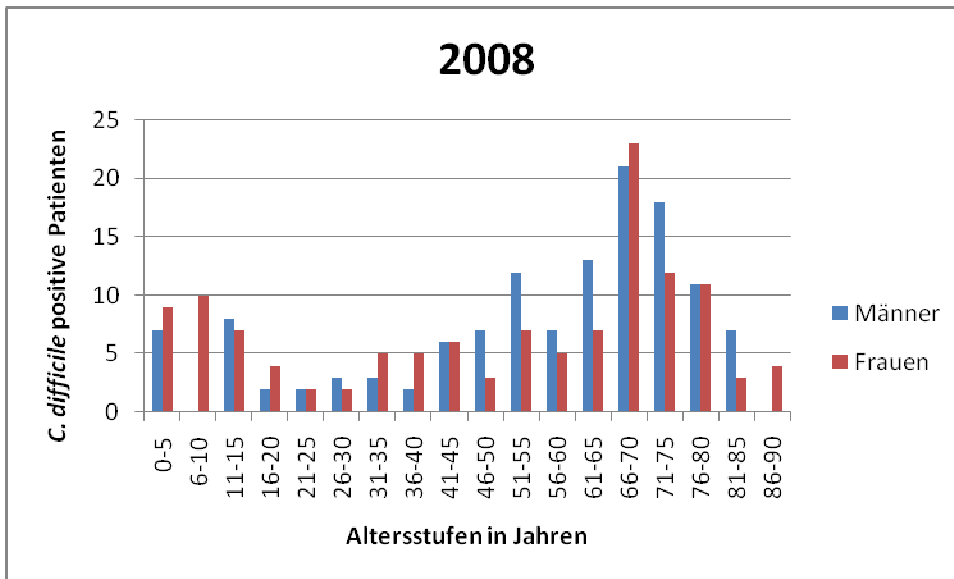
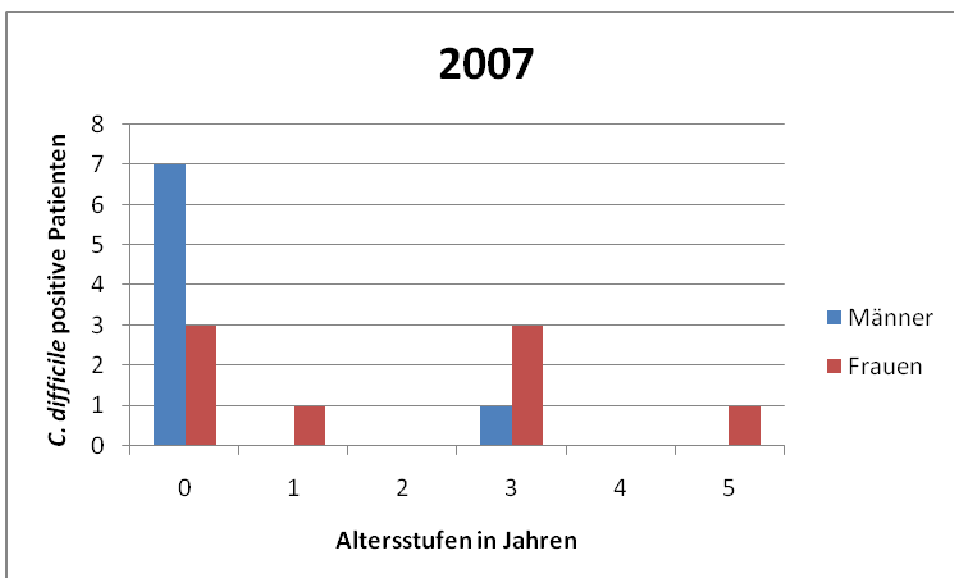


Diagramm 4 Anteil der männlichen/ weiblichen Patienten in verschiedenen Altersgruppen für 2007 und 2008

Die spezielle Gruppe der 0 bis 5 jährigen Patienten stellt sich in *Diagramm 5* dar. In dieser Gruppe beträgt der Anteil der Patienten im ersten Lebensjahr 62,5% (2007) bzw. 31,25% (2008).



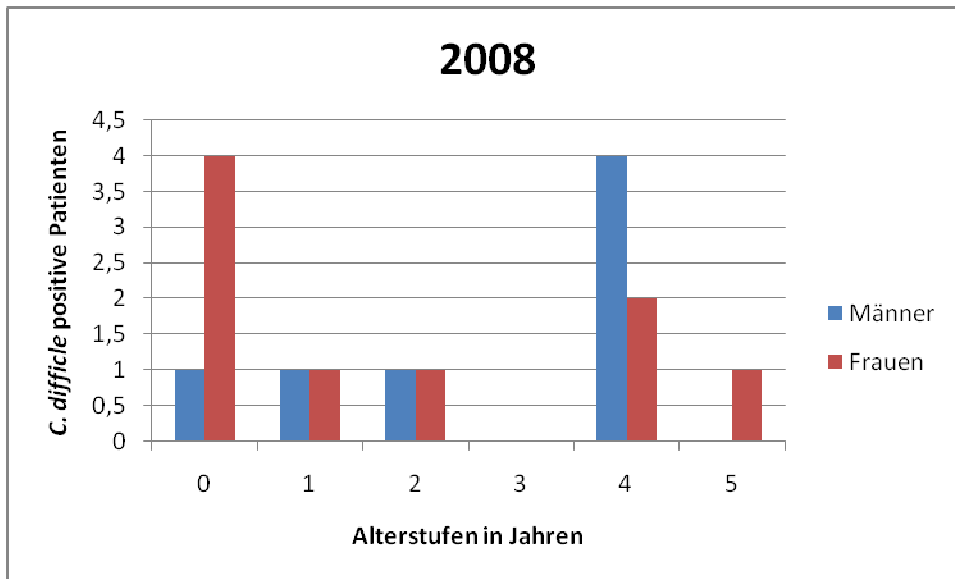


Diagramm 5 Anteil der männlichen/ weiblichen 0- 5 jährigen Patienten für 2007 und 2008

4.2.3 Betroffene Kliniken und Abteilungen mit der Verteilung der *C. difficile* positiven Patienten

Die Verteilung der Patienten mit *C. difficile*- Nachweis zwischen den verschiedenen Fachabteilungen des UKM ist heterogen wie in *Diagramm 6* dargestellt. Die *Intensivmedizin* versorgte mit n=49 / n=42 Patienten 17,38% / 16,54% der Erkrankten. 47,87% / 48,03% der Patienten wurden in Einheiten der *Innere Medizin* während ihres Klinikaufenthaltes betreut. Weitere 11,35% / 9,84% der Patienten wurden im Bereich der *Chirurgie* behandelt. Hierunter werden die Abdominal-, Viszeral-, Gefäß-, Herz- und Thoraxchirurgie sowie die Traumatologie und Unfallchirurgie gefasst. In den *anderen operativen Fächern* wie der Orthopädie, Urologie, Ophthalmologie, HNO- Kunde, Gynäkologie, Kinderchirurgie, Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie, Neurochirurgie und der Dermatologie können insgesamt 17,38% / 11,81% und damit für das Jahr 2007 folglich n=49 bzw. für 2008 n=30 Patienten registriert werden. In der Gruppe der *anderen konservativen Fächer* wie der Neurologie, Psychiatrie, Psychosomatik, Strahlentherapie, Nuklearmedizin, Pädiatrie und auch der Geriatrie waren 6,03% / 13,78% der betroffenen Patienten vertreten.

Ergebnisse

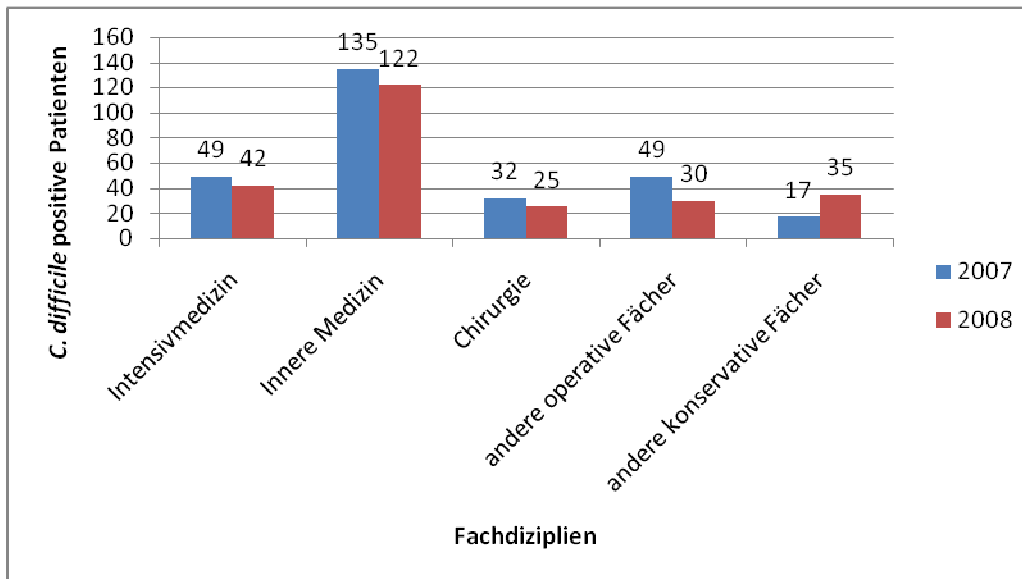


Diagramm 6 Anzahl *C. difficile* positiver Patienten verteilt auf verschiedene Fachabteilungen bzw. Kliniken in des UKM in den Jahren 2007 und 2008

Das *Diagramm 7* zeigt den prozentualen Anteil jeder Fachgruppe an allen *C. difficile* positiven Patienten als gestapelte Säule zu 100% im direkten Jahresvergleich.

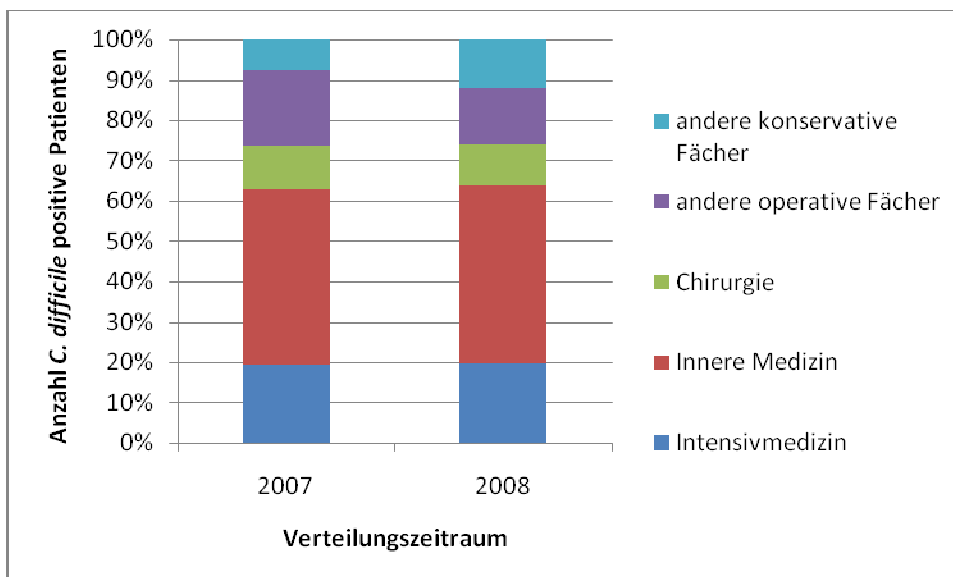


Diagramm 7 Relative Anteile zu 100% der positiv getesteten Patienten in unterschiedlichen Fachabteilungen im Jahresvergleich 2007 und 2008

Ergebnisse

In der Gruppe der *anderen konservativen Fächer* machen die Fälle aus der Klinik für Pädiatrie den Großteil der *C. difficile* positiven Fälle aus und repräsentieren n=15 von insgesamt 17 Fällen (88%) in 2007 und n=29 von insgesamt 35 (83%) in 2008.

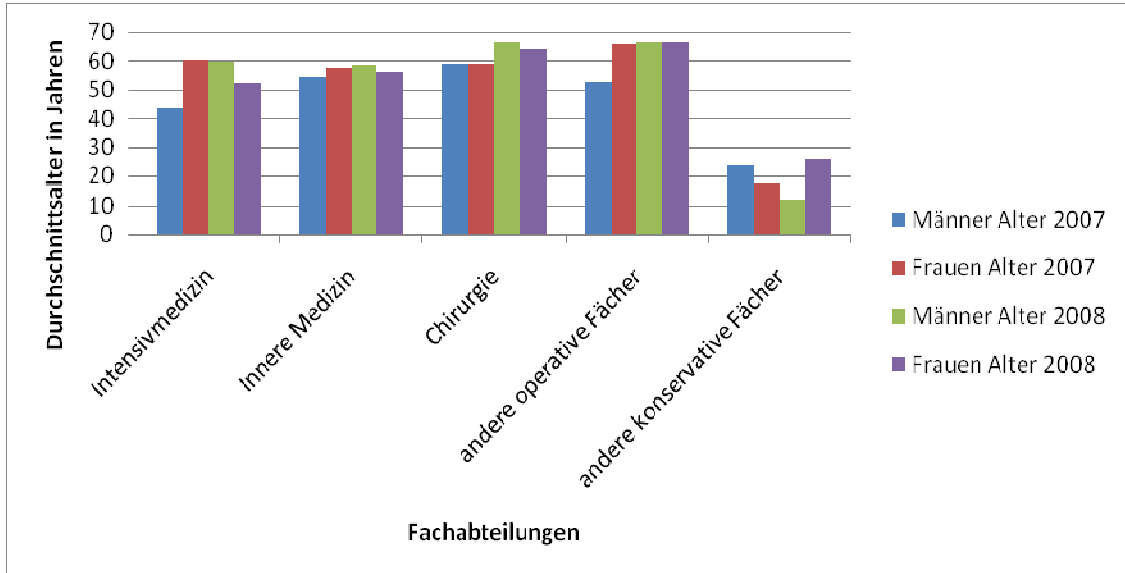


Diagramm 8 zeigt das Durchschnittsalter der *C. difficile* positiven Patienten in Relation zu den Fachabteilungen für die Jahre 2007 und 2008

4.2.4 Aufenthaltsdauer von *C. difficile* positiven Patienten am UKM

Die absolute Aufenthaltsdauer der Patienten mit *C. difficile*- Nachweis am Universitätsklinikum Münster beläuft sich für die Jahre 2007 und 2008 im Median auf jeweils 29 Tage und als Mittelwert für 2007 auf 72 Tage und für 2008 auf 73 Tage, wie dies in *Diagramm 9* in absoluten Zahlen zum Ausdruck kommt.

Ergebnisse

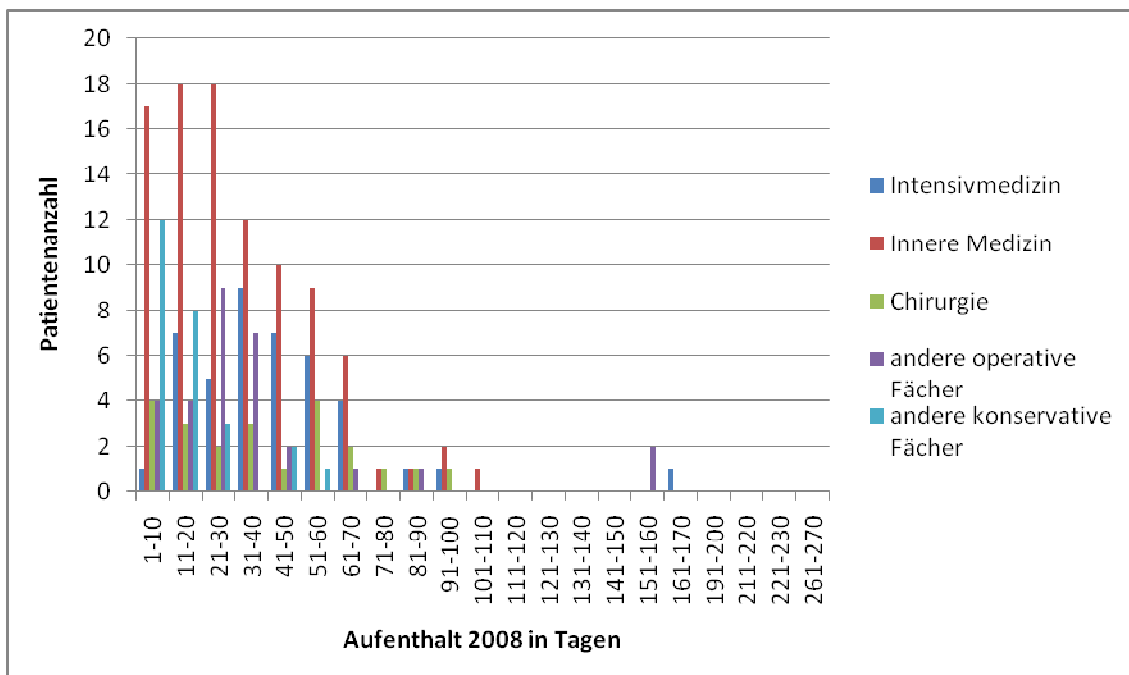
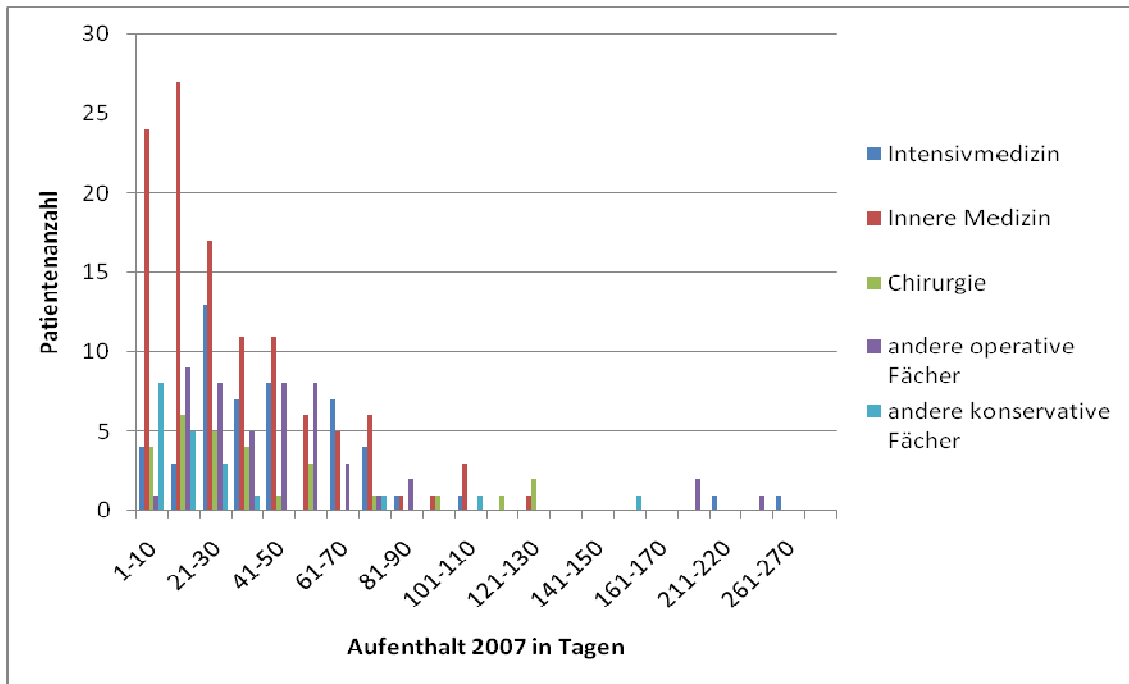


Diagramm 9 Aufenthalt in Tagen in Bezug auf die einzelnen Fachabteilungen und Kliniken des UKM

Betrachtet man die absolute Aufenthaltsdauer in den einzelnen Fachabteilungen, so kann festgestellt werden, dass sich in allen Fachabteilungen die Hauptaufenthaltszeit um die Tage 1-10 bis hin zu 51-60 Tagen akkumuliert. Der Median der Aufenthaltsdauer liegt in der *Intensivabteilung* bei 33,5 / 40 Tagen, in der *Inneren Medizin* bei 22 / 28 Tagen, in den

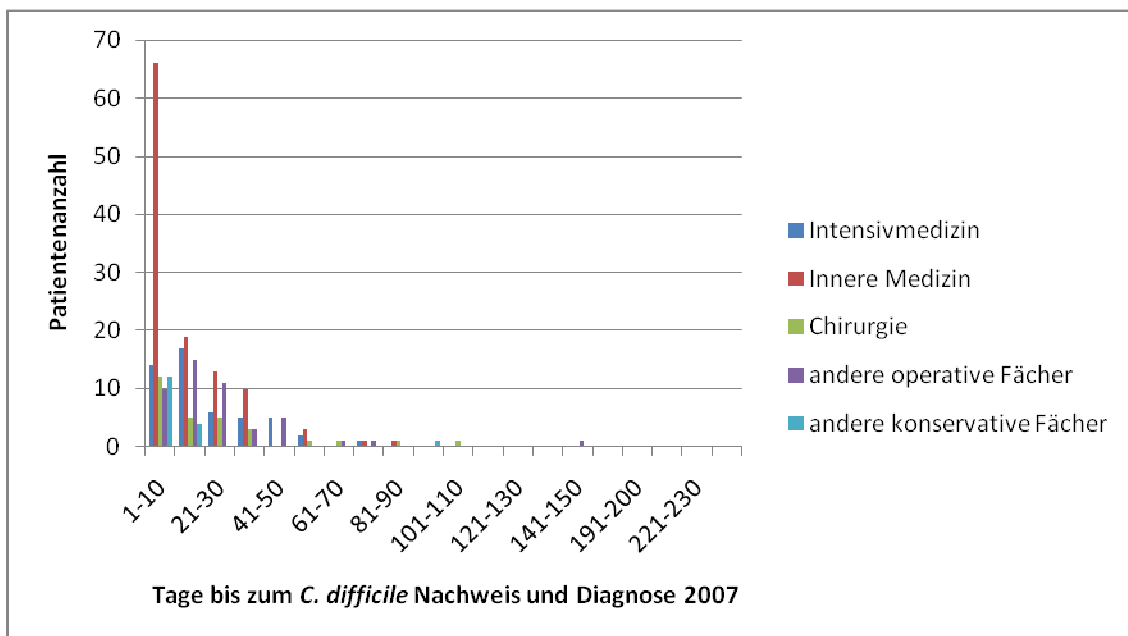
Ergebnisse

operativen Fächern auf 35,5 / 30,5 Tage (Chirurgie 30 / 36,5; andere operative Fächer 41,5 / 28 Tage) und in den anderen konservativen Fachabteilungen auf 13 / 12 Tage.

4.2.5 Aufenthaltsdauer bis zur *C. difficile*- Diagnose

Im Median erfolgt der Nachweis von *C. difficile* aus Stuhlproben nach 13 Tagen stationärer Aufenthaltsdauer (2007) bzw. 12 Tagen (2008).

Die Aufenthaltstage in den einzelnen Fachabteilungen bis zur Diagnose der mit *Clostridium difficile* assoziierten Symptomatik stellen sich wie folgt in *Diagramm 10* für die Jahre 2007 und 2008 dar.



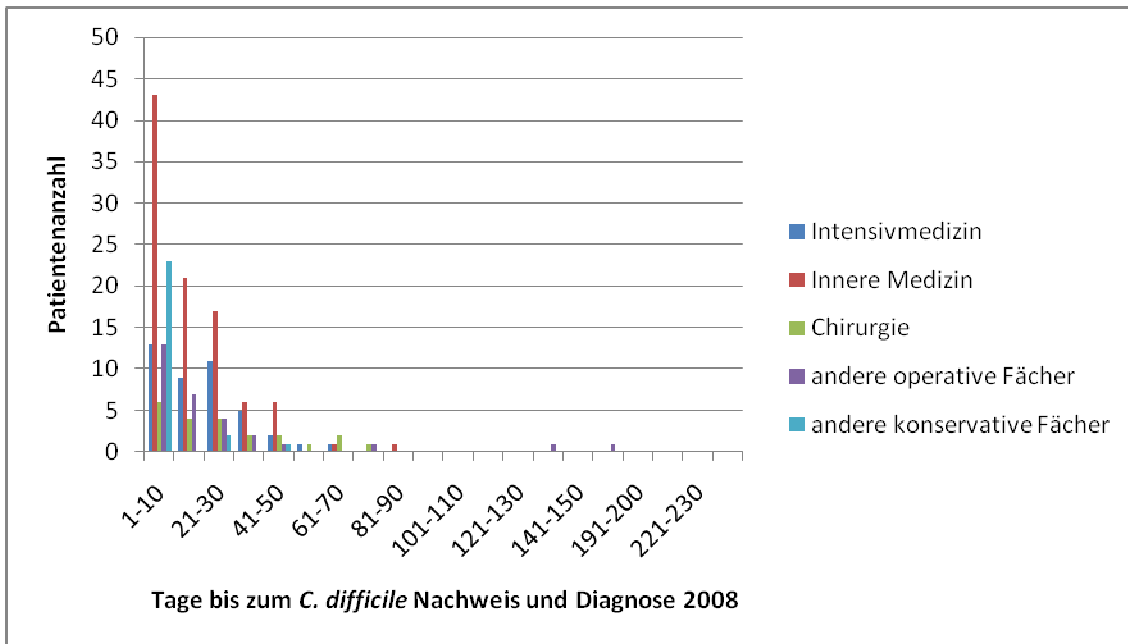


Diagramm 10 Patientenzahl in Relation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Betrachtet man die einzelnen Kliniken und Fachdisziplinen so erfolgt hier der Nachweis von *C. difficile* in der *Intensivmedizin* im Median für 2007 nach 16 Tagen und für 2008 nach 18,5 Tagen. Für die Fachgebiete der *Inneren Medizin* zeigt sich ein positiver Nachweis nach 8 / 12 Tagen. Bei Patienten in *Chirurgische Fachabteilungen* wird der Nachweis nach 17 Tagen in 2007 respektive 23 Tagen in 2008 erbracht. Die *anderen operativen Fächer* sind mit ihrer Diagnosestellung bei 19 bzw. 12,5 Tagen und die *anderen konservativen Fächer* bei 5 und 3 Tagen angesiedelt.

4.2.6 Nosokomiale versus ambulante *C. difficile* Fälle

Die absoluten Zahlen der nach der gegebenen Definition nosokomial (Nachweis aus >48h nach Aufnahme gewonnenem Material) erworbenen Fälle belaufen sich im Jahr 2007 auf n=224 Patienten (79,43%) und in Jahr 2008 auf n=177 Patienten (69,69%).

Ergebnisse

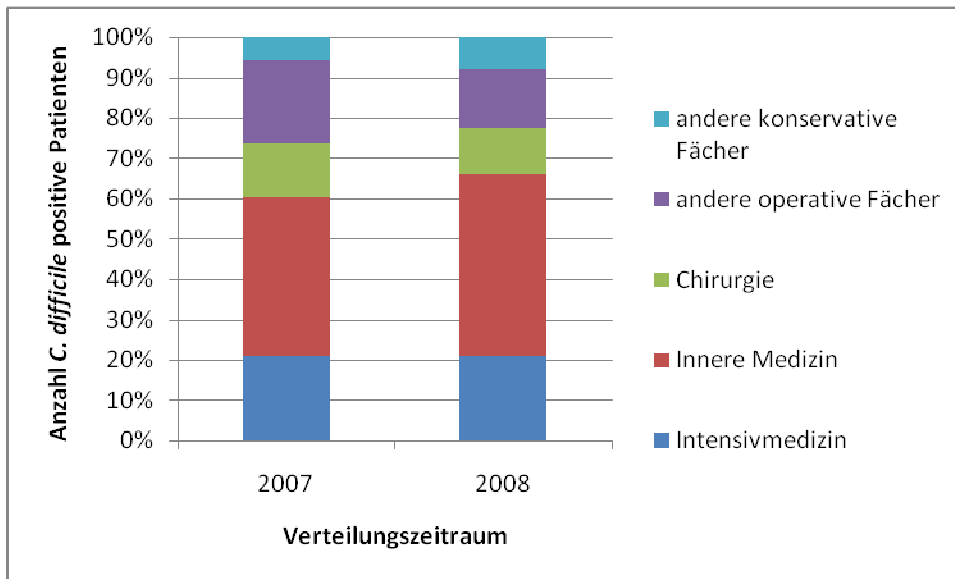


Diagramm 11 Verteilungsmuster der nosokomialen *C. difficile* Fälle bezogen auf die einzelnen Fachdisziplinen (Stapelsäulen jeweils zu 100%)

Bei den nosokomialen Fällen zeigt sich ein durchschnittliches Alter von 49 Jahren in 2007 und 55 Jahren im Jahr 2008.

Die Zahlen aus den Jahren 2007 und 2008 zeigen, dass bei insgesamt $n=58$ / $n=77$ Patienten aller Fachabteilungen der Nachweis von *C. difficile* Toxin innerhalb der ersten 48h nach Krankenhausaufnahme erfolgte. Damit zeigt sich eine prozentuale Beteiligung von 20,57% (2007) und 30,32% (2008) der „mitgebracht“ bzw. ambulant erworbenen *C. difficile* Fälle an allen registrierten Fällen, wie in *Diagramm 12* vergleichend dargestellt ist.

Eine Recherche der Grunderkrankung dieser Patienten mittels des Diagnosencodiersystems ergibt, dass das vorherrschende Krankheitsbild bei 75% der Patienten durch Erkrankungen aus dem Formenkreis der Stammzellerkrankungen und malignen Lymphome charakterisiert ist. Weitere 20% leiden an einer chronisch- ulzerösen, bereits klinisch bekannten Enterokolitis (Morbus Crohn/ Ileitis terminalis) und ca. 4% der Betroffenen sind Organ-Transplantatempfänger.

Ergebnisse

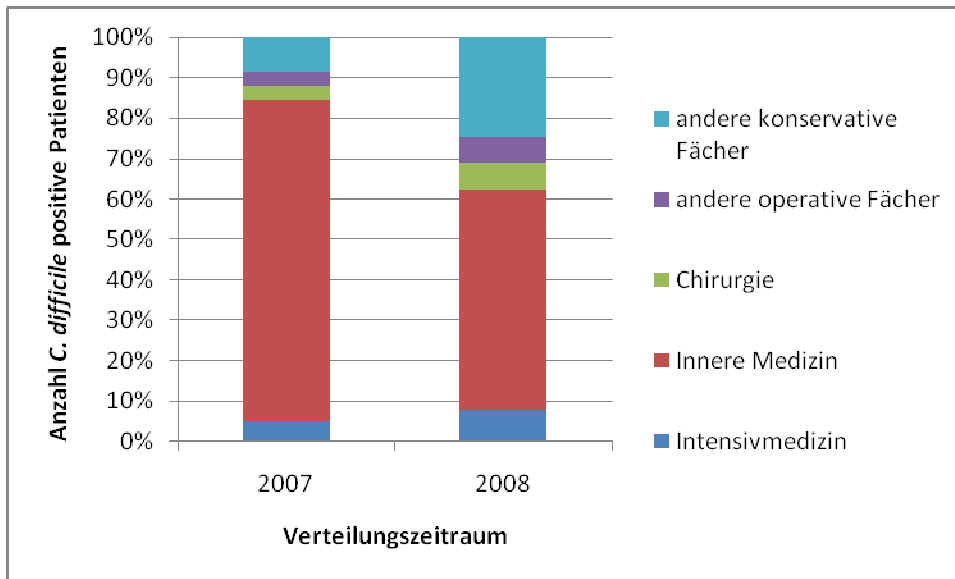


Diagramm 12 Verteilungsmuster der ambulanten *C. difficile* Fälle bezogen auf die einzelnen Fachdisziplinen (Stapelsäulen jeweils zu 100%)

Bei den mitgebrachten/ ambulanten Fällen zeigt sich ein durchschnittliches Alter von 43 Jahren (2007) und 42 Jahren (2008), wobei die Fachgruppe der *anderen konservativen Fächer* mit dem Gebiet der Pädiatrie, welches das Durchschnittsalter von 6 / 8 Jahren aufzeigt.

Der Vergleich der ambulanten/ importierten Fälle mit den nosokomial erworbenen Fällen 2007 und 2008 wird in *Diagramm 13* dargestellt und zeigt die beiden zuvor beschriebenen Situationen in einer gemeinsamen Graphik. Es wird ersichtlich, dass im Jahresverlauf die ambulanten/ importierten Fälle in jeder der beobachteten Disziplinen zunehmen. Der relative Anteil von ambulant zu nosokomial in der *Innere Medizin* bleibt über die Jahre gleich.

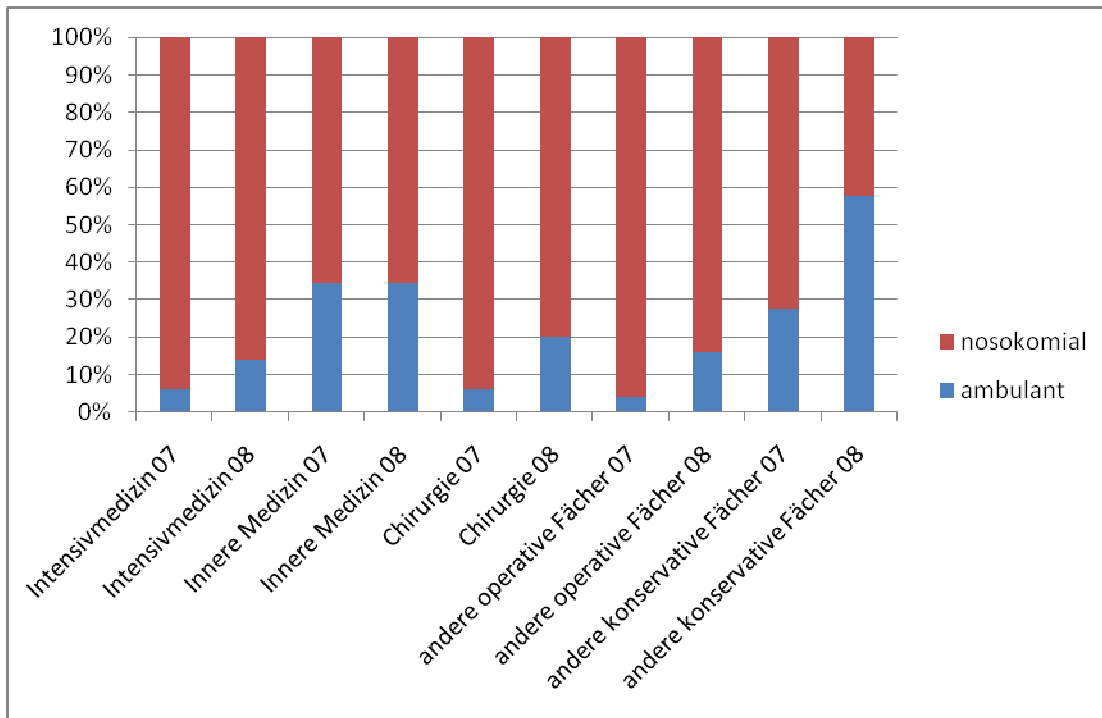


Diagramm 13 Relative Anteile zu 100% der ambulanten und nosokomialen *C. difficile* Fälle in unterschiedlichen Fachabteilungen

4.2.7 Inzidenzraten am UKM für 2007 und 2008

Während dieses Zeitraums kam es im UKM zu insgesamt 49.009 Patientenfällen im Jahr 2007 und zu 49.531 Patientenfällen im Jahr 2008. Die Zahl der Patiententage betrug 424.308 / 413.907. Somit ergibt sich eine Gesamtinzidenzdichte von *C. difficile* von 5,75 Fälle/1.000 Patientenfällen für 2007 und von 5,12/1.000 Patientenfällen für 2008.

Die Inzidenzdichte der nosokomialen *C. difficile* Fälle liegt bei 4,57/1.000 Patientenfälle in 2007 bzw. 3,57/1.000 Patientenfälle in 2008. Die Prävalenz bei Aufnahme kann für 2007 mit einem Wert von 0,71/1.000 Patientenfällen und 2008 mit 0,76/1.000 Patientenfällen registriert werden.

Die intensivmedizinischen Fälle setzen sich zusammen aus 3 chirurgischen Intensivstationen. Die internistischen Intensivpatienten sind unter der Fächergruppe der *Inneren Medizin* zusammengefasst.

Ergebnisse

	gesamt Patientenzahl UKM			
	2007		2008	
	Pat Fälle	Pat Tage	Pat Fälle	Pat Tage
Intensivmedizin	240	4717	188	4402
Innere Medizin	11717	107948	11794	106827
Chirurgie	6896	61372	6965	62405
andere operative Fächer	19127	126822	19538	120743
andere konservative Fächer	11029	123449	11046	119530
Summe	49009	424308	49531	413907
	<i>C. difficile</i> positive Patienten UKM			
	2007		2008	
	Pat Fälle	Pat Tage	Pat Fälle	Pat Tage
Intensivmedizin	50	2450	42	1832
Innere Medizin	113	3546	94	3043
Chirurgie	28	1153	23	886
andere operative Fächer	48	2458	30	1147
andere konservative Fächer	20	562	26	408
Summe	259	10169	215	7316

Tabelle 2 Gesamt- Patientenkollektiv des UKM vs. *C. difficile* positive Patienten (Aufenthaltsdauer und Anzahl) in 2007 und 2008

4.2.8 Vergleich mit nationalen Referenzdaten und statistische Unterschiede

Die Gesamtinzidenzdichte der *C. difficile* Fälle beträgt am UKM für das Jahr 2007 5,75/1.000 Fälle oder 0,66/1.000 Patiententage und für das Jahr 2008 5,12/1.000 Fälle oder 0,61/1.000 Patiententage. Verglichen werden die gefundenen Werte mit den Daten der anderen deutschen Krankenhäusern, die ihre Daten kollektiv über das *Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen des Robert Koch Institutes (NRZ)* zur Verfügung stellen (<http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/cdad.htm>). Tabelle 3 zeigt einen Vergleich der am UKM festgestellten Raten mit den Daten des NRZ. Es besteht kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf nosokomiale und ambulante *C. difficile* Fälle.

Jahr	Kranken- häuser (KH)	Patienten Fälle	Patienten- Tage	<i>C. difficile</i> Fälle	Gesamt Inzidenz Dichte	Inzidenz der nosokomialen Fälle	Prävalenz bei Aufnahme	P
2007	35 KH	652.971	4.591.728	3.033	0,66	0,48	0,13	0,157
	UKM	49.009	424.308	282	0,66	0,52	0,07	
2008	59 KH	1.565.084	8.315.462	5.640	0,68	0,47	0,11	0,157
	UKM	49.531	413.907	254	0,61	0,42	0,08	

Tabelle 3 Darstellung der jeweiligen Jahreszahlen der *C. difficile* positiven Patienten am UKM vergleichend zu den Gesamtzahlen der 35 bzw. 59 Krankenhäusern des CDAD-KISS (*Gesamtinzidenzdichte= Quotient aus der Anzahl der C. difficile positiven Patienten pro 1.000 Patiententage; Inzidenz der nosokomialen Fälle= Quotient der nosokomialen, C. difficile Fälle pro 1.000 Patiententage zur Charakterisierung der nosokomialen Ausbreitung; C. difficile- Positivität/ CDAD – Prävalenz bei Aufnahme= Quotient aus der Zahl der bei Aufnahme C. difficile positiven Patienten pro 100 Patientenfälle zur Charakterisierung des Imports von C. difficile*)

Ergebnisse

Im nationalen Vergleich gibt es 2007 3.033 durch das NRZ registrierte CDAD- Patienten in insgesamt 35 Krankenhäusern bei ca. 4,6 Mio. Patiententagen mit 652.971 Patientenfällen. In den teilnehmenden Kliniken entspricht dies einer Gesamtinzidenz von 4,65/1.000 CDAD- Fällen respektive 0,66/1.000 Patiententage. Für das Jahr 2008 werden 5.640 CDAD- Patienten aus 59 Krankenhäusern bei 8.3 Millionen Patiententagen mit 1.565.084 Patientenfällen gemeldet und in die Statistik mit aufgenommen, d.h. eine Gesamtinzidenz besteht hier mit 3,68/1.000 CDAD pro Patientenfälle bzw. 0,68/1.000 pro Patiententage. In *Tabelle 4* werden ebenfalls die Jahreszahlen von *C. difficile* positiven Patienten genannt. Hier gibt es für 2007 5,75/1.000 Patientenfälle und 0,66/1.000 Patiententage und für 2008 5,13/1.000 Patientenfälle und 0,61/1.000 Patiententage.

Ort	Deutschlandweit (CDAD – KISS)				UKM Münster			
	2007		2008		2007		2008	
Insgesamt	3.033	100,00%	5640	100,00%	282	100,00%	254	100,00%
Tagesklinik/ ambulant	820	27,04%	1738	30,82%	58	20,57%	77	30,32%
nosokomial	2.213	72,96%	3904	69,18%	224	79,43%	177	69,69%

Tabelle 4 Jahresliste mit Zahlen der deutschlandweiten Surveillance durch das NRZ im Vergleich zu den absoluten Zahlen der an *C. difficile* positiven Patienten am UKM in Münster

4.3 Detektion von *C. difficile* auf Oberflächen

Zur Evaluation der Verbreitung von *C. difficile* auf patientennahen und patientenfernen Oberflächen werden n=60 hospitalisierte, symptomatische Patienten mit *C. difficile*- Nachweis und n=60 hospitalisierte, nicht- symptomatische, *C. difficile*- negative Patienten untersucht. Somit stehen 480 Proben (4 Proben pro Patient) zur Auswertung bereit. Diese Proben werden jeweils zeitlich vor der flächendesinfizierenden, täglichen Routine- Reinigungen gewonnen.

Ergebnisse

Von diesen 480 Proben werden mittels der 16S- rDNA Sequenzierung [38] nach erfolgter Anzucht der Bakterien in Reinkultur auf Agar- Platten insgesamt n=2 positiv auf *C. difficile* (in Position 2 und 3 der definierten Oberfläche) getestet; n=4 *C. perfringens* (in Position 2 und 3) nachgewiesen und n=1 kann *C. barati* (in Position 3) nachgewiesen werden. *Clostridien* werden nur in Zimmern der symptomatischen *C. difficile* positiven Patienten nachgewiesen.

16- S- rDNA- Sequenzierung: der aus CCFB Bouillon bebrüteten Kulturen

- 3x *C. perfringens* in Position 3 (Waagerechte Flächen patientenfern)
- 1x *C. perfringens* in Position 2 (Bad- Armatur + WC- Spülung + Spülbecken)
- 1x *C. barati* in Position 3 (Waagerechte Flächen patientenfern)
- 1x *C. difficile* in Position 2 (Bad- Armatur + WC- Spülung + Spülbecken)
- 1x *C. difficile* in Position 3 (Waagerechte Flächen patientenfern)

Die Fotos der *Abbildung 4* und *5* zeigen die typische Wachstumsform der *C. difficile* Kolonien auf den verwendeten Agar- Anzucht- Platten nach 48h Bebrütung bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen im Anaerobier- Topf.

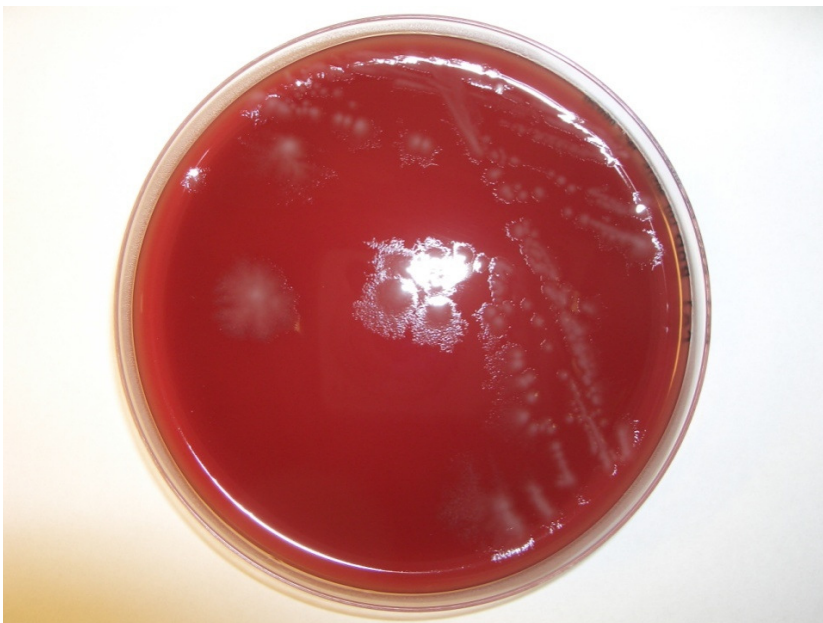


Abbildung 4 Blutagar- Platte mit *C. difficile* Kolonien nach 48h Bebrütung bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen

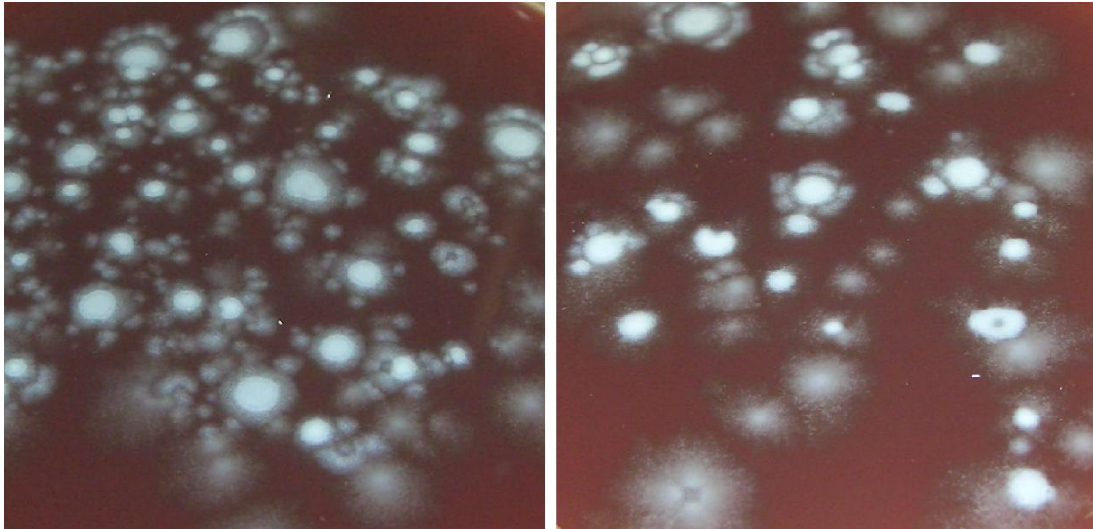


Abbildung 5 Schaedler- Blutagar- Platte mit *C. difficile* Kolonien nach 48h Bebrütung bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen

4.4 Untersuchung der Koloskope auf Bakterienwachstum, die auf eine Besiedlung mit *C. difficile* oder dessen Sporen schließen lassen

In den durchgeführten Untersuchungen gibt es in allen Fällen keinen Keimnachweis, weder aerob noch anaerob, die mittels der krankenhaushygienischen Maßnahmen des Routinelabors und durch die in dieser Arbeit verwendeten Spezialmedien und Anzuchtmethoden nachgewiesen werden können.

5 Diskussion

Im Vergleich zu den Daten des *Nationalen Referenzzentrums für nosokomiale Infektionen des Robert Koch Institutes Berlin* für durch *Clostridium difficile* bedingten Diarrhoen (CDAD), ergeben sich in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Inzidenz von CDAD am UKM; auch sind die gefundenen Inzidenzzahlen der verschiedenen Fachdisziplinen, die am UKM festgestellt werden können, in ihrer Verteilung repräsentativ für die an der *C. difficile* KISS Studie teilnehmenden deutschen Krankenhäuser.

Bei Betrachtung der Inzidenzraten im Jahresverlauf 2007 bis 2008 zeigt sich die Anzahl der *C. difficile* Patienten am UKM mäßig rückläufig (Inzidenzdichte pro 1.000 Patiententage 0,66 in 2007 und 0,61 in 2008) wobei im Vergleich die nationalen Referenzdaten eine, wenn auch minimale, Zunahme zeigen (Inzidenzdichte pro 1.000 Patiententage 0,66 in 2007 und 0,68 in 2008).

In den verschiedenen Fachbereichen des UKM zeigen sich für die Jahre 2007 und 2008 unterschiedliche *C. difficile* Inzidenzen pro 1.000 Patiententage. Die Inzidenzdichte ist am höchsten in der Intensivmedizin (10,39 bzw. 9,54 pro 1.000 Patiententage), gefolgt vom Bereich der *Inneren Medizin* (1,25 bzw. 1,14 pro 1.000 Patiententage) und der *Chirurgie* inklusive Abdominal-, Viszeral-, Gefäß-, Herz- und Thoraxchirurgie, Traumatologie und Unfallchirurgie (0,52 bzw. 0,41 pro 1.000 Patiententage). In den *anderen operativen Fächern* (Orthopädie, Urologie, Ophthalmologie, HNO- Kunde, Gynäkologie, Kinderchirurgie, Mund-Kiefer- Gesichtschirurgie, Neurochirurgie und der Dermatologie) liegt die Inzidenzdichte bei 0,39 bzw. 0,25 pro 1.000 Patiententage und in den *anderen konservativen Fächern* (Neurologie, Psychiatrie, Psychosomatik, Strahlentherapie, Nuklearmedizin, Pädiatrie und Geriatrie) ergeben sich *C. difficile* Inzidenzen von 0,14 bzw. 0,29 pro 1.000 Patiententage.

Eine mögliche Ursache für die deutliche Variabilität der Inzidenzraten in den verschiedenen Fachabteilungen könnte in einem unterschiedlichen Einsatz von Antibiotika liegen, was das Risiko für CDAD erhöht. Verschiedene Arbeiten zeigen hierbei, dass der Gesamtantibiotikaeinsatz auf Intensivstationen (gemessen in definierten Tagesdosen; Daily Defined Dosis, DDD) im Vergleich zu Stationen der Inneren Medizin und der Chirurgie deutlich größer ist.

Diskussion

So liegt der Antibiotikaverbrauch bei einer in Deutschland durchgeführten Studie in intensivmedizinischen Einrichtungen für chirurgische ICU's (Intensive Care Units) bei 146 DDD/100 Patiententagen bzw. Pflgetagen (Pd) und internistischen ICU's bei 187 DDD/100 Pd [101]. Auf Stationen der allgemeinen Patientenversorgung wird in den hämato- onkologischen Disziplinen ein Antibiotikaverbrauch von 110.8 DDD/100 Pd und in den chirurgischen Fächern von 51.6 DDD/100 Pd aufgezeigt. Die Innere Medizin hat hierbei einen Verbrauch von 66 DDD/100 [101].

Dies bestätigt Untersuchungen von *Kern et al.* [48], die ähnliche Antibiotikaverbrauchszahlen messen. Zwischen 2001 und 2002 betrug die Dichte der Antibiotikagaben in der Inneren Medizin 49.9 DDD/100 Pd, in der Chirurgie 43.4 DDD/100 Pd. Die gefundenen Werte für die Intensivmedizin sind etwas geringer als in der oben genannten Arbeit von *De With et al.*, zeigen aber eine ähnliche Tendenz mit 105.6 DDD/100 Pd für internistisch geführte ICU's, 116.9 DDD/100 Pd für chirurgische ICU's und 112.7 DDD/100 Pd für interdisziplinäre ICU's.

Interventionsstudien deuten darauf hin, dass durch rationalen Antibiotikaeinsatz die CDAD-Inzidenz sinkt. So weisen *Thomas et al.* nach, dass Cephalosporine der dritten Generation, hier vor allem Ceftriaxon, mit dem Anstieg von CDAD eng korreliert ist; auch wird ein signifikanter Anstieg von MRSA, VRE und beta- Laktamase produzierenden gram- negativen Erregern beobachtet. Bei Reduktion bzw. Antibiotika- Regime Wechsel konnte im Untersuchungszeitraum ein Rückgang der CDAD verzeichnet werden [86].

Die Diskussion um ansteigende Fallzahlen von CDAD wird weltweit geführt. Verglichen mit anderen Ländern stellen sich große Unterschiede dar.

Für Europa werden bei *Barbut et al.* [6] Inzidenzzahlen bis zu 0,71 / 1.000 Patiententagen angeführt, was im Bereich der Zahlen des Nationalen deutschen Referenzzentrums und der am UKM gefundenen Ergebnisse liegt. In US- amerikanischen Krankenhäusern sind die Inzidenzraten allerdings wesentlich höher. Vom US-amerikanischen National Nosocomial Infections Surveillance System [5] werden für die Jahre 1987 bis 1998 durchschnittlich CDAD Inzidenzen von 1,22 pro 1.000 Patiententage dokumentiert. Genauer betrachtet kann hier sogar ein Unterschied zwischen Lehrkrankenhäusern mit 1,30 / 1.000 und normalen Regel- bzw. Grundversorgern mit 1,17 / 1.000 Patiententagen aufgezeigt werden [84]. Aktuelle Zahlen zeigen eine Inzidenz zwischen 0,4 bis >2,5 / 1.000 Patiententage [81].

Zudem sind zwischen 1991 und 2003 auf dem nordamerikanischen Kontinent die registrierten Patientenfälle mit CDAD um ca. 340 % angestiegen (1991: 35.6 / 100.000 Einwohner → 2003: 156.3 / 100.000 Einwohner). Daneben kommt es dort seit 2002 zu einem deutlichen Anstieg der Nachweise des hypervirulenten *C. difficile* Ribotyps 027 [67] [92]. Insbesondere wird dieser Ribotyp vermehrt in Nord- Amerika bei ambulanten Patienten nachgewiesen, die nicht zwingend die klassischen Risikofaktoren für eine CDAD (vorangehende Antibiotikatherapie) aufweisen [51] [40] [59] [92].

Im Rahmen dieser Arbeit wird keine Ribotypisierung der Isolate in der Routinediagnostik der Mikrobiologie durchgeführt, so dass zur Häufigkeit des Ribotyps 027 in den Jahren 2007 und 2008 am Universitätsklinikum Münster keine Aussage getroffen werden kann.

Allerdings können Angaben dazu gemacht werden, bei wie vielen Patienten *C. difficile* aus Materialien nachgewiesen wurde, die weniger als 48h nach Krankenhausaufnahme gewonnen wurden und somit für einen ambulanten Erwerb der Infektion sprechen. Insgesamt beträgt die durchschnittliche Zeit zwischen Krankenhausaufnahme und Nachweis von *C. difficile* am UKM 10 Tage in den *internistischen Kliniken*, 17,25 Tage bei *intensivmedizinisch* betreuten Patienten, 20 Tage in der *Chirurgie*, 15,75 Tage in den *anderen operativen Fächern* und 4 Tage in den *andere konservativen Fächern*, was ebenfalls den Zahlen der CDAD- KISS Datenerhebung entspricht.

Im Median erfolgte der Nachweis von *C. difficile* am UKM aus Materialien, die nach einer Krankenhausaufenthaltsdauer von 13 (2007) bzw. 12 (2008) Tagen gewonnen wurden. Vergleichbare Beobachtungen machen *Chang et al.*, die in einer retrospektiven Studie in einem US-amerikanischen Krankenhaus eine mediane Dauer von 12 Tagen bis zum Nachweis von *C. difficile* aufzeigen [25].

Am UKM wurden *C. difficile* in den zwei betrachteten Jahren in n=135 Fällen weniger als 48h nach Krankenhausaufnahme nachgewiesen. Diese „importierten“ Fälle sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

Der Anteil der innerhalb der ersten 48h nach Krankenhausaufnahme gefundenen Fälle ist besonders hoch in der Inneren Medizin. Es zeigt sich, dass in beiden Jahren der Datenhebung (2007 und 2008) die *Innere Medizin* inklusive ihrer Unterabteilungen 91,30% / 69,23% aller ambulant- tagesklinisch *C. difficile* positiv getesteten Patienten am UKM versorgt. Weitere 4,35% bzw. 17,95% der Patienten mit ambulantem Nachweis von *C. difficile* wurden in Kliniken

der Kategorie „andere konservativen Fächer“ versorgt wobei der Großteil Patienten der Pädiatrie zufällt.

Bei der Analyse der Grunderkrankungen der Patienten mit „importiertem“ *C. difficile* Nachweis fällt auf, dass 75% dieser Patienten gemäß der kodierten Hauptdiagnosen Grunderkrankungen aus dem Bereich der Stammzellerkrankungen und malignen Lymphome haben.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass in den onkologischen Kliniken bei Patienten mit Erkrankungen des blutbildenden Systems ein Screening von Stuhlproben auf *C. difficile* vor Beginn einer myelosuppressiven Therapie empfohlen wird [83]. So kann bei Symptomentwicklung unter Immunsuppression in der leukopenisch- aplastischen Behandlungsphase eine schnelle ätiopathogenetische Zuordnung getroffen und eine adäquate Therapie schneller eingeleitet werden. Deshalb erscheint es wahrscheinlich, dass bei einem Großteil der ambulanten Patienten mit *C. difficile* Nachweis keine *C. difficile* assoziierte Infektion vorliegt und die Diagnostik unter einer prophylaktischen Indikationsstellung durchgeführt wird [41].

Allerdings erfolgen am UKM 20% der importierten Nachweise von *C. difficile* bei Patienten, die an einer chronisch- ulzerösen, bereits klinisch bekannten Enterokolitis (Morbus Crohn (Ileitis terminalis)) leiden und in ca. 4% der importierten Fälle sind die Patienten Organ-Transplantatempfänger. In diesen Patientengruppen bleibt unklar, ob eine symptomatische CDAD bestand. Ein prästationäres Screening von asymptomatischen Patienten wird nicht empfohlen.

Allerdings zeigen Ergebnisse von Issa et al. [43], dass die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen bei Patienten mit chronischen Darmerkrankungen als Grundleiden in einem Jahr von 1,8% auf 4,6% angestiegen ist. Desweiteren ist bekannt, dass Patienten mit chronischen Darmerkrankungen häufiger *C. difficile* Träger sind (91%), jedoch nicht häufiger an einer behandlungsbedürftigen CDAD leiden. Von diesen 91% sind wiederum 76% ambulant vorstellig [43].

Bei Clayton et al. [28] wird beschrieben, dass sich diese Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu den getesteten gesunden Probanden signifikant mit einem P-Wert von 0.02 unterscheiden was die Unabhängigkeit beider Testgruppen aufzeigt.

Zusammenfassend bleibt unklar zu welchem Anteil die „importiert“ nachgewiesenen *C. difficile* bei Patienten des UKM auch ambulant erworbene, klinisch manifeste CDAD repräsentieren, wobei es deutliche Hinweise dafür gibt, dass ein Teil der Fälle durch das prophylaktische Screening von symptomfreien hämato- onkologischen Patienten zustande kommt.

Allerdings ist erwähnenswert, dass *Borgmann et al.* in einer Untersuchung aus Süddeutschland nachweisen, dass bei 17,3% eine *C. difficile* Infektion mit Toxin- Nachweis (Tcd- positive Patienten) bei „outpatients“ auftritt, was zu den am UKM beobachteten Zahlen (20,57% in 2007 bzw. 30,32% in 2008) und den Daten des CDAD-KISS (27,04% in 2007 und 30,82% in 2008) passt [20]. Hierbei wird der multiresistente *C. difficile* Ribotyp 001 nachgewiesen.

Bezüglich der aktuellen Ausbreitung des Ribotyps 027 in Deutschland und Europa zeigen *Kuijper et al.*, dass sich der PCR Ribotyp 027 bereits in 16 europäischen Ländern nachweisen ließ und die Infektionen dabei durch einen rapid- schweren Krankheitsverlauf nach Ansteckung und eine hohe Komplikationsrate charakterisiert seien, und besonders bei vorhandenen Grunderkrankungen schnell zu lebensbedrohlichen Zuständen führen könnten [50].

In Deutschland werden die Isolate des Ribotyps 027 bislang nur sporadisch nachgewiesen, gelangen aber immer mehr in den Focus des öffentlichen, gesundheitspolitischen Interesses, da sie gehäuft zu direkter, hoher Letalität führen. Diese Beobachtung wird auch von *Dubberke* und *Song et al.* gemacht, da aufgrund der schwerwiegenden Entzündung infolge der Toxin-vermittelten Inflammation der Darmschleimhaut durch *Clostridium difficile* respektive dessen Toxin eine durchschnittlich um bis zu vier Tage [82] [31], je nach Schwere und Akut-Geschehen, verlängerte Hospitalisation und damit eines kostenpflichtigen Aufenthaltes im Krankenhaus unter speziellen Maßnahmen wie der Isolierung und der speziellen medikamentösen Therapie des Patienten von Nöten ist [89] [54].

Hinweise für den Ribotyp 027 gibt es vor allem im süd- westlichen Teil Deutschlands, wo der Ribotyp 027 nach klinischer Manifestation nachgewiesen werden kann [50]. Dieser erste Ausbruch von *C. difficile* des Ribotyp 027 wird im September 2007 in Trier gemeldet, nachdem Patientenmaterial von 4 Patientenfällen genauer charakterisiert worden war. Bei drei Patienten muss durch die von *C. difficile* hervorgerufene Kolitis bedingt eine Kolektomie

durchgeführt werden, wobei insgesamt zwei der vier Patienten an den Folgen der CDAD und den damit bedingten Komplikationen versterben [49].

So werden bei *Kleinauf et al.* in der Zeit ab Januar 2007 insgesamt 8 bestätigte und 28 verdächtige Erkrankungsfälle mit Assoziation von *C. difficile* PCR Ribotyp 027 (16 Männer / 20 Frauen; Durchschnittsalter: 74 Jahre) diagnostiziert [49]. 6 Patienten sterben direkt oder indirekt an den Folgen der durch die *Clostridien* verursachten Komplikationen mit Kolitis und allgemeiner Schwäche. Ein zusätzlicher Patientenfall stellt sich als asymptomatischer Träger des *C. difficile* PCR Ribotyp 027 heraus. Diese Ergebnisse von *Kleinauf et al.* zeigen, dass *C. difficile* PCR Ribotyp 027 möglicherweise schon endemisch in Deutschland ist, zumindest aber in der südwestlichen Region Deutschland im Großraum Trier, wie auch die Ergebnisse von *Zaiß et al.* aufzeigen [99].

Betrachtet man die Altersstruktur der Patienten mit *C. difficile* Nachweis am UKM liegt das durchschnittliche Alter der Patienten mit *C. difficile* Nachweis bei 45 Jahren. Obwohl mittels der hier generierten Daten keine altersspezifischen Inzidenzraten berechnet werden können, zeigt sich, dass 42% der nosokomialen Fälle bei Patienten über 60 Jahren aufgetreten sind.

Bezüglich der Altersinzidenzen für CDAD zeigt sich in der Literatur eine zunehmende Erkrankungshäufigkeit mit fortschreitendem Alter [67]. Grund hierfür könnte ein mit der Involution des Thymus im alternden Menschen einhergehendes Ungleichgewicht durch Abschwächung der nativen und gedächtnisbildenden T- Zellen sein [69]. Auch sind die Fähigkeiten zur Phagozytose und Chemotaxis der dendritischen Zellen und Neutrophilen im Alter verringert [2] [1]. Auch ist die Schwere der CDAD Symptomatik im Alter erhöht, da hier die Dehydratation als Folge von massiven Diarrhoen zu einem gravierenden Wasserverlust führt [76] [16].

In Schweden beispielsweise liegen die Gesamt- Inzidenzzahlen bei 58 /100.000 Patienten. Unter diesen haben die 60- 79 jährigen einen Wert von 121 / 100.000 und die 80- 89 Jährigen eine altersspezifische Inzidenz von 315 pro 100.000. Dies führt zu einer starken Kumulation von CDAD- Fällen in geriatrischen und Rehabilitations- Zentren sowie auf Infektionsstationen und anderen Subdisziplinen der *Inneren Medizin* [46].

Interessanterweise sind allerdings sowohl 2007 als auch 2008 6% der Patienten mit *C. difficile* Nachweis am UKM jünger als 5 Jahre. Innerhalb dieser Gruppe von Kindern ist, wie in

Diagramm 3 dargestellt in 62,5% (2007) bzw. 31,25% (2008) der Fälle *C. difficile* bei Kindern innerhalb des ersten Lebensjahres nachgewiesen.

Hierzu beschreibt *Benson et al.* einen Anstieg von 46% in 2001 auf 64% in 2006 im Großraum Chicago/ USA für den speziellen Bereich der Frühgeborenen- Intensivstation. Besonderes Augenmerk wird hier auf die Neonaten und Kinder zwischen 15 Tagen und 6 Monaten gelenkt [17] [70].

Mögliche Ursache für eine so frühe Infektion mit *C. difficile* könnte ein unmittelbarer post- oder peripartaler Kontakt mit *C. difficile* sein; hierfür kommen als Quellen eine Infektion *sub partu*, aber auch die *orale* Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel [44] [94] oder der Kontakt mit kontaminierten Flächen sowie Therapie- und Diagnostikinstrumenten infrage.

Die Quelle der Infektion ist entweder die Mutter oder die Exposition zu kontaminierten Krankenhausoberflächen wie *Wilcox et al.* beschreiben [97]. Auch ist der Kontakt mit anderen Kindern unter 2 Jahren signifikant mit CDAD assoziiert, wobei einer Behandlung bzw. der Exposition mit zwei oder mehr Antibiotika die größte Bedeutung beigemessen wird.

Bei der genauen Untersuchung der betroffenen Patienten fällt auf, dass > 95% der Kinder an angeborenen, gastrointestinalen Pathologien wie z.B. der nekrotisierenden Enterokolitis, Atresien, gastorintestinalem Prolaps und dem *M. Hirschsprung* leiden [17].

Die Untersuchungsergebnisse von *Pituch et al.* [70] machen neben den üblichen, schwächenden Faktoren wie Störung der normalen Mikroflora (Antibiotika- assoziierte und nicht- Antibiotika- assoziierte), Alter, Immunstatus, Ernährungszustand, körperlicher Entwicklungszustand, aktuelle Infektionen und Krebserkrankungen auch den Kontakt zu anderen, *C. difficile* tragenden Kindern für Infektionen und Neu- Kolonisationen mitverantwortlich. In ihrer Arbeit zeigen sie die asymptomatische Kolonisation von Kindern unter 2 Jahren; Neonaten und Säuglinge in Europa und den USA sind zu 26,6– 43,5% mit *C. difficile* besiedelt [22].

In Japan war der Anteil bei unter 2 Jährigen sogar bei 84,4%, bei den Kindern über 2 Jahre und älter bei 30,3% [57].

Die Arbeiten von *Benson et al.* [17] und auch die von *Pituch et al.* [70] zeigen, dass der stetige Anstieg von jungen Patienten mit community- acquired CDAD ein neues Problem darstellen kann.

Neonaten, Kleinkinder und Kinder sind dahingehend besonders stark betroffen und gefährdet, da sich ihr gastrointestinales Immunsystem (GALT (gut- associated lymphoid tissue), als sekundäres lymphatisches Organ des MALT (mucosa- associated lymphoid tissue)) noch nicht vollständig ausgebildet hat und sich erst als erworbenes (adaptives = spezifisches) Immunsystem einrichten und etablieren muss. Auch muss sich erst noch die eigene, physiologische Darmflora auf die neuen Lebens- und Verdauungsansprüche außerhalb des mütterlichen Körpers einstellen.

Bei einem Erstkontakt dieses adaptiven Immunsystems mit einem Antigen, das in Form eines Bakteriums, von Viren oder anderer Parasiten präsentiert wird, reagiert es erst nach wenigen Tagen (5 bis 7 Tage), da es primär über eine B- und T- Lymphozyten Prägung aktiviert werden muss und eine Ansiedlung der Bakterien bei einem Nichtvorhandensein von Abwehrfunktionen stark erleichtert wird [100].

Trotz der Funde und dem relativ häufigen Nachweis von *C. difficile* bei Neonaten und Kleinkindern beschreiben unsere Ergebnisse keine Ausbruchsdynamik und besondere Gefährdung von im UKM behandelten und geborenen Kindern.

Die erhöhte Nachweisrate auf Neugeborenenstationen und Kinderintensivstationen kann daher rühren, dass generell betrachtet Kinder allein schon wegen der Behandlungsbedürftigkeit ihrer Grundleiden (angeborenen Entwicklungsstörungen/ Frühgeburtlichkeit/ Kaiserschnittentbindung wegen Komplikationen, Ernährung durch „Nicht-Muttermilch- Nahrung“) für eine Besiedlung und Kolonisation mit *C. difficile* prädisponiert sind. Durch diese von *Penders et al.* [65] gegebene Darstellung stützen die Autoren unsere Annahme, dass die wiederholte Nachweisrate nicht der Charakteristik eines unkontrollierbaren Ausbruches mit *C. difficile* assoziierten Krankheiten und Beschwerden am UKM entspricht.

Vonberg et al. [89] zeigen, dass die mediane Verweildauer von Patienten mit *C. difficile* assoziierten Komplikationen bei 27 Tagen liegt. Dies bestätigt die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen medianen Verweildauern von 29 Tagen in den beiden Untersuchungsjahren 2007 und 2008 am Universitätsklinikum Münster.

Dies hat für Krankenhäuser und das Personal gesundheitsökonomische Konsequenzen auf verschiedenen Ebenen. Sind die Patienten länger hospitalisiert bedeutet dies eine zusätzliche logistische Belastung der Stationssituation etwa durch besondere Hygienemaßnahmen wie die Isolation der Patienten, Kittelwechsel, Tragen von Handschuhen und zusätzliche

Desinfektionsarbeiten [21] [58]. Diese Maßnahmen führen zu einer zeitlichen Bindung von ärztlichem, pflegerischem und hauswirtschaftlichem Personal [19].

Um die geforderten, gesundheitlichen Standards dennoch aufrecht zu halten und Mitpatienten adäquat zu schützen, steigen die finanziellen Kosten mit jedem Tag, der die normale Standardliegedauer überschreitet stark an. Valide Zahlen und Untersuchungen bestätigen diese Beobachtungen. So werden bei *Kyne et al.* [54] in einer nordamerikanischen Studie, 271 Patienten umfassend, Mehrkosten von umgerechnet 3.669 \$ pro Patient angegeben, dessen nosokomiale Diarrhoe- Symptomatik durch *C. difficile* Bakterien verursacht wird; so kommt zu der eigentlichen Liegedauer zur Behandlung der Primärkrankheit, welche nicht durch CDAD verursacht wird, eine verlängerte Hospital- Liegedauer von 3,6 Tagen (95% KI, 1,5 – 6,2 Tage) hinzu. Gründe sich die Verlängerung der Hospitalisierung allein auf die *C. difficile* Infektion, erhöhten sich die Kosten auf bis zu 7400 \$ (2984 – 34.860 \$) je Patientenfall und zögen eine median verlängerte Hospital- Liegedauer von 7 Tagen nach sich [54].

Vor dem Hintergrund der gesundheitsökonomischen Konsequenzen ist es wichtig die nosokomiale Übertragung von *C. difficile* einzudämmen. Symptomatische *C. difficile* positive Patienten scheiden eine große Menge vegetativer Keime und Sporen aus. Diese Sporen können sich ausbreiten und durch z.B. Pflegekräfte und andere Personen, die direkten körperlichen Kontakt zu den betroffenen Patienten haben, zu anderen Patienten getragen und übertragen werden.

Um eine Transmission von kranken, symptomatischen Patienten durch das Personal zu vermeiden, ist die Händehygiene als Scheuer- Wisch- Reinigung mit Seife (Alkohol wirkt in diesem Falle gegen die Sporen nicht) und die Raumreinigung mit sporoziden Flächendesinfektionsmitteln wie *Hydrogen- Peroxid* und *Natrium- Hypochlorit* Lösungen anzuraten wie es von *Barbut et al.* beschrieben und gefordert wird, wichtig zu beachten [7]. *Clostridium difficile* und seine Sporen können monatelang überleben und sich schnell als *de novo*- Infektionsquelle bei sanierten oder auch immungeschwächten Patienten auftun [64] [93].

Je länger *C. difficile* auf einer Oberfläche überdauert, desto länger kann diese eine Quelle für Ansteckung und Transmission sein [74].

Daher ist konsequente und immer fortwährende Reinigung notwendig, um bei einem Therapieerfolg keine, auf Grund nachlässiger Hygiene, Reinfektion zu erlangen. Das

Reinigungs- Management setzt sich aus der in den Leitlinien geforderten Scheuer- Wisch- Desinfektion und speziellen Händedesinfektion während des Aufenthaltes des kontaminierten Patienten mit Hände- Desinfektionsmittel und der Spezialreinigung nach Entlassung des Patienten aus der Einrichtung mit *Hydrogen Peroxid* und wahlweise mit *Natrium- Hydroxid* zusammen, wie in richtungsweisenden Empfehlung von *Vonberg et al.* dargestellt wird [88].

In unserer Arbeit werden deshalb potentielle, mit *C. difficile* und dessen Sporen belastete Oberflächen in Patientenzimmern untersucht, wobei alle Proben vor einer Grundreinigung oder anderen desinfizierenden Maßnahmen gewonnen werden.

Als ergiebige Anzuchtmedium für *C. difficile* aus Umweltproben wurde in der vorliegenden Arbeit CCFB Medium verwendet, welches beispielsweise bei Untersuchungen aus den Jahren 1983 von *Buggy et al.* [23] und aus dem Jahre 1991 von *Clabots et al.* [27] eingesetzt wurde. Störende Begleitflora kann in gewissem Umfang durch die speziellen Bestandteile der Nährbouillon beseitigt werden und so die nachfolgende Diagnostik beim Ablesen von der Agarplatte erleichtern. Die mit feuchten Oberflächenträgern asservierten Proben werden in CCFB kultiviert und bebrütet, auf Agarplatten subkultiviert und abschließend wird eine Spezies- Diagnostik mittels der partiellen 16S- ribosomalen DNA (rDNA)- Sequenzierung durchgeführt.

Es werden mit diesem Verfahren n=7 Sporenbildner der Gattung *Clostridium* in der Umgebung von 60 *C. difficile* positiven Patienten nachgewiesen (n=3 *C. perfringens*; n=1 *C. barati*; n=2 *C. difficile*).

Unser Ergebnis zeigt eine geringe Last von *C. difficile* (3,33 %) in der Umgebung von *C. difficile* positiven Patienten. Der Ort der *C. difficile* Funde und auch derjenige der anderen *Clostridien*- Vertreter beschränkt sich auf die Positionen, wo sie zum einen aufgrund der körperlichen Betätigung des Patienten ausgeschieden und aktiv verbreitet werden (Bad- Armatur + WC- Spülung + Spülbecken = patientennah) und zum anderen auf waagerechten Flächen außerhalb der Reichweite des Patienten (handfern = patientenfern).

Zahlen von anderen Arbeiten, die ebenfalls kulturelle Techniken anwenden, um *C. difficile* in der Umgebung nachzuweisen, ergeben ähnlich niedrige Nachweiskraten. So wird bei *Clabots et al.* [27] eine Nachweisrate von insgesamt 5% angegeben und lässt sich gut mit unseren Ergebnissen von 3,33% vergleichen. Die Positivrate der durch Oberflächenträger gewonnenen Proben mit anschließender Bebrütung im CCFB- Bouillon bei *Bender et al.* beläuft sich auf ca. 15 % [15].

Diskussion

Nachweisverfahren die sich auf molekulare Techniken stützen zeigen meist eine wesentlich höhere Detektionsrate für *C. difficile* aus Umweltproben. So führen *Mutters et al.* [64] diverse Umgebungsuntersuchungen im Patientenzimmer mit dem Ziel *Clostridien*- kontaminierte Oberflächen und zudem Hautoberflächen des Pflegepersonals auf Sporenlastigkeit zu überprüfen, durch. Es wird eine hohe Sporenlast von 6.8×10^1 bis 5.3×10^4 bei sowohl erkrankten Patienten als auch bei diesen Patienten zugeteilten Pflegekräften entdeckt. Dabei wurde zur Analyse der Sporenlast eine Real- Time PCR nach Extraktion der Gesamt- DNA direkt aus dem Umgebungsabstrichtupfer durchgeführt.

Vorteil dieser hier angeführten Methode ist die höhere Sensitivität des Verfahrens. Durch die Kultur unabhängige absolute Quantifizierung der Bakterienkontamination kann die momentane Besiedlung mit Bakterien und deren Sporen wiedergespiegelt werden.

Jedoch kann dieses Verfahren ebenfalls nicht die wirkliche Kontamination in den Ergebnissen abbilden, da nicht zwischen der lebendigen Form (Bakterien und Sporen) und bereits abgestorbenen, nicht mehr verbreitungsfähigen Formen unterschieden werden kann [64].

Umweltkontaminationen können zum einen durch eine direkte Übertagung (Anfassen der Flächen) entstehen. Dies dürfte z. B. für die hier beobachteten Kontaminationen der Nasszelle und der Waschelegenheiten gelten. Zum anderen zeigen die Funde auf den patientenfernen Flächen, dass Sporen eventuell auch durch Luftverwirbelungen der Raumluftanlagen und des alltäglichen Betriebes ubiquitär in der Raumluft enthalten sein können und sich bei weniger Luftturbulenzen auf eben diesen Flächen niedersetzten und über einen längeren Zeitraum dort akkumulieren, wie dies auch von *Roberts et al.* beschrieben wird [74].

Hier werden mit speziellen Luft- Filteranlagen in den Patientenzimmern Partikel eingefangen und unter bakteriologischen Gesichtspunkten bebrütet. Funde von *C. difficile*, die mittels REP-PCR identifiziert werden, rangieren hierbei von 53 – 426 CFU / m³ Raumluft. Die Verteilung erfolgt nach Beobachtung effektiver als die der üblichen, in der Luft enthaltenden Partikel, und stellt somit auch nach Abwesenheit von CDAD- positiven Patienten immer noch eine Kontaminationsquelle mit Verbreitungsdynamik dar.

Im Rahmen der durchgeführten Umgebungsuntersuchungen wurden neben *C. difficile* auch *C. barati* und *C. perfringens* nachgewiesen. Für die humanpathogene Bedeutung von *C. barati* gibt es nur wenige Fallbeschreibungen. So wird bei *Hall, Pincomb et al.* angedeutet, dass das Typ F Botulismus Toxin, produziert von *C. barati*, zu neurotoxischen Erscheinungen und auch

Diskussion

pulmonalen Abszessen führen kann; somit also reaktive Prozesse durch Toxinbereitstellung hervorzurufen in der Lage ist [36] [26].

C. perfringens hingegen ist der Erreger des Wundgasbrands und wie *C. difficile* ein Sporenbildner. Während der Umgebungsuntersuchung im Rahmen dieser Arbeit kann *C. perfringens* insgesamt viermal nachgewiesen werden; sowohl in dem Patienten- nahen Bereich als auch, und dies in 75% der Funde, patientenfern.

In einzelnen Arbeiten wird darauf verwiesen, dass *C. perfringens* auch an der Entwicklung von Antibiotika- assoziierten Diarrhoen (AAD) durch das produzierte Enterotoxin beteiligt sei [24] [62] [35].

Von einem Nachweis der Sporen oder Bakterien von *C. barati* und *C. perfringens* auf patientennahen Oberflächen oder möglicherweise transmissionsrelevanten Flächen ist zurzeit keine Untersuchung bekannt, jedoch ist es interessant diesen Punkt weiter zu verfolgen.

6 Literaturverzeichnis

[1] **Agrawal, Anshu, Agrawal, Sudhanshu and Gupta, Sudhir.** "Dendritic cells in human aging." *Exp Gerontol*, 2007, 42(5), pp. 421-6.

[2] **Agrawal, Anshu, Agrawal, Sudhanshu, Tay, Jia and Gupta, Sudhir.** "Biology of dendritic cells in aging." *J Clin Immunol*, 2008, 28(1), pp. 14-20.

[3] **Alfa, M. J., Du, T. and Beda, G..** "Survey of incidence of Clostridium difficile infection in Canadian hospitals and diagnostic approaches." *J Clin Microbiol*, 1998, 36(7), pp. 2076-80.

[4] **Alfa, M. J., Kabani, A., Lyerly, D., Moncrief, S., Neville, L. M., Al-Barrak, A., Harding, G. K., Dyck, B., Olekson, K. and Embil, J. M..** "Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea." *J Clin Microbiol*, 2000, 38(7), pp. 2706-14.

[5] **Archibald, Lennox K., Banerjee, Shailen N. and Jarvis, William R..** "Secular trends in hospital-acquired Clostridium difficile disease in the United States, 1987-2001." *J Infect Dis*, 2004, 189(9), pp. 1585-9.

[6] **Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmee, M., Brazier, J., Kuijper, E. and Poxton, I..** "Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates." *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(11), pp. 1048-57.

[7] **Barbut, F., Menuet, D., Verachten, M. and Girou, E..** "Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of Clostridium difficile spores." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2009, 30(6), pp. 507-14.

[8] **Barbut, Frederic, Lalande, Valerie, Burghoffer, Beatrice, Thien, Huong Vu, Grimpel, Emmanuel and Petit, Jean-Claude.** "Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of Clostridium difficile among adults and children with diarrhea in France." *J Clin*

Microbiol, 2002, 40(6), pp. 2079-83.

[9] **Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. and Onderdonk, A. B.** "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia." *N Engl J Med*, 1978, 298(10), pp. 531-4.

[10] **Bartlett, J. G.** "Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrhoeas." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 8(11), pp. 1054-61.

[11] **Bartlett, John G.** "Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea." *N Engl J Med*, 2002, 346(5), pp. 334-9.

[12] **Bartlett, John G.** "Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease." *Ann Intern Med*, 2006, 145(10), pp. 758-64.

[13] **Bartlett, John G.** "New Antimicrobial Agents for Patients With *Clostridium difficile* Infections." *Curr Infect Dis Rep*, 2009, 11(1), pp. 21-8.

[14] **Belmares, Jaime, Gerding, Dale N., Tillotson, Glenn and Johnson, Stuart.** "Measuring the severity of *Clostridium difficile* infection: implications for management and drug development." *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6(6), pp. 897-908.

[15] **Bender, B. S., Bennett, R., Laughon, B. E., Greenough, W. B. 3rd, Gaydos, C., Sears, S. D., Forman, M. S. and Bartlett, J. G.** "Is *Clostridium difficile* endemic in chronic-care facilities?" *Lancet*, 1986, 2(8497), pp. 11-3.

[16] **Bennett, R. G. and Greenough, W. B. 3rd.** "Approach to acute diarrhea in the elderly." *Gastroenterol Clin North Am*, 1993, 22(3), pp. 517-33.

[17] **Benson, Lacey, Song, Xiaoyan, Campos, Joseph and Singh, Nalini.** "Changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease in children." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007, 28(11), pp. 1233-5.

[18] **Bobulsky, Greg S., Al-Nassir, Wafa N., Riggs, Michelle M., Sethi, Ajay K. and Donskey,**

Curtis J. "Clostridium difficile skin contamination in patients with C. difficile-associated disease." *Clin Infect Dis*, 2008, 46(3), pp. 447-50.

[19] **Boone, N., Eagan, J. A., Gillern, P., Armstrong, D. and Sepkowitz, K. A.** "Evaluation of an interdisciplinary re-isolation policy for patients with previous Clostridium difficile diarrhea." *Am J Infect Control*, 1998, 26(6), pp. 584-7.

[20] **Borgmann, S., Kist, M., Jakobiak, T., Reil, M., Scholz, E., von Eichel-Streiber, C., Gruber, H., Brazier, J. S. and Schulte, B.** "Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany." *Euro Surveill*, 2008, 13(49),.

[21] **Boyce, John M., Havill, Nancy L., Otter, Jonathan A., McDonald, L. Clifford, Adams, Nicholas M. T., Cooper, Timothea, Thompson, Angela, Wiggs, Lois, Killgore, George, Tauman, Allison and Noble-Wang, Judith.** "Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on Clostridium difficile environmental contamination and transmission in a healthcare setting." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29(8), pp. 723-9.

[22] **Brazier, J. S.** "The epidemiology and typing of Clostridium difficile." *J Antimicrob Chemother*, 1998, 41 Suppl Cpp. 47-57.

[23] **Buggy, B. P., Wilson, K. H. and Fekety, R.** "Comparison of methods for recovery of Clostridium difficile from an environmental surface." *J Clin Microbiol*, 1983, 18(2), pp. 348-52.

[24] **Carney, T., Perry, J. D., Ford, M., Majumdar, S. and Gould, F. K.** "Evidence for antibiotic induced Clostridium perfringens diarrhoea." *J Clin Pathol*, 2002, 55(3), pp. 240.

[25] **Chang, Heidi T., Krezolek, Dorota, Johnson, Stuart, Parada, Jorge P., Evans, Charlesnika T. and Gerding, Dale N.** "Onset of symptoms and time to diagnosis of Clostridium difficile-associated disease following discharge from an acute care hospital." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007, 28(8), pp. 926-31.

[26] **Chin-Chung Shu, Ming Yao, Chien-Ching Hung, Shih-Chi Ku,* and Chong-Jen Yu.** *Lung Abscess due to Clostridium baratii Infection in a Patient with Invasive Pulmonary Aspergillosis .,*

2008 March.

[27] **Clabots, C. R., Bettin, K. M., Peterson, L. R. and Gerding, D. N.** "Evaluation of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and cycloserine-cefoxitin-fructose broth for recovery of *Clostridium difficile* from environmental sites." *J Clin Microbiol*, 1991, 29(11), pp. 2633-5.

[28] **Clayton, Evelyn M., Rea, Mary C., Shanahan, Fergus, Quigley, Eamonn M. M., Kiely, Barry, Hill, Colin and Ross, R. Paul.** "The vexed relationship between *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: an assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission." *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(5), pp. 1162-9.

[29] **Cloud, Jeffrey and Kelly, Ciaran P.** "Update on *Clostridium difficile* associated disease." *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(1), pp. 4-9.

[30] **Donovan, David M.** "Bacteriophage and peptidoglycan degrading enzymes with antimicrobial applications." *Recent Pat Biotechnol*, 2007, 1(2), pp. 113-22.

[31] **Dubberke, Erik R., Reske, Kimberly A., Olsen, Margaret A., McDonald, L. Clifford and Fraser, Victoria J.** "Short- and long-term attributable costs of *Clostridium difficile*-associated disease in nonsurgical inpatients." *Clin Infect Dis*, 2008, 46(4), pp. 497-504.

[32] **Fischetti, Vincent A.** "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." *Trends Microbiol*, 2005, 13(10), pp. 491-6.

[33] **Frost, F., Craun, G. F. and Calderon, R. L.** "Increasing hospitalization and death possibly due to *Clostridium difficile* diarrheal disease." *Emerg Infect Dis*, 1998, 4(4), pp. 619-25.

[34] **Goldenberger, D., Kunzli, A., Vogt, P., Zbinden, R. and Altwegg, M.** "Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing." *J Clin Microbiol*, 1997, 35(11), pp. 2733-9.

[35] **Gorkiewicz, Gregor.** "Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*." *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33 Suppl 1pp. S37-41.

[36] **Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J. and Hatheway, C. L.** "Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinal toxin from an infant with botulism." *J Clin Microbiol*, 1985, 21(4), pp. 654-5.

[37] **Harmsen, D., Singer, C., Rothganger, J., Tonjum, T., de Hoog, G. S., Shah, H., Albert, J. and Frosch, M.** "Diagnostics of neisseriaceae and moraxellaceae by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms." *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3), pp. 936-42.

[38] **Harmsen, Dag, Rothganger, Jorg, Frosch, Matthias and Albert, Jurgen.** "RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database." *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1), pp. 416-7.

[39] **Hedge, Dennis D., Strain, Joe D., Heins, Jodi R. and Farver, Debra K.** "New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI)." *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4(5), pp. 949-64.

[40] **Heimesaat, M. M., Granzow, K., Leidinger, H. and Liesenfeld, O.** "Prevalence of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium perfringens* enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhea." *Infection*, 2005, 33(5-6), pp. 340-4.

[41] **Hornbuckle, K., Chak, A., Lazarus, H. M., Cooper, G. S., Kutteh, L. A., Gucalp, R., Carlisle, P. S., Sparano, J., Parker, P. and Salata, R. A.** "Determination and validation of a predictive model for *Clostridium difficile* diarrhea in hospitalized oncology patients." *Ann Oncol*, 1998, 9(3), pp. 307-11.

[42] **Huang, Haihui, Wu, Shi, Wang, Mingguai, Zhang, Yingyuan, Fang, Hong, Palmgren, Ann-Chatrin, Weintraub, Andrej and Nord, Carl Erik.** "*Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes." *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(4), pp. 339-42.

[43] **Issa, Mazen, Vijayapal, Aravind, Graham, Mary Beth, Beaulieu, Dawn B., Otterson, Mary F., Lundeen, Sarah, Skaros, Susan, Weber, Lydia R., Komorowski, Richard A., Knox, Josh F.,**

Emmons, Jeanne, Bajaj, Jasmohan S. and Binion, David G. "Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease." *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(3), pp. 345-51.

[44] **Jhung, Michael A., Thompson, Angela D., Killgore, George E., Zukowski, Walter E., Songer, Glenn, Warny, Michael, Johnson, Stuart, Gerding, Dale N., McDonald, L. Clifford and Limbago, Brandi M.** "Toxinotype V Clostridium difficile in humans and food animals." *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(7), pp. 1039-45.

[45] **Joseph, Rafael, Demeyer, Danny, Vanrenterghem, Dirk, van den Berg, Renate, Kuijper, Ed and Delmee, M.** "First isolation of Clostridium difficile PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium." *Euro Surveill*, 2005, 10(10), pp. E051020.4.

[46] **Karlstrom, O., Fryklund, B., Tullus, K. and Burman, L. G.** "A prospective nationwide study of Clostridium difficile-associated diarrhea in Sweden. The Swedish C. difficile Study Group." *Clin Infect Dis*, 1998, 26(1), pp. 141-5.

[47] **Kelly, C. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T.** "Clostridium difficile colitis." *N Engl J Med*, 1994, 330(4), pp. 257-62.

[48] **Kern, W. V., de With, Katja, Steib-Bauert, Michaela, Fellhauer, M., Plangger, A. and Probst, W.** "Antibiotic use in non-university regional acute care general hospitals in southwestern Germany, 2001-2002." *Infection*, 2005, 33(5-6), pp. 333-9.

[49] **Kleinkauf, N., Weiss, B., Jansen, A., Eckmanns, T., Bornhofen, B., Kuehnen, E., Weil, H-P and Michels, H.** "Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Germany." *Euro Surveill*, 2007, 12(11), pp. E071115.2.

[50] **Kuijper, E. J., Barbut, F., Brazier, J. S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T., Lambert, M. L., Drudy, D., Fitzpatrick, F., Wiuff, C., Brown, D. J., Coia, J. E., Pituch, H., Reichert, P., Even, J., Mossong, J., Widmer, A. F., Olsen, K. E., Allerberger, F. and Note, .** "Update of Clostridium difficile infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008." *Euro Surveill*, 2008, 13(31),.

[51] **Kuijper, E. J., Coignard, B. and Tull, P.** "Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe." *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12 Suppl 6pp. 2-18.

[52] **Kuijper, E. J., Coignard, B., Brazier, J. S., Suetens, C., Drudy, D., Wiuff, C., Pituch, H., Reichert, P., Schneider, F., Widmer, A. F., Olsen, K. E., Allerberger, F., Notermans, D. W., Barbut, F., Delmee, M., Wilcox, M., Pearson, A., Patel, B. C. and Brown, .** "Update of Clostridium difficile-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe." *Euro Surveill*, 2007, 12(6), pp. E1-2.

[53] **Kuijper, Ed J., van den Berg, Renate J., Debast, Sylvia, Visser, Caroline E., Veenendaal, Dick, Troelstra, Annet, van der Kooi, Tjallie, van den Hof, Susan and Notermans, Daan W..** "Clostridium difficile ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands." *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5), pp. 827-30.

[54] **Kyne, Lorraine, Hamel, Mary Beth, Polavaram, Rajashekhar and Kelly, Ciaran P..** "Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to Clostridium difficile." *Clin Infect Dis*, 2002, 34(3), pp. 346-53.

[55] **Loo, Vivian G., Poirier, Louise, Miller, Mark A., Oughton, Matthew, Libman, Michael D., Michaud, Sophie, Bourgault, Anne-Marie, Nguyen, Tuyen, Frenette, Charles, Kelly, Mirabelle, Vibien, Anne, Brassard, Paul, Fenn, Susan, Dewar, Ken, Hudson, Thomas J. and, .** "A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality." *N Engl J Med*, 2005, 353(23), pp. 2442-9.

[56] **Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K. and Wilkins, T. D..** "Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals." *Infect Immun*, 1985, 47(2), pp. 349-52.

[57] **Matsuki, Shinichirou, Ozaki, Eijiro, Shozu, Makio, Inoue, Masaki, Shimizu, Shouji, Yamaguchi, Nobuo, Karasawa, Tadahiro, Yamagishi, Takayoshi and Nakamura, Shinichi.** "Colonization by Clostridium difficile of neonates in a hospital, and infants and children in three day-care facilities of Kanazawa, Japan." *Int Microbiol*, 2005, 8(1), pp. 43-8.

[58] **Mayfield, J. L., Leet, T., Miller, J. and Mundy, L. M..** "Environmental control to reduce transmission of Clostridium difficile." *Clin Infect Dis*, 2000, 31(4), pp. 995-1000.

[59] **McDonald, L. Clifford, Killgore, George E., Thompson, Angela, Owens, Robert C. Jr,**

Kazakova, Sophia V., Sambol, Susan P., Johnson, Stuart and Gerding, Dale N. "An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*." *N Engl J Med*, 2005, 353(23), pp. 2433-41.

[60] **McDonald, L. Clifford, Owings, Maria and Jernigan, Daniel B.** "Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003." *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(3), pp. 409-15.

[61] **McFarland, L. V., Mulligan, M. E., Kwok, R. Y. and Stamm, W. E.** "Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection." *N Engl J Med*, 1989, 320(4), pp. 204-10.

[62] **Modi, N. and Wilcox, M. H.** "Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea." *J Clin Pathol*, 2001, 54(10), pp. 748-51.

[63] **Musher, Daniel M., Logan, Nancy, Mehendiratta, Vaibhav, Melgarejo, Nicolas A., Garud, Sagar and Hamill, Richard J.** "*Clostridium difficile* colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide." *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(4), pp. 705-10.

[64] **Mutters, R., Nonnenmacher, C., Susin, C., Albrecht, U., Kropatsch, R. and Schumacher, S.** "Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction." *J Hosp Infect*, 2009, 71(1), pp. 43-8.

[65] **Penders, John, Thijs, Carel, Vink, Cornelis, Stelma, Foekje F., Snijders, Bianca, Kummeling, Ischa, van den Brandt, Piet A. and Stobberingh, Ellen E.** "Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy." *Pediatrics*, 2006, 118(2), pp. 511-21.

[66] **Pepin, Jacques, Routhier, Sophie, Gagnon, Sandra and Brazeau, Isabel.** "Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada." *Clin Infect Dis*, 2006, 42(6), pp. 758-64.

[67] **Pepin, Jacques, Valiquette, Louis, Alary, Marie-Eve, Villemure, Philippe, Pelletier, Annick, Forget, Karine, Pepin, Karine and Chouinard, Daniel.** "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity." *CMAJ*, 2004, 171(5), pp. 466-72.

[68] **Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G. and Popoff, M. R.** "Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196." *Infect Immun*, 1997, 65(4), pp. 1402-7.

[69] **Pfister, Gerald and Savino, Wilson.** "Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective." *Neuroimmunomodulation*, 2008, 15(4-6), pp. 351-64.

[70] **Pituch, Hanna.** "Clostridium difficile is no longer just a nosocomial infection or an infection of adults." *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33 Suppl 1pp. S42-5.

[71] **Razavi, B., Apisarnthanarak, A. and Mundy, L. M.** "Clostridium difficile: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance." *Infection*, 2007, 35(5), pp. 300-7.

[72] **Reichardt, C., Chaberny, I. F., Kola, A., Mattner, F., Vonberg, R. P. and Gastmeier, P.** "Dramatischer Anstieg von Clostridium-difficile-assoziiierter Diarrhoe in Deutschland: Ist der neue Stamm PCR-Ribotyp 027 bereits angekommen?" *Dtsch Med Wochenschr*, 2007, 132(5), pp. 223-8.

[73] **Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Schiessel, R. and LaMont, J. T.** "Clostridium difficile toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro." *J Clin Invest*, 1995, 95(5), pp. 2004-11.

[74] **Roberts, Katherine, Smith, Caroline F., Snelling, Anna M., Kerr, Kevin G., Banfield, Kathleen R., Sleight, P. Andrew and Beggs, Clive B.** "Aerial dissemination of Clostridium difficile spores." *BMC Infect Dis*, 2008, 8pp. 7.

[75] **Rupnik, Maja, Dupuy, Bruno, Fairweather, Neil F., Gerding, Dale N., Johnson, Stuart, Just, Ingo, Lyerly, David M., Popoff, Michel R., Rood, Julian I., Sonenshein, Abraham L., Thelestam, Monica, Wren, Brendan W., Wilkins, Tracy D. and von Eichel-Streiber, Ch.** "Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes." *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 2), pp. 113-7.

[76] **Schols, J. M. G. A., De Groot, C. P. G. M., Van Der Cammen, T. J. M. and Olde Rikkert, M.**

G. M. "Preventing and Treating Dehydration in the Elderly during Periods of Illness and Warm Weather." *J Nutr Health Aging*, 2009, 13(2), pp. 150-7.

[77] **Schroder, O., Gerhard, R. and Stein, J.** "Die Antibiotika-assoziierte Diarrho." *Z Gastroenterol*, 2006, 44(2), pp. 193-204.

[78] **Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. and Slatko, B. E.** "CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase." *Biotechniques*, 1992, 13(4), pp. 626-33.

[79] **Simor, A. E., Yake, S. L. and Tsimidis, K.** "Infection due to *Clostridium difficile* among elderly residents of a long-term-care facility." *Clin Infect Dis*, 1993, 17(4), pp. 672-8.

[80] **Smith, Alyson.** "Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US." *Euro Surveill*, 2005, 10(6), pp. E050630.2.

[81] **Sohn, SeJean, Climo, Michael, Diekema, Daniel, Fraser, Victoria, Herwaldt, Loreen, Marino, Susan, Noskin, Gary, Perl, Trish, Song, Xiaoyan, Tokars, Jerome, Warren, David, Wong, Edward, Yokoe, Deborah S., Zembower, Theresa and Sepkowitz, Kent A.** "Varying rates of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at prevention epicenter hospitals." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005, 26(8), pp. 676-9.

[82] **Song, Xiaoyan, Bartlett, John G., Speck, Kathleen, Naegeli, April, Carroll, Karen and Perl, Trish M.** "Rising economic impact of *clostridium difficile*-associated disease in adult hospitalized patient population." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29(9), pp. 823-8.

[83] **Starr.** *Control measures for Clostridium difficile need to extend into the community.*, 2007.

[84] **Sunenshine, Rebecca H. and McDonald, L. Clifford.** "Clostridium difficile-associated disease: new challenges from an established pathogen." *Cleve Clin J Med*, 2006, 73(2), pp. 187-97.

[85] **Tachon, M., Cattoen, C., Blanckaert, K., Poujol, I., Carbonne, A., Barbut, F., Petit, J. C.**

and Coignard, B. "First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report." *Euro Surveill*, 2006, 11(5), pp. E060504.1.

[86] **Thomas, Claudia and Riley, Thomas V.** "Restriction of third generation cephalosporin use reduces the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in hospitalised patients." *Commun Dis Intell*, 2003, 27 Supplpp. S28-31.

[87] **Torres, J. F.** "Purification and characterisation of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A." *J Med Microbiol*, 1991, 35(1), pp. 40-4.

[88] **Vonberg, R-P, Kuijper, E. J., Wilcox, M. H., Barbut, F., Tull, P., Gastmeier, P., van den Broek, P. J., Colville, A., Coignard, B., Daha, T., Debast, S., Duerden, B. I., van den Hof, S., van der Kooi, T., Maarleveld, H. J. H., Nagy, E., Notermans, D. W.** "Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*." *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 Suppl 5pp. 2-20.

[89] **Vonberg, R-P, Reichardt, C., Behnke, M., Schwab, F., Zindler, S. and Gastmeier, P.** "Costs of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea." *J Hosp Infect*, 2008, 70(1), pp. 15-20.

[90] **Vonberg, Ralf-Peter, Schwab, Frank and Gastmeier, Petra.** "*Clostridium difficile* in discharged inpatients, Germany." *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(1), pp. 179-80.

[91] **Voth, Daniel E. and Ballard, Jimmy D.** "*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease." *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2), pp. 247-63.

[92] **Warny, Michel, Pepin, Jacques, Fang, Aiqi, Killgore, George, Thompson, Angela, Brazier, Jon, Frost, Eric and McDonald, L. Clifford.** "Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe." *Lancet*, 2005, 366(9491), pp. 1079-84.

[93] **Weaver, L., Michels, H. T. and Keevil, C. W.** "Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene." *J Hosp Infect*, 2008, 68(2), pp. 145-51.

[94] **Weese, J. S.** "*Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious threat?" *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(1), pp. 3-10.

- [95] **Wilcox, M. H. and Fawley, W. N.** "Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*." *Lancet*, 2000, 356(9238), pp. 1324.
- [96] **Wilcox, M. H., Cunniffe, J. G., Trundle, C. and Redpath, C.** "Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection." *J Hosp Infect*, 1996, 34(1), pp. 23-30.
- [97] **Wilcox, M. H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C. D. and Fawley, W. N.** "A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection." *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(2), pp. 388-96.
- [98] **Yip, C., Loeb, M., Salama, S., Moss, L. and Olde, J.** "Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea." *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2001, 22(9), pp. 572-5.
- [99] **Zaiss, N. H., Weile, J., Ackermann, G., Kuijper, E., Witte, W. and Nuebel, U.** "A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany." *Euro Surveill*, 2007, 12(11), pp. E071115.1.
- [100] **Zilberberg, Marya D., Shorr, Andrew F. and Kollef, Marin H.** "Increase in *Clostridium difficile*-related hospitalizations among infants in the United States, 2000-2005." *Pediatr Infect Dis J*, 2008, 27(12), pp. 1111-3.
- [101] **de With, Katja, Bergner, Jobst, Buhner, Reinhard, Dorje, Frank, Gonnermann, Christa, Haber, Manfred, Hartmann, Michael, Rothe, Ulrich, Strehl, Egid, Steib-Bauert, Michaela and Kern, Winfried V.** "Antibiotic use in German university hospitals 1998-2000 (Project INTERUNI-II)." *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(3), pp. 213-8.

7 Lebenslauf und Danksagung

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Begriffsdefinition bei *C. difficile* Fällen: mitgebrachte vs. nosokomial erworbene *C. difficile* Fälle 12

Abbildung 2 Typisches untersuchtes Patientenzimmer am UKM, in welchem Proben an den unterschiedlich eingefärbten Bereichen zur Umgebungsuntersuchung + Sporenaufnahme durch Oberflächenträger gewonnen werden (Vergleich Tabelle 1 : rot = 1. Position; blau 2. Position; grün 3. Position) 16

Abbildung 3 Gram- Präparat von *C. difficile* (Vergrößerung bei 10x100); vegetative Formen imponieren hier als dunkel- violette Stäbchen; die tennisschlägerartig aufgeweiteten Endkappen einiger Stäbchen deuten bereits auf die freigesetzten Sporen hin 19

Abbildung 4 Blutagar- Platte mit *C. difficile* Kolonien nach 48h Bebrütung bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen 39

Abbildung 5 Schaedler- Blutagar- Platte mit *C. difficile* Kolonien nach 48h Bebrütung bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen 40

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Rezept der modifizierten Medien: Bouillon (CCFB) [27] 17

Tabelle 2 Gesamt- Patientenkollektiv des UKM vs. *C. difficile* positive Patienten (Aufenthaltsdauer und Anzahl) in 2007 und 2008 36

Tabelle 3 Darstellung der jeweiligen Jahreszahlen der *C. difficile* positiven Patienten am UKM vergleichend zu den Gesamtzahlen der 35 bzw. 59 Krankenhäusern des CDAD-KISS (Gesamtinzidenzdichte= Quotient aus der Anzahl der *C. difficile* positiven Patienten pro 1.000 Patiententage; Inzidenz der nosokomialen Fälle= Quotient der nosokomialen, *C. difficile* Fälle pro 1.000 Patiententage zur Charakterisierung der nosokomialen Ausbreitung; *C. difficile*-

Positivität/ CDAD – Prävalenz bei Aufnahme= Quotient aus der Zahl der bei Aufnahme C. difficile positiven Patienten pro 100 Patientenfälle zur Charakterisierung des Imports von C. difficile)..... 37

Tabelle 4 Jahresliste mit Zahlen der deutschlandweiten Surveillance durch das NRZ im Vergleich zu den absoluten Zahlen der an C. difficile positiven Patienten am UKM in Münster 38

8.3 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 Altersstufen mit absolutem Anteil von C. difficile positiven Patienten 23

Diagramm 2 prozentuale Anteile der betroffenen Patienten in den verschiedenen Altersgruppen für die Jahre 2007 und 2008 24

Diagramm 3 Gruppe der 0- 5 Jährigen im Ein- Jahres- Intervall..... 25

Diagramm 4 Anteil der männlichen/ weiblichen Patienten in verschiedenen Altersgruppen für 2007 und 2008..... 26

Diagramm 5 Anteil der männlichen/ weiblichen 0- 5 jährigen Patienten für 2007 und 2008.... 27

Diagramm 6 Anzahl C. difficile positiver Patienten verteilt auf verschiedene Fachabteilungen bzw. Kliniken in des UKM in den Jahren 2007 und 2008 28

Diagramm 7 Relative Anteile zu 100% der positiv getesteten Patienten in unterschiedlichen Fachabteilungen im Jahresvergleich 2007 und 2008 28

Diagramm 8 zeigt das Durchschnittsalter der C. difficile positiven Patienten in Relation zu den Fachabteilungen für die Jahre 2007 und 2008 29

Diagramm 9 Aufenthalt in Tagen in Bezug auf die einzelnen Fachabteilungen und Kliniken des UKM..... 30

Diagramm 10 Patientenzahl in Relation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 32

Diagramm 11 Verteilungsmuster der nosokomialen *C. difficile* Fälle bezogen auf die einzelnen Fachdisziplinen (Stapelsäulen jeweils zu 100%) 33

Diagramm 12 Verteilungsmuster der ambulanten *C. difficile* Fälle bezogen auf die einzelnen Fachdisziplinen (Stapelsäulen jeweils zu 100%) 34

Diagramm 13 Relative Anteile zu 100% der ambulanten und nosokomialen *C. difficile* Fälle in unterschiedlichen Fachabteilungen 35