

Evaluation of the Liaison® *C. difficile* GDH System

Massimo De Paschale, Maria Teresa Manco, Emanuela Vasconi, Alessia Paganini, Monica Barzani, Carlo Agrappi, Paola Mirri, Pierangelo Clerici

U.O.C. Microbiologia, A.O. Ospedale Civile di Legnano, Legnano (Mi), Italy.

Key words: *C. difficile*, GDH, Chemiluminescence, Bristol scale

Valutazione del sistema Liaison® *C. difficile* GDH

SUMMARY

Objectives. The aim of our study was to evaluate the LIAISON® system for the detection of GDH of *C. difficile* by comparing the results with those obtained with the our routine EIA test, from both of unselected samples and selected samples according to the Bristol scale for stool consistency.

Study Design. We examined 114 unselected stool samples (Group 1) and 104 selected samples according to the Bristol scale (type 4-7: Group 2) for the detection of GDH with enzyme immunoassay (EIA) and chemiluminescence LIAISON® system. In case of positivity for one or both tests toxins A and B were searched, with EIA, and, in case of negativity of the toxins, the test of gene amplification for the search of the locus of pathogenicity for toxins A and B was performed.

Results. In Group 1, sixteen samples were positive for both tests for GDH, 93 negative for both tests, and five discordant (three EIA positive and LIAISON® negative; two EIA negative and LIAISON® positive): total concordance between the two methods: 95.6%. Of the five discordant samples, all were toxin A & B negative, of these only one was positive to molecular biology.

In Group 2, fifteen samples were positive for both tests for GDH, 89 negative for both tests and no discordant: total concordance between the two methods: 100%.

Conclusions. Our data indicate a perfect correlation between LIAISON® and EIA, when samples are chosen according to stool consistency at least grade 4 of the Bristol scale. The possibility to use an automatic and fast system, like LIAISON®, also allows an optimization of workflows.

INTRODUZIONE

C. difficile è il più comune agente eziologico di diarrea associata ad antibiotici e rappresenta un'importante causa d'infezione nosocomiale in tutto il mondo (5, 10). I cambiamenti della flora intestinale associata all'utilizzo di antibiotici possono, infatti, favorire la colonizzazione da *C. difficile*, la cui percentuale, nei pazienti ospedalizzati, può raggiungere il 26% (4, 7). Il quadro clinico è legato alla produzione di enterotossine A e B, responsabili del danneggiamento della mucosa intestinale. La sintomatologia varia da una forma benigna autolimitante di diarrea acquosa ad una forma più grave di colite pseudomembranosa e megacolon tossico (5). I ceppi che non sono portatori dei geni della tossina A e B sono considerati non patogeni. Per la diagnosi di laboratorio esistono test per la ricerca nelle feci dell'antigene comune (glutamato deidrogenasi: GDH) prodotta da tutti i ceppi (9) e test per la ricerca delle tossine A e B. Per l'identificazione dei ceppi tossinogenici sono disponibili test di amplificazione genica per il rilevamento del locus di patogenicità codificante per le tossine A e B (6, 8). Sono stati proposti diversi iter

diagnostici combinando sequenzialmente i vari test a disposizione (1-3). Uno di questi (1), in uso presso il nostro Centro prevede, come *screening*, la ricerca dell'antigene GDH e, in caso di positività, la ricerca delle tossine A e B. In caso di negatività delle tossine, è previsto un test di amplificazione genica per la ricerca del locus di patogenicità per le tossine A e B.

Le linee guida (1-3) concordano nell'indicare la ricerca del *C. difficile* solo in feci non formate (tranne in pazienti con megacolon tossico) e i campioni di feci non idonee dovrebbero essere rifiutate dal Laboratorio, ma tale pratica non è ancora universalmente adottata.

La recente commercializzazione di un sistema in chemiluminescenza completamente automatizzato dalla ditta DiaSorin per la ricerca del GDH ha comportato la possibilità di eseguire i test su numeri consistenti di campioni in poco tempo. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare i risultati ottenuti con questo nuovo sistema e confrontarli con quelli ottenuti con il test di routine attualmente in uso presso la nostra Unità Operativa, sia su campioni di feci non selezionati

Corresponding author: Massimo De Paschale

U.O.C. Microbiologia, A.O. Ospedale Civile di Legnano

Via Papa Giovanni Paolo II - 20025 Legnano (MI) - Tel.: +39 (0) 331449319 - Fax: +39 (0) 331449758

E-mail: massimo.depaschale@ao-legnano.it

che selezionati secondo la scala di Bristol.

MATERIALI E METODI

Gruppo 1: Tra giugno e luglio 2012 sono pervenuti sequenzialmente 114 campioni di feci appartenenti a 90 pazienti interni e 24 pazienti esterni (52 maschi e 62 femmine; età media 70.5 anni, range 18-91), inviate per la ricerca del *C. difficile*. Su tutti campioni, senza valutazione della consistenza delle feci, sono stati eseguiti in contemporanea il nostro test di routine per la ricerca del GDH con metodica immunoenzimatica (EIA) (PREMIER *C. difficile* GDH, Meridian Bioscience, Cincinnati, USA) e il sistema in chemiluminescenza LIAISON® (*C. difficile* GDH, DiaSorin, Saluggia, Italy). In caso di discordanza, entrambi i test sono stati ripetuti (retest). In caso di positività per uno o entrambi i test sono state ricercate, con metodica EIA, le tossine A e B (ImmunoCard Toxins A&B, Meridian Bioscience, Cincinnati, USA) e, in caso di negatività delle tossine, è stato eseguito il test di amplificazione genica per la ricerca del locus di patogenicità per le tossine A e B (Illumigene *C. difficile*, Meridian Bioscience, Cincinnati, USA).

Gruppo 2: Tra dicembre 2012 e marzo 2013 sono stati esaminati con entrambi i metodi per la ricerca di GDH, 104 campioni appartenenti a 66 pazienti interni e 38 pazienti esterni (32 maschi e 72 femmine; età media 70.9 anni, range 16-99) pervenuti sequenzialmente, ma selezionati in base alla scala di Bristol (considerando solo i campioni con tipo da 4 a 7). In caso di discordanza tra i due test di screening e positività ad uno o entrambi i test è stato utilizzato il protocollo impiegato per il gruppo 1.

RISULTATI

Gruppo 1: 16 campioni (14.0%; 95% CI: 7.63-20.37) sono risultati positivi ad entrambi i test per GDH, 93 negativi (81.6%; 95% CI: 74.49-88.71) ad entrambi i test e 5 discordanti (4.4%; 95% CI: 0.64-8.16) dopo il retest (Tabella 1). Concordanza totale tra i due sistemi: 95.6% (95% CI: 91.83-99.36). I risultati dei test aggiuntivi per i campioni concordanti ai due test per il GDH sono riportati in tabella 2 e per i campioni discordanti in tabella 3.

La consistenza dei campioni discordanti era semi-solida nei primi 4 casi e solida nel 5° caso.

Dal punto di vista clinico il caso N°1 dei discordanti aveva un'infezione da Adenovirus con positività degli antigeni nelle feci, mentre del caso N°2 (paziente esterno) non si hanno notizie ulteriori oltre alla richiesta dell'esame in sospetta gastroenterite. Il caso N°3 si riferisce a un paziente ricoverato nel reparto di Medicina generale i cui

campioni prelevati nei giorni precedenti il campione in studio erano risultati positivi alle tossine o alla biologia molecolare (Tabella 4). Il caso N°4 si riferisce a un paziente con vari ricoveri in vari reparti dell'Ospedale e con presenza di tossina positiva in campioni prelevati in tempi precedenti o successivi rispetto al campione in studio (Tabella 5). Il caso N°5 si riferisce a un paziente ricoverato nel reparto di Medicina d'Urgenza con assenza di tossina, ma con biologia molecolare positiva nel campione in studio. Tale risultato si è confermato anche nei campioni prelevati nei giorni successivi (Tabella 6). Il campione presentava feci formate (2 alla scala di Bristol), ma proveniva da un paziente senza magacolon tossico.

Gruppo 2: 15 campioni (14.4%; 95% CI: 7.65-21.15) sono risultati positivi ad entrambi i test per GDH, 89 negativi (85.6%; 95% CI: 78.85-92.35) ad entrambi i test e nessun discordante dopo il retest: concordanza tra positivi, tra negativi e totale tra i due sistemi: 100%. I risultati dei test aggiuntivi sono riportati in tabella 7. In tabella 8 sono riportate le positività al GDH (concordanti ad entrambi i metodi) e i relativi test aggiuntivi in relazione alla scala di Bristol (differenze statisticamente non significative con test esatto di Fisher).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai nostri dati risulta una ottima concordanza dei risultati tra LIAISON® e il nostro test per la ricerca dal GDH. Per il gruppo dei campioni non selezionati, comprendenti campioni anche con feci solide (e, quindi, concettualmente non idonee per la ricerca del *C. difficile*) la concordanza totale supera il 95%. In particolare, considerando i casi discordanti, la negatività al test LIAISON® e positività al test EIA, in un paziente con patologia enterica causato da un altro agente (Adenovirus), potrebbe indicare una migliore specificità del test LIAISON®. Inoltre in due casi con positività al test LIAISON® e negatività al test EIA sembra esserci una miglior sensibilità del sistema LIAISON® in quanto questi casi avevano una positività per le tossine e per la biologia molecolare in campioni precedenti al campione in esame.

Questo è, però, in contrasto con un altro caso, negativo al test LIAISON® e positivo al test EIA con biologia molecolare positiva su più campioni. In quest'ultimo caso le feci erano solide e il campione sarebbe stato da non considerare idoneo. Poiché, quindi, la tipologia del campione è importante, abbiamo eseguito il confronto anche su campioni selezionati secondo la scala di Bristol. Sono stati valutati, in questo caso solo i campioni con tipo da 4 a 7 (evitando i principali tipi indicativi di stipsi, anche se tale tipo può esserci in pre-

senza di megacolon tossico). In questi campioni la concordanza tra i due metodi è stata del 100%, indipendentemente dal tipo di feci (anche nei campioni con tipo 4 e 5 dove, la presenza anche di tossine o la positività al test di biologia molecolare, però, necessita di una attenta valutazione clinica). In conclusione la concordanza dei risultati tra

sistema LIAISON® e test EIA per il GDH è assoluta quando i campioni sono scelti secondo la consistenza delle feci con valori alti della scala di Bristol con almeno tipo 4. La possibilità, inoltre, di utilizzare un sistema automatico e veloce come è il sistema LIAISON®, permette una ottimizzazione dei flussi di lavoro.

Tabella 1. Confronto tra i risultati ottenuti con test EIA e LIAISON® per la ricerca del GDH (Feci non selezionate: Gruppo 1).

GDH EIA	GDH LIAISON®		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTALE
POSITIVO	16	3	19
NEGATIVO	2	93	95
TOTALE	18	96	114

Tabella 2. Risultati per la ricerca della tossina A & B e della biologia molecolare nei 109 campioni concordanti ai test EIA e LIAISON® per la ricerca del GDH (Feci non selezionate: Gruppo 1).

GDH (EIA/LIAISON®)	Tossina A&B	Biologia Molecolare	N
Negativo	-	-	93
Positivo	Positivo	-	7
Positivo	Negativo	Negativo	1
Positivo	Negativo	Positivo	8

Tabella 3. Risultati per la ricerca della tossina A & B e della biologia molecolare nei 5 campioni discordanti ai test EIA e LIAISON® per la ricerca del GDH (Feci non selezionate: Gruppo 1).

Caso	ETA'	GDH		TOSSINA A&B	Biologia Molecolare
		EIA	LIAISON®		
1	81	POSITIVO	negativo	negativo	negativo
2	80	POSITIVO	negativo	negativo	negativo
3	66	negativo	POSITIVO	negativo	negativo
4	86	negativo	POSITIVO	negativo	negativo
5	65	POSITIVO	negativo	negativo	POSITIVO

Tabella 4. Risultati per la ricerca di marcatori d'infezione da *C. difficile* in campioni di feci di un paziente ricoverato con test discordanti per la ricerca del GDH (caso 3).

Data prelievo	GDH		TOSSINA A&B	Biologia Molecolare
	EIA	LIAISON®		
29/06/12	POSITIVO		POSITIVO	
09/07/12	POSITIVO		negativo	POSITIVO
16/07/12 *	negativo	POSITIVO	negativo	negativo ←
29/07/12	negativo			

* campione in studio

Tabella 5. Risultati per la ricerca di marcatori d'infezione da *C. difficile* in campioni di feci di un paziente con test discordanti per la ricerca del GDH (caso 4).

Data prelievo	Reparto	GDH		TOSSINA A&B	Biologia Molecolare
		EIA	LIAISON®		
21/05/12	Otorino.	POSITIVO		POSITIVO	
21/05/12	Otorino.	POSITIVO		POSITIVO	
21/05/12	Otorino.	POSITIVO		POSITIVO	
28/05/12	Medicina	negativo			
05/06/12	Medicina	negativo			
25/06/12	Esterno	negativo			
25/06/12*	Esterno	negativo	POSITIVO	negativo	negativo ←
25/06/12	Esterno	POSITIVO		negativo	negativo
11/07/12	Malatt. Infett.	POSITIVO		POSITIVO	
30/07/12	Esterno	negativo			
17/09/12	Malatt. Infett.	negativo			
21/09/12	Malatt. Infett.	negativo			

* campione in studio

Tabella 6. Risultati per la ricerca di marcatori d'infezione da *C. difficile* in campioni di feci di un paziente ricoverato senza diarrea con test discordanti per la ricerca del GDH (caso 5).

Data prelievo	GDH		TOSSINA A&B	Biologia Molecolare
	EIA	LIAISON®		
15/08/2012 *	POSITIVO	negativo	negativo	POSITIVO ←
16/08/2012	POSITIVO		negativo	POSITIVO
17/08/2012	POSITIVO		negativo	POSITIVO

* campione in studio

Tabella 7. Risultati per la ricerca della tossina A & B e della biologia molecolare nei 104 campioni concordanti ai test EIA e LIAISON® per la ricerca del GDH (Feci selezionate: Gruppo 2).

GDH (EIA/LIAISON®)	Tossina A&B	Biologia Molecolare	N
Negativo	-	-	89
Positivo	Positivo	-	10
Positivo	Negativo	Negativo	1
Positivo	Negativo	Positivo	4

Tabella 8. Campioni positivi alla ricerca del GDH (con entrambi i metodi in studio) in relazione alla scala di Bristol.

Scala di Bristol	N° totale	GDH positivo (EIA/LIAISON®)	Tossine A&B positive	Tossine A&B negative/ biologia molecolare positiva	Tossine A&B negative/ biologia molecolare negativa
4	15	3 (20.0)	3 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
5	34	5 (14.7%)	3 (8.8%)	1 (2.9%)	1 (2.9%)
6	35	4 (11.4%)	1 (2.9%)	3 (8.6%)	0 (0%)
7	20	3 (15.0%)	3 (15%)	0 (0%)	0 (0%)
Totale	104	15 (14.4)	10 (9.6%)	4 (3.8%)	1 (1.0%)

BIBLIOGRAFIA

1. Andreoni S, Farina C, Serra R e il Gruppo di lavoro Nomenclatore e Percorsi Diagnostici – GLNom. Enteriti d'origine infettiva (Esame microbiologico delle Gastroenteriti - feci). AMCLI: Percorsi Diagnostici Le Gastroenteriti Infettive. 2010, www.AMCLI.it
2. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Infectious Diseases Society of America. 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: 431-55.
3. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and

- recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1053-66.
4. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320: 204-10.
 5. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile*-Associated diarrhea: A review. *Arch Intern Med* 2001; 161: 525-33.
 6. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 541-55.
 7. Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A, et al. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 181-7.
 8. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (suppl 5): 2-20.
 9. Willis DH, Kraft JA. Confirmation that the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* is a glutamate dehydrogenase. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1363-4.
 10. Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 531-4.