

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Antibiotika-assoziierte Diarrhö

Die Antibiotika-assoziierte Diarrhö (AAD) wird als Diarrhö definiert, der eine vorangegangene Antibiotikatherapie zugrunde liegt. Die AAD stellt sowohl im stationären als auch im ambulanten Bereich eine bedeutende Komplikation der antibiotischen Behandlung dar. In der Literatur wird eine Prävalenz zwischen 5 und 39% beschrieben [1,2]. Antibiotika, die am häufigsten Diarrhö verursachen, sind vor allem Breitspektrum-Antibiotika wie Clindamycin, Ampicillin oder Amoxicillin und Cephalosporine. Jedoch trägt prinzipiell jedes Antibiotikum das Risiko, eine AAD zu verursachen [3].

Die Symptome einer AAD reichen von leichtem Durchfall bis hin zu schweren Kolitiden mit Bauchkrämpfen, Fieber, Leukozytose, Hypalbuminämie, verdickten Darmwänden und endoskopisch imponierenden Veränderungen der Darmschleimhaut [4,5]. Die Patienten können bis zu 20 Stühle pro Tag haben [6]. Die Stuhlkonsistenz variiert von weich und ungeformt über schleimig bis hin zu wässrig, das Aussehen kann normal bis grünlich sein, und selten können leichte Blutbeimengungen vorkommen [7].

Die AAD erweist sich nicht nur als gesundheitliche Gefahr, sondern auch als nicht zu vernachlässigender Kostenfaktor für die Krankenhäuser. Eine aktuelle Studie in den USA ergab, dass Patienten, die an AAD erkrankt waren, durchschnittlich 3,6 Tage länger im Krankenhaus blieben und 54% mehr Kosten verursachten, als Patienten deren Krankheitsverlauf nicht durch eine AAD kompliziert wurde [8].

Antibiotika sind zur Behandlung bakterieller Erkrankungen unerlässlich. Durch Antibiotika wird jedoch auch jegliche physiologische Kolonisationsflora verändert bzw. teilweise zerstört. Hierdurch wird der Organismus anfällig für die Überwucherung durch fakultativ pathogene Mikroorganismen der Dickdarmflora [9]. Die Standortflora des Dickdarmes (10^{12} /g Stuhl) setzt sich aus bis zu 500 verschiedenen Bakterienarten zusammen [10]. Die luminale Flora besteht zu ca. 99% aus obligat anaeroben Bakterien, den Rest bilden fakultativ anaerobe Bakterien und Hefen. 75% der obligat anaeroben Bakterien machen *Bacteroides* spezie, Bifidobakterien und Eubakterien aus. Deutlich seltener finden sich Clostridien, anaerobe Kokken (z.B. *Peptococcus* und *Peptostreptococcus spp.*), Fusobakterien und Laktobazillen. Durch die bessere Sauerstoffversorgung der wandständigen Flora verschiebt sich im Bereich der

Darmwand das Verhältnis zugunsten der fakultativ anaeroben Flora. Außerdem finden sich häufiger Bakterien mit adhäsiven Fähigkeiten, wie zum Beispiel *Escherichia coli*. Bei fehlbesiedelten Dickdärmen kommt es zu einer Zunahme von aeroben Bakterien, sowie einer Abnahme der Vielfalt obligat anaerober Bakterienspezies. *C. perfringens* und *Bacteroides fragilis* werden aus dem Darm von Patienten mit Fehlbesiedlung häufiger als bei gesunden Individuen isoliert [11].

Etwa 10-20% der AAD Fälle sind auf *C. difficile* Infektionen zurückzuführen [4]. In der Mehrzahl der Fälle bleibt der Auslöser jedoch unbekannt. 1984 wurde erstmals *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) in Stühlen von Patienten mit AAD gefunden [12]. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass bis zu 15% der AAD Fälle durch eine *C. perfringens* Infektion verursacht waren [13].

1.1.1 Geschichte

Das klinische Spektrum der AAD reicht von milden Diarrhöen über die einfache Kolitis bis hin zur pseudomembranösen Kolitis (PMC).

1893 wurde die PMC erstmalig durch Finney beschrieben [14]. In den 1950er Jahren gewann die AAD durch den verbreiteten Einsatz von Breitbandantibiotika an Bedeutung. *Staphylococcus aureus* wurde zunächst als Hauptverursacher angesehen [15]. In den 1970er Jahren wurde *C. difficile*-Zytotoxin erstmalig im Tierversuch als Ursache von AAD und PMC beschrieben [16, 17]. In den 1980er Jahren wurde die Erforschung der *C. difficile*-assoziierten AAD (CDAAD) intensiviert, obwohl diese nur etwa ein Viertel der Fälle von AAD ausmachten [1]. 1984 beschrieben Borriello et al. zum ersten Mal *C. perfringens* als Auslöser der AAD [12].

1.1.2 Ätiologie

Grundsätzlich werden drei Ursachen für das Auftreten einer AAD unterschieden: Die Infektion bzw. Überwucherung der normalen Darmflora mit fakultativ pathogenen Mikroorganismen, die direkten Nebenwirkungen von Antibiotika auf das intestinale Nervensystem und die metabolischen Veränderungen im Darmlumen.

Die durch Überwucherung der normalen intestinalen Flora hervorgerufene Form der AAD macht 30-40% der Fälle aus [1] und wird in die CDAAD und die nicht *C. difficile*-assoziierte AAD (NCDAAD) eingeteilt. Als infektiöse Erreger der NCDAAD wurden *Candida albicans* [18], *Klebsiella oxytoca* [19, 20], Methicillin-resistenter-

Staphylococcus aureus (MRSA) [15, 21, 22], *Salmonella Newport* [23, 24, 25] und *C. perfringens* [12, 13, 26-31] beschrieben.

Direkte Wirkungen von Antibiotika auf das Darmnervensystem wurden für Erythromycin [32], Amoxicillin/Clavulansäure-Kombinationen [33] und Neomycin [34] beschrieben. Erythromycin wirkt als Motilin-Rezeptor-Agonist und stimuliert somit die gastro-duodeno-jejunale Motilität beim Menschen [32]. Bei den Amoxicillin/Clavulansäure-Kombinationen verlängert die Amoxicillin-Komponente die oro-coecale Transitzeit [35], während die Clavulansäure-Komponente vor allem nachts die Darmmotilität verstärkt [33].

Durch Antibiotika wird die Funktion der normalen intestinalen Flora, und damit der Kohlenhydrat- und Gallensäure-Metabolismus, beeinflusst. Diverse Breitspektrumantibiotika vermindern durch Abtötung von anaeroben Darmbakterien den bakteriellen Kohlenhydrat-Metabolismus. Mögliche Ursachen der hierdurch entstehenden Diarrhö bestehen in einer osmotischen Diarrhö durch Kohlenhydrate, die im Darmlumen verbleiben [35], einer verminderten Absorption von Wasser durch Verringerung kurzkettiger Fettsäuren, welche als potente Stimulatoren der Wasser- und ElektrolytabSORption gelten [36, 37] und einer nutritiven Verarmung des distalen Kolons und damit Verminderung des Energieangebotes durch im Kohlenhydrat-Metabolismus normalerweise entstehender Butyrate [38, 39, 40].

Die anaeroben Darmbakterien sind auch für eine Metabolisierung von primären zu sekundären Gallensäuren im Dünndarm verantwortlich. Durch Abtötung von Anaerobiern durch Breitspektrumantibiotika wird dieser Metabolismus entsprechend herabgesetzt, in deren Folge vermehrt primäre Gallensäuren anfallen [41], während diese im Kolon als potente Sekretagoga wirken und zu Diarrhö führen [42].

1.1.3 Risikofaktoren

Risikofaktoren kann man in medikamentenbedingte und patientenbedingte Faktoren unterteilen. Zu den medikamentenbedingten Risikofaktoren gehören insbesondere die Gabe von Breitspektrumantibiotika [43], sowie Kombinationen- [44], Langzeit- [43, 45] oder wiederholte Therapien mit Antibiotika [2]. Zu den patientenbedingten Risikofaktoren zählt das Alter der Patienten. So konnte in einer landesweiten schwedischen Studie festgestellt werden, dass das Risiko, an CDAAD zu erkranken, 20 bis 100mal höher lag bei über 60-jährigen im Vergleich zu 10- bis 20-jährigen Patienten [46]. Weiterhin gelten eine frühere CDAAD [47], Komorbidität [48], chronische

gastrointestinale Leiden [49], Immunsuppression [50,51], langer Krankenhausaufenthalt [8, 44], Operationen [52] und Sondenernährung [53] als patientenbedingte Risikofaktoren.

1.1.4 Diagnostik

Da einer Diarrhö zahlreiche Ursachen zugrunde liegen können, sollte zunächst anamnestisch abgeklärt werden, ob der Patient kürzlich stationär behandelt worden ist und ob eine Antibiotikatherapie höchstens zwei Monate zurückliegt [54]. Weiterhin sollten andere nichtinfektiöse Auslöser einer Diarrhö, z.B. Medikamente, chronische Krankheiten, wie Morbus Crohn, Kurzdarmsyndrom oder ischämische Kolitis, und Lebensmittelintoleranzen, aber auch infektiöse nicht-antibiotikaassoziierte Darmpathogene wie Salmonellen, Shigellen, Campylobacter, Aeromonas, Yersinien und *Escherichia coli* ausgeschlossen werden [1]. Da die CDAAD den größten Anteil der AAD ausmacht, wird dem Nachweis von *C. difficile* Toxinen die größte Bedeutung beigemessen [1]. Der Nachweis des Zytotoxin B aus Gewebekulturen wird nach wie vor als „Goldstandard“ betrachtet, da er auch bei kleinen Mengen Toxin im Stuhl eine hohe Sensitivität aufweist [55]. Dieser Test ist jedoch relativ zeitaufwändig (24-48 Stunden) [6]. Im Gegensatz hierzu kann der Toxin A- und B-Nachweis mittels „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) in 2-3 Stunden durchgeführt werden und hat eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität [6]. Auch die Anzucht von *C. difficile* auf geeigneten Kulturmedien ist sinnvoll, da bis zu 38% der CDAAD-Fälle ätiologisch verborgen bleiben, wenn keine Kultur durchgeführt wird [55]. Trotzdem hat kein einzelner Test für sich eine hohe Sensitivität, Spezifität oder kurze Bearbeitungszeit [6]. Deshalb werden in vielen Labors zwei Testverfahren kombiniert (z.B. ELISA und kulturelle Anzucht) [56]. In einer aktuellen Studie aus den USA wurde eine „two-step“-Diagnostik, bestehend aus einem Antigen-ELISA zur Speziesdiagnose und einem Zellkultur-Zytotoxizitäts-Neutralisationsassay als hoch sensitiv und kostengünstig beschrieben [57]. Bei negativem Testergebnis und persistierenden Durchfällen sowie bei schwerkranken Patienten, akutem Abdomen und Verdacht auf PMC, sollten weitere Stuhlproben untersucht und eine Koloskopie oder Computertomographie in Erwägung gezogen werden [1, 6].

1.1.5 Therapie und Prävention

Die symptomatische Therapie der AAD besteht in Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution, Sicherung der Kalorienzufuhr, gegebenenfalls Senkung des Fiebers und Überwachung des Kreislaufes [58]. Bei 15 bis 23% der Patienten sistieren die Symptome unter dieser Therapie innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Absetzen des auslösenden Antibiotikums [59]. Bei schwereren Formen der AAD ist meist eine zusätzliche medikamentöse Therapie erforderlich. Die orale Gabe von Metronidazol ist bei CDAAD die Therapie der ersten Wahl [6]. Vancomycin sollte den Fällen vorbehalten sein, bei denen die Gabe von Metronidazol kontraindiziert ist, oder schwerkranken Patienten mit PMC oder toxischem Megakolon [1]. Der Grund hierfür ist die Gefahr der Selektion Vancomycin-resistenter Enterokokken in Krankenhäusern [6]. Auf die orale Therapie mit Metronidazol oder Vancomycin sprechen mindestens 94% der Patienten an, woraufhin die Diarrhö nach durchschnittlich zwei bis vier Tagen sistiert [6]. Es wird empfohlen, die Medikamente für zehn Tage zu verabreichen [6]. Die therapeutische Wirkung von *Saccharomyces boulardii* konnte in mehreren Studien als wirksames und gut verträgliches Medikament bestätigt werden [43, 53, 60]. Weniger erfolgreiche Ergebnisse erzielten Therapien mit *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* und *L. bulgaricus* sowie *Enterococcus faecium* [61, 62, 63].

Um einer AAD vorzubeugen, sollten vor allem dem Missbrauch und der übermäßigen Anwendung von Antibiotika entgegengewirkt werden [1]. Schnelle Diagnostik und Therapie tragen dazu bei, dass sich infektiöse Erreger weniger schnell in der Umgebung der Patienten ausbreiten können [45, 7, 64]. Die Übertragung von Erregern kann durch hygienische Maßnahmen, wie zum Beispiel das Tragen von Einmalhandschuhen und die Verwendung von Einmalthermometern, verhindert werden [65, 66]. Eine bessere Aufklärung des Krankenhauspersonals über mögliche Ausbreitungswege von *Clostridien* trägt zu einer Verminderung der Erregerübertragung bei [67].

1.2 Bedeutung von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* bei Antibiotika-assoziiertes Diarrhö

Clostridien sind obligat anaerobe grampositive Stäbchenbakterien, die Endosporen bilden und ubiquitär vorkommen. Zu dieser Gattung gehören neben *C. difficile* und *C. perfringens* noch weitere Spezies, die eine Reihe von schweren Krankheitsbildern, wie z.B. Botulismus, Gasbrand und Tetanus, verursachen [68].

1.2.1 *Clostridium difficile*

C. difficile wird seit den 1970er Jahren mit der AAD in Verbindung gebracht [16, 17]. Es gilt als der wichtigste Erreger der AAD und war in der Vergangenheit Schwerpunkt zahlreicher Studien im Bereich der AAD-Forschung. Nur etwa 10-20% der AAD-Fälle sind jedoch auf *C. difficile* Infektionen zurückzuführen [4].

Pathogene *C. difficile* Stämme produzieren zwei hitzelabile Toxine, ein Enterotoxin, das Toxin A, und ein Zytotoxin, das Toxin B. Beide Toxine werden durch Rezeptorvermittelte Endozytose in die intestinalen Epithelzellen aufgenommen und greifen direkt am Zytoskelett an. Sie verdichten die zellulären Aktinfilamente, verzerren die Zellform und führen zur Bildung von Ausstülpungen, was schließlich die Apoptose der Epithelzelle zur Folge hat. Weiterhin werden durch Toxin A und B die epithelialen „tight junctions“ zwischen den Zellen verändert, was zum Flüssigkeitsverlust und damit zur Diarrhö führt. Toxin A erhöht weiterhin die Membranpermeabilität und wirkt auf inflammatorische und neuronale Zellen [69]. Durch die Freisetzung von Zytokinen aus Epithelzellen, Monozyten und Makrophagen kommt es zu einer Entzündungsreaktion und nachfolgender Mukosazerstörung [70].

1.2.2 *Clostridium perfringens*

C. perfringens ist in der Natur ubiquitär verbreitet. Es findet sich in Erdboden, Staub, Wasser sowie als Standortflora im Intestinaltrakt von Säugetieren und ist demnach Bestandteil der physiologischen Darmflora des Menschen [71,72].

C. perfringens ist verantwortlich für verschiedene Erkrankungen. Dazu gehört der Gasbrand, eine schwere Wundinfektion, die unbehandelt innerhalb von Stunden tödlich verlaufen kann. Weiterhin können durch *C. perfringens* Lebensmittelvergiftungen, nekrotisierende Enterokolitiden und Peritonitiden verursacht werden [68]. *C. perfringens* Isolate werden abhängig vom Schema der exprimierten Toxine Alpha, Beta, Epsilon und Iota in Typ A – E eingeteilt [68].

Bis zu 5% aller Typ A *C. perfringens*-Stämme produzieren das *C. perfringens*-Enterotoxin (CPE) [73, 74]. CPE wurde in den USA als dritthäufigster Auslöser von Lebensmittelvergiftungen beschrieben [75]. Es gilt jedoch auch als wichtiger Auslöser Lebensmittel-unabhängiger Diarrhöen und wird, vor allem bei älteren, hospitalisierten und antibiotikatherapierten Patienten, in bis zu 20% mit Diarrhöen in Zusammenhang gebracht [12, 13, 26-31]. Einige *C. perfringens*-Stämme tragen das CPE-Gen auf einem Chromosom, andere auf einem Plasmid [76]. Nahezu alle Stämme, die ein

chromosomales CPE-Gen tragen, rufen Lebensmittelvergiftungen hervor, während plasmidgebundene *C. perfringens* Typ A Stämme, Lebensmittel-unabhängige Diarrhöen verursachen [77].

Durch eine orale CPE-Gabe konnte bei gesunden Testpersonen eine Diarrhö ausgelöst werden [78]. Enterotoxinogene *C. perfringens* Stämme vermehren sich nach Genuss stark kontaminierter Lebensmittel im Dünndarm, sporulieren und produzieren CPE [79]. Im Gegensatz zu der Lebensmittelintoxikation sind für die Auslösung Lebensmittel-unabhängiger Diarrhöen nur geringe Mengen an enterotoxinogenem *C. perfringens* nötig [80]. Brynestad et al. fanden 2001 heraus, dass plasmidgebundene CPE-Gene konjugativ zwischen *C. perfringens* Isolaten übertragen werden können. Wenn dieser Plasmidtransfer auch *in vivo* stattfinden sollte, ist davon auszugehen, dass die in geringen Mengen aufgenommenen enterotoxinogenen *C. perfringens* die in der normalen Standortflora vorkommenden nicht toxinogenen *C. perfringens* in enterotoxinogene umwandeln könnten [81].

Es ist bekannt, dass CPE die Darmschleimhaut schädigt. Die Zytotoxizitätskomponente greift die Zellen der Darmschleimhaut direkt an. Sie bildet einen Komplex in der Zellmembran, der möglicherweise einer Pore entspricht. Dies führt zur Erhöhung der Membranpermeabilität und damit zur Schädigung und zum Tod der Zelle. Weiterhin interagiert CPE mit Teilstrukturen der epithelialen „tight junctions“ und erhöht die Permeabilität der Zellzwischenräume, was zu Flüssigkeitsverlusten und damit zur Diarrhö führt [79].

Nicht-toxinogene *C. perfringens* Stämme kommen normalerweise in kleinen Mengen (bis zu 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Gramm Stuhl) in der physiologischen Darmflora vor. Über 10^6 *C. perfringens*-Sporen pro Gramm Stuhl können dagegen in Stühlen von Patienten mit *C. perfringens* assoziierter Diarrhö gefunden werden [82]. Der Anteil der CPE-positiven an allen *C. perfringens* Stämmen wird jedoch allgemein als niedrig eingeschätzt [83].

Das CPE wird nicht routinemäßig im Stuhllabor nachgewiesen. Frühere Studien haben jedoch gezeigt, dass dem Nachweis von *C. perfringens* bei AAD eine größere Bedeutung zugemessen werden sollte [12, 13, 26-31]. Der Nachweis von *C. perfringens* kann über kulturelle Anzucht erfolgen. Jedoch tragen nicht alle *C. perfringens* Stämme das CPE-Gen. Zum Nachweis des Toxins stehen der Vero-Zell-Zytotoxizitätsassay und ELISA zur Verfügung. Weiterhin besteht die Möglichkeit des Nachweises des CPE-Gens mittels PCR.

1.3 Stand der Forschung

1984 wurde erstmals CPE in Stühlen von Patienten mit AAD gefunden. Borriello et al. fanden CPE in *C. difficile*-Toxin A- und B-negativen Stühlen von 11 Patienten, die zuvor mit Antibiotika behandelt worden waren. Sämtliche Stuhlproben wiesen eine relativ große *C. perfringens*-Last ($>10^6$ KBE/g) auf [12]. Bei der durch *C. perfringens* ausgelösten AAD sind die Symptome stärker ausgeprägt und halten länger an als bei der durch *C. perfringens* ausgelösten Lebensmittel-abhängigen und sporadischen Diarrhöe [28]. Im Gegensatz zu *C. difficile* schien *C. perfringens* jedoch keine PMC zu verursachen [12].

Auch Samuel et al. fanden 1991 in einer Studie mit 721 untersuchten Stuhlproben 25 CPE-positive Proben, die im Vergleich zu einer CPE-negativen Kontrollgruppe eine relativ hohe Anzahl an *C. perfringens* ($>10^3$ KBE/g) enthielten. Die Studie zeigte außerdem eine klare Assoziation von *C. perfringens* Enterotoxin-assoziiierter Diarrhö und älteren, hospitalisierten Patienten [84].

1995 fanden Mpamugo et al. in 65 von 212 Stuhlproben von Patienten mit sporadischer Diarrhö CPE. Hiervon waren jedoch nur vier Patienten mit einer AAD assoziiert [29].

1997 wurde von Hancock et al. [85] eine Studie zur Ermittlung der Inzidenz von *C. perfringens* als Auslöser der AAD geplant. Hierbei handelte es sich um eine Fall-Kontroll-Studie, in der die Toxine von *C. difficile* und *C. perfringens* in Stuhlproben von Patienten mit Diarrhö und ohne Diarrhö unabhängig von einer vorangegangenen Antibiotikatherapie nachgewiesen wurden. CPE wurde in den Stühlen von 15 Patienten mit AAD (15,9%) und in keiner von Patienten ohne Diarrhö gefunden.

Im Gegensatz dazu ergab eine polnische Studie aus dem Jahr 2000, dass in 158 Stuhlproben von Patienten mit AAD zwar 21 Patienten *C. perfringens* Träger waren, CPE jedoch in keiner Stuhlprobe nachgewiesen werden konnte [86].

Bereits im Jahr 2001 wurde in unserem Institut eine Studie durchgeführt, bei der die Prävalenz von *C. difficile* und *C. perfringens* Toxinen ermittelt wurde. Hier lag die Prävalenz von CPE bei 6,4% [30]. In einer vergleichbaren Studie aus Großbritannien aus dem Jahr 2002 lag diese bei 8% [13].

Ackermann et al. [87] untersuchten von Juni 2002 bis April 2003 Stuhlproben von 89 Patienten, die an AAD erkrankt waren. Hiervon waren lediglich fünf Patienten *C. perfringens* Träger und eine Stuhlprobe CPE-positiv.

Bis heute wurde für die Diagnose einer durch CPE ausgelösten AAD kein Goldstandard definiert.

1.4 Fragestellung

Ein Ziel der vorliegenden prospektiven Studie war es, die Prävalenz von *C. difficile* und *C. perfringens* und deren Toxine in Stuhlproben von Patienten mit AAD zu ermitteln. Hierzu wurden sämtliche Stuhlproben untersucht, die dem Stuhllabor mit der Frage auf „*C. difficile*-Infektion“ zugesandt wurden. Ein weiteres Ziel war, einen schnell durchführbaren kommerziellen Test auf CPE für die Routinediagnostik zu evaluieren. Der Nachweis von *C. difficile* und dessen Toxinen A und B wurde deshalb mit Hilfe von kultureller Anzucht und ELISA durchgeführt. Der Nachweis von *C. perfringens* und dessen Enterotoxin erfolgte ebenfalls über kulturelle Anzucht und ELISA. Zur Bestätigung der Speziesdiagnose und des Toxinnachweises des verwendeten CPE-ELISA wurde zusätzlich eine PCR zum Nachweis des *C. perfringens*-Phospholipase C- und des CPE-Gens durchgeführt. Ergänzend wurden Daten zu Alter, Geschlecht und Antibiotikatherapie erhoben, um Risikofaktoren der untersuchten Patienten mit älteren Studien in der Literatur vergleichen zu können.