

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***Clostridioides-difficile*-Isolate aus
Kindern im ersten Lebensjahr:
Typisierung, Antibiotikaempfindlichkeit
und Toxinexpression**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Karin Marie Theres Tilkorn

aus

Braunschweig

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas E. Zautner

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Hendrik Rosewich

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. Andreas E. Zautner

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. Hendrik Rosewich

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 01.03.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*Clostridioides-difficile*-Isolate aus Kindern im ersten Lebensjahr: Typisierung, Antibiotikaempfindlichkeit und Toxinexpression" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 12.02.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Tilkorn FKMT, Frickmann H, Simon IS, Schwanbeck J, Horn S, Zimmermann O, Groß U, Bohne W, Zautner AE (2020): Antimicrobial resistance patterns in *Clostridioides difficile* strains isolated from neonates in Germany. *Antibiotics (Basel)* 9, 481

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i>	1
1.2 Pathogenese	2
1.3 Epidemiologie.....	3
1.3.1 Phylogenetische Unterteilung von <i>C. difficile</i>	3
1.3.2 Die Ribotypen 027 und 176.....	4
1.3.3 Asymptomatische Besiedlung und Wege der Infektion	4
1.4 Diagnostik.....	5
1.5 Therapie.....	6
1.6 Antibiotikaresistenzen	7
1.7 <i>Clostridioides difficile</i> bei Kindern	8
1.8 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material.....	11
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Rekrutierung der Probanden und Isolierung von <i>Clostridioides difficile</i>	15
2.2.2 Kultivierung und Kryokonservierung von <i>Clostridioides difficile</i>	15
2.2.3 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeiten mittels E-Test.....	16
2.2.4 PCR-Nachweis von Toxingenen	16
2.2.5 Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen toxigener und nicht toxigener <i>C.-difficile</i> -Stämme in Abhängigkeit vom Vorliegen verschiedener Parameter	18
2.2.6 Speziesbestimmung und Typisierung von <i>Clostridioides-difficile</i> -Isolaten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	19
3 Ergebnisse	21
3.1 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit	22
3.2 Nachweis von Toxingenen	27
3.3 Typisierung von <i>Clostridioides-difficile</i> -Isolaten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
4 Diskussion.....	36
4.1 Vergleich mit anderen Studien an Kindern	36

4.1.1	Die Häufigkeit des Ribotyps 027	36
4.1.2	Antibiotikaresistenzen	37
4.1.3	Toxingene	39
4.2	Vergleich der Ergebnisse mit Studien an Erwachsenen	41
4.2.1	Die Prävalenz des Ribotyps 027	41
4.2.2	Antibiotikaresistenzen	42
4.2.3	Toxingene	44
4.3	Pathogenese und Bedeutung der <i>C.-difficile</i> -Besiedlung bei Neugeborenen und Säuglingen	46
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arbeitsablauf	21
Abbildung 2: Beispielbilder E-Test	22
Abbildung 3: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Metronidazol	23
Abbildung 4: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Vancomycin.....	23
Abbildung 5: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Erythromycin	24
Abbildung 6: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Moxifloxacin	24
Abbildung 7: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Rifampicin	25
Abbildung 8: Übersicht über mehrfach resistente Isolate.....	25
Abbildung 9: Teststämme.....	28
Abbildung 10: Exemplarische Ergebnisse.....	29
Abbildung 11: Übersicht über das Vorliegen von Toxingenen in zeitl. Verlauf....	33
Abbildung 12: Insulin-Peak	35
Abbildung 13: Peak-Shift	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	12
Tabelle 3: Chemikalien	13
Tabelle 4: Reagenzien, Enzyme & Puffer.....	13
Tabelle 5: Kits.....	14
Tabelle 6: Referenzstämme.....	14
Tabelle 7: Software	14
Tabelle 8: PCR-Protokoll.....	17
Tabelle 9: Verwendete Lösungen	20
Tabelle 10: Zeitlicher Verlauf der Antibiotikaempfindlichkeiten bei Kind 83	26
Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der Antibiotikaempfindlichkeit bei Kind 300	27
Tabelle 12: Übersicht über Verteilung toxischer und nicht toxischer Isolate.....	30
Tabelle 13: Vergleich der Testmethoden	31

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BTS	<i>Biotyper Test Standard</i>
CDI	<i>Clostridioides-difficile</i> -Infektion
CDT	<i>Clostridioides-difficile</i> -Toxin (binär)
<i>cdtA</i>	Gen für die enzymatische Komponente des binären Toxins
<i>cdtB</i>	Gen für die Bindungskomponente des binären Toxins
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTNA	<i>cytotoxin neutralization assay</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIN	Deutsches Institut für Normierung
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GDH-EIA	Glutamat-Dehydrogenase-Enzymimmunoassay
GTP	Guanosintriphosphat
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
ISR	<i>Intergenic spacer regions</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NAAT	Nukleinsäure-Amplifikationstest
PaLoc	<i>pathogenicity locus</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RT	Ribotyp
SHEA	Society for Healthcare Epidemiology of America
<i>tcdA</i>	Gen für Toxin A von <i>Clostridioides difficile</i>
<i>tcdB</i>	Gen für Toxin B von <i>Clostridioides difficile</i>
<i>tcdC</i>	Inhibierendes Regulatorgen
<i>tcdE</i>	Gen für die extrazelluläre Freisetzung der Toxine
<i>tcdR</i>	Aktivierendes Regulatorgen
TFA	Trifluoressigsäure

1 Einleitung

1.1 *Clostridioides (Clostridium) difficile*

Clostridioides difficile ist ein Gram-positives, obligat anaerob wachsendes, sporenbildendes Stäbchenbakterium, das erstmals 1935 im Stuhl von gesunden Neugeborenen nachgewiesen und 1977 erstmalig mit Antibiotika-assoziiierter pseudomembranöser Kolitis in Verbindung gebracht wurde (Hall 1935; Bartlett *et al.* 1977). 2016 wurde *Clostridium difficile* offiziell zu *Clostridioides (C.) difficile* umbenannt, da im Rahmen der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens starke genetische Unterschiede zu der Gattung *Clostridium sensu stricto* auffielen (Lawson *et al.* 2016).

C. difficile ist der häufigste Erreger nosokomialer Durchfallerkrankungen in Europa und den USA. Eine 2011 in den USA durchgeführte Studie ergab, dass es alleine in diesem Jahr zu 453.000 *C.-difficile*-Infektionen (CDI) und zu 29.000 durch diesen Erreger verursachten Todesfällen kam (Lessa *et al.* 2015). Die den Gesundheitssystemen durch CDI entstehenden Kosten werden auf jährlich ca. 4,8 Milliarden Dollar in den USA und ca. drei Milliarden Dollar in Europa geschätzt (Kuijper *et al.* 2006; Dubberke und Olsen 2012). Eine Infektion mit *C. difficile* tritt vor allem nach Gabe von Antibiotika auf, da diese häufig die physiologische Zusammensetzung der Darmflora stören und somit das Wachstum von *C. difficile* begünstigen. Vor allem Fluorchinolone, Cephalosporine, Clindamycin sowie Amoxicillin/Clavulansäure werden mit dem Auftreten von CDIs assoziiert (Hensgens *et al.* 2012). Neben der Gabe von Antibiotika sind auch die Einnahme von Magensäureblockern wie Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) und Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten (Tleyjeh *et al.* 2012; Arriola *et al.* 2016; Trifan *et al.* 2017), der Aufenthalt in Krankenhäusern und Pflegeheimen (Garg *et al.* 2013; Crobach *et al.* 2018), Immunsuppression (Lübbert *et al.* 2013) und ein Alter von über 65 Jahren (Curry 2017) als Risikofaktoren für eine CDI anzusehen. Darüber hinaus sind auch Menschen mit Komorbiditäten wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Hourigan *et al.* 2014), Krebserkrankungen, Organ- und Rückenmarkstransplantationen (Cózar-Llistó *et al.* 2016) und chronischer Niereninsuffizienz (Keddis *et al.* 2012) vermehrt von der Infektion betroffen.

Die Symptome der CDI reichen von leichtem, wässrigem Durchfall bis hin zu schweren Verlaufsformen infolge derer es zu pseudomembranöser Kolitis, toxischem Megakolon, Ileus, Darmperforationen und Sepsis kommen kann. Systemisch kommt es darüber hinaus häufig zu subfebrilen Temperaturen, Leukozytosen und erhöhten Serumkreatinin-Werten,

bei schwereren Verläufen treten auch Fieber und Hypalbuminämien auf (Lübbert *et al.* 2014; Knight *et al.* 2015).

1.2 Pathogenese

Die Infektion mit *C. difficile* erfolgt fäkal-oral durch die Aufnahme von Sporen, welche resistent gegenüber äußeren Einflüssen wie starker Hitze, Sauerstoff und Desinfektionsmitteln sind. Sie finden sich im Erdboden und im Tierreich, vor allem aber auf Oberflächen in Einrichtungen wie Krankenhäusern und Pflegeheimen (Noor und Krilov 2018). Liegt eine physiologische Zusammensetzung der Darmflora (Mikrobiom) vor, unterbindet diese eine Ausbreitung des Erregers im Dickdarm, sowie die Umwandlung der Sporen in vegetative, Toxin-produzierende Wachstumsformen. Ist das Mikrobiom jedoch beispielsweise aufgrund der Einnahme von Antibiotika gestört oder der pH-Wert im Magen durch die Einnahme von Magensäureblockern erhöht, begünstigt dies eine Infektion. Weitere begünstigende Faktoren für das Auftreten einer CDI sind das Ausbleiben der Bildung von Antikörpern, sowie ein aus der Antibiotikagabe resultierender vermehrter Anfall primärer Gallensäuren. Im Gegensatz zu sekundären Gallensäuren, welche die Umwandlung der Sporen zu vegetativen Wachstumsformen inhibieren, fördern die primären Gallensäure diese (Kyne *et al.* 2001; Di Bella *et al.* 2016). Für das Krankheitsbild der CDI verantwortlich sind vor allem die Toxine A und B, deren Gene (*tcdA* und *tcdB*) auf dem sogenannten *pathogenicity locus* (PaLoc) der DNA des Bakteriums liegen. Neben diesen Genen liegen hier auch ein positives Regulatorgen (*tcdR*), ein inhibierendes Regulatorgen (*tcdC*) und ein für die extrazelluläre Freisetzung der Toxine zuständiges Gen (*tcdE*) (Govind und Dupuy 2012; Di Bella *et al.* 2016). Bei den Toxinen A und B handelt es sich um Glykosyltransferasen. Sie binden an Oberflächenrezeptoren der intestinalen Epithelzellen und gelangen über Rezeptor-vermittelte Endozytose ins Zellinnere. Dort inaktivieren sie durch Glykosylierung Rho-GTPasen, welche an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind. Infolge dessen kommt es durch die Deformierung der Zellen und durch die Schädigung von *Tight junctions* zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte. Darüber hinaus führt die Inaktivierung der Rho-GTPasen zu einer vermehrten Bildung von pro-apoptotischen Faktoren und hierdurch zum Zelltod. Außerdem werden bei Anwesenheit der Toxine vermehrt proinflammatorische Mediatoren und Zytokine produziert, die eine Entzündungsreaktion induzieren, welche ebenfalls die Barrierefunktion der Epithelzellschicht des Kolons negativ beeinflusst und zur Nekrose von Zellen führt (Di Bella

et al. 2016). Die hierdurch entstehende erhöhte Permeabilität bedingt eine Flüssigkeitssekretion ins Lumen des Kolons, infolge derer es zum für die CDI typischen Durchfall kommt. Im Falle der ebenfalls regelmäßig im Rahmen einer CDI auftretenden pseudomembranösen Kolitis, kommt es darüber hinaus zu einer Exsudation von Fibrin, Muzinen, Leukozyten und Zelldetritus, welche sich auf der Innenseite der Kolonwände ablagern und so ein membranähnliches Erscheinungsbild erzeugen (Chandrasekaran und Lacy 2017). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass sowohl Toxin A, als auch Toxin B alleine die typischen Symptome einer CDI hervorrufen können, Toxin B jedoch potenter zu sein scheint (Riegler *et al.* 1995; Chaves-Olarte *et al.* 1997; Carter *et al.* 2015). Neben den Toxinen A und B exprimieren manche *C.-difficile*-Stämme ein weiteres Toxin, das sogenannte binäre Toxin (CDT). Bei diesem Toxin handelt es sich um eine ADP Ribosyltransferase, bestehend aus einer enzymatischen Komponente (*cdtA*) und einer Bindungskomponente (*cdtB*). Die Relevanz und Funktion des binären Toxins ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch scheint dieses die bakterielle Adhärenz zum Intestinalepithel zu erhöhen (Schwan *et al.* 2009). *C.-difficile*-Stämme, die keines der drei Toxine exprimieren, sind apathogen (Lübbert *et al.* 2014).

1.3 Epidemiologie

1.3.1 Phylogenetische Unterteilung von *C. difficile*

Die mikrobielle Art *C. difficile* kann in mindestens sechs phylogenetische Kladen unterteilt werden. Neuere Untersuchungen weisen darüber hinaus auf das Vorhandensein zweier weiterer Kladen hin (Elliott *et al.* 2017). Darüber hinaus lassen sich *C.-difficile*-Stämme in Ribotypen aufteilen. Diese werden mithilfe einer PCR ermittelt, im Rahmen derer die Unterschiede der „*intergenic spacer regions*“ (ISR), die zwischen den Genen der 16S und der 23S rRNA liegen, untersucht werden (Knight *et al.* 2015). Die verschiedenen Ribotypen (RT) weisen eine starke genetische Heterogenität auf. Diese Heterogenität geht unter anderem mit einer unterschiedlichen Virulenz und mit einem unterschiedlichen Potenzial Ausbrüche zu verursachen einher. Zu den epidemiologisch bedeutsamen bzw. mit einer erhöhten Virulenz in Verbindung gebrachten Ribotypen gehören beispielsweise RT 027 und RT 176. Von diesen wird vor allem der Ribotyp 027 für eine große Zahl schwerer Verläufe und Ausbrüche in den letzten Jahren in Europa und Nordamerika verantwortlich gemacht (Bauer *et al.* 2011; Berger *et al.* 2017).

1.3.2 Die Ribotypen 027 und 176

Zu Beginn der 2000er Jahre kam es zunächst in Kanada und den USA, später auch in Europa und Asien, zu einem ausbruchsartigen Auftreten des Ribotyps 027 (Clements *et al.* 2010). In Deutschland wurde er zum ersten Mal 2007 in Trier beschrieben, 2013 war er mit einer Prävalenz von 19 % der häufigste in Europa auftretende Ribotyp und 2017 für 21 % der *C. difficile*-Infektionen am Universitätsklinikum Köln verantwortlich (Zaiss *et al.* 2007; Davies *et al.* 2016; Piepenbrock *et al.* 2019). Laut verschiedener Studien gehen Infektionen mit diesem Ribotyp mit besonders schweren Krankheitsverläufen und erhöhter Mortalität einher (Pepin 2004). Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen exprimiert der RT 027 neben den Toxinen A und B das sogenannte binäre Toxin (siehe 1.2) (Schwan *et al.* 2009). Darüber hinaus liegen in dem negativen Regulatorgen *tcdC* Mutationen vor, deren Auswirkung zunächst mit einer vermehrten Expression der Toxine A und B in Verbindung gebracht wurde, was spätere Studien jedoch widerlegten (Warny *et al.* 2005; Curry *et al.* 2007; Cartman *et al.* 2012). Unabhängig davon wurde eine erhöhte Zytotoxizität des Toxins B im Gegensatz zu der anderer Ribotypen nachgewiesen (Lanis *et al.* 2010). Als ein weiterer Grund für die möglicherweise erhöhte Pathogenität wird eine fast immer vorliegende Resistenz gegen Fluorchinolone angegeben (Loo *et al.* 2005). Eine zunehmende Zahl an Studien stellt allerdings den direkten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des Ribotyps 027 und der Schwere der Krankheitsverläufe in Frage (Cloud *et al.* 2009; Walk *et al.* 2012). Genau wie der Ribotyp 027 exprimiert auch der Ribotyp 176 neben den Toxinen A und B das binäre Toxin und wird mit einem erhöhten Potential in Verbindung gebracht, CDI Ausbrüche zu verursachen. Während dieser Ribotyp in Deutschland relativ selten zu finden ist, wurde er vor allem in Polen und Tschechien vermehrt im Rahmen von CDI Ausbrüchen nachgewiesen (Krutova *et al.* 2014a; Obuch-Woszczatyński *et al.* 2014). Aufgrund seiner genetischen Ähnlichkeit zum RT 027 ist der RT 176 mit den gängigen molekularbiologischen Methoden zum Teil nur schwer von ersterem zu unterscheiden (Krutova *et al.* 2014b).

1.3.3 Asymptomatische Besiedlung und Wege der Infektion

Wie bereits eingangs beschrieben, ist *C. difficile* der häufigste Erreger nosokomialer Durchfallerkrankungen in Europa und den USA (siehe 1.1). Die CDI wurde lange als vorwiegend nosokomial erworbene Infektion eingeordnet, verschiedene Studien zeigen jedoch, dass es auch im ambulanten Umfeld zunehmend zu Infektionen kommt (Wilcox *et al.* 2008; Khanna *et al.* 2012).

Neben den symptomatischen Infektionen können jedoch auch asymptomatische Besiedlungen mit *C. difficile* vorliegen. Um eine asymptomatische Besiedlung handelt es sich, wenn *C. difficile* oder seine Toxine im Stuhl nachgewiesen werden können, es jedoch nicht zu Durchfall kommt und keine endoskopischen oder histopathologischen Hinweise auf eine pseudomembranöse Kolitis vorliegen (Furuya-Kanamori *et al.* 2015). Laut verschiedener Studien liegt eine solche asymptomatische Besiedlung bei 0-17.5 % der gesunden Erwachsenen vor (Viscidi *et al.* 1981; Kobayashi 1983; Aronsson *et al.* 1985; Kato *et al.* 2001; Ozaki 2004; Arvand *et al.* 2012; Stojanović *et al.* 2012; Terveer *et al.* 2017). In Alten- und Pflegeheimen liegt die Zahl der Personen mit einer asymptomatischen Besiedlung bei 0-51 %, bei stationären Patienten bei 4-29 % und bei Angestellten im Gesundheitswesen bei 0-13 % (Riggs *et al.* 2007; Arvand *et al.* 2012; Furuya-Kanamori *et al.* 2015; Campbell *et al.* 2019). Der Zusammenhang zwischen asymptomatischer Besiedlung und der Entwicklung einer CDI sind bisher nicht vollständig geklärt.

1.4 Diagnostik

Eine Untersuchung auf das Vorliegen von *C. difficile* wird empfohlen, wenn Patienten im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes Durchfall entwickeln, sowie wenn andere Gründe, wie zum Beispiel eine enterale Ernährung und das Vorliegen anderer Durchfallerreger ausgeschlossen wurde (Guery *et al.* 2019). Aufgrund steigender Zahlen ambulant erworbener CDIs sollten symptomatische Patienten auch außerhalb von Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen auf *C. difficile* untersucht werden (Khanna *et al.* 2012).

Es existieren verschiedene Testmöglichkeiten um eine CDI nachzuweisen. Zum einen gibt es den Glutamat-Dehydrogenase-Enzymimmunoassay (GDH-EIA), welcher die von allen *C.-difficile*-Stämmen exprimierte Glutamatdehydrogenase nachweist. Darüber hinaus existieren Nukleinsäure-Amplifikationstests (NAAT), welche mithilfe einer PCR bestimmte Genregionen von *C. difficile* erkennen. Diese Tests weisen jeweils eine hohe Sensitivität auf, lassen aber keine zuverlässige Unterscheidung zwischen toxischen und nicht toxischen Stämmen zu (Guery *et al.* 2019). Neben diesen Untersuchungen gibt es Toxin A- und B Enzymimmunoassays, sowie Zellkultur Zytotoxizitätstests (*cyotoxin neutralisation assay*, CTNA), die das Vorliegen der Toxine nachweisen. Diese Tests sind weniger sensitiv für das generelle Vorliegen von *C. difficile*, weisen jedoch die Toxine, deren Vorliegen stark mit einer CDI assoziiert ist, zuverlässig nach (Planche *et al.* 2013; Guery *et al.* 2019). Aus diesem Grund empfiehlt die Europäische Gesellschaft für Klinische Mikrobiologie und

Infektionskrankheiten (ESCMID) bei der Diagnostik eine mehrstufige Vorgehensweise. Zunächst sollte mit dem GDH-EIA oder dem NAAT das Vorliegen von *C. difficile* nachgewiesen und im Anschluss mittels eines Toxin A/B-Immunoassays die Expression von Toxinen untersucht werden (Crobach *et al.* 2018). Fällt der erste Test positiv und der zweite Test negativ aus, können zusätzlich ein NAAT (wenn der erste Test ein GDH-EIA war) oder eine toxische Kultur durchgeführt werden. Bei letzterer handelt es sich um eine Kultivierung der Probe auf Spezialmedien mit anschließender Identifikation des Erregers mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie, sowie einer Untersuchung des Kulturüberstands auf Toxine. Die toxische Kultur gilt als Referenzmethode zum Nachweis einer CDI und ist Voraussetzung für Antibiotikaresistenztestungen und Ribotypisierungen, hat jedoch aufgrund langer Inkubationszeiten eine eingeschränkte Bedeutung für die Akutdiagnostik (Lübbert *et al.* 2014).

Eine erneute Untersuchung des Stuhls im Anschluss an eine Therapie wird nicht empfohlen, da *C. difficile* bei bis zu 56 % der Patienten eine bis vier Wochen nach Beendigung dieser und trotz fehlender Symptome noch nachweisbar ist (Sethi *et al.* 2010).

1.5 Therapie

Wurde eine CDI nachgewiesen, sollten nach Möglichkeit zunächst die auslösenden Antibiotika abgesetzt und auf eine ausreichende Substitution mit Flüssigkeit und Elektrolyten geachtet werden. Darüber hinaus sollte aufgrund der Gefahr der Entwicklung eines toxischen Megakolons auf die Gabe von Motilitätshemmern und Opiaten verzichtet werden. Die weitere Therapie ist abhängig vom Risikoprofil des Patienten. Ist das Krankheitsbild nur leicht ausgeprägt und liegen keine Risikofaktoren für den Verlauf einer schweren oder rezidivierenden Infektion vor, kann auf eine spezifische Therapie verzichtet werden. Liegen eine leichte bis moderate Krankheitsausprägung und keine Risikofaktoren vor, empfehlen die deutschen Leitlinien eine Therapie mit Metronidazol, bei schwerem Krankheitsverlauf oder dem Vorliegen von Risikofaktoren für einen solchen, eine Gabe von Vancomycin. Generell sollten beide Antibiotika *per os* verabreicht werden. Sollte dies nicht möglich sein oder eine schwere Motilitätsstörung vorliegen, kann Metronidazol, nicht aber Vancomycin, auch auf parenteralem Weg verabreicht werden. Im Falle einer signifikanten Kolondilatation oder eines (Sub-) Ileus ist auch eine Kombinationstherapie mit Metronidazol und Vancomycin möglich. Das Vorliegen einer Darmperforation, eines therapierefraktären Ileus, eines akuten Abdomens, eines toxischen Megakolons oder eines signifikanten

Laktatanstiegs stellen die Indikation für einen chirurgischen Eingriff. Kommt es zu einem ersten Rezidiv, sollte die gleiche Therapie durchgeführt werden, wie bei einer Ersterkrankung, alternativ kann in diesem Fall auch Fidaxomicin verabreicht werden. Im Falle von zwei oder mehr Rezidiven wird die Therapie mit einem Vancomycin-Ausschleich bzw. Puls-Schema oder mit Fidaxomicin empfohlen, bei multiplen Rezidiven kann auch ein fäkaler Mikrobiomtransfer durchgeführt werden (Leitlinien Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple 2015).

Im Gegensatz zu den deutschen Leitlinien empfehlen die US-amerikanischen Leitlinien von IDSA (Infectious Diseases Society of America) and SHEA (Society for Healthcare Epidemiology of America) seit 2018 Vancomycin als Mittel der ersten Wahl bei leichten Erstinfektionen, sowie bei einem erstmalig auftretenden Rezidiv (Lübbert *et al.* 2018).

Neben den momentan in den Leitlinien empfohlenen Therapien existieren weitere Behandlungsoptionen, wie die Gabe von Antibiotika aus der Klasse der Rifamycine (wie z.B. Rifampicin), Fusidinsäure oder Teicoplanin, für die es weniger Erfahrungswerte gibt (Lübbert *et al.* 2014). Darüber hinaus werden aktuell weitere Medikamente in verschiedenen Studien getestet. Dazu gehören die Antibiotika Cadazolid, Ridinilazol und Surotomycin, die im Rahmen erster Studien eine mit Vancomycin vergleichbare Wirksamkeit zeigten. Die Gabe von Cadazolid und Ridinilazol hatte außerdem ein reduziertes Auftreten von Rezidiven zur Folge (Louie *et al.* 2015; Daley *et al.* 2017; Vickers *et al.* 2017). Darüber hinaus werden derzeit ein monoklonaler Antikörper namens Bezlotoxumab, der das Toxin B neutralisiert, sowie Impfungen in Studien getestet (Greenberg *et al.* 2012; Wilcox *et al.* 2017).

1.6 Antibiotikaresistenzen

Resistenzen gegen die vornehmlich in der Therapie der CDI verwendeten Antibiotika Vancomycin und Metronidazol kommen bisher relativ selten vor. So zeigten Studien in Europa bei 0,11 % der untersuchten Stämme eine Resistenz gegen Metronidazol und 2,29 % eine Resistenz gegen Vancomycin (Freeman *et al.* 2015). Studien außerhalb Europas zeigten jedoch bereits einen deutlich größeren Anteil an Resistenzen. So wurden z.B. in einer chinesischen Studie 15,6 % gegen Metronidazol resistente Stämme und in einer US-amerikanischen Studie 17,9 % gegen Vancomycin resistente Stämme gefunden (Snydman *et al.* 2015; Jin *et al.* 2017).

Darüber hinaus ist bekannt, dass *C. difficile* in vielen Fällen gegen Antibiotika resistent ist, die regelmäßig zur Behandlung anderer bakterieller Infektionen eingesetzt werden. Zu

diesen gehören Aminoglykoside, Lincomycin, Tetracycline, Erythromycin, Clindamycin, Penicilline, Cephalosporine und Fluorchinolone (Spigaglia *et al.* 2011; Peng *et al.* 2017). Diese Resistenzen sind nicht nur relevant, da sie das (wiederholte) Auftreten einer CDI begünstigen, sondern man auch davon ausgeht, dass beispielsweise der häufige Gebrauch von Fluorchinolonen maßgeblich zur Ausbreitung des gegen diese Antibiotikaklasse resistenten Ribotyps 027 beigetragen hat (He *et al.* 2013).

1.7 *Clostridioides difficile* bei Kindern

Die Rolle von *C. difficile* im Kindesalter ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Dies ist vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass Kinder im Alter von bis zu zwei Jahren im Gegensatz zu Erwachsenen deutlich häufiger asymptomatische Träger des Bakteriums sind. So zeigten Studien an Neugeborenen unter einem Monat bei 25-90 % der untersuchten Kinder eine Besiedlung mit *C. difficile* (Bolton *et al.* 1984; Penders *et al.* 2006; Jangi und Lamont 2010; Rousseau *et al.* 2011a; Al-Jumaili *et al.*). Im Alter von einem bis sechs Monaten wurde bei 30 % der Kinder *C. difficile* nachgewiesen, im Alter von sechs bis zwölf Monaten bei 14 % und im Alter von über einem Jahr bei 10 %. Bei zwei- bis dreijährigen Kindern nähert sich die Häufigkeit der Besiedlung der bei gesunden Erwachsenen vorliegenden an (Jangi und Lamont 2010). Für diese asymptomatische Besiedlung sind sowohl toxische, als auch nicht toxische Stämme verantwortlich (Delmée *et al.* 1988; Rousseau *et al.* 2012). Die Besiedlung mit toxischen Stämmen ist mit einer Bildung von Antikörpern gegen die Toxine A und B assoziiert. Zu welchem Ausmaß die frühkindliche Besiedlung so zu einem Schutz vor später im Leben auftretenden Infektionen führt, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung (Kocielek *et al.* 2019).

Aufgrund der häufigen Besiedlung des kindlichen Darms mit *C. difficile* kommt es bei der Diagnostik von Durchfällen bei Kindern unter zwei Jahren mitunter zu Schwierigkeiten. Da der Erreger bei einem großen Anteil der Kinder physiologischer Weise vorkommt, ohne Symptome hervorzurufen, ist das alleinige Vorliegen von *C. difficile* und Durchfall in diesen Fällen als diagnostisches Kriterium für eine CDI umstritten. Der Untersuchung auf andere Durchfallursachen kommt daher eine verstärkte Bedeutung zu (Faust *et al.* 2015). Die deutschen Leitlinien empfehlen deshalb bei Säuglingen nur beim Vorliegen von Morbus Hirschsprung oder anderer Motilitätsstörungen einen Test auf *C. difficile* durchzuführen. Bei älteren Kindern soll dieser Test nur nach Ausschluss anderer Durchfallursachen, sowie beim Vorliegen von Risikofaktoren, wie der Einnahme von Antibiotika, einem vorangegangenen

chirurgischen Eingriff oder dem Vorliegen prädisponierender Grunderkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Immundefekten durchgeführt werden (Leitlinie: Akute infektiöse Gastroenteritis im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter 2019). Den deutschen Leitlinien ähnelnd empfiehlt die IDSA (Infectious Diseases Society of America) kein Testen auf *C. difficile* bei Kindern unter einem Jahr. Bei Kindern zwischen einem und zwei Jahren wird ein Test nur nach Ausschluss anderer Durchfallursachen, bei Kindern über zwei Jahren nur bei anhaltendem oder sich verschlimmernden Durchfall oder dem Vorliegen von Risikofaktoren oder Grunderkrankungen empfohlen (Campbell *et al.* 2019). Der Grund hierfür ist, dass *C. difficile* mit besonders schwer verlaufenden Kolitiden bei Morbus Hirschsprung, sowie mit Exazerbationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert zu sein scheint (Martinelli *et al.* 2014; Mc Laughlin *et al.* 2014). Die Häufigkeit des Auftretens von CDIs bei Kindern unter einem Jahr hingegen ist aufgrund oben genannter Gründe stark umstritten. Während einige Studien zeigen, dass diese Kinder selten bis nie eine CDI entwickeln (Sherertz und Sarubbi 1982; Bolton *et al.* 1984; Redelings *et al.* 2007), sprechen andere von einem Auftreten bei 26 % der unter einem Jahr alten Kinder mit Durchfall (Kim *et al.* 2008) und sogar steigenden Prävalenzen von CDIs innerhalb der letzten Jahre (Zilberberg *et al.* 2008). Bei Kindern im Alter von 3-18 Jahren wurde eine ähnliche Verteilung von asymptomatischen und symptomatischen Trägern wie bei gesunden Erwachsenen gefunden (McFarland *et al.* 2000). Auch das Auftreten des Ribotyps 027 bei Kindern ist umstritten. So wurden im Rahmen einer 2006 bis 2007 durchgeführten Studie in den USA bei ca. 20 % der Kinder, bei denen *C. difficile* nachgewiesen wurde, der Ribotyp 027 gefunden (Toltzis *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu fanden andere Studien keine Proben bei Kindern, die den Ribotyp 027 enthielten (Rousseau *et al.* 2012; Stoesser *et al.* 2013). Jedoch ist hierbei zu beachten, dass das Alter der Kinder in den Studien nicht einheitlich war.

Da die Aussagekraft des Nachweises von *C. difficile* bei Kindern unter drei Jahren als unklar eingestuft wird, soll hier laut deutscher Leitlinie im Regelfall keine Therapie erfolgen. Die Empfehlungen zur medikamentösen Behandlung von sichergestellten CDIs bei Kindern ähneln denen der deutschen Leitlinien für Erwachsene. Bei einer ersten, unkomplizierten Infektion wird die Gabe von Metronidazol oder Vancomycin empfohlen, bei mehrfachen Rezidiven ggf. eine zusätzliche Gabe von Rifaximin oder Fidaxomicin, wobei für letztere bisher nur wenig Daten vorliegen (Campbell *et al.* 2019).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits beschrieben, ist die Rolle von *C. difficile* im Kindesalter sehr umstritten und im Vergleich zur Auswirkung des Erregers auf Erwachsene wenig erforscht. Insbesondere herrscht Uneinigkeit über die Bedeutung der Besiedlung mit *C. difficile* und möglicher Zusammenhänge mit Infektionen bei Neugeborenen und Säuglingen sowie im späteren Leben. Darüber hinaus gibt es für diese Altersgruppe speziell aus Deutschland wenig aktuelle Informationen über die Epidemiologie der Besiedlung und der Infektion mit *C. difficile* sowie über die Charakteristika der bei Kindern dieses Alters vorliegenden Stämme. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen Studie „Einflussfaktoren auf die Kolonisierung von *Clostridium difficile* bei Neugeborenen und Säuglingen - eine epidemiologische Studie“ unter Verwendung von Stuhlproben aus Krankenhäusern in Göttingen und Darmstadt die Epidemiologie des Erregers bei Kindern im ersten Lebensjahr untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die *C. difficile* positiven Isolate hinsichtlich bestimmter Charakteristika zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden zum einen die Resistenzraten für die in der Therapie regelhaft verwendeten Antibiotika Vancomycin und Metronidazol sowie für Erythromycin, Moxifloxacin und Rifampicin betrachtet. Außerdem wird mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie das mögliche Vorliegen des Ribotyps 027 (und des nahe verwandten Ribotyps 176) getestet. Darüber hinaus wird das Vorhandensein der Gene für die Toxine A, B und das binäre Toxin untersucht. Unter Verwendung der in der vorangegangenen Studie gesammelten Daten über das Lebensumfeld der Kinder können anschließend Rückschlüsse auf eventuelle Zusammenhänge zwischen diesem und der Expression von Toxinen gezogen werden. All diese Informationen zusammenführend, soll die Arbeit die epidemiologischen Erkenntnisse aus der oben erwähnten, vorangegangenen Studie dieses Instituts um das Wissen über die Charakteristika der *C. difficile* positiven Isolate erweitern. Indem die Ergebnisse darüber hinaus mit denen anderer Studien an Kindern sowie mit Studien an Erwachsenen verglichen werden, soll die Arbeit dabei helfen, mögliche Veränderungen und regionale Unterschiede der Eigenschaften von *C.-difficile*-Stämmen bei Neugeborenen und Säuglingen zu erkennen und gegebenenfalls vorliegende Unterschiede zur Erwachsenenpopulation aufzudecken. Zusammenfassend hat diese Arbeit folglich zum Ziel, zum Verständnis der Bedeutung von *C. difficile* bei Neugeborenen und Säuglingen beizutragen, sowie einen Beitrag zum Wissen über die unterschiedlichen Rollen des Erregers bei Kindern dieser Altersgruppe und Erwachsenen zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Geräte

Material	Hersteller
Anaerobentöpfe: Anaerocult®	Merck, Darmstadt
Anaerobes Zelt: Anaerobic Chamber Type A Vinyl	Coy Laboratory Products, Grass Lake, Michigan, USA
DNA/RNA-Aufreinigungsmaschine: Magna Pure LC 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Horizontalschüttler: Duomax 1030	Heidolf Instruments, Schwabach
Hybridisierungsöfen: Biometra OV5	Biometra, Göttingen
Inkubator: Heraeus	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Kamera: Canon EOS 40D	Canon Deutschland, Krefeld
Objektiv: Sigma 50 mm 1:2,8 DG Makro	
MALDI-TOF-Massenspektrometer: autoflex III smart beam	Bruker Daltonics, Bremen
Pasteur-Pipetten 10 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipetten: Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Real-Time-PCR-Cycler: LightCycler® 480 II	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim
Target: MSP 96 Target polished steel BC	Bruker Daltronics, Bremen
Thermocycler: T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermometer: Digitales Einstichthermometer	TFA Dostmann, Wertheim-Reicholzheim
Vortexmischer: Vortex Genie	Bender & Hobein, Ulm

Material	Hersteller
Wasserbad: GFL	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Anaerobier- Beutel: Genbox anaer	BioMérieux Deutschland, Nürtingen
Chromogene Platten: chromID®C.difficile	bioMérieux Deutschland, Nürtingen
COS-Platten (Columbia agar + 5 % Schafsblut)	bioMérieux Deutschland, Nürtingen
Falcon 15 ml & 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe: Star Guard Touch	STARLAB International GmbH Deutschland, Hamburg
Impfschlingen 10 µl und 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Labortücher: Kimerbly-Clark Kimtech Science	Kimberly- Clark GmbH, Koblenz
Messküvetten Photometer: Halb-Mikro Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
MHF-Platten (Müller Hinton agar+ 5 % Pferdeblut+ 20 mg/l β-NAD)	BioMérieux Deutschland, Nürtingen
MHK-Teststreifen: MIC Test Strip Erythromycin	Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italien
MHK -Teststreifen: MIC Test Strip Vancomycin	Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italien
MHK-Teststreifen: MIC Test Strip Moxifloxacin	Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italien
MHK-Teststreifen: MIC Test Strip Metronidazol	Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
MHK-Teststreifen: MIC Test Strip Rifampicin	Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italien
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Petri-Schalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Biosphere ® Filter Tips (0- 20 µl, 2-100 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Viabank Cryogenic Storage Tubes	Abtek Biologicals Ltd., Liverpool, Großbritannien
Wattestäbchen 15 cm	Meditrade®, Kiefersfelden
Zahnstocher 80 mm	Hermann Metz KG, Quickborn

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	Fluka®Analytical, München
Ameisensäure 70 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 4: Reagenzien, Enzyme & Puffer

Reagenzien & Enzyme & Puffer	Hersteller
MALDI- H ₂ O	Fluka®Analytical, München
PCR-Puffer (10xconc.)	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim
PCR-H ₂ O	Medizinische Mikrobiologie, Göttingen

Reagenzien & Enzyme & Puffer	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim
Biotyper Test Standard (BTS)	Bruker Daltronics, Bremen

Tabelle 5: Kits

Kits	Hersteller
GenoTypeCDiff Version 1.0	Hain Lifescience, Nehren
MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim
Real Star® Clostridium difficile PCR Kit 1.0	Altona Diagnostics Germany, Hamburg

Tabelle 6: Referenzstämme

Stamm	Beschreibung
R20291	Laborstamm, Ribotyp 027
DSM 28669	Laborstamm, Toxin-negativ
2912/2018	Patientenisolat UMG, Ribotyp 027
2667/2018	Patientenisolat UMG, Ribotyp 027

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller
Excel 2016	Microsoft
Flex Analysis	Bruker Daltronics, Bremen
MALDI Biotyper	Bruker Daltronics, Bremen

Software	Hersteller
Word 2016	Microsoft
PubMed	NCBI
Zotero 5.0.88	Roy Rosenzweig Center for History and new media
R 3.6.2	The R Foundation for Statistical Computing (http://www.R-project.org)

2.2 Methoden

2.2.1 Rekrutierung der Probanden und Isolierung von *Clostridioides difficile*

Im Rahmen der Studie „Einflussfaktoren auf die Kolonisierung von *Clostridium difficile* bei Neugeborenen und Säuglingen - eine epidemiologische Studie“ hat die Doktorandin Isabel Simon über 22 Monate Stuhlproben von 324 Neugeborenen aus der Universitätsmedizin Göttingen und den Darmstädter Kinderkliniken Prinzessin Margaret gesammelt. Hierzu wurde nach Möglichkeit vom ersten Stuhl nach der Geburt (Mekonium) monatlich bis zum sechsten Lebensmonat eine Stuhlprobe des Kindes durch die Eltern an das Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen gesendet. In einigen Fällen konnte dies bis zum zwölften Lebensmonat weitergeführt werden.

Um herauszufinden, welche der Proben *C. difficile* enthalten, wurde der Stuhl auf chromogenen *C.-difficile*-Agarplatten ausgestrichen und für 48 Stunden kultiviert. Von den Platten, auf denen sich *C.-difficile*-Kolonien fanden, wurden ein erneuter Ausstrich auf COS-Platten gemacht, um gegebenenfalls vorhanden Mischkulturen zu isolieren. Um einen sicheren Nachweis von *C. difficile* zu haben, wurden sie im Anschluss per MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe 2.2.6) analysiert und im Falle eines positiven Nachweises kryokonserviert.

2.2.2 Kultivierung und Kryokonservierung von *Clostridioides difficile*

Zur Kultivierung von *C. difficile* wurden COS-Blutagarplatten (siehe Materialien) verwendet. Da *C. difficile* ein obligat anaerob wachsendes Bakterium ist, wurden die beimpften Platten für 24 bis 48 Stunden bei 37°C entweder in einem Anaerobier-Zelt

(Atmosphäre: N₂ 85 %, H₂ 10 % und CO₂ 5 %) oder in Anaerocult®-Boxen mithilfe von Anaerobier-Beuteln inkubiert (siehe Materialien).

Zur Konservierung der *C.-difficile*-Isolate wurden Viabank Cryogenic Storage Tubes (Abtek Biologicals Ltd, Großbritannien) genutzt. Auf den Blutagarplatten gezüchtete Kolonien wurden mithilfe einer Impfschlinge in der sich in den Kryoröhrchen befindlichen Lösung suspendiert. Durch leichtes Schütteln wurden sich ebenfalls in den Kryoröhrchen befindliche Plastikperlen mit der Bakteriensuspension benetzt. Im Anschluss wurde die Suspension bis auf einen geringen Rest mit einer Pipette entnommen und das Röhrchen bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeiten mittels E-Test

Die Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit wurde mithilfe eines E-Tests der Firma Biofilchem (Italien) durchgeführt. Getestet wurde die Empfindlichkeit der *C.-difficile*-Isolate auf die Antibiotika Metronidazol, Vancomycin, Erythromycin, Moxifloxacin sowie Rifampicin.

Zunächst wurden die Isolate auf COS-Platten für 48 Stunden kultiviert. Mit einer Impföse wurde Zellmaterial von den Platten entnommen und in 3 ml 0.9 % NaCl resuspendiert. Anschließend wurde hieraus eine Suspension mit einer OD₆₀₀ (optischen Dichte) von 0,1 erstellt. Mit dieser Suspension wurden dann mithilfe von Wattestäbchen MHF-Platten (siehe Materialien) beimpft, mit dem Ziel einen Bakterienrasen zu produzieren. Nachfolgend wurden die Antibiotikastreifen, die mit einer von ihrem unteren zu ihrem oberen Ende ansteigenden Konzentration des entsprechenden Antibiotikums versehen sind, steril auf den beimpften Platten platziert. Es folgte eine Inkubation im Anaerobier-Zelt für 24 Stunden. Auf den Streifen befindet sich eine Skala, die die Konzentration des Antibiotikums angibt. Der Wert, bis zu dem der Bakterienrasen an den Streifen heranwuchs, konnte dann als minimale Hemmkonzentration (MHK) für die verschiedenen Isolate abgelesen werden. Bei der minimalen Hemmkonzentration handelt es sich definitionsgemäß um die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, die das Wachstums des Bakteriums noch verhindert.

2.2.4 PCR-Nachweis von Toxingenen

Zur Prüfung des Vorhandenseins von Toxingenen in den Isolaten, wurde ein Kit namens „GenoType CDiff“ der Firma Hain Lifescience (Nehren) verwendet. Zunächst wurde hierfür eine 48-stündige Kultivierung der *C.-difficile*-Isolate auf COS-Platten vorgenommen und

mithilfe eines weiteren Kits namens „MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation“ und einem DNA/RNA-Aufreinigungsgerät (MagNa Pure LC 2.0, Roche Diagnostics) die genomische DNA isoliert. Anschließend wurde mit dieser DNA unter Verwendung von biotinylierten Primern eine Multiplex-PCR durchgeführt. Amplifiziert wurden hierbei 15 für *C. difficile* spezifische Genregionen. Hierzu gehören ein für die Triosephosphat-Isomerase codierendes Gen, sowie ein durch den Hersteller bestimmtes Gen, die als Bestätigung für das Vorliegen von *C. difficile* dienen. Des Weiteren gehören dazu die für die Toxine A und B codierenden Gene *tcdA* und *tcdB*, sowie die für das binäre Toxin codierenden Gene *cdtA* und *cdtB*. Darüber hinaus amplifiziert der Test zwei Regionen des Regulatorgens *tcdC* und zeigt zwei eventuelle Basenpaar-Mutationen (18- bzw. 39-Basenpaarmutation), sowie eine eventuelle 1-Basendeletion an Position 117 an. Außerdem wurde das Gyrase-Gen amplifiziert und auch hier zwei mögliche Mutationen angezeigt, die auf eine Moxifloxacin-Resistenz hinweisen. Die PCR wurde in einem Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das verwendete Protokoll und die verwendeten Materialien zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: PCR- Protokoll und Materialien

Schritt	Zeit und Temperatur	Anzahl Zyklen
Denaturierung	5 min 95°C	1
Denaturierung	30 sec 95°C	10
Annealing	2 min 58°C	
Denaturierung	25 sec 95°C	20
Annealing	40 sec 53°C	
Elongation	40 sec 70°C	
Finale Elongation	8 min 70°C	1
Materialien		
35 µL Primer-Nukleotid-Mix mit Biotin-markierten Primern (im Kit enthalten)		
5 µL 10-fach Polymerase-Puffer		
0,25 µL Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)		

Materialien

4,75 µL PCR- Wasser

5 µL DNA-Lösung

Im Anschluss an die die Multiplex-PCR wurde eine Hybridisierung durchgeführt. Die im Kit dafür enthaltenen Teststreifen sind mit spezifischen Sonden beschichtet, die komplementär zu den amplifizierten Nukleinsäuren sind. Nach einer chemischen Denaturierung binden die dann einzelsträngigen, Biotin-markierten Amplifikate an diese Sonden. Dieser Schritt wurde entweder in einem Schüttelwasserbad in einem Hybridisierungsofen (Biometra OV5, Göttingen), oder per Hand in einem Wasserbad (GFL, Schütt-Labortechnik, Göttingen) bei einer Temperatur von 45°C durchgeführt. Die in einem weiteren Schritt zugeführte Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase bindet über das Streptavidin an das Biotin der Amplifikate und setzt ein zugegebenes Substrat in einen Farbstoff um. Dieser wird auf dem Teststreifen als Farbniederschlag sichtbar und macht somit das Vorhandensein der fraglichen Amplifikate erkennbar.

Zur Bestätigung der mittels des „GenoType CDiff“ - Kits erhaltenen Ergebnisse wurden stichprobenhaft zehn Toxin A- und B-positive, sowie zehn Toxin A- und B-negative Isolate mithilfe eines weiteren Kits, dem „Real Star® Clostridium difficile PCR Kit 1.0“ (Altona Diagnostics, Hamburg) im Rahmen einer Real-Time-PCR untersucht. Das hierfür verwendete Gerät war der LightCycler® 480 II von Roche Diagnostics.

2.2.5 Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen toxigener und nicht toxigener *C.-difficile*-Stämme in Abhängigkeit vom Vorliegen verschiedener Parameter

Über die in der vorliegenden Studie untersuchten Kinder wurde im Vorfeld in der Arbeit „Einflussfaktoren auf die Kolonisierung von *Clostridium difficile* bei Neugeborenen und Säuglingen - eine epidemiologische Studie“ bereits Daten erhoben. Hierbei wurden durch die Eltern Angaben zum Lebensumfeld der Kinder gemacht. Zu diesen Angaben gehörten neben dem Geschlecht des Kindes, Informationen dazu, ob das Kind gestillt wurde, ob eine Frühgeburt vorlag, ob es Kontakt zu Haustieren gab, ob Infektionen vorlagen und ob das Kind Antibiotika eingenommen hat. Diese Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den genannten Parametern

und dem Vorliegen toxigener und nicht toxigener Stämme zu untersuchen. Um einen möglichen Effekt der Parameter auf das Vorliegen von toxigenen und nicht toxigenen Stämmen zu ermitteln, wurde mithilfe des Programms R eine logistische Regression durchgeführt.

2.2.6 Speziesbestimmung und Typisierung von *Clostridioides-difficile*-Isolaten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die *Matrix-assisted-laser-desorption/ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF) - Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das in der mikrobiologischen Diagnostik zur Speziesbestimmung von Bakterien und Pilzen eingesetzt wird. Hierzu wird eine kleine Menge einer Kolonie des zu untersuchenden Organismus auf ein Feld eines Probenträgers (Target) aufgetragen und mit einer Matrix versehen (Tabelle 9). Das Target wird in das MALDI-TOF-Gerät eingeführt. Mithilfe eines Laserstrahls werden in einem Hochvakuum die Matrixbestandteile, sowie die Bestandteile des Organismus verdampft, wodurch es zu einer Ionisierung der zu untersuchenden Bakterienproteine kommt. Hierbei handelt es sich vor allem um ribosomale Proteine. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und es wird die von der Masse sowie der Ladung abhängige Flugzeit gemessen. Diese wird in Form eines Massenspektrums aufgezeichnet. Die entstandenen Massenspektren werden mit internen Referenzspektren abgeglichen, was die Identifizierung des vorliegenden Organismus ermöglicht.

In dieser Studie wurde die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zum einen genutzt, um das sichere Vorliegen von *C. difficile* zu bestätigen, zum anderen, um zu testen, ob sich unter den Isolaten welche des Ribotyps 027 (bzw. des nahe verwandten Ribotyps 176) befinden. In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *C.-difficile*-Stämme, die dem Ribotyp 027 bzw. dem Ribotyp 176 angehören, in den Massenspektren eine Peak-Verschiebung von $m/z = 6647$ zu 6705 aufweisen (Emele et al. 2019).

Die Isolate wurden zunächst für 24 bis 48 Stunden auf COS-Platten inkubiert und anschließend mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer (autoflex III, smart beam, Bruker Daltronics, Bremen) gemessen. Mit einem Zahnstocher wurde hierfür Zellmaterial von den Agarplatten entnommen und auf einzelne Felder auf dem Target (MSP 96 Target polished steel BC, Bruker Daltronics, Bremen) aufgetragen. Im Anschluss wurden jeweils $0,5 \mu\text{L}$ 70 %ige Ameisensäure und $1 \mu\text{L}$ Matrix-Lösung auf die Felder gegeben und ca. 5 min trocknen gelassen. Um die Messungen kalibrieren und eventuelle Peak-Verschiebungen zuverlässig

bestimmen zu können, wurde der Matrix Insulin hinzugegeben (1 μL Insulin Stock (Tabelle 9) auf 100 μL Matrix), sodass eine Endkonzentration von 0,42 $\mu\text{g/ml}$ Insulin in der Matrix zustande kam. Die genaue Bestimmung des durch das Insulin entstehenden Peaks wurde erreicht, indem es in einer Kontrollmessung mit dem Biotyper Test Standard (BTS, Bruker Daltronics) gemischt und im Massenspektrum abgelesen wurde ($m/z = 5.808$). Die Messungen wurden mithilfe des Programms MALDI Biotyper (Bruker Daltronics, Bremen) durchgeführt und im Anschluss unter Verwendung der Software FlexAnalysis (Bruker Daltronics, Bremen) ausgewertet. Zunächst wurden die gemessenen Spektren hier entsprechend des Insulin-Peaks kalibriert und anschließend unter der Verwendung der Funktionen „*baseline subtraction*“ und „*smooth*“ modifiziert.

Tabelle 9: Verwendete Lösungen

Verwendete Lösungen:
- Insulin Stock: 41,67 $\mu\text{g/ml}$ gelöst in 0,01 % TFA und 50 % Acetonitril
- Matrix-Lösung: 10 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) gelöst in 47,5 % H_2O , 50 % Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure (TFA)

3 Ergebnisse

Zunächst wurden die im Rahmen der vorangegangenen Studie isolierten und bei -20 °C gelagerten 145 *C.-difficile*-Isolate von Kindern auf COS-Agar kultiviert und die Kulturen makroskopisch auf das mögliche Vorliegen von Mischkulturen inspiziert. Da das Vorliegen von *C. difficile* im Rahmen der vorangegangenen Studie zu diesem Zeitpunkt ausschließlich über die optische Beurteilung auf Selektivagar wachsender Kolonien erfolgte, wurde die Identität der Isolate zunächst mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft (Abbildung 1). Von den 145 überprüften Isolaten konnten 137 Isolate von 48 Kindern in der MALDI-TOF Analyse als *C. difficile* bestätigt werden. Bei den anderen Isolaten handelte es sich um *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus paracasei* und *Enterococcus casseliflavus*.

Von den bestätigten *C.-difficile*-Isolaten wurden im weiteren Verlauf folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) Ermittlung der Antibiotikaempfindlichkeit gegen Metronidazol, Vancomycin, Moxifloxacin, Erythromycin und Rifampicin mittels E-Test
- 2) Nachweis der Gene für Toxin A, Toxin B und das binäre Toxin durch einen PCR-basierten Test
- 3) Überprüfung auf das Vorliegen der Ribotypen 027/176 mittels einer weiteren modifizierten Messung per MALDI-TOF-Massenspektrometrie

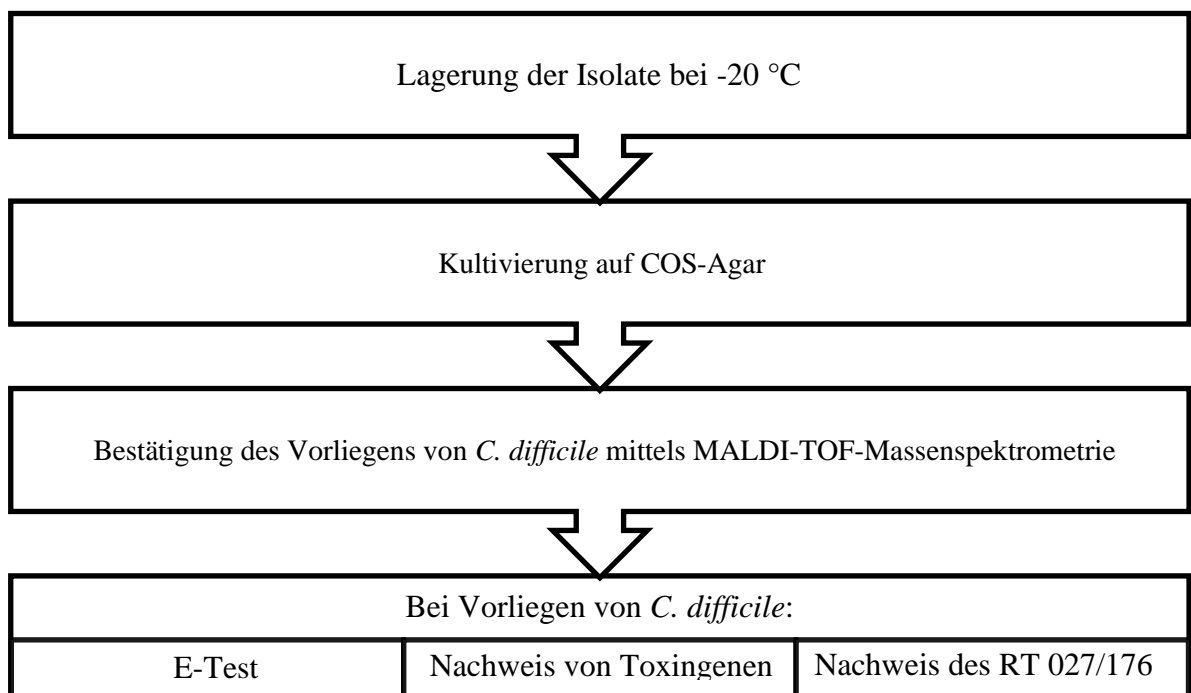


Abbildung 1: Arbeitsablauf

3.1 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit

Zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeiten wurde ein E-Test durchgeführt (Abbildung 2). Getestet wurden die Empfindlichkeiten der Isolate auf die Antibiotika Vancomycin, Metronidazol, Erythromycin, Moxifloxacin und Rifampicin (siehe 2.2.3).

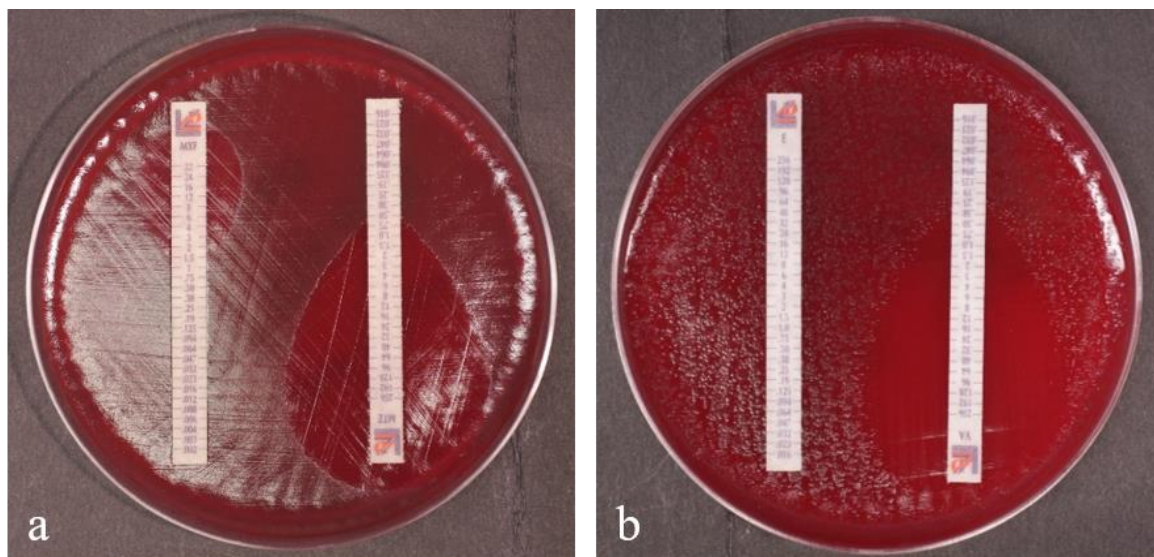


Abbildung 2: Beispielbilder E-Test

- a.** Ein Isolat, welches eine MHK von 1,5 µg/ml für Moxifloxacin und eine MHK von 0,5 µg/ml für Metronidazol aufweist und somit für beide Antibiotika sensibel ist
- b.** Ein Isolat, welches keinen Hemmhof bei Erythromycin bildet (resistent) und eine MHK von 0,38 g/ml für Vancomycin aufweist (sensibel)

Von den insgesamt 137 untersuchten Isolaten von 48 Kindern, konnten 17 Isolate gefunden werden, die laut den Richtwerten von EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Version 10.0), CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (M100S, 26. Auflage, 2016), DIN (Deutsches Institut für Normierung) (Version DIN 58940-1:2002-10) oder anhand anderer bereits publizierter Studien als resistent gegen mindestens eines der Antibiotika eingestuft werden können. Keines dieser Isolate zeigte eine Resistenz gegen Vancomycin (EUCAST: resistent bei MHK >2 µg/ml) oder Rifampicin (Freeman *et al.* 2015: resistent bei MHK >16 µg/ml). Ein Isolat wurde als resistent gegen Metronidazol eingestuft (EUCAST: resistent bei MHK >2µg/ml), zwei Isolate als resistent gegen Moxifloxacin (CLSI: resistent bei MHK >8µg/ml) und 16 Isolate als resistent gegen Erythromycin (DIN: resistent bei MHK >4µg/ml). Die genaue Verteilung der im E-Test

ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) sind den folgenden Abbildungen zu entnehmen (Abbildung 3, Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 7).

Metronidazol

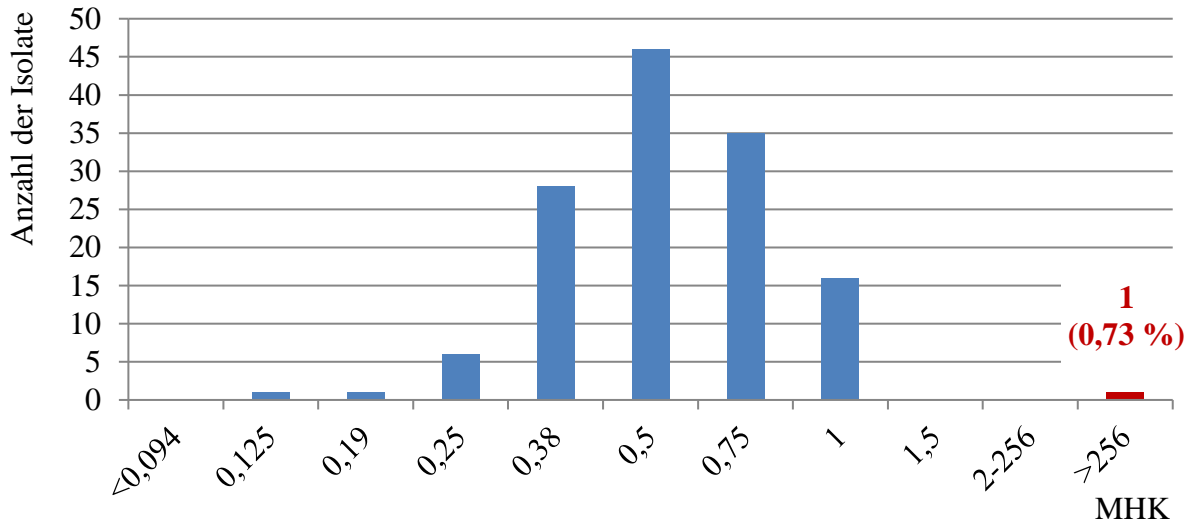


Abbildung 3: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Metronidazol der insgesamt 137 Isolate. Ein resistentes Isolat (EUCAST: resistent bei MHK $>2 \mu\text{g/ml}$). Nicht aufgetretene Werte auf der MHK-Skala wurden zusammengefasst.

Vancomycin

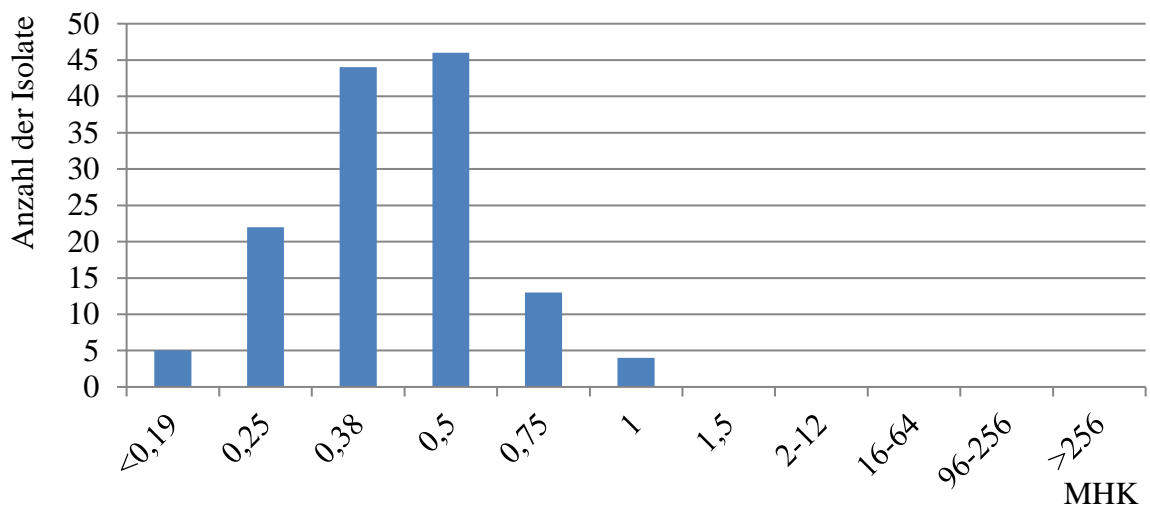


Abbildung 4: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Vancomycin der insgesamt 137 Isolate. Kein resistentes Isolat (EUCAST: resistent bei MHK $>2 \mu\text{g/ml}$). Nicht aufgetretene Werte auf der MHK-Skala wurden zusammengefasst.

Erythromycin

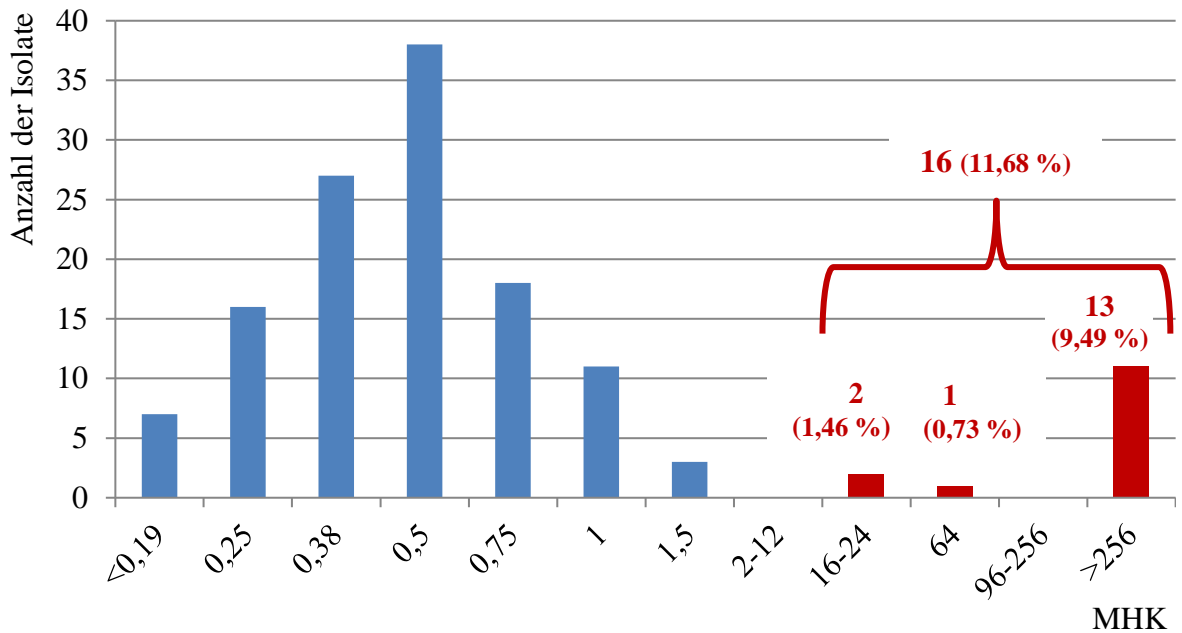


Abbildung 5: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Erythromycin der 137 Isolate. 16 resistente Isolate (DIN: resistent bei MHK > 4 μ g/ml). Nicht aufgetretene Werte der MHK-Skala wurden zusammengefasst.

Moxifloxacin

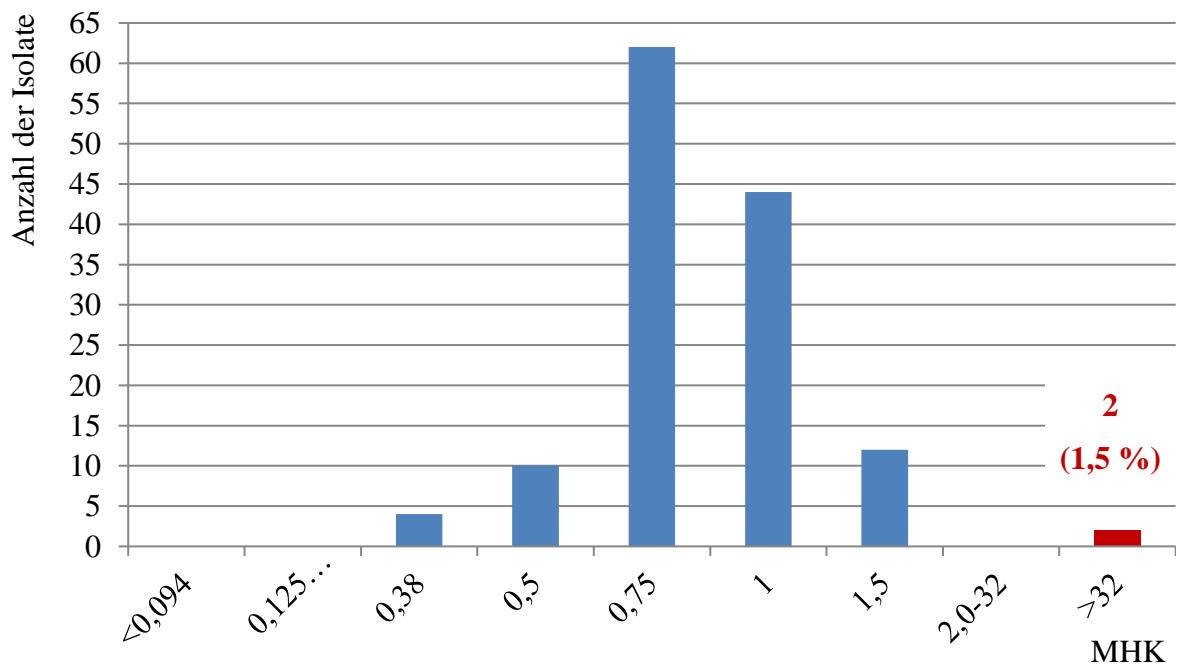


Abbildung 6: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Moxifloxacin der insgesamt 137 Isolate. Zwei resistente Isolate (CSLI: resistent bei MHK >8 μ g/ml). Nicht aufgetretene Werte der MHK-Skala wurden zusammengefasst.

Rifampicin

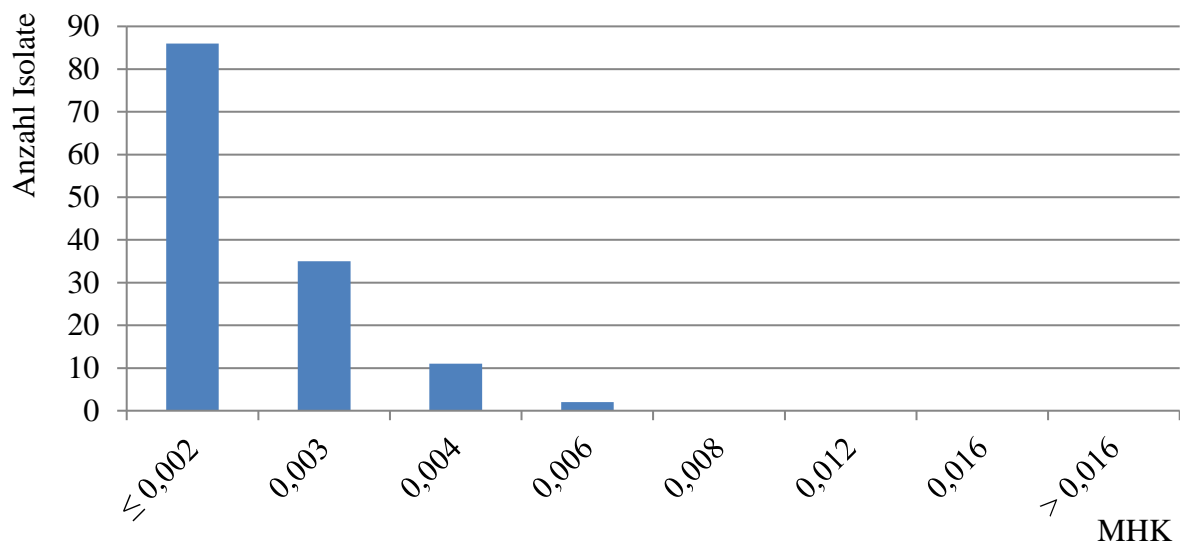


Abbildung 7: Verteilung minimaler Hemmkonzentrationen für Rifampicin der insgesamt 137 Isolate. Kein resistentes Isolat (vorangegangene Studien: resistent bei MHK >16 µg/ml). Nicht aufgetretene Werte der MHK-Skala wurden zusammengefasst.

Zwei der Isolate waren gegen mehr als ein Antibiotikum resistent. Eines wies eine Resistenz gegen Metronidazol und Erythromycin, ein anderes eine Resistenz gegen Moxifloxacin und Erythromycin auf (Abbildung 8).

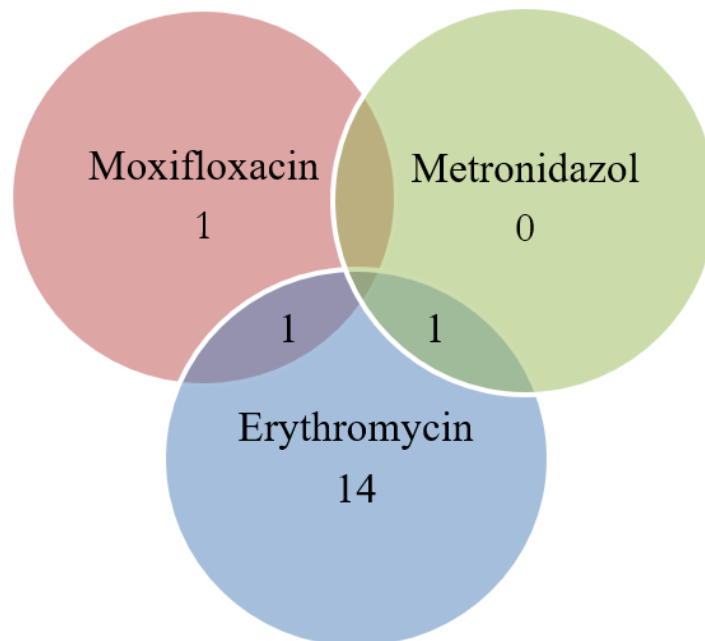


Abbildung 8: Übersicht über mehrfach resistente Isolate. Ein Isolat zeigte eine Resistenz gegenüber Erythromycin und Moxifloxacin, ein anderes eine Resistenz gegen Metronidazol und Erythromycin.

Bei 46 der 48 Kinder zeigten die im Laufe der Monate gewonnen Proben jeweils ähnliche Empfindlichkeitswerte für die einzelnen Antibiotika. Nur bei zwei Kindern konnten zu unterschiedlichen Zeitpunkten signifikante Veränderungen (Änderung der MHK um > Faktor 4) bezüglich der Empfindlichkeiten festgestellt werden. Bei einem Kind fanden sich im Gegensatz zu den Isolaten der Monate 1, 2, 3 und 8 in dem Isolat aus Monat 9 ein deutlicher, einer Resistenz entsprechender, Anstieg der MHK für Erythromycin, jedoch ein deutlicher Abfall der MHK für Metronidazol, also eine Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber diesem Antibiotikum (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zeitlicher Verlauf der Antibiotikaempfindlichkeiten bei Kind 83. In Monat 9 Entwicklung einer Resistenz gegenüber Erythromycin (Zunahme MHK) und eine Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol (Abnahme MHK).

	Monat 1	Monat 2	Monat 3	Monat 8	Monat 9
	(MHK in µg/ml)				
Erythromycin	0,25	0,25	0,25	0,38	24
Vancomycin	0,25	0,38	0,25	0,38	0,25
Metronidazol	0,5	0,38	0,5	0,75	0,125
Moxifloxacin	1	1	1	0,75	0,75
Rifampicin	0,002	0,002	0,002	0,002	0,006

Bei einem weiteren Kind zeigte das Isolat aus Monat 6 eine Resistenz gegen Erythromycin, während dies die vorangegangenen Isolate aus den Monaten 4 und 5 nicht taten. Bezüglich der anderen Antibiotika zeigten sich hier keine auffälligen Veränderungen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der Antibiotikaempfindlichkeit bei Kind 300. In Monat 6 Entwicklung einer Resistenz gegenüber Erythromycin.

	Monat 4	Monat 5	Monat 6
	(MHK in µg/ml)		
Erythromycin	0,5	0,38	> 256
Vancomycin	1	0,5	0,5
Metronidazol	0,38	0,38	0,5
Moxifloxacin	1	1	0,75
Rifampicin	0,004	0,002	0,004

3.2 Nachweis von Toxingenen

Der Nachweis der Toxingene erfolgte mithilfe eines Kits, basierend auf einer Multiplex-PCR sowie einer anschließenden Hybridisierung als Spezifitätsnachweis (siehe 2.2.4). Für diese Arbeit war die Überprüfung der Isolate auf das Vorliegen der Toxine A und B, sowie des binären Toxins von Interesse. Um den Test zu etablieren, wurde er zunächst mit vorcharakterisierten *C.-difficile*-Stämmen durchgeführt (Abbildung 9). Hierzu gehörten der nicht toxische Laborstamm EC 003-01-01 (DSM 28669), der toxische (positiv für Toxin A, B und binäres Toxin) Laborstamm R20291 sowie zwei Isolate von Patienten, die den Ribotyp 027 aufwiesen und somit auch die Gene für Toxin A, B und das binäre Toxin in ihrer DNA enthielten.

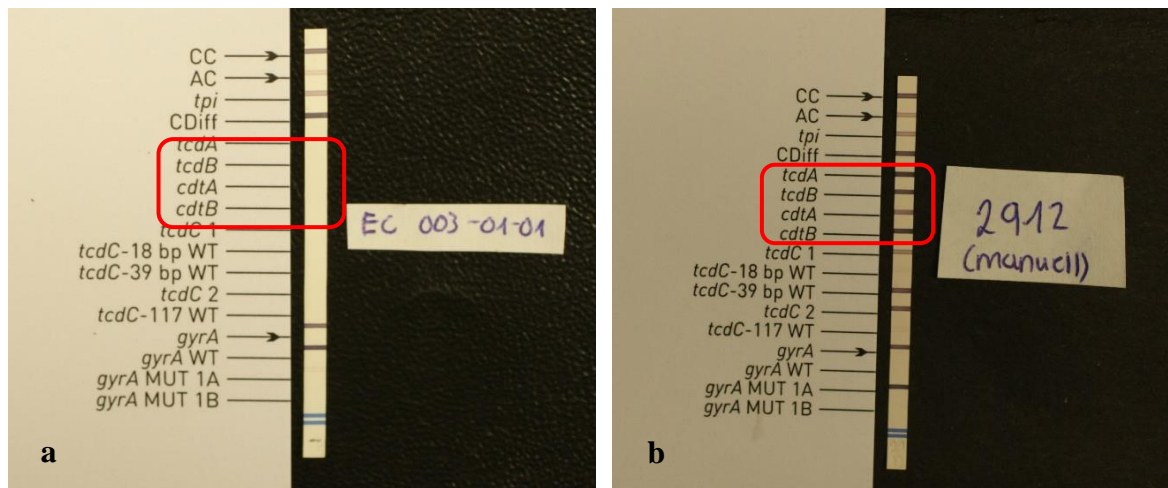


Abbildung 9: Teststämme

Die Banden CC (Konjugationskontrolle) und AC (Amplifikationskontrolle) zeigen eine erfolgreiche Durchführung des Tests an und müssen immer entwickelt sein. Die Banden *tpi* und CDiff zeigen das Vorliegen von *C. difficile* an und müssen ebenfalls immer entwickelt sein.

a. nicht toxigener Teststamm EC 003-01-01. Die Banden *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* und *cdtB* sind nicht entwickelt. Folglich liegen weder Toxin A (*tcdA*), Toxin B (*tcdB*) oder das binäre Toxin (*cdtA/cdtB*) vor.

b. Toxin A, B, binäres Toxin positiver Teststamm eines Patienten. Die Banden *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* und *cdtB* sind entwickelt, es liegen dementsprechend die Toxine A (*tcdA*) und B (*tcdB*) sowie das binäre Toxin (*cdtA/cdtB*) vor.

Von den 137 untersuchten Isolaten der 48 Kinder wies keines das Gen für das binäre Toxin auf. 64 Isolate (47 %) waren nicht toxigen, enthielten also auch keine Gene für die Toxine A oder B. Bei 73 Isolaten (53 %) konnten die Gene für die Toxine A und B nachgewiesen werden. Bei 47 der 48 Kinder fanden sich entweder ausschließlich toxigene oder ausschließlich nicht toxigene Isolate. Lediglich bei einem Kind konnten im Verlauf der Zeit sowohl toxigene als auch nicht toxigene Stämme nachgewiesen werden (weitführende Erläuterung siehe Seite 32). Es fanden sich 20 Kinder mit ausschließlich nicht toxigenen Isolaten und 27 Kinder mit ausschließlich toxigenen Isolaten (Tabelle 12). Keines der Isolate enthielt ausschließlich den Genlocus für Toxin A oder B, sondern es lagen immer entweder die Genloci für beide Toxine vor oder für keines (Abbildung 10).

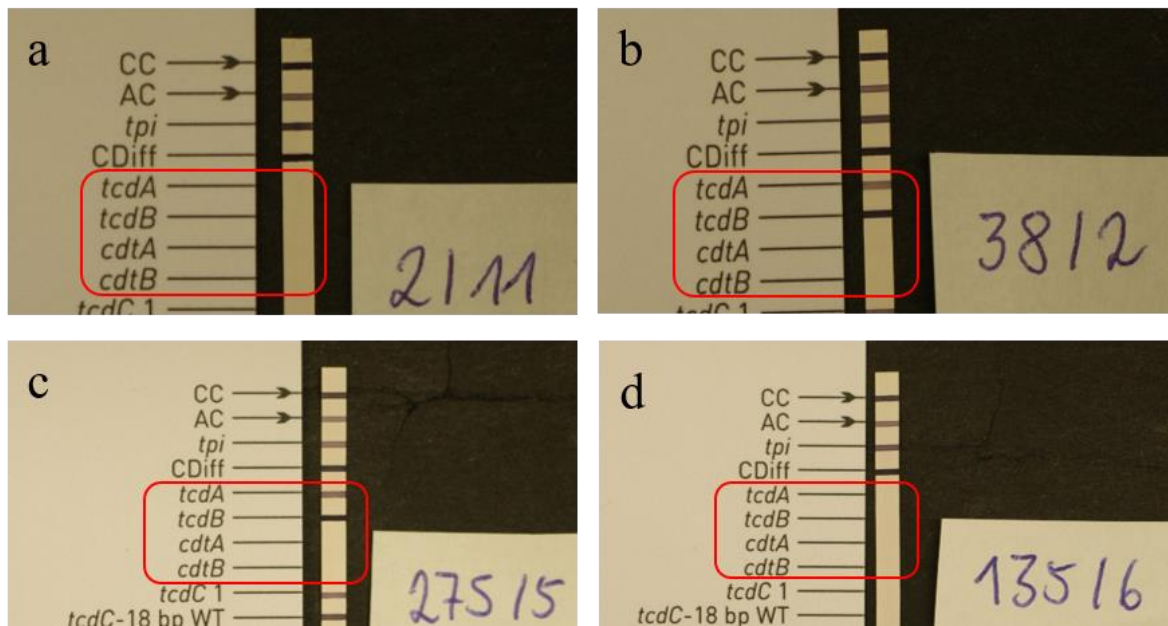


Abbildung 10: Exemplarische Ergebnisse

a./d. Toxin-negative Isolate von Kind 2 in Monat 11 und von Kind 135 in Monat 6. (Keine Banden für *tcdA* (Toxin A), *tcdB* (Toxin B) und *cdtA/cdtB* (binäres Toxin).

b./c. Toxin A (*tcdA*) und Toxin B (*tcdB*) positive Isolate von Kind 38 in Monat 2 und von Kind 275 in Monat 5. Keine Entwicklung der Banden *cdtA* und *cdtB*, dementsprechend kein Vorliegen des binären Toxins.

Die Kontrollbanden sind wie in Abbildung 9 beschrieben vorhanden.

Tabelle 12: Übersicht über Verteilung toxigener und nicht toxigener Isolate

	Gesamtzahl der Isolate: 137	Gesamtzahl der Kinder: 48
Toxin A/B positiv	73/137 (53 %)	27/48 (56 %)
Toxin A/B negativ	64/137 (47 %)	20/48 (42 %)
Im Verlauf sowohl Tox. A/B positiv als auch Tox. A/B negativ		1/48 (2 %)
Toxin B positiv, A negativ	0/137 (0 %)	0/48 (0 %)
Toxin B negativ, A positiv	0/137 (0 %)	0/48 (0 %)
Binäres Toxin positiv	0/137 (0 %)	0/48 (0 %)
Binäres Toxin negativ	137/137 (100 %)	48/48 (100 %)

Zur Bestätigung der mittels des „GenoType Cdiff“ - Kits erhaltenen Ergebnisse wurden stichprobenhaft zehn Toxin A- und B positive, sowie zehn Toxin A- und B negative Isolate mithilfe eines weiteren Kits, dem „Real Star® *Clostridium difficile* PCR Kit 1.0“ im Rahmen einer Real-Time-PCR untersucht (siehe 2.2.4). Hierbei konnte eine 100 %ige Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden festgestellt werden. Die zehn mithilfe des „GenoType Cdiff“ Kits ermittelten Toxin A und B positiven Isolate wurden auch durch das „Real Star® *Clostridium difficile* PCR Kit 1.0“ als Toxin positiv erkannt, während die anderen zehn Isolate in beiden Tests übereinstimmend als Toxin negativ erkannt wurden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich der Testmethoden

	Toxin A	Toxin B
Isolat 8/9	(+/+)	(+/+)
Isolat 16/11	(+/+)	(+/+)
Isolat 38/3	(+/+)	(+/+)
Isolat 50/10	(+/+)	(+/+)
Isolat 78/10	(+/+)	(+/+)
Isolat 83/3	(+/+)	(+/+)
Isolat 109/5	(+/+)	(+/+)
Isolat 165/6	(+/+)	(+/+)
Isolat 181/5	(+/+)	(+/+)
Isolat 300/6	(+/+)	(+/+)
Isolat 2/11	(-/-)	(-/-)
Isolat 15/10	(-/-)	(-/-)
Isolat 23/10	(-/-)	(-/-)
Isolat 83/9	(-/-)	(-/-)
Isolat 85/5	(-/-)	(-/-)
Isolat 99/4	(-/-)	(-/-)
Isolat 135/6	(-/-)	(-/-)
Isolat 170/4	(-/-)	(-/-)
Isolat 206/5	(-/-)	(-/-)
Isolat 307/2	(-/-)	(-/-)
Methoden	+/+ „GenoType Cdiff“ +/+ „Real Star ® Clostridium difficile PCR Kit“	

Wie bereits oben beschrieben, wurden, vergleichbar mit der Entwicklung der Antibiotikaempfindlichkeiten im zeitlichen Verlauf bei 47 von 48 Kindern entweder nur toxische (27 Kinder) oder nur nicht toxische Isolate (20 Kinder) gefunden. Ein Wechsel zwischen dem Vorliegen toxischer und nicht toxischer Isolate über die Zeit kam lediglich bei einem Kind vor. Von diesem Kind wurden in den Monaten 1, 2, 3 und 8 toxische Stämme isoliert, in Monat 9 hingegen konnte das Vorliegen der Toxingene nicht nachgewiesen werden. Bei diesem Kind handelt es sich um das gleiche Kind, das in Monat 9 eine Änderung der Antibiotikaempfindlichkeit aufwies. Eine Übersicht hinsichtlich des Vorliegens der Toxingene der über die Zeit isolierten Stämme zeigt Abbildung 11.

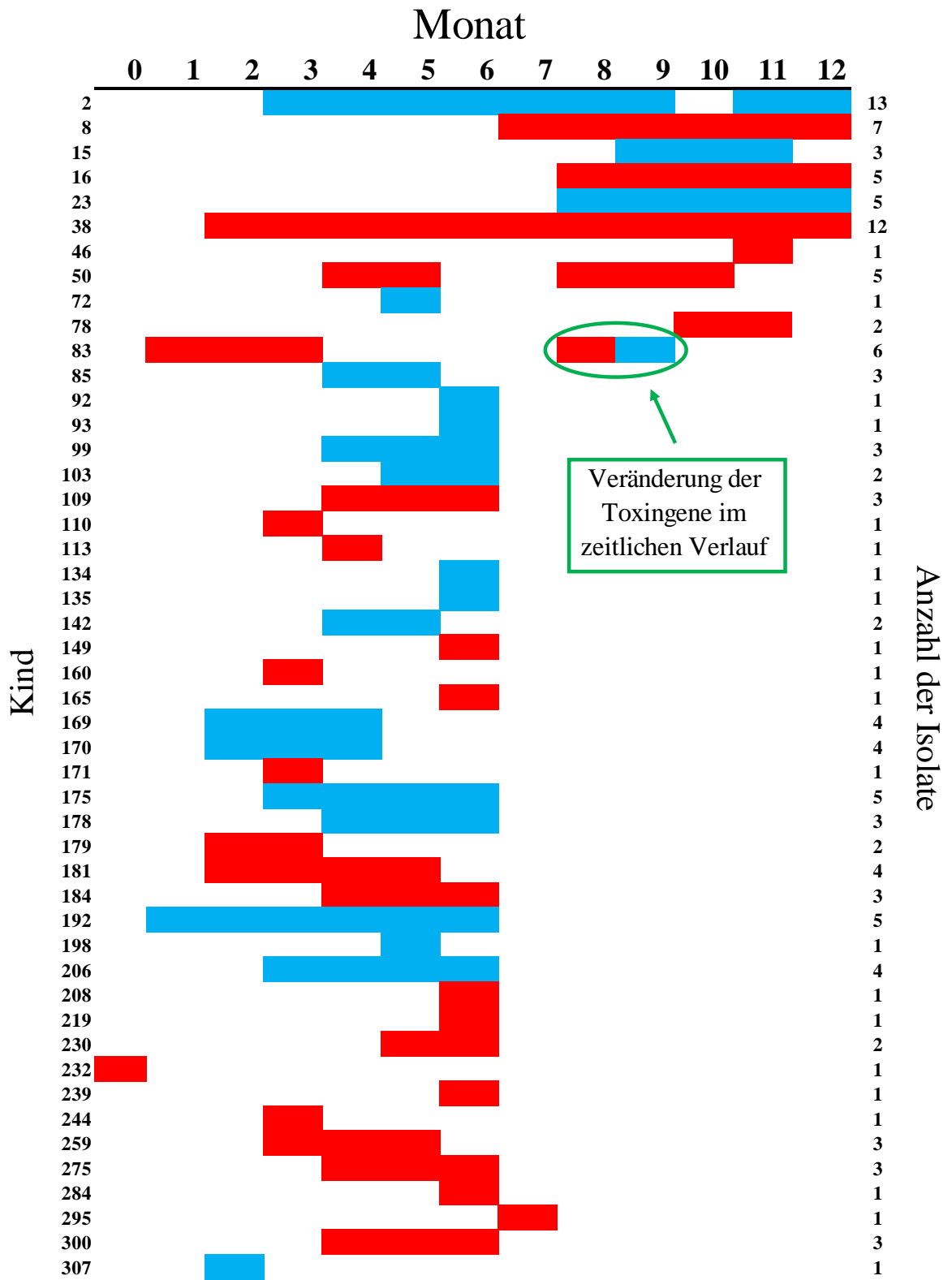


Abbildung 11: Übersicht über das Vorliegen von Toxingenen in zeitlichem Verlauf

■ Toxin A- und B positiv
 ■ Toxin A- und B negativ

Wie bereits in 2.2.5 erwähnt, wurden von den Eltern der untersuchten Kinder in der dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchung Angaben zum Lebensumfeld der Kinder gemacht. Diese Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Parametern Geschlecht, Stillen, Frühgeburt, Kontakt zu Haustieren, Infektionen und der Einnahme von Antibiotika und dem Vorliegen toxigener und nicht toxigener Stämme zu untersuchen. Da bei einigen Kindern einzelne Angaben fehlten, mussten diese aus der Untersuchung ausgeschlossen werden, sodass die Ergebnisse auf den Daten von 36 Kindern beruhen. Von diesen lagen bei 14 Kindern toxigene *C.-difficile*-Stämme im Stuhl vor, bei 22 Kindern nicht toxigene Stämme. Mithilfe einer logistischen Regression (siehe 2.2.5) ließ sich für fünf der sechs Parameter kein signifikanter Effekt auf das Vorliegen toxigener oder nicht toxigener Stämme zeigen. Lediglich für den Kontakt zu Haustieren konnte ein signifikanter Effekt gezeigt werden. Der Kontakt zu den Tieren verringerte die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen toxigener *C.-difficile*-Stämme im Stuhl der Kinder signifikant ($p = 0,0391$).

3.3 Typisierung von *Clostridioides-difficile*-Isolaten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden in dieser Arbeit die Isolate anhand einer Peak-Verschiebung von $m/z = 6647$ zu $m/z = 6705$ innerhalb des Massenspektrums auf das Vorliegen des Ribotyps 027 bzw. des nahe verwandten Ribotyp 176 überprüft (siehe 2.2.6.). Zunächst musste hierfür eine Konzentration des für die Kalibrierung notwendigen Insulins gefunden werden, die einerseits ausreichend groß war, um einen sichtbaren Peak im Massenspektrum zu erzeugen und andererseits die Erkennung von *C. difficile* nicht negativ beeinflusste. Abbildung 12 zeigt eine Messung ohne und eine Messung nach Zugabe von Insulin. Abbildung 13 zeigt die Messung eines bekannten Isolats des Ribotyps 027 und die Messung eines Isolats, welches einem anderen Ribotyp zuzuordnen ist. Von den 137 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolaten wies keines den Ribotyp 027 bzw. den Ribotyp 176 auf.

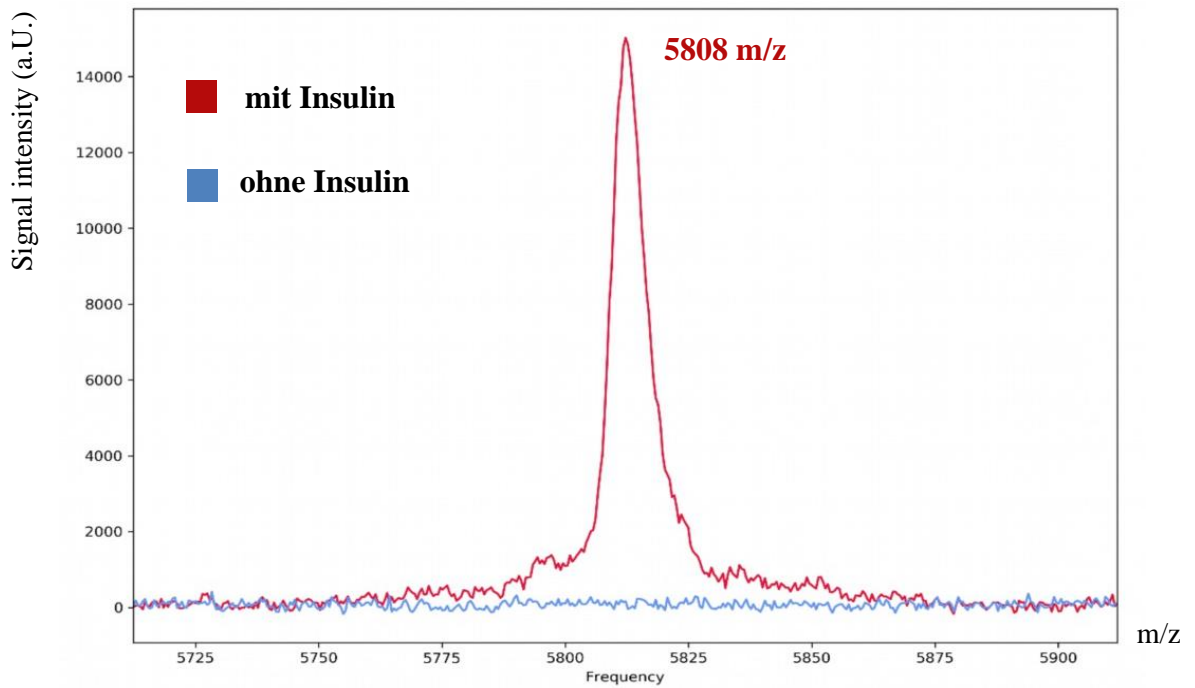


Abbildung 12: Insulin-Peak. Ausschnitt aus massenspektrometrischer Messung eines *C.-difficile*- Stammes mit und ohne Zugabe von Insulin. Nach der Zugabe zeigt sich ein Insulin-spezifischer Peak bei 5808 m/z.

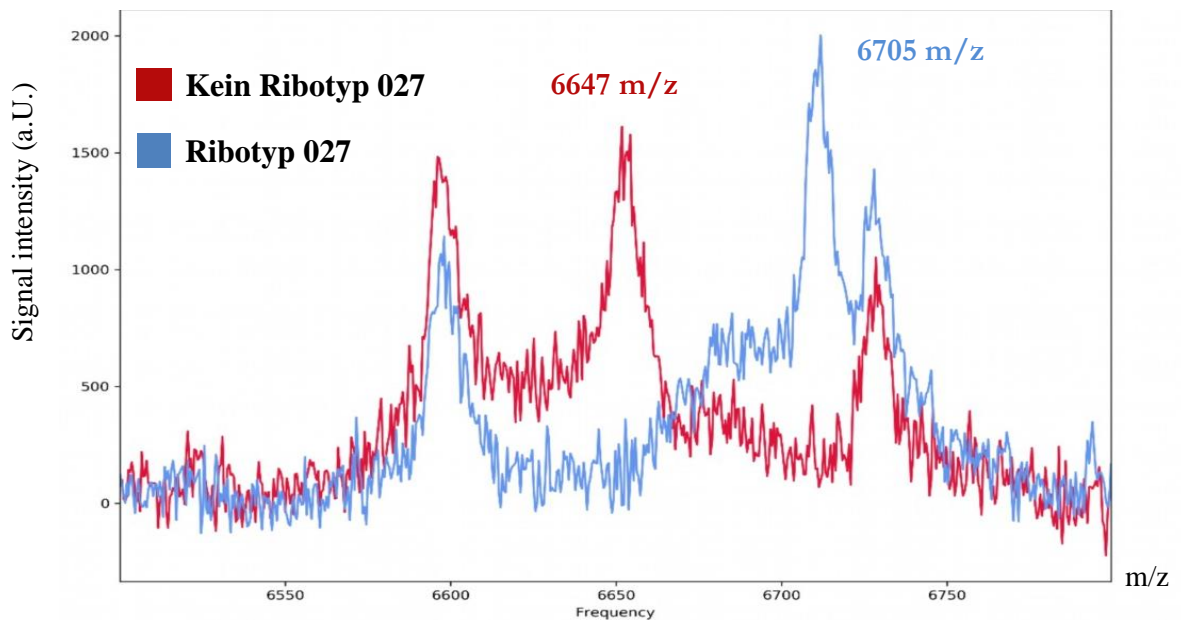


Abbildung 13: Peak-Shift. Ausschnitt aus einer massenspektrometrischen Messung zweier *C.-difficile*-Isolate. Das Isolat, bei dem es sich nicht um den Ribotyp 027 handelt, weist einen spezifischen Peak bei $m/z = 6647$ auf. Bei dem Isolat mit dem Ribotyp 027 ist dieser Peak zu $m/z = 6705$ verschoben.

4 Diskussion

Wie bereits eingangs erwähnt, ist über die Pathogenese von *C. difficile* bei Kindern und die Bedeutung der häufigen Besiedlung mit diesem Erreger in den ersten Lebensjahren wenig bekannt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich des Vorliegens von Antibiotikaresistenzen, der Gene für die Toxine A, B und das binäre Toxin sowie des Ribotyps 027 mit Ergebnissen früherer Studien verglichen. Aufgrund der sehr ähnlichen Charakteristika der Ribotypen 027 und 176 und der schlechten Datenlage bezüglich letzterem, wird sich im Folgenden ausschließlich auf den Ribotyp 027 bezogen. Um die unterschiedliche Bedeutung von *C. difficile* speziell bei Kindern unter einem Jahr und bei Menschen anderer Altersgruppen darstellen und diskutieren zu können, werden sowohl weitere Studien an Kindern als auch solche an Erwachsenen mit in den Vergleich einbezogen.

4.1 Vergleich mit anderen Studien an Kindern

Möchte man die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien an Kindern vergleichen, ist es wichtig, auf den genauen Inhalt dieser zu achten. Während in der vorliegenden Studie zufällig ausgewählte Kinder im Alter von null bis zwölf Monaten untersucht wurden, bezogen sich bisherige Studien häufig auf Kinder anderen Alters oder Gesundheitszustands. Man geht jedoch davon aus, dass die Pathogenese von *C. difficile* in Abhängigkeit vom Alter der Kinder deutliche Unterschiede aufweist (McFarland *et al.* 2000). Darüber hinaus werden in einigen Studien nur Kinder untersucht, die gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall zeigten (Kim *et al.* 2008; Zilberberg *et al.* 2008). Es ist jedoch gut denkbar, dass sich die Charakteristika der *C.-difficile*-Stämme bei symptomatischen und asymptomatischen Kindern unterscheiden. Aufgrund dessen werden diese Gruppen im Folgenden so gut wie möglich voneinander abgegrenzt.

4.1.1 Die Häufigkeit des Ribotyps 027

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei keinem der 48 *C. difficile* positiven Kinder unter einem Jahr der Ribotyp 027 nachgewiesen. Eine gut mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare, von 2014 bis 2017 in den USA an 32 asymptomatischen Kindern im ersten Lebensjahr durchgeführte Studie, konnte ebenfalls kein Vorliegen des Ribotyps 027 in dieser Altersgruppe nachweisen (Kociolek *et al.* 2019). Eine französische Untersuchung von 99 asymptomatischen Kindern zwischen null und zwei Jahren aus dem Jahr 2009 kam zu dem

gleichen Ergebnis, obwohl auch in Frankreich die Prävalenz des Ribotyps 027 in der Gesamtbevölkerung, ähnlich wie in Deutschland, bereits seit 2006 deutlich zunahm (Coignard *et al.* 2006; Rousseau *et al.* 2011b). In einer im Zeitraum von 2014 bis 2015 in China durchgeführten Studie an 250 Kindern im Alter von null bis drei Jahren wurde ein einziges Kind mit dem Ribotyp 027 gefunden (Cui *et al.* 2019). Auch wenn die Kinder der chinesischen und der französischen Studie zum Teil etwas älter waren, als die in diese Arbeit eingeschlossenen Kinder und ein exakter Vergleich daher nicht möglich ist, lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der genannten Studien grundsätzlich gut mit denen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Zu deutlich abweichenden Ergebnissen kamen hingegen US-amerikanischen Studien an symptomatischen Kindern und Jugendlichen im Alter von einem bis 18 Jahren, die eine deutlich höhere Prävalenz des Ribotyps 027 nachwiesen (Toltzis *et al.* 2009; Kociolek *et al.* 2015). Als eine mögliche Ursache hierfür sind Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms bei Kindern unter einem Jahr und älteren Kindern denkbar, da die Darmflora in den ersten zwölf Lebensmonaten noch starken Veränderungen unterliegt (Palmer *et al.* 2007). Möglicherweise ist es den Stämmen des Ribotyps 027 schlechter möglich, sich in dem Mikrobiom von Säuglingen als in dem älterer Kinder zu vermehren.

4.1.2 Antibiotikaresistenzen

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine insgesamt relativ geringe Rate an Antibiotikaresistenzen. Unter den 137 Isolaten waren ein Metronidazol-resistentes (0,73 %), kein Vancomycin-resistentes (0 %), 16 Erythromycin-resistente (11,68 %), zwei Moxifloxacin-resistente (1,5 %) und kein Rifampicin-resistentes (0 %) Isolat. Insbesondere die geringe Rate an Resistenzen gegenüber den regelhaft in der Therapie einer CDI eingesetzten Antibiotika Metronidazol und Vancomycin stimmt mit Ergebnissen aus anderen Studien an Kindern dieses Alters weitestgehend überein. Sowohl eine französische Studie von 2011 als auch eine US-amerikanische Studien aus dem Jahr 2015 fanden bei Kindern unter einem bzw. zwei Jahren keine *C.-difficile*-Stämme, die eine Metronidazol bzw. Vancomycin Resistenz aufwiesen (Rousseau *et al.* 2011b; Kociolek *et al.* 2016). In denselben Studien wurden Resistenzraten von 2,5 % und 3 % für Moxifloxacin gefunden, die damit etwas über der dieser Arbeit lagen. Recht deutliche Unterschiede fanden sich hingegen in Bezug auf die Häufigkeit von Resistenzen gegen Erythromycin und Rifampicin. Während die französische Studie einen Anteil von 31 % Erythromycin resistenten Stämme fand, zeigte die chinesische Studie sogar einen Anteil von 94 %. Letztere ergab darüber

hinaus, dass 63 % der untersuchten Isolate resistent gegen Rifampicin waren, was sich deutlich von den Ergebnissen dieser Arbeit unterscheidet. In der französischen Studie wurde nicht die Empfindlichkeit auf Rifampicin untersucht, sondern auf das ebenfalls zu der Antibiotikaklasse der Rifamycine gehörende Rifaximin und zeigte hierbei eine Resistenzrate von 1,6 % (Rousseau *et al.* 2011b; Cui *et al.* 2019). Als möglicher Grund für die gefundenen Unterschiede kommt zum einen das Alter der in die Studie eingeschlossenen Kinder in Frage. Zwar unterschieden sich die Altersgruppen nicht stark, jedoch handelt es sich bei den zum Vergleich herangezogenen Studien um die bereits in 4.1.1 erwähnten, in denen Kinder im Alter von null bis zwei bzw. null bis drei Jahren untersucht wurden und somit zum Teil älter waren als die in diese Arbeit eingeschlossenen Kinder. Der wahrscheinlichere Grund für die gefundenen Diskrepanzen könnte jedoch die in Asien und Europa unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Ribotypen sein (Huang *et al.* 2009). Da manche Ribotypen häufiger bestimmte Antibiotikaresistenzen aufweisen als andere, könnte dies eine Erklärung für die Ergebnisse sein. Nicht zuletzt sind auch Unterschiede in der Häufigkeit antibiotischer Behandlungen der Kinder als Ursache denkbar, da ein Zusammenhang zwischen vermehrter Antibiotikaexposition und dem Auftreten von Resistenzen wahrscheinlich ist (Kociolek *et al.* 2016).

Bei 46 der 48 Kinder zeigte sich im zeitlichen Verlauf keine Veränderung hinsichtlich der Resistenzlage. In diesen Fällen zeigten alle Isolate eines Kindes, die *C. difficile* positiv waren, vergleichbare Werte im E-Test. So war der Unterschied zwischen der niedrigsten und der höchsten minimalen Hemmkonzentration für ein Antibiotikum nie größer als der Faktor 4. Bei zwei Kindern hingegen änderte sich die Resistenzlage im Verlauf der Zeit. Ein Kind zeigte in den Monaten 1, 2, 3 und 8 keine Resistenz gegen Erythromycin, im neunten Monat konnte eine solche jedoch nachgewiesen werden. Bei einem anderen Kind wiesen die Isolate aus den Monaten 4 und 5 keine Resistenzen auf, das Isolat aus dem sechsten Monat wiederum zeigte ebenfalls eine Resistenz gegen Erythromycin. Studien an Kindern dieses Alters, die vergleichbare Veränderungen beschrieben hätten, konnten nicht gefunden werden, jedoch lassen sie sich am ehesten mit einem Wechsel der vorliegenden Stämme erklären (siehe 4.1.3). Denkbar wäre darüber hinaus auch, dass es sich bei den Isolaten der Kinder über den zeitlichen Verlauf jeweils um die gleichen Stämme handelt, diese jedoch eine Resistenz gegen Erythromycin entwickelten. Da jedoch keines der Kinder mit Erythromycin behandelt wurde, ist hier am ehesten von einem Stammwechsel auszugehen (Simon 2020).

4.1.3 Toxingene

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei 56 % der Kinder toxigene und bei 42 % der Kinder nicht toxigene *C.-difficile*-Stämme nachgewiesen. Bei einem Kind wurden sowohl toxigene als auch nicht toxigene Stämme gefunden. Dabei enthielten die toxigenen Stämme alle sowohl das Gen für das Toxin A als auch für das Toxin B und die nicht toxigenen Stämme keines der beiden. Bei keinem der Isolate wurde das Gen für das binäre Toxin nachgewiesen. Bisherige Studien an Säuglingen aus den Jahren 1998 bis 2017 zeigten einen Anteil von toxigenen Stämmen zwischen 18 % und 70 % (Rousseau *et al.* 2011b, 2012; Kociolek *et al.* 2019). Auch in diesen Studien fand sich bei der entsprechenden Altersgruppe in keinem der Isolate das Gen für das binäre Toxin. Im Gegensatz zu den Isolaten dieser Arbeit wiesen die Isolate einer 2009 in Frankreich durchgeführten Studie nur zu 91 % sowohl die Gene der Toxine A als auch B auf. Bei neun Prozent lag nur das Gen für das Toxin B vor (Rousseau *et al.* 2011b). In der in 4.1.1 bereits erwähnten chinesischen Studie an Kindern zwischen null und drei Jahren konnte sogar bei nur 80 % der toxigenen Isolate das gleichzeitige Vorliegen beider Gene nachgewiesen werden (Cui *et al.* 2019). 19 % der Isolate enthielten hingegen nur das Gen für das Toxin B. Im Rahmen der Untersuchung von Cui *et al.* konnte bei einem Kind auch das Vorliegen des binären Toxins festgestellt werden, jedoch geht aus der Studie das genaue Alter des betroffenen Kindes nicht hervor, sodass es möglicherweise älter war als die Kinder, die in unserer Studie untersucht wurden. Dies macht einen direkten Vergleich unzulässig. Die unterschiedliche Verteilung der Toxingene ist aber vermutlich, ähnlich wie die Diskrepanzen der Antibiotikaresistenzen, vor allem auf unterschiedliche Prävalenzen verschiedener Ribotypen in den Regionen dieser Welt zurückzuführen (Davies *et al.* 2016; Tickler *et al.* 2019).

Bei fast allen in dieser Arbeit erfassten Kindern gab es über die Zeit keine Änderung hinsichtlich des Vorliegens der Toxingene, was vergleichbar mit dem Verlauf der Antibiotikaresistenzen ist. Entweder wurden in jedem Isolat eines Kindes Toxingene nachgewiesen oder in keinem. Nur ein Kind bildete eine Ausnahme. Dabei handelt es sich um das gleiche Kind, bei dem sich im neunten Monat eine vorher nicht aufgetretene Resistenz gegen Erythromycin fand (siehe 4.1.2.). In den Monaten 1, 2, 3 und 8 lagen toxigene Stämme vor. Im neunten Monat kam es dann zu einem Wechsel und es wurde ein nicht toxigener Stamm nachgewiesen. Von dem Vorkommen solcher Stammwechsel berichtete auch eine Studie aus den USA (Kociolek *et al.* 2019). Neben dem Wechsel zeigte diese zum Teil auch ein paralleles Vorliegen verschiedener Stämme. So trugen von 16 mit

toxigenen Stämmen besiedelten Kindern fünf darüber hinaus nicht toxigene Stämme. Eine weitere Studie aus Schweden lieferte vergleichbare Ergebnisse. So waren hier von 42 Kindern zwei Kinder sogar mit drei unterschiedlichen Stämmen gleichzeitig besiedelt sowie 13 der Kinder mit zwei unterschiedlichen Stämmen (Adlerberth *et al.* 2014).

Die Untersuchung des Effekts verschiedener Parameter aus dem Lebensumfeld des Kindes auf das Vorliegen von toxigenen oder nicht toxigenen *C.-difficile*-Stämmen zeigte für fünf von sechs Parametern keinen signifikanten Zusammenhang. So hatten weder das Geschlecht des Kindes, die Ernährung, Frühgeburten, das Vorliegen von nicht *C. difficile*-assoziierten Infektionen, noch die Einnahme von Antibiotika eine signifikante Auswirkung auf das Vorliegen von Toxinen. Lediglich der Kontakt zu Haustieren verringerte die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens toxigener *C.-difficile*-Stämme signifikant ($p=0,0391$).

Betrachtet man vorangegangene Studien, die entsprechende Zusammenhänge untersuchten, finden sich verschiedene Ergebnisse. Bezogen auf die Haustiere zeigte eine Studie von 2017 zwar, dass *C. difficile* bei Kindern unter zwei Jahren infolge des Zusammenlebens mit Hunden signifikant häufiger vorlag als bei Kindern ohne Kontakt zu Hunden, jedoch konnten weder in dieser, noch in einer Studie von 2008 ein Einfluss auf das Vorliegen toxigener oder nicht toxigener Stämme nachgewiesen werden (Penders *et al.* 2008; Stoesser *et al.* 2017). Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass Stillen generell einen protektiven Effekt gegenüber einer Besiedlung mit *C. difficile* hat, doch auch dies hatte keinen Einfluss auf das Vorliegen toxigener oder nicht toxigener Stämme (Penders *et al.* 2008; Jangi und Lamont 2010; Abu-Khader *et al.* 2017; Stoesser *et al.* 2017). Sowohl das Geschlecht als auch Frühgeburten konnten in bisherigen Studien nicht mit einem gehäuften Auftreten von toxigenen oder nicht toxigenen *C.-difficile*-Stämmen bei Kindern in Verbindung gebracht werden (Jangi und Lamont 2010; Abu-Khader *et al.* 2017). Eine Untersuchung fand jedoch ein vermehrtes Auftreten von toxigenen Stämmen bei Jungen (Penders *et al.* 2008). Über den Einfluss der Einnahme von Antibiotika auf die Besiedlung mit *C. difficile* kamen Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während bei Erwachsenen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Einnahme von Antibiotika und dem Auftreten von *C. difficile* generell nachgewiesen ist, zeigten Untersuchungen an Kindern unter zwei Jahren, dass die Behandlung mit Antibiotika keinen Einfluss auf das Vorliegen von *C. difficile* hat (Jangi und Lamont 2010; Abu-Khader *et al.* 2017). Andere Studien zeigten, dass zumindest bei Kindern im Alter von einem bis fünf Jahren die Wahrscheinlichkeit der Besiedlung mit *C. difficile* in Abhängigkeit von vorangegangenen antibiotischen Behandlungen zunahm (Weng *et al.*

2019). Auch der Effekt auf das Vorliegen von toxischen oder nicht toxischen Stämmen infolge der Einnahme von Antibiotika zeigte sich in diesen Studien nicht einheitlich. Während eine Untersuchung keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung toxischer und nicht toxischer Stämme fand (Abu-Khader *et al.* 2017), beschrieb eine andere in dem gleichen Jahr ein erhöhtes Risiko der Besiedlung mit toxischen Stämmen als Folge einer antibiotischen Therapie (Stoesser *et al.* 2017). Zu dem direkten Einfluss von nicht *C. difficile*-assoziierten Infektionen auf den Nachweis von *C. difficile* im Stuhl der Kinder ist wenig bekannt. Lediglich der Effekt von den aufgrund von Infektionen verabreichten Antibiotika wurde untersucht, nicht jedoch der alleinige Zusammenhang zwischen den Infektionen und der Besiedlung mit *C. difficile* bzw. dem Vorliegen toxischer und nicht toxischer Stämme (Weng *et al.* 2019).

Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien weisen darauf hin, dass bisher keine eindeutigen Aussagen über den Effekt der beschriebenen Parameter auf das Vorliegen toxischer oder nicht toxischer Stämme bei Kindern unter einem Jahr gemacht werden können.

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit Studien an Erwachsenen

4.2.1 Die Prävalenz des Ribotyps 027

Im Gegensatz zu Kindern, bei denen sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in anderen Studien zumeist keine oder eine sehr geringe Zahl an *C.-difficile*-Stämmen des Ribotyps 027 gefunden wurde (siehe 4.1.1), ist dieser bei Erwachsenen weit verbreitet. Eine Studie von 2013 zeigte, dass der Ribotyp 027 mit einer Prävalenz von 19 % zu diesem Zeitpunkt der am häufigsten vorliegende in Europa war (Davies *et al.* 2016). 2017 war er für 21 % der CDIs am Uniklinikum Köln verantwortlich und damit auch hier der am häufigsten auftretende Ribotyp (Piepenbrock *et al.* 2019). Zwar beziehen sich diese beiden Studien auf Untersuchungen an Erwachsenen, die unter einer CDI litten und nicht etwa wie die Kinder dieser Studie gesund und damit asymptomatische Träger waren, jedoch konnte auch bei asymptomatischen Erwachsenen das Vorliegen des Ribotyps 027 nachgewiesen werden. So zeigten einzelne Studien an asymptomatisch besiedelten Erwachsenen aus Kanada und China einen Anteil des Ribotyps 027 von bis zu elf Prozent (Zhang *et al.* 2016; Sheth *et al.* 2019). Die Ursache für dieses unterschiedlich häufige Auftreten des Fluorchinolon resistenten Ribotyps 027 bei Kindern und Erwachsenen ist nicht eindeutig geklärt, es wird

jedoch unter anderem der seltenere Gebrauch von Fluorchinolonen bei Kindern als Ursache diskutiert (Kociolek *et al.* 2016). Darüber hinaus spielt möglicherweise auch das in einigen Studien nachgewiesene unterschiedlich häufige Auftreten verschiedener Ribotypen bei Kindern und Erwachsenen eine Rolle (Stoesser *et al.* 2011; Davies *et al.* 2016). So ist es beispielsweise, wie in 4.1.1 bereits erwähnt, denkbar, dass die unterschiedliche Zusammensetzung des Mikrobioms in den verschiedenen Altersklassen die Grundlage für eine Besiedlung mit unterschiedlichen Ribotypen bildet.

4.2.2 Antibiotikaresistenzen

Wie bereits in 4.1.2 erwähnt fand sich in dieser Arbeit eine relativ geringe Rate an Antibiotikaresistenzen. Unter den 137 Isolaten waren ein Metronidazol-resistentes (0,73 %), kein Vancomycin-resistentes (0 %), 16 Erythromycin-resistente (11,68 %), zwei Moxifloxacin-resistente (1,5 %) und kein Rifampicin-resistentes (0 %) Isolat. Im Gegensatz zu diesen Zahlen zeigen Studien an Erwachsenen vor allem für die Antibiotika Erythromycin und Moxifloxacin zum Teil deutlich höhere Resistenzraten. Zwar variieren diese je nach Land und Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen, jedoch liegen die Prozentzahlen im Durchschnitt deutlich über denen der im Rahmen dieser Arbeit bei Kindern unter einem Jahr gefundenen (Banawas 2018). So zeigte sich beispielsweise in einer von 2000-2009 in Süddeutschland an Erwachsenen durchgeführten Studie ein Anteil von 76 % Erythromycin resistenten und ein Anteil von 68 % Moxifloxacin resistenten Isolaten (Reil *et al.* 2012). Auch eine Untersuchung in England im Zeitraum von 2007-2008 zeigte hohe Resistenzraten für diese beiden Antibiotika (Brazier *et al.* 2008). Studien aus Deutschland bezüglich Resistenzen gegen Rifampicin konnten nicht gefunden werden. In einer europäischen Studie von 2012 bis 2014 zeigte sich jedoch ein Anteil 13 % Rifampicin resistenter Isolate, in einer von 2011-2017 in den USA durchgeführten Studie ein Anteil von 25 % (Freeman *et al.* 2015; Tickler *et al.* 2019). Verglichen mit den Daten dieser Arbeit (keine Rifampicin Resistenzen) weisen diese Werte auf vermehrte Resistenzen bei Erwachsenen im Gegensatz zu Kindern unter einem Jahr hin. Im Gegensatz zu Erythromycin, Moxifloxacin und Rifampicin zeigen die regelhaft in der Therapie einer CDI eingesetzten Antibiotika Metronidazol und Vancomycin auch bei Erwachsenen nach wie vor eine gute Wirksamkeit gegen *C. difficile*. So wies die oben erwähnte, von 2012 bis 2014 in Europa durchgeführte Studie nur bei 0,11 % der untersuchten Stämme eine Resistenz gegen Metronidazol und bei 2,3 % der Stämme eine Resistenz gegen Vancomycin nach (Freeman *et al.* 2015). Außerhalb Europas wurde jedoch mit Beginn der 2000er Jahre zum Teil ein vermehrtes Versagen der Therapie

mit Metronidazol festgestellt. So konnten laut einer 2005 in den USA durchgeführten Studie nur 50 % der Patienten mit einer CDI initial durch die Gabe von Metronidazol geheilt werden (Musher *et al.* 2005). Zwar ist das Nicht-Ansprechen der Therapie nicht zu hundert Prozent mit einem Vorliegen von Resistenzen gleichzusetzen, jedoch legt es eine hohe Zahl solcher nah. Weitere Studien aus den USA und Kanada aus den Jahren 2005 und 2007 wiesen darauf hin, dass sich Metronidazol vor allem bei schweren Verläufen einer CDI weniger wirksam zeigt als Vancomycin und dass es nach der Gabe von Metronidazol zunehmend zu Rezidiven kommt (Pepin *et al.* 2005b; Zar *et al.* 2007). Eine von 2012 bis 2015 in China durchgeführte Studie zeigte sogar bei 15,6 % der Patienten eine vollständige Resistenz gegen Metronidazol (Jin *et al.* 2017). 2012 wurde im Rahmen einer US-amerikanischen Studie auch für Vancomycin eine Resistenzrate von 17,9 % aufgezeigt (Snydman *et al.* 2015).

Für die bei Erwachsenen im Gegensatz zu den bei Kindern gefundenen erhöhten Resistenzraten lassen sich mehrere Gründe annehmen. Zum einen scheint es Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen Ribotypen bei Kindern und Erwachsenen zu geben (siehe 4.2.1). Da einige Ribotypen typischerweise Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika aufweisen, lässt sich ein häufigeres Auftreten dieser bei Erwachsenen als bei Kindern vermuten. Insbesondere die im Gegensatz zu Kindern bei Erwachsenen weite Verbreitung des gegen Erythromycin und Moxifloxacin resistenten Ribotyps 027 bietet eine Erklärung für die gefundenen Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Darüber hinaus liegen zwischen den beiden Populationen, wie bereits in 4.1.2 angesprochen, mutmaßliche Unterschiede hinsichtlich vorangegangener Antibiotikaexpositionen vor. So hatten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kinder nur zu einem sehr geringen Anteil überhaupt jemals Kontakt zu Antibiotika (6,25 %). Studien an Erwachsenen zeigten hingegen, dass diese vor Ausbruch einer CDI - infolge derer die verursachenden *C.-difficile*-Stämme auf Resistenzen untersucht wurden - zu einem sehr hohen Anteil (63 % - 92 %) Antibiotika eingenommen hatten (Pepin *et al.* 2005a; Chang *et al.* 2007). Andere Studien, die den Zusammenhang zwischen Antibiotikaexposition und Antibiotikaempfindlichkeiten bei Kindern unter einem Jahr untersucht hätten, konnten nicht gefunden werden. Bei Kindern zwischen einem und 18 Jahren wurden jedoch ebenfalls seltener Resistenzen beobachtet als bei Erwachsenen (Kociolek *et al.* 2016). Bei den Kindern dieses Alters wurde gezeigt, dass vor Entwicklung einer CDI seltener als bei Erwachsenen eine Einnahme von Antibiotika vorangegangen war (35 % - 75 %) (Morinville und McDonald 2005; Benson *et al.* 2007; Sandora *et al.* 2011). Es lässt sich dementsprechend vermuten, dass diese vermehrte

Antibiotikagabe bei Erwachsenen einem Selektionsdruck erzeugt, der eine Besiedlung mit resistenten *C.-difficile*-Stämmen begünstigt.

Wie bereits in 4.1.2 beschrieben, zeigte sich in dieser Studie bei 46 der 48 Kinder im zeitlichen Verlauf keine Veränderung der Resistenzlage, nur bei zwei Kindern konnte eine solche nachgewiesen werden. Zwar gibt es zahlreiche Studien, welche die Antibiotikaempfindlichkeiten von *C. difficile* bei Erwachsenen zu einem einmaligen Zeitpunkt untersucht haben, jedoch konnten keine Studien gefunden werden, im Rahmen derer mehrfach Proben entnommen und auf die Entwicklung von Resistenzen hin untersucht wurden.

4.2.3 Toxingene

Wie bereits in 4.1.3 beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit bei 56 % der Kinder toxische und bei 42 % der Kinder nicht toxische *C.-difficile*-Stämme gefunden. Bei einem Kind konnten sowohl toxische als auch nicht toxische Stämme gefunden werden. Dabei enthielten die toxischen Stämme alle sowohl die Gene für das Toxin A als auch das Toxin B und die nicht toxischen keines der beiden. Bei keinem der Isolate wurde das Gen für das binäre Toxin nachgewiesen. Bei Erwachsenen kommt es im Gegensatz zu Kindern nur selten zu asymptomatischen Besiedlungen mit *C. difficile* (siehe 1.3.3), weshalb es wenige Studien zu diesem Thema gibt. Der Vergleich mit an CDI erkrankten Erwachsenen, welche Gegenstand der meisten *C. difficile* Studien sind, wäre hier dagegen nicht zielführend, da in diesem Fall immer toxische Stämme vorliegen (Lübbert *et al.* 2014). In existierenden Untersuchungen, die sich auf asymptomatisch besiedelte Erwachsene beziehen, wurden jedoch ähnliche Anteile an toxischen und nicht toxischen Stämmen gefunden wie bei den Kindern. Eine 2001 in Japan durchgeführte Studie zeigte 54 % Toxin A und B positiv, 42 % Toxin A und B negativ und 4 % Toxin A negativ, aber Toxin B positiv Stämme (Kato *et al.* 2001). Auch niederländische Untersuchungen in den Jahren 2014 bis 2015 ergaben einen etwas höheren Anteil toxischer (62 %) als nicht toxischer (38 %) Stämme bei asymptomatisch besiedelten Erwachsenen (Terveer *et al.* 2017). Ein etwas anderes Bild zeigte hingegen eine serbische Studie von 2006 bis 2011, bei der die nicht toxischen Stämme (A-/B-) mit 76 % überwogen. Die restlichen 24 % der Stämme waren Toxin positiv, wobei 23 % sowohl Toxin A als auch Toxin B exprimierten und 1 % Toxin A negativ, aber Toxin B positiv war. (Stojanović *et al.* 2012). Hierbei ist allerdings anzumerken, dass in letztgenannter Studie die Toxine selbst im Stuhl untersucht wurden und nicht wie bei unserer Studie und den beiden erstgenannten das Vorliegen der Gene für die Toxine. Da das alleinige

Vorhandensein der Toxingene nicht unbedingt mit einem Vorliegen der Toxine im Stuhl einher geht, ist es denkbar, dass der Anteil der Stämme, welcher die Toxingene enthält auch bei den Patienten der serbischen Studie höher ist (Planche *et al.* 2013). Während bei den Kindern dieser Studie keine *C.-difficile*-Stämme gefunden wurden, die das Gen für das binäre Toxin aufweisen, zeigen einzelne Studien an asymptomatisch besiedelten Erwachsenen einen Anteil von bis zu elf Prozent mit Stämmen, die diese Gene enthielten (Zhang *et al.* 2016; Sheth *et al.* 2019). Der in 4.1.3 beschriebene vermutliche Stammwechsel über die Zeit der Besiedlung des kindlichen Darms mit *C. difficile* konnte auch bei asymptomatischen Erwachsenen nachgewiesen werden (Kato *et al.* 2001).

Wie bereits in 4.1.3 beschrieben, konnte kein Zusammenhang zwischen den Parametern Frühgeburt, Stillen, Geschlecht des Kindes, Infektionen oder der Einnahme von Antibiotika und der Besiedlung mit toxischen oder nicht toxischen *C.-difficile*-Stämmen nachgewiesen werden. Lediglich der Kontakt zu Haustieren verringerte die Anzahl der Nachweise von toxischen Erregern im kindlichen Stuhl signifikant. Studien an Erwachsenen, welche den Einfluss des Lebensumfelds auf das Auftreten von toxischen und nicht toxischen *C.-difficile*-Stämmen untersuchen, konnten nicht gefunden werden. Untersucht wurde ausschließlich der Einfluss einiger der Parameter auf das generelle Vorliegen von *C. difficile*. So wurde in zwei Studien kein Hinweis darauf gefunden, dass das Halten von Haustieren sich auf die Häufigkeit der Besiedlung mit *C. difficile* bei den Tierbesitzern auswirkte (Weese *et al.* 2010; Berinstein *et al.* 2020). Da jedoch bereits mehrfach identische Ribotypen bei Mensch und Tier gefunden wurden, lässt sich eine Übertragung zwischen diesen vermuten, konnte bisher aber nicht bewiesen werden (Lefebvre *et al.* 2006). Da der Einfluss der genannten Parameter auf das generelle Vorliegen von *C. difficile* jedoch nicht Thema dieser Arbeit ist, wird hier nicht genauer darauf eingegangen.

All diese Erkenntnisse sind unter den Limitierungen dieser Arbeit zu betrachten. Da aus jedem Isolat nur vereinzelte Bakterienkolonien kryokonserviert wurden, ist es denkbar, dass bei denselben Kindern noch weitere *C.-difficile*-Stämme mit anderen Eigenschaften vorliegen, diese aber nicht mit in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass bei der statistischen Auswertung des Zusammenhangs der verschiedenen Parameter und dem Vorliegen von toxischen und nicht toxischen *C.-difficile*-Stämmen mit 36 Kindern nur eine geringe Anzahl in die Auswertung eingeschlossen werden konnte. Auch wenn ein signifikanter Einfluss von Haustieren auf das Vorliegen nicht

toxigener *C.-difficile*-Stämme gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass eine größere Population zu deutlich aussagekräftigeren Ergebnissen führen würde.

4.3 Pathogenese und Bedeutung der *C.-difficile*-Besiedlung bei Neugeborenen und Säuglingen

Die Charakteristika der *C.-difficile*-Stämme bei Kindern und Erwachsenen vergleichend, stellt sich zum einen die Frage, warum es - trotz zu einem großen Teil übereinstimmender Eigenschaften der Stämme - bei Kindern unter einem Jahr in Folge einer Besiedlung meist zu keinen Symptomen kommt, bei den Erwachsenen jedoch oft eine CDI die Folge ist. Zum anderen stellt sich die Frage, welche Bedeutung die Besiedlung mit *C. difficile* im Neugeborenen- und Säuglingsalter im späteren Leben eines Menschen hat.

Die Gründe für die im Vergleich zu Erwachsenen bei Kindern unter einem Jahr meist asymptomatisch verlaufende Besiedlung mit *C. difficile* ist seit langer Zeit Gegenstand der Forschung, aber bis jetzt nicht hinreichend geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Theorien wie es zu diesen Unterschieden kommt. Eine denkbare Erklärung wäre, dass bei einer Besiedlung des kindlichen Darms eine geringere Anzahl an Bakterien vorliegt als bei Erwachsenen. Verschiedene Untersuchungen konnten diese Theorie jedoch widerlegen. So fanden sich bei Erwachsenen mit pseudomembranöser Kolitis 10^5 bis 10^9 Bakterien pro Gramm feuchten Stuhls (Bartlett *et al.* 1980). Doch auch bei asymptomatisch besiedelten Kindern konnten bis zu 10^7 Bakterien pro Gramm Stuhl nachgewiesen werden (Stark *et al.* 1982). Obwohl sowohl bei den Erwachsenen als auch bei den Kindern toxische und nicht toxische Stämme vorliegen, wäre auch eine unterschiedliche Menge an produzierten Toxinen bei den beiden Populationen denkbar. Zwar konnten hierzu keine Studien gefunden werden, jedoch wäre es vorstellbar, dass die Toxinproduktion Regulationsmechanismen unterliegt, die beispielsweise von der Ernährung oder der Zusammensetzung der Darmflora abhängig sind. Für diese Überlegung würde sprechen, dass auch bei Erwachsenen das alleinige Vorliegen von Toxingenen nicht automatisch mit dem Vorhandensein von Toxinen einhergeht (Planche *et al.* 2013). Dies weist darauf hin, dass die Toxinproduktion milieuhängigen Regulationsmechanismen unterliegen könnte. Eine sich an diesen Gedanken anknüpfende Theorie zur unterschiedlichen Pathogenese bei Säuglingen und Erwachsenen begründet sich in der verschiedenen Zusammensetzung des Mikrobioms. Möglicherweise bietet das kindliche Mikrobiom, das in den ersten zwölf Lebensmonaten noch starken Veränderungen unterliegt, den toxischen Stämmen aus bisher nicht bekannten

Gründen schlechtere Bedingungen, ihre Wirkung entfalten zu können, als das von Erwachsenen (Palmer *et al.* 2007). Eine ähnliche Überlegung zog schon vor vielen Jahren in Betracht, dass eine parallele Besiedlung mit nicht toxischen *C.-difficile*-Stämmen eine protektive Wirkung haben könnte. So wäre es denkbar, dass durch deren Vorliegen die Ausbreitung der toxischen Stämme im Darm kompetitiv gehemmt wird. Eine solche Wirkung konnte in einer 1983 an Hamstern durchgeführten Studie gezeigt werden, jedoch kommen Mehrfachbesiedlungen auch bei Erwachsenen vor, bei denen diese Auswirkung bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Wilson und Sheagren 1983; Seekatz *et al.* 2018). Als ein weiterer Grund für die Unterschiede zwischen Säuglingen und Erwachsenen wird das Fehlen der Rezeptoren für das Toxin A bei ersteren diskutiert. So konnte 1992 an einer Studie bei neugeborenen Hasen genau dieses festgestellt werden (Eglow *et al.* 1992). Jedoch zeigten andere Studien, dass es bei Hamstern keinen Unterschied zwischen jungen und alten Tieren bezüglich der Bindung des Toxins A gab und auch an humanen kindlichen intestinalen Epithelzellen wurde ein Rezeptor für das Toxin nachgewiesen (Rolfe 1991; Tucker und Wilkins 1991). Eine bisher nicht weiter untersuchte Ursache für das Ausbleiben der Symptome bei Kindern könnte dennoch eine geringere Dichte der Rezeptoren für die Toxine bei Kindern sein. Um dies weiterführend zu untersuchen, fehlen momentan Informationen zu Expressionsraten dieser Rezeptoren bei Kindern. Auch eine bei Kindern noch nicht ausreichende Ausbildung der Komponenten, die an der durch die Toxine ausgelösten Signalkaskade in der Darmschleimhaut beteiligt sind, ist als Ursache für die Unterschiede bei den beiden Populationen denkbar (Adlerberth *et al.* 2014). Neben dieser Möglichkeit wird auch ein möglicher Schutz der Kinder im ersten Lebensjahr durch mütterliche Antikörper diskutiert. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde in einer amerikanischen Studie ein Vergleich zwischen Antikörpern gegen die Toxine A und B im Nabelschnurblut von Müttern und den Antikörpern im Blut von Toxin A und B positiven Neugeborenen durchgeführt. Dabei fiel auf, dass die Konzentration der IgG Antikörper gegen die Toxine A und B im Blut der Toxin-positiven Kinder deutlich höher war, als im Nabelschnurblut. Darüber hinaus wurden bei diesen Kindern auch IgA Antikörper gegen die Toxine nachgewiesen, die im Nabelschnurblut in der Regel nicht zu finden sind. Dies weist darauf hin, dass die bei einer Besiedlung mit toxischen Stämmen vorhandenen Antikörper vom Kind selbst gebildet werden und kein ausreichender, bereits durch die Mutter mitgegebener, Schutz durch Antikörper besteht (Kociolek *et al.* 2019). Zwar spricht die gerade beschriebene Immunantwort dagegen, jedoch wäre auch ein noch nicht vollständig entwickeltes Immunsystem bei Kindern unter einem Jahr als mögliche Ursache für das

Ausbleiben der Symptome denkbar, da eine Entzündungsreaktion mit Beteiligung verschiedener Immunzellen maßgeblich für das Entstehen der Symptome verantwortlich ist (Di Bella *et al.* 2016).

Auch wenn sich die Frage stellt, welche Bedeutung die Besiedlung mit *C. difficile* im ersten Lebensjahr für das spätere Leben eines Menschen hat, nimmt das Immunsystem eine wichtige Rolle ein. Zwar ist die Rolle von Antikörpern bei der Entstehung einer CDI noch nicht genau bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass Menschen, die infolge einer Besiedlung mit toxischen *C.-difficile*-Stämmen eine starke Produktion von Antikörpern aufwiesen, ein geringeres Risiko hatten, einen schweren Krankheitsverlauf zu entwickeln als solche, bei denen die Antikörperproduktion geringer ausfiel (Kyne *et al.* 2000). Dies lässt eine protektive Wirkung von Antikörpern vermuten. Da genau wie bei Erwachsenen auch bei Säuglingen in Folge der Besiedlung mit toxischen Stämmen eine Bildung von Antikörpern nachgewiesen wurde, ist es denkbar, dass diese einen gewissen Schutz vor der Entwicklung einer CDI im späteren Leben bieten (Kociolek *et al.* 2019). Zu welchem Ausmaß und für wie lange dies der Fall ist, ist jedoch unklar. So wurde kürzlich die Hypothese aufgestellt, dass dieser immunologische Schutz nur bis zum hohen Adoleszentenalter bestehe (Kociolek *et al.* 2019). Diese Annahme wurde damit begründet, dass epidemiologische Studien CDI Peaks um den Zeitpunkt des ersten Geburtstages sowie bei älteren Teenagern zeigten (Khanna *et al.* 2013; Wendt *et al.* 2014). Die hohe Zahl an Infektionen bei der ersten Gruppe ließe sich durch den Anteil der Kinder erklären, die als Säuglinge nicht mit toxischen *C.-difficile*-Stämmen besiedelt waren. Schulkinder seien dann zu einem großen Teil entweder als Säuglinge mit toxischen Stämmen besiedelt gewesen oder bereits als Kleinkinder erkrankt, sodass die Anzahl der CDIs abnehme. Der Anstieg bei den älteren Adoleszenten könne als Hinweis auf die dann nachlassende Immunität gedeutet werden (Kociolek *et al.* 2019). Ob die Besiedlung mit *C. difficile* im Säuglingsalter für Krankheitsverläufe im Erwachsenenalter noch eine Rolle spielt, ist also weiterhin unklar. Es lässt sich jedoch annehmen, dass der Immunantwort im Hinblick auf die Pathogenese einer CDI eine starke Bedeutung zukommt. Aus diesem Grund wird derzeit an der Entwicklung von Antikörpern und Impfungen gearbeitet. Die Gabe des Antikörpers Bezlotoxumab, einem Antikörper gegen das Toxin B, konnte in ersten Studien die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs signifikant reduzieren (Wilcox *et al.* 2017).

Sowohl die Pathogenese als auch die Bedeutung der Besiedlung des Darms von Säuglingen mit *C. difficile* sind also weiterhin nicht eindeutig geklärt. Bereits durchgeführte Studien

zeigten einen Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit *C. difficile* und der Veränderung des Mikrobioms bei Kindern unter einem Jahr (Drall *et al.* 2019). Um dieses Wissen zu ergänzen, soll im Anschluss an die vorliegenden Untersuchungen eine Metagenomsequenzierung aller im Rahmen der Studie rekrutierten Stuhlproben durchgeführt werden. Neben den Zusammenhängen zwischen der Besiedlung mit *C. difficile* und der Zusammensetzung des Mikrobioms sollen der Einfluss von Parametern wie der Ernährung des Kindes und der Einnahme von Medikamenten sowie das Vorliegen bestimmter Ribotypen in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Darmflora untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Clostridioides (C.) difficile, ein sporenbildendes Stäbchenbakterium, ist der häufigste Erreger nosokomialer Durchfallerkrankungen in Europa und den USA. Eine Infektion mit dem Erreger tritt vor allem nach der Gabe von Antibiotika auf und kann in schweren Fällen unter anderem zu einer pseudomembranösen Kolitis und einem toxischen Megakolon führen. Für das Krankheitsbild verantwortlich sind vor allem die Toxine A und B, welche im Kolon die intestinale Epithelschicht schädigen. Neben diesen Toxinen exprimieren manche Stämme das sogenannte binäre Toxin, welches mit schwereren Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht wird. Zu diesen Stämmen gehören unter anderem die des Ribotyps 027, der sich seit den 2000er Jahren in Nordamerika und Europa vermehrt ausgebreitet hat. Neben der symptomatischen Infektion mit *C. difficile* kann es auch zu asymptomatischen Besiedlungen kommen. Bei Erwachsenen sind diese nur zu einem geringen Prozentsatz nachzuweisen, bei Kindern bis zum zweiten Lebensjahr jedoch deutlich häufiger. Die Rolle des Erregers in dieser Altersgruppe sowie die möglichen Auswirkungen der Besiedlung auf das spätere Leben sind Gegenstand kontroverser Diskussionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 137 *C.-difficile*-Isolate von 48 Kindern auf das Vorliegen von Antibiotikaresistenzen, Toxingenen und dem Ribotyp 027 untersucht. Die Antibiotikaempfindlichkeit wurde mittels eines E-Tests für die Antibiotika Metronidazol, Vancomycin, Erythromycin, Moxifloxacin und Rifampicin ermittelt. Hierbei fanden sich ein Metronidazol-resistentes (0,73 %), kein Vancomycin-resistentes (0 %), 16 Erythromycin-resistente (11,68 %), zwei Moxifloxacin-resistente (1,5 %) und kein Rifampicin-resistentes (0 %) Isolat. Zwei der Isolate waren dabei gegen mehr als ein Antibiotikum resistent. Die sehr niedrigen Resistenzraten gegen die in der Therapie von *C.-difficile*-Infektionen eingesetzten Antibiotika Metronidazol und Vancomycin stimmen mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien sowohl an Kindern als auch Erwachsenen überein. Für die Antibiotika Erythromycin, Moxifloxacin und Rifampicin konnten in bisherigen Untersuchungen in anderen Teilen der Welt bei Kindern und Erwachsenen höhere Resistenzraten gefunden werden. Dies ist am ehesten auf die ortsabhängigen unterschiedlichen Prävalenzen verschiedener Ribotypen sowie die ebenfalls ortsabhängigen Unterschiede in der Häufigkeit antibiotischer Behandlungen zurückzuführen. Bei 46 der 48 Kinder gab es keine Veränderung der Resistenzlage, nur bei zwei Kindern trat im zeitlichen Verlauf eine anfänglich nicht vorhandene Resistenz gegen Erythromycin auf. Dies ist vermutlich mit einem Wechsel der vorliegenden Stämme zu erklären.

Das Vorliegen der Toxingene für die Toxine A, B und das binäre Toxin wurden mithilfe des „Geno Type CDiff-Tests“ (Hain Life Science) untersucht, welcher auf einer Multiplex-PCR und einer anschließenden Hybridisierung basiert. Bei 20 Kindern (42 %) wurden nicht toxische Stämme nachgewiesen, bei 27 Kindern (56 %) wurden toxische Stämme nachgewiesen, bei einem Kind (2 %) fand sich zunächst ein toxischer, später dann ein nicht toxischer Stamm. Diese Verteilung stimmt mit Ergebnissen aus bisherigen Studien an Kindern vergleichbaren Alters überein. Alle Toxin-positiven Isolate enthielten sowohl den Genlocus für das Toxin A als auch für das Toxin B, jedoch konnte bei keinem der Isolate das Gen des binären Toxins nachgewiesen werden. Vergleichbare Untersuchungen außerhalb Europas wiesen eine Rate von bis zu 20 % nur Toxin B positiver Isolate nach, das binäre Toxin wurde jedoch auch bei diesen nicht nachgewiesen. Bei Erwachsenen hingegen zeigten Studien eine Rate von ca. zehn Prozent an Isolaten, die positiv für das binäre Toxin waren. Die Untersuchung des Einflusses des Lebensumfelds der Kinder auf das Vorliegen der Toxine zeigte für fünf von sechs Parametern keinen Effekt. Lediglich der Kontakt zu Haustieren war mit einem signifikant selteneren Auftreten von Toxinen assoziiert. Andere Studien zu diesem Thema kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Da bei dieser Arbeit nur 36 Kinder in die Untersuchung einbezogen wurden, ist das Ergebnis unter Beachtung der geringen Fallzahl zu betrachten.

Das Vorliegen des Ribotyps 027 wurde mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie getestet. Hierfür wurden spezifische Peak Verschiebungen innerhalb des Massenspektrums genutzt. Dabei zeigte sich keines der 137 Isolate dem Ribotyp 027 zugehörig. Dieses Ergebnis korreliert zum einem mit dem fehlenden Nachweis des binären Toxins und stimmt zum anderen mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien gut überein. Im Gegensatz hierzu zeigten Untersuchungen an asymptomatischen Erwachsenen eine Rate des Ribotyps 027 von ca. zehn Prozent, bei symptomatischen Erwachsenen und älteren Kindern ist dieser Ribotyp noch deutlich häufiger zu finden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem großen Teil mit denen vergleichbarer Studien übereinstimmen und somit bereits existierende Hinweise auf orts- sowie altersabhängige Unterschiede hinsichtlich der Verteilung von Ribotypen sowie der Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen bei *C. difficile* unterstützen.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Khader EN, Badran EF, Shehabi AA (2017): Epidemiological features of *Clostridium difficile* colonizing the intestine of Jordanian infants. *Int J Microbiol* 2017, 1-5
- Adlerberth I, Huang H, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Nord CE, Wold AE, Weintraub A (2014): Toxin-producing *Clostridium difficile* strains as long-term gut colonizers in healthy infants. *J Clin Microbiol* 52, 173-179
- Al-Jumaili IJ, Shibley M, Lishman AH (1984): Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J Clin Microbiol* 19, 77-78
- Aronsson B, Mollby R, Nord CE (1985): Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: Epidemiological data from Sweden, 1980-1982. *J Infect Dis* 151, 476-481
- Arriola V, Tischendorf J, Musuza J, Barker A, Rozelle JW, Safdar N (2016): Assessing the risk of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection with proton pump inhibitor use: A meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37, 1408-1417
- Arvand M, Moser V, Schwehn C, Bettge-Weller G, Hensgens MP, Kuijper EJ (2012): High prevalence of *Clostridium difficile* colonization among nursing home residents in Hesse, Germany. *PLoS ONE* 7, e30183
- Banawas SS (2018): *Clostridium difficile* infections: A global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms. *BioMed Res Int* 2018, 1-9
- Bartlett G, Taylor S, Wen T (1980): *Clostridium difficile* colitis. *Am J Clin Nutr* 33, 2521-2526
- Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL (1977): Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* 136, 701-705
- Bauer MP, Notermans DW, Kuijper EJ (2011): *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. 377, 11
- Benson L, Song X, Campos J, Singh N (2007): Changing epidemiology of *Clostridium difficile* - associated disease in children. *Infect control hosp epidemiol* 28, 1233-1235
- Berger F, Bischoff M, Strauß C, von Müller L, Gärtner B (2017): Auftreten von *Clostridium difficile* Ribotyp 176 in Deutschland. *Epid Bull* 10, 93-95
- Berinstein JA, Steiner CA, Roth KJ, Briggs E, Rao K, Higgins PDR (2020): Association of household pets, common dietary factors, and lifestyle factors with *Clostridium difficile* infection. *Dig Dis Sci* 65, 20
- Bolton RP, Tait SK, Dear PR, Losowsky MS (1984): Asymptomatic neonatal colonisation by *Clostridium difficile*. *Arch Dis Child* 59, 466-472
- Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, Duerden BI, the HPA Regional Microbiology Network C (2008): Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Eurosurveillance* 13, 1-4
- Campbell CT, Poisson MO, Hand EO (2019): An updated review of *Clostridium difficile* treatment in pediatrics. *J Pediatr Pharmacol Ther JPPT* 24, 90-98

-
- Carter GP, Chakravorty A, Pham Nguyen TA, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol SP *et al.* (2015): Defining the roles of *tcdA* and *tcdB* in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *mBio* 6, e00551-15
- Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, Heap JT, Minton NP (2012): Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production. *Appl Environ Microbiol* 78, 4683-4690
- Chandrasekaran R, Lacy DB (2017): The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev* 41, 723-750
- Chang HT, Krezolek D, Johnson S, Parada JP, Evans CT, Gerding DN (2007): Onset of symptoms and time to diagnosis of *Clostridium difficile* - Associated disease following discharge from an acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28, 926-931
- Chaves-Olarte E, Weidmann M, Eichel-Streiber C, Thelestam M (1997): Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *J Clin Invest* 100, 1734-1741
- Clements AC, Magalhães RJS, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV (2010): *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis* 10, 395-404
- Cloud J, Noddin L, Pressman A, Hu M, Kelly C (2009): *Clostridium difficile* Strain NAP-1 Is Not Associated with severe disease in a nonepidemic setting. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7, 868-873
- Coignard B, Barbut F, Blanckaert K, Thiolet JM, Poujol I, Carbonne A, Petit JC, Desenclos JC (2006): Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France, 2006. *Wkly Releases 1997-2007* 11, 3044
- Cózar-Llistó A, Ramos-Martinez A, Cobo J (2016): *Clostridium difficile* infection in special high-risk populations. *Infect Dis Ther* 5, 253-269
- Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, Kong LY, Péchiné S, Wilcox MH, Kuijper EJ (2018): Understanding *Clostridium difficile* colonization. *Clin Microbiol Rev* 31, e00021-17
- Cui Q, Yang J, Niu Y, Qiang C, Li Z, Xu K, Li R, Shi D, Wei H, Zhao X *et al.* (2019): Epidemiological investigation of *Clostridioides difficile* colonization in Chinese community infants. *Anaerobe* 56, 116-123
- Curry SR (2017): *Clostridium difficile*. *Clin Lab Med* 37, 341-369
- Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH (2007): *TcdC* genotypes associated with severe *tcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 45, 215-221
- Daley P, Louie T, Lutz JE, Khanna S, Stoutenburgh U, Jin M, Adedoyin A, Chesnel L, Guris D, Larson KB, Murata Y (2017): Surotomycin versus vancomycin in adults with *Clostridium difficile* infection: primary clinical outcomes from the second pivotal, randomized, double-blind, Phase 3 trial. *J Antimicrob Chemother* 72, 3462-3470
- Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, Group on behalf of the E study (2016): Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium*

-
- difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance* 21, 30294
- Delmée M, Verellen G, Avesani V, Francois G (1988): *Clostridium difficile* in neonates: serogrouping and epidemiology. *Eur J Pediatr* 147, 36-40
- Di Bella S, Ascenzi P, Siarakas S, Petrosillo N, di Masi A (2016): *Clostridium difficile* toxins A and B: insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins* 8, 134
- Drall KM, Tun HM, Morales-Lizcano NP, Konya TB, Guttman DS, Field CJ, Mandal R, Wishart DS, Becker AB, Azad MB *et al.* (2019): *Clostridioides difficile* colonization is differentially associated with gut microbiome profiles by infant feeding modality at 3-4 months of age. *Front Immunol* 10, 2866
- Dubberke ER, Olsen MA (2012): Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clin Infect Dis* 55, S88-S92
- Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, O'Keane CJ, Gong D, Gao N, Xu YL, Walker WA, LaMont JT (1992): Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 90, 822-829
- Elliott B, Androga GO, Knight DR, Riley TV (2017): *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 49, 1-11
- Emele MF, Joppe FM, Riedel T, Overmann J, Rupnik M, Cooper P, Kusumawati RL, Berger FK, Laukien F, Zimmermann O *et al.* (2019): Proteotyping of *Clostridioides difficile* as alternate typing method to ribotyping is able to distinguish the ribotypes RT027 and RT176 from other ribotypes. *Front Microbiol* 10, 2087
- Faust SN, Wilcox MH, Banaszkiwicz A, Bouza E, Raymond J, Gerding DN (2015): Lack of evidence for an unmet need to treat *Clostridium difficile* infection in infants aged <2 Years: Expert recommendations on how to address this issue. *Clin Infect Dis* 60, 912-918
- Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, Wilcox MH (2015): Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect* 21, 248.e9-248.e16
- Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Riley TV, Paterson DL, Foster NF, Huber CA, Clements ACA (2015): Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis* 15, 516
- Garg S, Mirza YR, Girotra M, Kumar V, Yoselevitz S, Segon A, Dutta SK (2013): Epidemiology of *Clostridium difficile*-Associated Disease (CDAD): A shift from hospital-acquired infection to long-term care facility-based infection. *Dig Dis Sci* 58, 3407-3412
- Govind R, Dupuy B (2012): Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog* 8, e1002727
- Greenberg RN, Marbury TC, Foglia G, Warny M (2012): Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. *Vaccine* 30, 2245-2249
- Guery B, Galperine T, Barbut F (2019): *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments. *BMJ* 14609
- Hall IC (1935): Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am J Dis Child* 49, 390

-
- He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB *et al.* (2013): Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 45, 109-113
- Hensgens MPM, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ (2012): Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 67, 742-748
- Hourigan SK, Oliva-Hemker M, Hutfless S (2014): The Prevalence of *Clostridium difficile* infection in pediatric and adult patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 59, 2222-2227
- Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE (2009): Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. *Clin Microbiol Infect* 15, 1170-1173
- Jangi S, Lamont JT (2010): Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51, 2
- Jin D, Luo Y, Huang C, Cai J, Ye J, Zheng Y, Wang L, Zhao P, Liu A, Fang W *et al.* (2017): Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients in eastern China. *J Clin Microbiol* 55, 801-810
- Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H, Saikai T, Kobayashi K, Yamagishi T, Nakamura S (2001): Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 50, 720-727
- Keddis MT, Khanna S, Noheria A, Baddour LM, Pardi DS, Qian Q (2012): *Clostridium difficile* infection in patients with chronic kidney disease. *Mayo Clin Proc* 87, 1046-1053
- Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen SW, Zinsmeister AR (2012): The Epidemiology of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Population-Based Study. *Am J Gastroenterol* 107, 89-95
- Khanna S, Baddour LM, Huskins WC, Kammer PP, Faubion WA, Zinsmeister AR, Harmsen WS, Pardi DS (2013): The epidemiology of *Clostridium difficile* infection in children: a population-based study. *Clin Infect Dis* 56, 1401-1406
- Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T (2008): Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *PEDIATRICS* 122, 1266-1270
- Knight DR, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV (2015): Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Rev* 28, 721-741
- Kobayashi T (1983): Studies on *Clostridium difficile* and antimicrobial associated diarrhea or colitis. *Jpn J Antibiot* 36, 464-476
- Kociolek LK, Patel SJ, Shulman ST, Gerding DN (2015): Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infections in children: a retrospective cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36, 445-451

-
- Kociolek LK, Gerding DN, Osmolski JR, Patel SJ, Snyderman DR, McDermott LA, Hecht DW (2016): Differences in the molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile* isolates in pediatric and adult patients. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 4896-4900
- Kociolek LK, Espinosa RO, Gerding DN, Hauser AR, Ozer EA, Budz M, Balaji A, Chen X, Tanz RR, Yalcinkaya N *et al.* (2019): Natural *Clostridioides difficile* toxin immunization in colonized infants. *Clin Infect Dis* 70, 2095-2102
- Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P (2006): Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 12, 2-18
- Krutova M, Nyc O, Kuijper EJ, Geigerova L, Matejkova J, Bergerova T, Arvand M (2014a): A case of imported *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infection within the Czech Republic which has a high prevalence of *C. difficile* ribotype 176. *Anaerobe* 30, 153-155
- Krutova M, Matejkova J, Nyc O (2014b): *C. difficile* ribotype 027 or 176? *Folia Microbiol (Praha)* 59, 523-526
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000): Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 342, 390-397
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2001): Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357, 189-193
- Lanis JM, Barua S, Ballard JD (2010): Variations in tcdB activity and the hypervirulence of emerging strains of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog* 6, e1001061
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016): Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40, 95-99
- Lefebvre SL, Arroyo LG, Weese JS (2006): Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerg Infect Dis* 12, 1036-1037
- Leitlinie Akute infektiöse Gastroenteritis im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter: siehe GPGE 2019
- Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple: siehe DGVS 2015
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC *et al.* (2015): Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 372, 825-834
- Loo VG, Oughton M, Bourgault A-M, Kelly M, Dewar K, Monczak Y (2005): A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353, 2442-2449
- Louie T, Nord CE, Talbot GH, Wilcox M, Gerding DN, Buitrago M, Kracker H, Charef P, Cornely OA (2015): Multicenter, double-blind, randomized, phase 2 study evaluating the novel antibiotic cadazolid in patients with *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6266-6273
- Lübbert C, Johann C, Kekulé A, Worlitzsch D, Weis S, Mössner J, Behl S, Seufferlein T (2013): Immunsuppressive Behandlung als Risikofaktor für das Auftreten einer *Clostridium-difficile*-Infektion (CDI). *Z Für Gastroenterol* 51, 1251-1258

-
- Lübbert C, John E, von Müller L (2014): *Clostridium Difficile* infection. Dtsch Ärztebl Int 111, 723-731
- Lübbert C, Lippmann N, von Braun A (2018): Neue Leitlinien und Daten zu *Clostridium difficile* - Was ändert sich? DMW - Dtsch Med Wochenschr 143, 787-792
- Martinelli M, Strisciuglio C, Veres G, Paerregaard A, Pavic AM, Aloï M, Martín-de-Carpi J, Levine A, Turner D, Del Pezzo M et al. (2014): *Clostridium difficile* and pediatric inflammatory bowel disease: a prospective, comparative, multicenter, ESPGHAN study. Inflamm Bowel Dis 20, 2219-2225
- Mc Laughlin D, Friedmacher F, Puri P (2014): The impact of *Clostridium difficile* on paediatric surgical practice: a systematic review. Pediatr Surg Int 30, 853-859
- McFarland LV, Brandmarker SA, Guandalini S (2000): Pediatric *Clostridium difficile*: A phantom menace or clinical reality? J Pediatr Gastroenterol Nutr 31, 220
- Morinville V, McDonald J (2005): *Clostridium Difficile*-associated diarrhea in 200 Canadian children. Can J Gastroenterol 19, 497-501
- Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, Hamill RJ (2005): Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. Clin Infect Dis 40, 1586-1590
- Noor A, Krilov LR (2018): *Clostridium difficile* infection in children. Pediatr Ann 47, e359-e365
- Obuch-Woszczatyński P, Lachowicz D, Schneider A, Mól A, Pawłowska J, Ożdżeńska-Milke E, Pruszczyk P, Wultańska D, Młynarczyk G, Harmanus C et al. (2014): Occurrence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 and its closely related PCR-ribotype 176 in hospitals in Poland in 2008-2010. Anaerobe 28, 13-17
- Ozaki E (2004): *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. J Med Microbiol 53, 167-172
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007): Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol 5, e177
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006): Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. PEDIATRICS 118, 511-521
- Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, van Ree R, Thijs C (2008): Toxigenic and non-toxigenic *Clostridium difficile*: determinants of intestinal colonisation and role in childhood atopic manifestations. Gut 57, 1025-1026
- Peng Z, Jin D, Kim HB, Stratton CW, Wu B, Tang Y-W, Sun X (2017): Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 55, 1998-2008
- Pepin J (2004): *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. Can Med Assoc J 171, 466-472
- Pepin J, Saheb N, Coulombe M-A, Alary M-E, Corriveau M-P, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V et al. (2005a): Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis 41, 1254-1260

-
- Pepin J, Alary M-E, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, Godin D, Bourassa C (2005b): Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 40, 1591-1597
- Piepenbrock E, Stelzer Y, Berger F, Jazmati N (2019): Changes in *Clostridium (Clostridioides) difficile* PCR-Ribotype distribution and antimicrobial resistance in a German tertiary care hospital over the last 10 years. *Curr Microbiol* 76, 520-526
- Planche TD, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, O'Connor L, Oakley SJ, Pope CF, Wren MW et al. (2013): Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection. *Lancet Infect Dis* 13, 936-945
- Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L (2007): Increase in *Clostridium difficile* -related mortality rates, United States, 1999 - 2004. *Emerg Infect Dis* 13, 1417-1419
- Reil M, Hensgens MPM, Kuijper EJ, Jakobiak T, Gruber H, Kist M, Borgmann S (2012): Seasonality of *Clostridium difficile* infections in Southern Germany. *Epidemiol Infect* 140, 1787-1793
- Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, Cosentini E, Feil W, Schiessel R, LaMont JT (1995): *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest* 95, 2004-2011
- Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RLP, Donskey CJ (2007): Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term Care facility residents. *Clin Infect Dis* 45, 992-998
- Rolfe RD (1991): Binding kinetics of *Clostridium difficile* toxins A and B to intestinal brush border membranes from infant and adult hamsters. *INFECT IMMUN* 59, 8
- Rousseau C, Levenez F, Fouqueray C, Dore J, Collignon A, Lepage P (2011a): *Clostridium difficile* colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J Clin Microbiol* 49, 858-865
- Rousseau C, Lemee L, Le Monnier A, Poilane I, Pons J-L, Collignon A (2011b): Prevalence and diversity of *Clostridium difficile* strains in infants. *J Med Microbiol* 60, 1112-1118
- Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault A-C, Le Monnier A, Collignon A (2012): *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis* 55, 1209-1215
- Sandora TJ, Fung M, Flaherty K, Helsing L, Scanlon P, Potter-Bynoe G, Gidengil CA, Lee GM (2011): Epidemiology and risk factors for *Clostridium difficile* infection in children: *Pediatr Infect Dis J* 30, 580-584
- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K (2009): *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 5, e1000626
- Seekatz AM, Wolfrum E, DeWald CM, Putler RKB, Vendrov KC, Rao K, Young VB (2018): Presence of multiple *Clostridium difficile* strains at primary infection is associated with development of recurrent disease. *Anaerobe* 53, 74-81

-
- Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Donskey CJ (2010): Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31, 21-27
- Sherertz RJ, Sarubbi FA (1982): The prevalence of *Clostridium difficile* and toxin in a nursery population: a comparison between patients with necrotizing enterocolitis and an asymptomatic group. *J Pediatr* 100, 435-439
- Sheth PM, Douchant K, Uyanwune Y, Larocque M, Anantharajah A, Borgundvaag E, Dales L, McCreight L, McNaught L, Moore C et al. (2019): Evidence of transmission of *Clostridium difficile* in asymptomatic patients following admission screening in a tertiary care hospital. *PLOS ONE* 14, e0207138
- Simon I: Einflussfaktoren auf die Kolonisierung von *Clostridium difficile* bei Neugeborenen und Säuglingen - eine epidemiologische Studie. Med. Diss Göttingen (in Vorbereitung*)
- Snydman DR, McDermott LA, Jacobus NV, Thorpe C, Stone S, Jenkins SG, Goldstein EJC, Patel R, Forbes BA, Mirrett S et al. (2015): U.S.-based national sentinel surveillance study for the epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrheal isolates and their susceptibility to fidaxomicin. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6437-6443
- Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD), Ackermann G, Balmelli C, Barbut F, Bouza E, Brazier J, Delmee M et al. (2011): Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 66, 2227-2234
- Stark PL, Lee A, Parsonage BD (1982): Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: Quantitative Study. *INFECT IMMUN* 35, 5
- Stoesser N, Crook DW, Fung R, Griffiths D, Harding RM, Kachrimanidou M, Keshav S, Peto TE, Vaughan A, Walker AS, Dingle KE (2011): Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* strains in children compared with that of strains circulating in adults with *Clostridium difficile*-associated infection: Fig. 1. *J Clin Microbiol* 49, 3994-3996
- Stoesser N, Eyre DW, Quan TP, Godwin H, Pill G, Mbuvi E, Vaughan A, Griffiths D, Martin J, Fawley W et al. (2017): Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants in Oxfordshire, UK: risk factors for colonization and carriage, and genetic overlap with regional *C. difficile* infection strains. *PLoS ONE* 12, e0182307
- Stoesser NE, Martin J, Mawer D, Eyre DW, Walker AS, Peto TEA, Crook DW, Wilcox MH (2013): Risk factors for *Clostridium difficile* acquisition in infants: importance of study design. *Clin Infect Dis* 56, 1680-1681
- Stojanović P, Stojanović N, Kocić B, Stanković-Đorđević D, Babić T, Stojanović K (2012): Asymptomatic carriers of *clostridium difficile* in Serbian population. *Open Med* 7, 769-774
- Terveer EM, Crobach MJT, Sanders IMJG, Vos MC, Verduin CM, Kuijper EJ (2017): Detection of *Clostridium difficile* in feces of asymptomatic patients admitted to the hospital. *J Clin Microbiol* 55, 403-411
- Tickler IA, Obradovich AE, Goering RV, Fang FC, Tenover FC (2019): Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017. *Anaerobe* 60, 15

* mit freundlicher Genehmigung der Verfasserin

-
- Tleyjeh IM, Bin Abdulhak AA, Riaz M, Alasmari FA, Garbati MA, AlGhamdi M, Khan AR, Tannir MA, Erwin PJ, Ibrahim T et al. (2012): Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection: a contemporary systematic review and meta-analysis. *PloS ONE* 7, e50836
- Toltzis P, Kim J, Dul M, Zoltanski J, Smathers S, Zaoutis T (2009): Presence of the epidemic North American pulsed field type 1 *Clostridium difficile* strain in hospitalized children. *J Pediatr* 154, 607-608
- Trifan A, Stanciu C, Girleanu I, Stoica OC, Singeap AM, Maxim R, Chiriac SA, Ciobica A, Boiculescu L (2017): Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 23, 6500-6515
- Tucker KD, Wilkins TD (1991): Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *INFECT IMMUN* 59, 6
- Vickers RJ, Tillotson GS, Nathan R, Hazan S, Pullman J, Lucasti C, Deck K, Yacyshyn B, Maliakkal B, Pesant Y et al. (2017): Efficacy and safety of ridinilazole compared with vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a phase 2, randomised, double-blind, active-controlled, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis* 17, 735-744
- Viscidi R, Willey S, Bartlett JG (1981): Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* 81, 5-9
- Walk ST, Micic D, Jain R, Lo ES, Trivedi I, Liu EW, Almassalha LM, Ewing SA, Ring C, Galecki AT et al. (2012): *Clostridium difficile* Ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis* 55, 1661-1668
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005): Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet* 366, 1079-1084
- Weese JS, Finley R, Reid-Smith RR, Janecko N, Rousseau J (2010): Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiol Infect* 138, 1100-1104
- Wendt JM, Mu Y, Dumyati GK, Dunn R, Holzbauer SM, Winston G, Johnston HL, Meek JI, Farley MM, Wilson LE et al. (2014): *Clostridium difficile* infection among children across diverse US geographic locations. 133, 10
- Weng MK, Adkins SH, Bamberg W, Farley MM, Espinosa CC, Wilson L, Perlmutter R, Holzbauer S, Whitten T, Phipps EC et al. (2019): Risk factors for community-associated *Clostridioides difficile* infection in young children. *Epidemiol Infect* 147, e172
- Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN (2008): A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 62, 388-396
- Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C et al. (2017): Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 376, 305-317
- Wilson KH, Sheagren JN (1983): Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis* 147, 733-736
- Zaiss NH, Weile J, Ackermann G, Kuijper EJ, Witte W, Nuebel U (2007): A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. *Wkly Releases 1997-2007* 12, 20

-
- Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KMLST, Davis MB (2007): A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis* 45, 302-307
- Zhang X, Wang X, Yang J, Liu X, Cai L, Zong Z (2016): Colonization of toxigenic *Clostridium difficile* among ICU patients: a prospective study. *BMC Infect Dis* 16, 397
- Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH (2008): Increase in *Clostridium difficile*-related hospitalizations among infants in the United States, 2000-2005. *Pediatr Infect Dis J* 27, 1111

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Andreas Zautner für die Vergabe und Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie seine stete und zuverlässige Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Herrn Dr. Wolfgang Bohne für seine hervorragende Betreuung, für seine zahlreichen wertvollen Anregungen sowie für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Auch bei Herrn Priv. Doz. Hendrik Rosewich und Herrn Prof. Groß möchte ich an dieser Stelle für ihre Anregungen und ihre Unterstützung bedanken.

Eine große Hilfe bei der Einarbeitung in die mikrobiologischen Methoden und durch viele wertvolle Ratschläge waren Ines Oehming, Yvonne Laukat, Agnieszka Goretzki, Sabine Ceramella, Larissa Miklos, Sabine Rabenda und Ulrike Bölling. Vielen Dank!

Für die ausgesprochen angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre möchte ich Julian Schwanbeck, Pia Sternisek, Noémie Thieffenat, Emilia Gomez Molero und Sabrina Minatelli danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Julian, der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, nicht müde wurde mir Dinge zu erklären und durch anregende Diskussionen maßgeblich zum Fortschritt meiner Doktorarbeit beitrug.

Auch ohne die Hilfe der zahlreichen weiteren Mitarbeiter des Instituts, vor allem Maik, Ruth, Marco und Herrn Zickenrott wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen. Auch Ihnen gilt mein herzlicher Dank!