

Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Vergleich zweier isothermaler Amplifikationsassays mit anderen
molekularbiologischen Methoden und Toxigener Kultur für die
Labordiagnose von *Clostridium difficile*-Infektionen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Martina Neuendorf

(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Decking

Erstgutachter: Prof. Dr. MacKenzie

Zweitgutachter: PD Dr. Laws

gewidmet meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Martina Neuendorf, Raquel Guadarrama-Gonzalez, Birgit Lamik and Colin R. MacKenzie, (2016), A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *BMC Microbiology*, (16:19)
DOI: 10.1186/s12866-016-0635-5

Zusammenfassung

Die Inzidenz von *Clostridium difficile* Infektionen (CDI) steigt seit einigen Jahren Deutschland- und Europaweit und hat nicht zu unterschätzenden Einfluss auf Mortalität und Morbidität der Krankenhauspatienten. Warum die CDI-Inzidenz steigt, welche Patienten eine rezidivierende Erkrankung bekommen und welche Patienten eine spezifische Therapie brauchen ist nicht ganz aufgeklärt. In jedem Fall sollte die Diagnosestellung schnellst möglichst erfolgen um infizierte Patienten bestmöglichst therapieren zu können und weiterer Transmission vorzubeugen.

Bei klinischem Verdacht auf *C. difficile* war die Diagnostik bis vor Kurzem mit der Toxigenen Kultur (TC) sehr zeitaufwendig. Nach Eintreffen der Probe musste zunächst eine Kultur ausgestrichen und 48 h bebrütet werden, um danach einen Zytotoxizitätstest aus der Kultur zu generieren. Bei schwerer klinischer Symptomatik wurde ein Patient daher schon therapiert bevor die Kultur fertig bebrütet war. Die Frage kam auf nach einem Test, der nicht zeitaufwendig, trotzdem sensitiv und zudem bezahlbar ist. Verschiedene Testmethoden und -algorithmen wurden daraufhin weltweit analysiert.

Durch Erstellen einer großen Studie mit 989 Proben haben wir den Nutzen von Isothermalen Amplifikationsassays (IAA) im Vergleich zu Toxigener Kultur und *Real-Time* PCR evaluiert und sind zu folgendem Schluss gekommen: Für Krankenhäuser mit großen Laboratorien und hohem Probenaufkommen finden IAAs Anwendung als Bestätigungstest im Rahmen eines diagnostischen mehrstufigen Algorithmus. Für Kleinkrankenhäuser, die nicht viel Geld in große Geräte für Screening Methoden investieren, eignen sich IAAs in wirtschaftlichem wie auch in diagnostischem Sinne auch als *stand-alone* Tests: Sie sind sensitiv, spezifisch, und liefern innerhalb von 60-90 Minuten ein Ergebnis. Allerdings muss das Ergebnis immer kritisch im klinischen Kontext betrachtet und evaluiert werden, da asymptomatische Clostridien-Träger im IAA ein positives Testergebnis erzielen können.

Aus diesem Grund sollten mit IAAs keine prophylaktischen Testungen asymptomatischer Patienten durchgeführt werden und mögliche andere Durchfallgenesen zuvor immer in Betracht gezogen und abgeklärt werden.

Abkürzungen

CCNA	Cell Cytotoxicity Neutralization Assay
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> associated disease
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
cdtA, cdtB	Binärtoxine
EIA	Enzyme Immuno Assay
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
HDA	Helicase Dependent Amplification
IAA	Isothermal Amplification Assay
LAMP	Loop mediated isothermal Amplification
LOD	Level of Detection
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
NaCl	Natriumchlorid
NPV	Negative Predictive Value
PaLoc	Pathogenicity Locus
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	Positive Predictive Value
qPCR	Quantitative PCR
<i>slpA</i>	Surface-layer protein A
TC	Toxigenic Culture
tcdA	Toxin A
tcdB	Toxin B

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Biologie, Pathogenese und Krankheitsbild von <i>Clostridium difficile</i>	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Pathogenese.....	2
1.1.3	Toxinbildung/-wirkung.....	3
1.1.4	Krankheitsbild.....	4
1.1.5	Rezidive.....	4
1.2	Diagnostik.....	5
1.2.1	Kultur.....	5
1.2.2	Zytotoxizitätstest/ Cell Cytotoxicity Neutralization Assay (CCNA).....	5
1.2.3	Alter Goldstandard: Toxigene Kultur.....	6
1.2.4	EIA = Enzyme Immunoassay.....	6
1.2.5	<i>C. difficile</i> -Glutamatdehydrogenase EIA.....	7
1.2.6	<i>Real-Time</i> PCR.....	7
1.2.7	Isothermale Amplifikationsteste.....	8
1.2.8	Aktuelles Testprinzip.....	8
1.3	Therapie.....	9
1.3.1	Nicht-medikamentöse Therapie.....	9
1.3.1.1	Flüssigkeitsmanagement.....	9
1.3.1.2	Absetzen von Antibiotika.....	10
1.3.2	Medikamentöse Therapie.....	10
1.3.3	Stuhltransplantation: Fecal microbiota transplant.....	11
1.3.4	Chirurgische Therapie.....	11
2	Fragestellung und Zielsetzung.....	11
3	Publikation.....	13
4	Diskussion.....	19
5	Schlussfolgerungen.....	26
6	Quellen- und Literaturverzeichnis.....	27

1 Einleitung

1.1 Biologie, Pathogenese und Krankheitsbild von *Clostridium difficile*

Stamm: *Firmicutes*

Klasse: *Clostridia*

Ordnung: *Clostridiales*

Familie: *Clostridiaceae*

Clostridium difficile ist ein Gram-positives, sporenbildendes, anaerobes Bakterium und einer der häufigsten Ursachen von Durchfall bei Patienten im Krankenhaus in Europa. *Clostridium difficile* Infektion (CDI) tritt oft erst nach Antibiotika Einnahme auf und das klinische Bild reicht von leichten Diarrhöen und Bauchschmerzen bis zu pseudomembranöser Kolitis, toxischem Megakolon und dem Tod. CDI hat enorm zugenommen in Bedeutung in den letzten Jahren und trägt nennenswert zu einer Verlängerung der Krankenhausaufenthalt und dadurch auch zu Morbidität und Mortalität bei.

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Insbesondere der virulente Ribotyp 027 hat sich weltweit massiv vervielfältigt [1], und in Europa haben sich neben Ribotyp 027 auch die Ribotypen 001 und 078 etabliert [2, 3].

Obwohl *C. difficile* ein obligat anaerobes Bakterium ist findet die Transmission mittels umweltresistenter Sporen sehr leicht statt. Diese Sporen sind ubiquitär in Sand, Heu, Boden, Flüssen, Nahrung, am Bettgestell und auf dem Krankenhausboden zu finden [4] und sind sogar gegen alkoholische

Desinfektionsmittel und Hitze resistent [5, 6]. Die Transmission erfolgt meist als Kontaktübertragung (z. B. Händeschütteln), weniger häufig fäkal-oral und selten als Tröpfchen-Infektion oder über die Nahrung [7].

Nach erfolgter Transmission entwickeln nicht alle Patienten eine symptomatische Infektion. Die Gefahr bei einer asymptomatischen Besiedlung besteht jedoch in einer weiteren Transmission auf andere Patienten [8]. Hierbei ist bislang jedoch unklar, ob und welche Patienten in der Folge CDI entwickeln können. Risikofaktoren für die Infektion mit asymptomatischem *C. difficile* sind - ähnlich wie für die symptomatische CDI - vorausgegangene stationäre Behandlung oder Arbeit im Krankenhaus, Kortikosteroid-Behandlung, vorausgegangene CDI, Antibiotika Einnahme und Gebrauch von Protonenpumpeninhibitoren [8].

Bei Neugeborenen beträgt die *C. difficile* Inzidenz 30-80% [8-10]. Fast alle Neugeborenen sind asymptomatische Träger, weil sie noch keine Rezeptoren besitzen, an die die Clostridien-Toxine binden können, und somit auch keine Toxin-induzierte Erkrankung bekommen können [11].

Risikofaktoren eine rekurrende symptomatische CDI zu entwickeln sind nach Debast et al. unter anderem höheres Alter (≥ 65 Jahre), langwierige Antibiotika-Einnahme (insbesondere 2. und 3. Generation Cephalosporine, Fluorchinolone und Clindamycin), schwerwiegende Grunderkrankungen und/oder Niereninsuffizienz, vorausgegangene CDI und Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren [2].

1.1.2 Pathogenese

Unter physiologischen Bedingungen existiert im Darm unter den Bakterien ein ausgewogenes Gleichgewicht. Im Falle einer Infektion mit *C. difficile*-Sporen entsteht beim gesunden Menschen meist keine symptomatische Krankheit, weil die Bakterien durch Interaktion mit den anderen Keimen der Darmflora nicht so stark vermehren können und in der Folge auch die Möglichkeit zur Toxin-Produktion nicht besteht [12].

Wird die physiologische mikrobielle Darmflora zerstört - wie z.B. unter längerer Antibiotika-Einnahme oder anderen schädigenden Agentien - kann *C. difficile* in die Darm Mucosa eindringen, sich massiv vermehren und Toxine produzieren, sodass eine symptomatische Erkrankung resultiert [13].

1.1.3 Toxin-Bildung

Neben Virulenzfaktoren wie Adhäsinen, Fimbrien, Flagellen etc. bildet *C. difficile* zwei Toxine, die die Virulenz der Bakterien determinieren: Toxin A und Toxin B (tcdA und tcdB). Beide Toxine sind zusammen mit weiteren regulatorischen Proteinen wie tcdC oder tcdD auf dem 19 kb großen Pathogenitätslokus (PaLoc) des Genoms der *C. difficile* zu finden. Krankheitseffekte wie erhöhte epitheliale Permeabilität, intestinale Flüssigkeitsansammlungen von zum Teil hämorrhagischer Form, Zytokin-Sekretion und *in vivo* abgerundete, teils abgestorbene Zellen werden hauptsächlich durch die Präsenz der beiden Toxine A und B (tcdA und tcdB) erklärt. Dabei galt Toxin A früher als Enterotoxin, während Toxin B vorwiegend als Zytotoxin betrachtet wurde. Diese Theorie wurde in aktuellen Studien widerlegt, in denen unter anderem postuliert wurde, dass Toxin A negative, Toxin B positive Stämme enterotoxische Wirkungen zeigen können, und Toxin A positive, Toxin B negative Stämme keine wesentlichen Krankheitseffekte hervorrufen müssen [14]. Andere Studien wiederum demonstrieren dass beide Toxine A und B unabhängig voneinander Pathologien verursachen können [15]. Es ist demnach sinnvoll, beide Toxine als eigenständige Virulenz-Faktoren zu betrachten.

Weitere Toxine, die zur Virulenz von *C. difficile* beitragen, sind die beiden binären Toxine cdtA und cdtB. Die binären Toxine sind nicht auf dem PaLoc kodiert. Patienten, die mit cdtA/B-positiven Clostridien-Stämmen befallen sind, zeigen stärkere Diarrhöen, haben öfter Bauchschmerzen und weisen insgesamt eine höhere Letalität auf [16].

1.1.4 Krankheitsbild

Die symptomatische CDI äußert sich in der Mehrzahl der Fälle durch leichte bis mittelstarke, wässrig-breiige, teils schleimige Durchfälle auf, die nicht selten mit Bauchschmerzen verbunden sind. Bei schlechtem Allgemeinzustand, hohem Alter oder hoher Co-Morbidität kann Fieber auftreten und die Erkrankung kann derart zunehmen, dass ein großer, zum Teil hämorrhagischer Flüssigkeitsverlust eintritt. Endoskopisch entwickelt sich typischerweise das Bild einer pseudomembranösen Kolitis. Selten kommt es darüber hinaus zu einem Stuhlverhalt mit toxischem Megakolon, Kolonperforation und Sepsis, die eine hohe Letalität hat [13].

Sobald eine symptomatische *C. difficile* Infektion diagnostiziert wurde sind Hygiene-Maßnahmen angebracht: Betroffene Patienten werden isoliert und bekommen eine eigene Toilette; das Krankenhauspersonal muss im Kontakt mit diesen Patienten geschult sein, persönliche Schutzkleidung (persönliche Schutzausrüstung, PSA) tragen und die Hygienemaßnahmen für infizierte Patienten strikt beachten [2, 7]. Um eine gezielte Therapie einleiten zu können ist es wichtig, innerhalb kurzer Zeit die Detektion von *C. difficile* generieren zu können. Die erste Stufe der Therapie ist, wenn möglich, das Absetzen der CDI verursachenden Antibiotika [2, 17, 18]. Wenn dies nicht möglich ist, muss eine spezifische enterale Antibiotika-Therapie eingeleitet werden.

1.1.5 Rezidive

Auch nach primär erfolgreicher Therapie erleidet ein Teil der Patienten Rezidiv-Infektionen: Bei ambulant erworbener ("*community acquired*") CDI sind ca. 20-30% der Patienten von Rezidiven betroffen, bei nosokomialer ("*hospital acquired*") CDI sind die Rezidivraten ähnlich (ca. 30%) [19-21].

1.2 Diagnostik

Die Detektions-Methoden von *C. difficile* haben sich in den letzten Jahren stark verändert. Der ursprüngliche Goldstandard (Toxigene Kultur) wurde abgelöst durch einen 2-stufigen- bzw. 3-stufigen-Algorithmus, der aus einer Kombination von einem sensitiven Screening Test und einem oder zwei spezifischen Bestätigungstesten besteht [2]. Die Toxigene Kultur benötigt, wie der Name sagt, einen kulturellen Nachweis des Erregers, der sehr zeitaufwendig ist.

1.2.1 Kultur

Vorteilhaft in der kulturellen Diagnostik ist, dass sie einfach und preiswert ist und eine spezifische Methode in der Diagnostik von *C. difficile* darstellt [18]. Als großer Nachteil dieser Methode ist der Zeitaufwand von mindestens 48 h Bebrütungszeit zu sehen, zudem werden anaerobe Kulturbedingungen benötigt.

Laut der Amerikanischen Guidelines entsteht durch den alleinigen kulturellen Nachweis von *C. difficile* kein wirklicher Nutzen, da nur toxische *C. difficile*-Stämme symptomatische Krankheitszustände hervorrufen. Die kulturelle Bebrütung ist als nur im Zusammenhang mit dem Zytotoxizitätstest - als Toxigene Kultur sinnvoll [18].

1.2.2 Zytotoxizitätstest/ *Cell Cytotoxicity Neutralization Assay (CCNA)*

Beim Zytotoxizitätstest wird die spezifische toxische Wirkung eines Stuhl-Überstands auf einer Zellkultur beobachtet. Unter Anwesenheit von Toxin im Stuhl wird ein zytopathischer Effekt sichtbar; die *C. difficile* Toxin-Spezifität wird durch einen neutralisierenden Antikörper bewiesen.

Vorteilhaft an dem CCNA ist seine hohe Spezifität, als nachteilig ist die niedrige Sensitivität zu sehen, da die zusätzliche Anwesenheit von anderen nicht clostridialen Toxinen den Test stören und das Testergebnis fälschlicherweise negativ erscheinen lassen können. PCR und isothermale Amplifikationsteste sind im Vergleich zum CCNA deutlich sensitiver [18].

1.2.3 Alter Goldstandard: Toxigene Kultur

Die Toxigene Kultur stellt eine Kombination aus Kultur und Toxin-Test dar: Nach Anzüchten der Kultur wird der Zytotoxizitätstest (oder anderer Nachweis von Toxin, z.B. EIA) nicht aus dem nativen Stuhl gemacht, sondern aus der Kultur. Diese Methode hat sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität [18], allerdings ist auch hier die lange Testdauer von Nachteil, da der CCNA erst nach Anzüchten der Kultur (48h) durchgeführt werden kann.

1.2.4 Enzyme Immunoassay (EIA)

Der EIA ist ein enzymatisches Immunabsorptionsverfahren, bei dem mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen eine Antikörperbindung im Immunassay dargestellt wird. Es ist ein relativ spezifisches Verfahren zum Nachweis von Antigenen, mit dem sowohl die *C. difficile*-spezifische Glutamatdehydrogenase (GDH) als auch spezifische *C. difficile*-Toxine (tcdA oder tcdB) nachweisen kann. Als Vorteil sind die schnelle Durchführbarkeit, die Kostengünstigkeit und die hohe Sensitivität zu nennen. Die Spezifität ist stark von dem nachzuweisenden Antigen abhängig: Der GDH-EIA ist nicht sehr spezifisch, da durch die GDH anderer Erreger, die kreuz-reagierende Epitopen haben, der Test falsch positiv ausfallen kann. Diese Konstellation ist zwar nicht sehr häufig, kommt aber gelegentlich vor. Der Toxin EIA, in dem auf tcdA oder tcdB getestet wird, ist hingegen deutlich spezifischer. Nachteilhaft ist auch hier, dass auch der Toxin EIA nicht so spezifisch ist wie ein NAAT [18].

1.2.5 *C. difficile*-Glutamatdehydrogenase EIA

Die Glutamatdehydrogenase (GDH) ist ein Enzym, das in relativ großer Menge in den meisten Bakterien vorkommt, und hat Antigen-Eigenschaften, die Spezies-spezifisch sind. Damit kann die GDH gut für die Detektion von *C. difficile* verwendet werden. Der GDH EIA ist kostengünstig, schnell durchführbar, weist eine hohe Sensitivität und - aufgrund der bestehenden Antigen-Kreuzreaktivität mit anderen GDH - eine niedrige Spezifität auf. Daher eignet sich der GDH EIA hervorragend als Screening Test [2, 18]. Ein Test mit hoher Sensitivität aber niedriger Spezifität reicht als diagnostischer „stand-alone“ Test nicht aus, weshalb der GDH EIA als erster Schritt von einem 2- oder 3-Stufen Algorithmus verwendet wird. Im Anschluss folgen ein oder zwei Bestätigungsteste mit höherer Spezifität, wie ein spezifischer *C. difficile* Toxin-EIA und/oder ein NAAT. Der Vorteil an diesem mehr-stufigen Algorithmus liegt darin, dass die vielen *C. difficile*-negativen Proben schnell und günstig mit dem GDH EIA aussortiert werden können, da das Verfahren einen sehr hohen negativen prädiktiven Wert (NPV) hat.

1.2.6 *Real-Time* PCR

Die *Real-Time* PCR ist eine Methode, die durch Polymerase Kettenreaktion Vervielfältigung einer bestimmten DNA Region generiert, und gleichzeitig eine Quantifizierung der DNA durch Fluoreszenzsignale ermöglicht.

Durch diese Methode wird ein sehr sensitiver und spezifischer Nachweis von *C. difficile* generiert [22], die *Real-Time* PCR ist schnell durchführbar und es können mehrere hundert Proben gleichzeitig getestet werden. Nachteilig bei diesem Verfahren sind die hohen Kosten.

1.2.7 Isothermale Amplifikationsteste

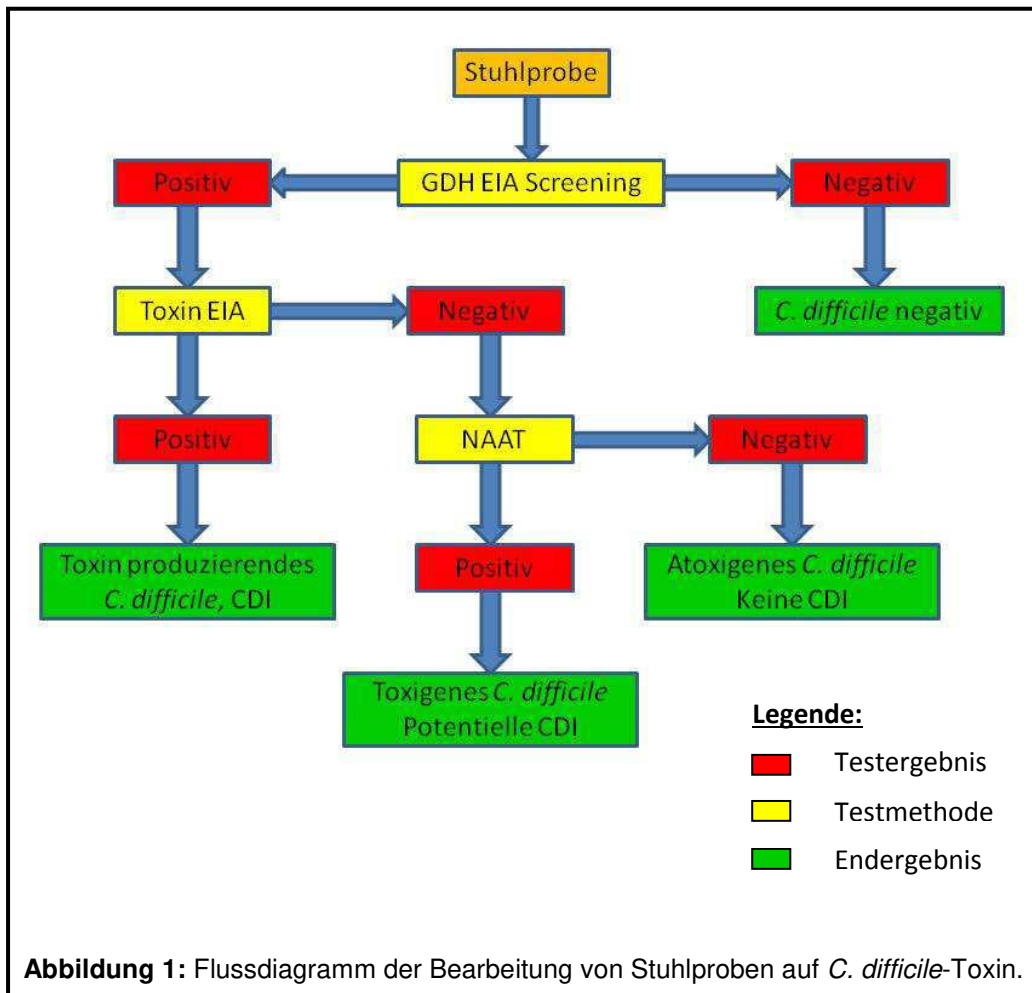
Das Prinzip isothermaler Amplifikation basiert auf der Polymerasen Kettenreaktion (PCR), also auf der Vervielfältigung von DNA-Stücken. Grundlegend unterschiedlich sind die Temperatur, die bei isothermaler Amplifikation gleichbleibend (=isothermal) ist, wohingegen bei der klassischen PCR ein Thermocycler verwendet wird, und die DNA-Polymerase, die in der isothermalen Amplifikation strangversetzend arbeitet, in der PCR thermostabil ist. Es erfolgt ein schneller, sensitiver und relativ spezifischer Nachweis von *C. difficile* [23].

Das Illumigene® Assay ist ein qualitativer *in-vitro*-Amplifikationstest, bei dem nach der DNA-Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)-Technik ein Fragment des Toxin A-Gens auf dem Pathogenitätslocus nachgewiesen wird. Im Detail findet bei der LAMP mithilfe einer strangversetzenden DNA Polymerase eine massive DNA Vervielfältigung statt, bei der als Nebenprodukt Pyrophosphat entsteht. Zusammen mit Mangan und Fluorexon wird das Pyrophosphat durch Fluoreszenz nachgewiesen [24]. Der isothermale Amplifikationstest von AmpliVue® funktioniert nach dem Prinzip der Helicase-abhängigen Amplifikation (HDA), mit der ein Fragment des Toxin A-Gens nachgewiesen wird. Die Helicase spaltet Doppelstrang-DNA ohne dass ein Thermocycler benötigt wird und ermöglicht somit das Anbinden von Primern zur DNA Vervielfältigung [25].

1.2.8 Aktuelles Testprinzip

Die aktuelle diagnostische Empfehlung ist ein 2- oder 3-stufiger Algorithmus bestehend aus einem primären hoch sensitiven kostengünstigen Screening Test (z.B. GDH-EIA) im ersten Schritt und, falls der Screening Test positiv ist, einem Toxin-spezifischen Test mit hoher Spezifität im nächsten Schritt (z.B. ein Toxin A EIA oder ein NAAT) [2, 18]. Ist der Toxin-spezifische Test auch positiv, wird die Probe als positiv bewertet; ist er negativ, kann je nach Qualität des

Bestätigungstest ein weiterer spezifischer Test hinzugezogen werden: Beispielsweise kann nach einem negativen Toxin A EIA im Anschluss noch ein NAAT durchgeführt werden; ist der NAAT positiv, wird auch das Endergebnis als positiv interpretiert, das heißt es liegt ein toxischer Clostridien Stamm vor [2].



1.3 Therapie

1.3.1 Nicht-medikamentöse Therapie

1.3.1.1 Flüssigkeitsmanagement

Patienten, die unter schweren Durchfällen leiden und massiv Flüssigkeit verlieren, erhalten intravenöse Flüssigkeitssubstitution und werden per Protokoll bilanziert, um nicht einen exsikkierten Zustand zu erlangen.

1.3.1.2 Absetzen von Antibiotika

Antibiotika bewirken nicht nur ein Abtöten von Bakterien im Zielbereich sondern auch an vielen anderen Orten; in erster Linie sind auch die Bakterien des Gastrointestinaltrakts betroffen und somit wird das physiologische Gleichgewicht der Darmflora zerstört. Durch Absetzen entsprechender Antibiotika haben die gastrointestinalen Bakterien die Möglichkeit, sich wieder zu vermehren, ein physiologisches Gleichgewicht zu erreichen und die sich vermehrenden, toxinproduzierenden Clostridien einzudämmen [2, 17, 18].

1.3.2 Medikamentöse Therapie

Die gängige antibiotische Therapie für eine symptomatische *C. difficile* Infektion ist orales Metronidazol oder Vancomycin. Beide Antibiotika sind effektiv und bewirken in der Mehrzahl der Fälle eine zeitnahe Reduktion klinischer Symptome. Metronidazol hat den Vorteil dass es sehr kostengünstig ist, wohingegen Vancomycin, das inzwischen auch preisgünstig zu erhalten ist, bei einem kleinen Anteil von Krankheitsfällen bessere Wirkung gezeigt hat als Metronidazol [2]. Bei milder klinischen Symptomatik wird daher die Gabe von Metronidazol empfohlen, in schwereren Fällen wird mit Vancomycin therapiert [2]. Trotz initial erfolgreicher Therapie erleiden etwa 30% der medikamentös therapierten Patienten ein Rezidiv. Aktuelle Studien zufolge kann durch eine Therapie mit Fidaxomicin die Rezidivquote im Vergleich zu einer Therapie mit Metronidazol und Vancomycin signifikant gesenkt werden [17, 19]. Der initiale Therapieerfolg ist bei Fidaxomicin ähnlich hoch wie bei Therapie unter Vancomycin [17].

1.3.3 Stuhltransplantation: *Fecal microbiota transplant*

In der Mehrzahl der symptomatischen *C. difficile* Infektionen ist davon auszugehen, dass sich die gastrointestinale mikrobakterielle Flora in einem pathologischen Zustand befindet, weshalb die Clostridien sich vermehren können. Unter gezielter Einnahme von Antibiotika bessern sich die Symptome meistens, es kommt allerdings oft zu Rezidiven. Der Versuch, mit einer Stuhltransplantation die physiologische gastrointestinale mikrobielle Flora wiederherzustellen, zeigte großen Erfolg. Nicht nur die aktuellen klinischen Symptome werden gebessert, auch die Rezidivquote verringert sich [26]. Die Stuhltransplantation kommt bisher nur selten bei hoher Rezidivquote zum Einsatz.

1.3.4 Chirurgische Therapie

Im Falle eines toxischen Megakolons oder einer Kolonperforation steht die chirurgische Therapie als Ultima Ratio und lebensrettende Maßnahme.

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, durch eine groß angelegte Studie den Nutzen von isothermalen Amplifikationstesten in der *C. difficile* Diagnostik zu evaluieren. Dazu wurde unter anderem analysiert, wie sensitiv und spezifisch IAAs im Vergleich zur Toxigenen Kultur (Alter Goldstandard), zum Zytotoxizitätstest und zur *Real-Time* PCR sind.

Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob und in welchem Rahmen IAAs in Routine-Laboratorien etablierbar sind und welchen wirtschaftlichen Nutzen sie

für Krankenhäuser haben. Dabei wurden sowohl Krankenhäuser der Maximalversorgung mit einem hohen täglichen Probendurchlauf als auch kleinere Häuser mit eher niedrigem Probenaufkommen berücksichtigt. Weiterhin wurde evaluiert ob sich IAAs diagnostisch als *stand-alone* Tests eignen, und welche Krankenhäuser davon profitieren würden. Es wurde die Möglichkeit diskutiert, IAAs in einem schnell arbeitenden diagnostischen mehrstufigen Algorithmus zu etablieren. Verschiedene Testkombinationen wurden analysiert und sowohl der Nutzen IAAs als primärer Test eines mehrstufigen Verfahrens, als auch als finaler Bestätigungstest in Betracht gezogen und kritisch hinterfragt.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection

Martina Neuendorf, Raquel Guadarrama-Gonzalez, Birgit Lamik and Colin R. MacKenzie* 

Abstract

Background: New molecular methods of detecting *Clostridium difficile* infection (CDI) provide the routine lab with a sensitive random access method to produce results that are available in a shorter time than traditional methods.

Methods: In this prospective study a total of 989 stool specimens were tested over a period of 16 months in parallel using two isothermal amplification assays, AmpliVue® (Quidel) and Illumigene® (Meridian) and the results compared to those from toxigenic culture. In addition all specimens were tested using a cytotoxic cell neutralisation assay (CCNA) and three different Real-time PCR targeting a *C. difficile*-specific 16S rDNA sequence or the toxin genes *tcdA*, *tcdB*/*tcdB027* or *cdtB*.

Results: AmpliVue® was positive in 242 (24.5 %) and Illumigene® in 228 (23.1 %) specimens. 167 (16.9 %) specimens were positive in toxigenic culture. Real-time-*tcdA* and -*tcdB* PCR was positive in 211 (21.3 %) specimens, Real-time-*cdtB* PCR was positive in 101 (10.2 %) specimens and *C. difficile*-PCR (16S rDNA) in 267 (27.0 %) specimens.

Conclusions: The respective sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value compared to toxigenic culture were 91, 89, 62 and 98 % for AmpliVue® and 91, 91, 67 and 98 % for Illumigene®.

Keywords: *Clostridium difficile*, Molecular diagnosis, Isothermal amplification, Real-time PCR, CDI

Background

Clostridium difficile infection (CDI) is the leading cause of health-care associated diarrhoea most frequently associated with antecedent antibiotic therapy. The incidence of CDI in Europe is rising steadily and has considerable influence on patient morbidity and mortality [1]. The clinical presentation varies widely from mild, watery diarrhoea to pseudomembranous colitis, toxic megacolon and sepsis [2] and in addition recurrent CDI has become a major problem possibly related to binary toxins as virulence factors [3, 4].

Rapid diagnosis forms a cornerstone for patient management and early isolation, and adequate (antibiotic) therapy of infected patients may reduce transmission and disease

severity [5, 6]. The laboratory detection of *Clostridium difficile* is increasingly focused on toxin detection as routine toxigenic culture has a long turnaround time [7]. A *C. difficile*-specific glutamate dehydrogenase antigen detection assay can be used as a sensitive screening test but has a low specificity and thus requires confirmation, usually by detection of one or both toxin genes [8] or antigen detection using an EIA, which has a low sensitivity. Isothermal amplification assays are easy to use, have low hands on and turnaround times and are highly sensitive [9–12]. European and American guidelines have recommended a two-step testing algorithm for the laboratory diagnosis of CDI consisting of a sensitive antigen test followed by a more specific confirmatory test [13, 14] although more recent guidelines have recommended the use of NAATs as stand-alone tests [15]. Due to insufficient data isothermal amplification assays

* Correspondence: colin.mackenzie@hhu.de
Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University Hospital, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany

have not generally been included in the recommendations concerning NAAT [15]. A recent meta-analysis of published data for loop-mediated isothermal amplification shows the accuracy of this type of isothermal amplification method [9]. The optimal combination of tests is largely dependent on the local conditions and resources. In this large prospective study we compared the performance of two different isothermal amplification assays (AmpliVue®, helicase dependant amplification and Illumigene®, loop-mediated isothermal amplification) with toxigenic culture and additionally with an in-house Real-time PCR and cytotoxic cell neutralisation assay in a routine diagnostic laboratory setting.

Methods

From January 2013 to April 2014 consecutive liquid stool specimens received by the laboratory with a request for *C. difficile*-toxin assay from hospital wards and out-patient departments of three tertiary care hospitals were included in the study and fully evaluated. The persons performing the tests were blinded to the results of the other tests. The study was approved by the ethics committee of the medical faculty of the Heinrich-Heine University of Düsseldorf. Specimens were tested by two commercial isothermal amplification assays, toxigenic culture (TC), cytotoxic cell neutralisation assay (CCNA) and by Real-time PCR (Real-time-*tcd* PCR) targeting gene sequences for toxin A, B, and B027 (a sequence incorporating a mutation found in the *tcdB* gene in ribo-type 027 strains), binary toxin B (Real-time-*cdtB* PCR) and a *C. difficile*-specific 16S fragment (Real-time-16S PCR). In previous work we found no *C. difficile* strains with discordant *cdtA* and *cdtB* results and thus the *cdtB* gene was used as a marker for the presence of both binary toxin genes (unpublished data). Sequencing of the *slpA* gene was performed on all available *C. difficile* isolates. The reference method was toxigenic culture.

All specimens were tested according to the manufacturers' instructions within 48 h after delivery to the laboratory. If necessary the specimens were stored at 4 °C until testing was performed. In brief, the Illumigene® assay employs loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) to detect a gene segment of the *tcdA* gene in the pathogenicity locus (PaLoc) present in all known toxigenic *C. difficile* strains. The AmpliVue® assay utilizes helicase-dependant amplification (HDA) for the detection of a conserved sequence of the *tcdA* gene. Positive and negative controls for both assays were provided by the manufacturers and were performed weekly. All stool specimens were cultured for *C. difficile* by inoculating a portion of the stool sample onto *Clostridium difficile* selective agar (bioMérieux, Germany) and incubating under anaerobic conditions for 48 h. Growth of colonies suspected to be *C. difficile* were identified by MALDI-ToF (Vitek® MS,

bioMérieux, Germany). *C. difficile* isolates were stored in glycerine stocks at -80 °C and re-cultured on blood agar for *slpA* sequencing.

CCNA was performed by re-suspending approximately 100 µl of fresh stool in 500 µl normal saline and centrifuging at 850 g for 1 min. Thereafter the supernatant was passed through a 0.2 µm filter and 50 µL of two dilutions, 1:5 and 1:50 in sterile normal saline, added in duplicate to four wells containing a monolayer of BGM (Buffalo Green Monkey) cells (Sigma-Aldrich, Munich). To one well of each dilution polyclonal anti-toxin antibody was added (Techlab, Blacksberg, USA). A cytopathic effect only in the well without anti-toxin was interpreted as a positive result. Toxigenic culture was performed by adding *C. difficile* culture supernatant to the CCNA instead of stool and results were interpreted in a similar procedure.

DNA extraction from stool specimens was performed by mixing approximately 10 µl of the stool specimen in 500 µl PBS and centrifuging at 850 g for 1 min. A 200 µl aliquot of the supernatant was extracted using the DNA tissue kit and EZ1 BioRobot (Qiagen, Germany) and eluted in 100 µl. The eluates were kept at -20 °C until tested.

For *slpA* sequencing 2.5 µl DNA eluate was added to 1 µl Peqgold Hot-Start mastermix (Peqlab, Erlangen), 20.5 µl distilled water and 1 µl (3 µM) primers *slpA* 19 and *slpA* 22 (Table 1). The PCR was performed on an Eppendorf Mastercycler pro thermocycler (Wesseling-Berzdorf, Germany) as follows: 95 °C for 5 min and subsequently 35 cycles comprising 95 °C for 20 s and 55 °C for 180 s, then incubation at 74 °C for 30 s. A final step at 74 °C for 5 min completed the PCR. The amplified DNA was sequenced by the Sanger method in the university molecular biology core facility (BMFZ, Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum).

For all Real-time PCRs the mastermix per specimen was composed of 12.5 µl Qiagen Mastermix and 2.5 µl (3 µM) each of forward and reverse primers (Table 1), 2.5 µl probe and 2.5 µl H₂O. 2.5 µl from the DNA-eluate were added to the mastermix and heated at 50 °C for 10 min and then 95 °C for 10 min and thereafter placed in a thermocycler (BioRad, München) for 44 cycles comprising 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s.

The sequences for the primers and probes for the Real-time PCR and *slpA* analysis are shown in Table 1.

Results

A total of 989 stool specimens from 828 patients were included in the study. The number of positive specimens in toxigenic culture was 167 (17 %). The AmpliVue® assay was positive in 242 (25 %) specimens and Illumigene® assay in 228 (23 %) specimens. Real-time-*tcd* PCR was positive in 211 (21 %) specimens (of these 79 (8 %) were

Table 1 Primers and probes

Gene	Primers/Probes	PCR-product (bp)	Acc-number	Gene region (bp)
tcdA	tcdA F: 5'-ATTCCAATACAAGYCCTGTAGAAAA-3' tcdA R: 5'-TTTATGTATTCAAGARCAATATCACTGACT-3' tcdA-S: 5'-Fam-RATTACATTTTGTATGGATAGGTGGAG-BHQ-1-3'	85	AM180355	796102–796186
tcdB	tcdBF: 5'-AACAGGTGATTTAGTACAGAAGATGGATT-3' tcdBR: 5'-AATTGCTTCTCCTTCTAGGTTTTTCAT-3' tcdB-S: 5'-Hex-AAATATTTTGCCCCAGCTAATACACTT-BHQ-1-3'	85	AM180355	793077–793161
tcdB027 ^a	tcdBF: 5'-AACAGGTGATTTAGTACAGAAGATGGATT-3' 027tcdBR*: 5'-AATTGCTT CCCC TCTAGATTTTCAT-3' 027tcdB-S: 5'-Hex-AAATATTTG CTCCAGCAG ATACACTT-BHQ-1-3'	85	FN665654	708928–709012
16S	CdF: 5'-TGTACACACGGATAACATACCGAAA-3' CdR: 5'-CCGTTACCTTACCAACTAGCTAATCA-3' CdS5'-Fam-CATCTCTTGAATATCAAGGTGAGCCAGTACAGG-BHQ-1-3'	131	AM180355	125189–125289
cdtB	cdtBfor: 5'GATGATCCATTTATCCCAAATAACAA-3' cdtBrev: 5'GTCCTTAATAGTATATCCATTTTCGTTTCATATG-3' cdtBS: 5'Hex-TTCTTTGACCCAAAGTTGATGCTGATTGGG-BHQ-1-3'	132	FN665654	2833044–2833175
slpA (Kato et al. 2004)	slpAcom22: 5'-GCWGYTCTATTCTATCDTYWCC-3' slpAcom19: 5'-GTTGGGAGGAATTTAAGRAATG-3'	23 22	AM180355	3253526–3254737

^aBolded bases represent a difference from the standard *tcdB* primer or probe

positive for the *tcdB027* gene) and *C. difficile*-16S-PCR was positive in 267 (27 %) specimens.

Isothermal amplification assay results discrepant to toxigenic culture are shown in Tables 2 and 3. A total of 90 (9 %) specimens tested with AmpliVue[®] and 75 (8 %) specimens tested with Illumigene[®] were positive by isothermal amplification but negative in the toxigenic culture (i. e. false positive). Sixty three of these specimens were positive in both isothermal amplification methods. On the other hand 15 (2 %) specimens tested with AmpliVue[®] and 14 (1 %) specimens tested with Illumigene[®] were negative in isothermal amplification but positive in the toxigenic culture (i. e. false negative). Of these 12 specimens were negative in both isothermal amplification assays. *C. difficile* strains in which no toxin production was detected in bacterial culture supernatants were classified non-toxigenic strains. 20 of 34 stool specimens containing non-toxigenic strains were positive in the AmpliVue[®] assay and 19 strains were positive in the Illumigene[®] assay. The respective sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the isothermal amplification assays compared to toxigenic culture were 91, 89, 62 and 98 % for AmpliVue[®] and 91, 91, 67 and 98 % for Illumigene[®]. The sensitivity, specificity, PPV and NPV for Real-time *tcd* PCR compared to toxigenic culture were 91, 93, 73 and 98 % respectively.

For general epidemiological purposes and to determine if there was any correlation between strain type and the results of isothermal amplification or toxigenic culture all cultures were typed by *slpA*-sequencing. Of the *C.*

difficile strains 171 were typable by *slpA* sequencing the distribution of which is shown in Fig. 1. Three *slpA* types made up the majority (69 %) of the strains: the most common *slpA* type was gc8 (63 specimens, 37 %) (associated with ribotype 027 [16]); followed by gr (29

Table 2 Discrepant results for isothermal amplification: false positive specimens

N	AmpliVue [®]	Illumigene [®]	Culture	TC	Real-time- <i>tcd</i> PCR	16S PCR
17	+	+	+	-	+	+
1	+	+	+	-	-	+
30	+	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	-	+
11	+	+	-	-	-	-
1	+	-	+	-	-	+
1	+	-	-	-	+	+
3	+	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	-	-
1	-	+	+	-	+	+
2	-	+	-	-	+	+
8	-	+	-	-	-	-
1	+	invalid	+	-	+	+
1	+	invalid	-	-	-	+
1	+	invalid	-	-	+	+
1	+	invalid	-	-	-	-
1	Invalid	+	-	-	-	-

TC, toxigenic culture

Table 3 Discrepant data for isothermal amplification: false negative specimens

N	AmpliVue®	Illumigene®	TC	Real-time- <i>tcd</i> PCR	Real-time 16S PCR
1	-	-	+	+	+
2	-	-	+	-	+
9	-	-	+	-	-
2	-	+	+	-	+
1	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+

TC, toxigenic culture

specimens, 17 %; 27 of which were gr-01 and 2 were gr-04) and hr (25 specimens, 15 %; 19 of which were hr-01, 4 were hr-02, 1 was hr-05 and 1 was hr-06). 8 (5 %) specimens were typed as 078-01 or kr03. All other *slpA* types were represented by less than 8 specimens each. 14 specimens of the 171 specimens analysed by *slpA* sequencing were atoxigenic as they were neither positive in TC nor in Real-time-*tcd* PCR. Atoxigenic *slpA* types were xr and 078 (3 specimens each) and one strain each was nc, cr, ac, fr. Of the 79 specimens positive in the *tcdB027* Real-time PCR 61 specimens were available for *slpA*-typing. 57 (93 %) of these specimens were type gc8 and of 63 gc8 types 57 (90 %) were *tcdB027*-positive.

The binary toxin gene (*cdtB*-PCR) was detected in 87 specimens. A correlation between Real-time *tcdB027* PCR and *cdtB* PCR positivity was high (70 of the 87 binary toxin positive specimens (80 %) were Real-time-*tcdB027* PCR positive).

Discussion

To our knowledge this is the largest reported study comparing the isothermal amplification assays from AmpliVue® and Illumigene® with a Real-time PCR in reference to toxigenic culture. A study reported by Deak et al. directly comparing the AmpliVue® assay and a Real-time PCR assay by Simplexa® (Simplexa™, Focus Diagnostics) with the

Illumigene® assay in a sample size of 200 found a sensitivity and specificity of 96 % and 100 %. Other recent studies with a lower number of specimens using TC as reference method have also revealed high sensitivities and specificities for AmpliVue® and Illumigene® [10–12, 17, 18].

In general molecular tests have many advantages: They are easy to perform and often associated with high sensitivity and specificity. Nevertheless there are some disadvantages. Firstly, the assays are performed in stool containing a large amount of extraneous DNA which may interfere with the detection [11]. Recent studies however have not shown much cross reactivity [19, 20]. Secondly, the mere presence of toxin genes is not proof of toxin expression. Therefore only patients with an appropriate clinical suspicion of CDI should be tested by the laboratory [11, 21] since the carriage of *C. difficile*, even toxigenic strains, is not necessarily diagnostic of disease or in itself an indication for therapy [22, 23]. In settings with a low prevalence of CDI the low positive predictive value of the isothermal tests as shown in this study may lead to a rather high number of laboratory diagnoses of CDI, in which perhaps another cause for the diarrhoea is present. This is especially important in clinically complicated cases, in which multiple factors may be relevant.

The relatively low PPV in our study compared to that of Hong et al. may possibly be due to a lower sensitivity of the reference method in our study. The number of specimens positive in 16S-PCR (106) that were *C. difficile* culture-negative would support this hypothesis, however the detection of DNA from *C. difficile* alone does not necessarily relate to the presence of viable bacteria and since the CCNA was negative in all these cases it would seem probable that if indeed bacteria were present and viable, they were not producing significant amounts of toxin and therefore not causing CDI. This raises the important question as to the clinical usefulness of such highly sensitive methods to detect CDI and if NAAT methods may in fact not overcall CDI. A contrary view is that since CDI is thought to be essentially underdiagnosed [24, 25], the high sensitivity of isothermal amplification assays may contribute to a better detection of disease.

In 34 (3.4 %) specimens the toxigenic culture was negative despite a positive culture for *C. difficile* indicating non toxin-producing strains. In comparison the Real-time-*tcd* PCR was positive in 56 cases, in which toxigenic culture was negative resulting in a specificity and PPV of 93 and 73 %. According to Buchan et al. false positive results can occur due to the presence of non-viable bacteria or residual DNA or because the isothermal amplification tests have a lower level of detection than toxigenic culture (i. e. true positive). As a control in their study they used another PCR targeting a different region of the *C. difficile* chromosome than that targeted by the isothermal amplification assay, the results of which confirmed the results of the

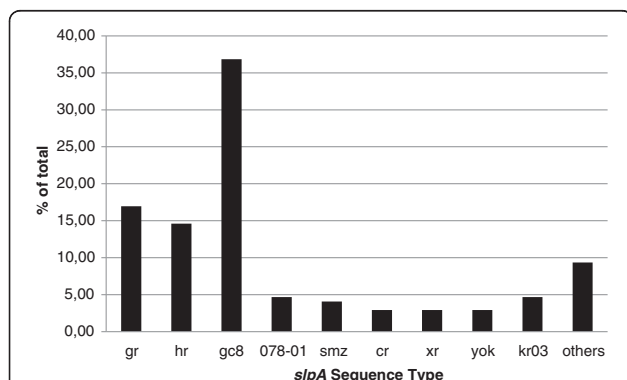


Fig. 1 Prevalence of *slpA* types in the study isolates. All cultures were subjected to typing by determining the *slpA* sequence as described in the methods

latter. This would support the purported higher sensitivity of the isothermal amplification assay [26]. Following this argument the performance of the isothermal amplification assays in terms of true specificity and PPV would be better if the reference method in our study was more sensitive.

In the present study we found only one minor difference between the two isothermal assays: A higher number of invalid results (26 specimens) were obtained using the Illumigene® assay; whereas only 11 specimens were invalid using the AmpliVue® assay. The relatively high number of non-evaluable tests using Illumigene® was due to sample overloading at the beginning of the study period, which improved with experience and in the latter half of the study was negligible. Furthermore Illumigene® invalid results are known to be caused by blood-containing samples [27, 28]. In this study very few patients presented with bloody diarrhoea (data not shown). However we were able to confirm this in 2 macroscopically bloody samples. This would be a disadvantage of the assay for patients with severe CDI and bloody stools unless an additional DNA-purification step is added prior to testing.

To evaluate the practicality of the isothermal amplification assays the number of steps, hands on time and turnaround time were determined. Both are equivalent in terms of practicality in the routine laboratory. Each assay had 6 (Illumigene®) and 7 (AmpliVue®) steps with hands on time for 10 specimens of 14 min (Illumigene®) and 12 min (AmpliVue®) and total turnaround time was 64 and 92 min respectively.

Conclusion

This study contributes data towards the determination of the value of isothermal amplification as a diagnostic tool for CDI. Both isothermal methods are easy to use, deliver reliable results with a rapid turn-around time and have a high sensitivity compared to other molecular methods. A high negative predictive value of 98 % was demonstrated for both assays, which provides a rapid reliable result to clinicians treating patients with suspected CDI and diarrhoea enabling a de-escalation of empiric therapy. For laboratories dealing with a small number of CDI-requests the option of a single step random access diagnostic method in terms of personnel efficiency is probably cost effective. Both tests are useful for the detection of *C. difficile* with up to 10 specimens per run.

Abbreviations

BGM: Buffalo Green Monkey; CDI: *Clostridium difficile* infection; CCNA: cytotoxic cell neutralisation assay; EIA: enzyme immunoassay; HDA: helicase-dependant amplification; LAMP: loop-mediated isothermal DNA amplification; MALDI-ToF: Matrix-assisted-laser desorption/ionisation-time of flight; NAAT: nucleic acid amplification test; PaLoc: pathogenicity locus; TC: toxigenic culture.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the performance of the study or publication of the results.

Authors' contributions

MB performed all experiments, designed the study and wrote the manuscript, RG-G and BL performed some of the molecular assays and CM designed the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Ilona Widera and Dilek Kara, for their excellent technical assistance. This work was performed in collaboration with the ESCMID Study Group on Molecular Diagnostics (ESGMD), Basel, Switzerland.

Received: 21 July 2015 Accepted: 3 February 2016

Published online: 12 February 2016

References

- Smith AM, Wuerth BA, Wiemken TL, Arnold FW. Prevalence of *Clostridium difficile* infection presenting to US EDs. *Am J Emerg Med*. 2015;33(2):238–43.
- Walters PR, Zuckerbraun BS. *Clostridium difficile* infection: clinical challenges and management strategies. *Crit Care Nurse*. 2014;34(4):24–34. quiz 35.
- Stewart DB, Berg A, Hegarty J. Predicting recurrence of *C. difficile* colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(1):118–24. discussion p.124–115.
- Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(6):976–82.
- Hardy K, Manzoor S, Marriott C, Parsons H, Waddington C, Gossain S, et al. Utilizing rapid multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis typing to aid control of hospital-acquired *Clostridium difficile* Infection: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3244–8.
- Bentley AH, Patel NB, Sidorczuk M, Loy P, Fulcher J, Dexter P, et al. Multicentre evaluation of a commercial test for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-mediated antibiotic-associated diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17(11):788–90.
- Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46 Suppl 1:S12–8.
- Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):328–30.
- Lloyd A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DD, Hernandez AV, et al. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;82(1):4–10.
- Deak E, Miller SA, Humphries RM. Comparison of Illumigene, Simplexa, and AmpliVue *Clostridium difficile* molecular assays for diagnosis of *C. difficile* infection. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):960–3.
- Eckert C, Holscher E, Petit A, Lalande V, Barbut F. Molecular test based on isothermal helicase-dependent amplification for detection of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2386–9.
- Norén T, Unemo M, Magnusson C, Eiserman M, Matussek A. Evaluation of the rapid loop-mediated isothermal amplification assay Illumigene for diagnosis of *Clostridium difficile* in an outbreak situation. *APMIS*. 2014; 122(2):155–60.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, Diseases ESocMal. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 2:1–26.
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(5):431–55.
- Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(4):478–98. quiz 499.
- Kato H, Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, et al. Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing of *slpA* and its application to direct typing. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 5):556–62.
- Ylisiurua P, Koskela M, Vainio O, Tuokko H. Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(1):19–25.
- Hong G, Park KS, Ki CS, Lee NY. Evaluation of the illumigene *C. difficile* assay for toxigenic *Clostridium difficile* detection: a prospective study of 302

- consecutive clinical fecal samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;80(3):177–80.
19. Couturier B, Schlaberg R, Konzak C, Nicholes J, Law C, She RC. tcdA As a diagnostic target in a loop-mediated amplification assay for detecting toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(3):171–6.
 20. Kaltsas A, Simon M, Unruh LH, Son C, Wroblewski D, Musser KA, et al. Clinical and laboratory characteristics of *Clostridium difficile* infection in patients with discordant diagnostic test results. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1303–7.
 21. Dubberke ER, Han Z, Bobo L, Hink T, Lawrence B, Copper S, et al. Impact of clinical symptoms on interpretation of diagnostic assays for *Clostridium difficile* infections. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2887–93.
 22. Lubbert C, John E, von Muller L. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(43):723–31.
 23. Gerding DN, Brazier JS. Optimal methods for identifying *Clostridium difficile* infections. *Clin Infect Dis*. 1993;16 Suppl 4:S439–42.
 24. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1208–19.
 25. Barbut F, Rame L, Petit A, Suzon L, de Chevigny A, Eckert C, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea: results of a French prospective multicenter bi-annual point prevalence study. *Presse Med*. 2015;44(4 Pt 1):e75–83.
 26. Buchan BW, Mackey TL, Daly JA, Alger G, Denys GA, Peterson LR, et al. Multicenter clinical evaluation of the portrait toxigenic *C. difficile* assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile* strains in clinical stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3932–6.
 27. McElgunn CJ, Pereira CR, Parham NJ, Smythe JE, Wigglesworth MJ, Smielewska A, et al. A low complexity rapid molecular method for detection of *Clostridium difficile* in stool. *PLoS One*. 2014;9(1):e83808.
 28. Pancholi P, Kelly C, Raczkowski M, Balada-Llasat JM. Detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of the cell culture neutralization, Xpert *C. difficile*, Xpert *C. difficile*/Epi, and Illumigene *C. difficile* assays. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1331–5.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4 Diskussion

Unsere Studie wurde im Februar 2016 in *BMC Microbiology* veröffentlicht. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät geprüft und beurteilt (Studiennummer 4167). Es ist die bisher größte Studie zu isothermalen Amplifikationstesten im Vergleich zu TC, RT-PCR und trägt dazu bei, den Nutzen von isothermalen Amplifikationstesten zu evaluieren.

Unser Probenkollektiv besteht aus insgesamt 989 Proben von der Uniklinik Düsseldorf und zwei weiteren peripheren Krankenhäusern aus dem Umkreis. Das Patientenkollektiv ist zum Großteil schwer krank, multimorbide, und repräsentiert damit Patienten in Krankenhäusern der maximalen Versorgung aber nicht den durchschnittlichen Krankenhauspatienten.

Epidemiologisch ist deutschlandweit sowie weltweit ein starker Anstieg des Ribotyps 027 (RT027) zu vermerken [1]. Nach Arvand et al. beträgt die Rate vom Ribotyp 027 bereits 30% in Hesse in Deutschland 2013 [27]. Von unserem multimorbiden Patientenkollektiv wurden mit der *Real-Time PCR* 79 (37%) RT027 (*tcdB027*) positive Proben detektiert, mit der *slpA* Sequenzierung wurden 63 (ebenfalls 37%) Proben vom Typ *gc8* detektiert, welcher laut Kato et al. eng mit dem Ribotyp 027 korreliert [28]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unser multimorbides Patientenkollektiv geringfügig mehr vom Ribotyp 027 betroffen ist als in der Literatur für diese Zeitspanne in Deutschland beschrieben.

Sensitivität und Spezifität unserer Studie sind ähnlich wie die von anderen Studien [23, 29, 30]; jedoch zeigen sich in aktuellen Studien mit NAAT höhere Werte für den PPV [23, 29-32], was für eine erniedrigte Sensitivität unseres diagnostischen Referenztests (TC) spricht. Jensen et al. führten eine Studie durch, die zeigte, dass *Multitarget PCR Assays* eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Toxigenen Kultur hatten, und dass verlängerte Kulturbegrütungszeit oder eine Re-Kultur die positive TC Rate um 29% erhöhten [33]. Nach dieser Aussage müssten eventuell die Kultivierungs- und Bebrütungsmethoden für TC überarbeitet werden, und unser niedriger PPV hätte keine Relevanz im Hinblick auf isothermale Amplifikationsdiagnostik.

Der ehemalige Goldstandard Toxigene Kultur hat eine hohe Sensitivität und Spezifität; nachteilig ist der Zeitaufwand durch die kulturelle Bebrütungszeit von mindestens 48 h plus anschließenden Zytotoxizitätstest, infolgedessen erkrankte Patienten erst nach mehr als 48 h kohortenisoliert und gezielt behandelt werden konnten. In diesem Zeitfenster kommen gezielte Hygieneanwendungen, wie beispielsweise das gründliche Händewaschen zusätzlich zur Händedesinfektion [34], noch nicht adäquat zur Anwendung.

Zwar werden mit der TC mehr Proben positiv nachgewiesen als mit CCNA, jedoch zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Mortalität. Auch wenn klinische Symptome bei Patienten mit positivem CCNA stärker ausgeprägt sind, sollten auch Patienten mit positiver TC und negativem CCNA gezielt isoliert und therapiert werden, da sie eine mögliche Transmissionsquelle auf andere eventuell immunsupprimierte Patienten darstellen [35].

Mit molekularen Testmethoden wird im Vergleich zur Toxigenen Kultur schnelle Diagnostik betrieben: Bei unseren untersuchten isothermalen Amplifikationsassays werden 10 Proben mit AmpliVue® in 92 Minuten und mit Illumigene® in 64 Minuten analysiert, die *Hands-on-Time* beträgt bei AmpliVue® 12 Minuten und bei Illumigene® 14 Minuten.

Auch mit PCR in Form von *Multitarget Assays (Real-Time PCR)* oder als Taqman-basierte quantitative PCR (qPCR) wird schnellere Diagnostik betrieben als mit der TC. Zudem sind *Multitarget Assays* sensitiver und robuster bezüglich Inhibition im Vergleich zur TC [33]; Die qPCR hat ein niedriges *Level of Detection* (LOD) und den Vorteil, dass atoxigene von toxischen *C. difficile* Typen unterschieden werden können [36].

Durch den frühzeitigen Bescheid eines positiven Ergebnisses können Patienten direkt kohortenisoliert werden, es werden spezielle Hygienestandards etabliert und auslösende Antibiotika werden abgesetzt, bevor weiterer individueller Krankheitsprogress entsteht. Auch die Transmission der Clostridien wird somit vermindert und eventuellem stationären Krankheitsprogress kann vorgebeugt werden.

AmpliVue® und Illumigene® sind im Vergleich untereinander potentiell als gleichwertig anzusehen; bei Illumigene® gab es initial durch Verwendung von zu viel Probenmaterial mehr ungültige Ergebnisse. Dies ließ sich jedoch mit wachsender Routine in der Handhabung mit dem Illumigene®-Set vermeiden. Allerdings waren makroskopisch bluthaltige Proben mit Illumigene® nicht testbar, da diese vom Gerät nicht erkannt wurden. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur beschrieben [37, 38], und wir konnten es im Rahmen unserer Studie anhand zweier makroskopisch bluthaltiger Proben bestätigen. Im Vergleich von Illumigene® mit XPert® *C. difficile* ist das LOD bei Illumigene® niedriger [39].

Aufgrund des Zeitaufwandes von mehr als 48 h bei der Erstellung der Toxigenen Kultur ist diese als Goldstandard in der Diagnostik von *C. difficile* durch sensitive und spezifische EIAs und/oder NAATs abgelöst worden [40]. Isothermale Amplifikationsteste alleine sind für Krankenhäuser der Maximalversorgung mit hohem Probenaufkommen kostenintensiv und im wirtschaftlichen Sinne nicht unbedingt geeignet. Sie haben in großen Laboratorien ihren Stellenwert als sensitiver und spezifischer diagnostischer Bestätigungstest im Rahmen eines diagnostischen 2- oder 3-step Algorithmus; in Krankenhäusern mit kleinerem Patientenkollektiv, bei denen Screening-Tests wie der GDH EIA nicht rentabel sind, sind NAATs auch als *stand-alone* Test kosteneffektiv und wirtschaftlich.

Keiner der Teste in unserer Studie wies Defizite in der Diagnostik spezifischer *stx*A Typen im Raum Düsseldorf auf. Laut einer aktuellen Studie verursacht der Toxin A und B negative, Binär-Toxin positive (tcdA-, tcdB-, cdtB+) Ribotyp 033 allerdings schwere Durchfallssymptomatik, und ist mit den herkömmlichen NAATs, die selektiv die Toxine A bzw B detektieren, schwer bis gar nicht zu diagnostizieren [41]: Sowohl Illumigene® als auch CXpert® konnten den Ribotyp 033 nicht zuverlässig detektieren. Zu AmpliVue® gibt es bislang keine Studien, die sich mit der Detektion vom *C. difficile* Ribotyp 033 auseinandersetzen; man muss aber davon ausgehen, dass auch das AmpliVue® Assay den Ribotyp 033 nicht detektieren kann, da ebenfalls ein Toxin A Fragment nachgewiesen wird.

Auch lag kein relevanter Unterschied in der Diagnostik bezüglich der beiden Toxine A und B in unserer Studie vor; in der *Real-Time* PCR waren entweder beide positiv, oder beide negativ. Es gibt allerdings *C.difficile* Stämme, die Toxin A negativ und Toxin B positiv (tcdA-, tcdB+) sind. Hier läge ein großer Unterschied in der Diagnostik, bezüglich dessen es sich empfehlen würde, Toxin B in die Diagnostik mit einzubeziehen. In London, Dublin und Buenos Aires wurde beispielsweise der Ribotyp 017 isoliert, der Toxin A negativ und Toxin B positiv ist (tcdA-, tcdB+) ist, und zu ähnlich starker klinischer Symptomatik führte wie der weltweit bekannte Ribotyp 027 [42-44]. Es ist fraglich wie weit der Ribotyp 017 sich noch ausbreiten wird und ob mehr Toxin A negative Stämme folgen. In diesem Fall müssten die NAATs erweiterten Ansprüchen Folge leisten und die zu testenden Proben auf mehrere Toxine untersucht werden. In unserer Studie waren alle Toxin-positiven Proben sowohl Toxin A, als auch Toxin B positiv, und auch in der *slpA* Detektion war kein mit dem Ribotyp 017 korrelierender *slpA* Typ zu finden. Für den Raum Düsseldorf wurde auch in der Literatur die Prävalenz des Ribotyp 017 bisher nicht beschrieben, sodass wir davon ausgehen können, dass mit der Toxin A Diagnostik alle Toxin-positiven Stämme erfasst werden können.

In wie weit die Detektion non-toxigener *C. difficile* Stämme wichtig ist und ob sich klinische Krankheitssymptome entwickeln können, ist bisher strittig.

Roy et al. zeigten in einer Studie dass non-toxigene *C. difficile* zwar putative Virulenz-Faktoren aufweisen, aber dass weitere Studien benötigt werden um zu zeigen ob Menschen unter non-toxigenen *C. difficile* Stämmen klinische Symptomatik entwickeln können [45]. Laut Polage et al, sind Infektionen mit Toxin-negativen *C. difficile* größtenteils selbstlimitierend und benötigen keine medikamentöse Behandlung [46, 47]. In Publikationen von Eckert et al. und Androga et al. wird von einer Infektion mit dem Toxin A und B negativem, Binär-Toxin positivem Ribotyp 033 berichtet (tcdA- tcdB- cdtB+), der bei Patienten zu typischer klinischer *C. difficile* Symptomatik (Diarrhö) führte [41, 48]. Allerdings wurde dieser Ribotyp nur sehr selten detektiert weshalb Konsequenzen bezüglich diagnostischer Algorithmen mit zusätzlichem Nachweis von Binär-Toxin bislang ausbleiben.

Mit DNA-Detektionsmethoden werden generell mehr positive Testergebnisse generiert als mit der TC da bei einem positiven DNA-Nachweis nicht zwingend ein funktionstüchtiges Toxin vorhanden sein muss. Zudem sind die Kulturbedingungen in der Routine-Diagnostik nicht optimiert um alle Bakterien zu kultivieren, sodass manche Bakterienstämme kulturell nach 48 h kein Wachstum zeigen, obwohl Toxin-produzierende Clostridien vorhanden sind. Die Frage verbleibt, ob die positiven isothermalen Amplifikationstestergebnisse im Falle einer Abweichung als falsch positiv zu werten sind oder ob sie durch sensitivere Detektionsmethoden das wahre positive Ergebnis zeigen. Für den Einzelfall bleibt die Antwort auf diese Frage unklar, sodass das Testergebnis mit Vorsicht bewertet werden muss. Symptomatische Patienten mit *C. difficile* Nachweis können aufgrund einer Co-Infektion mit einem anderen Keim, dessen Diagnostik ausbleibt (z.B. Norovirus, Rotavirus, Adenovirus, etc.), Durchfall-Symptomatik entwickeln, und ein kleiner Teil der Patienten ist asymptomatisch mit *C. difficile* besiedelt ohne dass dies einen pathologischen Stellenwert hat. Die Prävalenz asymptomatischer *C. difficile* Träger ist mit ca. 2% jedoch relativ niedrig [49]. Da also potentiell mit NAATs zu viele Proben positiv bewertet werden können ist es wichtig, nur flüssige Stuhlproben von klinisch symptomatischen Patienten zu testen und mit NAATs keine Analysen von Stuhlproben jedweder Konsistenz zu betreiben. Weiterhin sollten Patienten nach ihrem klinischen Kontext evaluiert und therapiert werden. Mögliche andere Durchfallgenesen sollten zuvor differentialdiagnostisch immer in Betracht gezogen und abgeklärt werden.

Im Falle einer asymptomatischen *C. difficile* Trägerschaft können betroffene Patienten durch fehlende Schutzmaßnahmen wie Händewaschen und -desinfektion, Isolation und medikamentöse Therapie andere Menschen in ihrem Umfeld anstecken, die daraufhin klinische Symptome entwickeln können [35, 40].

Auch im Rahmen unserer Studie haben wir versucht, klinische Daten der Clostridien-positiven Patienten zu sammeln und zu analysieren. Da eine detaillierte Anamnese oft nicht möglich war, konnten insgesamt nur limitierte Schlüsse bezüglich klinischer Daten gezogen werden.

Von 95 Patienten wurden klinische Daten gesammelt. Die tägliche Diarrhö Quantität wurde dokumentiert von 27% der Patienten als "mild" (1-2 Mal pro Tag), von 28% der Patienten als "moderat" (3-4 Mal pro Tag) und von 45% der Patienten als "schwere" Diarrhö (mehr als 4 Mal pro Tag). Die stärkste Ausprägung klinischer Symptome in unserer Studie konnte für Binär-Toxin positive Patienten nachgewiesen werden: 63 % der Patienten litten unter schwerer Diarrhö und 54% hatten Fieber. Diese Ergebnisse finden sich auch in der aktuellen Literatur wieder [16].

Insgesamt 43% unserer Patienten litten unter einer Rekurrenz, was deutlich über dem in der Literatur angegebenen Durchschnitt von ca. 30% liegt [19-21] und unterstreicht, dass unsere Patienten multimorbide und aus Häusern der Maximalversorgung stammen und somit eine erhöhte Anfälligkeit für rezidivierende Infektionen aufweisen.

Der Ribotyp 027, in der Literatur als hypervirulenter Strain beschrieben [1, 50, 51], korreliert stark mit dem *slpA* Typ gc8 [28]. Das konnten wir auch in unserer Studie bestätigen: Insgesamt waren 37% aller *slpA* typisierten Patienten mit *slpA* Typ gc8 infiziert, wovon 90% ein positives Ergebnis in der mutierten Form des Toxin B (*tcdB027*) in der *Real-Time* PCR hatten, was stark auf den Ribotyp 027 hinweist. Patienten mit starker klinischer Symptomatik wie Fieber oder schwerer Diarrhö wiesen in unserer Studie signifikant häufiger den *slpA* Typ gc8 auf (44% und 28%).

Nachdem anhand diverser Studien gezeigt wurde, dass isothermale Amplifikationsmethoden eine schnelle sensitive und spezifische Methode darstellen, das *C. difficile* Toxin-Gen nachzuweisen, verbleibt die Frage in welchem Rahmen sie sich diagnostisch und wirtschaftlich als „*stand-alone*“ Test oder als Baustein eines mehr-stufigen Verfahrens empfehlen würden. Diesbezüglich finden sich in der Literatur unterschiedliche Ansichten:

Shin et al. führten eine große Studie durch, im Rahmen derer verschiedene NAATs hohe Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu TC aufwiesen und daraus geschlussfolgert wurde, dass isothermale Amplifikationsteste gut als *stand-alone* Teste in der Diagnostik von *C. difficile* benutzt werden können [32].

Polage et al. empfehlen explizit nicht NAATs (und damit auch IAAs) als *stand-alone* Tests in der Diagnostik von *C. difficile*, da die Gefahr einer Überdiagnose und folgenden Über-Behandlung von CDI besteht [46, 47]. Laut Polage et al. sind Infektionen mit Toxin-negativen *C. difficile* größtenteils selbstlimitierend und benötigen keine medikamentöse Behandlung, weshalb der diagnostische Fokus nicht auf molekularen Testmethoden, sondern auf direktem Toxin-Nachweis (z. B. anhand sensitivem Toxin EIA) erfolgen sollte [46, 47].

Wilcox et al. verglichen verschiedene Testalgorithmen miteinander und kamen zu dem Schluss, dass ein Screening bestehend aus GDH EIA mit einem darauf folgenden NAAT die höchste Sensitivität, aber eine relativ niedrige Spezifität hätte. Diese Testkombination wäre gut geeignet um CDI auszuschließen, aber erscheint nicht sinnvoll um *C. difficile* zu diagnostizieren. Ein Toxin EIA in Kombination mit einem NAAT hätte die höchste Spezifität und einen hohen PPV, dafür aber eine niedrigere Sensitivität, weshalb mit dieser Kombination zu viele *C. difficile* positive Proben nicht erfasst werden würden. Als besten diagnostischen Pfad empfehlen Wilcox et al. einen sensitiven GDH EIA oder NAAT im ersten Schritt mit einem anschließenden (relativ) sensitiven Toxin EIA als Bestätigungstest. Durch diese Testkombination wird ein hoher NPV und ein akzeptabler PPV generiert, womit gezeigt ist, dass CDI sicher ausgeschlossen und auch relativ sicher bestätigt werden kann. Da sich aus wirtschaftlichen Aspekten der GDH EIA als Screening Test besser eignet, kann ein NAAT im Anschluss an den Toxin EIA erfolgen. Durch den NAAT kann bei negativem Toxin EIA - also fehlendem Toxin-Nachweis im Stuhl - der Nachweis von Toxingenen im Stuhl erfolgen, und somit "potenziell *C. difficile* ausscheidende Patienten" identifiziert werden. Auch diese eventuell symptomatischen Patienten können eine Transmission von CDI auf bisher nicht infizierte Patienten unterhalten, weshalb Schutzmaßnahmen wie Hygienemaßnahmen und Isolation bei den "potenziell *C. difficile* ausscheidende Patienten" in jedem Fall erfolgen sollten [35, 40, 52-54].

Aus wirtschaftlicher Sicht sind isothermale Amplifikationstests als *stand-alone* Test praktisch und kosteneffizient nur für Kleinkrankenhäuser mit einem

Probenumfang von bis zu ca. 10 Proben am Tag, da es für kleine Häuser nicht wirtschaftlich ist, in große Geräte für Screening Methoden zu investieren.

Für größere Krankenhäuser sowie Häuser der Maximalversorgung mit einem hohen Probendurchlauf sind IAAs als *stand-alone* Test aus wirtschaftlicher Sicht nicht kosteneffizient. Für solche Häuser eignen sich die aktuell empfohlenen 2-/3-Stufen Algorithmen mit einem kostengünstigen sensitiven Screening Test im ersten Schritt, einem spezifischen Bestätigungstest im zweiten Schritt und einem eventuellen dritten spezifischen Bestätigungstest [2, 18]. In der Praxis ist der erste Test meist das Screening auf die clostridienspezifische Glutamatdehydrogenase, und bei positivem Testergebnis folgt im Anschluss ein spezifischer *C. difficile* EIA und/oder ein NAAT. Auch in der Clostridien Diagnostik größerer Krankenhäuser haben isothermale Amplifikationsteste ihren Stellenwert, da sie bezüglich Sensitivität und Spezifität dem *C. difficile* Toxin EIA überlegen sind und deshalb als Bestätigungstest im 2-Stufen Algorithmus nach einer positiven GDH Detektion die sensitivste Kombination in der Diagnostik darstellen [18]. Wird aus Kostengründen als primärer spezifischer Bestätigungstest ein Toxin EIA verwendet, kann der IAA als zweiter spezifischer Test hinzugezogen werden [2, 18].

Im Umgang mit molekularer Diagnostik, so auch bei isothermalen Amplifikationstesten, muss stets bedacht werden, dass es sich diagnostisch um einen Gen-Nachweis handelt, weshalb die Diagnose CDI immer auch klinisch gestellt werden muss. Die Schnelligkeit der IAAs liefert den Vorteil, dass neben Isolationsmaßnahmen, die bei akuter stationärer Diarrhö immer getroffen werden, auch Hygienemaßnahmen wie gründliches Händewaschen oder gezielte medikamentöse Therapien begonnen werden können.

5 Schlussfolgerungen

Isothermale Amplifikationsteste sind hoch sensitive und sehr spezifische Assays, die ihren Stellenwert in der Diagnostik von *C. difficile* Infektionen

haben. Sie sind sowohl als *stand-alone* Tests als auch in mehr-stufigen Diagnostik-Algorithmen im Labor gut zu integrieren.

Für Krankenhäuser mit hohem Probenaufkommen sind IAAs als Bestätigungstest im mehr-stufigen Diagnostik-Algorithmus sinnvoll und lukrativ, und erhöhen die Sensitivität des diagnostischen Verfahrens. Potentielle Toxin-Ausscheider können erkannt und mögliche Transmissionen vermindert werden.

IAAs als *stand-alone* Tests sind zwar sensitiv und spezifisch, aber nur für Laboratorien mit niedrigem Probenaufkommen lukrativ. Zudem besteht die Gefahr der Über-Diagnose und Über-Behandlung, weshalb das Ergebnis isothermaler Amplifikationstests strengstens im klinischen Kontext evaluiert werden sollte.

6 Quellen- und Literaturverzeichnis

1. Depestel DD, Aronoff DM: **Epidemiology of Clostridium difficile infection.** *J Pharm Pract* 2013, **26**(5):464-475.
2. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, Diseases ESoCMal: **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection.** *Clin Microbiol Infect* 2014, **20 Suppl 2**:1-26.
3. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E, Nazeri S: **Clostridium difficile Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options.** *Scientifica (Cairo)* 2014, **2014**:916826.
4. Ali S, Muzsly M, Wilson P: **A Novel Quantitative Sampling Technique for Detection and Monitoring of Clostridium difficile Contamination in the Clinical Environment.** *J Clin Microbiol* 2015, **53**(8):2570-2574.
5. Rodriguez-Palacios A, Lejeune JT: **Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in Clostridium difficile.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(9):3085-3091.
6. Dubberke ER, Haslam DB, Lanzas C, Bobo LD, Burnham CA, Grohn YT, Tarr PI: **The ecology and pathobiology of Clostridium difficile infections: an interdisciplinary challenge.** *Zoonoses Public Health* 2011, **58**(1):4-20.
7. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Health Care Infection Control Practices Advisory C: **2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings.** *Am J Infect Control* 2007, **35**(10 Suppl 2):S65-164.
8. Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Riley TV, Paterson DL, Foster NF, Huber CA, Clements AC: **Asymptomatic Clostridium difficile colonization: epidemiology and clinical implications.** *BMC Infect Dis* 2015, **15**:516.
9. Bolton RP, Tait SK, Dear PR, Losowsky MS: **Asymptomatic neonatal colonisation by Clostridium difficile.** *Arch Dis Child* 1984, **59**(5):466-472.

10. Rousseau C, Lemee L, Le Monnier A, Poilane I, Pons JL, Collignon A: **Prevalence and diversity of Clostridium difficile strains in infants.** *J Med Microbiol* 2011, **60**(Pt 8):1112-1118.
11. Borriello SP: **12th C. L. Oakley lecture. Pathogenesis of Clostridium difficile infection of the gut.** *J Med Microbiol* 1990, **33**(4):207-215.
12. Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmee M, Daube G: **Clostridium difficile infection and intestinal microbiota interactions.** *Microb Pathog* 2015, **89**:201-209.
13. Weis S, John E, Lippmann N, Mössner J, Lübbert C: **[Clostridium difficile infection (CDI) in the course of time - an issue only for the internist?].** *Zentralbl Chir* 2014, **139**(4):460-468.
14. Pruitt RN, Lacy DB: **Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B.** *Front Cell Infect Microbiol* 2012, **2**:28.
15. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP: **The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection.** *Nature* 2010, **467**(7316):711-713.
16. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE: **Binary toxin and death after Clostridium difficile infection.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(6):976-982.
17. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue YK, Group OPTCS: **Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection.** *N Engl J Med* 2011, **364**(5):422-431.
18. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M, Zuckerbraun BS: **Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections.** *Am J Gastroenterol* 2013, **108**(4):478-498; quiz 499.
19. Cornely OA, Nathwani D, Ivanescu C, Odufowora-Sita O, Retsa P, Odeyemi IA: **Clinical efficacy of fidaxomicin compared with vancomycin and metronidazole in Clostridium difficile infections: a meta-analysis and indirect treatment comparison.** *J Antimicrob Chemother* 2014, **69**(11):2892-2900.
20. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL: **Meta-analysis to assess risk factors for recurrent Clostridium difficile infection.** *J Hosp Infect* 2008, **70**(4):298-304.
21. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR: **The epidemiology of community-acquired Clostridium difficile infection: a population-based study.** *Am J Gastroenterol* 2012, **107**(1):89-95.
22. Yoo J, Lee H, Park KG, Lee GD, Park YG, Park YJ: **Evaluation of 3 automated real-time PCR (Xpert C. difficile assay, BD MAX Cdiff, and IMDx C. difficile for Abbott m2000 assay) for detecting Clostridium difficile toxin gene compared to toxigenic culture in stool specimens.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015, **83**(1):7-10.
23. Eckert C, Holscher E, Petit A, Lalande V, Barbut F: **Molecular test based on isothermal helicase-dependent amplification for detection of the Clostridium difficile toxin A gene.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**(7):2386-2389.
24. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T: **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products.** *Nat Protoc* 2008, **3**(5):877-882.
25. Vincent M, Xu Y, Kong H: **Helicase-dependent isothermal DNA amplification.** *EMBO Rep* 2004, **5**(8):795-800.
26. Bowman KA, Broussard EK, Surawicz CM: **Fecal microbiota transplantation: current clinical efficacy and future prospects.** *Clin Exp Gastroenterol* 2015, **8**:285-291.
27. Arvand M, Vollandt D, Bettge-Weller G, Harmanus C, Kuijper EJ, Hesse Cdsg: **Increased incidence of Clostridium difficile PCR ribotype 027 in Hesse, Germany, 2011 to 2013.** *Euro Surveill* 2014, **19**(10).
28. Kato H, Ito Y, Akahane T, Izumida S, Yokoyama T, Kaji C, Arakawa Y: **Typing of Clostridium difficile isolates endemic in Japan by sequencing of slpA and its application to direct typing.** *J Med Microbiol* 2010, **59**(Pt 5):556-562.

29. Deak E, Miller SA, Humphries RM: **Comparison of Illumigene, Simplexa, and AmpliVue Clostridium difficile molecular assays for diagnosis of C. difficile infection.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**(3):960-963.
30. Norén T, Unemo M, Magnusson C, Eiserman M, Matussek A: **Evaluation of the rapid loop-mediated isothermal amplification assay Illumigene for diagnosis of Clostridium difficile in an outbreak situation.** *APMIS* 2014, **122**(2):155-160.
31. Antonara S, Daly J, Greene W, Leber A: **A large scale clinical evaluation of the AmpliVue and Illumigene molecular tests for the identification of Clostridium difficile-associated diarrhea in adult and pediatric patients.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015, **82**(4):265-268.
32. Shin BM, Yoo SM, Shin WC: **Evaluation of Xpert C. difficile, BD MAX Cdiff, IMDx C. difficile for Abbott m2000, and Illumigene C. difficile Assays for Direct Detection of Toxigenic Clostridium difficile in Stool Specimens.** *Ann Lab Med* 2016, **36**(2):131-137.
33. Jensen MB, Olsen KE, Nielsen XC, Hoegh AM, Dessau RB, Atlung T, Engberg J: **Diagnosis of Clostridium difficile: real-time PCR detection of toxin genes in faecal samples is more sensitive compared to toxigenic culture.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015, **34**(4):727-736.
34. Metz DC: **Clostridium difficile colitis: wash your hands before stopping the proton pump inhibitor.** *Am J Gastroenterol* 2008, **103**(9):2314-2316.
35. Planche TD, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, O'Connor L, Oakley SJ, Pope CF, Wren MW *et al*: **Differences in outcome according to Clostridium difficile testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of C difficile infection.** *Lancet Infect Dis* 2013, **13**(11):936-945.
36. Kubota H, Sakai T, Gawad A, Makino H, Akiyama T, Ishikawa E, Oishi K: **Development of TaqMan-based quantitative PCR for sensitive and selective detection of toxigenic Clostridium difficile in human stools.** *PLoS One* 2014, **9**(10):e111684.
37. McElgunn CJ, Pereira CR, Parham NJ, Smythe JE, Wigglesworth MJ, Smielewska A, Parmar SA, Gandelman OA, Brown NM, Tisi LC *et al*: **A low complexity rapid molecular method for detection of Clostridium difficile in stool.** *PLoS One* 2014, **9**(1):e83808.
38. Pancholi P, Kelly C, Raczkowski M, Balada-Llasat JM: **Detection of toxigenic Clostridium difficile: comparison of the cell culture neutralization, Xpert C. difficile, Xpert C. difficile/Epi, and Illumigene C. difficile assays.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(4):1331-1335.
39. Gyorke CE, Wang S, Leslie JL, Cohen SH, Solnick JV, Polage CR: **Evaluation of Clostridium difficile fecal load and limit of detection during a prospective comparison of two molecular tests, the illumigene C. difficile and Xpert C. difficile/Epi tests.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**(1):278-280.
40. Wilcox MH: **Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection.** *Clin Microbiol Infect* 2012, **18 Suppl 6**:13-20.
41. Androga GO, Hart J, Foster NF, Charles A, Forbes D, Riley TV: **Infection with Toxin A-Negative, Toxin B-Negative, Binary Toxin-Positive Clostridium difficile in a Young Patient with Ulcerative Colitis.** *J Clin Microbiol* 2015, **53**(11):3702-3704.
42. Cairns MD, Preston MD, Lawley TD, Clark TG, Stabler RA, Wren BW: **Genomic Epidemiology of a Protracted Hospital Outbreak Caused by a Toxin A-Negative Clostridium difficile Sublineage PCR Ribotype 017 Strain in London, England.** *J Clin Microbiol* 2015, **53**(10):3141-3147.
43. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, O'Mahony R, Kyne L: **Isolation and characterisation of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile in Dublin, Ireland.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**(3):298-304.
44. Goorhuis A, Legaria MC, van den Berg RJ, Harmanus C, Klaassen CH, Brazier JS, Lumelsky G, Kuijper EJ: **Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative Clostridium difficile in a**

- general hospital in Buenos Aires, Argentina.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**(12):1080-1086.
45. Roy Chowdhury P, DeMaere M, Chapman T, Worden P, Charles IG, Darling AE, Djordjevic SP: **Comparative genomic analysis of toxin-negative strains of Clostridium difficile from humans and animals with symptoms of gastrointestinal disease.** *BMC Microbiol* 2016, **16**:41.
 46. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, Nguyen HH, Huang B, Tang YW, Lee LW *et al*: **Overdiagnosis of Clostridium difficile Infection in the Molecular Test Era.** *JAMA Intern Med* 2015, **175**(11):1792-1801.
 47. Polage CR, Turkiewicz JV, Cohen SH: **The never-ending struggle with laboratory testing for Clostridium difficile infection.** *J Comp Eff Res* 2016, **5**(2):113-116.
 48. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, Berger P, Petit A, De Chevigny A, Jean-Pierre H *et al*: **Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive Clostridium difficile strains that do not produce toxins A and B.** *New Microbes New Infect* 2015, **3**:12-17.
 49. Pires D, Prendki V, Renzi G, Fankhauser C, Sauvan V, Huttner B, Schrenzel J, Harbarth S: **Low frequency of asymptomatic carriage of toxigenic Clostridium difficile in an acute care geriatric hospital: prospective cohort study in Switzerland.** *Antimicrob Resist Infect Control* 2016, **5**:24.
 50. Le Monnier A, Zahar JR, Barbut F: **Update on Clostridium difficile infections.** *Med Mal Infect* 2014, **44**(8):354-365.
 51. Tschudin-Sutter S: **Molecular epidemiology of Clostridium difficile for clinical practice.** *Swiss Med Wkly* 2014, **144**:w13995.
 52. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, America SfHEo, America IDSo: **Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA).** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010, **31**(5):431-455.
 53. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmee M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E *et al*: **Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID).** *Lancet Infect Dis* 2014, **14**(12):1208-1219.
 54. Planche T, Wilcox MH: **Diagnostic pitfalls in Clostridium difficile infection.** *Infect Dis Clin North Am* 2015, **29**(1):63-82.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Colin Mackenzie für die wunderbare Betreuung und großartige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mir wurde die Möglichkeit gegeben, auf der ECCMID 2014 in Barcelona tiefere Einblicke in die klinische Mikrobiologie zu gewinnen, was für mich ein einzigartiges Erlebnis war.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die guten Arbeitsbedingungen und für die Materialien, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

Ich bedanke mich bei Raquel Guadarrama-Gonzalez und Birgit Lamik für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Simone Bühler und Christian Neuendorf danke ich für die gute Laune, die ich dank Euch nie verloren habe.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift