

Nosokomialkeim von großer Wichtigkeit und methodische Optionen zu seiner spezifischen diagnostischen Erfassung

Clostridium difficile ist als strikt anaerob lebendes sporenbildendes Stäbchenbakterium Bestandteil der normalen Stuhlflora des Menschen.

Die Besiedlungsrate mit diesem, unter normalen Umständen eher harmlosen Erreger, ist in frühester Kindheit mit bis zu 80 % sehr hoch. Sie nimmt im Laufe des Lebens ständig ab und liegt im Erwachsenenalter bei durchschnittlich nur noch 2–10 %. Unter bestimmten Umständen wie beispielsweise stationärem Krankenhausaufenthalt kann sie jedoch leicht über 30 % steigen. Diese Zunahme hängt stark vom Ausmaß der primären Kontamination der Krankenhausabteilung, des Personals und der Stringenz des örtlichen Hygienemanagements ab.

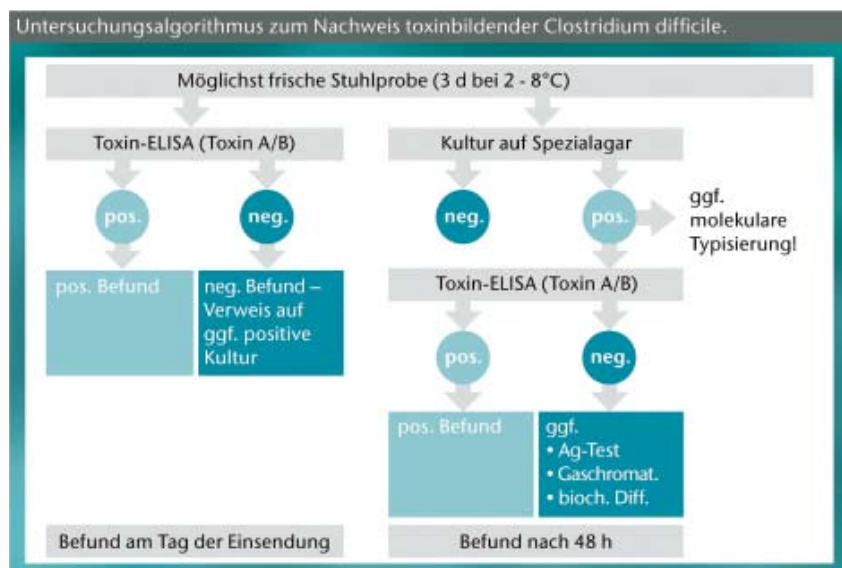
Entscheidend für die zunehmende und heutzutage hohe klinische Bedeutung dieses Nosokomialkeimes ist seine Ausstattung mit Virulenzfaktoren. Zu den sog. „klassischen“ und gleichzeitig wichtigsten Virulenzfaktoren zählen die beiden hochmolekularen Toxinproteine A (Enterotoxin) und B (Zytotoxin). Jedoch besitzen nicht alle Clostridium-difficile-Stämme die Fähigkeit, diese Toxine zu produzieren, weswegen man eine Einteilung in toxische und atoxigene Stämme vornimmt. Letztere machen immerhin einen Anteil von rund einem Drittel aller C.-difficile-Stämme aus. Bei den toxischen Stämmen wiederum gibt es einen nicht unerheblichen Anteil solcher, die nur ein Toxin, und zwar

ausschließlich Toxin B bilden können. Dieser Unterschied ist wichtig für die Diagnostik, wie im Folgenden noch erörtert wird.

Neben der Fähigkeit zur Bildung der Toxine A und B tauchen in den letzten Jahren jedoch zunehmend Stämme auf, die sich durch eine Reihe weiterer Virulenzmerkmale wie z.B. zunehmende Resistenz gegen verschiedene Antibiotika und verstärkte Produktion von Toxinen auszeichnen. Derartige Entwicklungen machen den Keim zu einem wirklichen „reemerging germ“, dessen Pathogenität sich nicht mehr allein nur auf Personen beschränkt, die infolge einer antibiotischen Behandlung an einer Clostridium-difficile-Infektion (CDI) erkranken aufgrund der breiten und zunehmenden Resistenz der Clostridienstämme gegen die eingesetzten Antibiotika, sondern auch zunehmend unbehandelte und nicht hospitalisierte Personen erfasst. Das bedeutet, dass es nicht mehr notwendigerweise einer Antibiotika-bedingten Unterdrückung

der physiologischen Darmflora bedarf, um eine ungehemmte Vermehrung von Clostridium difficile zu ermöglichen. Die CDI geht somit weit über die sog. Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (AAD), die ohnedies neben einer Reihe weiterer Keime wie beispielsweise Clostridium perfringens und Staphylococcus aureus nur zu etwa 25 % durch C. difficile verursacht ist, hinaus. Als wesentliche und lebensbedrohliche Krankheitsbilder gelten die pseudomembranöse Colitis (PMC) sowie das toxische Megakolon. Eine nosokomial erworbene CDI hat immense ökonomische Bedeutung mit einem im Durchschnitt um sieben Tage verlängerten Krankenhausaufenthalt und damit verbundenen zusätzlichen nicht unerheblichen Kosten.

Eine schnelle und zuverlässige Diagnostik einer CDI bei entsprechendem Verdacht einer C.-difficile-bedingten Diarrhoe (CDAD) ist deshalb von größter Wichtigkeit. Einmal um eine weitere nosokomiale Verbreitung zu vermeiden, zum



Kist (2007), Krankenhaushygiene up 2 date 2 ; (modifiziert)

anderen um eine bestehende Antibiotikatherapie umzusteuern bzw. eine gezielte Behandlung gegen *C. difficile* einzuleiten. Im Fokus und an erster Stelle einer Therapieentscheidung steht dabei der Nachweis der Toxine A und B. Daneben ist die Erregeranzucht zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz und die Stammtypisierung von Bedeutung. Der reine Nachweis von Clostridium-Antigenen wie z.B. der Glutamatdehydrogenase (GLDH), welche in jüngster Zeit stark propagiert wird, ist hingegen wenig aussagefähig und zudem nicht spezifisch, um eine CDI nachzuweisen. Denn der GLDH-Nachweis kann einerseits nicht zwischen atoxigenen und den eigentlich klinisch relevanten toxischen *C.-difficile*-Stämmen unterscheiden, andererseits muss auf jeden Fall nach einem solchen Antigennachweis immer noch ein die Krankheit beweisender Toxinnachweis geführt werden. Durch einen vorgeschalteten Antigennachweis kommt es neben den vermeidbaren zusätzlichen Kosten nur zu einem unnötigen zusätzlichen Zeitverzug, weswegen sich ein solches Zweistufenverfahren auch bislang noch nicht in der Routinediagnostik durchsetzen konnte. Bedenkt man darüber hinaus, dass bei 2–10% gesunder Erwachsener, bei bis zu 80% aller Kleinkinder bis zwei Jahren und bei etwa 30% der hospitalisierten Patienten *C. difficile* nachgewiesen werden kann, ohne dass spezifische Krankheitssymptome bei diesen Personen vorliegen, dann wird klar, dass ein Antigennachweis nicht wirklich zielführend ist. Selbst bei klinisch-anamnestic Verdacht auf eine CDI findet man immer noch in etwa 30% aller *C.-difficile*-Isolate von diesen Patienten, dass es sich um atoxigene Stämme handelt, die nicht in der Lage sind, die für eine CDAD notwendigen Toxine A und B zu bilden.

Aus diesen Erwägungen heraus muss dem Nachweis der Toxine A

und B die höchste Priorität bei Verdacht einer CDI eingeräumt werden. Ein von zahlreichen Fachleuten vorgeschlagener Untersuchungsalgorithmus hingegen, der parallel zum frühen Toxin-Elisa auch noch die kulturelle Anzucht vorsieht und dadurch neben der Möglichkeit einer Resistenzbestimmung und Ribotypisierung auch noch einen zweiten Toxintest aus der Kultur ermöglicht, sofern der erste Test direkt aus der Stuhlprobe mangels Erreger und Toxinmenge noch negativ war, ist eindeutig von Vorteil gegenüber all jenen Untersuchungsalgorithmen, die in irgendeiner Stufe der Untersuchung einen Antigennachweis vorsehen.

Die gegenwärtig verfügbaren und seit Jahren bewährten Toxin-A/B-Elisas zeigen unter kontrollierten Bedingungen eine hinreichend gute Sensitivität zum Nachweis der klinisch relevanten Toxine. Die schweren und mittlerweile meldepflichtigen Verlaufsformen einer CDI (toxisches Megacolon, PMC) werden ohnedies rein klinisch gestellt und entsprechend therapiert, ohne dass ein Labortest erforderlich ist.

Ein entscheidender und in jüngster Zeit häufig diskutierter Punkt einer zuverlässigen Diagnostik ist die Stabilität der Toxine A und B in der Stuhlprobe. In diesem Punkt ist die Literatur weder eindeutig noch liegen systematische Untersuchungen zur Stabilität der Toxine vor.

Während die Stuhlproben für den Nachweis der Toxine (Toxin B) im Zytotoxtest, der immer noch als Goldstandard angesehen wird, relativ frisch sein müssen, damit die biologische In-vivo-Aktivität erhalten bleibt, ist für den rein immunologischen Nachweis der Toxine im Elisa-Test eine Lagerung der Stuhlproben bei 2–8 °C für maximal drei Tage möglich. Für eine längere Lagerung muss die Stuhlprobe bei

mindestens –20 °C eingefroren werden. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren sollte jedoch vermieden werden.

Wenn die schnelle Verbringung einer auf *C. difficile* Toxin B zu untersuchenden Stuhlprobe in die zytotoxische Zellkultur nicht gewährleistet werden kann, dann relativiert sich diese Nachweismethode als Goldstandard entscheidend. Es muss dann aus der Probe zunächst eine Anreicherung des Erregers erfolgen, um danach aus dem Kulturfiltrat den Zytotox-Test zu machen. Dadurch verzögert sich die Diagnose entscheidend, sodass der Toxinnachweis mittels Elisa oder membrangebundenem Schnelltest aus der Clostridienanreicherung einen deutlichen Zeitvorsprung in der Diagnosestellung bedeutet.

Neuere Trends, mittels PCR die Toxingene nachzuweisen, bringen sicherlich einen Sensitivitätsvorteil, haben allerdings den Nachteil, nicht sicher zu beweisen, dass tatsächlich exprimierte und eine CDAD beweisende Toxine in der Stuhlprobe vorliegen. Bei einem latenten Clostridienträger – und davon gibt es wie oben erwähnt nicht wenige – kann der vermutlich als durch Clostridium *difficile* verursachte Durchfall auch zahlreiche andere Ursachen haben.

So bleibt letzten Endes der direkte Nachweis vorhandener Toxine A und B mittels Immunoassays kausal die zuverlässigste, schnellste und kostengünstigste Methode zur Identifikation einer durch Clostridium *difficile* verursachten Diarrhoe.

Helmut Leidinger
Product Manager Clinical Diagnostics
R-Biopharm AG, Darmstadt
Tel.: 06151/8102-26
h.leidinger@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com