

**UKS**  
Universitätsklinikum  
des Saarlandes

04.11.2014

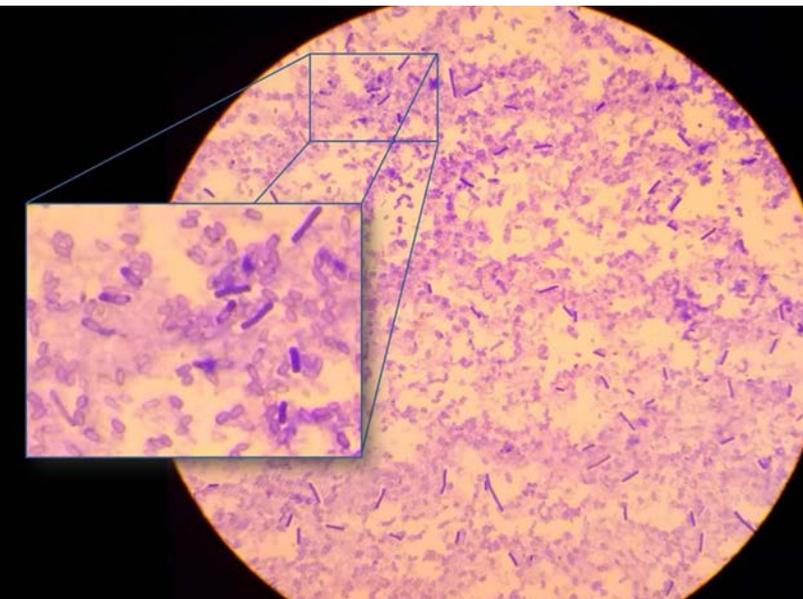
# Diagnostik und Typisierung von *Clostridium difficile*

Alik Dawson  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene



## Clostridium difficile

- grampositives Stäbchen
- gehört der Familie der Clostridiaceae an
- obligater Anaerobier



- ubiquitäres Vorkommen
- Sporenbildner
- Toxinbildner
- zahlreiche Antibiotikaresistenzen



Diagnostik und Typisierung von *Clostridium difficile*

Infektionsart	Patienten mit NI	NI	NI Prävalenz (%)	Anteil Patienten mit NI (%)
Postoperative Wundinfektionen	543	547	1,31	25,7
Harnwegsinfektionen	522	522	1,26	24,8
Untere Atemwegsinfektionen	484	487	1,17	23,0
<b>Clostridium difficile Infektion (CDI)</b>	<b>143</b>	<b>144</b>	<b>0,34</b>	<b>6,8</b>
Primäre Sepsis	129	129	0,31	6,1
Andere gastrointestinale Infektionen	101	103	0,25	4,8
Haut- und Weichteilinfektionen	53	53	0,13	2,5
Systemische Infektionen	48	48	0,12	2,3
Knochen-und Gelenkinfektionen	40	40	0,10	1,9
Augen-,Ohren-, Nase- und Mund-Infektionen	28	28	0,07	1,3
Infektionen des kardiovaskulären Systems	15	15	0,04	0,7
Infektionen des zentralen Nervensystems	12	12	0,03	0,6
Infektionen des Reproduktionstraktes	12	12	0,03	0,6

Die häufigsten Spezies		
<i>Escherichia coli</i>	281	18,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	204	13,1
<b><i>Clostridium difficile</i></b>	<b>126</b>	<b>8,1</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	112	7,2
<i>Enterococcus faecium</i>	93	6,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87	5,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	82	5,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55	3,5
<i>Candida albicans</i>	50	3,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	45	2,9

Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2011



# Clostridium difficile

Pathogen	All Health Care-Associated Infections (N=504)†		Pneumonia (N=110)	Surgical-Site Infections (N=110)	GI Infections (N=86)	UTIs (N=65)	Bloodstream Infections (N=50)
	no. (%)	rank					
<i>Clostridium difficile</i>	61 (12.1)	1	0	0	61 (70.9)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	54 (10.7)	2	18 (16.4)	17 (15.5)	1 (1.2)	2 (3.1)	7 (14.0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> or <i>K. oxytoca</i>	50 (9.9)	3	13 (11.8)	15 (13.6)	1 (1.2)	15 (23.1)	4 (8.0)
<i>Escherichia coli</i>	47 (9.3)	4	3 (2.7)	14 (12.7)	1 (1.2)	18 (27.7)	5 (10.0)
Enterococcus species‡	44 (8.7)	5	2 (1.8)	16 (14.5)	5 (5.8)	11 (16.9)	6 (12.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36 (7.1)	6	14 (12.7)	7 (6.4)	1 (1.2)	7 (10.8)	2 (4.0)
<i>Candida</i> species§	32 (6.3)	7	4 (3.6)	3 (2.7)	3 (3.5)	3 (4.6)	11 (22.0)
<i>Streptococcus</i> species¶	25 (5.0)	8	7 (6.4)	8 (7.3)	2 (2.3)	2 (3.1)	2 (4.0)
Coagulase-negative staphylococcus species	24 (4.8)	9	0	7 (6.4)	0	1 (1.5)	9 (18.0)
Enterobacter species	16 (3.2)	10	3 (2.7)	5 (4.5)	0	2 (3.1)	2 (4.0)

11 000 Patienten  
183 KH

Magill et al, NEJM 2014



Land	gemittelter zusätzlicher Krankenhausaufenthalt durch CDI	Autor
------	--	-------

Land	gemittelter zusätzlicher Krankenhausaufenthalt durch CDI	Land	gemittelte zusätzliche Kosten durch CDI	Autor
Deutschland	7			
Finnland	2,7			
England	14			
Niederlande	18	Deutschland	7499 €	Vonberg et al. (2008)
		Irland	5040 €	McEneaney et al. (2008)
		Finnland	1150 €	McEneaney et al. (2008)

Quelle: (Wiegand, J Hosp Infect. 2012)

- ...€3 Mrd. p.a. in the EU
- ...it is expected to almost double over the next four decades...

Quelle: ECDC

# Stuhldiagnostik

Kultureller Zytotoxizitätstest

Toxigene Kultur

Glutamatdehydrogenase  
(GDH)

Toxin A/B-Elisa

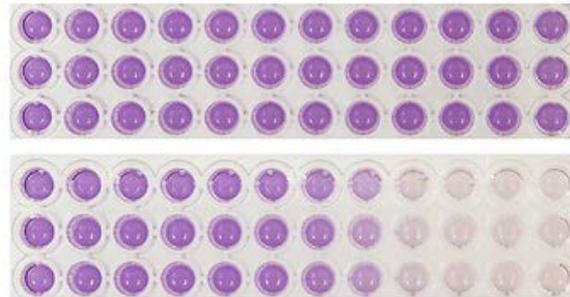
Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren  
(NAAT)



## Kultureller Zytotoxizitätstest

- Filtrat des zu untersuchenden Stuhl wird mit einer Monolayer Zellrasenschicht inkubiert

- Nach 24 bzw. 48 h wird der Zellrasen auf zytopathische Effekte (CPE) untersucht



- Vorhandende CPE werden mittels parallel durchgeführter Neutralisationstest auf Spezifität untersucht

- Relativ aufwendig (Zellkultur)
- Zeitintensiv
- Stark von der Expertise des auszuführenden Labors abhängig

- Sensitivität 75-85%<sup>1</sup> im Vgl. zur toxigenen Kultur
- fehlende Sensibilitätstestung/Typisierung
- Sehr hohe Spezifität



## Toxigene Kultur

- Anzucht von *C. difficile* unter obligat anaeroben Bedingungen aus dem Stuhl
- Hitze- oder Alkohol-Behandlung der Stuhlproben
- Selektiv-Medien (Unterdrückung der Begleitflora)



- Zusätze (Taurocholat => Unterstützung der Germination)
- Präreduktion des Mediums in anaerober Atmosphäre
- Identifizierung der Kultur (MALDI-TOF etc.)

- Bestätigung der Toxigenität => per Toxin-EIA A/B / Zytotoxizitätstest / PCR
- perirektale Abstriche Sensitivität 95,7%<sup>1</sup> i.V. zu Stuhlproben

Möglichkeit der Typisierung und der Resistenztestung

- wird von ESCMID, SHEA/IDSA als neuer Goldstandard für komparative Studien empfohlen
- Nachweis von in vitro Toxinproduktion / klin. Relevanz der höheren Sensitivität unklar



# Glutamatdehydrogenase (GDH)

- wird von allen *C.difficile*-Stämmen in hohen Konzentrationen produziert „common antigen“



- Screening-Test für das Vorhandensein von *C.difficile*

- Schnell durchführbar und relativ kostengünstig

- Hohe Sensitivität

- Exzellenter NPV (negativ prädiktiver Wert) 97,1-100%<sup>1</sup>

- Keine Aussage über klin. Relevanz

- Positives Ergebnis bedarf weiterer Tests



## Toxin-EIA

- Am häufigsten verwendete Testverfahren
- Mono- bzw. polyklonale Antikörper gegen C.difficile-Toxine
- Schnelle Durchführbarkeit
- Kostengünstig



- Unzureichende Sensitivität => klin. Relevanz?<sup>1</sup>
- Unzureichende Spezifität?<sup>2</sup>
- Kombiteste, die gleichzeitig auf GDH und Toxin A/B untersuchen weisen die gleichen Charakteristika auf, wie die entsprechenden Einzeltests



<sup>1</sup>Polage et al., Diagn Microbiol Infect Dis., Dec 2012

<sup>2</sup>Han et al., Am J Infect Control. 2012 May



## NAT (Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren)

- Molekularbiologische Verfahren
- Dienen der Vermehrung und dem Nachweis von bestimmten Zielgenen
- ⇒ **tcdA** / **tcdB** / **tcdC** / **cdtAB**
- Hohe Sensitivität 92-99%<sup>1</sup>
- Niedrige Turnaround-Zeiten (60-240 Min)<sup>1</sup>
- Hohe Kosten (Einzeltests) => manche Kostenmodelle favorisieren dennoch die Anwendung von NAT
- Nachweis von Genen, statt von freiem Toxin
- ⇒ Analytische vs. klinische Spezifität?
- Report von Kopienzahl?<sup>2</sup> (CDI vs. Kolonisation)



## 3 Stufen-Algorithmus<sup>1</sup>

1. / 2. Stufe			
	GDH	Toxin A/B	Bewertung
	-	-	Kein Hinweis auf CDI
	+	+	Sicherer Hinweis auf CDI
	+	-	Diskrepanter Befund
3. Stufe			
	NAT (tcdA/tcdB/tcdt/cdtAB)		Bewertung
	-		Kein Hinweis auf CDI
	+		(Sicherer) Hinweis auf CDI

## 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):

“Currently there is no testing strategy that is optimally sensitive and specific and, therefore, clinical suspicion and Consideration of the patient risk factors are important in making clinical decisions about whom to treat.”

One potential strategy to overcome this problem is a 2-step method that uses EIA detection of glutamate dehydrogenase (GDH) as initial screening and then uses the cell cytotoxicity assay or toxigenic culture as the confirmatory test for GDH-positive stool specimens only.

Polymerase chain reaction (PCR) testing appears to be rapid, sensitive, and specific and may ultimately address testing concerns. More data on utility are necessary before his methodology can be recommended for routine testing.

## Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infections (2013):

Nucleic acid amplification tests (NAAT) for *C. difficile* toxin genes such as PCR are superior to toxins A + B EIA testing as a standard Diagnostic test for CDI. (Strong recommendation, moderate-quality evidence)

Glutamate dehydrogenase (GDH) screening tests for *C difficile* can be used in two- or three-step screening algorithms with subsequent toxin A and B EIA testing, but the sensitivity of such strategies is lower than NAATs. (Strong recommendation, moderate-quality evidence)

If a patient has strong a pre-test suspicion for CDI, empiric therapy for CDI should be considered regardless of the laboratory testing result, as the negative predictive values for CDI are insufficiently high to exclude disease in these patients. (Strong recommendation, moderate-quality evidence)

# Typisierung

## Aufgaben:

- Surveillance der epidemiologischen Dynamik
- Charakterisierung von Stämmen
- Erkennen von Ausbruchsgeschehen / Verfolgung der Transmission
- Möglicherweise therapeutische u. diagnostische Konsequenzen

## Voraussetzungen:

- Hohe Diskriminationsfähigkeit
- Objektivierbare, eindeutige Ergebnisse
- Reproduzierbarkeit
- Kosteneffektivität



# Typisierungsmethoden

- Ribotypisierung
- Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)
- Multilocus sequence typing (MLST)
- Whole-genome-sequencing

Methode	Vorteil	Nachteile/Herausforderungen
Ribotypisierung		
- Gel-basiert	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine weltweite genutzte Datenbank ist für die häufigsten Stämme etabliert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Standardisierung (Protokolle / Auswertung) für Vergleichbarkeit notwendig</li> </ul>
- Sequencer-basiert (Kapillargel-Elektrophorese)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gute Diskrimination</li> <li>- Hohe Reproduzierbarkeit</li> <li>- Digitale Daten zum Austausch verfügbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bisher noch keine standardisierte Nomenklatur</li> </ul>
PFGE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gute Diskrimination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Standardisierung (Protokolle / Auswertung) für Vergleichbarkeit notwendig</li> <li>- Hoher Arbeits- u. Zeitaufwand</li> </ul>
MLST	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gute Diskrimination</li> <li>- Digitale Daten zum Austausch verfügbar</li> <li>- Phylogenetische Beziehung werden erfasst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Im Vgl. zu Ribotypisierung hohe Kosten und hoher Arbeitsaufwand</li> </ul>
Whole-genom-Sequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ultimative Diskrimination</li> <li>- Hohe Reproduzierbarkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hohe Kosten, hoher Aufwand</li> <li>- Bioinformatik-Expertise notwendig</li> <li>- Speziallaboren vorbehalten</li> </ul>

## Zum Mitnehmen:

- Es gibt nicht das „ideale“ Testverfahren
- standardisierte Algorithmen mit etablierten schnellen Methoden
- Testung nur von symptomatischen Patienten
- Kein Test beweist eine CDI => kein reflektorischer Therapiebeginn oder –ausschluss aufgrund eines Laborergebnisses
- Typisierung ist ein wichtiges Instrument zur Erfassung der Epidemiologie, als mögliche Grundlage therapeutischen Handelns, diagnostischer Vorgehensweisen
- Ribotypisierung ist mittlerweile das europäische Standardverfahren
- Die gängigen Typisierungsverfahren weisen eine gute Diskriminationsfähigkeit auf
- Whole-Genom-Sequenzierung => die Methode der Zukunft?



**Danke für Ihre  
Aufmerksamkeit !**