

CAT

Critically Appraised Topic

Plaats van het opsporen van glutamaat dehydrogenase in de diagnostiek van *Clostridium difficile* geassocieerde diarree

Author: Sarah Ressler
Supervisor: Prof. Dr. J. Verhaegen
Date: 15/04/2008
Expiry date: 15/04/2010

CLINICAL BOTTOM LINE

Clostridium difficile is de meest frequent gediagnosticeerde oorzaak van nosocomiale infectieuze diarree, ongeveer 15-20% van antibiotica-geassocieerde diarree en bijna alle gevallen van pseudomembraneuze colitis, en epidemieën in ziekenhuizen zijn relatief frequent. Infecties met *Clostridium difficile* gaan niet enkel gepaard met een belangrijke morbiditeit en mortaliteit, een verlengde hospitalisatie met isolatiemaatregelen en behandeling brengt ook heel wat extra kosten met zich mee. Dit maakt dat de bacterie uitgegroeid is tot één van de meest belangrijke ziekenhuispathogenen. Een snelle diagnose en behandeling van *C. difficile*-geassocieerde diarree zijn belangrijk om progressie van de ziekte naar pseudomembraneuze colitis en nosocomiale verspreiding te voorkomen. De meeste guidelines stellen dat voor een maximale diagnostische sensitiviteit en specificiteit het opsporen van het cytopathogeen effect, eventueel in combinatie met cultuur, beschouwd moet worden als gouden standaard. Deze aanpak is echter zeer tijdrovend en arbeidsintensief en er zijn dan ook heel wat snelle enzyme immunoassays ontwikkeld voor de detectie van toxine A, toxine A/B, en recenter ook voor detectie van het common antigeen glutamaat dehydrogenase. Hoewel de sensitiviteit van deze immunoassays voor detectie van toxines lager is dan die van het opsporen van het cytopathogeen effect, die nog steeds als gouden standaard wordt beschouwd, worden deze toch in de meeste laboratoria gebruikt omwille van de korte turnaround tijd, de eenvoudige uitvoering van de testen en de voordelige kostprijs. Recent is ook de detectie van het glutamaat dehydrogenase in een aantal studies geëvalueerd en de conclusies zijn dat opsporen van dit enzyme, omwille van de hoge sensitiviteit en negatieve predicatieve waarde, een uitstekende screeningstest is voor *Clostridium difficile*. Uiteraard dienen positieve resultaten voor de aanwezigheid van glutamaat dehydrogenase steeds bevestigd worden met een toxinetest aangezien zowel toxinogene als niet-toxinogene *Clostridium difficile* stammen het common antigeen produceren.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Clostridium difficile is een belangrijke nosocomiale pathogeen en de meest frequent gediagnosticeerde oorzaak van infectieuze diarree verworven in het ziekenhuis. *Clostridium difficile* is een gram-positieve, anaërobe, spoorvormende bacil en werd voor de eerste maal geïsoleerd in 1935 uit de stoelgang van gezonde pasgeborenen. In de jaren '70 werd het

organisme geïdentificeerd als de belangrijkste oorzaak van pseudomembraneuze colitis. Momenteel wordt *C.difficile* beschouwd als oorzaak voor 15-25% van de gevallen van antibiotica-geassocieerde diarree en voor quasi alle gevallen van pseudo-membraneuze colitis. Tijdens de laatste decade is de incidentie van *C.difficile*-geassocieerde diarree progressief toegenomen en het is momenteel een significant klinisch probleem in Noord-Amerika en Europa. (R4,R5,R6)

Er is een grote variatie in de incidentie van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree bij gehospitaliseerde patiënten, van 0.1 tot 2%. In de Verenigde Staten zijn er meer dan 250 000 gevallen van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree per jaar. De incidentie van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree is tijdens de jaren '80 en '90 sterk toegenomen, waarschijnlijk ten gevolge van een verhoogd gebruik van breedspectrum antibiotica (vnl. derde generatie cefalosporines), hoewel deze toename voor een deel ook te verklaren is door de beschikbaarheid van betere detectiemethodes. Daarenboven is er een belangrijk probleem van contaminatie van de ziekenhuisomgeving. (R7,R8,R11)

Bij pasgeborenen en jonge kinderen wordt *Clostridium difficile*, zowel toxinogene als niet-toxinogene stammen, vaak geïsoleerd uit de stoelgang in afwezigheid van symptomen. Er is geen duidelijke verklaring voor de afwezigheid van symptomen bij deze kinderen waarbij toxines gedetecteerd worden; een mogelijke hypothese is de afwezigheid van toxine-receptoren in de immature gastro-intestinale tractus. Asymptomatisch dragerschap van het organisme wordt ook gezien bij mucoviscidose patiënten. Het aantal carriers neemt snel af met toenemende leeftijd, en op volwassen leeftijd is nog slechts 0-3% carrier. Tijdens hospitalisatie neemt kolonisatie echter toe tot 20-30% en zelfs hoger bij een langere hospitalisatieduur. Bij ongeveer een derde van deze patiënten treden er ook klinische symptomen op. De vegetatieve vorm kan niet lang overleven in de omgeving maar *Clostridium difficile* vormt sporen die zeer weerstandig zijn aan multiple ontsmettingsmiddelen en gedurende maanden in de omgeving kunnen overleven. De belangrijkste besmettingsbron in het ziekenhuis is de symptomatische patiënt en secundair ook de omgeving van de geïnfecteerde patiënt. Er is een intermitterende blootstelling van patiënten aan *Clostridium difficile* gedurende hun verblijf in het ziekenhuis, en er is een directe correlatie tussen de hospitalisatieduur en kolonisatie van het colon met *Clostridium difficile*. (R6,R7,R8,R21,R22,R23)

De disruptie van de normale bacteriële flora van het colon met een verminderde weerstand tegen kolonisatie met potentieel pathogene kiemen staat centraal in de pathogenese van *Clostridium difficile*-infectie. Meestal wordt dit veroorzaakt door antibiotica, voornamelijk clindamycine, ampicilline, amoxicilline en de cefalosporines, minder frequent ook door antineoplastische (vnl. methotrexaat) of immuunsuppressieve medicatie. Kolonisatie gebeurt via feco-orale weg, waarbij de sporen kunnen overleven in de zure omgeving van de maag en zo tot in het colon kunnen doordringen. (R5,R6,R22,R23) De belangrijkste risicofactoren die geassocieerd zijn met *Clostridium difficile*-infectie zijn hospitalisatie, toenemende leeftijd (≥ 65 jaar) en behandeling met antibiotica. Andere geïdentificeerde risicofactoren zijn ernst van de onderliggende ziekte, gastro-intestinale procedures, sondevoeding. Wat antibioticatherapie betreft lag de aandacht in de jaren '70 voornamelijk op clindamycine omwille van de associatie tussen dit antibioticum en het optreden van pseudomembraneuze colitis. Studies in de jaren '80 toonden echter aan dat vooral cefalosporines geassocieerd zijn met *Clostridium difficile* infecties, en op de tweede plaats breed-spectrum penicillines (waaronder amoxicilline). Meer recent is ook gebleken dat het gebruik van fluorochinolones een belangrijke risico-factor is voor infectie met het hypervirulent ribotype 027. (R9,R10)

Clostridium difficile-geassocieerde diarree is een toxine-gemedieerde ziekte. *Clostridium difficile* produceert twee belangrijke toxines, namelijk TcdA (308 kDa) en TcdB (270kDa), die behoren tot de grootste bacteriële toxines die op dit ogenblik gekend zijn. Aanvankelijk werd aangenomen dat enkel de productie van toxine A verantwoordelijk was voor de ziekte maar het isoleren van toxine A⁻ en toxine B⁺ stammen bij symptomatische patiënten en in kader van nosocomiale epidemieën hebben aangetoond dat ook toxine B een rol speelt in het ontstaan van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree. Omdat veel laboratoria een diagnostische test gebruiken die enkel toxine A detecteert is de prevalentie van toxine A⁻ / toxine B⁺ stammen niet goed gekend. (R5,R11,R24,R25) Beide toxines komen via een receptor-gemedieerde binding in de intestinale epitheelcellen terecht. Toxine A is voornamelijk een sterk enterotoxine en beperkt cytotoxisch terwijl toxine B zeer cytotoxisch is voor verschillende eukaryote cellijnen. Naast celdood induceren de toxines ook de vrijzetting van ontstekingsmediatoren en cytokines met infiltratie van de intestinale mucosa door neutrofielen en toegenomen vochtsecretie door het openen van de tight-juncties tussen de epitheelcellen van het colon waardoor de permeabiliteit toeneemt en er een waterige diarree ontstaat. Recent werd ook een stam beschreven die grotere hoeveelheden toxine A en B produceren dan gewoonlijk, ten gevolge van een deletie in een regulatorgen van de toxineproductie, en daarnaast nog een derde toxine, het zogenoemde “binary toxin”, waarvan de rol nog ongekend is. Deze stam toont resistentie tegen vele antibiotica, en meer bepaald tegen fluorochinolones, en behoort tot het ribotype O27. (R4,R6,R12)

Kolonisatie kan snel na opname optreden bij gehospitaliseerde patiënten, waarbij een groot deel van de patiënten asymptomatisch blijft. De term *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree (CDAD) wordt gebruikt om de symptomatische vormen van de ziekte te beschrijven. Een nieuwe term die reeds vaak wordt gebruikt is ‘*C.difficile* infection’ of CDI. De klinische presentatie van CDAD is zeer variabel, gaande van een zelf-limiterende diarree tot een ernstige pseudomembraneuze colitis, met mogelijke ernstige complicaties zoals toxisch megacolon en colonperforatie geassocieerd met een hoge mortaliteit. Het meest frequente symptoom is diarree, andere zijn abdominale pijn en krampen, koorts en leukocytose. Deze symptomen kunnen optreden vanaf enkele dagen na het starten van de antibiotica-therapie tot 8 weken na het beëindigen van de therapie. De diagnose kan berusten op specifieke endoscopische bevindingen, namelijk de aanwezigheid van pseudomembranen. Afwezigheid van dergelijke letsels sluit de diagnose echter niet uit zodat de sensitiviteit van endoscopie laag is. Bij klinisch vermoeden van CDAD of CDI gebeurt er dan ook best een confirmatie met laboratoriumtesten. Groei van *C.difficile* of de detectie van het specifieke antigen met behulp van EIA’s zijn een indicatie voor aanwezigheid van het micro-organisme, in vivo productie van toxines is een indicatie voor CDAD. (R5,R6,R10)

Er zijn verschillende methodes voor de detectie van *Clostridium difficile* en zijn toxines, en er blijft nog wat onenigheid bestaan over welke methode of combinatie van methodes de meest geschikte is. Microbiologische onderzoeken die routinematig mogelijk zijn op faeces houden in: 1. cultuur van faeces, 2. cytopathogeen effect, 3. enzyme linked immunosorbent assays (ELISA’s) voor detectie van toxines, 4. detectie van bacterieel antigen, 5. Polymerase Chain Reaction (PCR).

- Cultuur: voor het isoleren van *Clostridium difficile* uit stoelgangstalen kan er gebruik gemaakt worden van selectieve voedingsbodems zoals CCFA. Deze Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar werd in 1979 ontwikkeld door George et al. De bodems kunnen na 48 uur incubatie onder anaërobe omstandigheden afgelezen worden. De kolonies van *Clostridium difficile* hebben een typisch aspect op deze CCFA bodems, ze vertonen namelijk een goudgele fluorescentie met rafelige, gekartelde randen en een ‘gemalen glas’

aspect indien bekeken met een stereomicroscop. Deze typische morfologie en confirmatie door middel van een Gramkleuring, gram-positieve staven (de sporen zijn enkel zichtbaar bij kweek op bloedagar), zijn voldoende voor de identificatie van *Clostridium difficile*.

De sensitiviteit van cultuur kan verhoogd worden door de toevoeging van natrium taurocholaat aan de bodem dat het kiemen van de sporen bevordert. Een andere techniek is de voorbehandeling van het staal met alcoholshock, waarbij gelijke volumes ethanol en stoelgang gedurende 1 uur voor het enten gemengd worden.

Kweek alleen laat geen onderscheid toe tussen toxinogene en niet-toxinogene stammen, beiden groeien even goed en hebben dezelfde fenotypische eigenschappen. Het isoleren van *Clostridium difficile* is noodzakelijk voor het uitvoeren van gevoeligheidsbepalingen en voor typering van de geïsoleerde stammen. Isolatiemethoden hebben als bijkomend voordeel dat men bij stalen waarbij de rechtstreekse toxinebepaling negatief was deze bij groei van *Clostridium difficile* nogmaals op de kolonies kan uitvoeren, de zogenaamde “second-look” cytotoxiciteit. (R13,R14,R15,R16,R20,R26,R27,R28)

- Cytopathogeen effect (CPE): deze methode wordt nog steeds beschouwd als gouden standaard voor de diagnose van CDAD omwille van de hoge sensitiviteit. Er kunnen verschillende cellijnen gebruikt worden voor de detectie van het cytotoxine, de ouderdom van de cellijnen kan van belang zijn. De gehanteerde verdunningsfactor voor de detectie van het cytopathogeen effect is een kritisch punt, een te lage verdunningsfactor kan resulteren in een te groot aantal vals-positieve resultaten terwijl een te grote verdunning een daling van de sensitiviteit kan geven. Het cytopathogeen effect treedt op ten gevolge van een verstoring van het cytoskelet van de cellen en resulteert in een zwelling van deze cellen zodat deze een rond aspect krijgen. Bevestiging van de specificiteit van dit effect gebeurt door middel van een neutralisatie-test met een specifiek antiserum gericht tegen *Clostridium difficile* of *Clostridium sordellii*. De belangrijkste voordelen zijn de hoge sensitiviteit en specificiteit, nadelen zijn de lange turnaround time van 24-48 uur, de test is ook relatief arbeidsintensief en laboratoria beschikken vaak niet over celculturen. De test wordt in sommige laboratoria nog uitgevoerd omwille van de hoge sensitiviteit (de test detecteert toxine B in de grootte-orde van pico-gram en is zo de meest gevoelige methode) maar er is een gebrek aan controle en standaardisatie. (R1,R2,R3,R15,R17)
- Enzyme immunoassay voor de detectie van toxine A of toxine A+B: veel van de EIAs die momenteel op de markt zijn maken gebruik van monoclonale antitoxine A antilichamen, een minderheid detecteert beide toxines. Op basis van diermodellen dacht men oorspronkelijk dat enkel toxine A belangrijk was in het optreden van CDAD en dat toxine B eerder een merker was voor toxine productie. Vandaar dat commerciële kits aanvankelijk ontwikkeld werden voor de detectie van toxine A. Recentere studies uitgevoerd op menselijke intestinale cellen, naar aanleiding van het isoleren van stammen die enkel toxine B produceren bij symptomatische patiënten, hebben het cytotoxisch effect en belang van toxine B aangetoond. Momenteel zijn er dan ook kits op de markt die beide toxines opsporen. Er zijn heel wat publicaties die de performantie van verschillende kits met elkaar vergelijken, maar er is geen meta-analyse die de superioriteit van een welbepaalde test aantoonst. Hoewel de sensitiviteit van deze assays lager is dan die van de celculturen hebben de snelle turnaround time en de eenvoudigere uitvoering van de testen aanleiding gegeven tot het gebruik van deze testen door heel wat laboratoria. De meeste auteurs raden het gebruik van een assay aan die zowel toxine A als toxine B detecteert, omdat de performantie van deze assays beter lijkt te zijn en tevens omwille van het belang van toxine A negatieve/toxine B positieve stammen die niet opgespoord worden met een assay die enkel toxine A detecteert. Er is wel een verschil in kostprijs tussen een assay die enkel toxine A detecteert en een assay die beide toxines detecteert. De assays voor

detectie van toxine A zijn gemiddeld een derde goedkoper. Omwille van dit verschil in kostprijs hebben veel laboratoria een strategie waarbij er in eerste instantie toxine A wordt opgespoord rechtstreeks in stoelgang. Bij een negatief resultaat en groei van *C.difficile* op CCFA bodem wordt een toxinetest op de kolonies uitgevoerd die beide toxines detecteert. Dit is zeker een verdedigbare manier van werken aangezien toxine A-/toxine B+ stammen eerder zeldzaam zijn (<1% volgens de gegevens van Delmée, 3% in het Brits referentiecentrum). (R1,R3,R15)

- Glutamaat dehydrogenase (GDH): van een commerciële latex agglutinatie-test, Culturette Brand (Marion) werd oorspronkelijk beweerd dat deze toxine A opspoorde. Nadien werd echter aangetoond dat deze niet toxine A maar wel het enzym glutamaat dehydrogenase opspoorde, een matig specifieke merker voor *C.difficile*. Nu wordt de test aangebracht als een screeningstest voor de detectie van het organisme.

GDH is een enzyme dat door alle *Clostridium difficile* isolaten in relatief grote hoeveelheden geproduceerd wordt. Testen die dit common antigen of specifiek antigeen opsporen maken dus, net zoals cultuur, geen onderscheid tussen toxine producerende en niet-toxine producerende isolaten. (R1,R14,R30,R31,R32)

- Polymerase Chain Reaction (PCR): er zijn verschillende methodes ontwikkeld zowel voor de detectie van toxine A of B als voor de directe detectie van *Clostridium difficile* genen in faecesstalen. Hoewel deze moleculaire technieken accuraat zijn is de DNA extractie complex en technisch veeleisend wegens de aanwezigheid van PCR inhibitoren in faecale stalen. Recent zijn er wel eenvoudigere procedures ontwikkeld voor de detectie van het toxine B die zeer goed correleren met de huidige gouden standaard, met een sensitiviteit van 91.5-96.3% en een specificiteit van 100%. Deze gaan echter wel gepaard met een hogere kostprijs. (R1,R15,R33,R34,R35)

De meeste guidelines opgesteld in de Verenigde Staten en Engeland stellen dat de detectie van toxines met behulp van celculturen of immunoassays volstaat. In verschillende andere Europese landen daarentegen wordt de combinatie van cultuur en detectie van toxines voorgesteld als optimale detectiemethode voor *Clostridium difficile*. Er is echter een grote variatie in de gebruikte methoden voor de laboratoriumdiagnostiek van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree binnen Europa.

Het RIZIV voorziet een terugbetaling voor de diagnose van CDAD voor de combinatie van kweek en opsporen van toxines A of B. Hieraan is een diagnoseregeling 37 verbonden waarbij deze verstrekking enkel aangerekend mag worden bij kinderen boven twee jaar, tenzij na transplantatie. (R1,R15,R16,R26,R29)

Het is niet volledig duidelijk of patiënten met milde symptomen behandeld moeten worden met antibiotica tegen *C.difficile*. Sommige studies suggereren dat het onderbreken van de antibioticatherapie voldoende kan zijn in de aanpak van CDAD.

Voor de behandeling van CDAD met antibiotica zijn er twee producten die gebruikt worden namelijk vancomycine of metronidazole, beiden via orale weg toegediend. Initieel werd vancomycine gebruikt, en vancomycine blijft nog steeds het enige antibioticum met FDA approval (Food and Drug Administration) voor de behandeling van CDAD. De farmacologische eigenschappen zijn ideaal voor de behandeling van een gevoelig pathogeen dat zich in het lumen van het colon bevindt, aangezien het niet geabsorbeerd wordt en de levels in het colon gewoonlijk meer dan 100 maal hoger liggen dan de hoogste minimaal inhiberende concentratie. Guidelines van de Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), Infectious Diseases Society of America (IDSA) en Centers for Disease Control and Prevention (CDC) vermelden echter metronidazole als voorkeursbehandeling. Dit is gebaseerd op een gerapporteerde equivalente efficaciteit in vergelijking met vancomycine in verschillende klinische trials, het risico op kolonisatie met vancomycine-resistente

enterokokken bij het gebruik van dit agens bij CDAD en de lage kostprijs in vergelijking met vancomycine. Nadelen van metronidazole zijn echter het slechte farmacologische profiel voor de behandeling van een pathogeen in het lumen van het colon daar het quasi volledig geabsorbeerd wordt, behalve in geval van diarree, en de bevinding dat sommige stammen in vitro resistentie vertonen. Veel auteurs hebben echter een voorkeur voor behandeling met vancomycine per os, zeker bij ernstig zieke patiënten en bij een minder goede respons op metronidazole. (R10,R18,R36)

QUESTION(S)

1. Is er een plaats voor het opsporen van glutamaatdehydrogenase in de diagnostiek van *Clostridium difficile*-geassocieerde diarree?
2. Zou de detectie van dit antigeen een mogelijk alternatief kunnen zijn voor cultuur? Is de detectie van het antigeen in combinatie met detectie van toxines een alternatief voor cultuur in combinatie met detectie van toxines?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "*Clostridium difficile*", "Clostridium enterocolitis", "antibiotic associated colitis", "Clostridium enterotoxin"
Other key words: *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, antigen, toxin,
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews, Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), Belgian Infection Control Society (<http://www.belgianinfectioncontrolociety.be>), Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov>), The Society for Healthcare Epidemiology of America (<http://www.shea-online.org/>), Infectious Diseases Society of America (<http://www.idsociety.org/>), European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseases (<http://www.escmid.org/>).
- 4) UpToDate Online version 14.2 (2005)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)

- Berrington A, Borriello SP, Brazier JS et al. National *Clostridium difficile* Standards Group: report to the Department of Health. J Hosp Infect 2004;56 Suppl 1:1-38. R1
- Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Am J Gastroenterol 1997;92(5):739-750. R2
- Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J Jr. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Shea Position Paper. Infect Control Hosp Epidemiol 1995;16(8):459-477. R3

2) Reviews

- Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev;1(1): 1-18. R4
- Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. Intern Med J 2007;37(8): 561-568. R5
- Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Arch Intern Med 2001;161(4): 525-533. R6
- Riley TV. Nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*. Cur Opin Infect Dis 2004;17(4):323-327. R7
- Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect 2007;7(8):405-410. R8
- Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998;40(1):1-15. R9
- Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C.difficile* infection. Clin Infect Dis 2008;46 (Suppl 1):S4-11. R10
- Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005;18(2):247-263. R11
- Poxton IR, McCoubrey, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2001;7(8):421-427. R12
- Knoop FC, Owens M, Crocker IC. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev 1993;6(3):251-265. R13
- Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003;41(2):531-534. R14
- Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001;7(8):411-416. R15
- Delmée 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;54(Pt2):187-191. R16
- Peterson LR, Kelly PJ. The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Infect Dis Clin North Am 1993;7(2):277-293. R17
- Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. Ann Intern Med 2006;145(10):758-764. R18

- Gerding DN, Brazier JS. Optimal methods for identifying *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis 1993;16(Suppl 4):S439-442. R19
- Brazier JS. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. Clin Infect Dis 1993;16(Suppl 4):S228-233. R20

3) Original Articles

- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 1989;320(4):204-210. R21
- Riley TV. *Clostridium difficile*: a pathogen of the nineties. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17(3):137-141. R22
- Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. Lancet 1998;351(9103):633-636. R23
- Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, Harding GK, Dyck B, Olekson K, Embil JM. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000;38(7):2706-2714. R24
- Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmée M, Avesani V, Merrigan MM, Gerding DN. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. J Clin Microbiol 2003;41(4):1543-1547. R25
- Barbut F, Kajzer C, Planas N, Petit JC. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 1993;31(4):963-967. R26
- George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 1979;9(2):214-219. R27
- Bouza E, Pelaez T, Alonso A, Catalan P, Muñoz P, Créixems MR. 'Second-look' cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. J Hosp Infect 2001;48(3):233-237. R28
- Barbut F, Delmée M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, Lalande V, Schneider C, Mastrantonio P, Alonso R, Kuipjer E, Tvede M and the ESCMID Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2003;9(10):989-996. R29
- Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. J Clin Microbiol 1991;29(11):2639-2642. R30

- Massey V, Gregson DB, Chagla AH, Storey M, John MA, Hussain Z. Clinical usefulness of components of the Triage immunoassay, enzyme immunoassay for toxins A and B and cytotoxin B tissue culture assay for the diagnosis of *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Clin Pathol* 2003;119(1):45-49. R31
- Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, Carman RJ, Genheimer CW, Gleaves CA, Kohlhepp SJ, Young S, Perez S, Ye K. Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3837-3840. R32
- Alonso R, Muñoz C, Gros S, Garcia de Viedma D, Pelaez T, Bouza E. Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* from stool samples by a nested PCR of toxin B gene. *J Hosp Infect* 1999;41(2):145-149. R33
- Guilbault C, Labbé AC, Poirier L, Busque L, Béliveau C, Laverdière M. Development and evaluation of a PCR method for detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2288-2290. R34
- Van den Berg RJ, Kuijper EJ, van Coppenraet LE, Claas EC. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(2):184-186. R35
- Monaghan T, Boswell T, Mahida YR. Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. *Gut* 2008 [Epub ahead of print]. R36
- Barbut F, Lalande V, Daprey G, Cohen P, Marle N, Burghoffer B, Petit JC. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(6):481-484. R37
- Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(2):55-64. R38
- Snell H, Ramos M, Longo S, John M, Hussain Z. Performance of the TechLab *C.DIFF* CHEK-60 enzyme immunoassay (EIA) in combination with the *C.difficile* Tox A/B II EIA kit, the Triage *C.difficile* panel immunoassay, and a cytotoxin assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4863-4865. R39
- Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, Carroll KC. 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;45(11):3601-3605. R40
- Reyes RC, John MA, Ayotte DL, Covacich A, Milburn S, Hussain Z. Performance of TechLab *C.DIFF* QUIK CHEK and TechLab *C.DIFFICILE* TOX A/B II for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(1):33-37. R41

- 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):328-330. R42
- Gilligan PH. Is a two-step glutamate dehydrogenase antigen-cytotoxicity neutralization assay algorithm superior to the premier toxin A and B enzyme immunoassay for laboratory detection of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2008;46(4):1523-1525. R43

4) Reference Works, Handbooks and Databases

- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2003 Principles and practice of infectious diseases, sixth edition, Elsevier Churchill Livingstone.

5) Posters, “grey literature”, presentations

- Isolatiebeleid *Clostridium difficile*: voorzorgsmaatregelen bij een geïnfecteerde patiënt. UZ Leuven Ziekenhuishygiëne 2007.

APPRAISAL

1) Is er een plaats voor het opsporen van GDH in de diagnostiek van CDAD?

1.1. Preanalytical considerations (patient variables, sample stability)

Enkel vloeibare of ongevormde stoelgang is geschikt voor het opsporen van CDAD. Aangezien 10% of meer gehospitaliseerde patiënten gekoloniseerd kunnen zijn met *C.difficile*, kan het opsporen van *C.difficile* en zijn toxines in gevormde stoelgang de specificiteit van de diagnose van CDAD verminderen. Detectie van het organisme of zijn toxines in stoelgang van asymptomatische patiënten heeft geen enkel klinisch nut en wordt dan ook niet aangeraden, enkel in kader van epidemiologische studies. Ook tijdens of na de behandeling (‘test of cure’) is het opsporen van *C.difficile* of zijn toxines niet zinvol. De aanwezigheid van *C.difficile* of zijn toxines in de stoelgang van neonati en kleine kinderen is meestal niet geassocieerd met klinische ziekte, zodat diagnostiek bij kinderen jonger dan één jaar niet zinvol is.

Herhalen van de diagnostiek bij een negatief resultaat kan nuttig zijn bij persisterende diarree, hoewel de meerwaarde hiervan beperkt is. (R1,R2,R3,R6,R15,R17,R19)

Wissers zijn geen geschikte stalen voor de opsporing van toxines door het te laag volumegehalte.

Ten gevolge van een snel verlies van de cytotoxische activiteit zijn enkel verse stoelgangstalen geschikt voor de diagnostiek, stalen zouden optimaal binnen 2 uur getest moeten worden op de aanwezigheid van toxines. Indien het onderzoek niet onmiddellijk uitgevoerd kan worden moeten de stalen bewaard worden op 4°C. Cultuur van *C.difficile* wordt niet beïnvloed door slechte staalbewaring omwille van spoorvorming van het organisme. (R15,R20)

Situatie in Gasthuisberg:

Alle stoelgangstalen met een aanvraag voor detectie van *Clostridium difficile* worden getest, er worden geen selectiecriteria toegepast. Het valt toch wel op dat de aanvragen niet altijd correct gebeuren, regelmatig ontvangen wij gevormde stoelgangstalen, stalen zijn ook vaak afkomstig van kinderen jonger dan één jaar. Er

worden vanuit verschillende diensten herhaaldelijk bijkomende stalen opgestuurd van patiënten met diarree waarbij een eerste resultaat negatief was, en van patiënten met een bewezen CDAD ontvangen wij ook regelmatig follow-up stalen.

1.2. Detectie van het glutamaat dehydrogenase antige

Er zijn momenteel meerdere commerciële kits (EIA's) op de markt die het zogenaamde common antige of specifieke antige opsporen. Dit is een glutamaat dehydrogenase (GDH), opgebouwd uit zes identieke subunits, en wordt in grote hoeveelheden geproduceerd door zowel toxigene als niet-toxigene isolaten. Een belangrijk voordeel van deze testen is de korte turn around time (TAT) van 15-45 minuten. Een belangrijke beperking is het feit dat de detectie van GDH niet toelaat de diagnose van CDAD te stellen, maar enkel de aanwezigheid van het organisme in stoelgang aantoot. (R14,R30,R31)

Zheng et al evalueerden de *C.DIFF* CHEK (TechLAB) door deze te vergelijken met een in-house PCR voor de detectie van het GDH gen *gluD* en met bacteriële cultuur (CCFA). Er was een zeer goede correlatie tussen de resultaten van de GDH assay en de PCR, de correlatie tussen zowel de GDH assay als PCR met cultuur was veel minder. Deze resultaten suggereren dat de *C.DIFF* CHEK een meer accurate indicator is dan cultuur voor de detectie van *C.difficile* in stoelgangstalen. (R32)

1.3. Laboratoriumdiagnostiek van *C.difficile*

Oorspronkelijk gebeurde de diagnostiek van *C.difficile* door een combinatie van bacteriële cultuur en detectie van toxines door middel van celculturen. De Society for Healthcare Epidemiology of America adviseert zowel cultuur als een cytotoxiciteit assay uit te voeren op stoelgangstalen van patiënten verdacht voor CDAD. (R3) Deze aanpak is echter problematisch omdat beide testen een lange turnaround tijd hebben en ze ten vroegste pas na twee dagen resultaten geven. Daarom dat celculturen in sommige laboratoria nog wel gebruikt worden ter ondersteuning van de diagnostiek, maar de meeste laboratoria maken gebruik van EIA's voor de detectie van toxines omwille van de kortere turnaround tijd en de eenvoudige uitvoering van dergelijke testen. Detectie van toxines wordt door veel auteurs als de standaard diagnose van CDAD beschouwd, voornamelijk in de Verenigde Staten, andere auteurs beschouwen de combinatie van cultuur en detectie van toxines als noodzakelijk voor een optimale diagnose. Bij het gebruik van een commerciële kit voor de detectie van toxines is het aangewezen een test te gebruiken die zowel toxine A als B opspoort, de sensitiviteit van commerciële kits die beide toxines detecteren is hoger dan deze van kits die enkel toxine A detecteren.

Situatie in Gasthuisberg:

Diagnostiek van CDAD gebeurt door een combinatie van opsporen van toxines en detectie van *C.difficile* door cultuur. Voor de detectie van toxines wordt gebruik gemaakt van een kit die zowel toxine A als B detecteert, namelijk de ImmunoCard® Toxins A & B® van Meridian. De toxines worden steeds 's morgens bepaald, stalen worden in afwachting bewaard in de koelkast. Nadien worden de stoelgangstalen geënt op een CCFA bodem die dan gedurende 48 uur in anaërobie worden geïncubeerd. Indien er groei is van *C.difficile* uit een staal waarbij de toxines negatief waren gebeurt er een zogenaamde "second-look" cytotoxiciteit op de kolonies.

1.4. Wat is de plaats van het opsporen van GDH in de diagnostiek van CDAD? Is dit een mogelijk alternatief voor cultuur?

Literatuur

Er zijn reeds verschillende studies uitgevoerd met betrekking tot de plaats van de detectie van GDH in de laboratoriumdiagnostiek van CDAD. Hieronder volgt een kort overzicht van enkele grote studies.

- Barbut et al evalueerden een immunoassay dat tegelijk het GDH en toxine A detecteert, het Triage *C.difficile* Panel (Biosite). Deze test werd vergeleken met een cytotoxicity assay voor de detectie van toxine B met behulp van celculturen, de referentiemethode.

De sensitiviteit van de detectie van GDH in vergelijking met cultuur was 90.8%. Voor toxine A was de sensitiviteit 79.4% in vergelijking met de cytotoxiciteit assay, met een specificiteit van 99.6%. (Tabel1+2)

Als de detectie van GDH vergeleken wordt met de detectie van toxine B, bekeken vanuit het stangpunt dat de GDH test als een screening voor toxigenen stammen wordt gebruikt, dan is de negatieve predictieve waarde 99.6%. (Tabel3)

Tabel1

Resultaten van TR-GDH in vergelijking met cultuur.

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
TR-GDH	90,8	98,7	95,8	97

Tabel2

Resultaten van TR-ToxineA in vergelijking met cytotoxiciteit assay voor toxine B.

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
TR-Toxine A	79,4	99,6	96,4	97,5

Tabel3

Resultaten van TR-GDH in vergelijking met de detectie van toxine B (cytotoxiciteit assay).

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
TR-GDH	97,1	85,6	45,8	99,6

Besluit: het Triage *C.difficile* panel is een snelle test (20 min) en gemakkelijk uit te voeren. Een negatief resultaat voor zowel GDH als toxine A betekent dat de aanwezigheid van een toxigenen *C.difficile* stam met een betrouwbaarheid van 99.6% kan uitgesloten worden. (R37)

- Vanpoucke et al evalueerden zes commerciële kits voor de detectie van *Clostridium difficile* toxine en/of antigeen in stoelgang, één latex agglutinatie test voor de detectie van het *C.difficile*-geassocieerde antigeen (Culturette brand CDT, Becton Dickinson), twee ELISA's voor de detectie van toxines (Culturette brand Toxin CD detecteert toxine A, Becton Dickinson; Ridascreen *C.difficile* Toxin A/B, R-biopharm), twee chromatografische assays voor de detectie van toxine A (Clearview *C.difficile* A, Oxoid, en ColorPac Toxin A, Becton Dickinson) en één EIA die tegelijk GDH en toxine A detecteert (Triage *C.difficile* Panel, Biosite).

Er werd gebruik gemaakt van de celcultuur cytotoxine assay als gouden standaard, en met PCR werd onderscheid gemaakt tussen toxinogene en niet-toxinogene stammen door bevestiging van de aanwezigheid van toxine A en/of B genen.

Triage *C.difficile*® (Biosite) en twee nieuwere chromatografische assays hadden een hogere sensitiviteit dan de conventionele EIA's (95% voor Triage en 89% voor zowel Clearview *C.difficile* A® en ColorPac Toxin). De specificiteit van deze nieuwere assays is echter lager dan die van de conventionele EIA's.

Voor Triage was de sensitiviteit van detectie van GDH 93% en 77% voor toxine A. De negatieve predictieve waarde van het Triage panel was 96%.

De specificiteit van het Triage panel was 75%, met een specificiteit van 75% voor het GDH en 97% voor toxine A. (Tabel 1) (R38)

Tabel 1

Vergelijking van cultuur en de verschillende commerciële assays met de celcultuur cytotoxiciteit assay

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
Cultuur	98	93	75	99
Culturette brand CDT (antigeen)	23	99	81	88
Culturette brand Toxin CD	73	95	84	90
Ridascreen <i>C.diff</i> ToxinA/B	57	97	89	83
Clearview <i>C.diff</i> A	89	83	71	94
ColorPac ToxinA	89	89	79	95
Triage GDH	93	75	68	95
Triage ToxA	77	97	94	88
Triage <i>C.diff</i> panel	95	75	68	96

PPW, Positieve predictieve waarde; NPW, Negatieve predictieve waarde

Besluit: de nieuwe chromatografische assays en het Triage panel hebben een hogere sensitiviteit dan de conventionele assays. Ze hebben ook een hoge

negatieve predictieve waarde. De sensitiviteit blijft echter lager dan de gouden standaard, namelijk opsporen van het cytopathogeen effect. (R38)

- Massey et al evalueerden het klinisch nut van de componenten van het Triage panel® (Biosite), zijnde toxine A en GDH, en een EIA voor toxine A en B (*C.DIFFICILE* TOX A/B II®, TechLab) met de detectie van toxine B met celculturen (gouden standaard).

Voor het Triage panel was de sensitiviteit van detectie van GDH 97.2% met een specificiteit van 87%, de negatieve predictieve waarde (NPW) was 98.9%; voor toxine A was de sensitiviteit 69.9% en de specificiteit 99.3%, met een NPW van 90.5%. De sensitiviteit van de toxine A/B kit bedroeg 74.8%. (Tabel 2) (R31)

Tabel 2

Sensitiviteit, specificiteit en predictieve waarde van de *C.difficile* merkers.

Merker	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
GDH	97,2	87	72	98,9
Toxine A	69,9	99,3	97,1	90,5
Toxine A/B	74,8	97,6	93	91,9

PPW: Positieve predictieve waarde, NPW: Negatieve predictieve waarde

Besluit: de beste aanpak binnen het laboratorium voor de diagnose van CDAD is het testen van de stoelganstalen met het Triage Micro Panel. GDH heeft een NPW van bijna 99% en toxine A is heel specifiek. Zo kunnen stalen positief voor beide merkers geantwoord worden als aanwezigheid van toxinogene *C.difficile*, en stalen negatief voor beide merkers als negatief. Stalen met aanwezigheid van GDH en een negatief resultaat voor toxine A moeten verder getest worden met celculturen voor detectie van het CPE, of eventueel met een EIA die toxine B detecteert. (R31)

- Snell et al vergeleken de *C.DIFF* CHEK-60® (TechLab) voor GDH in combinatie met de *C.DIFFICILE* TOX A/B® (TechLab) voor toxine A/B met Triage® (Biosite) (detectie van GDH en toxine A), een cytotoxine assay en cultuur. Alle *C.difficile* isolaten werden met PCR getest op de aanwezigheid van toxine A en B genen.

Een staal dat positief was voor toxine A en/of B en waarbij met PCR een toxigene *C.difficile* stam werd geïsoleerd werd beschouwd als true positief.

C.DIFF CHEK-60 GDH (TL-GDH) had een sensitiviteit van 93.5%, een specificiteit van 98% en een NPW van 98.5%.

Triage GDH (TR-GDH) had een sensitiviteit van 84.9%, een specificiteit van 98.8% en een NPW van 96.6%. (Tabel 3) (R39)

Tabel 3

Detectie van GDH door TL-GDH en TR-GDH in stalen positief voor *C.difficile* met cultuur.

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	Positieve predictieve waarde (%)	Negatieve predictieve waarde (%)
TL-GDH	93,5	98	91,6	98,5
TR-GDH	84,9	98,8	94	96,6

Tabel 4

Detectie van CDAD met een cytotoxine assay (C-Tox), Tox A/B en TR-ToxA.

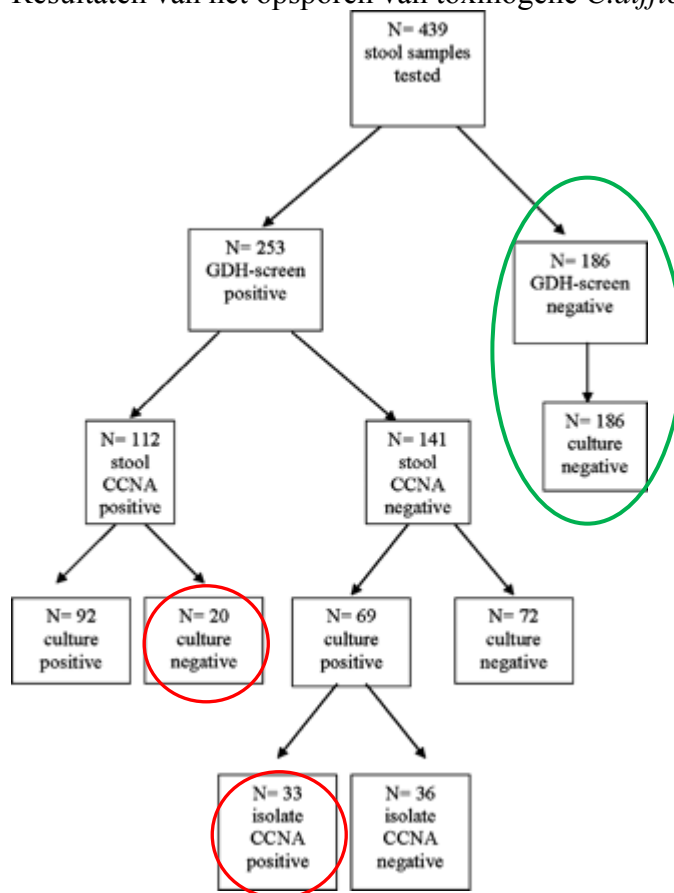
Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	Positieve predictieve waarde (%)	Negatieve predictieve waarde (%)
C-Tox	96,1	99,3	94,3	99,5
Tox A/B	84,6	98,2	84,6	98,2
TR-ToxA	69,2	100	100	96,5
TR-GDH, Tox A/B en C-Tox	100	100	100	100
TL-GDH, TR-ToxA en C-Tox	96,1	100	100	99,5

Besluit: de beste aanpak in het laboratorium voor de diagnose van CDAD is in eerste instantie het staal te testen op aanwezigheid van GDH en, indien positief, de aanwezigheid van toxines op te sporen met een EIA voor toxines. GDH positieve en toxine-negatieve stalen worden best verder getest voor het opsporen van het cytopathogeen effect met celculturen. (R39)

- Reller et al vergeleken de opbrengst van cultuur gecombineerd met opsporen van het CPE op de isolaten (indirect) met een twee-staps algoritme. In het algoritme werden de stalen in een eerste stap gescreend op de aanwezigheid van GDH (*C.DIFF* CHEK, TechLab) en indien positief getest op aanwezigheid van toxines door middel van celculturen voor detectie van het CPE rechtstreeks op stoelgang (direct). Indien de cytotoxiciteit assay rechtstreeks op stoelgang negatief was gebeurde er een PCR voor de detectie van toxigene *C.difficile*. Detectie van *C.difficile* door middel van de GDH screening of door cultuur in combinatie met een positieve cytotoxiciteit assay (direct of indirect) werd beschouwd als terecht positief. Twintig stalen met toxinogene *C.difficile* volgens het algoritme werden niet geïdentificeerd met cultuur. Cultuur gevolgd door detectie van het CPE op de kolonies kon echter 33 stalen identificeren als positief voor toxinogene *C.difficile*

die niet werden opgespoord met het algoritme. De berekende sensitiviteiten voor het twee-staps algoritme en cultuur waren respectievelijk 77% en 87%. De GDH screening identificeerde 100% van de cultuur positieve stalen (zonder onderscheid te maken tussen toxinogene en niet-toxinogene *C.difficile*). (Figuur 1) Besluit: GDH is een uitstekende screeningtest voor de detectie van toxinogene *C.difficile*. Ondanks de lagere sensitiviteit van het twee-staps algoritme ten opzichte van cultuur, is het toch de strategie die de voorkeur krijgt voor het opsporen van toxigene *C.difficile* in routine wegens de kortere turnaround tijd in vergelijking met cultuur gevolgd door een cytotoxiciteit assay op de kolonies. (R40)

Figuur 1
Resultaten van het opsporen van toxinogene *C.difficile*.



- Reyes et al vergeleken de performantie van de *C.DIFF* QUIK CHEK (QC-GDH) in combinatie met de *C.DIFFICILE* TOX A/B II (QC-toxinA/B) (beiden van TechLab) met het Triage® Micro *C.difficile* panel (TR-GDH en TR-toxinA, Biosite), cultuur en een cytotoxiciteit assay.

Stalen positief voor GDH of cultuur en toxine (QC-toxinA/B, TR-toxinA of met de cytotoxiciteit assay) werden beschouwd als terecht positief. Deze combinatie werd gebruikt als gouden standaard voor de berekening van de sensitiviteit en specificiteit van de membraangebonden immunoassays.

Voor de detectie van GDH was de sensitiviteit van QC-GDH significant hoger (93.5%) dan deze van TR-GDH (79.5%). De specificiteit van TR-GDH was echter

significant hoger (100%) dan deze van QC-GDH (96.9%). In vergelijking met cultuur is de sensitiviteit van TR-GDH en QC-GDH respectievelijk 93% en 94%. Wat de toxines betreft was de sensitiviteit van de QC-toxin A/B hoger dan die van TR-toxinA (80.4% versus 73.9%), en de specificiteit van beide testen was vergelijkbaar (99.7% voor QC-toxin A/B, 100% voor TR-toxinA). (Tabel 5) (R41)

Tabel 5

Performantie karakteristieken van de membraangebonden immunoassays vergeleken met de diagnostische gouden standaard voor de detectie van toxinogene stammen.

EIA's	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
QC-GDH	93,5	96,9	87,9	98,4
QC-toxin A/B	80,4	99,7	97,3	97,4
TR-GDH	79,5	100	100	94,5
TR-toxinA	73,9	100	100	96,6

PPW: Positieve predictieve waarde, NPW: Negatieve predictieve waarde

Besluit: deze studie toont aan dat een immunoassay voor de detectie van GDH een plaats kan hebben in de laboratoriumdiagnose van CDAD. Indien deze positief is moet het staal getest worden op de aanwezigheid van toxines met een immunoassay. Bij een GDH positief en een toxine negatief resultaat moet men best de aanwezigheid van het CPE met celculturen nagaan. (R41)

- Fenner et al evalueerden een twee-staps algoritme voor de detectie van *C.difficile* waarbij de stoelgangstalen in een eerste stap werden gescreend op de aanwezigheid van het *C.difficile* glutamaat dehydrogenase antigeen (C.DIFF CHEK-60, TechLab). Indien de screening positief was werden de stalen getest op de aanwezigheid van toxines met een assay die zowel toxine A als B detecteert (TOX A/B QUIK CHEK, TechLab). Cultuur werd ingezet voor screen positieve en toxine negatieve stalen zodat er bij groei van *C.difficile* een “second-look” cytotoxiciteit kon gebeuren op de kolonies. Alle stalen werden ter vergelijking ingezet voor cultuur en PCR werd gebruikt om discrepanties tussen resultaten voor GDH en cultuur op te lossen (detectie van het GDH gen of *gluD*). PCR werd ook gebruikt om de aanwezigheid van toxinegenen (*TcdA* en *TcdB*) na te gaan bij alle isolaten.

Een terecht GDH-positief resultaat werd gedefinieerd als een staal positief voor cultuur en/of PCR. Een terecht positief resultaat voor toxineA/B was een isolaat met aanwezigheid van toxinegenen met PCR.

De sensitiviteit van GDH was 93.4% en de NPW 99.2% in vergelijking met cultuur. (Tabel 6)

Tabel 6
Performantie van test voor GDH in vergelijking met cultuur.

	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
GDH	93,4	96,6	75,9	99,2

De sensitiviteit van de toxine A/B rechtstreeks op stoelgang was 52.9% ten opzichte van 93.8% voor de test uitgevoerd op kolonies, waarbij de toxigeniciteit van de isolaten werd bepaald door de aanwezigheid van toxinegenen met PCR. (Tabel 7)

Tabel 7
Performantie van C.DIFF TOX A/B QUIK CHEK voor stoelgangstalen in vergelijking met toxigene cultuur. Toxinogene *C.difficile* ~ aanwezigheid van toxinegenen met PCR.

	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
GDH+, stoelgang	52,9	97,1	96,5	57,4
Toxigene cultuur	93,8	95,8	99,1	76,7

Besluit: Het voorgestelde algoritme laat toe bij een negatief resultaat voor GDH de aanwezigheid van *C.difficile* uit te sluiten. GDH positieve stalen dienen verder getest te worden voor de aanwezigheid van toxines, in eerste instantie met een EIA rechtstreeks op de stoelgang en indien deze negatief is met toxigene cultuur. In deze studie konden volgens dit algoritme 92% van de ontvangen stoelgangstalen met een aanvraag voor *C.difficile* definitief geantwoord worden binnen de vier uur. (R42)

- Gilligan ging de performantie van een twee-staps algoritme na, gebruik makend van een GDH antigeen assay (C.DIFF QUIK CHEK, TechLab) en een cytotoxiciteit neutralisatie assay met behulp van celculturen (CTN). Hij vergeleek de performantie karakteristieken van het algoritme met deze van twee EIA's voor de detectie van toxine A en B (A/B EIA Meridian en Tox A/B QUIK CHEK TechLab). Een terecht positief resultaat was een positieve GDH assay gecombineerd met een positieve cytotoxine neutralisatie assay. Het algoritme was gevoeliger dan de beide EIA's die getest werden. De A/B EIA had een sensitiviteit van 59.5%, en die van de meer recente Tox A/B QUIK CHEK was nog lager, namelijk 43.2%. De specificiteit was respectievelijk 99.4% en 98.5%. (Tabel 8)

Tabel 8

Performantie karakteristieken van de Tox A/B EIA's in vergelijking met een twee-staps algoritme gebruik makend van C.Diff Chek-60 en een CTN voor toxine B.

Test	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
A/B-EIA	59,5	99,4	95,6	91,7
QC-ToxA/B	43,2	98,5	93,9	76,2

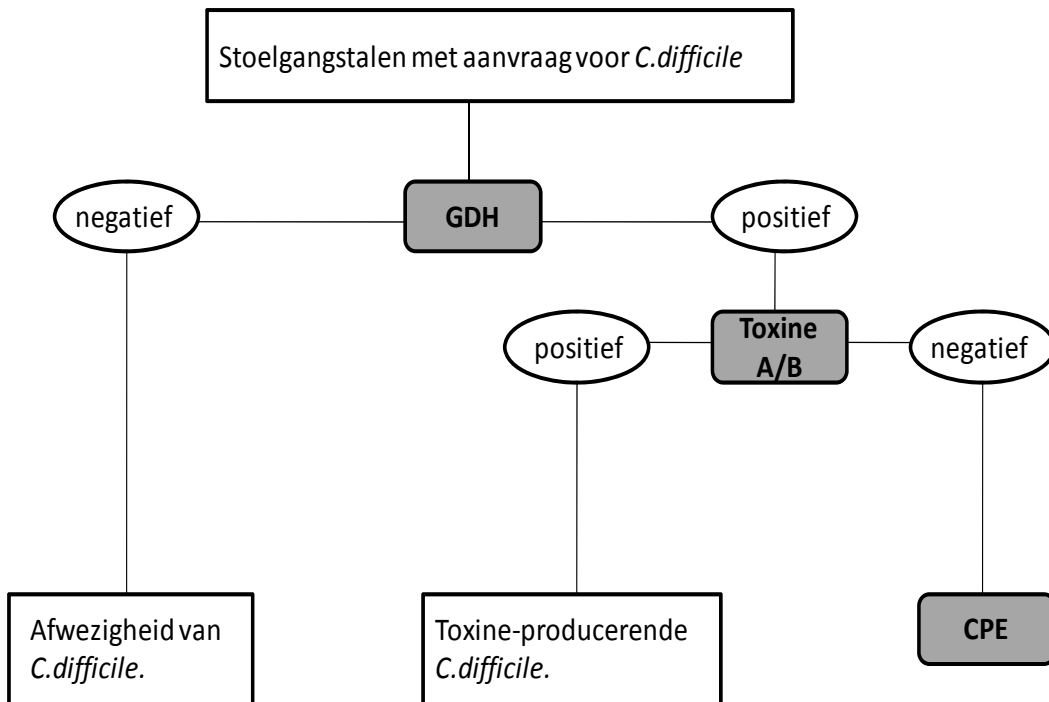
Besluit: de detectie van GDH is de meest gevoelige methode voor de detectie van *C.difficile* in stoelgang, de test heeft ook een zeer hoge NPW. Door de beperkte specificiteit is het echter noodzakelijk een goede confirmatietest te hebben voor de stalen met een positief resultaat voor GDH. De EIA's voor de detectie van toxines die momenteel door veel klinische laboratoria gebruikt worden zijn wel zeer specifiek, maar hebben een veel lagere sensitiviteit in vergelijking met de cytotoxiciteit neutralisatie assay. Daarom zullen laboratoria die gebruik willen maken van de GDH-test als screening momenteel een beroep moeten doen op de cytotoxiciteit neutralisatie assay of op toxigene cultuur als confirmatietest. (R43)

Conclusies:

Door de hoge sensitiviteit, de hoge negatieve predictieve waarde en korte turnaround tijd is de detectie van GDH een uitstekende screeningstest. Het gebruik van een twee-staps algoritme waarbij een makkelijk uit te voeren en zeer sensitieve maar minder specifieke assay wordt gebruikt als een screeningstest ter eliminatie van stalen met een negatief resultaat en waarbij positieve resultaten bevestigd worden door een meer specifieke test kan toegepast worden in de detectie van toxine-producerende *C.difficile*.

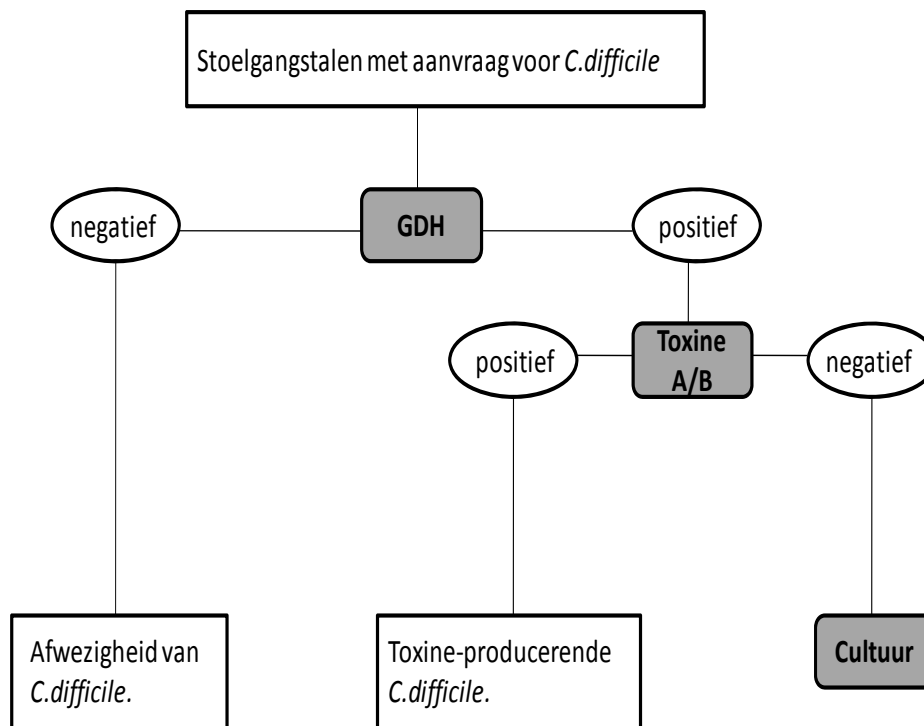
Een mogelijke werkwijze is enkel de stalen die positief zijn voor GDH te testen op de aanwezigheid van toxines met een EIA. Indien ook de toxines positief zijn kan men de resultaten als true positief beschouwen, bij discrepante resultaten tussen GDH en toxines (GDH+, toxines-) moet men de stalen verder testen met een cytotoxine assay met behulp van celculturen, indien beschikbaar of met cultuur met toxinebepaling op kolonies. (Figuur1)

Figuur 1
Twee-staps algoritme met opsporen van het CPE.



Voor laboratoria die voor de detectie van toxigene *C.difficile* gebruik maken van een EIA voor de detectie van toxines in combinatie met cultuur, kan de detectie van het *C.difficile*-specifieke antigen voor een deel de cultuur vervangen en zo als een alternatief voor cultuur gebruikt worden. Zo kan men GDH als een screeningstest gebruiken en enkel de positieve stalen testen op de aanwezigheid van toxines (GDH negatief→afwezigheid van *C.difficile*: verder testen is niet noodzakelijk, het staal kan definitief afgewerkt worden). Stalen die positief zijn voor de aanwezigheid van toxines kunnen ook definitief geantwoord worden als toxine-producerende *C.difficile*. De stalen met discrepante resultaten, GDH positief en toxine A/B negatief, dienen dan nog voor cultuur ingezet te worden zodat een “second-look” cytotoxiciteit kan gebeuren op de kolonies bij groei van het organisme (geen groei→vals positief resultaat GDH; groei met negatieve toxinetest op kolonies→niet-toxigene *C.difficile*; groei met positieve toxinetest op kolonies→toxine-producerende *C.difficile*). (Figuur2)

Figuur 2
Twee-staps algoritme met toxigene cultuur.



Studie Gasthuisberg

Er werd voor deze studie één EIA geëvalueerd voor de detectie van GDH, namelijk het Triage® Micro *C.difficile* panel (Biosite). Deze membraangebonden immunoassay combineert de detectie van het antigeen met de detectie van toxine A. (Attachment1) De resultaten werden vergeleken met de routine diagnostiek zoals die momenteel gebeurt in het laboratorium, namelijk de detectie van toxines A/B (ImmunoCard® Toxins A&B) rechtstreeks op de stoelgangstalen en cultuur, met detectie van de toxines op kolonies bij groei van *C.difficile* uit stalen waarbij het resultaat voor toxine A/B rechtstreeks op de stoelgang negatief was.

Indien zowel de detectie van *C.difficile* met cultuur als de detectie van toxines A/B positief waren werd dit beschouwd als een terecht positief resultaat en dus diagnostisch voor CDAD. Deze combinatie werd gebruikt als standaard voor de berekening van de sensitiviteit en specificiteit van de EIA. Een terecht negatief resultaat is de combinatie van afwezigheid van toxines en groei van *C.difficile*.

Resultaten:

In totaal werden 118 stalen met aanvraag voor detectie van *C.difficile* getest met het Triage panel (GDH en toxine A), toxine A&B en cultuur. Eén staal kon niet worden geëvalueerd met Triage wegens een verkleuring van het testpanel. Van de 117 stalen waren 12 (10.3%) stalen positief voor toxine A&B en met cultuur en deze werden dus beschouwd als diagnostisch voor CDAD. Voor deze 12 stalen was ook de EIA voor de detectie van GDH positief (sensitiviteit 100%, NPW 100%), slechts 4 van de 12 stalen waren positief voor toxine A met het Triage panel (sensitiviteit 33.3%). Eén staal was enkel positief voor de detectie van toxine A&B en negatief voor alle andere testen, wat eventueel een vals positief resultaat kan zijn.

Van de 104 (88.9%) stalen die negatief waren voor de detectie van toxine A&B werd bij 4 stalen *C.difficile* geïsoleerd via cultuur, 2 hiervan waren ook met de GDH test positief, de andere 2 waren GDH negatief. De detectie van toxines op de kolonies, de toxigene cultuur, was negatief voor deze stalen. Deze resultaten zijn eerder suggestief voor kolonisatie met niet-toxinogene *C.difficile*, doch aangezien de detectie van toxines niet 100% sensitiviteit is, is het belangrijk dat de interpretatie ervan in functie van klinische gegevens gebeurt zoals blootstelling aan antibiotica, klinische presentatie. Bij 6 van de 100 stalen die zowel toxine A&B als cultuur negatief waren was de GDH test positief. Dit kunnen vals positieve resultaten zijn of kunnen terecht positief zijn en zo een hogere sensitiviteit voor de detectie van *C.difficile* aantonen in vergelijking met cultuur. (Tabel 8)

Tabel 8

Performantie van het Triage® Micro *C.difficile* panel vergeleken met een diagnostische “gouden” standaard.

EIA	Diagnostische "gouden"standaard				Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PPW (%)	NPW (%)
	Resultaat	Positief	Negatief	Totaal				
Triage-GDH	Positief	12	6	117	100	94	66,7	100
	Negatief	0	94					
Triage-toxinA	Positief	4	0	117	33,3	100	100	92,6
	Negatief	8	100					

PPW: positieve predictieve waarde

NPW: negatieve predictieve waarde

Deze resultaten tonen vergelijkbare resultaten als andere studies terug te vinden in de literatuur. De GDH test toont de kenmerken van een goede screeningstest, namelijk een hoge sensitiviteit en negatieve predictieve waarde. De test is echter minder specifiek en positieve resultaten dienen dus zeker geconfirmeerd te worden met een test die een hoge specificiteit heeft.

Indien men het Triage panel als routinetest zou gebruiken binnen de huidige diagnostiek moet men wel rekening houden met een aantal aspecten. Op de eerste plaats is het beter voor de detectie van toxines gebruik te maken van een immunoassay die beide toxines detecteert en niet enkel toxine A. Het is dus zeker een beperking van deze assay dat enkel toxine A wordt opgespoord. Daarenboven heeft de detectie van toxine A met behulp van Triage een lage sensitiviteit, en hoewel dit voor een deel wordt goedge maakt door de hoge sensitiviteit van het GDH zal men stalen met een positief GDH resultaat en een negatief resultaat voor toxine A zeker nog verder moeten uitwerken. Een zeer groot voordeel van de GDH test is de korte turnaround tijd. Bij een dagelijkse uitvoering van de test zoals dat nu gebeurt voor de toxines (’s morgens) bedraagt de turnaround time van ongeveer 83% van de stalen (GDH-) minder dan één dag waarbij men als definitief resultaat kan antwoorden ‘afwezigheid van *C.difficile*’. Stalen waarbij naast GDH ook de toxines positief zijn kunnen ook met dezelfde turnaround tijd geantwoord worden.

Situatie in Gasthuisberg:

Met de huidige werkwijze voor de detectie van toxinogene *C.difficile* bedraagt de turnaround tijd in feite ook minder dan één dag. Aanwezigheid van toxines wordt immers dagelijks getest en zo kan er een weliswaar voorlopig resultaat gerapporteerd

worden. Aanwezigheid van *C.difficile* met behulp van cultuur met in tweede instantie detectie van toxines op de kolonies kan pas na twee dagen gerapporteerd worden. Detectie van toxines staat centraal in de laboratoriumdiagnostiek, en volgens veel richtlijnen volstaat dit zelfs, maar omwille van de beperkte sensitiviteit van de huidige EIA's is het bij gebruik hiervan zeker aan te raden de diagnostiek aan te vullen met testen die wel een hogere sensitiviteit hebben. Dus voor een zo optimaal mogelijke strategie bedraagt de huidige turnaround tijd minstens 2 dagen en maximum 3 dagen.

Om de correlatie met de huidige methode van werken na te gaan werden stalen geselecteerd op basis van positieve resultaten met ImmunoCard® Toxins A&B (Meridian). De bijsluiter vermeldt een sensitiviteit van 93.1% en een specificiteit van 98.9%, in de literatuur worden aanvaardbare resultaten gevonden wat betreft de sensitiviteit in vergelijking met de gouden standaard. Indien er een positief resultaat is wordt dit onmiddellijk gerapporteerd en verschijnt er automatisch de boodschap "patiënt isoleren tot einde diarree", met andere woorden een positief resultaat voor toxines wordt vanuit het laboratorium beschouwd als diagnostisch voor CDAD.

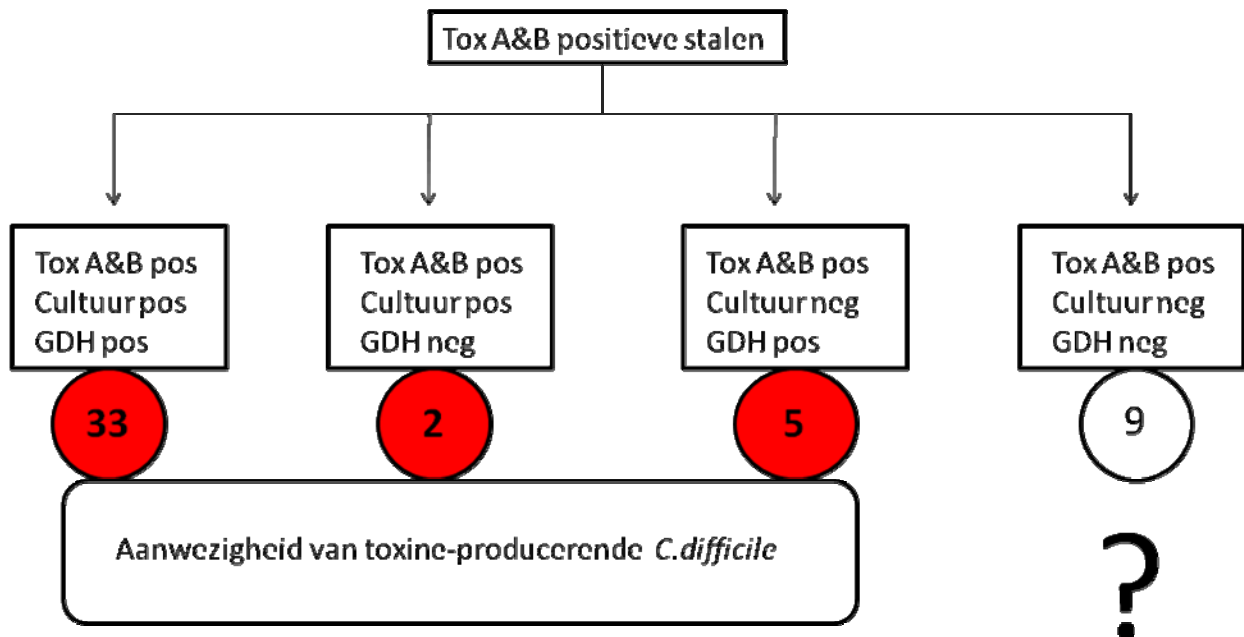
In totaal werden 49 stalen positief voor toxine A&B getest op de aanwezigheid van GDH. Van deze 49 stalen waren 33 stalen positief met cultuur en GDH positief, 2 stalen waren positief met cultuur maar negatief met GDH. Uit de overige 14 stalen kon *C.difficile* niet geïsoleerd worden met cultuur, waarvan 9 stalen ook GDH negatief waren, 5 stalen waren wel positief voor de aanwezigheid van GDH. Dit wijst op een betere opbrengst met GDH in vergelijking met cultuur.

De stalen die positief zijn zowel voor toxine A&B als voor cultuur (cfr."diagnostische" gouden standaard) willen we zeker niet missen met onze GDH test als we denken vanuit het standpunt GDH als screeningstest te gebruiken. Zo zijn er uiteindelijk 2 stalen die we niet oppikken met de GDH test en waarbij *C.difficile* wel geïsoleerd kan worden met cultuur. Aan de andere kant zijn er 5 stalen waarbij het organisme niet kan worden geïsoleerd met cultuur, maar waarbij wel de detectie van GDH positief is.

De 9 stalen die enkel met de immunoassay voor de detectie van toxines positief is zijn wat moeilijker te interpreteren, eventueel zijn het vals positieve resultaten voor de toxines, ofwel wijzen de resultaten op een falen van zowel cultuur als detectie van GDH. Beide hypothesen zijn echter niet conform met de gegevens en resultaten die in de literatuur terug te vinden zijn, aangezien de EIA's voor de detectie van toxines eerder een beperkte sensitiviteit hebben maar een hoge specificiteit. Cultuur en detectie van GDH hebben dan weer een hoge sensitiviteit. (Figuur 3)

Figuur 3

Correlatie GDH test met de huidige methode voor stalen positief met ImmunoCard® Toxins A&B (Meridian)



1.5. Klinische impact

De belangrijkste klinische impact is de verkorting van de turnaround tijd. Zo kan men bij patiënten waarbij men omwille van een klinisch vermoeden van CDAD reeds empirisch gestart is met behandeling (Vancomycine) deze stoppen bij een negatief resultaat. Daardoor kan onnodige blootstelling aan een antibioticum dat daarenboven ook geassocieerd is met het optreden van CDAD. Uiteraard kan men bij een positief resultaat voor aanwezigheid van het antigeen en/of voor toxines zo snel mogelijk de isolatiemaatregelen toepassen en de behandeling starten indien dit nog niet gebeurd is. Zo zou deze verkorte turnaround tijd een invloed kunnen hebben op de verspreiding van *C.difficile* in het ziekenhuis en zo op het aantal nosocomiale infecties met dit micro-organisme.

1.6. Kostenanalyse

Voor de kostenanalyse moet vooreerst duidelijk zijn wat de plaats zou zijn van de detectie van GDH in de diagnostiek van *C.difficile*.

De huidige kit die gebruikt wordt voor de detectie van toxines, namelijk de ImmunoCard® Toxins A & B® van Meridian, kost 10.36 Euro per test. De kostprijs van één CCFA bodem is 0.26 Euro. Per staal bedraagt de minimum kostprijs 10.62 Euro, dit kan oplopen tot 20.98 Euro indien er een toxinebepaling op kolonies gebeurt bij groei van het organisme met een negatief resultaat voor toxine rechtstreeks op stoelgang.

Voor de test van Meridian, ImmunoCard *C.difficile*, die enkel GDH detecteert is de prijs 8.5 Euro per test. Indien men deze test als screening gebruikt en enkel toxinebepaling doet op GDH positieve stalen, kan de kost voor een negatief staal beperkt blijven tot dit bedrag. Een positief staal voor GDH dat ook toxine A/B positief is zal 18.86 Euro kosten.

Bij een negatief resultaat voor toxines rechtstreeks op stoelgang moet er cultuur ingezet worden. GDH positieve, toxine A/B negatieve, cultuur negatieve stalen hebben een kost van 19.12 Euro; cultuur positief met toxinebepaling op kolonies lopen op tot 29.48 Euro.

Het heeft geen zin om een kostenanalyse te doen voor het Triage *C.difficile* panel aangezien deze niet meer op de markt is.

De verwachte combinatiekit voor de simultane detectie van GDH en toxine A/B van TechLab zou 10.75 Euro per test kosten. Als beide resultaten negatief of positief zijn blijft dit de uiteindelijke kostprijs. Discrepante stalen moeten verder ingezet worden voor cultuur en dan kan de kost van een staal oplopen tot 21.76 Euro indien ook bepaling van toxines op cultuur gebeurt. (NB: dit is een voorlopige berekening gebaseerd op de prijs van Triage die volgens de gegevens van de firma hetzelfde zou zijn)

De aparte kit voor de detectie van GDH van TechLab, C.DIFF QUIK CHEK, kost 9.95 (of 7.95) Euro per test. Indien men deze test als screening gebruikt en enkel toxinebepaling doet op GDH positieve stalen, kan de kost voor een negatief staal beperkt blijven tot dit bedrag. Een positief staal voor GDH dat ook toxine A/B positief is zal 20.31 (of 18.31) Euro kosten. Bij een negatief resultaat voor toxines rechtstreeks op stoelgang moet er cultuur ingezet worden. GDH positieve, toxine A/B negatieve, cultuur negatieve stalen hebben een kost van 20.57 (of 18.57) Euro; cultuur positief met toxinebepaling op kolonies lopen op tot 30.93 (of 28.93) Euro.

TO DO/ACTIONS

1. Gaan we gebruik maken van de detectie van GDH in de diagnostiek van CDAD?
Wat zijn de resultaten van de studie die momenteel aan de UCL wordt uitgevoerd?
2. Bij het implementeren van deze test:
 - een algoritme opstellen om de plaats te bepalen (assay die enkel GDH detecteert OF assay die GDH en toxines detecteert?)
 - testen nieuwe kit TechLab (combinatie toxine A/B en GDH, binnen een paar maanden op de markt)?

COMMENTS

De studie uitgevoerd in Gasthuisberg is een eerste klein project om een idee te kunnen geven over de plaats van detectie van GDH in de diagnostiek van *C.difficile*-geassocieerde ziekte. Momenteel is er een studie gestart aan de UCL in Brussel waarbij de detectie van glutamaat dehydrogenase en toxines A&B op verse stoelgangstalen vergeleken wordt met de klassieke cultuur op CCFA bodems in combinatie met de faecale celcytotoxiciteit assay (MRC5 cellen) (= gouden standaard). Er zullen ongeveer 300 stalen geëvalueerd worden afkomstig van de UCL en van Gasthuisberg. Voor de detectie van GDH worden twee kits vergeleken, namelijk de ImmunoCard *C.difficile* van Meridian en de C.DIFF QUIK CHEK van TechLab. Bij groei van *C.difficile* in afwezigheid van toxines rechtstreeks op stoelgang zal de toxinetest tevens uitgevoerd worden op de kolonies. Een terecht positief resultaat is een staal waarbij een toxineproducerende stam wordt geïsoleerd. Indien cultuur negatief is terwijl toxines gedetecteerd werden, zal een CCFA medium gebruikt worden met toevoeging van natrium taurocholaat (verhoogt de gevoeligheid van de bodem), en indien het organisme ook op die manier niet geïsoleerd kan worden zal men hier een verklaring voor trachten te vinden.

Vooraleer verdere acties gepland kunnen worden zullen we de resultaten van deze studie afwachten.

Een tweede opmerking met betrekking tot deze CAT is dat de kit die uitgetest werd voor de detectie van GDH, namelijk het Triage Micro *C.difficile* panel, tijdens de studie wegens fabricatieproblemen van de markt werd gehaald. Dit is een definitieve beslissing maar er komt een nieuwe combinatiekit op de markt voor detectie van GDH en toxines A&B, Triage detecteerde enkel toxine A, van de firma TechLab. Men verwacht dat deze tegen de zomer te verkrijgen zal zijn.

ATTACHMENTS

Attachment1

Principes van het Triage Micro Panel (Biosite) voor de detectie van GDH en toxine A.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Triage® *Clostridium difficile* Panel is an enzyme immunoassay for the simultaneous detection of the *C. difficile* common antigen and toxin A in human fecal specimens. *C. difficile* common antigen and/or toxin A present in stool specimens are isolated and immobilized on a membrane using specific antibodies. The immobilized antigens are incubated with an antibody-enzyme conjugate that binds to specific sites on the antigens. After addition of the wash and substrate, the presence of the common antigen and toxin A is detected visually by the presence of a purple-black color bar next to the name printed on the Test Device.

A positive specimen produces a distinct purple-black bar in the Test Zone adjacent to the antigen name. A negative specimen does not produce a colored bar. The Positive Control Zones contain immobilized *C. difficile* common antigen and toxin A bound to specific antibodies. Properly performing all the steps in the test will produce a colored bar on both of the Positive Control Zones.

