

# Nationale Referenzzentrale für *Clostridium difficile*

## Jahresbericht 2012

Österreichische Agentur für  
Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES)  
Institut für medizinische Mikrobiologie  
und Hygiene Wien  
Währingerstr. 25a  
A-1096 Wien  
Tel. 050 555 37111  
E-Mail: [humanmed.wien@ages.at](mailto:humanmed.wien@ages.at)

Ansprechpersonen:  
Dr. Alexander Indra  
Dr. Steliana Huhulescu

### Zusammenfassung

Im Jahr 2012 wurden 229 Einsendungen an die österreichische Referenzzentrale für *Clostridium difficile* übermittelt, 199 davon waren Reinkulturen und 30 waren Stuhlproben. Der PCR-Ribotyp 027 fand sich bei 142 (67 %) der 212 typisierten Isolate des Jahres 2012. Diese Isolate zeigten eine sehr hohe molekularbiologische Verwandtschaft zu dem in den Jahren 2008-2009 erstmals beschriebenen Wiener PCR-Ribotyp 027-Ausbruchsstamm. Im Jahr 2012 wurden der Referenzzentrale elf tödlich verlaufende *C. difficile*-Infektionen bekannt. Die in vitro-Resistenztestung von 212 Isolaten mittels E-Test zeigte, dass 77 % gegenüber Moxifloxacin nicht empfindlich waren.

### Summary

In the year 2012 a total of 229 samples (30 stool samples and 199 culture isolates) were sent to the Austrian national reference centre for *Clostridium difficile*. PCR-ribotype 027 accounted for 142 of 212 typed isolates (67 %). The PCR-ribotype 027 isolates of 2012 proved to be closely related with a strain initially described during an outbreak affecting Vienna in 2008-2009. Fatal outcome was reported for eleven cases. In vitro-susceptibility testing using Epsilon-tests was performed on 212 isolates; 77% were not susceptible to moxifloxacin.

## Einleitung

*Clostridium difficile*, ein grampositives, sporenbildendes, obligat anaerob wachsendes Stäbchenbakterium, ist ein ubiquitärer Keim, der den Darm von Mensch und Tier besiedeln kann und auch in der Umwelt (in Erde und in aquatischem Milieu) über längere Zeit überdauert [1,2]. Es gilt seit langem als Erreger der pseudomembranösen Kolitis. Zu Beginn des neuen Millenniums wurde ein Anstieg der Prävalenz von *Clostridium difficile*-Infektionen (CDI), deren Schweregrad, sowie ein vermehrter Nachweis der sogenannten "hochvirulenten Ribotypen" 027 und 078 registriert. Diese *Clostridium difficile*-Stämme besitzen die Fähigkeit, ein Mehrfaches an Toxin A oder B zu bilden, sowie auch das sog. binäre Toxin zu produzieren [3]. Man geht davon aus, dass 0 bis 3 % der Erwachsenen und bis zu 80% der Säuglinge mit *Clostridium difficile* kolonisiert sind, ohne dass Krankheitssymptome auftreten [3,4]. Bei hospitalisierten Patientinnen und Patienten ist die Besiedelungsrate wesentlich höher und kann, je nach Dauer des Krankenhausaufenthaltes und nach Art des Kontaktes mit besiedelten oder erkrankten Bettnachbarn, 13-50 % betragen. CDI wurde auch beim Krankenhauspersonal beschrieben [5]. *Clostridium difficile*-Infektion ist die häufigste bakterielle Ursache der nosokomialen Gastroenteritis. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich fäkal-oral (als Schmierinfektion von Mensch zu Mensch, auf direktem oder indirektem Weg). Die Quelle kann exogen oder endogen sein. Die Rolle von tierischen Lebensmitteln als Quelle von CDI wird kontrovers diskutiert [6]. Die 19. Verordnung des Bundesministers für Gesundheit hinsichtlich einer Änderung der Verordnung betreffend anzeigepflichtige übertragbare Krankheiten, ausgegeben am 18.01.2010, führte die Meldepflicht von schweren CDI-Fällen ein [7,8].

## Ergebnisse

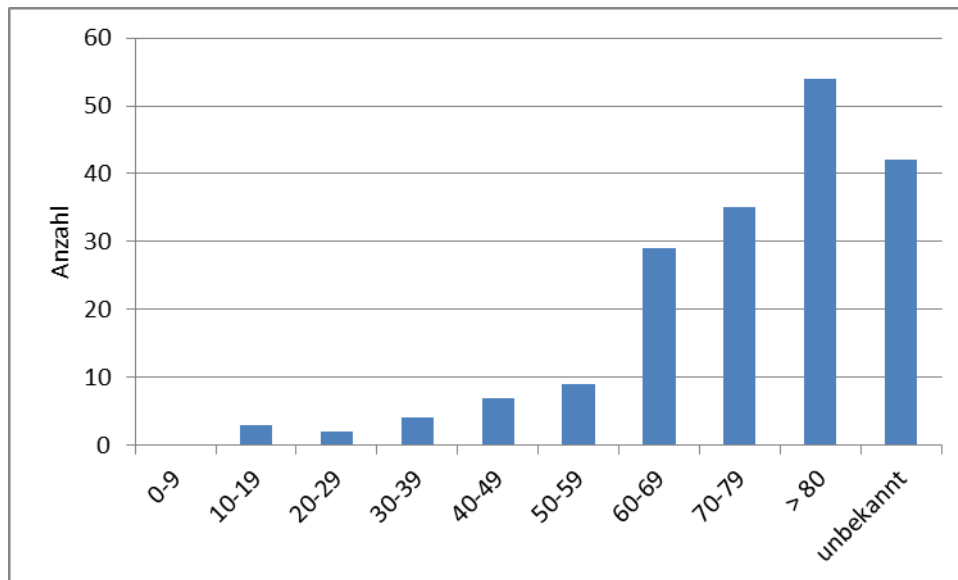
Im Jahr 2012 wurden 229 *Clostridium difficile*-Proben an die Referenzzentrale gesandt; 199 der Proben waren Reinkulturen und 30 waren native Stuhlproben. Von diesen Einsendungen waren 137 von weiblichen und 79 von männlichen Patienten. Die meisten Einsendungen (88 % aller eingesandten Proben) kamen aus Wien ( $n=180$ ) und Salzburg ( $n=22$ ) (

Tabelle 1). Abbildung 1 gibt für die Einsendungen die Altersverteilung der Patientinnen und Patienten wider.

**Tabelle 1:** Herkunft der 229 *Clostridium difficile*-Proben nach Bundesländern

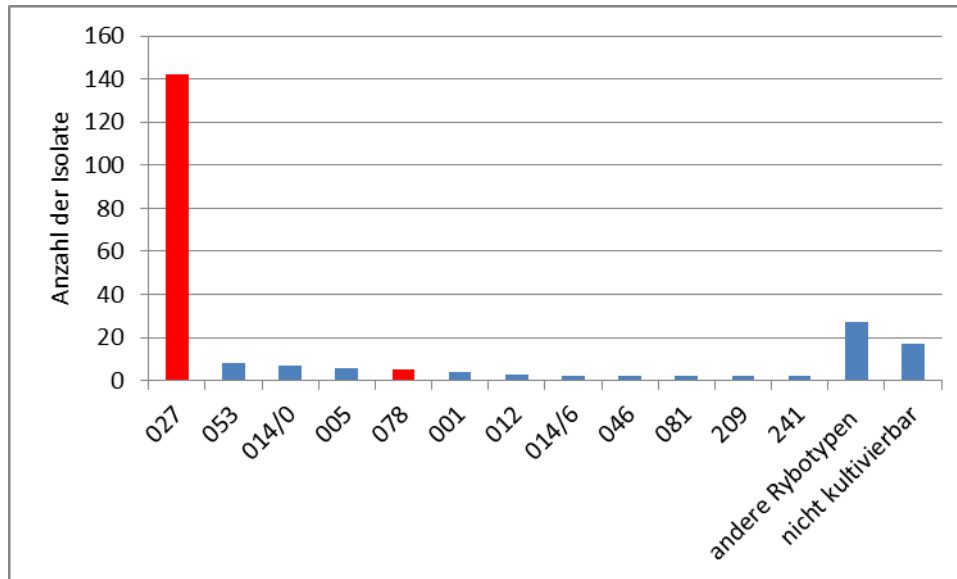
Bundesland	Anzahl Proben Referenzzentrale
Wien	180
Salzburg	22
Kärnten	0
Burgenland	13
Steiermark	10
Tirol	1
Vorarlberg	0
Niederösterreich	2
Oberösterreich	1

**Abbildung 1:** Altersverteilung der Patientinnen und Patienten von denen im Jahr 2012 *C. difficile*-Proben an die nationale Referenzzentrale eingesandt wurden.



*Clostridium difficile* war aus 17 Einsendungen (zehn Kultureinsendungen und sieben Stuhleinsendungen) nicht anzüchtbar. Der am häufigsten isolierte PCR-Ribotyp war der als hypervirulenter Stamm bezeichnete PCR-Ribotyp 027, mit 142 Isolaten ( $n=132$  aus Wien, sechs Isolate aus dem Burgenland, zwei Isolate aus Salzburg und jeweils ein Isolat aus Niederösterreich und Steiermark) gefolgt von Ribotyp 053 mit acht Isolaten, 014/0 mit sieben Isolaten, 005 mit sechs und 078 mit fünf (Abbildung 2).

**Abbildung 2:** Anzahl der in der Referenzzentrale im Jahr 2012 mittels PCR-Ribotyping typisierten *Clostridium difficile*-Isolate ( $n = 212$ ). Binär-Toxin positive Ribotypen sind mit roter Farbe hervorgehoben.



Die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika wurde bei 212 Isolaten mittels E-Test für vier Antibiotika bestimmt. Getestet wurden: Metronidazol, Vancomycin, Clindamycin und Moxifloxacin. Für 206 Isolate wurden weitere zwei Antibiotika getestet: Rifampicin, mittels E-Test und Rifaximin mittels Blättchendiffusionstest. Die Interpretationskriterien sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Alle Isolate waren in vitro empfindlich gegen Metronidazol und Vancomycin. Gegenüber Clindamycin wiesen 64 % der Isolate eine reduzierte Empfindlichkeit auf und 77 % zeigten eine reduzierte Empfindlichkeit ( $n=2$ ) oder eine hochgradige Resistenz ( $n=161$ ) gegenüber dem Fluorchinolon. Dieses Ergebnis spiegelt den hohen Anteil von Ribotyp 027 bei den getesteten Isolaten wider. Von 142 getesteten Isolaten des PCR-RT027 wiesen 139 eine in vitro Resistenz gegenüber Moxifloxacin auf. Bei 13 % der getesteten 206 Isolate ließ sich eine Resistenz gegenüber Rifampicin und Rifaximin nachweisen (Abbildung 3).

**Tabelle 2:** Cut-off-Werte der Nationalen Referenzzentrale für *Clostridium difficile* (MHK = minimale Hemmkonzentration; HH = Hemmhofdurchmesser)

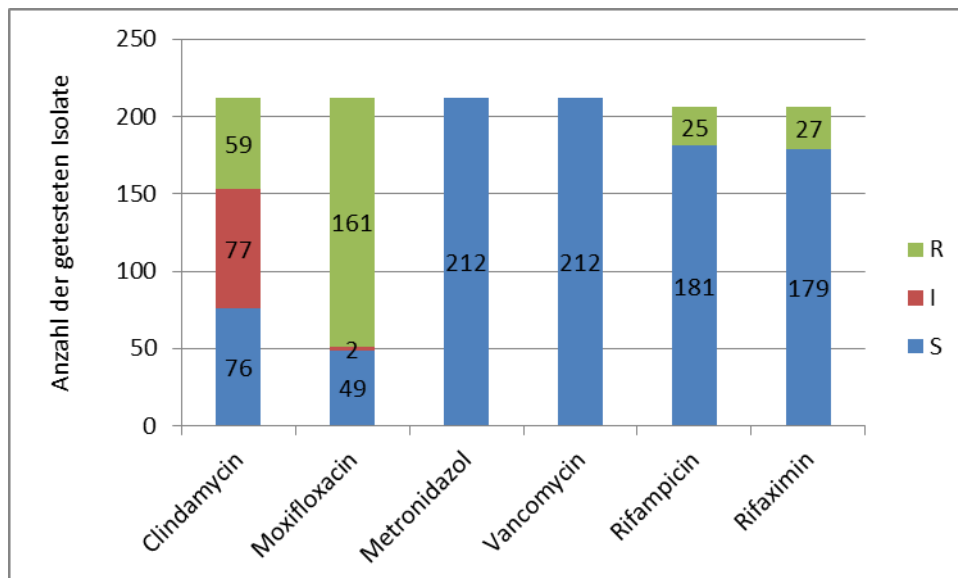
Substanz	MHK (µg/ml)			HH (mm)		
	Resistent (R) µg/ml	Intermediär (I) µg/ml	Sensibel (S) µg/ml	Resistent (R) mm	Intermediär (I) mm	Sensibel (S) mm
Metronidazol*	> 2	-	≤ 2			
Vancomycin*	> 2	-	≤ 2			
Clindamycin**	≥ 8	4	≤ 2			
Moxifloxacin**	≥ 8	4	≤ 2			
Rifampicin***	≥ 32	0,012-16	≤ 0,006			
Rifaximin (40µg)***				< 38	-	≥ 38

\* Interpretation: nach EUCAST – Kriterien

\*\* Interpretation: nach CLSI - Kriterien

\*\*\* Interpretation nach Huhulescu *et al.* [9]

**Abbildung 3:** Ergebnisse der in vitro Empfindlichkeitstestung von 212 *C. difficile*-Isolaten des Jahres 2012 (R: resistent; I: intermediär; S: sensibel)

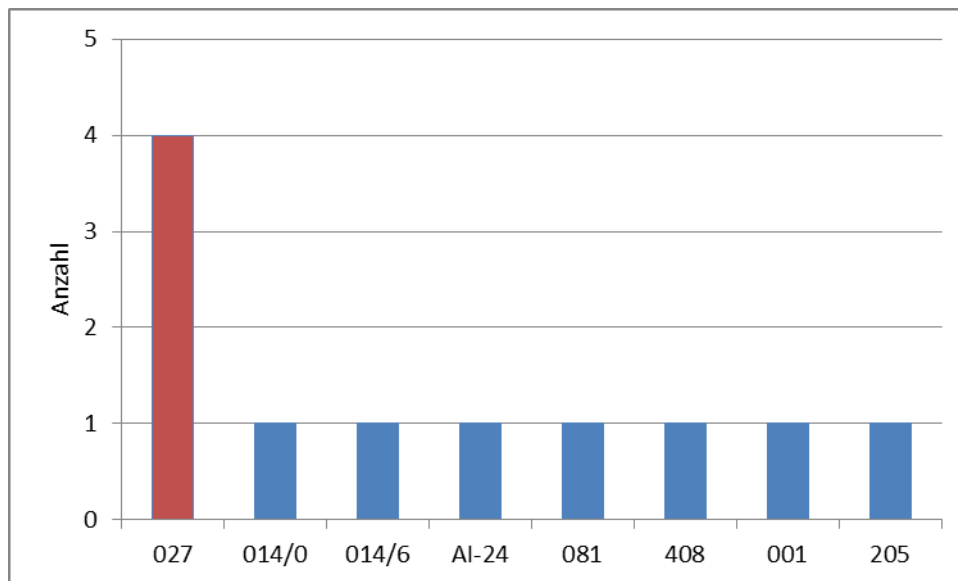


Bei 100 der 212 in der Referenzzentrale untersuchten Isolate konnten auch Daten zu den *C. difficile*-assoziierten Krankheitssymptomen ausgewertet werden.

Antibiotikagabe wurde bei 18 und Antazidagabe bei 11 Patientinnen und Patienten angeführt. Das häufigste Symptom war Durchfall in 86 Fällen, schwere Verläufe von CDI wurden in 17 Fällen mitgeteilt. Eine CDI ist laut Falldefinition der AGES dann als schwer zu werten, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist: 1. wenn es sich um eine CD assoziierte Erkrankung handelt, die intensivmedizinischer Behandlung bedarf oder 2. wenn eine CD assoziierte Erkrankung vorliegt, die aufgrund damit verbundener Komplikationen, wie Darmperforation oder therapierefraktärer Kolitis, chirurgischer Behandlung bedarf oder 3. eine CD assoziierte Erkrankung mit letalem Ausgang, wobei die Erkrankung in direktem oder

indirektem kausalen Zusammenhang mit dem letalen Ausgang stehen muss. Ribotyp 027 wurde bei vier verstorbenen Patientinnen und Patienten isoliert, für die restlichen Todesfälle zeichneten RT 014/0, 014/6, AI-24, 408, 205, 001 und 081 verantwortlich (Abbildung 4). Laut Epidemiologischen Meldesystem (Quelle: vorläufiger Jahresbericht 2012 vom 14.1.2013) verstarben im Jahr 2012 infolge einer *C. difficile* Infektion 55 Patientinnen und Patienten, was bei 159 gemeldeten Fällen eine Letalität von 35 % ergäbe.

**Abbildung 4:** PCR-Ribotypen der elf verstorbenen Patientinnen und Patienten (Binär-Toxin positiv: rot hervorgehoben)



## Diskussion

Im Jahr 2012 fand sich ein überraschend hoher Anteil von PCR-Ribotyp 027 (67 % der an die Referenzzentrale übersandten Isolate und Stuhlproben). Dieser hohe Anteil resultiert vor allem aus Einsendungen von Wien und könnte durch die oftmals beschriebene Hypervirulenz verursacht sein, kann aber auch aus der in Wien weit verbreiteten Anwendung kommerzieller molekularbiologischer Testsysteme für ein Vorscreening auf Ribotyp 027 resultieren. Dieser drastische Anstieg von 027 in Österreich ist besorgniserregend, da eine inhärente Fluorochinolon-Resistenz (98 % der 142 getesteten Isolate) die Weiterverbreitung dieses sog. hypervirulenten Klons, der in Österreich erstmalig im Jahr 2006 nachgewiesen wurde, begünstigt [10]. Während die erste Einschleppung nach Tirol auf einen Einzelfall beschränkt blieb, mündete das Auftreten in Wien in einem offensichtlich noch nicht beherrschten Ausbruch [11-13]. *Clostridium difficile*-Ausbrüche sind schwer beherrschbar und zeigen eine hohe Neigung für Übertragungen auf weitere Abteilungen und Spitäler [14].

In Ostösterreich war in den Jahren vor 2011 PCR-Ribotyp 053 der dominante Ribotyp; im Jahr 2011 wurde 053 nur mehr bei 7 und im Jahr 2012 bei 8 Einsendungen festgestellt. Auffällig war auch der (scheinbare) Rückgang der PCR Ribotypen 001 und 014/0, die ebenfalls in den letzten Jahren zu den häufigsten isolierten Ribotypen gezählt haben. Ribotyp 014/0 wurde in den letzten Jahren europaweit zum am häufigsten isolierten Ribotyp.

Im Jahr 2012 wurden bei 229 Einsendungen an die Referenzzentrale elf (5 %) tödlich verlaufene Erkrankungen registriert, um 6 Fälle weniger als im Vorjahr. Da die Einsendungen einerseits oft vor Kenntnis des finalen Behandlungsausgangs getätigt werden („underreporting“), andererseits aber bei schweren Verläufen (mit erhöhter Letalität) die Wahrscheinlichkeit einer Probeneinsendung erhöht ist („overreporting“), sind die vom Referenzlabor passiv erfragten Sterberaten nur von beschränkter Validität. In einer europaweiten Studie wurde im Jahr 2010 die 3-Monate-Letalität von CDI mit 22 % berichtet, wobei CDI in 40 % dieser Todesfälle ursächlich oder mitursächlich war, was eine CDI-bedingte Letalität von 8,7 % bedeutet [15]. Wenisch *et al.* ermittelten für die Jahre 2008-2010 für ein Wiener Spital eine CDI-Fallsterblichkeit von 17 % (Fallsterblichkeit bei nicht-CDI-Patientinnen und -Patienten: 6,7 %) [16,17]. Somit scheinen sich die Angaben der Referenzzentrale als grober Parameter zur Abschätzung des CDI-Sterblichkeit-Trends zu eignen.

## Danksagung

Wir bedanken uns bei folgenden Einsenderinnen und Einsendern:  
SALK Labor GmbH.; Pathologisch-bakteriologisches Institut Kaiserin Elisabeth Spital Wien; Pathologisch-bakteriologisches Institut Wilhelminenspital Wien; Pathologisch-bakteriologisches Institut KA Rudolfstiftung Wien; Institut für Hygiene und Mikrobiologie Innsbruck; Mikrobiologisches Labor LKH Univ. Klinikum Graz; Institut für Hygiene und Mikrobiologie KH St. Pölten; Institut für Pathologie Landeskrankenhaus Mistelbach; Labor Dr. Breuer Wien; Pathologisch-bakteriologisches Institut Kaiser Franz Josef Wien; Mikrobiologisches Labor AKH Wien; Pathologisch-bakteriologisches Institut Sozialmedizinisches Zentrum Ost Wien; Klinische Pathologie, Mikrobiologie und Infektionsdiagnostik Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern Ried; Pathologisch-bakteriologisches Institut Otto Wagner Spital Wien; KH Göttlicher Heiland Wien; Institut für klinische Pathologie und Mikrobiologie KH Oberwart.

## Literatur

[1] Indra A, Schmid D, Huhulescu S, Hell M, Gattringer R, Hasenberger P, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F (2008) *Characterization of clinical Clostridium difficile isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006–2007. J Med Microbiol.* 57:702-708



- [2] Allerberger F. **Clostridium difficile Infektion** In: **Krankenhaus- und Praxishygiene**. Kramer A., O. Assadian, M. Exner, N.-O. Hübner, A. Simon (Eds.), Elsevier Urban Fischer Verlag, München, 2011, pp. 223-226.
- [3] Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2009) **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI)**. Clin Microb Infect. 15: 1053-1066.
- [3] Hell M, Sickau K, Chmelizek G, Kern JM, Maass M, Huhulescu S, Allerberger F (2011) **Absence of Clostridium difficile stool carriage in asymptomatic volunteers**. BMC Proc. 5:1-1.
- [4] Hell M, Sickau K, Chmelizek G, Kern JM, Maass M, Huhulescu S, Allerberger F (2012) **Absence of Clostridium difficile in asymptomatic hospital staff**. AJIC in press
- [5] Hell M, Indra A, Huhulescu S, Allerberger F. **Clostridium difficile Infection in a Health Care Worker**. Clin Infect Dis. 2009 May 1;48(9):1329
- [6] Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Köfer J, Wagner M (2010) **Clostridium difficile in raw products of animal origin**. Int J Food Microbiol. 138:172-175.
- [7] Indra A, Lassnig H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S, Allerberger F (2009) **Clostridium difficile: a new zoonotic agent?** Wien Klin Wschr. 121:91-95
- [8] Bundesministerium für Gesundheit, 2010. **Änderung der Verordnung betreffend anzeigepflichtige übertragbare Krankheiten 2009, Bundesgesetzblatt II Nr.19/2010** [https://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblAuth/BGBLA\\_2010\\_II\\_19](https://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblAuth/BGBLA_2010_II_19)
- [9] Huhulescu S, Sagel U, Fiedler A, Pecavar V, Blaschitz M, Wewalka G, Allerberger F, Indra A. **Rifaximin disc diffusion test for in vitro susceptibility testing of Clostridium difficile**. J Med Microbiol 2011;60(8):1206-1212.
- [10] Indra A, Huhulescu S, Hasenberger P, Schmid D, Alfery C, Würzner R, Fille M, Gattringer K, Kuijper E, Allerberger F (2006) **First isolation of Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Austria**. Eurosurveillance, Volume 11, Issue 37, 14 September
- [11] Indra A, Huhulescu S, Kernbichler S, Kuo HW, Feierl G, Holler A, Skrabal F, Tucek G, Allerberger F (2008) **First cases of Clostridium difficile PCR ribotype 027 acquired in Austria**. Eurosurveillance Edition 2008: Volume 13/ Issue 20 Article 3
- [12] Indra A, Huhulescu S, Fiedler A, Kernbichler S, Blaschitz M, Allerberger F. **Outbreak of Clostridium difficile 027 infection in Vienna, Austria 2008-2009**. Euro Surveill. 2009 Apr 30;14(17). pii: 19186
- [13] Kasper S, Schmid D, Indra A, Ulrich W, Masoud H, Eberl S, Huhulescu S, Allerberger F (2011) **C. difficile in a hospital in Vienna before and after implementation of CDI control measures, Austria 2009-2010**. Abstract 21.113. Abstract Proceedings of the International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance IMED 2011, Vienna, February 4-7, 2011; pp. 170-171.
- [14] Kuijper EJ, Barbut F, Brazier J, Kleinkauf N, Suetens C, Drudy D, Fitzpatrick F, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Delmée M, Coignard B, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Bouza E, Åkerlund T, Virolainen-Julkunen A, Ingebretsen A, Poxton IR, Tüll P, Monnet D (2008) **Update of Clostridium difficile-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe**. Euro Surveill. 2008;13(31):pii=18942. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18942>
- [15] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT and Kuijper EJ, for the ECDIS Study Group (2010) **Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey**. Lancet 377(9759):63-73

[16] Wenisch JM, Schmid D, Tucek G, Kuo HW, Allerberger F, Michl V, Tesik P, Laferl H, Wenisch C (2012) **A prospective cohort study on hospital mortality due to Clostridium difficile infection.** Infection in press

[17] Wenisch JM, Schmid D, Kuo HW, Simons E, Allerberger F, Michl V, Tesik P, Tucek G, Wenisch C (2012) **Hospital-acquired Clostridium difficile infection: Determinants for severe disease.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. DOI 10.1007/s10096-011-1522-5