

Detection of *C. difficile* common antigen: comparison of methods

Maria Giuliana Brunelli, Sabrina Tamburelli, Gian Lorenzo Molinari, Stefano Andreoni

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

Key words: *C. difficile*, Common antigen (GDH), Antibiotic-associated pseudomembranous colitis

La ricerca di antigene comune di *C. difficile*: confronto fra metodi

SUMMARY

In order to identify and define a diagnostic algorithm for the diagnosis of *C. difficile* infection, a comparative study was carried out at the Microbiology Laboratory of "Maggiore della Carità" Hospital in Novara. We compared the system currently in use in the laboratory "TECHLAB *C. difficile* Quik Chek Complete (Inverness Medical, USA)", an immunoenzymatic assay for the simultaneous detection of *C. difficile* common antigen (GDH) and Toxins A&B, with the new ImmunoCard *Clostridium difficile* GDH (Meridian Bioscience, USA), which identifies the *C. difficile* Common Antigen GDH. The results proved identical between the two assays: of 100 samples, 82 resulted negative with both tests, 18 were GDH positive with both tests. Out of the 18 GDH positives, 9 resulted positive for the Toxins portion of the TechLab test.

INTRODUZIONE

Clostridium difficile, bacillo Gram positivo, anaerobio, sporigeno, largamente diffuso nel suolo, presente nel tratto intestinale degli animali e in quello umano, può essere responsabile di patologie di carattere infettivo (ICD), di differente entità, generalmente in seguito a trattamento con antibiotici (2).

Il range di quadri clinici va dalle forme di colonizzazione asintomatica, a forme di diarrea di entità media (AAC: *antibiotic-associated diarrhea*), a sindromi più consistenti che includono dolore addominale, febbre e leucocitosi (CDAD: *Clostridium difficile associated disease*), a forme molto gravi (AAPMC: *Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis*) (6), fino ad arrivare alle forme fulminanti con megacolon tossico o empiema, perforazione intestinale, peritonite, sepsi, *shock* che possono costituire causa diretta o indiretta di morte.

Le ICD sono ormai riconosciute da più parti come la principale causa di diarrea infettiva in ambito ospedaliero e in quelle strutture in cui si pratica assistenza sanitaria (strutture riabilitative, per anziani).

Sebbene i pazienti anziani ospedalizzati siano il principale gruppo a rischio d'infezione, sono in aumento segnalazioni di coinvolgimento di popolazioni più giovani senza contatti recenti con strutture ospedaliere o in assenza di trattamenti antibiotici, così come bambini e donne in gravidanza.

In seguito all'incremento d'incidenza o comunque di severità, in relazione anche alla comparsa di ceppi ipervirulenti, le ICD hanno conquistato un posto sempre più rilevante nel dibattito medico e scientifico, risultando un importante problema di sanità pubblica, anche in termini di costi economici (3).

L'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) e altre società scientifiche hanno definito linee guida per la diagnosi di ICD. Questa si basa sulla ricerca di *C. difficile* e/o di suoi antigeni, tossine o acidi nucleici su filtrato fecale.

A causa delle limitazioni inerenti a ciascun metodo e per cercare di combinare la rapidità di risposta con una buona sensibilità, la Letteratura Internazionale e quella Nazionale suggeriscono algoritmi diagnostici (Schema 1-2) che prevedano *step* successivi.

Tra questi algoritmi vanno sicuramente considerati quelli che prevedono un primo *screening* volto alla ricerca di *glutammato deidrogenasi* (GDH) (il cosiddetto antigene comune) e la successiva verifica, a fronte di un riscontro positivo, della produzione di tossina A/B, mediante sistemi immunologici e/o molecolari (1, 4, 5).

Una recente revisione dei principali sistemi presenti in commercio per la rilevazione di antigeni e tossine di *C. difficile* con metodi immunometrici (EIA/IC) ha portato alla conclusione che, considerando la mancanza di differenze sostanziali nelle *performances* complessive dei differenti *kit* e l'elevato valore predittivo negativo (VPN) (>98%)

Corresponding author: Stefano Andreoni

Lab. Microbiologia e Virologia

Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

E-mail: stefano.andreoni@maggioreosp.novara.it

dei *test* del commercio, data una sensibilità rilevata non inferiore al 75%, un risultato negativo permette, in un contesto di prevalenza dell'infezione relativamente bassa, con elevata probabilità di escludere l'infezione.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2011, è stato condotto, presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara, un confronto tra il sistema in uso "TECHLAB *C. difficile* Quik Chek Complete – Inverness Medical (Princeton-USA)", sistema immunocromatografico in grado di evidenziare l'antigene comune (GDH) di *C. difficile* e contemporaneamente la presenza di tossina A/B, sistema già oggetto di verifiche e confronti in termini di sensibilità e specificità (7) e un nuovo sistema "ImmunoCard *Clostridium difficile* GDH"-Meridian Bioscience, in grado di evidenziare la presenza del solo antigene comune (GDH) di *C. difficile* (8).

Campioni di feci fresche di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali, sono stati quindi sottoposti ad indagine per la ricerca di antigene comune di *C. difficile* utilizzando contemporaneamente entrambi i metodi e secondo le indicazioni dei *kit* commerciali.

Il protocollo operativo prevedeva, la registrazione dei risultati concordanti (ricerca dell'antigene comune positiva e negativa per entrambi i sistemi) e, nel caso di risultati discordanti (positivo/negativo o negativo/positivo), un'ulteriore verifica mediante coltura: partendo sempre da feci fresche, si sarebbe proceduto, dopo *shock* etanolico di una sospensione fecale e la successiva germinazione delle spore a bagnomaria a 56°C, alla semina su Schaedler agar in condizioni di anaerobiosi.

Le colonie eventualmente sviluppatasi, con aspetto compatibile con *Clostridium* (osservazione microscopica dopo colorazione di *Gram*), sarebbero state sottoposte a saggi d'identificazione biochimico-assimilativa e spettrofotometrica (Rapid ID32ANA – bioMérieux; MALDI TOF - Bruker Daltonik). Confermata la presenza di *C. difficile* si sarebbe proceduto, attraverso una sospensione in substrato liquido, ad un ulteriore saggio con i due sistemi.

RISULTATI

Nel periodo Maggio 2011 – Settembre 2011, 100 campioni fecali d'isolamento clinico, sono stati sottoposti alla ricerca di antigene comune di *C. difficile* utilizzando in contemporanea i due metodi in oggetto. Come riportato nella Tabella 1, i risultati hanno evidenziato una completa concordanza tra i due sistemi: 82 campioni sono risulta-

ti negativi e 18 sono risultati positivi per antigene comune di *C. difficile* utilizzando tanto il sistema TECHLAB *C. difficile* Quik Chek Complete quanto il sistema ImmunoCard *Clostridium difficile* GDH. Dei 18 campioni positivi, 9 sono risultati anche produttori di tossina A/B come evidenziato dal sistema Inverness.

TABELLA 1. Rilevazione di antigene comune di *C. difficile*.

	CD Chek Complete	CD GDH
POSITIVI	18	18
NEGATIVI	82	82
TOXIN A/B +	9	*
TOXIN A/B -	9	*

* non determinabile

DISCUSSIONE

Dalle nostre osservazioni si conferma la validità del sistema ImmunoCard *Clostridium difficile* GDH come *test* di *screening* per la ricerca di GDH su campioni fecali per la diagnosi di infezione da *C. difficile*. Come suggerito da numerosi algoritmi diagnostici proposti da Società scientifiche (AMCLI, SIMPIOS, IDSA, HPA, ASM), riferibili alle ICD, l'utilizzo di sistemi volti alla ricerca dell'antigene comune (GDH) come *test* di *screening* iniziale, risulta essere il più indicato in relazione alla buona sensibilità del *test* stesso, all'elevato VPN, alla considerazione, non trascurabile, che l'antigene risente meno rispetto alle tossine della conservazione del campione e, non ultimo, dal contenimento dei costi.

In base a queste considerazioni e in seguito alle nostre osservazioni, il sistema ImmunoCard *Clostridium difficile* GDH può rappresentare una valida opportunità ai fini diagnostici. Naturalmente l'utilizzo di un *test* di *screening* deve prevedere, in caso di positività, la conferma della presenza o meno di uno stipite tossinogenico, mediante *test* immunoenzimatici, mediante *test* di citotossicità o direttamente mediante metodi molecolari, sistemi che garantiscano VPP superiori.

BIBLIOGRAFIA

1. A Practical Guidance Document for the laboratory Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*. American Society for Microbiology - September 21, 2010
2. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978; 298: 531-4.
3. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46 (Suppl.1): S12-18.
4. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious

- diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31(5): 431-55.
5. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of Nine Commercially Available *Clostridium difficile* Toxin Detection Assays, a Real-Time PCR Assay for *C. difficile tcdB*, and a Glutamate Dehydrogenase Detection Assay to Cytotoxin Testing and Cytotoxigenic Culture Methods. Journal of Clinical Microbiology, October 2009; 47: 3211-7.
 6. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet 1978; 1: 1063-6.
 7. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the *C. difficile*. Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol. 2010; 48(6): 2082-6.
 8. Shetty N, Wren MWD, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. Journal of Hospital Infection. 2011; 77: 1-6.