

## 4. Diskussion

Die Prävalenz von CDT in Stuhlproben von hospitalisierten Patienten mit AAD lag in der vorliegenden prospektiven Studie bei 11,4%. In bisherigen Studien lag der Anteil der auf *C. difficile*-Infektionen zurückzuführenden AAD-Fälle bei 10-20% [4], so dass die in unserer Studie ermittelte Prävalenz im unteren Bereich anzusiedeln ist. In einer vergleichbaren Studie aus Großbritannien lag die Prävalenz von *C. difficile*-Infektionen bei AAD bei 16% [13], in einer zuvor in unserem Institut durchgeführten Studie bei 6,4% [30]. In beiden Studien betrug die Zahl der untersuchten Stuhlproben etwa ein Drittel der jetzt untersuchten Proben.

Die Prävalenz von CPE lag überraschenderweise bei nur 0,14%. In unserer früheren Studie fanden Abrahao et al. unter Verwendung eines anderen kommerziell erhältlichen ELISA (TechLab) eine CPE-Prävalenz von 6,4% [30]. In der Studie aus Großbritannien lag die Prävalenz bei 8% [13]. Auch hier wurde der ELISA der Firma TechLab verwendet. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie aus Polen gar kein CPE nachgewiesen werden [86]. In einer neueren deutschen Studie aus dem Jahr 2005 lag die Prävalenz von CPE in einer Ausbruchssituation bei etwa 1% [87].

Die vorliegenden, im Vergleich zu anderen veröffentlichten Studien, niedrigen CPE-Prävalenzen könnten mehrere Erklärungen haben:

1. In der vorliegenden Studie wurde ein ELISA der Firma R-Biopharm verwendet. Die Sensitivität dieses ELISA könnte geringer sein als die des in den anderen vorliegenden Studien verwendeten ELISA der Firma TechLab. Dies könnte zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben. Die Verwendung des ELISA von R-Biopharm wurde gewählt, da der Test im Vergleich zu dem ELISA von TechLab schneller durchführbar und weniger aufwändig ist. In einer weiteren bislang unveröffentlichten Studie aus unserem Institut wurden die beiden ELISA von R-Biopharm und TechLab anhand von Stuhlproben hospitalisierter Patienten miteinander verglichen. Die Prävalenz lag in dieser Studie mit dem ELISA von TechLab höher als die mit dem ELISA von R-Biopharm. Die Auswertung der Ergebnisse steht noch aus. Es ist jedoch möglich, dass im ELISA von TechLab falsch positive bzw. im ELISA von R-Biopharm falsch negative Stuhlproben gefunden wurden.

2. Weiterhin könnte die Behandlung und Verarbeitung der Stuhlproben die Stabilität des CPE beeinflusst haben. Die Stuhlproben wurden in unserem Stuhllabor routinemäßig bearbeitet. Es ist somit nicht eruierbar, wie die Proben auf den verschiedenen Stationen vor dem Transport in unser Labor behandelt und gelagert wurden. Notermans et al. beschrieben jedoch 1984 während der Evaluierung eines ELISA zum Nachweis von CPE, dass das CPE über einen langen Zeitraum (>20 Tage) bei Raumtemperatur stabil bleibt [88]. In neueren Studien wurde jedoch belegt, dass die Plasmid-gebundenen CPE-Gene weitaus hitzelabiler als die chromosomal-kodierten sind [89]. Wiederholtes Auf- und Abtauen der einzigen im ELISA CPE-positiven Stuhlprobe sowie ihrer DNA-Isolate führte jedoch in der vorliegenden Studie zu keinem Aktivitätsverlust.
3. Die Menge des verwendeten Stuhls könnte sich ebenfalls auf die Sensitivität des ELISA ausgewirkt haben. Dies ist vor allem von Bedeutung, wenn die Stuhlproben am Ende des Verlaufes einer AAD entnommen wurden, da zumindest bei Lebensmittel-abhängigen Diarrhöen die CPE-Ausscheidung am Anfang der Erkrankung am höchsten ist [90].
4. Des Weiteren scheint CPE nicht gleichmäßig im Stuhl verteilt zu sein. Von drei Proben einer Patientin, die am selben Tag asserviert worden waren, war eine Probe in der PCR CPE-Gen-positiv, während die anderen beiden *C. perfringens* Kultur-positiv waren, das CPE-Gen per PCR jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Im ELISA waren alle drei Proben CPE-negativ. Wir vermuten, dass entweder die Menge an CPE im Stuhl für den Nachweis im ELISA zu gering war oder dass CPE sehr ungleichmäßig im Stuhl verteilt war. Falsch-negative Ergebnisse in der PCR sind eher unwahrscheinlich, da alle drei Proben im selben Durchlauf getestet wurden und neben der vorher beschriebenen CPE-positiven Stuhlprobe eine weitere im ELISA CPE-negative Stuhlprobe in der PCR als CPE-positiv indentifiziert werden konnte.
5. Die unterschiedlichen Prävalenzen in verschiedenen Studien könnten weiterhin auf regionale und saisonale Schwankungen sowie Ausbruchssituationen zurückzuführen sein [26, 91].

Um die Ergebnisse des ELISA zu bestätigen, wurden sämtliche 147 *C. perfringens* Kultur-Isolate in der PCR auf das Vorkommen des CPE-Gens getestet. In fünf Fällen konnte das CPE-Gen nachgewiesen werden, darunter die einzige CPE-ELISA-positive

Probe. Zusätzlich wurde in 4 ELISA-negativen Proben das CPE-Gen nachgewiesen. Dadurch erhöht sich die Prävalenz von 0,14 auf 0,72%. Zwei (40%) der CPE-Gen-positiven Proben konnten mittels PCR direkt aus den Stuhlproben bestätigt werden. Die im Vergleich zu anderen Studien geringe Prävalenz von CPE in der PCR könnte auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein.

Im menschlichen Darmtrakt können sowohl CPE-positive als auch -negative *C. perfringens* Stämme vorkommen. Das Verhältnis der CPE-positiven *C. perfringens* Stämme zu der gesamten *C. perfringens* Population ist hierbei jedoch gering [83]. Bei der Anzucht von *C. perfringens* auf Kulturmedien kommen deshalb sowohl CPE-positive als auch CPE-negative *C. perfringens* Stämme vor. Für die Subkultivierung könnten somit zufällig CPE-negative *C. perfringens* Stämme verwendet worden sein und dies somit in der Folge zu falsch negativen Testergebnissen geführt haben. Weiterhin könnten CPE-positive *C. perfringens* Stämme ihr CPE-Gen während des Subkultivierungsverfahrens verloren haben [92].

Die Diskrepanz der Häufigkeit des Nachweises von CPE aus Subkulturen und der direkt aus den Stuhlproben könnte dadurch erklärt werden, dass Bestandteile des Stuhls die PCR gehemmt haben könnten. In verschiedenen Studien wurde aufgezeigt, dass bestimmte Substanzen die PCR-Amplifikation inhibieren können. Dies wurde für Blut [93], saure Polysaccharide [94], Huminstoffe [95], Bohnensprossen-Homogenisate [96], Austern [96] und Weichkäse [97] beschrieben. In einer Studie aus dem Jahr 2000 wiesen Kim et al. nach, dass Kollagen, ein Bestandteil vieler Lebensmittel, die PCR-Amplifikation beim Nachweis von *C. perfringens* direkt aus Lebensmittelproben hemmen kann [98]. Es ist daher möglich, dass die PCR-Amplifikation in der vorliegenden Studie von Stuhlbestandteilen gehemmt wurde und daher nur 2 der CPE-positiven Proben mittels PCR direkt aus den Stuhlproben bestätigt werden konnten.

*C. perfringens* konnte fast doppelt so häufig angezüchtet werden wie *C. difficile*. 21,2% der Stuhlproben waren damit *C. perfringens* Kultur-positiv im Gegensatz zu 12,0% *C. difficile* Kultur-positiven. Dies könnte mit der Ubiquität des Vorkommens von *C. perfringens* erklärt werden und mit der Tatsache, dass *C. perfringens* bis zu 40% in der physiologischen Darmflora gesunder Individuen zu finden ist [30], und dass vor allem ältere Patienten *C. perfringens* in höheren Mengen im Intestinum tragen [99, 100].

1997 identifizierten Gilbert et al. ein bislang unbekanntes *C. perfringens* Toxin, das Beta2 Toxin (CPB2) [101]. In einer aktuellen Studie wurde dieses Toxin erstmals in Zusammenhang mit AAD und Sporadischer Diarrhö (SD) gebracht [102]. In mehr als 75% der CPE-positiven AAD/SD Fälle konnte CPB2 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass es sich bei dem CPB2 um ein weiteres Toxin bei der CPE-assoziierten AAD/SD handeln könnte. Weiterhin deutet die Studie auf das mögliche Vorkommen CPB2-positiver, CPE-negativer *C. perfringens* assoziierter AAD/SD hin, was auch die niedrige Prävalenz von CPE im Gegensatz zu der relativ hohen Prävalenz an *C. perfringens* in der vorliegenden Studie erklären würde.

Die Kriterien für die Diagnose AAD legten in der vorliegenden Studie die Ärzte auf den jeweiligen Stationen fest. Es wurden ausschließlich Stuhlproben untersucht, die mit der Fragestellung „*C. difficile*-Infektion“ eingesandt wurden. Möglicherweise wurden die Grenzen diagnostischer Kriterien für das Vorliegen einer AAD von den behandelnden Ärzten zu weit gesteckt. Dies könnte dazu geführt haben, dass Stuhlproben von Patienten untersucht wurden, die nicht an AAD erkrankt waren, was die niedrige Prävalenz von CDT und CPE verursacht haben könnte.

68,3% der untersuchten Patienten waren zuvor antimikrobiell behandelt worden. Besonders häufig wurden Fluorchinolone und Cephalosporine verabreicht. Diese beiden Substanzgruppen machten über die Hälfte der verabreichten Antibiotika aus. Cephalosporine gelten als Antibiotika, die besonders häufig AAD verursachen. Das Risiko, eine AAD auszulösen, wird für Cephalosporine mit bis zu 40% angegeben [103]. Auch Ampicillin, Amoxicillin und Clindamycin werden in der Literatur als sehr häufige Ursachen der AAD beschrieben [103]. In der vorliegenden Studie machten diese Antibiotika zusammen lediglich etwa 15% aus. Die niedrige Prävalenz könnte damit erklärt werden, dass durch verstärkte Aufklärung über Risikofaktoren der AAD der Einsatz dieser Antibiotika bereits eingeschränkt wurde. Dem widerspricht jedoch der hohe Verbrauch an Cephalosporinen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Cephalosporine eine eigene Substanzgruppe darstellen, wohingegen Ampicillin und Amoxicillin den Penicillinen als Substanzgruppe untergeordnet werden und Clindamycin der Gruppe der Lincosamine angehört. Der Wechsel zwischen Substanzgruppe und Wirkstoff bei der Angabe des Risikos, eine AAD auszulösen, zieht sich jedoch durch die

gesamte Literatur der AAD. Fluorchinolone besitzen ein mittelgradiges Risiko für die Auslösung einer AAD [103]. Sie wurden in der vorliegenden Studie in 33,0% der Fälle und damit am häufigsten gegeben.

Es wurden etwa gleich viele Patienten mit antimikrobiellen Einfach- oder Kombinationstherapien behandelt. Antibiotische Kombinationstherapien als Risikofaktor der AAD wurden daher in der vorliegenden Studie nicht bestätigt.

Drei (60%) der fünf CPE-Gen-positiven Stuhlproben in der PCR stammten von Patienten, die Antibiotika verabreicht bekommen hatten. Davon erhielten zwei eine Kombinationstherapie. Alle drei Patienten wurden mit Fluorchinolonen behandelt. Weiterführende Studien sollten klären, ob den Fluorchinolonen eine Rolle in der *C. perfringens*-abhängigen AAD beigemessen werden kann. Dies würde mit dem hohen Verbrauch an Fluorchinolonen in der gesamten Stichprobe korrelieren. Patienten, die eine Kombinationstherapie erhalten hatten, bekamen als zweites Antibiotikum Metronidazol. Es könnte sich bei den CPE-positiven *C. perfringens* Stämmen um Metronidazol-resistente Stämme handeln. 1999 wurde von Faris et al. [104] ein Metronidazol-resistenter *C. perfringens* Stamm in einer klinischen Probe gefunden. Bei Verdacht auf eine durch *C. perfringens* ausgelöste AAD sollte deshalb das Vorkommen von resistenten Stämmen bedacht werden. In der gesamten Stichprobe unserer Studie sowie in der Gruppe der CDT-positiven *C. difficile*-Träger lag der Anteil der Patienten, die Metronidazol erhalten hatten, unter 25%, also deutlich niedriger als in der Gruppe der CPE-positiven *C. perfringens*-Träger. Hierbei muss jedoch auch die geringe Anzahl der CPE-positiven Proben insgesamt berücksichtigt werden.

81,0% der CDT-positiven Stuhlproben stammten von Patienten, die zuvor eine Antibiotikatherapie erhalten hatten. Hiervon wurden jedoch nur 34,4% mit einer Kombinationstherapie behandelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen antimikrobieller Kombinations- und Monotherapie nachgewiesen werden. Antimikrobielle Kombinationstherapien als offensichtlicher Risikofaktor der CDAAD konnten in der vorliegenden Studie daher nicht bestätigt werden. Am häufigsten wurde in der Gruppe der CDT-positiven *C. difficile*-Träger Cephalosporine verabreicht. Beinahe genauso häufig wurden jedoch auch Fluorchinolone gegeben. Zusammen machten diese beiden Substanzgruppen fast 60% aus. Auch hieraus ergibt sich, dass den Fluorchinolonen eine größere Bedeutung als bislang angenommen bei der Auslösung einer AAD beigemessen werden sollte. Hier ist auch von Bedeutung, dass

die kürzlich in Nordamerika und Europa beschriebenen hypervirulenten *C. difficile*-Stämme unter anderem mit der Einnahme von Fluorchinolonen assoziiert wurden [105, 106]

Bei Patienten, die keine Antibiotika erhalten hatten und trotzdem *C. perfringens*- oder *C. difficile*-Träger waren, könnte dies auf eine Kreuzinfektion, d.h. eine Infektionskette von einem Infizierten auf einen anderen Patienten und von dort wieder zurück auf den ursprünglich Infizierten, zurückzuführen sein [26, 84]. Des Weiteren könnte eine Akkumulation der Erreger im Umfeld der Patienten zu einer Reinfektion oder Infektion von Mitpatienten geführt haben [26, 84] und es ist auch möglich, dass die vorangegangene Gabe eines Antibiotikums anamnestisch nicht eruierbar war.

Das Durchschnittsalter der Patienten der Stichprobe lag bei  $65 \pm 18,8$  Jahren. *C. perfringens* wie auch *C. difficile*-Träger waren durchschnittlich älter als die Patienten der gesamten Stichprobe ( $67 \pm 18,4$  respektive  $72 \pm 18,2$  Jahre). In der Literatur wurde ein Alter von  $>60$  Jahren als Risikofaktor beschrieben [47]. Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Auffallend war hierbei jedoch, dass die CPE-positiven *C. perfringens*-Träger durchschnittlich jünger waren ( $58 \pm 20,7$  Jahre) als der Rest der Stichprobe. In einer vergleichbaren Studie unseres Institutes lag das Durchschnittsalter der CPE-positiven Patienten bei 54,2 Jahren („Range“ 39-68 Jahre) [30]. Dies lässt vermuten, dass höheres Alter bei der *C. perfringens*-abhängigen AAD nicht zu den Risikofaktoren zählt.