

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. R. Handgretinger
In Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Clostridium-difficile-Nachweis bei CF-Patienten:
Prävalenz, klinische und sonographische Befunde
bei Patienten der Tübinger Universitäts-Kinderklinik**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Birgit Dietsche
aus
Überlingen**

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Liste der verwendeten Abkürzungen | III |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Pathogenese der Zystischen Fibrose (CF) | 1 |
| 1.2 Clostridium difficile..... | 4 |
| 1.3 Fragestellung..... | 7 |
| 2 Material und Methoden..... | 9 |
| 2.1 Patienten | 9 |
| 2.2 Methoden..... | 10 |
| 2.2.1 Studienablauf | 10 |
| 2.2.1.1 Querschnittstudie | 10 |
| 2.2.1.2 Längsschnittstudie..... | 11 |
| 2.2.2 Erhebung der mikrobiologischen Daten | 12 |
| 2.2.2.1 Probenentnahme und Transport | 12 |
| 2.2.2.2 Kultureller Nachweis..... | 12 |
| 2.2.2.3 Identifizierung von Clostridium difficile | 13 |
| 2.2.2.4 Toxinnachweis | 15 |
| 2.2.2.5 Molekularbiologischer Nachweis von <i>tcdB</i> | 16 |
| 2.2.2.5.1 DNA-Extraktion | 16 |
| 2.2.2.5.2 PCR | 16 |
| 2.2.3 Erhebung der klinischen Daten | 18 |
| 2.2.3.1 Fragebogen zur Querschnittstudie | 18 |
| 2.2.3.2 Fragebögen zur Längsschnittstudie | 18 |
| 2.2.3.3 Klinische Parameter | 19 |
| 2.2.4 Erhebung der sonographischen Messdaten..... | 20 |
| 2.2.4.1 Untersuchungsablauf | 20 |
| 2.2.4.2 Sonographische Messung der Darmwanddicke | 21 |
| 2.3 Statistische Methoden und Auswertung | 22 |
| 2.3.1 Querschnittstudie | 22 |
| 2.3.2 Längsschnittstudie..... | 24 |
| 3 Ergebnisse..... | 25 |
| 3.1 Klassifizierung der mikrobiologischen Befunde | 25 |
| 3.2 CD-Prävalenz bei CF-Patienten und Kontrollgruppe | 26 |
| 3.3 Mögliche Beziehungen ausgewählter Parameter zu CD-Besiedlung und Toxinexpression bei CF-Patienten..... | 27 |
| 3.3.1 Alter..... | 28 |
| 3.3.2 Geschlecht | 29 |
| 3.3.3 Ernährungszustand | 30 |
| 3.3.4 Lungenfunktion..... | 31 |
| 3.3.5 Krankenhaus- und Rehaaufenthalte..... | 32 |
| 3.3.6 Antibiotikaeinnahme | 33 |
| 3.3.7 Gastrointestinale Beschwerden..... | 34 |
| 3.3.8 Darmwanddicke..... | 35 |
| 3.3.8.1 Ergebnisse der gemessenen Darmwanddicken bei CF- Patienten im Vergleich zu Referenzwerten von gesunden Probanden..... | 35 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.8.2 | Darmwanddicke und Nachweisbarkeit von CD bzw. Toxinexpression | 36 |
| 3.3.9 | Darmmotilitätsstörungen..... | 36 |
| 3.3.9.1 | Distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS)..... | 36 |
| 3.3.9.2 | Mekoniumileus | 37 |
| 3.4 | Längsschnittstudie | 38 |
| 3.4.1 | CD-Besiedlung im Verlauf der Längsschnittstudie | 38 |
| 3.4.2 | In-vivo-Toxinexpression im Stuhl im Verlauf der Längsschnittstudie..... | 41 |
| 3.4.3 | Gastrointestinale Symptome im Verlauf der Längsschnittstudie.. | 41 |
| 4 | Diskussion | 42 |
| 4.1 | Probentransport und -verarbeitung..... | 42 |
| 4.2 | CD-Prävalenz bei CF-Patienten | 43 |
| 4.2.1 | Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der CD-Prävalenz..... | 44 |
| 4.2.2 | Einfluss des Ernährungszustandes und der Lungenfunktion auf die CD-Prävalenz und Toxinexpression | 45 |
| 4.2.3 | Einfluss von Krankenhaus- bzw. Rehaaufenthalt und Antibiotika auf die CD-Prävalenz und Toxinexpression | 47 |
| 4.2.4 | Zusammenhang zwischen gastrointestinalen Beschwerden und Nachweisbarkeit von CD bzw. Toxinexpression..... | 50 |
| 4.2.5 | Zusammenhang zwischen gastrointestinalen Manifestationsformen der Zystischen Fibrose und Nachweisbarkeit von CD bzw. Toxinexpression | 53 |
| 4.2.5.1 | Darmwandverdickung..... | 53 |
| 4.2.5.2 | DIOS | 56 |
| 4.2.5.3 | Mekoniumileus | 57 |
| 4.3 | Bedeutung von CD bei CF | 57 |
| 5 | Zusammenfassung | 59 |
| 6 | Anhang | 60 |
| 6.1 | Anlagen (Fragebögen und Patientenbriefe)..... | 60 |
| 6.2 | Nährmedien und Reagenzien | 80 |
| 6.3 | Hintergrundinformation zur Beurteilung der Darmwanddicke | 82 |
| 6.4 | Patientendaten | 82 |
| 6.5 | Ergebnisse der Querschnittstudie..... | 83 |
| 6.6 | Ergebnisse der Längsschnittstudie..... | 87 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 92 |

Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| AAC | Antibiotika-assoziierte Kolitis |
| AAD | Antibiotika-assoziierte Diarrhoe |
| AB | Antibiotikum / Antibiotika |
| Abb. | Abbildung |
| BMI | Body mass index |
| bp | Basenpaare |
| C. | Kolon |
| CD | Clostridium difficile |
| CF | Zystische Fibrose |
| DIOS | Distales intestinales Obstruktionssyndrom |
| DNA | Desoxiribonukleinsäure |
| EIA | Enzymimmunoassay |
| EZ | Ernährungszustand |
| FEV1 | Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde |
| GC | Gaschromatographie |
| GI-Beschwerden | gastrointestinale Beschwerden |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| Ig | Immunglobulin |
| k.A. | keine Angabe |
| kg | Kilogramm |
| KH | Krankenhaus |
| LSG | Längensollgewicht |
| m | männlich |
| m ² | Quadratmeter |
| MI | Mekoniumileus |
| MIÄ | Mekoniumileus-Äquivalent |
| mm | Millimeter |
| n.u. | nicht untersucht |
| p | probability (Irrtumswahrscheinlichkeit) |
| P | Patient |
| PCR | Polymerase chain reaction |

| | |
|------|--------------------------|
| pH | Wasserstoffionenpotenz |
| PMC | Pseudomembranöse Kolitis |
| Reha | Rehabilitation |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Standard Deviation Score |
| Tab. | Tabelle |
| w | weiblich |

1 Einleitung

1.1 Pathogenese der Zystischen Fibrose (CF)

Die Zystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit der weißen Rasse. In dieser Bevölkerungsgruppe sind 3-5% Träger des auslösenden Gendefektes. Demnach kommt auf ca. 2500 Geburten eine Erkrankung [111,72]. Der zugrunde liegende Defekt des „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“-Gens (CFTR) ist in der Bande 7q31.2 auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert. CFTR kodiert ein Glykoprotein, das den transmembranen Chloridaustausch reguliert [98]. Obwohl prinzipiell alle Körperzellen betroffen sind, wirkt sich der Defekt vor allem auf die Zellen exkretorischer Organe aus. Die fehlende oder mangelnde Ausbildung des Chloridionenkanals führt neben einem erhöhten Kochsalzgehalt des Schweißes vor allem zur Bildung zähflüssiger muköser Sekrete. Die Verlegung der Ausführungsgänge exokriner Drüsen durch den viskösen Mukus resultiert in Funktionsstörungen und pathomorphologischen Veränderungen des Respirationstraktes, Gastrointestinaltraktes und des reproduktiven Systems [111]. Im gesamten Gastrointestinaltrakt wird CFTR auf der apikalen Seite von Epithelzellen exprimiert. Eine Fehlfunktion äußert sich hier außer in abnormer Sekretion in Absorptionstörungen, in Störung der Enzymaktivität und Hormonsekretion sowie der Darmmotilität. Da eine kausale Therapie der CF bis heute nicht möglich ist, basiert die symptomatische Therapie auf der Kompensation der Funktionsstörung der betroffenen Organe und dem Aufhalten sekundärer Defizite und Störungen.

Ausprägung und Verlauf der Erkrankung können individuell sehr unterschiedlich sein, was auf genetische Varianten und eine Vielzahl unterschiedlicher exogener Einflüsse zurückzuführen ist [24]. Obwohl sich bei vielen Patienten bereits im frühen Kindesalter schwere Krankheitserscheinungen manifestieren, erreichen heutzutage die meisten das Erwachsenenalter [18,29]. Für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung sind in erster Linie die pulmonale und die gastrointestinale Manifestation entscheidend [24,27].

Die **pulmonale Manifestation** wird maßgeblich durch die Viskositätszunahme des Bronchialsekrets und die beeinträchtigte mukoziliäre Clearance bestimmt. Die dadurch ausgelöste Sekretretention führt zu einer chronischen Obstruktion und rezidivierenden Infektionen mit komplexen Entzündungsmechanismen. Der Krankheitsverlauf ist durch einen progredienten Verlust von funktionstüchtigem Lungengewebe mit zystisch-fibrotischer Degeneration der Lunge gekennzeichnet. Die Progression dieser Lungendestruktion wird maßgeblich beeinflusst von der schon früh einsetzenden Besiedlung des Respirationstraktes mit pathogenen Bakterien als Auslöser für akute und chronisch-rezidivierende Infektionsprozesse [77,19,46]. Eine der wichtigsten Therapiesäulen stellt daher der frühzeitige und gezielte Einsatz von Antibiotika dar. Durch aggressive und hochdosierte Antibiotikaregimes können heute viele bakterielle Erreger erfolgreich eradiziert oder chronische Infektionsverläufe über Jahre hinausgezögert werden, was mit dazu beigetragen hat, dass die Lebenserwartung von CF-Patienten heute bereits bei durchschnittlich 36J. liegt [107].

Hochvolumige Fettstühle mit unverdauten Nahrungsresten und fauligem, penetrantem Geruch, breiige Durchfälle, Blähungen, Bauchschmerz und ein aufgetriebenes Abdomen gehören zu den dominierenden Symptomen der **gastrointestinalen Manifestation** der Mukoviszidose [30,27]. Hier äußert sich der Gendefekt hauptsächlich an Pankreas, Intestinum und dem hepatobiliären System. Bei den meisten Patienten bestimmt die exokrine Pankreasinsuffizienz mit Maldigestion und Gedeihstörung die Ausprägung. Nur 15% der Patienten sind bei Geburt zunächst noch pankreassuffizient [24,27,30]. Durch die hohe Viskosität des Pankreassekrets entstehen Obstruktion und Dilatation der intra-lobulären Gänge mit nachfolgenden Entzündungsreaktionen, progredienter Fibrose und Destruktion der Drüsenazini [36,27,30]. Mit zunehmender Funktionseinschränkung des Pankreas nimmt die Konzentration der Verdauungsenzyme und die Bikarbonatsekretion ab und sistiert schließlich, was sich bei den meisten Patienten bereits in den ersten Lebensjahren durch schwere Fehlverdauung und Gedeihstörung äußert. Therapeutisch erfolgt eine bilanzierte Enzymsubstitution mit hochpotenten mikroverkapselten, magensaftresistenten Enzymzubereitungen aus porcinen Bauchspeicheldrüsen [27,30]. Durch die so

verbesserte Nährstoff-, Vitamin- und Spurenelementaufnahme kann die Gewichtsentwicklung und das Wachstum der Patienten verbessert und die Häufigkeit von Durchfällen, Blähungen und Bauchschmerzen durch eine verringerte Stuhlfettausscheidung und besser verdaute Stühle reduziert werden. Zusätzlich sind eine hochkalorische Ernährung sowie die ergänzende Zufuhr von fettlöslichen Vitaminen erforderlich [30].

Oft lassen sich schon pränatal fortgeschrittene entzündlich-destruktive Veränderungen am Pankreas nachweisen, die bereits intrauterin zu einer Fehldauung des albuminhaltigen Fruchtwassers führen können. Die Obstruktion des distalen Ileums mit zähem Mekonium führt zur Hypoplasie des Kolons (Mikrokolon) und verursacht den postpartalen **Mekoniumileus**. Die Kinder können schon während der Schwangerschaft durch Polyhydramnion oder durch die im intrauterinen Ultraschall sichtbare Dilatation der Darmschlingen auffallen, die Hinweise auf eine intestinale Obstruktion geben. Nach Geburt setzt das Kind kein Mekonium ab, erbricht gallig und zeigt eine zunehmende abdominelle Distension [27].

Auch bei älteren CF-Patienten können schlecht verdaute Stuhlmassen infolge der CF-Manifestation am Intestinum (abnormer epithelialer Schleim in Dün- und Dickdarm, verlängerte oro-coecalen Passagezeit und gestörte Darmmotrik) zur Darmobturation im Bereich des distalen Ileum und des Coecum führen. Zusätzliche auslösende Faktoren können eine zu geringe Flüssigkeitsaufnahme oder fehlerhaften Enzymeinnahme sein [30]. Dieser als „distales intestinales Obstruktions-Syndrom“ (**DIOS**) oder als Mekoniumileus-Äquivalent (MIÄ) bezeichnete Zustand zeigt sich klinisch als akute oder rezidivierend auftretende stechende Schmerzen im rechten Unterbauch, Obstipation und Blähungen [18,27]. Etwas häufiger kommt ein DIOS bei Patienten vor, die bereits einen Mekoniumileus hatten und deshalb operiert wurden [30].

In mehreren Studien konnten sonographisch bei CF-Patienten **Darmwandverdickungen** festgestellt werden: die Darmwände waren bis zu 50% dicker als bei gesunden Kindern. Die Darmwanddicke zeigte dabei zwar eine Korrelation zum Alter der Patienten, nicht jedoch zur Dosis der Pankreasenzymsubstitution [21,48]. Mittels Computertomographie nachgewiesene vorwiegend rechtsseitige

Kolonwandverdickungen mit einem mittleren Durchmesser der Kolonwände von 6,4 mm bei 10 CF-Patienten mit Bauchschmerzen ohne nachweisbare andere Ursachen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Darminfektionen wurden ebenfalls als Hinweis auf eine Darmbeteiligung bei CF gedeutet [87].

Die **fibrosierende Kolonopathie** stellt eine weitere Manifestation der Zystischen Fibrose im Intestinum dar. Vermehrt wurde sie in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts im Zusammenhang mit der Einführung von hochdosierten Pankreasenzympräparaten beschrieben. Die klinischen Symptome sind eher unspezifisch und können denen eines DIOS oder einer entzündlichen Darmerkrankung ähneln [18,27]. Im Darm findet man dabei hochgradige Kolonstrikturen. Histologisch zeigen sich submuköse fibrotische Wandverdickungen mit Zerstörung der Muskularis und eosinophilen Infiltrationen. Bislang konnte jedoch kein Zusammenhang dieser Veränderungen zu verschiedenen potentiellen Auslösemechanismen wie hoher Enzymgesamtdosis, Enzymkonzentration der einzelnen Präparate, bestimmter Stoffe im Präparatüberzug (z.B. Eudragit), Begleitmedikationen (z.B. Laxantien), Menge und Qualität der Fette in der Nahrung, sowie anderen pathologischen Immunmechanismen hergestellt werden [32,30,18].

In der **Leber** führt der CFTR-Gendefekt zu einer veränderten viskösen Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit mit nachfolgender Obstruktion der Gallengänge. Mit zunehmendem Alter, vor allem beim männlichen Geschlecht und bei Pankreasinsuffizienz, kann aufgrund der steigenden Lebenserwartung bei bis zu 25% der Patienten eine klinisch manifeste Leberbeteiligung auftreten. Bei 1-5% der Patienten tritt im weiteren Verlauf eine biliäre Zirrhose mit Pfortaderhochdruck und Oesophagusvarizen auf [102,117]. Die Veränderungen in Leber und Gallenwegen können sich durch die unzureichende Bereitstellung von Gallensäuren ebenfalls ungünstig auf Fettverdauung und Energiebilanz auswirken.

1.2 Clostridium difficile

Clostridium difficile (CD) wurde 1935 erstmals in der Darmflora von Neugeborenen isoliert [53]. CD ist ein grampositives, obligat anaerob wachsendes,

sporenbildendes Stäbchenbakterium, das in der Darmflora von Säugetieren und Menschen sowie in Boden und Abwässern isoliert werden kann [15]. Die pathologische Bedeutung von CD wurde erst in den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts offensichtlich, als CD als Erreger der Pseudomembranösen Kolitis (PMC) und als ein Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe (AAD) identifiziert wurde, die in den 60er und 70er Jahren durch den Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika zu einem bedeutenden klinischen Problem geworden waren [70,44,60]. Pathogenetisch entscheidend für die Auslösung einer pseudomembranösen Kolitis durch CD ist die Produktion der Enterotoxine A und B, die über die Induktion einer starken inflammatorischen Reaktion zu einer Schädigung der Darmmukosa führen. Die toxin-kodierenden Gene (*tcdA* und *tcdB*) liegen zusammen mit den Genen von drei weiteren, bislang in ihrer Funktion noch wenig charakterisierten Toxinen (*tcdC*, *tcdD* und *tcdE*) auf einem gemeinsamen Pathogenitäts-Insert (PaLoc). Die Präsenz von PaLoc scheint für die Pathogenität von CD-Stämmen entscheidend zu sein, apathogene, nicht toxinogene Stämme weisen PaLoc nicht auf [20]. Sowohl *tcdC* und *tcdD* als auch Insertionssequenzen *cdu-2* und *ccd2-3* upstream und downstream von PaLoc scheinen für die Regulation der Toxinexpression von Bedeutung zu sein [14]. Die CD-assoziierte Diarrhoe ist derzeit die häufigste nosokomial erworbene gastrointestinale Erkrankung und stellt wegen zunehmendem Schweregrad der Erkrankung und Rezidivneigung in vielen Kliniken ein bedeutendes Problem dar [38,39,112,73,74,91]. Nach Studien der letzten Jahre werden 11-33% der Fälle von AAD und 60-75% von Antibiotika-assoziiierter Kolitis (AAC) und >90% von PMC durch CD ausgelöst [60,78].

Die Besiedlungsrate der gesunden Bevölkerung mit CD ist altersabhängig. So wird der Besiedlungsstatus von Neugeborenen mit bis zu 67% (bei Krankenhausgeburten) angegeben, wobei es sich gewöhnlich um eine asymptomatische Besiedlung handelt [79,16,15]. Bei Kindern unter 2 Jahren beträgt die Prävalenz der CD-Besiedlung noch bis zu 62%, bei etwas höherer Erkrankungsrate als bei Neugeborenen. Kinder über 2 Jahren zeigen mit einer Prävalenz von 2-8% ähnliche Besiedlungsraten wie Erwachsene [79,16]. Man vermutet, dass die Entwicklung der normalen intestinalen Flora im Kleinkindalter einen inhibieren-

den Effekt auf die CD-Besiedlung aufweist. Für die geringere Erkrankungshäufigkeit trotz hoher Besiedlungsrate bei gesunden Neugeborenen werden verschiedene Erklärungsmodelle herangezogen: zum einen wird vermutet, dass die intestinalen Toxin-Rezeptoren bei Neonaten wegen Unreife der Darm-enterozyten noch nicht ausgebildet oder aber wegen einer andersartigen Zusammensetzung des Mucus für die pathogenetisch bedeutsamen Toxine nicht zugänglich sind [40,97,64]. Ferner scheinen mütterliche Antikörper als auch die Unreife des kindlichen Immunsystems das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion zu bedingen. Darüber hinaus werden auch diätetische Einflüsse diskutiert [22,62,75,110,79].

CD wird meist als Schmierinfektion über den oral-fäkalen Übertragungsweg erworben [60]. Die Fähigkeit zur Ausbildung von extrem überlebensfähigen, gegen Hitze, Desinfektionsmittel und anderen Umweltfaktoren resistenten Sporen erleichtert die Persistenz des Erregers insbesondere im Krankenhaus. CD ist einer der bedeutenden nosokomialen Infektionserreger und der Aufenthalt im Krankenhaus stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Aquisition von CD dar [81]. Normalerweise ist die intakte Mikroflora des Darmes eines gesunden Erwachsenen relativ resistent gegenüber einer Kolonisation und Infektion mit CD. Diese sogenannte natürliche „Kolonisationsresistenz“ kann jedoch durch bestimmte Faktoren geschwächt oder geschädigt werden und so eine CD-Infektion bahnen [13].

Ein Hauptrisikofaktor für die Aquisition von CD und die Expression von CD-Toxinen ist die Exposition mit Antibiotika (Tabelle 1).

Tabelle 1: Häufigkeit von CD-assoziierter Erkrankung in Zusammenhang mit bestimmten Antibiotika [79]

| oft | gelegentlich | selten/nie |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| Clindamycin | Chinolone | parenterale Aminoglycoside |
| Ampicillin/Amoxycillin | Tetracycline | Bacitracin |
| Lincomycin | Sulfonamide | Metronidazol |
| Cephalosporine (2. u. 3. Generation) | Erythromycin | Vancomycin |
| | Chloramphenicol | |
| | Trimethoprim | |

Ein hohes Erkrankungsrisiko besteht bei Behandlung mit Clindamycin, Ampicillin und Amoxicillin, Lincomycin, sowie Cephalosporinen der 2. und 3. Generation. Geringer ist das Risiko bei Behandlung mit Chinolonen, Tetracyclin, Sulfonamiden, Trimethoprim, Erythromycin und Chloramphenicol [79,60]. Hospitalisation, höheres Alter, Immunschwäche, Bestrahlung oder Operation des GIT sowie gastrointestinale Vorerkrankungen und andere Begleiterkrankungen stellen zusätzliche Risikofaktoren dar [79,60].

Die klinische Manifestation der Erkrankung reicht von milder über akute und protrahierte Diarrhoe bis zur Enterokolitis mit deren schwerster Ausprägung, der pseudomembranösen Kolitis und weiteren Komplikationen wie toxischem Megakolon, Elektrolytentgleisung und Darmperforation [13].

Für die Entwicklung einer CD-assoziierten Erkrankung sind also drei Faktoren wesentlich: Akquisition eines toxischen Stammes, Induktion der Toxin-Produktion und Suszeptibilität für die CD-Toxine.

1.3 Fragestellung

Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) weisen aufgrund einer hohen Kolonisierungsrate, multiplem Antibiotikaeinsatz und vermehrten Krankenhauskontakten eine Vielzahl an Risikofaktoren für eine CD-Infektion auf. Gastrointestinale Beschwerden wie Bauchschmerzen, Meteorismus, Diarrhoe, Obstipation sind bei CF-Patienten häufig, wobei sich die Symptome bislang nur unzureichend einer auslösenden Ursache wie z.B. mangelhafter PankreasenzymEinstellung zuordnen lassen. Viele CF-Patienten weisen überdies bislang ätiologisch ungeklärte, vorwiegend submuköse Darmwandverdickungen auf, wie sie typischerweise auch bei CD-Kolitis auftreten. Ein Grund für die abdominelle Symptomatik bei diesen Patienten kann eine CD-assoziierte Infektion sein. Die Häufigkeit von CD-assoziierten Infektionen bei CF-Patienten wird aber möglicherweise wegen der geringen oder atypischen Symptomatik unterschätzt.

Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die klinische Relevanz von CD-Infektionen sowie krankheitsspezifischen Auswirkungen auf den Darm bei CF-Patienten im Rahmen einer zweigeteilten Studie zu analysieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- 1) Wie hoch ist der Anteil von intestinal mit toxischen und mit nicht toxischen Clostridium-difficile (CD)-Stämmen besiedelten sowie von CD-Toxin-positiven CF-Patienten im Vergleich zu den Ergebnissen früherer, in der Literatur beschriebener Studien mit CF-Patienten und im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen aus demselben Klinikum)?
- 2) Sind klinische Symptome und sonographische Darmwandbefunde erkennbar, die durch eine intestinale CD-Besiedlung bzw. CD-Toxin-Ausscheidung verursacht worden sein könnten (gastrointestinale Symptome, Darmwandverdickungen, DIOS)? Die Evaluation erfolgte mit Hilfe eines Anamnesebogens bezüglich gastrointestinaler Beschwerden und Durchführung einer Darmwandsonographie.
- 3) Sind Risikofaktoren für eine Besiedlung mit toxischen CD-Stämmen wie z.B. eine gestörte Darmmotilität (Patienten mit Z.n. Mekoniumileus oder DIOS), Antibiotikatherapien oder Hospitalisationen festzustellen?

2 Material und Methoden

Die Daten dieser Untersuchung wurden zwischen Januar 2003 und Mai 2005 erhoben.

Im Rahmen einer Querschnittstudie wurde die Prävalenz von *Clostridium difficile* in Stühlen von CF-Patienten im Vergleich zu einer pädiatrisch-hämatologischen Kontrollgruppe der Kinderklinik bestimmt. Die nachfolgende Längsschnittstudie diente primär zur Untersuchung von CD-assoziierten Erkrankungen im Zusammenhang mit Antibiotikatherapien.

2.1 Patienten

65 Patienten, die in der Mukoviszidose-Ambulanz der Tübinger Kinderklinik betreut wurden, nahmen an der Querschnittstudie teil. Davon waren 30 Patienten weiblich, 35 männlich. 19 dieser Patienten nahmen auch an der Verlaufstudie teil. Die Diagnose `Zystische Fibrose` war durch mindestens zwei pathologische Schweißtests (Pilocarpin-Iontophorese nach Gibson und Cooke) mit Werten für Chlorid > 60 mmol/l oder anhand des Nachweises zweier CF-Mutationen (Homozygotie oder Compound-Heterozygotie) gestellt worden.

Als Kontrollgruppe wurden insgesamt 29 pädiatrische Patienten der hämatologischen Ambulanz im Uni-Klinikum Tübingen untersucht. Diese Patienten wiesen ebenfalls die Risikofaktoren „häufiger Krankenhauskontakt“ und „regelmäßige Antibiotikatherapie-Zyklen“ auf (Tabelle 2).

Tabelle 2: Altersverteilung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe in Jahren
Querschnittstudie:

| Gruppe | Anzahl | G(w/m) | Min | Md | Max | Mean |
|----------------|--------|--------|-----|----|-----|------|
| CF-Patienten | 65 | 30/35 | 0,5 | 9 | 44 | 11,0 |
| Kontrollgruppe | 29 | 16/13 | 1 | 7 | 19 | 8,5 |

Längsschnittstudie:

| Gruppe | Anzahl | G(w/m) | Min | Md | Max | Mean |
|--------------|--------|--------|-----|----|-----|------|
| CF-Patienten | 19 | 10/9 | 4 | 7 | 19 | 8,2 |

(G=Geschlecht, w=weiblich, m=männlich, Min=Minimum, Md=Median, Max=Maximum, Mean= Durchschnitt)

2.2 Methoden

2.2.1 Studienablauf

2.2.1.1 Querschnittstudie

Alle Patienten erhielten ein Informations- und Aufklärungsschreiben über die geplante Querschnittserhebung zusammen mit einer Einwilligungserklärung, einem Stuhlproben-Set¹ mit genauer Anleitung, einem Symptomfragebogen (QS) (s. Anhang 6.1 A, D u. E) und einem frankierten Antwort-Briefumschlag. Das Einverständnis der Ethik-Kommission lag vor (Votum vom 20.02.2002).

Von allen Patienten wurde eine zu einem vorgegebenen Zeitpunkt eingesandte Stuhlprobe mikrobiologisch untersucht. Zeitgleich füllte der Patient bzw. ein Elternteil einen Symptomfragebogen zu typischen und atypischen gastrointestinalen Symptomen einer CD-Infektion, zur Antibiotikatherapie sowie Krankenhaus- und Kuraufenthalt aus.

Bei allen CF-Patienten wurde im Studienzeitraum eine Darmwandsonographie durchgeführt, um mögliche Auswirkungen einer CD-Besiedlung auf die Darmwanddicke erkennen zu können. Zusätzlich wurden Gewichts- und Lungenfunktionswerte (LSG bzw. BMI und FEV 1) zur orientierenden Einschätzung des Gesundheitszustandes, sowie anamnestische Daten zur Vorgeschichte hinsichtlich Mekoniumileus und DIOS aus den Patientenakten entnommen.

¹ bestehend aus Stuhlprobenröhrchen, Anaerobier-Transport-Medium mit Abstrichtupfer, Katalysator, Anaerobiose-Indikator, Plastikbeutel und Verschlussclips zur Herstellung anaerober Atmosphäre

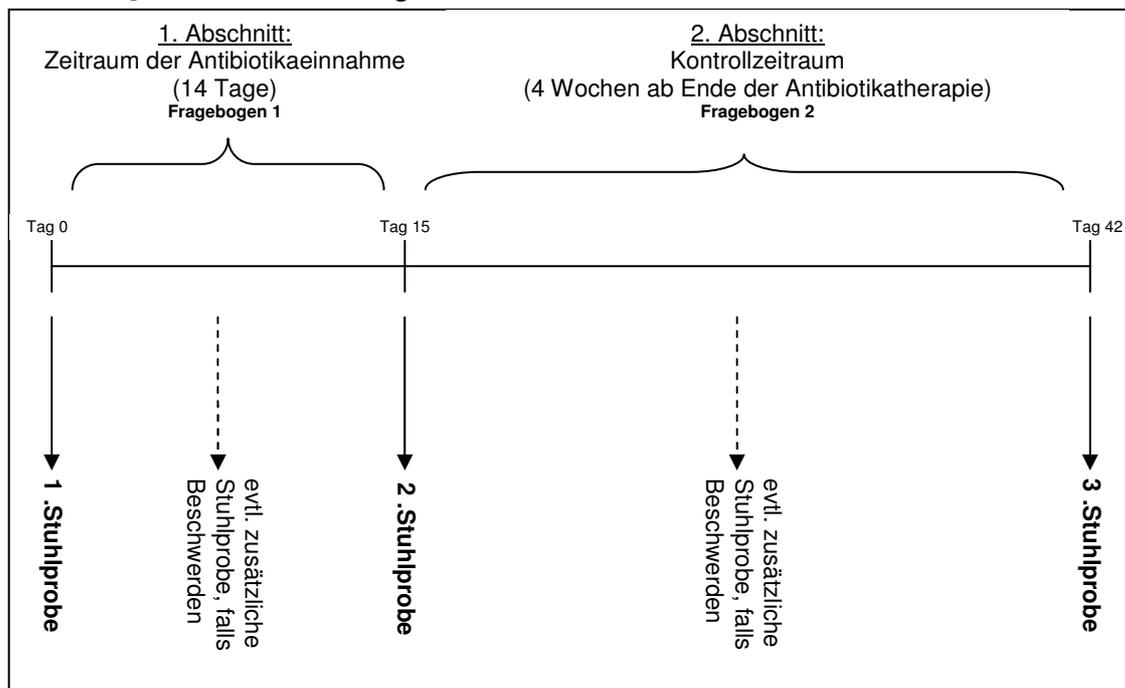
In der Kontrollgruppe wurden nur mikrobiologische Stuhlbefunde und Daten aus dem dazugehörigen Fragebogen im Rahmen der Querschnittuntersuchung erhoben und im Vergleich zu den CF-Patienten ausgewertet. Weitere klinische Daten wurden nicht erhoben.

2.2.1.2 Längsschnittstudie

Die Patienten der Längsschnittstudie erhielten ein weiteres Informations- und Aufklärungsschreiben, eine Einwilligungserklärung, vier Stuhlproben-Sets (s.o.), zwei Symptomfragebögen (LS-AB u. LS-KO) (s. Anhang 6.1 B, D u. F) und frankierte Antwort-Briefumschläge. Die Stuhlproben wurden von den Patienten ebenfalls per Post eingesandt.

Bei Verordnung oraler Antibiotika wurden Stuhlbefunde vor, unmittelbar im Anschluss an und 4 Wochen nach Antibiotikatherapie sowie bei Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhoe, Schmerzen oder Erbrechen während oder innerhalb von 4 Wochen nach Abschluss der Therapie erhoben (Abbildung 1). Dasselbe Vorgehen wurde bei parenteralen Antibiotikatherapien sowohl im stationären wie auch im häuslichen Setting durchgeführt.

Abbildung 1: Ablauf der Längsschnittstudie



2.2.2 Erhebung der mikrobiologischen Daten

2.2.2.1 Probenentnahme und Transport

Für den kulturellen Nachweis von CD ist wegen der besonderen Sauerstoffempfindlichkeit des Erregers ein spezielles Vorgehen bei der Probenentnahme und beim Versand erforderlich [115,80]. Alle an der Studie beteiligten Patienten wurden in einem Schreiben detailliert zur Durchführung der Probenentnahme und des Transports angeleitet. Anhand eines Probedurchlaufes mit fünf Patienten war die Verständlichkeit und Durchführbarkeit für die Patienten vorab getestet worden.

In die zu untersuchende Stuhlprobe wurde zunächst ein Abstrichtupfer eingetaucht und dann in ein für besonders empfindliche Anaerobier geeignetes Transportmedium (Cary-Blair-Medium, Culture SwabTM Plus, Becton Dickinson) verbracht. Die Stuhlprobe selber wurde dann in ein Stuhlröhrchen eingebracht. Dieses wurde zunächst aufrecht stehend und mit nur lose aufgesetzten Deckel in einem zugehörigen Plastikbeutel durch einen Verschlussclip (GasPakTM-Pouch, Becton Dickinson) luftdicht verschlossen asserviert. Zeigte der beige-fügte Anaerobiose-Indikator die Herstellung eines anaeroben Milieus im Plastikbeutel durch den Katalysator an, wurde der Deckel des Stuhlröhrchens von außen verschlossen. Danach waren die Stuhlproben versandfertig. Transportmedien und Stuhlproben wurden bis zum Versand im Kühlschrank aufbewahrt. Die meisten Proben lagen innerhalb 48-72 Stunden nach Probenentnahme im mikrobiologischen Labor vor. Die maximale Transportzeit einer untersuchten Probe betrug 5 Tage (trotzdem konnte hier CD angezüchtet werden).

2.2.2.2 Kultureller Nachweis

Für den kulturellen Nachweis von CD wurden Stuhlproben sowie Abstrichtupfer auf vorreduzierten Selektivnährböden (Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar, CCFA) angesetzt und mindestens 48 Stunden in anaerober Atmosphäre bei 37°C inkubiert (AnaeroGenTM OXOID, AN0025A, Anaerobindikatorstreifen Anaer Indicator bioMérieuxR, Art.-Nr.96 118). Die Rezepturen aller verwend-

ten Medien befinden sich im Anhang (s. 6.2, Tabelle 15). Zur Erhöhung der Sensitivität wurden dabei 6 mikrobiologische Ansätze durchgeführt.

1. Ausstrich des Abstrichtupfers auf CCFA
2. Stuhlausstrich auf CCFA
3. Alkohol-Schock-Behandlung² der Stuhlprobe, danach Stuhlausstrich auf CCFA
4. Inkubation des Abstrichtupfers in Leberbouillon (24h), danach Aussaat auf CCFA
5. Inkubation der Stuhlprobe in Leberbouillon (24h), danach Aussaat auf CCFA
6. Inkubation der Stuhlprobe in CD-Bouillon (24h), danach Aussaat auf CCFA

Als Kontrollstamm für die Medien und Inkubationsbedingungen wurde bei jedem neuen Ansatz *Clostridium difficile* (ATCC 9689) in den oben beschriebenen Ansätzen mitgeführt.

CD-verdächtige Kolonien wurden in Subkulturen parallel auf Hirn-Herz-Agarplatten (BHI) als nicht selektive Medien sowie auf CCFA abgeimpft. Nach Gewinnung einer Reinkultur erfolgte die weitere Differenzierung.

2.2.2.3 Identifizierung von *Clostridium difficile*

Clostridium difficile wurde anhand der folgenden Kriterien identifiziert:

- Koloniemorphologie:

4-6 mm große, flache bis leicht vorgewölbte, milchglasartige Kolonien mit gelapptem oder ausgefranstem Rand, auf CCFA durch Fruktosespaltung und Indikatorumschlag blassgelb gefärbt

- Geruch:

typischer „pferdestallartiger“ Geruch

- Gram-Präparat:

Grampositives ovales Stäbchenbakterium z.T. mit subterminaler oder terminaler Sporenbildung

² Alkohol-Schock-Behandlung: Stuhlprobe wird mit gleichen Teilen 96%igen Ethanol vermischt und nach 1 Stunde auf Platte abgeimpft

- obligat anaerobes Wachstum:

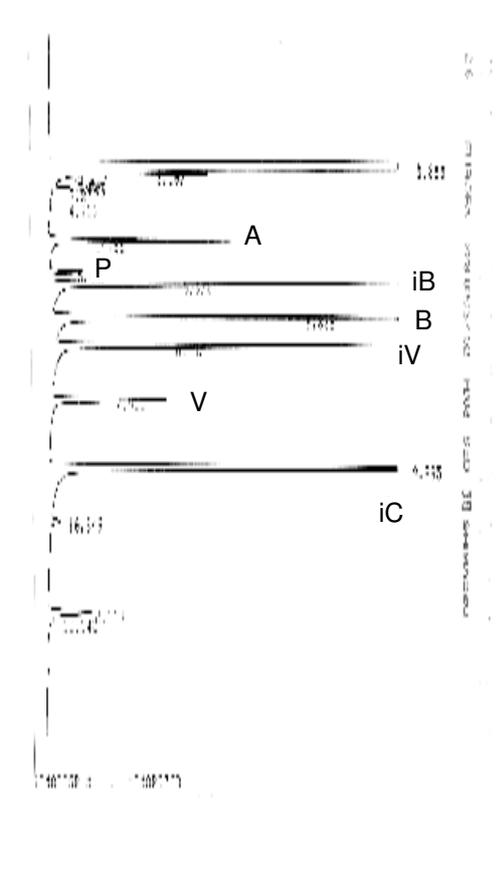
in parallelen Subkulturen auf CCFA und BHI aerob, anaerob und mikroaerophil mit erhöhter CO₂-Spannung (GENbox CO₂, bioMérieuxR, Art.-Nr. 96 126) nur Wachstum in anaerobem Milieu

- Prolin-Aminopeptidase:

In 20µl steriler physiologischer NaCl-Lösung wurde eine dichte, milchig trübe Bakteriensuspension erstellt und eine Enzymtablette (Proline Aminopeptidase DIATABSTM ROSCO Art.-Nr.46921) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und Zugabe von Aminopeptidase Reagenz (ROSCO Art.-Nr.92131) zeigte eine Gelbfärbung den positiven Nachweis von L-Proline-Aminopeptidase an, der charakteristisch für CD ist [41,108].

- Nachweis akkumulierter Fettsäuren durch Gaschromatographie (GC):

CD-verdächtigen Kolonien wurden 4-7 Tage in einer CMC-Bouillon kultiviert. Danach wurden die Fettsäuren extrahiert und für die GC-Analyse derivatisiert. Je 1ml der Bouillonkultur wurden dafür in Glasröhrchen mit 0.4g NaCl, 200 µl H₂SO₄, 1000 µl Äther vorsichtig vermengt, anschließend 1 Minute mit 900 Upm zentrifugiert und der Ätherüberstand für die GC-Analyse entnommen (GC-17A, Shimadzu). Die Identifizierung einer Fettsäure erfolgte über den Vergleich mit den Retentionszeiten eines Standardgemisches von definierten Fettsäuren, wobei gleiche Retentionszeit die Identität einer Verbindung belegt. Das CD-spezifische Fettsäureprofil weist als Hauptprodukte Essig- (A), Butter- (B) und iso-Caprinsäure (iC) neben geringeren Anteilen an Propion- (P), iso-Butter- (iB), iso-Valerian- (iV) und Valeriansäure (V) auf (Abbildung 2).

Abbildung 2: Fettsäureprofil von *Clostridium difficile*

Alle als CD identifizierte Stämme wurden in 1,5 ml Hirn-Herz-Glycerin-Bouillon bei -20 °C eingefroren und bei Bedarf auf BHI rekultiviert.

2.2.2.4 Toxinnachweis

Alle Stuhlproben sowie alle isolierten CD-Stämme wurden auf die Präsenz bzw. Expression von Toxin A und Toxin B geprüft durch Einsatz eines kommerziellen Enzymimmunoassays (RIDASCREEN *Clostridium difficile* Toxin A/B, r-biopharm, Art.-Nr. C 0801). Der Testkit wurde nach Vorschrift des Herstellers abgearbeitet. Für diesen Kit wird eine Sensitivität und Spezifität im Nachweis der Toxine in Stuhlproben von jeweils über 94% angegeben [92].

2.2.2.5 Molekularbiologischer Nachweis von *tcdB*

Je 200µl der Stuhlproben wurden mit je 1 ml Aqua destillata vermischt und bis zur Durchführung der PCR bei -80°C eingefroren. Da sich im Laufe der Studie zeigte, dass diese Proben fast ausnahmslos PCR-Inhibitoren aufwiesen, wurde im folgenden 1ml Material aus der Vorkultur in CD-Bouillon (Ansatz 6; Stuhlkultur) für die PCR-Analyse eingesetzt. Daneben wurden alle CD-Isolate in Leberbouillon subkultiviert (Isolatkultur) und je 1ml der gut bewachsenen Kulturen in die PCR-Analyse eingesetzt. Für die PCR-Analyse wurde ein semi-nested-PCR-Verfahren eingesetzt, das die Toxin-B kodierenden Genregionen als Zielsequenz verwendet [4].

2.2.2.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der Stuhl- und Isolatkulturen erfolgte mit kommerziellen Extraktionssystemen (Qiamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden). Das Kulturmaterial wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, das Pellet für die Zellyse in 200µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K resuspendiert und 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200µl AL-Puffer wurde das Gemisch 10 Minuten bei 70°C erhitzt und danach mit 200µl Ethanol vermischt. Insgesamt 630µl Reaktionsgemisch wurde auf eine Spinsäule gegeben und 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Spülen der Säule mit je 500µl AW-1 und AW-2 Puffer, wurde die DNA durch zweimaliges Auftragen von 100µl AE-Puffer auf die Säule und Zentrifugation bei 8.000 rpm für je 1 Minute eluiert.

2.2.2.5.2 PCR

In der ersten PCR-Runde wurde dem Reaktionsansatz (Reagenzienbezug siehe Anhang 6.2, Tabelle 16) jeweils 2,5µl der extrahierten Proben-DNA zugesetzt. Bei jedem Analyselauf wurde sowohl eine Negativ-Kontrolle (Aqua dest.) als auch eine Positivkontrolle (extrahierte DNA aus *Clostridium difficile* ATCC 9689) mitgeführt. Jede Probe wurde darüber hinaus in einem zweiten Ansatz

unter Zugabe von 1,0µl Kontroll-DNA auf Präsenz von PCR-Inhibitoren getestet (Inhibitionskontrolle).

Ansatz erste Runde :

| | | |
|-------------------|---------------------------------|--------|
| Primer 1 C DTB1 | 5´GTG GCC CTG AG CAT ATG 3´ | 0,2µl |
| Primer 2 C DTB3 | 5´GCT TCT TCA ATC CTT TCC TC 3´ | 0,2µl |
| Taq | | 0,5µl |
| dNTP | | 1,0µl |
| PCR-Puffer | | 2,5µl |
| MgCl ₂ | | 2,5µl |
| Aqua dest. | | 15,6µl |

Die erste PCR-Runde begann mit einer 2minütigen Denaturierung bei 94°C, gefolgt von einem 30maligen Zyklus von 45´bei 94°C, 45´bei 45°C, 75´bei 72°C und endete mit einer 5minütigen Extension bei 72°C. In der zweiten Runde wurden dem Ansatz 0,5µl des PCR-Produktes aus der ersten Runde zugesetzt. Die zweite PCR-Runde begann mit einer 2minütigen Denaturierung bei 94°C, gefolgt von einem 30maligen Zyklus von 45´bei 94°C, 45´bei 52°C, 30´bei 72°C und endete mit einer 5minütigen Extension bei 72°C. Beide PCRs wurden auf einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Ansatz zweite Runde :

| | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|
| Primer 1 C DTB1 | 5´GTG GCC CTG AG CAT ATG 3´ | 0,2µl |
| Primer 2 C DTB2 | 5´TCC TCT CTC TGA ACT TCT TGC 3´ | 0,2µl |
| Taq | | 0,5µl |
| dNTP | | 1,0µl |
| PCR-Puffer | | 2,5µl |
| MgCl ₂ | | 2,5µl |
| Aqua dest. | | 24,5µl |

Erwartet wurde ein PCR-Produkt von 322bp, das über Gelelektrophorese in 1,5%igem Agarosegel dargestellt wurde.

2.2.3 Erhebung der klinischen Daten

2.2.3.1 Fragebogen zur Querschnittstudie

Jeder Patient füllte zum Zeitpunkt der Stuhlprobenuntersuchung einen Fragebogen (QS) (s. Anhang 6.1 E) aus. In diesem wurden Fragen zur aktuellen Antibiotikatherapie sowie zu Krankenhaus- oder Rehaaufenthalten der letzten zwei Jahre gestellt, um die zwei Hauptrisikofaktoren für eine mögliche *Clostridium-difficile*-Infektion zu erfassen. Des Weiteren wurde in semiquantitativer Abfrage nach typischen und atypischen Symptomen einer CD-Kolitis wie Durchfall, Verstopfung, Erbrechen, Bauchschmerzen, Blähungen, Übelkeit, usw. gefragt, sowie auch individuelle Angaben des Patienten über bestehende Beschwerden berücksichtigt.

Da die Stuhlbeschaffenheit von CF-Patienten sehr variiert (einige Patienten weisen immer „durchfälligen“ Stuhl auf), wurde das Symptom „Durchfall“ detaillierter abgefragt. Hier wurden z.B. weitere Angaben zur individuellen, normalen Stuhlbeschaffenheit verlangt, um ggf. CD-assoziierte Stuhlveränderungen unterscheiden zu können.

Aus den Angaben der Patienten über gastrointestinale Beschwerden zum Zeitpunkt der Stuhluntersuchung wurde ein gastrointestinaler Score (GI-Score) von 0-3 erstellt. Darin wurden zusammengefasst:

1. Stuhlauffälligkeiten (Durchfall/Verstopfung)
2. Erbrechen
3. andere Beschwerden (Übelkeit, Bauchschmerzen, Blähungen)

Patienten ohne Beschwerden bekamen einen GI-Score von 0, Patienten mit Beschwerden aus einer der drei Gruppen wurden als GI-Score 1, Patienten mit Beschwerden aus zwei Gruppen als GI-Score 2 und Patienten mit Beschwerden aus allen drei Gruppen als GI-Score 3 klassifiziert.

2.2.3.2 Fragebögen zur Längsschnittstudie

Ziel der Längsschnittstudie war es, Zusammenhänge zwischen Antibiotikatherapie, CD-Besiedlung sowie CD-Toxinexpression und Gastrointestinalen Beschwerden zu erfassen. Dafür sollten Patienten im Beobachtungszeitraum täglich bestimmte Parameter auf zwei verschiedenen Fragebögen (LS-AB und LS-

KO)(s. Anhang 6.1 F) dokumentieren. Der Fragebogen LS-AB diente zur Erfassung der Antibiotikatherapie und enthielt Angaben zur Stuhlbeschaffenheit und Stuhlhäufigkeit, sowie dem Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden. Der Fragebogen LS-KO erfasste gastrointestinale Symptome während des Kontrollzeitraumes.

2.2.3.3 Klinische Parameter

Zur orientierenden Einschätzung des Ernährungszustandes (EZ) und der Lungenfunktion wurden verschiedene klinische Parameter, die innerhalb eines Jahres vor oder nach Studienbeginn während eines Ambulanzbesuches erhoben worden waren, den Patientenakten entnommen. Darüber hinaus wurden anamnestisch das Auftreten eines Mekoniumileus sowie ein „Distales Intestinales Obstruktionssyndrom“ (DIOS) erfasst.

Ernährungszustand (EZ)

Zur Beurteilung des EZ eines Patienten wurden für Patienten unter 18 Jahren das Längen-Soll-Gewicht (LSG) nach Reinken [94] und für ältere Patienten der Body-Mass-Index (BMI) herangezogen. Der Wert für einen guten EZ liegt beim LSG bei $\geq 95\%$ und beim BMI bei ≥ 19 . Werte unterhalb dieser Grenze deuten auf einen weniger optimalen Ernährungszustand hin.

| EZ | LSG Ist-Gewicht x 100% / Soll-Gewicht | BMI Ist-Gewicht in kg / (Körperlänge in m) ² |
|-------------------------------|---|---|
| Guter EZ/ Normalgewicht | $\geq 95\%$ | ≥ 19 |
| Untergewicht/ Malnutrition | $< 95\%$ | < 19 |

Forciertes Expiratorisches Volumen

Das „Forcierte Expiratorische Volumen“ (FEV 1), auch Einsekundenkapazität genannt, beschreibt das Gasvolumen, das nach maximaler Inspiration bei forcierter Ausatmung in einer Sekunde maximal ausgeatmet werden kann. Sein Wert ist ein aussagefähiger Parameter für die Beurteilung der Lungenfunktion und damit des Gesundheitszustandes des Patienten.

| Lungenfunktion | FEV 1 |
|-----------------------|--------------|
| Normal | $\geq 70\%$ |
| Eingeschränkt | $< 70\%$ |

2.2.4 Erhebung der sonographischen Messdaten

Bei 59 der 65 CF-Patienten wurde im Untersuchungszeitraum eine Abdomensonographie zur Ermittlung der Darmwanddicke durchgeführt.

Alle sonographischen Darmwanddickenmessungen wurden von PD Dr. Haber mit einem 7- MHz-Linearschallkopf (ACUSON 128, Mountain View, California, USA) durchgeführt.

Die Schallkopfeinstellung wurde folgendermaßen modifiziert: Bildtiefe (je nach Dicke der Bauchdecke 30-40 mm), Graustufen-Dynamikumfang (65-70 dB), Fokusanzahl (je nach Bildtiefe: 5 bei Bildtiefe 30 mm und 6 bei Bildtiefe 40 mm), Persistence-Einstellung (Bildwiederholungsfrequenz) mit Stufe 3.

2.2.4.1 Untersuchungsablauf

Die sonographische Untersuchung erfolgte in Rückenlage des Patienten.

Zuerst wurden die Oberbauchorgane sowie die Oberbauchgefäße sonographiert, um eine mögliche Fehllage des Darmes aufgrund eines Situs inversus abdominalis auszuschließen und um Hinweise auf eine etwaige Malrotation und damit atypische Darmlage zu erhalten. Die Darmsegmente wurden aufgrund ihrer typischen anatomischen Lage, sowie spezifischer Merkmale wie Kaliber, Lumeninhalt, Haustrierung und Peristaltik identifiziert und in folgender Reihenfolge aufgesucht:

1. Terminales Ileum: Aufsuchen im rechten Unterbauch als ein peristaltikarmer, wenig gefüllter Darmabschnitt. Die Messung der Wanddicke erfolgte in Höhe der Überkreuzung über die Iliacalgefäße.
2. Durch Verfolgen des terminalen Ileums nach craniolateral lassen sich Ileo-coecalklappe und das Coecum identifizieren. Die Messung der Wanddicke erfolgte aboral der Bauhin'schen Klappe
3. Das Colon ascendens wurde vom Coecum ausgehend im rechten mittleren Quadranten aufgesucht. Es stellt sich, wie auch die anderen Kolonabschnitte, als ein relativ großlumiger Darmabschnitt dar, der keine peristaltische Aktivität aufweist und häufig mit gasdurchsetztem Stuhl angefüllt ist. In transversaler Schnittebene zeigt das proximale Colon ascendens die ventral verlaufende Taenia libera und in sagittaler Schnittebene die für das Kolon typische Haustrierung.
4. Das Colon transversum wurde im rechten oberen Quadranten an der Leberunterkante dargestellt. Die Messung der Wanddicke erfolgte etwa in Höhe der Medioclavikularlinie.
5. Das Colon descendens wurde im linken Mittelbauch aufgesucht. Die Messung der Wanddicke erfolgte aboral der linken Kolonflexur.
6. Das Jejunum wurde durch seine meist lebhafteste Darmperistaltik und gashaltige Füllung im linken Mittelbauch identifiziert.

2.2.4.2 Sonographische Messung der Darmwanddicke

Die Messung der Darmwanddicke erfolgte auf der Grundlage der von M.B. Kimmey et al. [63] identifizierten Darmwandschichten. Diese hatten 1989 Untersuchungen über die Zuordnung der Sonomorphologie zu den einzelnen histologischen Schichten der Darmwand durchgeführt. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die sonographische Darstellung der Darmwand einen fünfschichtigen Wandaufbau mit Zonen unterschiedlicher Echogenität aufweist. Auf das Lumen folgt als erste Schicht die echogene Grenzschicht zwischen Darmlumen und der Oberfläche der Tunica mucosa. Die folgende anliegende echoarme Schicht entspricht der Tunica mucosa, daraufhin lassen sich die echogene Tela submucosa und die wiederum echoarme Tunica muscularis darstellen. Die äußerste

Schicht ist die echoreiche Tunica serosa mit dem subserösen Fettgewebe, die jedoch häufig nicht von den angrenzenden echogenen Strukturen abzugrenzen ist [52].

Die Darmwanddicke wird angegeben als die Summe der Dicke der Tunica mucosa, der Tela submucosa und der Tunica muscularis. (Die Tunica serosa wird aufgrund ihrer schlechten Abgrenzbarkeit von anderen angrenzenden Strukturen nicht mitgemessen.)

Der Wert der Darmwanddicke wurde mit dem elektronischen Kalipermesssystem auf dem Monitor abgegriffen und als Messwert mit einer Genauigkeit von 0,1 mm notiert.

Um **falsch-pathologische** Darmwandverdickungen auszuschließen, wurden kontrahierte Darmabschnitte nicht ausgemessen.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe statistischer Methoden (s. 2.3.1). Als „normale Darmwanddicke“ galten Messwerte, die innerhalb ± 2 Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert lagen, als „verdickt“, wenn sie 2 SD über dem Mittelwert lagen.

2.3 Statistische Methoden und Auswertung

2.3.1 Querschnittstudie

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistik-Softwareprogramm JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Die Vergleichbarkeit der Altersstruktur der beiden Gruppen (CF-Patienten, Kontrollgruppe) wurde mit dem **Wilcoxon-Test** überprüft.

Um den Einfluss des Alters und des Geschlechtes auf die Häufigkeit eines CD-Nachweises zu untersuchen, wurde eine **multiple logistische Regression** [65] berechnet. Zur Beurteilung der Signifikanz wurde der **Wald-Test** verwendet. Da das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf den CD-Nachweis zeigte, kam eine **einfache logistische Regression** zur Anwendung, mit der die Abhängigkeit des Alters zum CD-Nachweis untersucht wurde.

Für den Vergleich von zwei Häufigkeiten wurde **Fishers exakter Test** für eine zweiseitige Alternative verwendet. Damit wurden neben dem Vergleich der CD-Prävalenz von CF-Patienten und Kontrollgruppe folgende Parameter im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge auf die Nachweisbarkeit von CD überprüft: Gewicht und Lungenfunktion (FEV1) der Patienten, Einfluss von Krankenhaus- bzw. Rehaaufenthalt, Antibiotikumeinnahme, DIOS und/oder Mekoniumileus in der Anamnese, das Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden und der Nachweis verdickter Darmwände.

Für **Kontingenztafelanalysen** wurde der **Test nach Pearson** verwendet. Damit wurden die oben bereits erwähnten Parameter (Gewicht, Lungenfunktion usw.) im Hinblick auf die Toxinexpression bewertet. Aufgrund der kleinen Patientenzahlen gab es z.T. Ergebnisse, die in mindestens 20% auf einem Erwartungswert ≤ 5 beruhten. In diesen Fällen ist die Schlussfolgerung bezüglich der Pearson-Statistik unsicher. Sämtliche Testergebnisse wurden bis zu einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ als statistisch signifikant bezeichnet.

Das Verhältnis zwischen Alter der CF-Patienten (in Jahren) und Darmwanddicke (in mm) wurde mit der **nicht-linearen Regressionsanalyse** unter Verwendung der Gleichung

$$\text{Wanddicke (mm)} = \frac{A - A(0)}{1 + e^{-b(\text{Alter} - T)}} + A(0)$$

untersucht. Dabei haben die Parameter folgende Bedeutung:

- A Darmwanddicke (in mm) der Probanden im Erwachsenenalter (Asymptote der Regressionskurve)
- A(0) Darmwanddicke (in mm) der Probanden zum Zeitpunkt der Geburt
- T Lebensalter (in Jahren) der Probanden, an dem 50% der bis zum Erwachsenenalter zu erwartenden Dickenzunahme (entspricht der Differenz zwischen A und A(0) erreicht sind (Wendepunkt der Regressionskurve)
- b Steigungsparameter der Regressionskurve am Wendepunkt.

Mit der Gleichung wird eine Wachstumskurve mit einer stetigen Zunahme der Darmwanddicke vom Wert A(0) (zum Zeitpunkt der Geburt) bis zum Wert A (Maximalwert im Erwachsenenalter) beschrieben. Die Angabe der Parameter

der Regressionsgleichung (s. Anhang 6.3, Tabelle 17), die den Zusammenhang zwischen der Darmwanddicke der verschiedenen Darmwandabschnitte und dem Alter der Probanden in der Regressionsanalyse beschreibt, folgt der Aufstellung bei Haber [52]. Messwerte der Darmwanddicke, die mehr als zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert lagen, wurden als „pathologische Darmwanddicke“ bezeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz (Direktor des Institutes für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen).

2.3.2 Längsschnittstudie

Aufgrund der geringen Fallzahl wurde hier auf eine statistische Auswertung verzichtet.

3 Ergebnisse

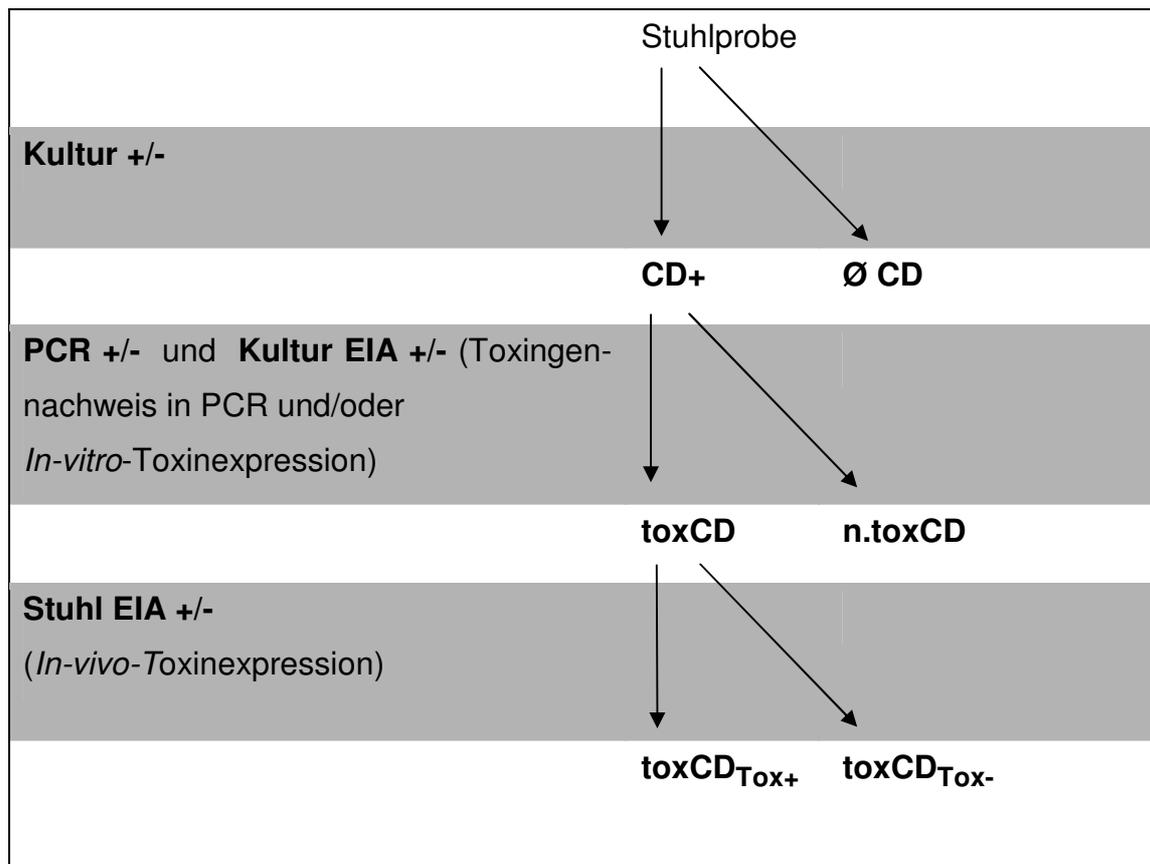
3.1 Klassifizierung der mikrobiologischen Befunde

Isolierte CD-Stämme wurden durch den Toxinnachweis mittels EIA aus Stuhl und Kultur und des PCR-Ergebnisses in verschiedene Gruppen eingeteilt (Abbildung 3).

Isolierte CD-Stämme wurden in „toxigene“ (**toxCD**) und „nicht toxigene“ (**n.toxCD**) Stämme klassifiziert. Toxigene Stämme zeichneten sich durch die Nachweisbarkeit von Toxin A/B (EIA aus Stuhlprobe bzw. Kultur) und/oder den Nachweis toxinkodierender Gene (PCR) aus. Toxigene CD-Stämme mit *In-vivo*-Toxinexpression (Toxinnachweis im Stuhl) wurden als **toxCD_{Tox+}** bezeichnet, toxigene CD-Stämme ohne *In-vivo*-Toxinexpression entsprechend als **toxCD_{Tox-}**.

5 CD-Isolate ließen sich nach dem Einfrieren nicht wieder anzüchten, sodass kein Kultur-EIA und keine Toxingen-PCR möglich war. Da bei diesen Patienten kein Toxin im Stuhl nachweisbar war, wurden diese Stämme als nicht klassifizierbar eingestuft (**n.klassCD**).

Wurde bei einem Patienten zwar Toxin im Stuhl nachgewiesen, jedoch kein CD angezüchtet, wurde das als Nachweis von **toxCD_{Tox+}** mit einer Keimzahl unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze gewertet. Die Befundkombination von Toxinnachweis im Stuhl und kultureller Nachweis eines nicht toxigenen Stammes wurde als Mischbesiedelung durch toxigene Stämme (unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze) und nicht toxigene Stämme bewertet und in die Gruppe **toxCD_{Tox+}** aufgenommen.

Abbildung 3 : Identifizierungs- und Klassifizierungsalgorithmus

3.2 CD-Prävalenz bei CF-Patienten und Kontrollgruppe

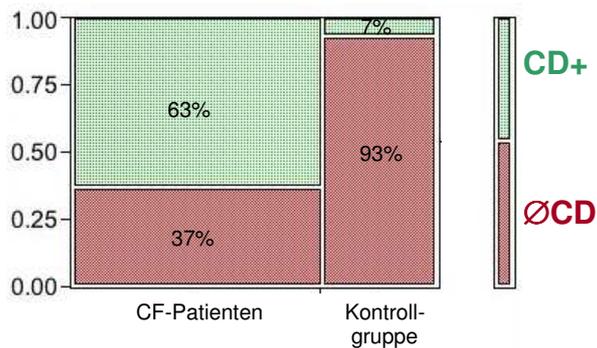
Ziel war es, die Häufigkeit einer CD-Besiedlung sowie Toxinnachweis bei CF-Patienten der Tübinger Kinderklinik im Gegensatz zu einem Vergleichskollektiv (Patienten der hämato-onkologischen Ambulanz der Kinderklinik) zu bestimmen. Die beiden Gruppen waren sowohl hinsichtlich der Altersstruktur als auch des Geschlechts vergleichbar ($p=0,214$ bzw. $p=0,531$; s.a. Anhang 6.4 Abbildung 14 u. Abbildung 15). Die CD-Prävalenz im Stuhl war bei CF-Patienten mit 63% hoch signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe mit 7% ($p<0,0001$). Daneben zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe ausschließlich nicht toxische Stämme nachweisbar waren, während bei den CF-Patienten mit 73% toxische Stämme dominierten (Tabelle 3a und b).

Tabelle 3a: CD-Prävalenz im Stuhl

| | CF-Patienten | | Kontrollgruppe | |
|-------|--------------|--------|----------------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil |
| Ø CD | 24 | 37% | 27 | 93% |
| CD+ | 41 | 63% | 2 | 7% |
| Summe | 65 | 100% | 29 | 100% |

Tabelle 3b: Klassifizierung der CD-Isolate

| | CF-Patienten | | Kontrollgruppe | |
|-----------------------|--------------|--------|----------------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil |
| n.toxCD | 6 | 9% | 2 | 7% |
| toxCD _{Tox-} | 22 | 34% | 0 | 0% |
| toxCD _{Tox+} | 8 | 12% | 0 | 0% |
| n.klassCD | 5 | 8% | 0 | 0% |

Abbildung 4: CD-Prävalenz bei CF-Patienten und Kontrollgruppe

3.3 Mögliche Beziehungen ausgewählter Parameter zu CD-Besiedlung und Toxinexpression bei CF-Patienten

Um die in Tabelle 3a und b dargestellten Ergebnisse der CF-Patienten auf mögliche Beziehungen zu verschiedenen Parametern untersuchen zu können, wurden die ermittelten CD-Nachweis-Werte in Übergruppen zusammengefasst. Dabei wurden jeweils der CD-Nachweis und die Toxinexpression im Verhältnis zu den Analyseparametern dargestellt.

a) Kriterium: CD-Nachweis

| Kategorie | | Anzahl | Untergruppen | Anzahl |
|------------|------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| ØCD | kein CD-Nachweis | 24 | Ø CD | 24 |
| CD+ | CD- Nachweis | 41 | n.toxCD | 6 |
| | | | toxCD _{Tox-} | 22 |
| | | | toxCD _{Tox+} | 8 |
| | | | n.klassCD | 5 |

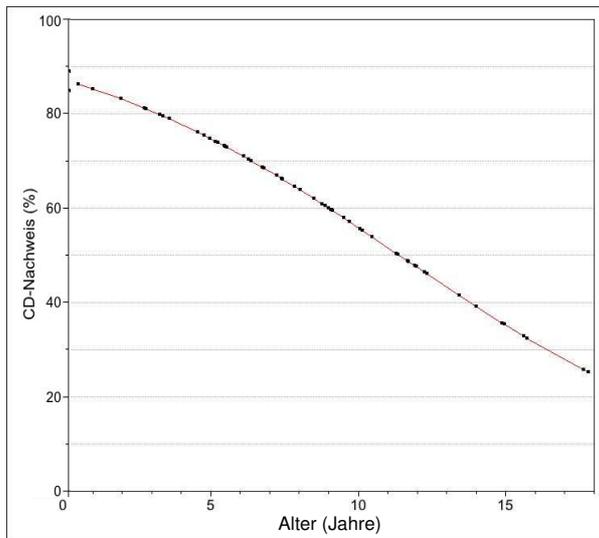
b) Kriterium: Toxinexpression

| Kategorie | | Anzahl | Untergruppen | Anzahl |
|-----------|--------------------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| T0 | Toxinexpression ausgeschlossen | 30 | Ø CD | 24 |
| | | | n.toxCD | 6 |
| T1 | Toxinexpression möglich | 27 | toxCD _{Tox-} | 22 |
| | | | n.klassCD | 5 |
| T2 | Toxin nachgewiesen | 8 | toxCD _{Tox+} | 8 |

In der Gruppe T1 wurden diejenigen Patienten zusammengefasst, bei denen prinzipiell die Möglichkeit einer Toxinproduktion gegeben war. Dazu zählten Träger von toxischen Stämmen ohne den Nachweis einer *In-vivo*-Toxinexpression sowie Patienten mit nicht klassifizierbaren CD-Stämmen.

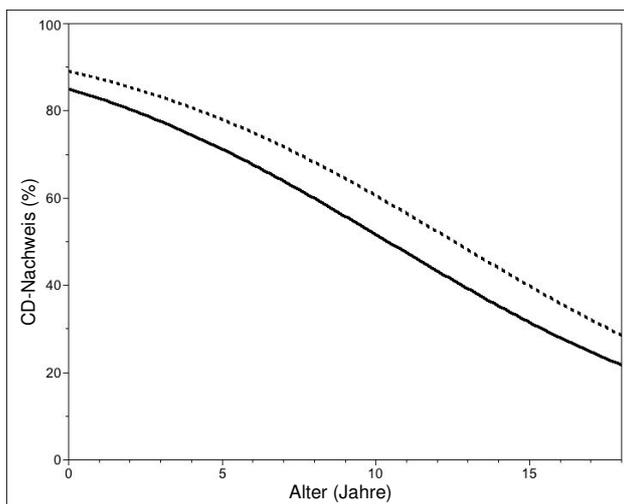
3.3.1 Alter

Die Wahrscheinlichkeit einer CD-Besiedlung nahm mit zunehmendem Lebensalter signifikant ab ($p=0,022$)(Abbildung 5). Der Anteil CD-besiedelter Patienten lag in den ersten drei Lebensjahren zwischen 80 und 90% und reduzierte sich ab dem 15.Lebensjahr auf unter 35%.

Abbildung 5: Altersabhängigkeit der CD-Besiedlung bei CF-Patienten

3.3.2 Geschlecht

Die CD-Prävalenz war bei Mädchen etwas höher als bei Jungen, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,531$) (Abbildung 6).

Abbildung 6: Geschlechtsabhängigkeit der CD-Besiedlung bei CF-Patienten

....= weiblich
__= männlich

3.3.3 Ernährungszustand (EZ)

Zur Beurteilung des EZ als einem Index für den Gesundheitszustand der CF-Patienten wurden die Parameter Längen-Soll-Gewicht (LSG) und Body-Mass-Index (BMI) den Patientenakten entnommen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ernährungszustand der Patienten und der CD-Prävalenz bzw. der Toxinexpression ($p=0,431$ bzw. $p=0,119$) (Tabelle 4a und b; Abbildung 7a und b).

Tabelle 4a: Ernährungszustand und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Normalgewicht | 13 | 33% | 27 | 67% | 40 |
| Tendenz Untergewicht | 11 | 44% | 14 | 56% | 25 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 4b: Ernährungszustand und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Normalgewicht | 15 | 37% | 18 | 45% | 7 | 18% | 40 |
| Tendenz Untergewicht | 15 | 60% | 9 | 36% | 1 | 4% | 25 |
| Summe | 30 | | 27 | | 8 | | 65 |

Abbildung 7a: CD-Prävalenz im Verhältnis zum Gewicht

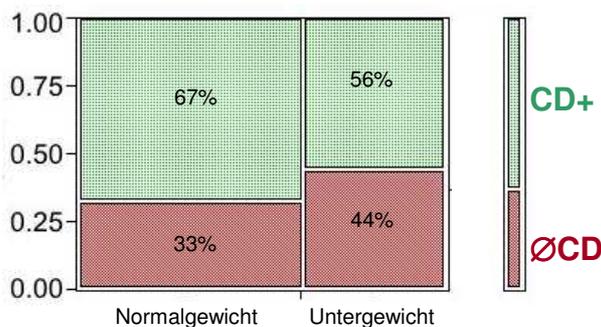
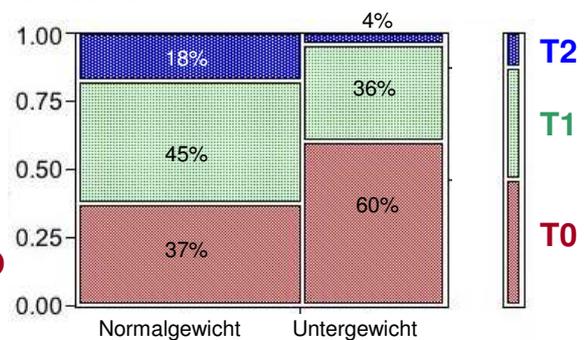


Abbildung 7b: Toxinexpression im Verhältnis zum Gewicht



3.3.4 Lungenfunktion

Die Lungenfunktion, charakterisiert durch das „Forcierte Expiratorische Volumen“ (FEV 1), wurde als weiterer Wert, der den Gesundheitszustand der Patienten beschreibt, in Zusammenhang mit CD- und CD-Toxin-Nachweis gesetzt. Da eine Lungenfunktionsmessung erst ab einem Alter von 6 Jahren möglich ist, konnten für 19 Patienten keine FEV1-Werte erhoben werden. In die Auswertung wurden hier insgesamt 46 Patienten aufgenommen. (Tabelle 5a und b; Abbildung 8a und b)

Tabelle 5a: Lungenfunktion und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| FEV 1 < 70% | 4 | 24% | 13 | 76% | 17 |
| FEV 1 ≥ 70% | 17 | 59% | 12 | 41% | 29 |
| Summe | 21 | | 25 | | 46 |

Tabelle 5b: Lungenfunktion und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| FEV 1 < 70% | 6 | 35% | 10 | 59% | 1 | 6% | 17 |
| FEV 1 ≥ 70% | 21 | 73% | 5 | 17% | 3 | 10% | 29 |
| Summe | 27 | | 15 | | 4 | | 46 |

Abbildung 8a: CD-Prävalenz im Verhältnis zur Lungenfunktion

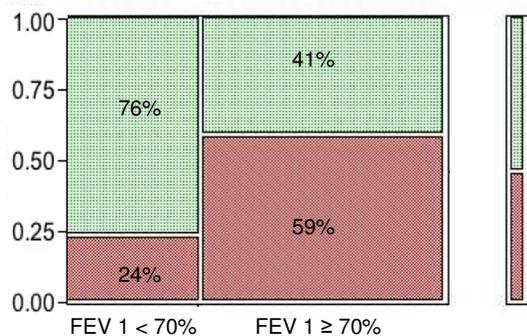
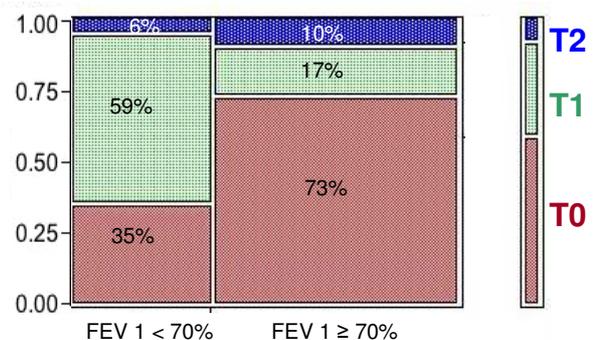


Abbildung 8b: Toxinexpression im Verhältnis zur Lungenfunktion



Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CD-Besiedlung und Lungenfunktion ($p=0,021$). Nur 41% der Patienten mit guter Lungenfunktion waren CD-besiedelt, während Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion eine CD-Prävalenz von 76% aufwiesen. Obwohl Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion signifikant häufiger mit toxischen Stämmen besiedelt waren ($p= 0.015$), zeigte sich, vorbehaltlich der geringen Fallzahlen, in der *In-vivo*-Toxinexpression kein deutlicher Unterschied (Abbildung 8a und b).

3.3.5 Krankenhaus- und Rehaufenthalte

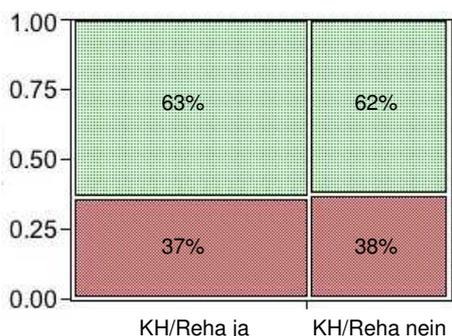
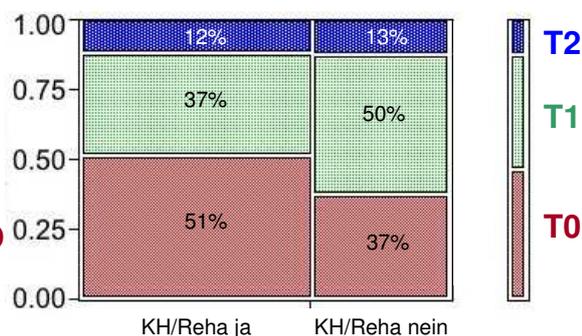
Da Krankenhausaufenthalte zu den Hauptrisikofaktoren für eine Aquisition von CD gerechnet werden, wurde der Zusammenhang von Krankenhaus- und Rehaufenthalten auf die CD-Prävalenz analysiert. Von den 65 untersuchten Patienten hatten sich 41 in den letzten zwei Jahren in einem Krankenhaus oder einer Rehaklinik aufgehalten. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen KH-/Rehaufenthalt und CD-Prävalenz bzw. Toxinexpression ($p=1,000$ bzw. $p=0,529$) (Tabelle 6a und b; Abbildung 9a und b).

Tabelle 6a: Krankenhaus-/Rehaufenthalte und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| KH/Reha-Aufenthalte | 15 | 37% | 26 | 63% | 41 |
| Keine KH/Reha-Aufenthalte | 9 | 38% | 15 | 62% | 24 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 6b: Krankenhaus-/Rehaufenthalte und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| KH/Reha-Aufenthalte | 21 | 51% | 15 | 37% | 5 | 12% | 41 |
| Keine KH/Reha-Aufenthalte | 9 | 37% | 12 | 50% | 3 | 13% | 24 |
| Summe | 30 | | 27 | | 8 | | 65 |

Abbildung 9a: CD-Prävalenz im Verhältnis zu KH/Rehaufenthalten**Abbildung 9b:** Toxinexpression im Verhältnis zu KH/Rehaufenthalten

3.3.6 Antibiotikaeinnahme

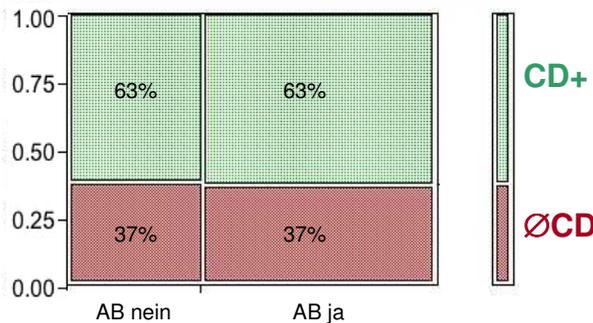
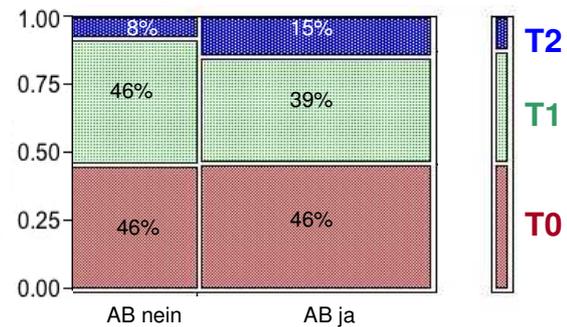
Die Einnahme von Antibiotika gilt als Hauptrisikofaktor für die Aquisition eines CD-Stammes und als entscheidender Auslöser für die Toxinexpression in vivo. 41 der 65 Patienten hatten in den letzten zwei Monaten ein Antibiotikum eingenommen. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CD-Prävalenz bzw. Toxinexpression und der Antibiotikaeinnahme festgestellt werden ($p=1,000$ bzw. $p=0,720$) (Tabelle 7a und b, Abbildung 10a und b).

Tabelle 7a: Antibiotikaeinnahme und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Antibiotikaeinnahme | 15 | 37% | 26 | 63% | 41 |
| Keine Antibiotikaeinnahme | 9 | 37% | 15 | 63% | 24 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 7b: Antibiotikaeinnahme und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Antibiotikaeinnahme | 19 | 46% | 16 | 39% | 6 | 15% | 41 |
| Keine Antibiotikaeinnahme | 11 | 46% | 11 | 46% | 2 | 8% | 24 |
| Summe | 30 | | 27 | | 8 | | 65 |

Abbildung 10a: CD-Prävalenz im Verhältnis zur Antibiotikaeinnahme**Abbildung 10b:** Toxinexpression im Verhältnis zur Antibiotikaeinnahme

3.3.7 Gastrointestinale Beschwerden

Aus den Angaben der Patienten über gastrointestinale Beschwerden zum Zeitpunkt der Stuhluntersuchung wurde ein gastrointestinaler Score (GI-Score) von 0-3 erstellt und in Zusammenhang mit der CD-Prävalenz und der Toxinexpression analysiert.

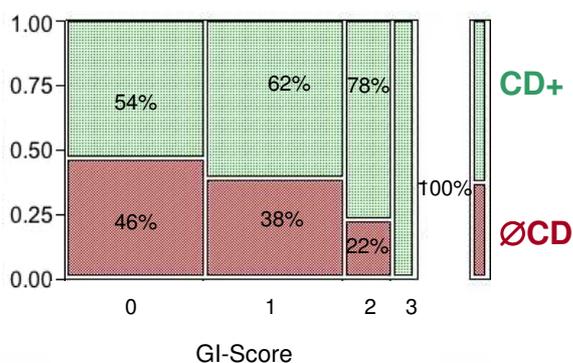
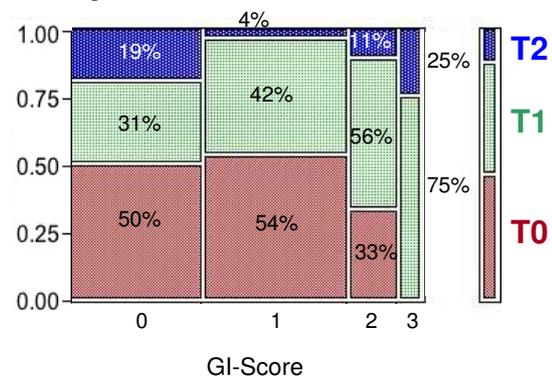
Es zeigte sich, dass die meisten CF-Patienten einen GI-Score von 0 oder 1 angaben (keine oder nur geringe gastrointestinale Beschwerden). Die CD-Prävalenz stieg zwar mit zunehmender Beschwerdesymptomatik von 54% auf 100% an, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,245$). Auch hinsichtlich der Toxinexpression zeigte sich, jedoch vor dem Hintergrund geringer Fallzahlen, kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,247$) (Tabelle 8a und b; Abbildung 11a und b).

Tabelle 8a: GI-Score und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| GI-Score 0 | 12 | 46% | 14 | 54% | 26 |
| GI-Score 1 | 10 | 38% | 16 | 62% | 26 |
| GI-Score 2 | 2 | 22% | 7 | 78% | 9 |
| GI-Score 3 | 0 | 0% | 4 | 100% | 4 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 8b: GI-Score und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| GI-Score 0 | 13 | 50% | 8 | 31% | 5 | 19% | 26 |
| GI-Score 1 | 14 | 54% | 11 | 42% | 1 | 4% | 26 |
| GI-Score 2 | 3 | 33% | 5 | 56% | 1 | 11% | 9 |
| GI-Score 3 | 0 | 0% | 3 | 75% | 1 | 25% | 4 |
| Summe | 30 | | 27 | | 8 | | 65 |

Abbildung 11a: CD-Prävalenz im Verhältnis zu gastrointestinalen Beschwerden**Abbildung 11b:** Toxinexpression im Verhältnis zu gastrointestinalen Beschwerden

3.3.8 Darmwanddicke

3.3.8.1 Ergebnisse der gemessenen Darmwanddicken bei CF-Patienten im Vergleich zu Referenzwerten von gesunden Probanden

Bei insgesamt 59 Patienten wurden sonographische Messungen der Darmwanddicke durchgeführt. Aus untersuchungstechnischen Gründen konnte bei einem Patienten das Jejunum und bei zwei Patienten das Ileum nicht dargestellt werden. Darmwandverdickungen wurden vorwiegend im Bereich des Kolons und des terminalen Ileums, deutlich weniger im Jejunum gemessen (Tabelle 9; s.a. Anhang 6.4, Abbildung 16a-f).

Tabelle 9: Darmwandverdickung bei CF-Patienten

| Darmabschnitt | verdickt | normal | Patientenzahl (100%) |
|----------------|----------|----------|----------------------|
| Jejunum | 27 (47%) | 31 (53%) | 58 |
| Ileum | 39 (68%) | 18 (32%) | 57 |
| Coecum | 41 (69%) | 18 (31%) | 59 |
| C. ascendens | 43 (73%) | 16 (27%) | 59 |
| C. transversum | 37 (63%) | 22 (37%) | 59 |
| C. descendens | 37 (63%) | 22 (37%) | 59 |

3.3.8.2 Darmwanddicke und Nachweisbarkeit von CD bzw.

Toxinexpression

Es ließ sich, vorbehaltlich der geringen Fallzahlen bei der Toxinexpression, die eine statistische Auswertung einschränkte, kein Zusammenhang zwischen der CD-Prävalenz bzw. Toxinexpression und den Darmwandverdickungen der einzelnen Darmabschnitte feststellen (Jejunum: $p=0,279$ und $p=0,289$; Ileum $p=0,389$ und $p=0,139$; Coecum: $p=0,775$ und $p=0,447$; Colon ascendens: $p=1,000$ und $p=0,666$; Colon transversus: $p=0,584$ und $p=0,794$; Colon descendens: $p=0,585$ und $p=0,405$) (s.a. Anhang 6.4, Abbildung 17).

3.3.9 Darmmotilitätsstörungen

3.3.9.1 Distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS)

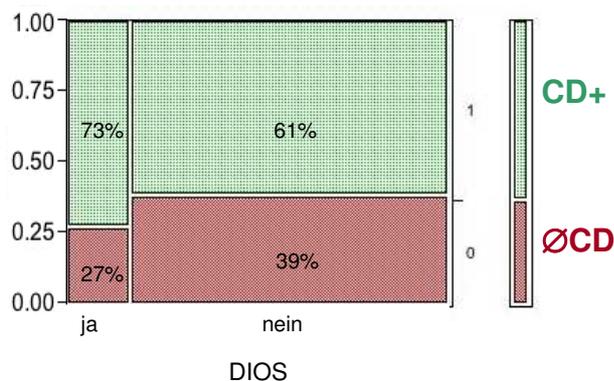
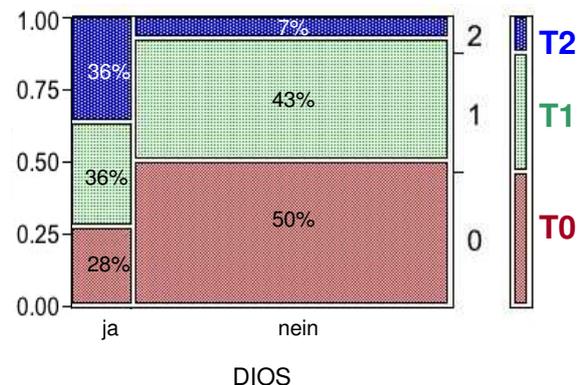
Eine Manifestation der gastrointestinalen Form der Zystischen Fibrose äußert sich als „Subileus-Zustand“ oder DIOS. Bei 11 Patienten war ein DIOS aus der Anamnese bekannt. Diese Patienten wiesen eine geringfügig, jedoch statistisch nicht signifikant höhere CD-Prävalenz auf ($p=0,733$). Dagegen war der Anteil der Patienten mit *In-vivo*-Toxinexpression in der DIOS-Gruppe mit 36% signifikant höher als in der Gruppe ohne DIOS in der Anamnese (8%; $p=0,026$) (Tabelle 10a und b; Abbildung 12a und b).

Tabelle 10a: DIOS und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| DIOS | 3 | 27% | 8 | 73% | 11 |
| Kein DIOS | 21 | 39% | 33 | 61% | 54 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 10b: DIOS und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| DIOS | 3 | 28% | 4 | 36% | 4 | 36% | 11 |
| Kein DIOS | 27 | 50% | 23 | 43% | 4 | 7% | 54 |
| Summe | 30 | | 28 | | 7 | | 65 |

Abbildung 12a: CD-Prävalenz im Verhältnis zu DIOS**Abbildung 12b:** Toxinexpression im Verhältnis zu DIOS

3.3.9.2 Mekoniumileus

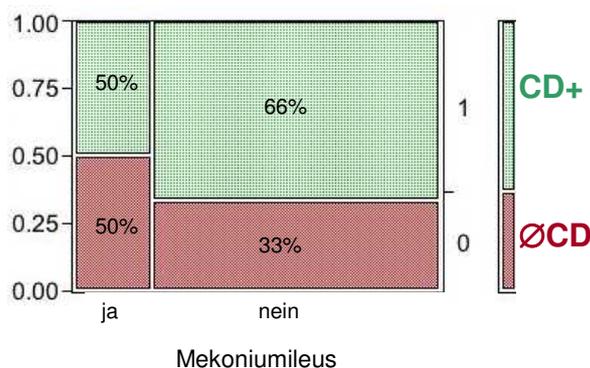
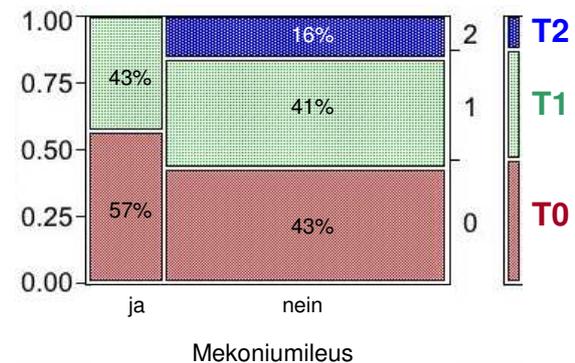
Bei 14 Patienten manifestierte sich die Zystische Fibrose postpartal als Mekoniumileus. In dieser Studie wurde untersucht, ob ein Mekoniumileus einen fördernden Einfluss auf eine CD-Besiedelung oder Toxinexpression haben könnte. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mekoniumileus und CD-Prävalenz bzw. Toxinexpression konnte jedoch nicht gezeigt werden ($p=0,350$ bzw. $p=0,263$). Tendenziell war sogar bei Patienten ohne Mekoniumileus eine höhere CD-Prävalenz und eine *In-vivo*-Toxinexpression feststellbar (Tabelle 11a und b; Abbildung 13a und b).

Tabelle 11a: Mekoniumileus und CD-Nachweis

| | Ø CD | | CD+ | | Summe |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Mekoniumileus | 7 | 50% | 7 | 50% | 14 |
| Kein Mekoniumileus | 17 | 33% | 34 | 67% | 51 |
| Summe | 24 | | 41 | | 65 |

Tabelle 11b: Mekoniumileus und Toxinexpression

| | T0 | | T1 | | T2 | | Gesamt |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl |
| Mekoniumileus | 8 | 57% | 6 | 43% | 0 | 0% | 14 |
| Kein Mekoniumileus | 22 | 43% | 21 | 41% | 8 | 16% | 51 |
| Summe | 30 | | 28 | | 7 | | 65 |

Abbildung 13a: CD-Pävalenz im Verhältnis zu Mekoniumileus**Abbildung 13b:** Toxinexpression im Verhältnis zu Mekoniumileus

3.4 Längsschnittstudie

3.4.1 CD-Besiedlung im Verlauf der Längsschnittstudie

In der Längsschnittstudie wurden die mikrobiologischen Befunde und gastrointestinalen Symptome von insgesamt 19 Patienten während der Behandlung mit Antibiotika (AB) vollständig untersucht. Zwei Patienten brachen die Studie vorzeitig ab. Pro Patient wurden zwischen einem und drei AB-Zyklen dokumentiert (s. Anhang 6.6, Tabelle 25). Es wurde untersucht, ob und inwieweit die Einnahme von Antibiotika zu einer Änderung der CD-Prävalenz und der *In-vivo*-

Toxinexpression führen, und inwieweit sich ein Zusammenhang der Toxinexpression mit gastrointestinalen Beschwerden herleiten lässt. Der Beobachtungszeitraum zwischen der Querschnittstudie und dem Beginn der Längsschnittstudie umfasste bei einigen Patienten bis zu 2 Jahren. 12 der 21 Patienten, welche die Längsschnittstudie begonnen hatten, zeigten zwischen den beiden Beobachtungszeiträumen keine Änderung hinsichtlich ihres CD-Besiedlungsstatus, 6 Patienten hatten ihren CD-Stamm verloren und 3 Patienten zwischenzeitlich CD neu akquiriert (Tabelle 12). Kein Patient blieb konstant CD-negativ.

Tabelle 12: Entwicklung des CD-Status von der Querschnittstudie bis zum Beginn der Längsschnittstudie

| Befundentwicklung | | | Anzahl Patienten |
|-------------------|---|-----|------------------|
| Q | → | A | |
| CD+ | → | CD+ | 12 |
| CD+ | → | ØCD | 6 |
| ØCD | → | CD+ | 3 |
| ØCD | → | ØCD | 0 |

Q: Querschnittstudie

A: Beginn der AB-Therapie

Bei 14 Patienten konnte eine longitudinale Verlaufsbeobachtung wie geplant vorgenommen werden. 5 Patienten erhielten zwei oder mehr überlappende Antibiotikazyklen und wurden in den folgenden tabellarischen Auswertungen nicht erfasst.

Insgesamt traten keine großen Veränderungen auf. Die meisten Patienten der Längsschnittstudie waren CD-positiv und behielten ihren Befundstatus über den Beobachtungszeitraum. Kleinere Veränderungen traten vor allem im Kontrollzeitraum nach der Antibiotikagabe auf. Hier akquirierten 4 Patienten einen toxischen Stamm, während nur bei einem Patienten eine Elimination eines toxischen Stammes erfolgte (Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13: CD-Prävalenz an Beobachtungszeitpunkten A, B, C

| Patienten | Befund: | | | | | |
|--------------------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | ØCD | | n.toxCD | | toxCD | |
| | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil |
| Zeitpunkt A | 4 | 29% | 2 | 14% | 8 | 57% |
| Zeitpunkt B | 5 | 36% | 1 | 7% | 8 | 57% |
| Zeitpunkt C | 2 | 14% | 1 | 7% | 11 | 79% |

A: Beginn der AB-Therapie **B:** Ende der AB-Therapie **C:** Ende des Kontrollzeitraumes

Tabelle 14: Verlauf des CD-Besiedlungsstatus

| Befundentwicklung | Entwicklung A→B | Entwicklung B→C | Entwicklung A→C |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ØCD → ØCD | 2 | 1 | 1 |
| toxCD → ØCD | 2 | 1 | 1 |
| n.toxCD → ØCD | 1 | 0 | 0 |
| ØCD → toxCD | 1 | 4 | 2 |
| toxCD → toxCD | 6 | 7 | 7 |
| n.toxCD → toxCD | 1 | 0 | 2 |
| ØCD → n.toxCD | 1 | 0 | 1 |
| toxCD → n.toxCD | 0 | 0 | 0 |
| n.toxCD → n.toxCD | 0 | 1 | 0 |

A: Beginn der AB-Therapie **B:** Ende der AB-Therapie **C:** Ende des Kontrollzeitraumes

Von den 5 Patienten mit zwei oder mehr AB-Zyklen behielt nur ein Patient seinen positiven CD-Besiedlungsstatus über den gesamten Beobachtungszeitraum (P31). Bei einem Patienten (P8) wurde CD im Verlauf des zweiten und dritten Zyklus eliminiert. Zwei Patienten (P41, P44) akquirierten im Kontrollzeitraum toxische Stämme, ein Patient (P 14) einen nicht toxischen Stamm (s. Anhang 6.6, Tabelle 25).

3.4.2 In-vivo-Toxinexpression im Stuhl im Verlauf der Längsschnittstudie

Eine Toxinexpression im Stuhl konnte bei insgesamt zwei von 19 Patienten (10,5%) festgestellt werden (s. Anhang 6.6, Tabelle 25). Weder zum Zeitpunkt des Toxinnachweises noch später wurden bei diesen Patienten gastrointestinale Beschwerden angegeben. Bei einem dieser Patienten (P 32) wurde vor Beginn der Antibiotikatherapie ein toxischer CD-Stamm ohne Toxinexpression im Stuhl nachgewiesen. Nach Ende der Antibiotika-Einnahme war der Stamm zwar nicht mehr anzüchtbar, jedoch eine Toxinexpression im Stuhl nachweisbar. Am Ende des vierwöchigen Kontrollzeitraumes war das Ergebnis aller Nachweisverfahren negativ. Beim anderen Patienten (P 36) war schon vor Beginn der Antibiotikatherapie eine Toxinexpression durch einen toxischen Stamm nachweisbar. Nach Beendigung der Antibiotika-Einnahme war der toxische Stamm zwar nachweisbar, eine Toxinexpression war aber nicht mehr festzustellen. Am Ende des vierwöchigen Kontrollzeitraumes lag jedoch wieder der Ausgangsbefund mit Toxinexpression vor.

3.4.3 Gastrointestinale Symptome im Verlauf der Längsschnittstudie

Beschwerden wurden im ganzen Studienzeitraum von drei Patienten (15,8%) angegeben (s. Anhang 6.6, Tabelle 25). Ein Zusammenhang zwischen Toxinfreisetzung und gastrointestinalen Symptomen konnte nicht beobachtet werden. Zwar war bei einem Patienten die Akquisition eines toxischen Stammes mit einer Fieberepisode verbunden (P 20), bei den übrigen zwei Patienten (P 8 und 31) bestanden die gastrointestinalen Symptome jedoch ohne CD-Nachweis.

4 Diskussion

CF-Patienten weisen eine Vielzahl an Risikofaktoren für eine CD-Infektion auf, die jedoch oligosymptomatisch oder mit atypischen Symptomen verlaufen kann. Viele CF-Patienten zeigen überdies bislang ätiologisch ungeklärte, vorwiegend submuköse Darmwandverdickungen, wie sie typischerweise auch bei CD-Kolitis auftreten. Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die klinische Relevanz von CD-Infektionen sowie krankheitsspezifischen Auswirkungen auf den Darm bei CF-Patienten im Rahmen der zweigeteilten Studie zu analysieren.

4.1 Probentransport und -verarbeitung

Entscheidend für Prävalenzstudien ist die Auswahl geeigneter, sensitiver Nachweisverfahren. CD gehört zu den obligat anaeroben Bakterien, die bei suboptimalen Transport- und Kulturbedingungen nur schwer anzüchtbar sind. Alle in dieser Studie untersuchten Stuhlproben waren nach genauer Anleitung von den Patienten bzw. deren Eltern zu Hause entnommen und verschickt worden. Die Entscheidung für den postalischen Versand der Stuhlproben war zugunsten einer möglichst großen Stichprobe, die nicht vom Krankenhausmilieu geprägt war, getroffen worden. Zur Sicherstellung des kulturellen Nachweises wurde jede Stuhlprobe in einem für Anaerobier geeigneten Transportmedium und unter anaeroben Bedingungen verschickt. In equinen Stuhlproben konnte CD bei einer Lagerung der Proben unter anaeroben Bedingungen bei 4 °C noch bis zu 30 Tagen nach Probenentnahme sicher angezüchtet werden. Der Nachweis der CD-Toxine war demgegenüber nicht an anaerobe Transportbedingungen gebunden [115] Die meisten Proben lagen innerhalb 48 bis 72 Stunden im Labor zur Bearbeitung vor. Auch aus einer Probe, die 5 Tage auf dem Postweg war, konnte noch CD isoliert werden.

Für den kulturellen Nachweis von CD wurde mit vorreduzierten CCFA-Selektivnährböden eine etablierte Methode gewählt [43] vgl. auch [78,16,47,7]. Durch Inkubation der Proben in 2 verschiedenen Anreicherungsmedien (CD-Bouillon

und Leberbouillon) sollten auch geringe Keimzahlen erfasst werden können [108].

Die hohe kulturelle Nachweisrate von CD von 63% lässt darauf schließen, dass Transportbedingungen und Nachweisverfahren in optimierter Form gewählt worden sind.

Obwohl der Zytotoxizitätstest in Zellkulturen bislang noch als „gold standard“ des Toxinnachweises bei CD gilt [101,113], wurde vor allem aus logistischen Gründen ein kommerzieller Enzymimmunoassay eingesetzt, der jedoch mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils über 94 % als dem Zytotoxizitätstest fast gleichwertig eingeschätzt werden kann [92,66].

4.2 CD-Prävalenz bei CF-Patienten

Die CD-Prävalenz im Stuhl war mit 63% bei CF-Patienten deutlich höher als vergleichbare Studien bislang gezeigt haben. Mehrere Studien aus den 80er Jahren wiesen eine deutlich höhere CD-Besiedlungsrate bei CF-Patienten nach (21-32%) als bei der Normalbevölkerung (2-8%) [120,116,86,37]. In diesen Studien wurden jedoch keine besonderen Transportmaßnahmen durchgeführt und zum kulturellen Nachweis nur ein Festmedium und ein Anreicherungsverfahren eingesetzt. Die hohe Nachweisrate der jetzt durchgeführten Studie könnte daher auf die optimierten Probenversandbedingungen und den breiten Untersuchungsansatz im Labor zurückgeführt werden. Daneben wären auch epidemiologische Faktoren oder Änderungen im Management der CF-Erkrankung (Antibiotika-Regime, Krankenhausaufenthalte) als Ursache denkbar, die in den letzten 20 Jahren zu einer erhöhten Prävalenz der CD-Besiedlung beigetragen haben könnten [114]. Der Vergleich zu einer Kontrollgruppe hämato-onkologischer Patienten, die ebenfalls vermehrt den Risikofaktoren Antibiotikaeinnahme und Krankenhausaufenthalten ausgesetzt waren, und deren Stuhlproben gleichen Versand- und Kultivierungsbedingungen unterlagen wie die der CF-Patienten, zeigte jedoch nur bei CF-Patienten eine gegenüber früheren Studien höhere CD-Prävalenz (63,1% vs. 6,9%). Bereits Peach und Kollegen [86] beschrieben 1986 eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte CD-Prävalenz bei

CF-Patienten (32,4% vs. 7,5%). Die deutlich höhere Nachweisrate an CD bei CF-Patienten dieser Studie kann daher wahrscheinlich nicht ausschließlich auf die verbesserten Transportbedingungen und Nachweisverfahren zurückgeführt werden, da die Nachweisrate in der Kontrollgruppe nicht im vergleichbaren Ausmaß angestiegen ist. Dies weist auf CF-spezifische Risikofaktoren für eine CD-Besiedlung hin, wie sie jüngst von der Arbeitsgruppe um Borowitz beschrieben worden sind [12].

4.2.1 Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der CD-Prävalenz

Es war Ziel der Studie, eine Abhängigkeit des CD-Besiedlungsstatus bei CF-Patienten von Alter und Geschlecht zu untersuchen.

In mehreren Studien wird das weibliche **Geschlecht** als Risikofaktor für eine CD-assoziierte Erkrankung beschrieben [6,78,95,66,2,28]. Als Erklärung für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied wird der häufigere Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika bei Frauen zur Behandlung von urogenitalen Infektionen herangezogen. In der vorliegenden Untersuchung wiesen die weiblichen Patienten jedoch gegenüber dem männlichen Geschlecht nur eine leichte, statistisch nicht signifikant erhöhte CD-Prävalenz auf. Auch die Studien von Cooperstock et al. und Bolton et al. beobachteten keine geschlechtsabhängige Änderung der CD-Besiedlung bei Säuglingen und Kleinkindern. [22,11].

Während für Normalpersonen altersabhängige Besiedlungsraten bekannt sind, sind entsprechende Daten für CF-Patienten bislang nicht publiziert worden. Bei den CF-Patienten dieser Studie zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen **Alter** und Besiedlungsstatus, der prinzipiell dem Verlauf bei Normalpersonen vergleichbar ist. Die höchste CD-Prävalenz von 80-86% wiesen CF-Patienten im Neugeborenen- und Kleinkindesalter auf. Diese Besiedlungsrate nahm kontinuierlich bis zum 12. Lebensjahr auf ca. 50% ab, bis zum 18. Lebensjahr auf 20-30%. Normalpersonen zeigen in der Neugeborenen- und Säuglingsperiode Nachweisraten von 50-67%, die nach dem 2. Lebensjahr auf 2-8%

abfallen. Es ist also bei CF-Patienten ein deutlich langsamerer Rückgang der CD-Besiedlung als bei Gesunden zu beobachten.

Vermutlich ist die hohe CD-Prävalenz bei Neugeborenen und Säuglingen in beiden Gruppen auf die gleichen Ursachen zurückzuführen. Hier wird vor allem die Unreife des Verdauungstraktes Neugeborener mit noch fehlendem protektivem Milieu der normalen Mikroflora des Darms als Ursache postuliert [79]. Mit Ausbildung der normalen Mikroflora, die dem Überwuchern mit pathogenen Mikroorganismen entgegenwirkt, reduziert sich nach dem 2. Lebensjahr auch die Nachweisrate an CD in der gesunden Bevölkerung. Dies ist bei den CF-Patienten nicht der Fall. Man kann daher annehmen, dass bei CF-Patienten spezifische, die CD-Kolonisation begünstigende Faktoren einwirken oder physiologische Faktoren, die einer CD-Besiedlung entgegenwirken, bei CF-Patienten nur eingeschränkt wirksam werden (vgl. auch [12]). Daher wurden weitere Parameter, die den Gesundheitszustand der CF-Patienten charakterisieren, in ihrer Einflussnahme auf die CD-Prävalenz untersucht.

4.2.2 Einfluss des Ernährungszustandes und der Lungenfunktion auf die CD-Prävalenz und Toxinexpression

Ernährungszustand und Lungenfunktion sind zwei aussagekräftige Parameter zur Beurteilung des Gesundheitszustandes von CF-Patienten, die entweder durch eine CD-Besiedlung verändert werden oder selbst eine CD-Kolonisierung beeinflussen könnten. So wird angenommen, dass eine CD-assoziierte Erkrankung **Untergewicht** hervorrufen kann [5,67]. Untergewicht könnte jedoch auch mit reduziertem Resistenzvermögen gegenüber pathogenen Einflüssen einhergehen und so eine CD-Besiedlung begünstigen (vgl. [109]). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Ernährungsstatus und hier insbesondere einem tendenziellen Untergewicht und einer CD-Besiedlung bzw. Toxinexpression. Die Arbeitsgruppe von Al-Turehi und Mitarbeitern kam vor kurzem zu ähnlichen Schlussfolgerungen [3].

Demgegenüber konnte in dieser Arbeit erstaunlicherweise ein signifikanter Zusammenhang zwischen der **Lungenfunktion** und der Besiedlung mit CD fest-

gestellt werden: Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion wiesen eine CD-Prävalenz von 76% auf im Gegensatz zu Patienten mit guter Lungenfunktion, die nur zu 41% mit CD besiedelt waren. Dieser Unterschied ist noch umso auffälliger, da Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion im Mittel älter waren (Durchschnitt 16,8 Jahre) als die Patienten mit guter Lungenfunktion (Durchschnitt 12,2 Jahre). CF-Patienten sind aber, wie oben gezeigt, in jüngeren Lebensjahren deutlich häufiger mit CD besiedelt als in älteren Jahren. Die CD-Prävalenz verläuft also im Verhältnis zur Lungenfunktion entgegen dem Alterstrend. Eine CD-Besiedlung findet nach derzeitigem Kenntnisstand ausschließlich intestinal statt und hat daher keinen direkten Einfluss auf die pulmonale Situation. Man könnte daher annehmen, dass umgekehrt Veränderungen in der Lungenfunktion indirekt Einfluss auf die CD-Besiedlung nehmen. Dies könnte durch Summierung von bekannten Risikofaktoren entstehen. So wäre ein möglicher Erklärungsansatz, dass Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion häufiger Antibiotika einnehmen und häufiger hospitalisiert sind. Von den Patienten dieser Studie nahmen aber Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion tendenziell sogar weniger Antibiotika ein (58,8%) als Patienten mit guter Lungenfunktion (65,5%) und hinsichtlich der Krankenhaus- und Rehaufenthalte waren keine Unterschiede zu erkennen (64,7% vs. 65,5%). Die Analyse dieser Risikofaktoren erfasste in dieser Studie jedoch nur einen begrenzten Zeitraum. Es ist daher trotzdem denkbar, dass sich über einen zeitlich längeren Verlauf möglicherweise doch signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Antibiotikagabe und Hospitalisation summiert haben könnten.

Möglich ist auch, dass ein weiterer Faktor Lungenfunktion und CD-Prävalenz zugleich beeinflusst. Denken ließe sich dabei z.B. an durch den CFTR-Defekt hervorgerufene pulmonale und intestinale Veränderungen (z.B. Mukus-Zusammensetzung, subklinische Entzündungsreaktionen o.Ä.). Bisher haben sich keine Arbeiten mit dem Zusammenhang zwischen Lungenfunktion und CD-Besiedlung beschäftigt, so dass sich hier ein interessanter Aufgabenkomplex für weitere Studien herausstellt.

4.2.3 Einfluss von Krankenhaus- bzw. Rehaufenthalten und Antibiotika auf die CD-Prävalenz und Toxinexpression

Häufige und verlängerte **Krankenhausaufenthalte** bedingen eine stärkere Exposition gegen nosokomiale Infektionserreger wie z.B. *Clostridium difficile* und stellen daher vor allem im Zusammenhang mit Antibiotikatherapien den wichtigsten bekannten Risikofaktor für die Akquisition von CD dar [42,116,86,57,81,56,114].

Diese Studie analysierte den Einfluss von Krankenhaus- und Rehaufenthalten der letzten zwei Jahre auf die CD-Besiedlung von CF-Patienten. Dabei zeigten Patienten mit stationärem Aufenthalt in diesen medizinischen Einrichtungen keine signifikant höhere CD-Prävalenz und Toxinexpression als Patienten ohne stationären Aufenthalt.

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren aus jüngeren CF-Patienten. In diesem Alter sind Krankenhausaufenthalte gegenüber von Rehaufenthalten eher seltener. Da Patienten bei Rehabilitationsmaßnahmen im Vergleich zu hospitalisierten Patienten in der Regel einen besseren Gesundheitszustand aufweisen und dadurch weniger aggressiven bzw. keinen AB-Einflüssen ausgesetzt sind und Rehaeinrichtungen dadurch im Vergleich zu Krankenhäusern zusätzlich einem geringeren Selektionsdruck durch Antibiotika unterliegen, können diese daher als geringer risiko-reich als Krankenhausstationen eingestuft werden. Dies könnte eine Erklärung für den hier fehlenden Zusammenhang zwischen Aufenthalten in stationären Einrichtungen und CD-Prävalenz darstellen.

Im Gegensatz zu einer Vielzahl von publizierten Studien [17,60,105,66,106,84] konnte in der Querschnittstudie kein Einfluss einer aktuellen **Antibiotikaeinnahme** auf die CD-Prävalenz der CF-Patienten festgestellt werden. Das muss jedoch nicht bedeuten, dass Antibiotika in dieser Studie keinen Einfluss auf die CD-Prävalenz hatten. Denn diese lag bei beiden Patientengruppen mit und ohne Antibiotikaeinnahme mit über 60% deutlich höher als in vergleichbaren Studien zuvor. Dieser hohe Wert wurde nicht nur zum Zeitpunkt der Querschnittstudie, sondern auch zum Beginn der Längsschnittstudie, also bis zu 2 Jahre später, ermittelt. Eine Erklärung hierfür könnte das in den letzten

Jahren stark veränderte therapeutische Management der CF-Erkrankung sein. Denn obwohl sich tendenziell die Hospitalisationshäufigkeit vermindert, somit potentielle Infektionsquellen abnehmen, ist doch eine Intensivierung in den antibiotischen Therapien zu verzeichnen. So kommen allein bei Atemwegsinfektionen und vor allem in der Problemkeimbekämpfung bei vielen Patienten regelmäßig hochpotente Antibiotika-Regimes, zunehmend auch in Heim-i.v.-Therapien, zum Einsatz. Die hohe CD-Prävalenz könnte auf eine durch die Vielzahl von AB-Behandlungen hervorgerufene persistierende CD-Besiedlung zurückzuführen sein. Dafür spricht, dass, wie oben gezeigt, kein Patient zwischen Querschnittstudie und Beginn der Längsschnittstudie CD-frei blieb (s. Ergebnisse 3.4.1 Tabelle 12). Dies ließe sich mit einer immer wieder neu erfolgenden Besiedlung erklären; wahrscheinlicher ist jedoch, dass bei den meisten dieser Patienten CD immer vorhanden ist, teilweise jedoch unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze bleibt.

In diesem Fall hätte bei der ohnehin sehr hohen CD-Prävalenz zum Zeitpunkt der Querschnittstudie eine weitere aktuelle Antibiotikagabe wenig Einfluss auf eine neue CD-Akquisition. Die Nichtnachweisbarkeit eines Einflusses einer aktuellen Antibiotikatherapie auf die CD-Prävalenz bedeutet also nicht unbedingt, dass kein Einfluss vorliegt, sondern ist im Gegenteil eher durch die frühere dauerhafte Beeinflussung der Darmflora durch Antibiotikagaben zu erklären. Für eine Auswertung von Antibiotika als Risikofaktor für die Akquisition von CD wäre daher eine Erfassung der kumulativen Antibiotikagaben vermutlich aussagekräftiger.

Aus den Beobachtungen in der Längsschnittstudie lassen sich zudem Hinweise darauf ableiten, dass der Zeitraum der Antibiotikaexposition für eine CD-Akquisition weniger entscheidend zu sein scheint als die postexpositionelle Zeit. So waren von den 14 Patienten der Längsschnittstudie zu Beginn vier Patienten ohne Nachweis von CD, nach Abschluss der Antibiotikatherapie fünf, am Ende des Kontrollzeitraumes jedoch nur noch zwei Patienten. Vier Patienten erwarben im postexpositionellen Zeitraum einen toxischen Stamm, während dies unter Antibiotikaexposition nur bei einem Patienten vorkam (s. Ergebnisse 3.4.1, Tabelle 13 und Tabelle 14).

Eine dauerhafte Kolonisierung setzt die Präsenz und Vermehrung des Erregers im Intestinum voraus. Es wird vermutet, dass die Infektion mit CD primär über die Aufnahme von resistenten Sporen verläuft. Eine Auskeimung und Vermehrung der Sporen jedoch könnte unter Antibiotikaexposition ebenfalls eingeschränkt sein. Holton und Hall konnten zeigen, dass unter Gabe von Cephalosporinen und Penicillinen die Besiedlung von Neugeborenen mit CD verzögert werden kann [54]. Im antibiotikafreien Kontrollzeitraum jedoch, wenn Antibiotika-sensible Anteile der Darmflora sich noch nicht rekonstituieren, kann eine Auskeimung und damit Etablierung der relativ resistenten CD-Stämme leichter erfolgen [97]. Bei einem in mehreren Antibiotika-Zyklen behandelten Patienten (P 44), der vorbeugend gegen eine CD-Infektion zusätzlich Metronidazol einnahm, war zwar sein ursprünglicher nicht toxischer CD-Stamm nach Abschluss der Antibiotikatherapie nicht mehr nachweisbar. Im Kontrollzeitraum wurde er jedoch mit einem toxischen und nicht toxischen Stamm kolonisiert.

Dennoch erscheint eine CD-Akquisition nicht immer eine dauerhafte Besiedlung zu bedingen. Von 21 Patienten, die an der Querschnittstudie und Längsschnittstudie teilnahmen, wiesen 6 zwischen der ersten und zweiten Untersuchung, die in einem Zeitabstand von bis zu 2 Jahren durchgeführt wurden, einen Verlust des primär nachgewiesenen CD-Stammes auf. Demgegenüber erwarben nur 3 Patienten in diesem Zeitraum einen CD-Stamm. Weiterreichende Aufschlüsse über mögliche Erregerwechsel, die beim einfachen Erfassen eines CD-positiven Status nicht erkennbar sind, und der Dynamik einer CD-Besiedlung werden mit molekularen Typisierungsverfahren der CD-Isolate möglich sein.

Die molekularen Mechanismen, die eine *In-vivo*-Toxinexpression bedingen, sind bislang noch weitgehend unklar [114]. Dupuy und Sonenshein beschrieben eine Abhängigkeit der *In-vitro*-Toxinsynthese von der Wachstumsphase von CD. So scheint in der exponentiellen Wachstumsphase die Toxinproduktion unterdrückt zu sein und erst beim Eintreten in die Stationäre Phase Toxinproduktion möglich zu werden [35,76]. Daneben spielen weitere Faktoren wie z.B. der Aminosäure- und Biotin-Gehalt oder die Kohlenstoffquelle bei der *In-vitro*-Toxin-Expression eine Rolle [121,76]. Stressfaktoren wie z.B. subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen und katabole Stoffwechsellagen sowie die

Kultivierungstemperatur können ebenfalls eine Toxinproduktion auslösen [35,106,58,114]. Die *In-vivo*-Toxinexpression bei einem CD-kolonisierten Patienten ist aber nach bisherigem Wissen ganz wesentlich von der Einnahme von Antibiotika abhängig [106]. Bei der hohen Prävalenz von toxischen CD-Stämmen (73%) wurde eine hohe Rate an Toxinexpression unter Antibiotika in dieser Studie erwartet. So berichteten Edelstein und Kollegen bei hospitalisierten CF-Patienten unter i.v.-Antibiose von Toxinnachweisraten von 50% [37]. In starkem Kontrast dazu stehen die hier erhobenen Befunde, bei denen nur bei insgesamt 2 von 19 Patienten (10,5%) in der Längsschnittstudie (s. Anhang 6.4, Tabelle 26) und bei 8 von 65 Patienten (12%) in der Querschnittstudie eine Toxinexpression nachweisbar war; 6 der 8 Patienten der Querschnittstudie standen dabei unter Einfluss von Antibiotika, die als Auslöser von Toxinexpression bekannt sind (1x Acylaminopenicillin, 1x Amoxicillin, 2x Cephalosporine, 1x Clindamycin, 4x Cotrimoxazol, 3x Makrolide, 2x Aminoglykoside) [60,105,79]. Die geringe Toxinnachweisrate in dieser Studie deutet darauf hin, dass Antibiotikaexposition nicht allein ausschlaggebend für eine *In-vivo*-Toxinexpression bei CF-Patienten ist. Eine Ursache dafür könnte sein, dass hier die meisten Patienten nicht hospitalisiert waren und anteilig weniger Antibiotika einnahmen (63%), während bei Edelstein et al. alle Patienten stationär behandelt wurden und Antibiotika erhielten. Auch CF-spezifische Faktoren könnten möglicherweise einer Toxinexpression entgegenwirken. Neuere Arbeiten weisen auf immunologische Komponenten und die Produktion antitoxischer Enzyme hin [82]. Auch hier bieten sich für folgende Studien interessante Ansatzpunkte.

4.2.4 Zusammenhang zwischen gastrointestinalen Beschwerden und Nachweisbarkeit von CD bzw. Toxinexpression

Von 65 Patienten der Querschnittstudie berichteten 39 (60%) über abdominale Beschwerden, 2/3 davon nur über geringe Beschwerden mit GI-Score 1. Keiner der Patienten gab an, starke Beschwerden gehabt zu haben. Die Mehrheit der Patienten war zum Zeitpunkt der Querschnittuntersuchung völlig oder relativ beschwerdefrei.

Tendenziell zeigte sich jedoch eine Zunahme der CD-Prävalenz mit vermehrter Beschwerdesymptomatik ohne eine entsprechende Toxinexpression. Auch bei den in der Längsschnittstudie beobachteten 19 Patienten traten nur bei drei Beschwerden auf, die jedoch nur in einem Fall mit einer Akquisition eines potentiell toxischen Stammes einhergingen. Bei den anderen beiden Patienten wurde kein bzw. ein nicht toxischer CD-Stamm nachgewiesen. Toxinexpression wurde bei 2 Patienten ohne gastrointestinale Beschwerdesymptomatik beobachtet. Dies lässt einen kausalen Zusammenhang zwischen CD-Kolonisation und abdominalen Beschwerden fraglich erscheinen.

Auch andere Studien berichten über die auffallende Diskrepanz zwischen hoher Kolonisierungsrate bei fehlender erhöhter Inzidenz von symptomatischen CD-Infektionen [120,116,86,37]. Obwohl Patienten meistens asymptomatisch mit z.T. auch toxinbildenden CD-Stämmen kolonisiert sind, existieren jedoch eine Vielzahl von Fallberichten und Publikationen über symptomatische CD-Infektionen insbesondere PMC mit z.T. auch dramatischen Verläufen [90,119,96,8,71,99,55]. Neben typischer Krankheitssymptomatik sind bei CF-Patienten auch atypische Verläufe von CD-Infektionen mit Schmerzen ohne Diarrhoe beobachtet worden, die sich computertomographisch als Pankolitis darstellten [8]. Insbesondere bei Kindern kann eine CD-Infektion mit vielfältiger atypischer Symptomatik (Appetitlosigkeit, rezidivierendes Erbrechen, Koliken, Meteorismus, Gedeihstörungen) verlaufen [79]. In einem Fall einer schweren CD-assoziierten AAC konnten Darmwandverdickungen festgestellt werden, die sich nach CD-Eradikation vollständig zurückbildeten [99]. Auch in dem Tübinger Patientenkollektiv wurden bereits mehrfach CD-Colitiden mit typischer und atypischer Beschwerdesymptomatik und z.T. chronisch-rezidivierendem Verlauf beobachtet [123].

Als Ursachen für die häufig geringe Symptomatik der CD-Infektion bei CF-Patienten werden immunologische Reaktionen gegen CD-Toxine, verändertes Darmmilieu, andersartig zusammengesetzte Mikroflora oder Fehlen von Toxinrezeptoren in der Darmmukosa diskutiert [55]. Andere Autoren sehen die CF-assoziierten Störungen des epithelialen Chloridionentransportes als Ursache an für die fehlende Diarrhoe bzw. die mangelnde Suszeptibilität der CF-Patienten

für *Escherichia-coli*-Enterotoxine [37,45]. Welkon et al. und Peach et al. vermuteten ein Fehlen von Toxinrezeptoren bei CF-Patienten [116,86]. Möglich wäre allerdings auch eine durch den CF-spezifischen zähen Schleim bedingte Unerreichbarkeit der Toxinrezeptoren für die Toxine, wie auch für Neugeborene postuliert wird [97]. Andere Autoren vermuten, dass bestimmte CF-Mutationstypen eine erhöhte Suszeptibilität für CD-Toxine aufweisen könnten und dass erst das Zusammenspiel CD-spezifischer und wirtsspezifischer Faktoren für die Ausprägung einer CD-assoziierten Erkrankung verantwortlich sind [118,96].

Zu den wirtsspezifischen Faktoren zählen auch erworbene Immunreaktionen. Shim et al. zeigten, dass eine früher erfolgte Kolonisation mit CD später vor einer CD-assoziierten Erkrankung schützen kann [100]. Auch Welkon et al. vermuteten eine bereits im Kindesalter mit Erstexposition einsetzende immunologische Antwort, die zwar nicht vor einer Kolonisation mit CD schützt, jedoch vor deren Toxinauswirkungen [116]. Diese Vermutungen bestätigten sich in späteren Untersuchungen, die eine Abhängigkeit der klinischen Ausprägung einer CD-Infektion von der Existenz von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Toxin A und Oberflächenproteine von CD nachweisen konnten [61,69,68,34]. Auf dieser Grundlage wurde ein Impfstoff gegen Toxin A entwickelt, der sich z. Zt. in der Erprobung befindet [1,104].

Im Rahmen dieser Studie muss jedoch noch ein weiterer Faktor in Betracht gezogen werden, der bislang nicht systematisch erfasst wurde. Einige der Patienten nahmen parallel zur Antibiotikatherapie Probiotika ein. Die Wirkung von Probiotika soll durch selektive Unterstützung einzelner Komponenten der Darmflora auf einer Stärkung der sogenannten Kolonisationsresistenz beruhen [88,122,82]. Möglicherweise beeinflusst dies neben der CD-Kolonisation und Toxinexpression auch indirekt die Schwere der abdominalen Symptomatik.

4.2.5 Zusammenhang zwischen gastrointestinalen Manifestationsformen der Zystischen Fibrose und Nachweisbarkeit von CD bzw. Toxinexpression

Die meisten CF-Patienten zeigen eine gastrointestinale Manifestation der Mukoviszidose [85]. Durch die zunehmend steigende Lebenserwartung ergibt sich außerdem ein ansteigendes Risiko für früher eher seltener beobachtete gastrointestinale Krankheitsmanifestationen wie DIOS, Invagination, akute Appendizitis, Morbus Crohn, Fibrosierende Colonopathie (FC), gastrointestinale Karzinome und pseudomembranöse Kolitis [18]. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Korrelationen zwischen der CD-Besiedlung und Toxinexpression mit Komplikationen wie Darmwandverdickungen, DIOS und Mekoniumileus nachweisbar sind.

4.2.5.1 Darmwandverdickung

Die Messung der Darmwanddicken wurde durch die abdominelle Sonographie durchgeführt, welche als nicht-invasive Methode zur Untersuchung von intestinalen Erkrankungen dient und durch den Einsatz hochauflösender Ultraschallgeräte die Identifizierung verschiedener Darmwandschichten ermöglicht [63]. Entzündungen der Darmwand stellen sich dabei durch Darmwandverdickung mit aufgehobener Differenzierung der Darmwandschichten dar, wodurch eine Aussage über den Grad, nicht jedoch über die Art der Erkrankung möglich ist [50]. Ein Vorteil gegenüber anderen Untersuchungsmethoden ist dabei auch die uneingeschränkte Beurteilung der Entzündungsreaktion aller Darmwandschichten [50].

Aus organisatorischen Gründen konnte die sonographische Darmwanddickenmessung bei einigen Patienten nicht in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang mit der Stuhluntersuchung durchgeführt werden. Nach den Untersuchungen von Haber et al. bleiben jedoch Darmwanddicken über einen Zeitraum von einem Jahr relativ konstant [49]. Auch zeigten sich bei Patienten dieser Studie, bei denen im Untersuchungszeitraum aus unterschiedlichen Gründen mehrere Darmwanddickenmessungen durchgeführt worden waren, kaum Abweichungen

vom Vorergebnis. Sieht man von akuten entzündlichen Ereignissen ab, kann man somit davon ausgehen, dass sich Änderungen der Darmwanddicke erst über einen längeren Zeitraum vollziehen. Die Besiedlungsrate im Patientenkollektiv blieb im Verlaufszeitraum dieser Studie ebenfalls relativ konstant bei > 60%. Beide Parameter wurden daher auch bei einem größeren zeitlichen Abstand voneinander ausgewertet.

Die meisten der untersuchten CF-Patienten zeigten nachweisbare Darmwandverdickungen vorwiegend im Colon und terminalen Ileum ($\geq 63\%$). Diese Darmabschnitte werden auch regelmäßig im Rahmen einer CD-assoziierten Infektion wie z.B. einer pseudomembranösen Kolitis betroffen [13,91,114], häufig mit messbaren Darmwandverdickungen [9,10,59].

In den letzten 10 Jahren sind mehrfach asymptomatische Darmwandverdickungen bei CF-Patienten beschrieben worden, deren Ätiologie jedoch bislang ungeklärt ist [51,49,89,93,21]. Bei unterschiedlichen Darmmanifestationen (DIOS, FC, M.Crohn, usw.) kommen bei CF-Patienten Verdickungen der Darmwand auch als Zeichen einer entzündlichen Aktivität vor [87]. Deshalb bestand die Frage, ob den in dieser Studie nachgewiesenen Verdickungen auch subklinische Entzündungsreaktionen zugrunde liegen könnten.

So hatten schon Croft et al. und Smyth et al. bei der Untersuchung gastrointestinaler Lavageflüssigkeiten von CF-Patienten in allen Fällen Entzündungszeichen nachweisen können [23,103], und Smyth et al. formulierten die Hypothese, dass primäre Entzündungsreaktionen bei CF-Patienten nicht nur auf die Lunge beschränkt sind, sondern dass diese auch subklinisch im Gastrointestinaltrakt als Ergebnis des zugrunde liegenden Basisdefektes vorkommen könnten und z.B. die FC aus dem Zusammenwirken verschiedener Entzündungsprozesse unterschiedlicher Ätiologie entsteht. Als weitere beteiligte Faktoren an diesem entzündlichen Prozess werden darüber hinaus eine durch erhöhte intraluminale Drucksteigerung (z.B. DIOS) hervorgerufene Ischämie oder toxisch wirkende Metabolite, Enzyme, Abbauprodukte und Medikamente aufgeführt [32,31].

Durch den Nachweis subklinischer Entzündungen bei CF-Patienten einerseits und die Häufung von Darmwandverdickungen an von CD-Infektionen besonders betroffenen Darmregionen andererseits bestand die Vermutung, dass auch die oligosymptomatische CD-Colitits eine Ursache der nicht selten beobachteten submukösen Darmwandverdickungen bei CF sein könnte.

Diese Vermutung wurde gestützt durch einen von Schmitt-Grohe et al. beschriebenen klinischen Fall eines 28-jährigen CF-Patienten, bei dem der Ausbruch einer schweren Kolitis mit Darmwandverdickungen einherging, die zudem offenbar in einem Zusammenhang zum CD-Befund standen [99]: Wochen vor Erkrankungsbeginn traten DIOS-ähnliche Beschwerden auf, ohne dass sonographisch ein DIOS nachweisbar war. Jedoch stellte sich eine leichte Darmwandverdickung von 4 mm dar. Nach kurz darauf folgender infektsbedingter AB-Therapie entwickelte der Patient eine schwere Antibiotika-assoziierte Kolitis mit starker Darmwandverdickung (bis 40 mm), Lumenobstruktion und positiven Stuhlkulturen für CD. Erst nach der vollständigen Eradikation von CD verschwand die Darmwandverdickung bei diesem Patienten.

In der vorliegenden Untersuchung hatte keiner der Patienten vergleichbare akute gastrointestinale Symptome. Die gemessenen Darmwanddicken können also als „Normalwerte“ für die beteiligten Patienten angesehen werden. Für keinen der untersuchten Darmabschnitte konnte dabei jedoch eine Korrelation zur Nachweisbarkeit von CD oder zur Toxinproduktion hergestellt werden. Dieses Ergebnis lässt mehrere Erklärungen zu: entweder lassen sich die bei CF-Patienten häufig nachweisbaren Darmwandverdickungen nicht auf die Besiedlung mit CD oder auf CD-Toxinexpression zurückführen, zumindest nicht bei Patienten ohne akute gastrointestinale Symptomatik. Oder es ist denkbar, dass CD im Zusammenspiel mit anderen Faktoren an Entzündungsprozessen im Darm und somit auch an den Darmwandverdickungen beteiligt ist. Eine dritte Erklärung könnte jedoch auch die bei vielen Patienten vermutete dauerhafte CD-Besiedlung darstellen. In diesem Fall könnten die Darmwandverdickungen die Folge hiervon sein, ohne dass die Darmwanddickenwerte mit den jeweils erhobenen CD-Befunden korrelieren müssten.

4.2.5.2 DIOS

Die Ursachen für die Entwicklung eines DIOS sind multifaktoriell und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die Vermutung, dass Kinder mit Mekoniumileus später bevorzugt ein DIOS entwickeln, hat sich nur für Kinder mit operiertem Mekoniumileus bestätigt [27,30,33]. Im Vordergrund steht sicherlich die Dysfunktion des Pankreas, sowie auch das durch abnorme Sekrete und pH-Verschiebungen veränderte intestinale Milieu mit resultierenden Motilitätsstörungen und verlängerter oro-coecaler Transitzeit [25,27]. Jedoch sind auch Fälle von DIOS-Episoden pankreassuffizienter Patienten beschrieben [26,83]. Weitere Risikofaktoren sind abrupte Erhöhung der Enzymdosis und Flüssigkeitsmangel.

In der Tübinger Mukoviszidoseambulanz wurde in den letzten Jahren bei einigen CF-Patienten mit rezidivierender DIOS-Symptomatik ein wiederholter Nachweis von CD-Toxin beobachtet. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen DIOS-Anamnese und CD-Besiedlung bzw. Toxinexpression nachweisbar ist.

Obwohl Patienten mit DIOS-Anamnese nicht signifikant häufiger mit CD besiedelt waren als Patienten ohne DIOS-Anamnese, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen DIOS-Episoden und CD-Toxinexpression. Unter der Einschränkung, dass die Befunderhebung für beide Parameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt ist, legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass bei diesen Patienten bestimmte Risikofaktoren wirksam werden, die beide Erkrankungen begünstigen, wie z.B. ein bei bestimmten Mutationen besonders ausgeprägter CFTR-Defekt. Denkbar ist aber auch, dass eine Neigung zu DIOS die Expression von Toxinen fördert oder umgekehrt eine Toxinexpression die Entwicklung eines DIOS z.B. durch subklinische Darminflammation begünstigt. Für letzteren Fall müsste man allerdings eine relativ langfristige Konstanz der Toxinexpression voraussetzen, da die Toxinnachweise in der untersuchten Patientengruppe in etwa dem Status entsprechen müssten, der auch schon vor Auftreten des DIOS bestand.

In der Literatur gibt es noch keine Untersuchungen hierzu. Es existieren jedoch Beschreibungen von atypisch verlaufenden CD-assoziierte Colitiden, die sich in

DIOS-ähnlichen Beschwerden äußern, aber auf adäquate Behandlung der CD-Infektion ansprechen [8,99]. Für die Hypothese einer CD-assoziierten Entwicklung von DIOS-ähnlichen Symptomen spricht auch die Beobachtung, dass bei den 9 Patienten, die in der Querschnittsbefragung DIOS-ähnliche Symptome wie Obstipation und Erbrechen angaben, durchweg toxische (8) bzw. ein nicht klassifizierbarer CD-Stamm nachgewiesen werden konnten. Demgegenüber hatten Patienten mit Durchfall, Übelkeit u.a. Beschwerden häufig auch keinen CD-Nachweis oder einen Nachweis nicht toxischer Stämme (s. Anhang 6.4, Tabelle 22). Möglicherweise werden aber auch CD-assoziierte Colitiden fälschlich als DIOS missgedeutet [8]. Um die Rolle der Toxine bzw. von CD für die Entstehung eines DIOS besser einschätzen zu können, wären weitere prospektive Studien erforderlich.

4.2.5.3 Mekoniumileus

DIOS und Mekoniumileus sind Darmmanifestationen, die sich in einer Darmmotilitätsstörung mit Darmobstruktion äußern. Während beim Mekoniumileus die Ursachen meist eine schwere exokrine Pankreasinsuffizienz und CFTR-bedingte Darmmanifestationen der CF sind, kommen beim DIOS zusätzliche exogene Faktoren hinzu.

Bei insgesamt 14 der untersuchten Patienten lag bei Geburt ein Mekoniumileus vor. Obwohl dieser ähnlichen Einflüssen unterliegt wie das DIOS, konnte weder eine Korrelation zum erhöhtem CD-Nachweis noch zum Nachweis von Toxinen aufgezeigt werden. Da der vermutete Zusammenhang zwischen Mekoniumileus und dem Auftreten von DIOS-Episoden nicht bestätigt werden konnte [27,30,33], ist eher davon auszugehen, dass beim DIOS zusätzliche Faktoren vorhanden sein müssen, die in Zusammenhang mit der Toxinexpression stehen.

4.3 Bedeutung von CD bei CF

Patienten mit Zystischer Fibrose gelten als Risikopopulation für eine Infektion mit CD. Die Bedeutung einer CD-Infektion bei CF-Patienten ist jedoch bis heute

nicht eindeutig geklärt. CF-Patienten und Neugeborene gelten als die einzigen Personengruppen, die trotz hoher CD-Besiedlungsrate und Toxinnachweisrate relativ selten Erkrankungszeichen zeigen.

Obwohl in dieser Studie die CD-Prävalenz mit über 60% wesentlich höher lag als in bislang publizierten Untersuchungen, traten bei keinem Patienten klinisch manifeste, CD-assoziierte Beschwerden auf, sodass eine Kolonisierung mit CD (v.a. auch mit toxischen CD-Stämmen) für CF-Patienten kein erhöhtes Risiko für eine CD-assoziierte Erkrankung auch unter Antibiotikagabe darstellt.

Auffallend war weiterhin die fehlende Korrelation zu „klassischen“ Risikofaktoren wie Antibiotikaeinnahme und Hospitalisation, möglicherweise als Ausdruck eines veränderten Behandlungsumfeldes.

Die Klärung der Bedeutung der erhöhten CD-Prävalenz bei Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion sowie der höheren Toxinexpression bei Patienten mit DIOS-Anamnese stellt eine interessante Fragestellung für nachfolgende Studien dar.

5 Zusammenfassung

Patienten mit Zystischer Fibrose (CF) sind durch häufige Krankenhausaufenthalte und Antibiotikatherapien eine Risikogruppe für *Clostridium difficile* (CD)-Infektionen. Obwohl CF-Patienten älteren Studien zufolge keine erhöhte Inzidenz von symptomatischen CD-Infektionen aufweisen, gab es jedoch immer wieder Berichte von schweren, teils auch atypisch (d.h. ohne Durchfall und mit variabler abdominaler Symptomatik) verlaufenden CD-Infektionen. Zudem treten bei CF-Patienten häufig Darmwandverdickungen auf, deren Pathomechanismus bislang noch unklar ist und die möglicherweise mit einer CD-Infektion in Verbindung stehen könnten. In dieser Studie sollte der Frage nach der CD-Prävalenz im Stuhl bei CF-Patienten und der klinischen Relevanz von CD-Infektionen sowie krankheitsspezifischen Auswirkungen auf den Darm bei CF-Patienten nachgegangen werden.

In einer *Querschnittstudie* wurde zum einen die Prävalenz von CD-Stämmen und der CD-Toxin-Ausscheidung im Stuhl im Vergleich zu früheren Studien und zu anderen Risiko-Patienten aus demselben Klinikum ermittelt. Zum anderen wurden mögliche durch eine CD-Infektion assoziierte klinische Symptome und Risikofaktoren für eine CD-Infektion erfasst. In einer *Längsschnittstudie* wurde innerhalb von zwei Jahren die Häufigkeit von CD-assozierten Kolitiden unter Antibiotikatherapie bestimmt.

65 Patienten der Tübinger CF-Ambulanz nahmen an der Querschnittuntersuchung teil. Sie wiesen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (29 Patienten der hämato-onkologischen Ambulanz Tübingen) eine signifikant höhere Prävalenz von CD auf (63% vs. 7%). Dabei nahm die Besiedlungsrate mit zunehmendem Alter ab (>80% im ersten LJ. auf 25% im 18. LJ). Die insgesamt sehr hohe CD-Prävalenz zeigte sich unabhängig von einer aktuellen Antibiotikagabe und Aufenthalt in stationären Einrichtungen innerhalb der letzten zwei Jahre. Der Einfluss von Antibiotika war zusätzlich in der Längsschnittstudie an 19 Patienten genauer untersucht worden: Bemerkenswerterweise zeigte sich auch unter Antibiose eine relative Konstanz im CD-Besiedlungsstatus, obwohl im Kontrollzeitraum nach Antibiose eine leichte Zunahme toxigener Stämme zu verzeichnen war. Es konnte kein fördernder Einfluss der Antibiotikatherapiezyklen auf die Toxinexpression festgestellt werden.

Erstaunlicherweise zeigten Patienten mit einer eingeschränkten Lungenfunktion eine signifikant höhere CD-Prävalenz, als Patienten mit guter Lungenfunktion. Bei Patienten mit einem „distalen intestinalen Obstruktions-Syndrom“ (DIOS) in der Anamnese gelang vergleichsweise häufiger der Nachweis von CD-Toxinexpression als bei Patienten ohne DIOS-Anamnese. Kein Zusammenhang konnte jedoch zwischen Mekoniumileus-Anamnese und CD-Nachweis bzw. Toxinexpression gezeigt werden. Die bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten sonographisch feststellbaren Wandverdickungen im Kolon, Coecum und terminalem Ileum korrelierten nicht mit einer CD-Kolonisation oder CD-Toxinexpression.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden und der Besiedlung mit toxigenem CD oder Toxinproduktion aufgezeigt werden. Allerdings zeigte sich die Tendenz, dass mit zunehmender Beschwerdesymptomatik auch die Besiedlungsrate mit CD anstieg.

Die klinische Relevanz einer CD-Infektion scheint für CF-Patienten eher gering zu sein. Die hohe CD-Prävalenz stellt somit kein erhöhtes Risiko für eine klinisch manifeste Erkrankung bei CF dar.

6 Anhang

6.1 Anlagen (Fragebögen und Patientenbriefe)

- A: Informationsbrief und Einverständnis zur Querschnittstudie
- B: Informationsbrief und Einverständnis zur Längsschnittstudie
- C: Entsprechende Informationen für die Kontrollgruppe
- D: Anweisung für die Patienten zur Probennahme
- E: Fragebogen zur Querschnittstudie (QS)
- F: Fragebögen zur Längsschnittstudie (LS-AB ; LS-KO)

Liebe Patienten, liebe Eltern,

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Untersuchung führt die CF-Ambulanz der Universitätskinderklinik Tübingen eine Studie durch, die die Besiedlung des Magen-Darm-Traktes von CF-Patienten mit dem Bakterium *Clostridium difficile* und daraus folgende Auswirkungen untersucht.

Patienten mit Mukoviszidose haben häufigen Kontakt zu Krankenhäusern und erhalten oft Antibiotika. Das sind zwei Faktoren, die das Risiko erhöhen, sich mit *Clostridium difficile* anzustecken.

Clostridium difficile (CD) ist ein Bakterium, das gelegentlich im Boden, im Kot von Tieren, im Wasser, aber auch in der Darmflora gesunder Kinder und Erwachsener vorkommen kann. Bei ca. 30-50% der gesunden Kleinkinder (0-2 Jahre) und 1-8% der gesunden Erwachsenen ist es nachgewiesen.

Studien zufolge sind ca. 50% der Mukoviszidose-Patienten Träger dieses Keimes. Die Ansteckungsquelle scheint in den meisten Fällen das Krankenhaus zu sein.

CD bildet zwei Toxine, A und B, die für die Beschwerdesymptomatik verantwortlich sind.

Die Krankheit beginnt meist unter Antibiotikatherapie oder kurz danach. Erkrankungszeichen, die auf eine Infektion mit CD hinweisen, können in unterschiedlichster Ausprägung auftreten. Sie reichen angefangen von symptomfreier Trägerschaft über Magen-Darm-Beschwerden wie Durchfall, Übelkeit und Erbrechen bis hin zu schwersten Darmentzündungen (wie z.B. der pseudomembranösen Kolitis) und deren schlimmstenfalls tödlich verlaufenden Komplikationen.

Auch an den Darmwänden der Patienten kann es bei der Infektion mit CD zu Veränderungen im Sinne einer Verdickung der Darmwand kommen, die sonographisch (durch Ultraschall) erkennbar ist.

Die Ursachen, die zum Ausbruch der Krankheit führen, sind nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass die normale Bakterienflora des Darmes durch bestimmte auslösende Faktoren geschwächt wird und es so zu einer Übersiedlung der normalen Bakterienflora durch CD kommt. Zu diesen auslösenden Faktoren zählen unter anderem Antibiotika.

Um deutlichere Zusammenhänge zwischen den mit CD besiedelten Patienten und bei ihnen auftretenden Magen-Darm-Beschwerden unter Antibiotikatherapie erkennen zu können, führt die Universitätskinderklinik Tübingen für die Zeit von ca. einem Jahr eine Studie durch.

Teil 1: Querschnittuntersuchung von Patienten der Tübinger Mukoviszidose-Ambulanz zur Besiedlung mit *Clostridium difficile* (CD)

Bei dieser Untersuchung soll unter anderem ermittelt werden, bei wie vielen Patienten der Tübinger Mukoviszidose-Ambulanz CD nachweisbar ist, und ob zum Zeitpunkt der Untersuchung Krankheitszeichen im Sinne von Magen-Darm-Beschwerden vorliegen.

Dafür werden jedem Patienten ein Stuhlröhrchen und ein Stuhl-Abstrichröhrchen zusammen mit einem Fragebogen zugesandt, welchen dieser dann ausgefüllt zusammen mit den Stuhlproben an die Klinik zur Auswertung zurückschickt.

Teil 2: Auswirkung von *Clostridium difficile* (CD) unter Antibiotikatherapie

Hieran nehmen diejenigen Patienten teil, die innerhalb der Laufzeit der Studie Antibiotika einnehmen müssen. In Anlehnung an Teil 1 werden dabei die Auswirkungen der Antibiotikatherapie auf die Besiedlung des Darmes mit CD und auf evtl. dadurch ausgelöste Beschwerden ermittelt.

Die Untersuchung wird unmittelbar vor Beginn und nach Abschluss der Antibiotikatherapie sowie in einem Zeitraum von 4 Wochen danach durchgeführt. Hierfür ist es notwendig, mehrmals Stuhlproben des Patienten zu untersuchen und insgesamt zwei Fragebögen auszufüllen. In diesen können gegebenenfalls die auftretenden Beschwerden notiert werden.

Die Stuhlproben können allesamt auf dem Postweg in vorfrankierten Umschlägen zur Klinik gesandt werden. Es müssen somit keine zusätzlichen Fahrten nach Tübingen unternommen werden.

Falls man jedoch in der Stuhlprobe eines Patienten CD nachweist, wird dieser gebeten, zu einer Ultraschallkontrolle in die Ambulanz zu kommen, um mögliche durch CD bedingte Darmwandveränderungen feststellen zu können. (Bei dieser Kontrolle kann gleichzeitig die jährliche Routinesonographie des Darmes durchgeführt werden.)

Bei stärkerer Beschwerdesymptomatik wird ggf. eine Therapie eingeleitet und weitere Stuhlproben untersucht.

(Bitte beachten Sie, dass sich für Sie oder Ihr Kind durch die Teilnahme an dieser Studie hinsichtlich der Therapie keine Änderung gegenüber der normalen Vorgehensweise bei einer Infektion mit Clostridium difficile ergibt. Lediglich die Diagnostik wird durch die Untersuchung mehrerer Stuhlproben und ggf. einer Ultraschalluntersuchung des Darmes intensiviert.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie haben die Möglichkeit, sich auch nur an einem Teil der Studie zu beteiligen und können diese jederzeit abbrechen; damit die Studie aber aussagekräftig ist, ist es wünschenswert, dass möglichst viele Patienten mitmachen.

Falls Sie bereit sind, am **ersten Teil** dieser Studie teilzunehmen, bitte ich Sie, beiliegende Einverständniserklärung auszufüllen und an uns zurückzusenden. Sie werden dann zu Beginn des nächsten Jahres (innerhalb des Zeitraumes von Januar bis April 2003) ein Stuhlröhrchen und ein Stuhl-Abstrichröhrchen zusammen mit einem Fragebogen von uns zugesandt bekommen.

Das Einverständnis für den **zweiten Teil** der Studie erteilen Sie erst, falls Sie von Ihrem Ambulanz- oder Hausarzt ein neues Antibiotikum verschrieben bekommen und Sie zu diesem Zeitpunkt am zweiten Teil der Studie teilnehmen möchten.

Nach Abschluss der Studie werden alle daran teilnehmenden Patienten von deren Ergebnis informiert.

Mit freundlichen Grüßen –

Dr. med. Rita Ziebach

Birgit Dietsche
(Doktorandin)

Name und Anschrift des Patienten :

Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Dr. med. R. Ziebach
Tel.: 07071/29-83781
Universitätskinderklinik Tübingen
Hoppe-Seyler-Str.1
72076 Tübingen

Hiermit teile ich mit, dass

ich / mein Kind

am **1. Teil** der Studie (Querschnittuntersuchung von Patienten der Tübinger
Mukoviszidose-Ambulanz zur Besiedlung mit *Clostridium difficile*)

teilnehmen möchte

nicht teilnehmen möchte.

Mir ist bekannt, dass die Teilnahme an der Untersuchung vollkommen freiwillig ist und dass das Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile widerrufen werden kann.

Der Umgang mit den erhobenen Daten erfolgt vertraulich. Die Angaben werden ausschließlich zu Studienzwecken benutzt.

Ich wurde über Ziele, Dauer, Ablauf und Nutzen der Studie informiert.

Datum:

Unterschrift:

(Bitte bis spätestens _____ zurücksenden)

Liebe Patienten, liebe Eltern,

Vielen Dank für Ihre Bereitschaft, am zweiten Teil der Studie über *Clostridium difficile* (CD) teilzunehmen.

Fragestellungen dieser Untersuchung:

- Wie wirken sich Antibiotika auf die Besiedlung des Darmes mit *Clostridium difficile* und dessen Toxinproduktion aus?
- Welche Beschwerden werden dadurch zu welchem Zeitpunkt und in welcher Intensität ausgelöst?

Vorgehensweise: Die Erkrankung durch CD beginnt erfahrungsgemäß während der Antibiotikatherapie oder kurz danach.

Damit unsere Untersuchung diesen Zeitraum möglichst vollständig erfasst, werden wir am Tag vor Beginn der ersten Antibiotikaeinnahme mit dieser Studie beginnen und vier Wochen nach Ende der letzten Antibiotikaeinnahme abschließen.

Materialien: - 2 Fragebögen

- 4 Stuhlabnahmesets. Diese enthalten jeweils:

- ein Stuhlröhrchen und ein Abstrichröhrchen
- ein Plastikbeutel [„BBL GasPak Pouch“] mit Reaktionsstarter und Verschlussclip
- eine vorfrankierte und adressierte Versandtasche

Untersuchungszeitraum: Die Untersuchung beginnt, wenn:

- ein Antibiotikum neu eingenommen wird (bzw. bei Beginn einer i.v.-Therapie) *oder wenn*
- ein Antibiotikumswechsel stattfindet.

Der Beginn der Untersuchung richtet sich also allein nach den Umständen bei Ihnen (Antibiotikaverordnung). Sie erhalten keine gesonderte Aufforderung zum Beginn der Untersuchung, sondern beginnen, wenn die genannten Umstände eintreten. Ich bitte Sie, mir zu diesem Zeitpunkt eine kurze telefonische Rückmeldung zu geben, damit ich die Untersuchung der Stuhlproben terminlich koordinieren kann. (Telefonnummer siehe unten)

Der Untersuchungszeitraum selbst wird in folgende zwei Abschnitte unterteilt (siehe auch Übersicht nächste Seite):

1. Abschnitt: Zeitraum der Antibiotikaeinnahme

Hier benötigen Sie den Fragebogen Nr. 1 und zwei, ggf. drei Stuhlabnahmesets.

Die Dauer dieses Abschnittes beträgt insgesamt 15 Tage.

Fragebogen: Sie beginnen am Tag 0 (d.h. am Tag vor Beginn der Antibiotikaeinnahme) mit dem Ausfüllen des Fragebogens und führen dies die folgenden 15 Tage fort. Tag 15 entspricht dann dem Tag, an dem das Antibiotikum nicht mehr eingenommen wird.

Stuhlproben: An folgenden Tagen nehmen Sie eine Stuhlprobe unter Benutzung von jeweils einem Stuhlabnahmeset ab und senden diese noch am selben Tag an uns:

- am Tag 0 (also vor der ersten Einnahme des Antibiotikums)
- am Tag 15 (Tag nach der letzten Einnahme des Antibiotikums)
- dazwischen nur, wenn sich Beschwerden wie Bauchschmerzen, Blähungen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Verstopfung, usw. einstellen: Bitte nehmen Sie in diesem Falle unverzüglich telefonisch Kontakt zu mir auf (Telefonnummer siehe unten), damit wir die weitere Vorgehensweise individuell besprechen können.

2. Abschnitt: Zeitraum von 4 Wochen nach Beendigung der Antibiotikatherapie

Hier benötigen Sie den Fragebogen Nr. 2 und ein, ggf. zwei Stuhlabinahmesets.

Die Dauer dieses Abschnittes beträgt insgesamt 4 Wochen.

Fragebogen: Sie beginnen mit dem Ausfüllen des Fragebogens am ersten Tag nach Beendigung der Antibiotikaeinnahme (das heißt also, wenn Sie die Antibiotikatherapie z.B. am Mittwoch beendet haben, beginnen Sie mit dem Ausfüllen der Tabelle am Donnerstag).

Stuhlprobe: An folgenden Tagen nehmen Sie eine Stuhlprobe unter Benutzung von jeweils einem Stuhlabinahmeset ab und senden diese noch am selben Tag an uns:

- am letzten Tag des vierwöchigen Beobachtungszeitraumes
- dazwischen nur, wenn sich Beschwerden wie Bauchschmerzen, Blähungen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Verstopfung, usw. einstellen: Bitte nehmen Sie in diesem Falle unverzüglich telefonisch Kontakt zu mir auf, damit wir die weitere Vorgehensweise individuell besprechen können:

Telefon: B. Dietsche **07071/ 368750** (am besten abends zwischen 20.00 und 21.30 Uhr)

Unter dieser Nummer können Sie mich auch erreichen, wenn Sie andere wichtige Fragen haben z.B. zur Probennahme bzw. zur Beantwortung der Fragebögen oder zum zeitlichen Schema (z.B. Antibiotikatherapie-Verordnung für 3 Wochen statt 2 Wochen) o.ä..

Wird in Ihrer Stuhlprobe das Toxin (Giftstoff) von *Clostridium difficile* nachgewiesen, werden wir Sie telefonisch benachrichtigen und einen Ambulanztermin mit Ihnen vereinbaren.

An diesem Termin führen wir eine Ultraschalluntersuchung des Darmes durch, um eventuelle infektionsbedingte Veränderungen feststellen und dokumentieren zu können. (Bei dieser Kontrolle kann gleichzeitig die jährliche Routinesonographie des Darmes durchgeführt werden.)

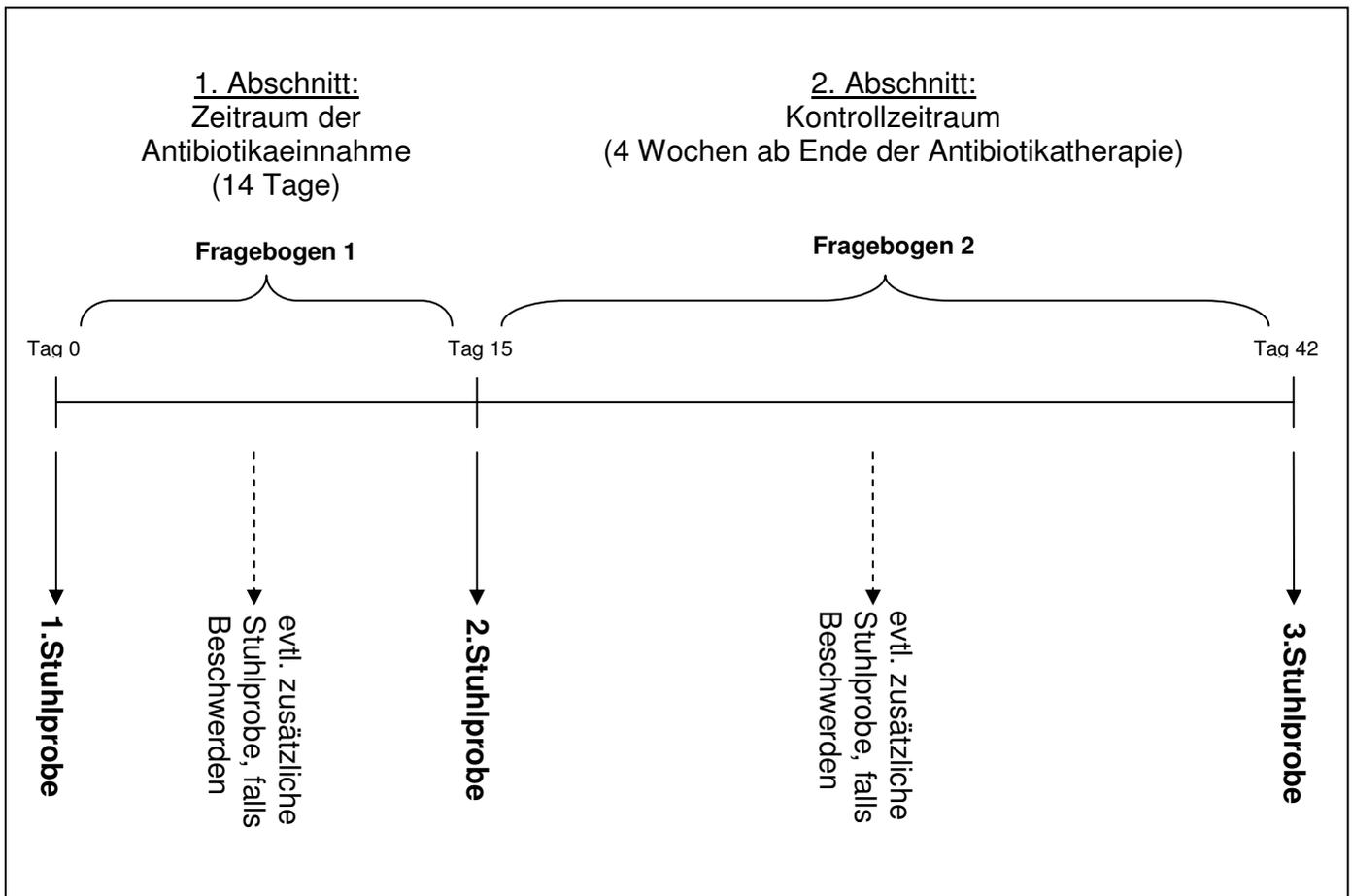
Bei bestehender Beschwerdesymptomatik wird gegebenenfalls eine Therapie eingeleitet und weitere Stuhlproben untersucht.

Mit freundlichen Grüßen –

Dr. med. Rita Ziebach

Birgit Dietsche
(Doktorandin)

Übersicht über den Studienverlauf und die Zeitpunkte der Stuhlentnahme:



Name und Anschrift des Patienten:

Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Dr. med. R. Ziebach
Tel.: 07071/29-83781
Universitätskinderklinik Tübingen
Hoppe-Seyler-Str.1
72076 Tübingen

Hiermit gebe ich mein Einverständnis, dass

ich / mein Kind

am **2. Teil** der Studie (Auswirkungen von Clostridium difficile unter Antibiotikatherapie)
teilnehmen möchte.

Mir ist bekannt, dass die Teilnahme an der Untersuchung vollkommen freiwillig ist und dass das Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile widerrufen werden kann.

Der Umgang mit den erhobenen Daten erfolgt vertraulich. Die Angaben werden ausschließlich zu Studienzwecken benutzt.

Ich wurde über Ziele, Dauer, Ablauf und Nutzen der Studie informiert.

Datum:

Unterschrift:

Liebe Patienten, liebe Eltern der hämato-onkologischen Ambulanz Tübingen

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie untersucht die Mukoviszidose-Ambulanz Tübingen die Auswirkungen von Antibiotikatherapien auf den Magen-Darm-Trakt bei Mukoviszidose-Patienten.

Dabei ist es notwendig, diese Patienten mit einer **Kontrollgruppe** zu vergleichen (Kontrollgruppe: Patienten, die ebenfalls in der Kinderklinik Tübingen behandelt werden und gelegentlich Antibiotika einnehmen).

Wir wollen Sie daher bitten, uns einmalig eine Stuhlprobe von Ihnen/ bzw. Ihrem Kind zur Untersuchung auf einen pathogenen (krankmachenden) Darmkeim (*Clostridium difficile*) zur Verfügung zu stellen und einen darauf bezogenen Fragebogen auszufüllen.

Die Stuhlprobe kann auf dem Postweg in einem vorfrankierten Umschlag zur Klinik gesandt werden. Es entstehen Ihnen somit keine Kosten und Sie müssen keine zusätzlichen Fahrten nach Tübingen unternehmen.

Da die Stuhlprobe unter Abschluss von Sauerstoff transportiert werden muss, ist es notwendig die Stuhlprobe in einem bestimmten Aufbewahrungssystem, welches Sie von uns mit genauer Anleitung erhalten, zu verschicken.

Wenn Sie bereit sind an dieser Studie teilzunehmen, füllen Sie bitte nachfolgende Einverständniserklärung aus und geben Sie sie in Ihrer Ambulanz ab. Wir werden uns dann demnächst mit Ihnen in Verbindung setzen. Nach Abschluss der Untersuchung werden wir Sie über Ihr persönliches Ergebnis informieren.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Rita Ziebach

Birgit Dietsche

Mukoviszidose ist eine angeborene und derzeit unheilbare chronische Erbkrankheit. Infolge eines Gendefektes wird in vielen Organen des Körpers ein zähflüssiger Schleim gebildet, der bereits im Kindesalter schwere Krankheitserscheinungen verursachen kann. Die Patienten leiden an ständigem Husten mit Auswurf, Bronchitis, Lungenentzündungen und zunehmender Atemnot. Der häufige Einsatz von Antibiotika ist deshalb unumgänglich. Nebenwirkungen zeigen sich oft in einer Fehlbesiedlung des Magen-Darm-Traktes mit pathogenen Bakterien wie z. B. *Clostridium difficile* und daraus folgenden Magen-Darm- Beschwerden.

Name des Patienten:
Straße, Hausnummer:
PLZ, Wohnort:
Telefon:
Geburtsdatum:

Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Dr. med. R. Ziebach
Tel.: 07071/29-83781
Universitätskinderklinik Tübingen
Hoppe-Seyler-Str.1
72076 Tübingen

Hiermit teile ich mit, dass

ich / mein Kind

in der **Kontrollgruppe** der Studie (Querschnittuntersuchung von Patienten der Tübinger Mukoviszidose-Ambulanz zur Besiedlung mit *Clostridium difficile*)

teilnehmen möchte.

Mir ist bekannt, dass die Teilnahme an der Untersuchung vollkommen freiwillig ist und dass das Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile widerrufen werden kann.

Der Umgang mit den erhobenen Daten erfolgt vertraulich. Die Angaben werden ausschließlich zu Studienzwecken benutzt.

Ich wurde über Ziele, Dauer, Ablauf und Nutzen der Studie informiert.

Datum:

Unterschrift:

Liebe Patienten, liebe Eltern,

Vielen Dank für Ihre Bereitschaft, an der Studie über Clostridium difficile teilzunehmen.

In dieser ersten Untersuchung soll ermittelt werden, bei wie vielen Patienten der Tübinger Mukoviszidose-Ambulanz Clostridium difficile nachweisbar ist und ob zum Zeitpunkt der Stuhlprobenentnahme Krankheitszeichen im Sinne von Magen-Darm-Beschwerden vorliegen.

Für die Untersuchung Ihrer Stuhlproben ist folgender Termin vorgesehen:

Dienstag

Mittwoch

(D.h. die Stuhlproben sollten frühestens am Dienstag, spätestens jedoch am Mittwoch bei uns eintreffen. Da die Proben spätestens nach zwei Tagen von uns bearbeitet werden müssen, sollten sie am besten in der Zeit von Sonntagmittag bis Montagabend abgenommen werden.)

Falls der angegebene Termin für Sie nicht günstig ist, teilen Sie mir dies telefonisch mit; wir machen dann einen neuen Termin aus. Auch bei wichtigen Fragen zur Probennahme bzw. zur Beantwortung des Fragebogens können Sie mich unter folgender Telefonnummer erreichen:

Birgit Dietsche 07071/ 368750

Wird in Ihrer Stuhlprobe das Bakterium Clostridium difficile nachgewiesen, werden wir Sie telefonisch benachrichtigen und einen Ambulanztermin mit Ihnen vereinbaren. An diesem Termin führen wir eine Ultraschalluntersuchung des Darmes durch, um eventuelle infektionsbedingte Veränderungen feststellen und dokumentieren zu können. (Bei dieser Kontrolle kann gleichzeitig die jährliche Routinesonographie des Darmes durchgeführt werden.)

Bei bestehender Beschwerdesymptomatik wird gegebenenfalls eine Therapie eingeleitet und weitere Stuhlproben untersucht.

Sofern Sie im Verlauf dieses Jahres (2003) eine Antibiotikatherapie erhalten, wäre es - egal ob der Stuhlprobenbefund Ihrer Stuhlprobe positiv oder negativ war - wichtig, die Besiedlung des Darmes mit Clostridium difficile und dessen mögliches verändertes Verhalten unter Antibiotikatherapie zu untersuchen.

Es wäre daher zu empfehlen, dass Sie in diesem Fall auch am zweiten Teil der Studie teilnehmen, über die Sie in einem gesonderten Schreiben noch informiert werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Rita Ziebach

Birgit Dietsche
(Doktorandin)

Bitte lesen Sie zuerst alle Anweisungen genau durch, bevor Sie mit der Probenentnahme beginnen.

1. Sie haben von uns ein Stuhlröhrchen [**Abb. A**] erhalten. Wir bitten Sie, das Stuhlröhrchen mit einer frischen Stuhlprobe zu füllen. Das Stuhlröhrchen sollte dabei mindestens zu einem Viertel mit Stuhl gefüllt sein. Nehmen Sie bitte das Stuhlröhrchen und stecken Sie es in das Anaerobier-Transportsystem [„BBL GasPak Pouch“]. Sie erfahren im Anhang auf der nächsten Seite, wie Sie das genau tun müssen.

(Da *Clostridium difficile* nur unter anaeroben Bedingungen kultiviert werden kann [d.h. es überlebt nur, wenn kein Sauerstoff vorhanden ist], ist es notwendig, diese Stuhlprobe sofort in ein Transportsystem zu bringen, aus dem der Sauerstoff entzogen wird.)

2. Nehmen Sie ebenfalls mit dem beiliegenden Abstrichtupfer [**Abb. B**] eine Stuhlprobe

(Tauchen Sie das Stäbchen mit dem Wattetupfer kurz in den Stuhl ein und stecken Sie ihn anschließend in das beiliegende Aufbewahrungsröhrchen. Den Deckel des Aufbewahrungsröhrchens öffnen Sie am besten, indem Sie an diesem drehen und gleichzeitig daran ziehen. Achten Sie bitte darauf, dass der Abstrichtupfer nur mit der Stuhlprobe in Kontakt kommt.)

3. Beantworten Sie noch am selben Tag den dazugehörigen Fragebogen (siehe hinten).

4. Bitte senden Sie alles umgehend im beigelegten Briefumschlag an uns zurück.

(Um möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erzielen, sollten die Stuhlproben von uns nach spätestens zwei Tagen bearbeitet werden können. Wichtig: Bewahren Sie die Stuhlproben bis zu ihrer Absendung im Kühlschrank auf!)



Abb. A

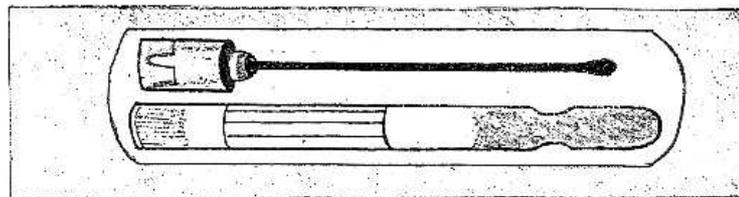


Abb. B

Anhang: Anleitung zum Anaerobier-Transportsystem

- Das System besteht aus:
- einem Plastikbeutel [„BBL GasPak Pouch“, Abb. 1]
 - einem Indikatorstreifen [Abb. 2]
(Dieser befindet sich bereits im Plastikbeutel. Er zeigt an, wenn kein Sauerstoff mehr vorhanden ist. Zu Beginn hat sein Reaktionszentrum eine bläuliche Farbe, die dann nach erfolgtem Sauerstoffentzug nach 2-4 Stunden in eine weiße Farbe umschlägt.)
 - einem Reaktionsstarter [Abb. 3]
 - einem Verschlussclip [Abb. 4]

1. Öffnen Sie bitte den Verschlussclip [Abb. 4] am Plastikbeutel [Abb. 1]. Öffnen Sie ebenfalls das Fläschchen mit dem Reaktionsstarter [Abb. 3] (evtl. Schere verwenden) und gießen Sie die blaue Flüssigkeit in den extra abgeteilten Kanal im Plastikbeutel, der mit der Aufschrift „Reagent Channel“ beschriftet ist.

Halten Sie dabei den Plastikbeutel aufrecht, damit die Flüssigkeit nach unten auf das dort vorhandene saugfähige Papierkissen läuft.

2. Stellen Sie nun das Stuhlröhrchen mit der frischen Stuhlprobe in den Plastikbeutel neben den Indikatorstreifen [Abb. 2]. Der braune Deckel des Stuhlröhrchens darf dabei vorerst noch nicht verschlossen werden, sondern sollte so aufgesetzt sein, dass noch ein Spalt vorhanden ist, durch den ein Luftaustausch möglich ist. Nur so kann der Sauerstoff, der auch in dem Röhrchen vorhanden ist, durch die stattfindende Reaktion entfernt werden.

3. Nun können Sie den Beutel mit dem Verschlussclip [Abb. 4] wieder verschließen.

4. Wenn die Reaktionszone des Indikatorstreifens eine weiße Farbe anzeigt (nach ca. 2-4 Stunden), schließen Sie nun von außen (d.h. ohne den Plastikbeutel dabei noch einmal zu öffnen!) den Deckel des Stuhlröhrchens fest zu.

5. Nun können Sie den Transportbeutel zu den anderen Proben in den an die Klinik adressierten Briefumschlag stecken und an uns zurücksenden.

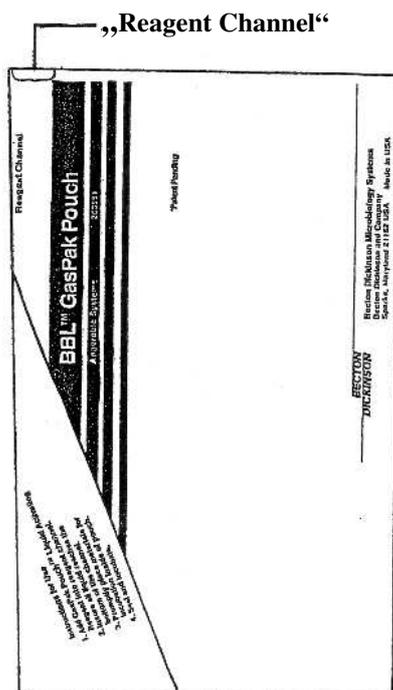


Abb. 1



Abb. 2

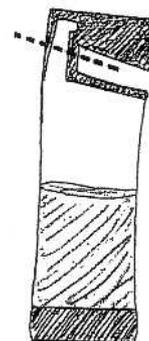


Abb. 3

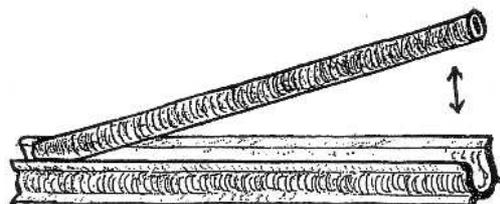


Abb. 4

Symptomfragebogen zur Querschnitterhebung

PAT.-ID: _____

Datum der Abnahme der Stuhlprobe: _____

Dokumentationsdatum dieses Fragebogens: _____

1. Haben Sie bzw. Ihr Kind (also der CF-Patient) z. Zt. Beschwerden im Magen-Darm Bereich, oder hatten Sie/ hatte es innerhalb des **letzten Monats** Beschwerden folgender Art:

Durchfall

(Bitte die Spalte 'normaler Stuhl' auf jeden Fall ausfüllen, auch wenn kein Durchfall auftrat!)

- Nein** (Falls Sie hier „Nein“ ankreuzen, müssen Sie in nachfolgender Tabelle nur die Spalte 'normaler' Stuhl ausfüllen. Dies ist deshalb notwendig, da bei Patienten mit Mukoviszidose die Beschaffenheit des Stuhles und die Häufigkeit der Stuhlentleerungen oft von der Norm abweichen.)
- Ja** (Falls Sie hier „Ja“ ankreuzen, müssen Sie in nachfolgender Tabelle die Spalten Durchfall und 'normaler' Stuhl ausfüllen.)

| | | Durchfall | 'normaler' Stuhl |
|--|---------------|--|--|
| Konsistenz | fest, geformt | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | breiig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | wässrig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | schaumig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | anders | <input type="checkbox"/> _____ | <input type="checkbox"/> _____ |
| Häufigkeit der Stühle (pro Tag) | | | |
| Farbe (z.B. bräunlich, grünlich, gelblich,...) | | | |
| Geruch (normal, sauer, faulig,...) | | | |
| sichtbare Blutbeimengung | | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja |
| Erhöhte Temperatur/ Fieber (ca. in °C) | | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja _____ °C | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja _____ °C |
| Beginn der Beschwerden (Datum, ca.) | | | |
| Dauer in Tagen (ca.) | | | |

Verstopfung

- Nein** **Ja**

| Häufigkeit der Stühle pro Woche | Beginn (Datum, ca.) | Dauer in Tagen (ca.) |
|---------------------------------|---------------------|----------------------|
| | | |

Erbrechen

- Nein** **Ja**

| Häufigkeit pro Tag | Beginn (Datum, ca.) | Dauer in Tagen (ca.) |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| | | |

Andere Beschwerden

| Nein | Ja | Beschwerden | Ausmaß | | | Beginn (Datum, ca.) | Dauer in Tagen (ca.) |
|--------------------------|--------------------------|------------------|--------|--------|-------|---------------------|----------------------|
| | | | leicht | mittel | stark | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Bauchschmerzen | | | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Übelkeit | | | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Blähungen | | | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Appetitlosigkeit | | | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Unwohlsein | | | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Sonstiges | | | | | |

2. Falls Sie bzw. Ihr Kind Beschwerden hatte(n): Haben Sie eine Vermutung, welche Ursache(n) die Magen-Darm Beschwerden ausgelöst haben könnte(n)?

Nein Ja

| | |
|--|--------------------------|
| z.B. Magen-Darm Grippe (Erkrankung in Umgebung) | <input type="checkbox"/> |
| Verdorbene Speisen | <input type="checkbox"/> |
| Fehlerhafte Enzymeinnahme | <input type="checkbox"/> |
| Antibiotika | <input type="checkbox"/> |
| Anderes: _____ | <input type="checkbox"/> |

3. Nehmen Sie bzw. Ihr Kind zurzeit ein oder mehrere Antibiotika ein (außer Antibiotika zur Inhalation), oder wurde in den letzten zwei Monaten ein Antibiotikum eingenommen?

Nein

Ja

| Name des Antibiotikums | Tagesdosis (in ml oder mg, z.B. 3 x 2,5 mg) | Einnahmebeginn (Datum bitte möglichst genau angeben) | Einnahmedauer in Tagen (ca.) | Grund der Einnahme 1= Dauerantibiose 2= Atemwegsinfekt 3= Keimnachweis 4= Routinemäßige i.v.- Therapie wegen Pseudomonas o.ä. 5= Sonstiges (z.B. Ohr-, Harnwegsentzündung) 6= Grund unbekannt |
|------------------------|---|---|---------------------------------|--|
| 1. | | | | |
| 2. | | | | |
| 3. | | | | |

4. Hatten Sie bzw. Ihr Kind in den letzten zwei Jahren einen stationären Krankenhausaufenthalt oder waren Sie / war es in einer Rehabilitationsklinik?

Nein

Ja

Insgesamt wie viele Aufenthalte? _____Aufenthalt(e)

Wie viele Tage umfassten diese Aufenthalte insgesamt? _____Tage

Wann war der letzte Aufenthalt (Monat / Jahr)? _____

5. Sind bei Ihnen bzw. Ihrem Kind Beschwerden aufgetreten, die in diesem Fragebogen nicht oder zu ungenau abgefragt wurden, listen Sie diese bitte hier auf und beschreiben Sie sie genauer.

Nein

Ja

Genauere Beschreibung:

Fragebogen Nr.1: Symptomfragebogen zur Antibiotikatherapie

PAT.-ID:

Datum (Beginn dieses Fragebogens): _____

| Name der Antibiotika A: (falls) bisherige Antibiotika B: neu verordnete Antibiotika | Dosis (in ml oder in mg, z.B. 3 x 2,5 mg) | Einnahmebeginn (Datum) | Einnahmeende (Datum) | Grund der Einnahme (siehe unten Zahlenschlüssel *1) |
|---|---|---------------------------|-------------------------|---|
| A 1. | | | | |
| A 2. | | | | |
| A 3. | | | | |
| A 4. | | | | |

| | | | | |
|------|--|--|--|--|
| B 1. | | | | |
| B 2. | | | | |
| B 3. | | | | |
| B 4. | | | | |

Tabelle 1

Zahlenschlüssel *1) für Grund der Einnahme (Tab. 1):

1= Dauerantibiose

2= Atemwegsinfekt

3= Keimnachweis

4= Routinemäßige Prophylaxe

5= Sonstiges, z.B. Ohr-, Harnwegsinfektionen

6=Grund unbekannt

Bitte wenden →

| Tag der Antibiotikaeinnahme | 0.(Tag vor Beginn) | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | 11. | 12. | 13. | 14. | 15.(Tag nach Abschluss) |
|--|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Stuhlbeschaffenheit (siehe unten Zahlenschlüssel*2) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Häufigkeit der Stühle (pro Tag) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *3) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stuhlprobe (ggf. weitere eintragen) | X | | | | | | | | | | | | | | | X |

Tabelle 2

Zahlenschlüssel *2) für Stuhlbeschaffenheit (Tab.2):

Je nach Beschaffenheit des Stuhles

1= festen, geformt

2= weich

3= breiig

4= wässrig

5= schaumig

6= anders _____

Zahlenschlüssel *3) für Beschwerden (Tab. 2):

1= Durchfall

2= Verstopfung

3= Erbrechen

4= Übelkeit

5= Bauchschmerzen

6= Blähungen

7= Appetitlosigkeit

8= Unwohlsein

9= erhöhte Temperatur/ Fieber > 37° C

10= sichtbare Blutbeimengung

11= Sonstige Beschwerden: _____

Fragebogen Nr.2:

PAT.-ID:

Beschwerdedokumentation der 1.-4. Woche nach Antibiotikatherapie

Datum der letzten Einnahme des Antibiotikums: _____

(Tragen Sie hier das Datum des Tages ein, an dem das Antibiotikum zum letzten Mal eingenommen wurde. Beginnen Sie beim Ausfüllen der Dokumentationstabelle dann mit dem **darauf folgenden** Wochentag. Wenn Sie also die Therapie am Mittwoch beendet haben, beginnen Sie beim Ausfüllen der Tabelle mit Donnerstag.)

1. Woche

| Wochentag | | Montag | Dienstag | Mittwoch | Donnerstag | Freitag | Samstag | Sonntag |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *) | | | | | | | | |
| Abgabe der Stuhlprobe (Bitte mit X markieren und Datum eintragen) | | | | | | | | |

2. Woche

| Wochentag | | Montag | Dienstag | Mittwoch | Donnerstag | Freitag | Samstag | Sonntag |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *) | | | | | | | | |
| Abgabe der Stuhlprobe (Bitte mit X markieren und Datum eintragen) | | | | | | | | |

*) Zahlenschlüssel für Beschwerden:

1= Durchfall

2= Verstopfung

3= Erbrechen

4= Übelkeit

5= Bauchschmerzen

6= Blähungen

7= Appetitlosigkeit

8= Unwohlsein

9= erhöhte Temperatur/ Fieber > 37° C

10= sichtbare Blutbeimengung

11= Sonstiges _____

Bitte wenden →

3. Woche

| Wochentag | | Montag | Dienstag | Mittwoch | Donnerstag | Freitag | Samstag | Sonntag |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *) | | | | | | | | |
| Abgabe der Stuhlprobe (Bitte mit X markieren und Datum eintragen) | | | | | | | | |

4. Woche

| Wochentag | | Montag | Dienstag | Mittwoch | Donnerstag | Freitag | Samstag | Sonntag |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *) | | | | | | | | |
| Abgabe der Stuhlprobe (Bitte mit X markieren und Datum eintragen) | | | | | | | | |

5. Woche

| Wochentag | | Montag | Dienstag | Mittwoch | Donnerstag | Freitag | Samstag | Sonntag |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Auftreten von Beschwerden | Nein | <input type="checkbox"/> |
| | Ja | <input type="checkbox"/> |
| Art der Beschwerden (bitte in Ziffern angeben, siehe unten Zahlenschlüssel *) | | | | | | | | |
| Abgabe der Stuhlprobe (Bitte mit X markieren und Datum eintragen) | | | | | | | | |

*) Zahlenschlüssel für Beschwerden:

1= Durchfall

2= Verstopfung

3= Erbrechen

4= Übelkeit

5= Bauchschmerzen

6= Blähungen

7= Appetitlosigkeit

8= Unwohlsein

9= erhöhte Temperatur/ Fieber > 37° C

10= sichtbare Blutbeimengung

11= Sonstiges _____

6.2 Nährmedien und Reagenzien

Tabelle 15: Nährmedien

| | | | | |
|---|---|---|---|--|
| 1 | Chopped-Meat-Carbohydrate (CMC)-Bouillon | | <ul style="list-style-type: none"> - Tatar 500 g - VE (vollentsalztes) Wasser 1 l - NaOH 25 ml - Trypostose 30 g - Lab-Lemoco Powder 0,3 % - Hefeextrakt 5 g - Kaliumphosphat 5 g - Cystein 0,5 g - Häminlösung (5mg/ml) 10 ml | <ul style="list-style-type: none"> BD 211713 Oxoid L 29 BD 212750 Sigma R-2127 VWR 1.02838 Fluka 51280 |
| 2 | Clostridium-difficile-(CD)-Bouillon | | <ul style="list-style-type: none"> - Proteose-Pepton 40,0 g/l - Dinatriumhydrogenphosphat 5,0 g/l - Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/l - Magnesiumsulfat 0,1 g/l - Natriumchlorid 2,0 g/l - Fructose 6,0 g/l - Natrium-Taurocholat 1,0 g/l - Hämin 5,0 mg/l - Vitamin K 1 1,0 mg/l | <ul style="list-style-type: none"> BD 211693 Merck 1.06580 Merck 1.04873 Merck 5886 Merck 1.06404 Merck 1.04007 SIGMA,T 4009 Fluka 51280 Sigma V-3501 |
| | | Clostridium-difficile-selective – supplement (500 ml) | Zusammensetzung je 500ml: <ul style="list-style-type: none"> - D-Cycloserin 125 mg - Cephoxitin 4 mg | } Oxoid SR 96 |
| | | | - Defibriniertes Schafblut 7 % | Acila 2101012 |
| 3 | Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA-Agar) | Clostridium-difficile-Agar-Basis | Zusammensetzung: <ul style="list-style-type: none"> - Proteose-Pepton 40,0 g/l - Dinatriumhydrogenphosphat 5,0 g/l - Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/l - Magnesiumsulfat 0,1 g/l - Natriumchlorid 2,0 g/l - Fructose 6,0 g/l - Agar 15,0 g/l | } Oxoid CM 601 |
| | | Clostridium-difficile-selective - supplement | Zusammensetzung je 500ml: <ul style="list-style-type: none"> - D-Cycloserin 125 mg - Cephoxitin 4 mg | } Oxoid SR 96 |
| | | | - Defibriniertes Schafblut 7 % - Neutralrot 1 % | Acila 2101012 Art. 1369 |
| 4 | Hirn-Herz-Agar (Brain-heart-infusion-[BHI]-Agar) | | <ul style="list-style-type: none"> - Brain-heart-infusion-Agar 47 g - VE Wasser 1 l - Defibriniertes Schafblut 5 % - Iso Vitalex Enrichment, gelöst in 12 ml Diluent 1 Fl | <ul style="list-style-type: none"> Oxoid CM 375 Acila 2101012 BD 211876 |

| | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------------|-------|---------------|
| 5 | Hirn-Herz-Glycerin-Bouillon | - Hirn-Herz-Bouillon | 37 g | Merck 1.10493 |
| | | - VE Wasser | 1 l | |
| | | - Glycerin | 30 % | VWR 1.04093 |
| 6 | Leber-Bouillon | - Tryptone Soja Broth | 30 g | Oxoid CM 129 |
| | | - VE Wasser | 1 l | |
| | | - Rinderleber | 2 St. | |
| | | - TSB Lösung | 10 ml | |

Tabelle 16: Reagenzien für PCR

| | |
|----------------------|-----------------------------|
| Q/Aamp DNA- Mini Kit | Qiagen S1306 |
| Ethanol | Uni-Apotheke |
| Taq | Roche 1647687 |
| dNTP's | Promega U1240 |
| Primer | MWG Biotech |
| Ampuwa | Braun 02351544 |
| Agarose | Fisher Scientific B24703610 |
| Ethidiumbromid | Sigma E1510 |

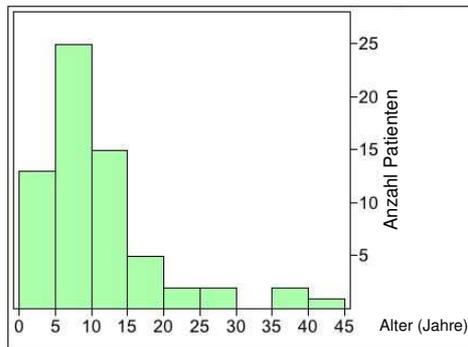
6.3 Hintergrundinformation zur Beurteilung der Darmwanddicke

Tabelle 17: Zusammenstellung der **Parameter der Regressionsgleichung**, die den Zusammenhang zwischen der Darmwanddicke (in mm) der verschiedenen Darmabschnitte und dem Alter (in Jahren) der Probanden in der Regressionsanalyse beschreibt. A: Darmwanddicke (in mm) der Probanden im Erwachsenenalter. A(0): Darmwanddicke (in mm) der Probanden zum Zeitpunkt der Geburt. T: Lebensalter (in Jahren) der Probanden, an dem 50% der bis zum Erwachsenenalter zu erwartenden Dickenzunahme (entspricht der Differenz zwischen A und A(0)) erreicht sind. b: Steigung der Regressionskurve am Wendepunkt. SD: Standardabweichung (in mm) der Messwerte vom rechnerisch aus der Regressionsgleichung ermittelten Wert.

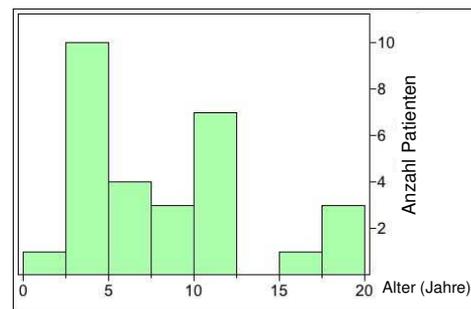
| | A(0) | A | T | b | SD |
|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|-----------|
| Jejunum | 0,60 | 0,92 | 6,82 | 0,21 | 0,12 |
| Ileum | 0,84 | 1,16 | 11,93 | 1,71 | 0,14 |
| Coecum | 1,08 | 1,54 | 9,11 | 0,40 | 0,18 |
| C. ascendens | 1,10 | 1,46 | 10,38 | 0,54 | 0,22 |
| C. transversus | 1,00 | 1,40 | 8,83 | 0,38 | 0,20 |
| C. descendens | 1,10 | 1,43 | 10,86 | 0,49 | 0,22 |

6.4 Patientendaten

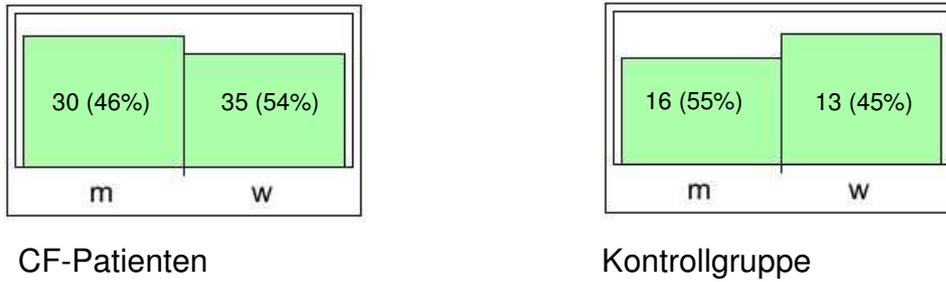
Abbildung 14: Altersstruktur der CF-Patienten und der Kontrollgruppe



CF-Patienten



Kontrollgruppe

Abbildung 15: Geschlechtsverteilung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe

6.5 Ergebnisse der Querschnittstudie

Tabelle 18: Gewicht und CD-Befund

| Gewicht | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|---------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| Normalgewicht | 13 | 2 | 7 | 14 | 4 | 40 |
| Untergewicht | 11 | 4 | 1 | 8 | 1 | 25 |
| Summe | 24 | 6 | 8 | 22 | 5 | 65 |

Tabelle 19: Lungenfunktion und CD-Befund

| Fev1% | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|--------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| FEV 1 < 70% | 4 | 2 | 1 | 8 | 2 | 17 |
| FEV 1 ≥ 70% | 17 | 4 | 3 | 4 | 1 | 29 |
| Summe | 21 | 6 | 4 | 12 | 3 | 46 |

Tabelle 20: Krankenhaus/ Rehaufenthalt und CD-Befund

| KH/Reha | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|--------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| ja | 15 | 6 | 5 | 13 | 2 | 41 |
| nein | 9 | 0 | 3 | 9 | 3 | 24 |
| Summe | 24 | 6 | 7 | 23 | 5 | 65 |

Tabelle 21: Antibiotika und CD-Befund

| AB in Anamnese | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|----------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| ja | 15 | 4 | 6 | 13 | 3 | 41 |
| nein | 9 | 2 | 2 | 9 | 2 | 24 |
| Summe | 24 | 6 | 7 | 23 | 5 | 65 |

Tabelle 22: Gastrointestinale Symptome und CD-Befund

| | Anzahl Patienten | Ø CD | n.toxCD | toxCD _{Tox-} | toxCD _{Tox+} | n.klassCD |
|------------------------|------------------|-----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Durchfall | 14 | 3 (21,4) | 1 (7,1) | 6 (42,9) | 2 (14,3) | 2 (14,3) |
| Verstopfung | 5 | 0 (0) | 0 (0) | 4 (80,0) | 1 (20,0) | 0 (0) |
| Erbrechen | 5 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (40,0) | 2 (40,0) | 1 (20,0) |
| Sonstige Beschwerden * | 35 | 12 (34,3) | 5 (14,3) | 12 (34,3) | 2 (5,7) | 4 (11,4) |
| keine Beschwerden | 26 | 12 (46,2) | 1 (3,8) | 7 (26,9) | 5 (19,2) | 1 (3,8) |

*sonstige Beschwerden: Übelkeit, Bauchschmerzen, Blähungen

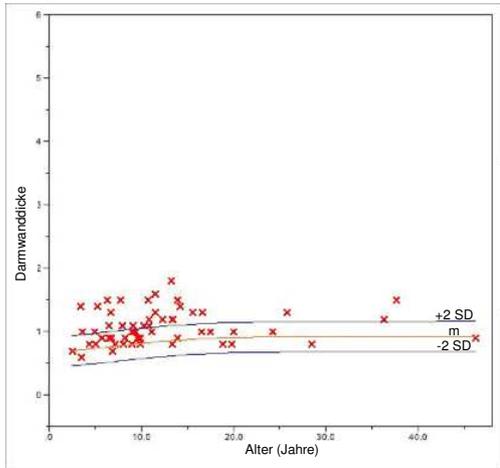
Tabelle 23: DIOS und CD-Befund

| DIOS | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|--------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| ja | 3 | 0 | 4 | 3 | 1 | 11 |
| nein | 21 | 6 | 4 | 19 | 4 | 54 |
| Summe | 24 | 6 | 7 | 23 | 5 | 65 |

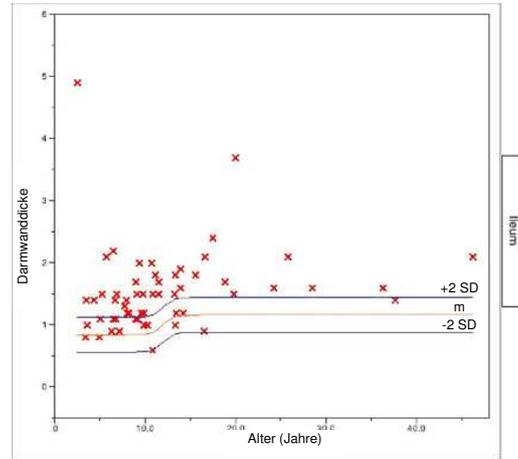
Tabelle 24: Mekoniumileus und CD-Befund

| Mekoniumileus | CD = n | n.t.CD | t.CD Tox (+) | t.CD Tox (-) | n.k.CD | Summe |
|---------------|-----------|----------|--------------|--------------|----------|-----------|
| ja | 7 | 1 | 0 | 4 | 2 | 14 |
| nein | 17 | 5 | 8 | 18 | 3 | 51 |
| Summe | 24 | 6 | 8 | 22 | 5 | 65 |

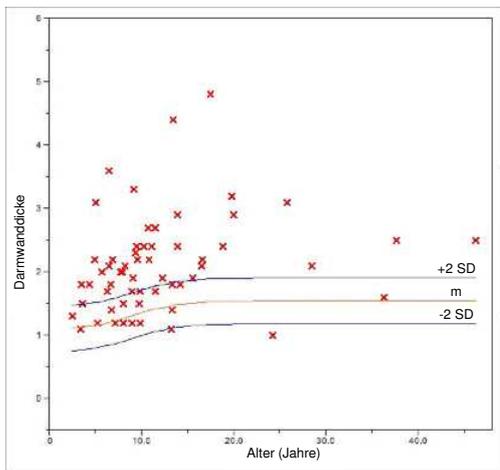
Abbildung 16a-f: Darstellung der Darmwanddicken der verschiedenen Darmabschnitte abhängig vom Alter im Vergleich zu Referenzwerten von gesunden Probanden. Als Linien eingezeichnet sind das 50te Perzentil der Referenzgruppe (m) und der Bereich $\pm 2SD$, in welchem die Darmwanddicken als normal angesehen werden ($m+2SD$, $m-2SD$)



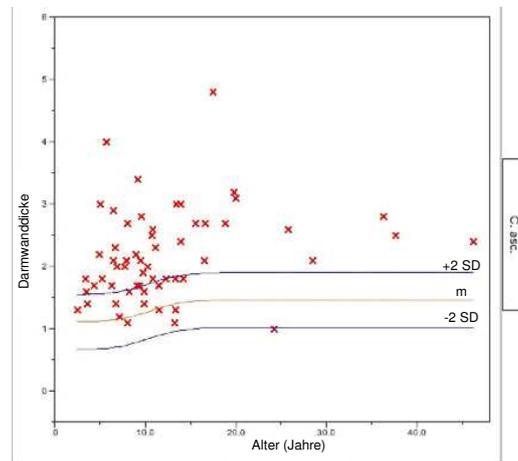
a



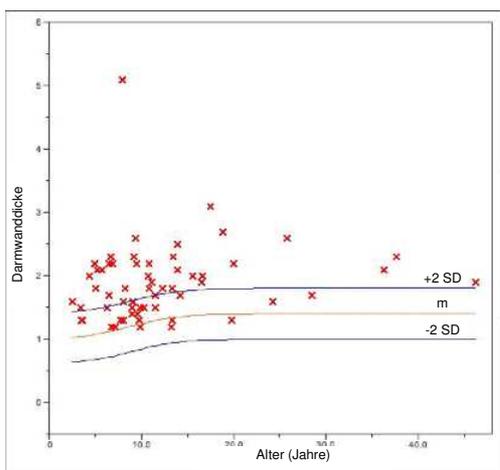
b



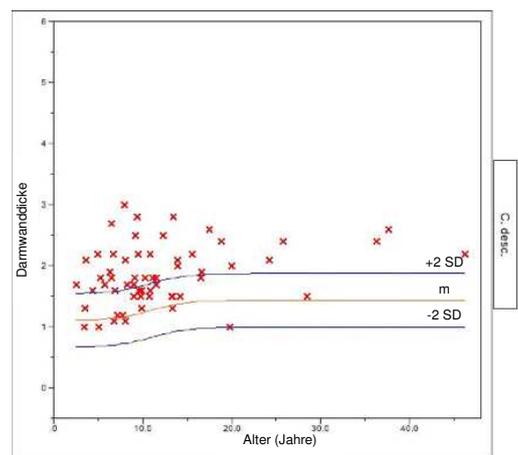
c



d

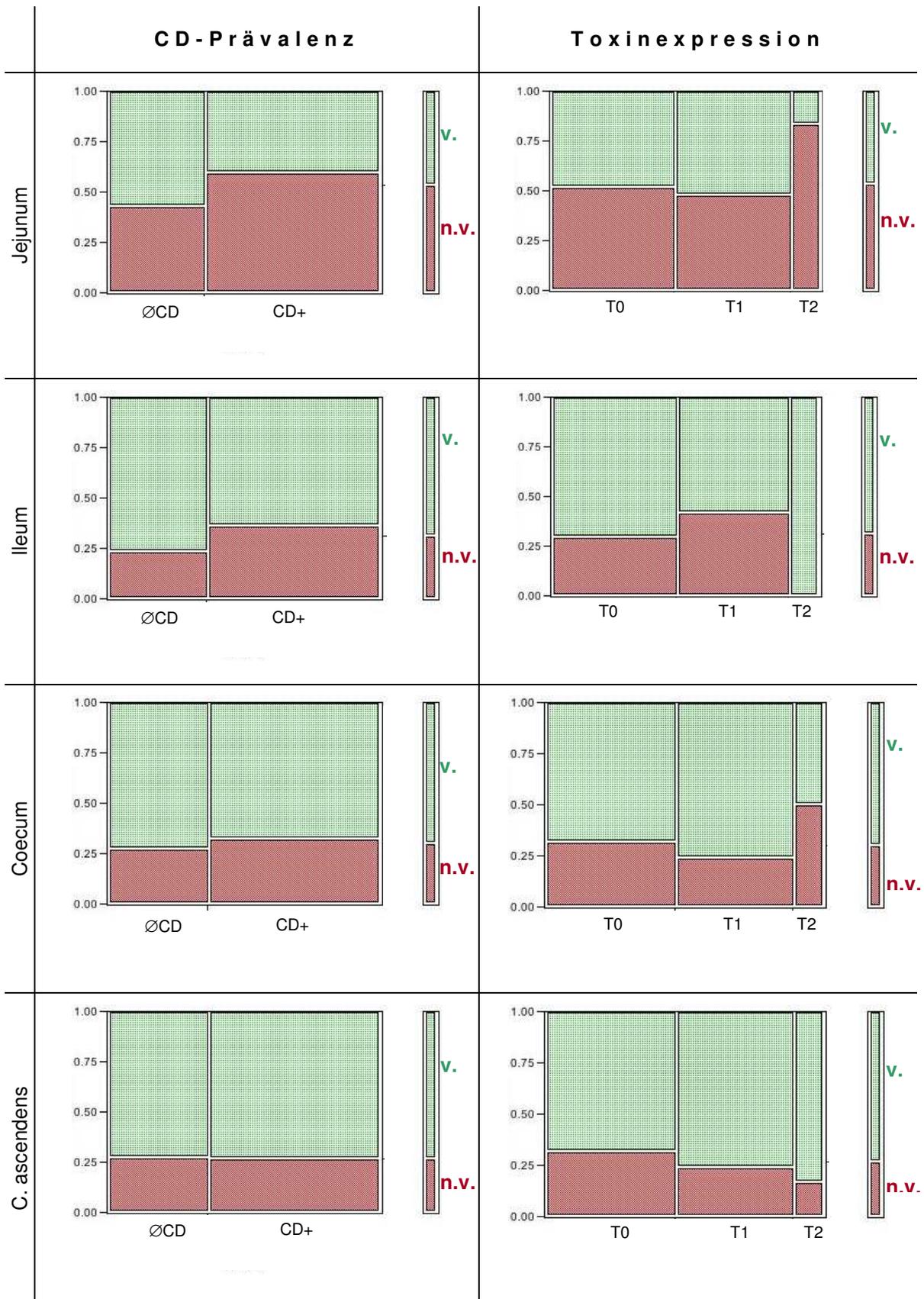


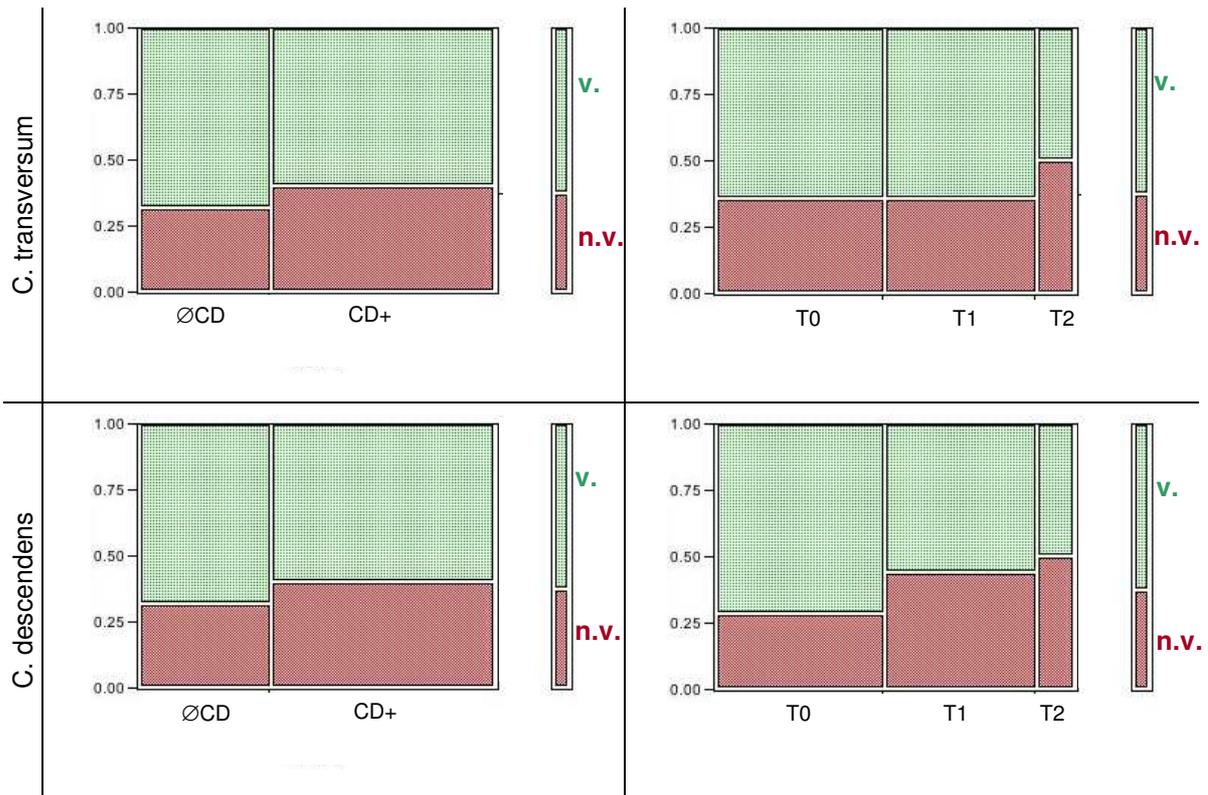
e



f

Abbildung 17: Relation der Darmwanddicken definierter Darmabschnitte zu CD-Nachweis und Toxinexpression





v. = Darmwand verdickt; n.v. = Darmwand nicht verdickt

6.6 Ergebnisse der Längsschnittstudie

Tabelle 25: Auswertungsprotokoll zur Längsschnittstudie

| | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|---|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--|
| | Q | | p | p | n | | |
| 8 | IA | 1 | p | p | n | | Co-Trimoxazol Aminopenicillin Gyrasehemmer Cephalosporin Aminoglycosid |
| | IB, IIA | 2 | p | p | n | | |
| | IIA1 | 3 | n | p | n | Fieber, Erbrechen, Durchfall | |
| | IIB | 4 | n | n | n | | |
| | IIIA | 5 | n | n | n | | |
| | IIIA1 | 6 | n | n | n | Übelkeit, Bauchschmerzen | |
| | IIIB | 7 | n | n | n | | |
| | IIIC | 8 | n | n | n | | |
| K | | | n | n | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|---------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 14 | IA | 1 | n | n | n | | Cephalosporin Makrolid |
| | IB,IIA | 2 | p | p | n | | |
| | IIB | 3 | n | n | n | | |
| | IIC | 4 | p | n | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 15 | A | 1 | n | n | n | | Gyrasehemmer |
| | B | 2 | n | n | n | | |
| | C | 3 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 18 | A | 1 | n | n | n | | Aminopenicillin |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | n | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Q | | n | # | n | | |
| 19 | A | 1 | p | p | n | | Aminoglycosid Gyrasehemmer |
| | B | 2 | n | n | n | | |
| | C | 3 | n | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|----------------------------|
| | Q | | p | # | n | | |
| 20 | A | 1 | n | p | n | | Carbapenem Gyrasehemmer |
| | B | 2 | n | n | n | | |
| | B1 | 3 | p | p | n | Fieber | |
| | C | 4 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | # | n | | |
| 22 | A | 1 | n | n | n | | Cephalosporin |
| | B | 2 | n | n | n | | |
| | C | 3 | n | n | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 25 | A | 1 | n | n | n | | Aminopenecillin |
| | B | 2 | p | n | n | | |
| | C | 3 | p | n | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 26 | A | 1 | p | p | n | | Cephalosporin |
| | B | 2 | n | p | n | | |
| | C | 3 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 27 | A | 1 | p | p | n | | Cephalosporin |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | n | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Q | | p | # | n | | |
| 30 | A | 1 | p | n | n | | Cephalosporin Aminoglycosid |
| | B | 2 | n | n | n | | |
| | C | 3 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 31 | IA | 1 | p | p | n | | Co-Trimoxazol Gyrasehemmer |
| | IB, IIA | 2 | p | p | n | | |
| | IIB | 3 | p | p | n | | |
| | IIB1 | 4 | p | n | n | Erbrechen, Bauchschmerzen | |
| | IIC | 5 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 32 | A | 1 | p | p | n | | Gyrasehemmer |
| | B | 2 | n | n | p | | |
| | C | 3 | n | n | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | n | # | n | | |
| 35 | A | 1 | p | n | n | | Cephalosporin |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | n | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|---|
| | Q | | p | n | n | | |
| 36 | A | 1 | p | p | p | | Aminoglycosid Cephalosporin Co-Trimoxazol |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | p | p | p | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|
| | Q | | p | p | n | | |
| 41 | IA | 1 | n | n | n | | Cephalosporin Aminopenicillin |
| | IB, IIA | 2 | p | p | n | | |
| | IIB | 3 | p | p | n | | |
| | IIC | | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Q | | p | # | n | | |
| 43 | A | 1 | p | p | n | | Co-Trimoxazol Cephalosporin |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Q | | p | # | p | | |
| 44 | IA | 1 | p | n | n | | Metronidazol Cephalosporin |
| | IB | 2 | p | n | n | | |
| | IB, IIA | 3 | n | n | n | | |
| | IIB | 4 | n | n | n | | |
| | IIC | 5 | p | n | n | | |
| | | | p | p | n | | |

| patnr | Zeitpunkt | Probe-Nr. | CD Stuhl | EIA Kultur/PCR | EIA-Stuhl | Gastrointestinale Beschwerden | Eingenommene Antibiotika |
|-------|-----------|-----------|----------|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | Q | | p | # | n | | |
| 47 | A | 1 | p | p | n | | Cephalosporin |
| | B | 2 | p | p | n | | |
| | C | 3 | p | p | n | | |

Legende:

Q: Tag der Querschnittstudie **A:** Tag vor Beginn der AB-Therapie **B:** Tag nach Ende der AB-Therapie **C:** Tag am Ende des vierwöchigen Kontrollzeitraumes nach AB-Therapie
K: Kontrolluntersuchung

I: erster AB-Zyklus **II:** zweiter AB-Zyklus **III:** dritter AB-Zyklus

p = positiv **n** = negativ **#** = kein Ergebnis (nicht durchgeführt oder inhibiert)

Tabelle 26: Vergleich von Werten aus den Längsschnitterhebungen von Edelstein und Dietsche

| | | gesamt (Anzahl) | CD-Nachweis | | | | Toxin A/B - Nachweis | | | |
|------------------|----------------|-----------------|---------------|--------|----------------|--------|----------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| | | | vor Antibiose | | nach Antibiose | | vor Antibiose | | nach Antibiose | |
| | | | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil | Anzahl | Anteil an CD ⁺ | Anzahl | Anteil an CD ⁺ |
| Edelstein | CF-Patienten | 18 | 4 | 22,2% | 13 | 72,2% | k.A. | - | 9 | 69,2% |
| | Kontrollgruppe | 5 | 0 | 0% | 0 | 0% | k.A. | - | - | - |
| Dietsche | CF-Patienten | 19 | 13 | 68,4% | 17 | 89,5% | 1 | 8,3% | 2 | 11,8% |
| | Kontrollgruppe | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

k.A.= keine Angabe

7 Literaturverzeichnis

- 1 Aboudola S, Kotloff KL, Kyne L, Warny M, Kelly EC, Sougioultzis S, Giannasca PJ, Monath TP, Kelly CP: Clostridium difficile vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect Immun* 2003;71(3):1608-10.
- 2 Al-Eidan FA, McElnay JC, Scott MG, Kearney MP: Clostridium difficile-associated diarrhoea in hospitalised patients. *J Clin Pharm Ther* 2000;25(2):101-9.
- 3 Al-Tureihi FIJ, Hassoun A, Wolf-Klein G, Isenberg H: Albumin, length of stay, and proton pump inhibitors: Key factors in Clostridium difficile-associated disease in nursing home patients. *J Am Med Dir Assoc* 2005;6(2):105-8.
- 4 Alonso R, Munoz C, Gros S, Garcia de Viedma D, Pelaez T, Bouza E: Rapid detection of toxigenic Clostridium difficile from stool samples by a nested PCR of toxin B gene. *J Hosp Infect* 1999;41(2):145-9.
- 5 Anand A, Bashey B, Mir T, Glatt AE: Epidemiology, clinical manifestations, and outcome of Clostridium difficile-associated diarrhea. *Am J Gastroenterol* 1994;89(4):519-23.
- 6 Aronsson B, Mollby R, Nord CE: Clostridium difficile and antibiotic associated diarrhoea in Sweden. *Scand J Infect Dis Suppl* 1982;35:53-8.
- 7 Beaugerie L, Flahault A, Barbut F, Atlan P, Lalande V, Cousin P, Cadilhac M, Petit J: Antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile in the community. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(7):905-12.
- 8 Binkovitz LA, Allen E, Bloom D, Long F, Hammond S, Buonomo C, Donnelly LF: Atypical presentation of Clostridium difficile colitis in patients with cystic fibrosis. *AJR Am J Roentgenol* 1999;172(2):517-21.
- 9 Blickman JG, Boland GW, Cleveland RH, Bramson RT, Lee MJ: Pseudomembranous colitis: CT findings in children. *Pediatr Radiol* 1995;25 Suppl 1:S157-9.
- 10 Boland GW, Lee MJ, Cats AM, Ferraro MJ, Matthia AR, Mueller PR: Clostridium difficile colitis: correlation of CT findings with severity of clinical disease. *Clin Radiol* 1995;50(3):153-6.
- 11 Bolton RP, Tait SK, Dear PR, Losowsky MS: Asymptomatic neonatal colonisation by Clostridium difficile. *Arch Dis Child* 1984;59(5):466-72.
- 12 Borowitz D, Durie PR, Clarke LL, Werlin SL, Taylor CJ, Semler J, De Lisle RC, Lewindon P, Lichtman SM, Sinaasappel M, Baker RD, Baker SS, Verkade HJ, Lowe M: Gastrointestinal outcomes and confounders in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41(3):273-85.

- 13 Borriello SP: Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl C:13-9.
- 14 Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C: Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 1996;181(1-2):29-38.
- 15 Brazier JS: The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl C:47-57.
- 16 Cerquetti M, Luzzi I, Caprioli A, Sebastianelli A, Mastrantonio P: Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14(7):598-603.
- 17 Chachaty E, Depitre C, Mario N, Bourneix C, Saulnier P, Corthier G, Andremont A: Presence of *Clostridium difficile* and antibiotic and beta-lactamase activities in feces of volunteers treated with oral cefixime, oral cefpodoxime proxetil, or placebo. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9):2009-13.
- 18 Chaun H: Colonic disorders in adult cystic fibrosis. *Can J Gastroenterol* 2001;15(9):586-90.
- 19 Chmiel JF, Davis PB: State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003;4(1):8.
- 20 Cohen SH, Tang YJ, Silva JJ: Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis* 2000;181(2):659-63.
- 21 Connett GJ, Lucas JS, Atchley JT, Fairhurst JJ, Rolles CJ: Colonic wall thickening is related to age and not dose of high strength pancreatin microspheres in children with cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11(2):181-3.
- 22 Cooperstock M, Riegle L, Woodruff CW, Onderdonk A: Influence of age, sex, and diet on asymptomatic colonization of infants with *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1983;17(5):830-3.
- 23 Croft NM, Marshall TG, Ferguson A: Direct assessment of gastrointestinal inflammation and mucosal immunity in children with cystic fibrosis. *Postgrad Med J* 1996;72 Suppl 2:S32-6.
- 24 Cutting GR: Phenotype-genotype relationships. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): Cystic fibrosis. London: Arnold, 2000:49-60.
- 25 Dalzell AM, Heaf DP: Oro-caecal transit time and intra-luminal pH in cystic fibrosis patients with distal intestinal obstruction syndrome. *Acta Univ Carol (Med) (Praha)* 1990;36(1-4):159-60.
- 26 Davidson AC, Harrison K, Steinfert CL, Geddes DM: Distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis treated by oral intestinal lavage, and a case of recurrent obstruction despite normal pancreatic function.

- Thorax* 1987;42(7):538-41.
- 27 Davidson AGF: Gastrointestinal and pancreatic disease in cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): Cystic fibrosis. London: Arnold, 2000:261-288.
 - 28 Dial S, Alrasadi K, Manoukian C, Huang A, Menzies D: Risk of Clostridium difficile diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. *CMAJ* 2004;171(1):33-8.
 - 29 Dockter G, Lindemann H: Prognose. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): Mukoviszidose - Zystische Fibrose. Stuttgart: Thieme, 2004:26-34.
 - 30 Dockter G: Pankreas, Leber, Gallenwege und Magen-Darm-Trakt. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): Mukoviszidose - Zystische Fibrose. Stuttgart: Thieme, 2004:100-130.
 - 31 Dodge JA: Fibrosing colonopathy. *Gut* 2000;46(2):152-3.
 - 32 Dodge JA: The aetiology of fibrosing colonopathy. *Postgrad Med J* 1996;72 Suppl 2 :52-5.
 - 33 Dray X, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Dusser D, Marteau P, Hubert D: Distal intestinal obstruction syndrome in adults with cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(6):498-503.
 - 34 Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP: Human antibody response to surface layer proteins in Clostridium difficile infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;41(3):237-42.
 - 35 Dupuy B, Sonenshein AL: Regulated transcription of Clostridium difficile toxin genes. *Mol Microbiol* 1998;27(1):107-20.
 - 36 Durie PR: The pathophysiology of the pancreatic defect in cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;363:41-4.
 - 37 Edelstein B, Lloyd-Still J, Kahn N, Udarbe A: Clostridium difficile in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1993;A 104 (suppl.9):231.
 - 38 Eggertson L, Sibbald B: Hospitals battling outbreaks of C. difficile. *CMAJ* 2004;171(1):19-21.
 - 39 Eggertson L: C. difficile strain 20 times more virulent. *CMAJ* 2005;172(10):1279.
 - 40 Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, O'Keane CJ, Gong D, Gao N, Xu YL, Walker WA, LaMont JT: Diminished Clostridium difficile toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 1992;90(3):822-9.
 - 41 Fedorko DP, Williams EC: Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of

- Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 1997;35(5):1258-9.
- 42 Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva JJ: Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of Clostridium difficile from the hospital environment. *Am J Med* 1981;70(4):906-8.
- 43 George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM: Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 1979;9(2):214-9.
- 44 George WL, Sutter VL, Goldstein EJ, Ludwig SL, Finegold SM: Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. *Lancet* 1978;1(8068):802-3.
- 45 Goldstein JL, Sahi J, Bhuvra M, Layden TJ, Rao MC: Escherichia coli heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl- secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 1994;107(4):950-6.
- 46 Griese M, Hüls G, Lindemann H: Atemwege und Lunge. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): Mukoviszidose - Zystische Fibrose. Stuttgart: Thieme, 2004:35-94.
- 47 Gumerlock PH, Tang YJ, Weiss JB, Silva JJ: Specific detection of toxigenic strains of Clostridium difficile in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31(3):507-11.
- 48 Haber HP, Benda N, Fitzke G, Lang A, Langenberg M, Riethmüller J, Stern M: Colonic wall thickness measured by ultrasound: striking differences in patients with cystic fibrosis versus healthy controls. *Gut* 1997;40(3):406-11.
- 49 Haber HP, Busch A, Ziebach R, Dette S, Ruck P, Stern M: Ultrasonographic findings correspond to clinical, endoscopic, and histologic findings in inflammatory bowel disease and other enterocolitides. *J Ultrasound Med* 2002;21(4):375-82.
- 50 Haber HP, Lang A, Drews K, Stern M: Colonic wall thickening in cystic fibrosis identified by ultrasound. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23(4):487-91.
- 51 Haber HP, Stern M: Intestinal ultrasonography in children and young adults: bowel wall thickness is age dependent. *J Ultrasound Med* 2000;19(5):315-21.
- 52 Haber HP: Transabdominelle hochauflösende (HR-) Sonographie des Darms im Kindes- und Jugendalter: Erstellung von altersabhängigen Referenzwerten für die Darmwanddicke und klinische Anwendung bei akuten und chronischen Darmerkrankungen. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität (Habil), 2001.
- 53 Hall IC, O'Toole E: Intestinal flora in newborn infants. With a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am J Dis Child* 1935;49:390-402.

- 54 Holton AF, Hall MA, Lowes JA: Antibiotic exposure delays intestinal colonization by *Clostridium difficile* in the newborn. *J Antimicrob Chemother* 1989;24(5):811-7.
- 55 Hussain SZ, Chu C, Greenberg DP, Orenstein D, Khan S: *Clostridium difficile* colitis in children with cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* 2004;49(1):116-21.
- 56 Johnson S, Clabots CR, Linn FV, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN: Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet* 1990;336(8707):97-100.
- 57 Kaatz GW, Gitlin SD, Schaberg DR, Wilson KH, Kauffman CA, Seo SM, Fekety R: Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Epidemiol* 1988;127(6):1289-94.
- 58 Karlsson S, Dupuy B, Mukherjee K, Norin E, Burman LG, Akerlund T: Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect Immun* 2003;71(4):1784-93.
- 59 Kawamoto S, Horton KM, Fishman EK: Pseudomembranous colitis: spectrum of imaging findings with clinical and pathologic correlation. *Radiographics* 1999;19(4):887-97.
- 60 Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994;330(4):257-62.
- 61 Kelly CP: Immune response to *Clostridium difficile* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8(11):1048-53.
- 62 Kim K, Pickering LK, DuPont HL, Sullivan N, Wilkins T: In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 1984;150(1):57-62.
- 63 Kimmey MB, Martin RW, Haggitt RC, Wang KY, Franklin DW, Silverstein FE: Histologic correlates of gastrointestinal ultrasound images. *Gastroenterology* 1989;96(2 Pt 1):433-41.
- 64 Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK: Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995;109(2):516-23.
- 65 Kleinbaum DG, Klein M, Pryor ER: Logistic regression. New York u.a.: Springer, 2002.
- 66 Klingler PJ, Metzger PP, Seelig MH, Pettit PD, Knudsen JM, Alvarez SA: *Clostridium difficile* infection: risk factors, medical and surgical management. *Dig Dis* 2000;18(3):147-60.
- 67 Kyne L, Merry C, O'Connell B, Kelly A, Keane C, O'Neill D: Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. *Age Ageing* 1999;28(2):107-13.

- 68 Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP: Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357(9251):189-93.
- 69 Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP: Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000;342(6):390-7.
- 70 Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP: *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978;1(8073):1063-6.
- 71 Laurans M, Toulemonde M, Duhamel J: *Clostridium Difficile*-associated Pseudomembranous Colitis in a Young Patient with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2002;(1):153.
- 72 Lewis PA: The epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): *Cystic fibrosis*. London: Arnold, 2000:13-25.
- 73 Loo VG, Libman MD, Miller MA, Bourgault A, Frenette CH, Kelly M, Michaud S, Nguyen T, Poirier L, Vibien A, Horn R, Laflamme PJ, Rene P: *Clostridium difficile*: a formidable foe. *CMAJ* 2004;171(1):47-8.
- 74 Louie TJ, Meddings J: *Clostridium difficile* infection in hospitals: risk factors and responses. *CMAJ* 2004;171(1):45-6.
- 75 Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD: *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988;1(1):1-18.
- 76 Mani N, Lyras D, Barroso L, Howarth P, Wilkins T, Rood JI, Sonenshein AL, Dupuy B: Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J Bacteriol* 2002;184(21):5971-8.
- 77 Marshall SG, Rosenfeld M, Ramsey BW: Respiratory system. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): *Cystic fibrosis*. London: Arnold, 2000:204-217.
- 78 McFarland LV, Brandmarker SA, Guandalini S: Pediatric *Clostridium difficile*: a phantom menace or clinical reality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31(3):220-31.
- 79 McFarland LV, Coyle MB, Kremer WH, Stamm WE: Rectal swab cultures for *Clostridium difficile* surveillance studies. *J Clin Microbiol* 1987;25(11):2241-2.
- 80 McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE: Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320(4):204-10.
- 81 McFarland LV, Stamm WE: Review of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Am J Infect Control* 1986;14(3):99-109.
- 82 McFarland LV: Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what

- really works? *J Med Microbiol* 2005;54(Pt 2):101-11.
- 83 Millar-Jones L, Goodchild MC: Cystic fibrosis, pancreatic sufficiency and distal intestinal obstruction syndrome: a report of four cases. *Acta Paediatr* 1995;84(5):577-8.
- 84 O'Connor KA, Kingston M, O'Donovan M, Cryan B, Twomey C, O'Mahony D: Antibiotic prescribing policy and *Clostridium difficile* diarrhoea. *QJM* 2004;97(7):423-9.
- 85 Park RW, Grand RJ: Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: a review. *Gastroenterology* 1981;81(6):1143-61.
- 86 Peach SL, Borriello SP, Gaya H, Barclay FE, Welch AR: Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 1986;39(9):1013-8.
- 87 Pickhardt PJ, Yagan N, Siegel MJ, Balfe DM, Rothbaum RJ: Cystic fibrosis: CT findings of colonic disease. *Radiology* 1998;206(3):725-30.
- 88 Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P, Hunter J: *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol* 2004;7(1):59-62.
- 89 Pohl M, Krackhardt B, Posselt HG, Lembcke B: Ultrasound studies of the intestinal wall in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25(3):317-20.
- 90 Pokorny CS, Bye PT, MacLeod C, Selby WS: Antibiotic-associated colitis and cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* 1992;37(9):1464-8.
- 91 Poutanen SM, Simor AE: *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* 2004;171(1):51-8.
- 92 R-Biopharm AG Darmstadt: Ridascreen (R) *Clostridium difficile* Toxin A/B. Darmstadt, 2001.
- 93 Ramsden WH, Moya EF, Littlewood JM: Colonic wall thickness, pancreatic enzyme dose and type of preparation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1998;79(4):339-43.
- 94 Reinken L, van Oost G: Longitudinale Körperentwicklung gesunder Kinder von 0 bis 18 Jahren. Körperlänge/-höhe, Körpergewicht und Wachstumsgeschwindigkeit. *Klin Padiatr* 1992;204(3):129-33.
- 95 Riley TV, O'Neill GL, Bowman RA, Golledge CL: *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiol Infect* 1994;113(1):13-20.
- 96 Rivlin J, Lerner A, Augarten A, Wilschanski M, Kerem E, Ephros MA: Severe *Clostridium difficile*-associated colitis in young patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1998;132(1):177-9.

- 97 Salyers AA, Whitt DD: Pseudomembranous Colitis. In: Salyers AA, Whitt DD (Hrsg): Bacterial Pathogenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1994:282-289.
- 98 Santis G: Basic molecular genetics. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): Cystic fibrosis. London: Arnold, 2000:27-47.
- 99 Schmitt-Grohe S, Wiggert E, Steffan J, Handke R, Zielen S: Severe antibiotic-associated colitis in a patient with cystic fibrosis and colonic wall thickening. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34(2):224-6.
- 100 Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN: Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* 1998;351(9103):633-6.
- 101 Siarakas S, Tambosis E, Robertson GJ, Funnell GR, Bradbury R, Gottlieb T: Comparison of two commercial enzyme immunoassays with cytotoxicity assay and culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* related diarrhea. *Pathology* 1996;28(2):178-81.
- 102 Sinaasappel M: Hepatobiliary pathology in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;363:45-50; discussion 50-1.
- 103 Smyth RL, Croft NM, O'Hea U, Marshall TG, Ferguson A: Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2000;82(5):394-9.
- 104 Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, Keates S, Maroo S, Pothoulakis C, Giannasca PJ, Lee CK, Warny M, Monath TP, Kelly CP: *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 2005;128(3):764-70.
- 105 Spencer RC: The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl C:21-7.
- 106 Starr JM, Martin H, McCoubrey J, Gibson G, Poxton IR: Risk factors for *Clostridium difficile* colonisation and toxin production. *Age Ageing* 2003;32(6):657-60.
- 107 Stern M, Sens B, Wiedemann B, Busse O, Damm G, Wenzlaff P (Hrsg.): Qualitätssicherung Mukoviszidose. Hannover, 2005.
- 108 Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM: Wadsworth anaerobic bacteriology manual. California: Star Publishing Company, 1993.
- 109 Thomas DR, Bennett RG, Laughon BE, Greenough WB3, Bartlett JG: Postantibiotic colonization with *Clostridium difficile* in nursing home patients. *J Am Geriatr Soc* 1990;38(4):415-20.
- 110 Tullus K, Aronsson B, Marcus S, Mollby R: Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol*

- Infect Dis* 1989;8(5):390-3.
- 111 Tümmler B, Lindemann H: Genetik, Molekularbiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): Mukoviszidose - Zystische Fibrose. Stuttgart: Thieme, 2004:3-13.
- 112 Valiquette L, Low DE, Pepin J, McGeer A: Clostridium difficile infection in hospitals: a brewing storm. *CMAJ* 2004;171(1):27-9.
- 113 Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G: Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(2):55-64.
- 114 Voth DE, Ballard JD: Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):247-63.
- 115 Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF: Survival of Clostridium difficile and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest* 2000;12(4):332-6.
- 116 Welton CJ, Long SS, Thompson CMJ, Gilligan PH: Clostridium difficile in patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1985;139(8):805-8.
- 117 Westaby D: Liver and biliary disease in cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM (Hrsg): Cystic fibrosis. London: Arnold, 2000:289-300.
- 118 Wilson KH: The microecology of Clostridium difficile. *Clin Infect Dis* 1993;16 Suppl 4:S214-8.
- 119 Winesett DE, Rhoads JM, Boat TF: Pseudomembranous colitis in a patient with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18(2):244-6.
- 120 Wu TC, McCarthy VP, Gill VJ: Isolation rate and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1983;148(1):176.
- 121 Yamakawa K, Kamiya S, Meng XQ, Karasawa T, Nakamura S: Toxin production by Clostridium difficile in a defined medium with limited amino acids. *J Med Microbiol* 1994;41(5):319-23.
- 122 Zhong S, Zhang Z, Wang J, Lai Z, Wang Q, Pan L, Ren Y: Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic Escherichia coli, enteropathogenic Escherichia coli and Clostridium difficile to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of Bifidobacterium adolescentis 1027. *World J Gastroenterol* 2004;10(11):1630-3.
- 123 Ziebach R, Busch A, Stern M: Clostridium Difficile Colitis in five CF Patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 2002;1(1):154.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Stern herzlich für die Überlassung des Themas und die umfassende Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Besonders intensiv hat mich Frau Privatdozentin Dr. Ulrike Schumacher betreut, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr danke ich vielmals für die wichtigen Hinweise und Verbesserungsvorschläge sowie für ihren beständigen Ansporn.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Rita Ziebach, die mir die Arbeit an diesem Thema überhaupt ermöglichte und mir nicht nur bei den vielen kleinen Hindernissen der Studiendurchführung immer wieder den Weg zu einer praktikablen Lösung gewiesen hat.

Herrn Privatdozent Dr. H. P. Haber danke ich herzlich für die Durchführung der sonographischen Untersuchungen und die ausführliche und überaus freundliche fachliche Beratung.

Mit großer Geduld haben Frau Iris Bergmann sowie Herr Prof. Dr. K. Dietz, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie, die umfangreiche statistische Auswertung der Daten durchgeführt. Für ihre unermüdliche Hilfe danke ich ihnen herzlich.

Frau Ulrike Rassow-Schlanke und Herrn Bernhard Rottinghaus danke ich für die vielfältige organisatorische Unterstützung in der CF-Ambulanz.

Für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im bakteriologischen Labor bedanke ich mich ganz herzlich beim gesamten Laborpersonal, besonders bei Frau Karin Hauser.

Weiterhin möchte ich allen Patienten aus der CF-Ambulanz Tübingen für die bereitwillige Teilnahme an dieser Studie meinen Dank aussprechen.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Mutter und meinem Vater für den großen Einsatz bei der Fertigstellung dieser Arbeit, ihren Beistand und ihre Förderung während meiner Ausbildung und weit darüber hinaus, sowie meinem Mann und meinen drei Kindern Paula, Johann und Wendelin für ihre große Geduld und Unterstützung.

Lebenslauf

| | | |
|----------------|---|---|
| Name: | Birgit Dietsche | |
| Geburtsdatum: | 23.02.1970 | |
| Geburtsort: | Überlingen am Bodensee | |
| Eltern: | Edeltraud Dietsche, geb. Hebeisen, Grund- u. Hauptschul- lehrerin Wolfgang Dietsche, Grund- u. Hauptschullehrer | |
| Familienstand: | verheiratet, 3 Kinder: 1996 Geburt der Tochter Paula 1999 Geburt des Sohnes Johann Konrad (CF) 2004 Geburt des Sohnes Jakob Wendelin | |
| Ausbildung: | 1976 - 1980 | Grundschule Owingen |
| | 1980 - 1982 | Gymnasium Überlingen |
| | 1982 - 1983 | Realschule Überlingen |
| | 1983 - 1990 | Heimschule Kloster Wald, allgemeine Hoch- schulreife Mai 1990 |
| | 1987 - 1990 | Bildhauerlehre an der Heimschule Kloster Wald Abschluss: Gesellenprüfung |
| | 1991 | Freiwilliges Soziales Jahr (6 Monate), Chirur- gie, Uniklinik Tübingen |
| | 1991 - 1993 | Medizinstudium an der Semmelweis-Univer- sität in Budapest 7/1993: Ärztliche Vorprüfung |
| | 1993 - 1994 | Medizinstudium an der Universität Greifswald |
| | 1994 - 1998 | Medizinstudium an der Universität Rostock 3/1995: Erster Abschnitt der ärztlichen Prü- fung 9/1997: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1997: Akupunktur Diplom A |
| | 1998 - 1999 | Praktisches Jahr an der Universität Tübingen 23.11.2000: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| | 2003 | Beginn der Dissertation über Clostridium diffi- cile bei CF |
| | 3/2004 - 2/2005 | Teilzeittätigkeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Tübingen |

Tübingen, im November 2005