

Sensitivitätsgewinn beim Testen auf toxische *Clostridium difficile* durch drei kommerzielle Kulturmedien

Frauke Mattner MD^{1*}, Ingo Winterfeld¹, Lutz Mattner PhD²

*Korrespondenz:

PD Dr. Frauke Mattner

¹Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

(Direktor Prof. Dr. Werner Solbach)

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

D-23538 Lübeck

Tel: +49 451 500 2812

Fax: + 49 451 500 4729

E-Mail: Frauke.Mattner@uk-sh.de

²Institut für Mathematik, Universität zu Lübeck

(Direktor Prof. Dr. Jürgen Prestin)

Zusammenfassung

Hintergrund: Infektionen mit Toxin A oder B produzierenden *Clostridium difficile* (toxigene *C. difficile*) stiegen in Deutschland von 1,3 / 100 000 Krankenhausentlassungen in 2000 auf 97,5 / 100 000 in 2006 an und weisen eine hohe Mortalität auf. Zur mikrobiologischen Diagnostik stehen ELISA - (und andere immundiagnostische) Tests zum Nachweis von Toxin A oder B im Stuhl (CdT-Direkttest), verschiedene Nährmedien für den kulturellen Nachweis mit anschließender Überprüfung der Toxinproduktion (Kulturtest), Zytotoxizitätstests und in Entwicklung befindliche molekulargenetische Tests zur Verfügung. Zur Diagnostik toxigener *C. difficile* empfehlen ECDC, CDC und MIQ Kombinationen von Testverfahren. CdT-Direkttests werden mit Sensitivitäten zwischen 50 und 98% beschrieben. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist der Vergleich der Sensitivitäten dreier Kulturtests mit der eines CdT-Direkttests.

Methoden: Von Februar bis März 2008 wurden alle flüssigen in ein mikrobiologisches Labor eingesandten Erstproben auf drei *C. difficile*-Selektivnährböden kultiviert (Kulturmedium I: CDSA, (Becton Dickinson), Kulturmedium II: CLO-Agar (BioMérieux), Kulturmedium III: *C. difficile*-Selektivagar modifiziert nach Brazier (Oxoid)). Weiterhin wurde ein CdT-Direkttest (Ridascreen, r-biopharm) durchgeführt. Auf den Nährmedien angezüchtete verdächtige Kolonien wurden nach 48 h anaerober Bebrütung mittels Latex-Agglutinationstest auf Zellwandantigene von *C. difficile* (Oxoid) überprüft und mittels CdT-ELISA nach Herstellerangaben auf Toxin A- oder B-Produktion untersucht (Ridascreen, r-biopharm). Da bisher kein hinreichend guter Referenztest (nachgewiesene Sensitivität und Spezifität nahe 100%, „Goldstandard“) zum Schätzen der Sensitivitäten existiert, wurde für alle drei Medien der Mindestsensitivitätsgewinn gegenüber der Anwendung des CdT-Direkttestes ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass ein kultureller Nachweis toxigener *C. difficile* (CdT-bestätigt) mindestens so spezifisch ist wie der CdT-Direkttest. Beispielhaft wurde eine Prävalenz von 15% zugrunde gelegt.

Ergebnisse: Von 256 flüssigen Stuhlproben waren 47 (18,4%) in mindestens einem der vier Teste positiv für toxinbildende *C. difficile*. Die drei Kulturtests waren in 33 (12,8 %), 42 (16,4 %) bzw. 35 (13,6 %) Proben positiv. Der CdT-Direkttest wies 26 (10,1 %) Proben als „positiv“ aus. Die Mindestsensitivitätsgewinne beliefen sich für die drei untersuchten Kulturmedien auf 18% (untere 95% Konfidenzschranke -4%) für Kulturmedium I, 40% (untere 95% Konfidenzschranke 21%) für Kulturmedium II und 23% für Kulturmedium III (untere 95% Konfidenzschranke 2 %).

Zusammenfassung: Der höchste Mindestsensitivitätsgewinn bei drei untersuchten Kulturmedien gegenüber dem CdT-Direkttest wurde mit dem Kulturmedium II (CLO-Medium, BioMérieux) erreicht und betrug 40% (untere 95% Konfidenzschranke 21%). Folglich kann die Sensitivität des CdT-Direkttests höchstens 79% betragen – im Widerspruch zu hohen

publizierten Sensitivitätswerten. Um therapeutische und krankenhaushygienisch korrekte sowie zeitnahe Entscheidungen für *Clostridium difficile* Infektionen (CDI)-Patienten treffen zu können, sollte eine schnelle mit einer hochsensitiven Nachweismethode kombiniert werden. Für Sensitivitätsermittlungen von mikrobiologischen Testen ist es essentiell, die Sensitivitäten gegen möglichst sensitive Methoden zu testen. Dabei scheint für toxische *C. difficile* der als „Goldstandard“ geltende Zytotoxizitätstest im Vergleich zu bestimmten kulturellen Selektivnährmedien unterlegen zu sein. Bei seiner Verwendung zur Sensitivitätsberechnung von CdT Direkttests werden diese zum Teil erheblich überschätzt. Bei folglich unbekanntem „Goldstandard“ ist es daher inadäquat, aus den Daten verschiedener Tests Sensitivitäten zu schätzen. Wir schätzen hier statistisch korrekt den Sensitivitätsgewinn eines Testes gegenüber einem anderen.

Einleitung

Über die letzten Jahre in Nordamerika, Europa und Deutschland ansteigende Infektionsraten an *C. difficile* Infektionen erfordern eine effektive Infektionskontrolle. Voraussetzung dafür ist eine schnelle und sensitive mikrobiologische Diagnostik (1-6). Deren Ziel ist der Nachweis des Potenzials von *C. difficile*, die Toxine A und/oder B zu bilden (Toxigenität von *C. difficile*), da letztere für die Erkrankung verantwortlich gemacht werden. Bei Vorliegen toxigener *C. difficile* sollte mittels frühzeitig initiiertes spezifischer antibiotischer Therapie ein schwerer klinischer Verlauf verhindert werden. Weiterhin sollten spezifische Präventionsmaßnahmen zur Verhinderung nosokomialer Übertragungen initiiert werden. Zur Diagnostik stehen schnelle Resultate bietende diverse *C. difficile* Toxin A+B ELISAs („CdT-Direkttest“) und selektive kulturelle Fertigmedien zur Verfügung (7, 8). Der „Zytotoxintest“ auf Zellkulturen gilt zwar als bislang hinreichend guter Referenztest der *C. difficile*-Diagnostik, wird aber in den meisten mikrobiologischen Laboratorien als für den Routinebetrieb zu aufwendig bewertet. Die drei Organisationen Centers for Disease Control and Prevention (CDC), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) und Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MIQ) empfehlen als Standarddiagnostik die Kombination eines Toxin A+B ELISAs oder GDH-ELISAs mit einer kulturellen Anzucht (5, 9, 10). Dennoch wird häufig nur ein Schnelltest durchgeführt (4, 11, 12). Oben genannte Empfehlungen zur kulturellen Anzucht enthalten keine Präferenz für ein bestimmtes Kulturmedium. Daher haben wir hier drei verschiedene kommerzielle Selektivmedien (ohne Blut, mit Hammelblut, mit Pferdeblut) vergleichend getestet, um Sensitivitäten der damit durchgeführten Tests mit der des CdT-Direkttests zu vergleichen. Weiterhin haben wir die Sensitivitätsdaten von CdT-ELISA-Direkttests kürzlich erschienener Veröffentlichungen zusammengestellt und hinsichtlich der Auswahl der eingesetzten Referenzmethoden diskutiert.

Methoden

Von Februar bis März 2008 wurden alle in das Labor eines Universitätsklinikums eingesandten flüssigen Stuhlproben auf *C. difficile* untersucht. Etwaige Folgeeingsendungen von Stuhlproben desselben Patienten blieben bei der folgenden Auswertung unberücksichtigt. Es lagen schließlich 256 erste Stuhlproben zur weiteren Auswertung vor. Die Proben wurden auf drei verschiedenen Kulturmedien angelegt (Kulturmedium I: CDSA, Becton Dickinson (Tierisches Pepton 32g/l Neutralrot 0,03g/l, Cycloserin 0,25g/l, Cefoxitin 0,016g/l); Kulturmedium II: CLO, BioMérieux (Tierisches Pepton 21g/l, Hammelblut 50ml/l, Cycloserin 0,1g/l, Cefoxitin 0,008g/l, Amphotericin B 0,002g/l); Kulturmedium III: *Clostridium difficile* Selektivagar nach Brazier, Oxoid, (Tierisches Pepton 23 g/l, defibriniertes Pferdeblut 10 ml/l, Eigelb 40 ml/l, p-Hydroxyphenylacetat 1,0 mg/l, Cycloserin 0,25g/l, Cefoxitin 0,008g/l, Amphotericin B 0,008 g/l, Cholsäure 1,0 g/l)) und 48 h anaerob bei 37°C bebrütet. Parallel wurde ein *C. difficile*-Toxin-ELISA taggleich direkt aus der Stuhlprobe (CdT-Direkttest) durchgeführt (Ridascreen, r-biopharm). Morphologisch verdächtige Kolonien (grau, unregelmäßig begrenzt, mit prominentem Zentrum, oder mit typischem Geruch) wurden mittels Latex-Agglutinationstest auf Zellwandantigene von *C. difficile* (Oxoid) überprüft und auf Toxin A oder B mit dem *C. difficile*-Toxin-ELISA (Ridascreen, r-biopharm) nach Herstellerangaben getestet. Ein kulturell angezüchteter *C. difficile* Stamm wurde somit nur dann als „positiv“ eingestuft, wenn er auch im ELISA (Ridascreen, r-Biopharm) positiv war (Kulturtest). Da bisher kein perfekter Referenztest für die interessierende Toxigenitätsdiagnose bekannt ist, können Sensitivitäten und Spezifitäten prinzipiell nicht bestimmt werden (13). Möglich ist jedoch die Bestimmung von Mindestsensitivitätsgewinnen (Punktschätzung und untere 95% Konfidenzschranke) für jede getestete Kultur im Vergleich zum CdT-Direkttest, unter folgender wichtiger Annahme:

- Die Spezifität eines Kulturtests ist mindestens so hoch wie die Spezifität des CdT-Direkttests.

Diese Annahme erscheint uns plausibel, weil bei einem Kulturtest der ELISA auf eine Probe aus einer als *C. difficile* nachgewiesenen Kultur und damit auf ein für die interessierende Diagnose spezifischeres Material als der Stuhl angewandt wird. Weiterhin haben wir die Prävalenz von toxigenem *C. difficile* von allen stationären Patienten mit flüssigem Stuhl, der in das Labor eingesandt wird, mit 15% angenommen. Diese Annahme ist weniger wichtig: Bei einer Prävalenz von x% wären unsere Punktschätzer und Konfidenzschranken für die Mindestsensitivitätsgewinne mit 15/x zu multiplizieren. Die verwendete statistische Methode basiert auf (14, 15); eine genauere Darstellung ist in Vorbereitung.

Ergebnisse

Von 256 Ersteinsendungen von Patienten mit flüssigen Stuhlproben waren 47 Proben auf mindestens einem Kulturtest oder dem CdT-Direkttest positiv (Tabelle 1). 26 Proben waren im CdT-Direkttest positiv, von denen aus 4 Proben keine Anzucht auf den drei Kulturmedien gelang bzw. in einem Fall die angezüchtete Kultur keinen Toxinnachweis erbrachte. 209 Proben waren in allen Testen negativ. *C. difficile* mit positivem CdT-Nachweis aus der Kultur wurde auf Kulturmedium I in 33 (12,8%), auf Kulturmedium II in 42 (16,4%) und auf Kulturmedium III in 35 (13,6%) Patienten nachgewiesen. In 4 (Kulturmedium I), 7 (Kulturmedium II) und 5 (Kulturmedium III) Proben waren die angezüchteten *C. difficile* nicht toxisch (= negativer CdT-ELISA aus der Kultur) und zählten als negativ für den jeweiligen Kulturtest. Unter der exemplarischen Annahme einer Prävalenz von 15% betrug die Mindestsensitivitätsdifferenz des Nachweises toxischer *C. difficile* auf den Nährmedien im Vergleich zum CdT-Direkttest für Kulturmedium I 18% (-4% untere 95% Konfidenzschranke, also kein signifikanter Mindestsensitivitätsgewinn), für Kulturmedium II 40% (21% untere 95% Konfidenzschranke) und für Kulturmedium III 23% (2% untere 95% Konfidenzschranke). Insbesondere ergibt sich für den Direkttest durch Vergleich mit dem Kulturtest mit dem Medium II eine Sensitivität von höchstens 60% (79% obere 95% Konfidenzschranke, ohne Korrektur für die dreifache Berechnung von Konfidenzschranken). Nähme man die Veroderung der drei Kulturtests („positiv“, falls mindestens ein Test positiv) als perfekten Referenztest an, ergäbe sich für den CdT-Direkttest eine Sensitivität von nur 51% (obere 95% Konfidenzschranke 64%). Sensitivitätsvergleiche der Kulturentests untereinander sind ohne Annahme an deren Spezifitäten unmöglich.

Ein Beispiel des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens von *C. difficile* auf den verschiedenen Nährmedien ist in Abbildung 1a-c dargestellt: Dieselbe Stuhlprobe zeigte auf dem Kulturmedium II (CLO-Agar, BioMérieux) ein selektives üppiges (1b), auf dem Kulturmedium III (Selektivagar nach Brazier, Oxoid) ein vereinzelt (1c) und auf dem Kulturmedium I (CDSA, BD) gar kein (1a) Wachstum.

Diskussion

Infektionen mit toxischen *C. difficile* sind die häufigsten Ursachen nosokomial erworbener Diarrhoen und haben wegen des Auftretens größerer Ausbrüche mit schweren klinischen Verläufen, die teilweise auf den Ribotypen 027 zurückgeführt wurden, weltweit kürzlich für Aufmerksamkeit gesorgt (1, 2, 6, 16, 17). Um eine spezifische antibiotische Therapie initiieren und hygienische Maßnahmen zur Vorbeugung weiterer nosokomialer Übertragungen zeitig und konsequent ergreifen zu können, ist eine sichere und möglichst sensitive sowie schnelle mikrobiologische Diagnostik von toxischen *C. difficile* nötig. In zahlreichen deutschen, europäischen und außereuropäischen Laboratorien wurde aus Kostengründen und aus Gründen der diagnostischen Schnelligkeit lediglich ein Direkt-Test für Stuhlproben auf Toxin A und B durchgeführt (4, 11). In Deutschland wird von der MIQ empfohlen, parallel eine Kultur auf *C. difficile* durchzuführen (10). Es liegen wenige Sensitivitätsdaten für Tests unterschiedlicher kommerzieller Kulturen vor. Daher haben wir hier eine Untersuchung zur Ermittlung der Mindestsensitivitätsgewinne durch drei verschiedene Kulturmedien gegenüber einem CdT-Direkttest durchgeführt.

Überraschenderweise war der CdT-Direkttest (Ridascreen, r-biopharm) mindestens 40%-Punkte (Punktschätzung) bzw. 21%-Punkte (untere 95% Konfidenzschranke) weniger sensitiv als der „Kulturmedium II-Test“ (CLO-Agar, BioMérieux mit CdT-Bestätigung). Der sich aus den Daten ergebende Mindestsensitivitätsgewinn war für das Kulturmedium II mit Abstand am höchsten gefolgt vom Kulturmedium III. Der für Kulturmedium I geschätzte Mindestsensitivitätsgewinn war statistisch nicht signifikant. Auch wenn unsere Untersuchungen dahingehend limitiert waren, dass keine TcdA und TcdB-Gen-Diagnostik durchgeführt wurde, so zeigte sich deutlich, dass Toxin A+B Direkttests offensichtlich nicht die hohe Sensitivität aufweisen, die Ihnen in der Literatur zugeschrieben wird (7), Tabelle 2. Diese Diskrepanz kann zum einen auf die in den meisten Studien gewählten Zytotoxizitätstests als Referenzmethode zurückgeführt werden. Zum anderen referenzierten andere Studien auf anscheinend wenig sensitive toxische Kulturmedien wie z.B. CCFA-Agar, bei dem unsere Daten im Vergleich zum CdT-Direkttest auch keinen signifikanten Sensitivitätsgewinn zeigten. Uns war es nicht möglich, parallel einen Zytotoxizitätstest durchzuführen. Jedoch haben bereits andere Autoren gezeigt, dass der Zytotoxizitätstest gewissen toxischen kulturellen Verfahren unterlegen war (18-20). Wurden dann CdT-Direkttests gegen eine sensitive toxische *C. difficile*-Kultur getestet, ergaben sich wie auch bei unseren Daten ernüchternd niedrige Sensitivitätswerte für die Direkttests (21-24).

Die grundsätzliche Frage:

Wie können Akkuratheitswerte von Tests auf toxische C. difficile ermittelt werden, wenn unklar ist, welche Methode als Referenzmethode statthaft ist?

wurde von uns hier durch die Angabe unterer Konfidenzschranken für Mindestsensitivitätsgewinne gelöst. Unter der im vorliegenden Fall plausiblen Annahme, dass ein als besser nachzuweisender Test (hier ein Kulturtest) mindestens so spezifisch ist wie ein möglicherweise zu ersetzender Test (hier der CdT-Direkttest), sind die von uns angegebenen Schranken statistisch korrekt und praktisch kaum verbesserbar, wie wir durch Betrachtung des üblichen latent class models (15) und Anwendung einer geeigneten Konfidenzschranke für Multinomialparameterdifferenzen (14) anderswo (Preprint Mattner L und Mattner F) ausführlich zeigen. Wir glauben, dass unsere Vorgehensweise auch in anderen Fällen anwendbar ist und ungerechtfertigte „Sensitivitätsberechnungen“ ersetzen sollte (z.B. die aus (7)).

Da von einer schnellen aber auch korrekten Diagnose besonders im Krankenhaus nicht nur das Wohl des betroffenen Patienten sondern auch das der Mitpatienten abhängt, sollte die mikrobiologische Diagnostik den häufigsten Erreger einer nosokomialen Diarrhoe mit hoher Sicherheit nachweisen können. Wir denken, dass die Kombination eines sensitiven kulturellen Verfahrens mit einem ein schnelles erstes Resultat bietenden Toxin A+B ELISA nach der heutigen Datenlage die beste und gebotene Diagnostik ist. Wünschenswert für die Zukunft wären auch verlässliche molekulargenetische Schnelltests auf toxische *C. difficile*.

Merkkasten:

- Einige kulturelle Verfahren zum Nachweis toxischer *C. difficile*-Stämme sind sensitiver als ein Toxin A + B Direkt-ELISA (CLO-Agar, BioMérieux; Clostridium-Selektivagar nach Brazier, Oxoid).
- Kulturelle Medien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer geschätzten Mindestsensitivitätsgewinne, Selektivitäten und Ablesbarkeit.
- Bei nun bekannter höchstens 79%iger Sensitivität des CdT-Direktnachweises ist das Mitführen eines sensitiven kulturellen Verfahrens essentiell, um CDI-Patienten sicher zu diagnostizieren.
- Ohne verlässlichen Referenztest ist es inadäquat „Sensitivitäten“ zu berechnen. Unter bestimmten Voraussetzungen können zur Quantifizierung eines diagnostischen Vorteils Mindestsensitivitätsgewinne geschätzt und publiziert werden.
- Nur der kulturelle Nachweis erlaubt eine Empfindlichkeitsbestimmung sowie molekulargenetische Typisierung zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge oder des Nachweises besonders pathogener Stämme (z.B. Ribotyp 027).

Anmerkung

Die Firma Oxoid stellte für die Untersuchung dankenswerterweise Kulturmedium III und den Latex-Agglutinationstest zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

1. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, et al. Update of Clostridium difficile-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* 2007 Jun;12(6):E1-2.
2. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Oct;12 Suppl 6:2-18.
3. McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kuttu PK. Recommendations for surveillance of Clostridium difficile-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Feb;28(2):140-5.
4. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006 Mar;12(3):409-15.
5. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tull P, Gastmeier P, et al. Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect.* 2008 May;14 Suppl 5:2-20.
6. Vonberg RP, Schwab F, Gastmeier P. Clostridium difficile in discharged inpatients, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jan;13(1):179-80.
7. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, et al. Diagnosis of Clostridium difficile infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2008 Dec;8(12):777-84.
8. Russmann H, Panthel K, Bader RC, Schmitt C, Schaumann R. Evaluation of three rapid assays for detection of Clostridium difficile toxin A and toxin B in stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Feb;26(2):115-9.
9. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46 Suppl 1:S12-8.
10. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Heft 9/200.
11. Fitzpatrick F, Oza A, Gilleece A, O'Byrne AM, Drudy D. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated disease in the Republic of Ireland: a survey of Irish microbiology laboratories. *J Hosp Infect.* 2008 Apr;68(4):315-21.
12. Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol.* 2005 Feb;54(Pt 2):187-91.
13. Pepe MS. The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction. New York: Oxford University Press; 2003.
14. Lloyd CJ, Moldovan MV. Exact one-sided confidence limits for the difference between two correlated proportions software: <http://mrw.interscience.wiley.com/suppmat/0277-6715/suppmat/sim.2708.html>. *Statist Med.* 2007;26:3369-84.
15. Gart JJ, Buck AA. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Am J Epidemiol.* 1966;83(3):593-602.
16. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2433-41.
17. Kuijper EJ, de Weerd J, Kato H, Kato N, van Dam AP, van der Vorm ER, et al. Nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001 Aug;20(8):528-34.
18. Delmee M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. *Clin Microbiol Infect.* 2001 Aug;7(8):411-6.
19. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic Clostridium difficile. *J Clin Microbiol.* 2007 Nov;45(11):3601-5.

20. Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrlin J, Ikpeama I, et al. Comparison of a Commercial Real-Time PCR Assay for tcdB Detection to a Cell Culture Cytotoxicity Assay and Toxigenic Culture for Direct Detection of Toxin Producing *Clostridium difficile* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 2008 Dec 10.
21. Altindis M, Usluer S, Ciftci H, Tunc N, Cetinkaya Z, Aktepe OC. [Investigation of the presence of *Clostridium difficile* in antibiotic associated diarrhea patients by culture and toxin detection methods]. *Mikrobiyol Bul.* 2007 Jan;41(1):29-37.
22. Anderson TL, McGregor A. Evaluation of the Clearview *Clostridium difficile* Toxin A Test and various selective culture media in comparison with the cytotoxin assay for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Pathology.* 2003 Jun;35(3):244-7.
23. Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):328-30.
24. Alcalá L, Sánchez-Cambronero L, Catalan MP, Sánchez-Somolinos M, Peláez MT, Marin M, et al. Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3833-5.
25. van den Berg RJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LS, Gerritsen HJ, Endtz HP, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5338-40.
26. Diederens BM, Verbakel H, Bergmans A, Peeters MF. Evaluation of two immunochromatographic tests (ImmunoCard Toxins A&B, Xpect C. *difficile* Toxin A&B) and PCR for the detection of *Clostridium difficile* toxins in faecal samples. *J Infect.* 2007 Jun;54(6):e251-2.
27. Lee SD, Turgeon DK, Ko CW, Fritsche TR, Surawicz CM. Clinical correlation of toxin and common antigen enzyme immunoassay testing in patients with *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 2003 Jul;98(7):1569-72.
28. Miendje Deyi VY, Vandenberg O, Mascart G, Gning S, Retore P, Douat N, et al. Diagnostic value of five commercial tests for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin Lab.* 2008;54(1-2):9-13.

Tabelle 1: Ergebnisse von 256 konsekutiven Ersteinsendungen von Patienten mit Diarrhoe bei vier Tests

Anzahl untersuchter Proben (n=256, davon 47 in mindestens einem Test positiv)	Kulturtest mit Nährmedium			CdT-Test direkt aus dem Stuhl
	I	II	III	
18	+	+	+	+
14	+	+	+	-
1	+	+	-	-
1	-	+	+	-
1	-	-	+	-
4	-	+	-	-
1	-	+	+	+
3	-	+	-	+
4	-	-	-	+
Summe positiver Resultate	33	42	35	26
Additive Mindestsensitivitätsgewinne gegenüber CdT-Direkttest (beispielhaft Prävalenz = 15%)				
Punktschätzung	18%	40%	23%	-
Untere 95% Konfidenzschranke	-4%*	21%	2%	-

Toxinproduzierende Kultur I: CDSA; Becton Dickinson; Ridascreen, r-Biopharm

Toxinproduzierende Kultur II: CLO, BioMérieux; Ridascreen, r-Biopharm

Toxinproduzierende Kultur III: Clostridium-Selektivagar nach Brazier, Oxoid; Ridascreen, r-Biopharm

CdT-Test direkt aus dem Stuhl: Ridascreen, r-Biopharm

*Sensitivitätsgewinn gegenüber CdT-Test direkt aus dem Stuhl nicht signifikant

Tabelle 2: Angebliche Sensitivitäten und Spezifitäten verschiedener Teste auf *C. difficile* Toxin A oder B im Stuhl und Toxin A oder B produzierende *C. difficile* („toxigene“ Kultur). (Für die Bestimmung der Akkuratheitswerte wurden bei den unten genannten Publikationen zum Teil unterschiedliche Referenzsysteme verwendet. Da z.Z. kein hinreichend gutes Referenzsystem existiert, bezeichnen wir die angegebenen Sensitivitäten und Spezifitäten als „angebliche“ Sensitivitäten bzw. Spezifitäten)

Autoren und untersuchte Tests	Anzahl untersuchter Stuhlproben	Verwendete Nenner zur Sensitivitäts-berechnung	angebliche Sensitivität	angebliche Spezifität	Bemerkungen
Van den Berg et al.(25) Meridian, ICTAB, Bioscience Europe, Boxtel, The Nederlands	367 Proben von 300 Patienten	Cytotoxizitätstest toxigenen Kultur	91% 79% ^a	97% 99% ^a	Patienten mit Diarrhoe und Anforderung auf <i>C. difficile</i> , Patienten (Klinikaufenthalt > 72 h); ^a rekalkulierte Werte nach Durchführung der toxinproduzierenden Kultur von Proben mit diskrepanten Testergebnissen
Diederer et al. (26) Meridian , ICTAB			88.6%		
Planche et al. (7, 8, 27) Meridian Premier		Cytotoxizitätstest mit oder ohne Kultur	95%	97%	
TechLab Quick Check		Cytotoxizitätstest mit oder ohne Kultur	84%	100%	Systematisches Review über verschiedene Toxin A + B Teste, aus Publikationen Daten zusammengeführt ohne zwischen verwendeten Referenzmethoden (Cytotoxizitätstest oder/und toxigene Kultur (ohne Blutzusatz)) zu unterscheiden
Remel Xpect		Cytotoxizitätstest mit oder ohne Kultur	82%	96%	
Meridian Immunocard		Cytotoxizitätstest mit oder ohne Kultur	90%	99%	
BioMérieux VIDAS		Cytotoxizitätstest mit oder ohne Kultur	76%	93%	
Alcala et al.(24) X/pect	367	Cytotoxizitätstest und toxinproduzierende Kultur	49%	96%	
Wampole Tox A/B Quick Check	367	Cytotoxizitätstest und toxinproduzierende Kultur	55%	96%	
ImmunoCard Toxin A+B	367	Cytotoxizitätstest und toxinproduzierende Kultur	67%	95%	
Miendje Deyi (28) Biostar OIA CdTOX AB	100	Cytotoxizitätstest	87%	99%	
Immunocard Toxins	100	Cytotoxizitätstest	91%	100%	
Toxin A/B QUIK	100	Cytotoxizitätstest	96%	100%	
CHEKTM					
Xpect	100	Cytotoxizitätstest	87%	100%	
Vorliegende Studie	256	In mindestens einer von drei Kulturtests positiv			Flüssige Stühle (nur Ersteinsendungen), vier Tests: Ridascreen, r- Biopharm und drei Kulturmedien mit Überprüfung der Toxigenität mittels Ridascreen, r-Biopharm
Ridascreen, r- Biopharm			51%	98%	
CDSA-Agar, BD (CCFA)			77%	100%	
CLO-Agar, Schafsblut, BioMérieux			98%	100%	
Clostridium-Selektivagar nach Brazier, Pferdeblut, Oxoid			81%	100%	

Abbildung 1: Beispiel einer *C. difficile* enthaltenden Stuhlprobe auf drei verschiedenen Fertignährmedien

Abbildung 1 a: Kulturmedium I (CDSA, Becton Dickinson)

Untere linke Hälfte der Platte: keine verdächtige Kolonie, zahlreiche „Begleitflora“

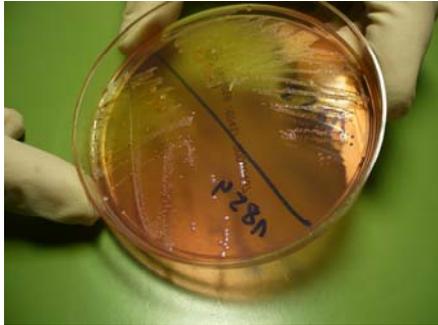


Abbildung 1b: Kulturmedium II (CLO-Agar, BioMérieux)

Untere rechte Hälfte der Platte: Reinkultur verdächtiger Kolonien



Abbildung 1c Kulturmedium III (Clostridium-Selektivagar nach Brazier, Oxoid):

Untere Hälfte der Platte: Eine verdächtige Kolonie bei zahlreicher Begleitflora

