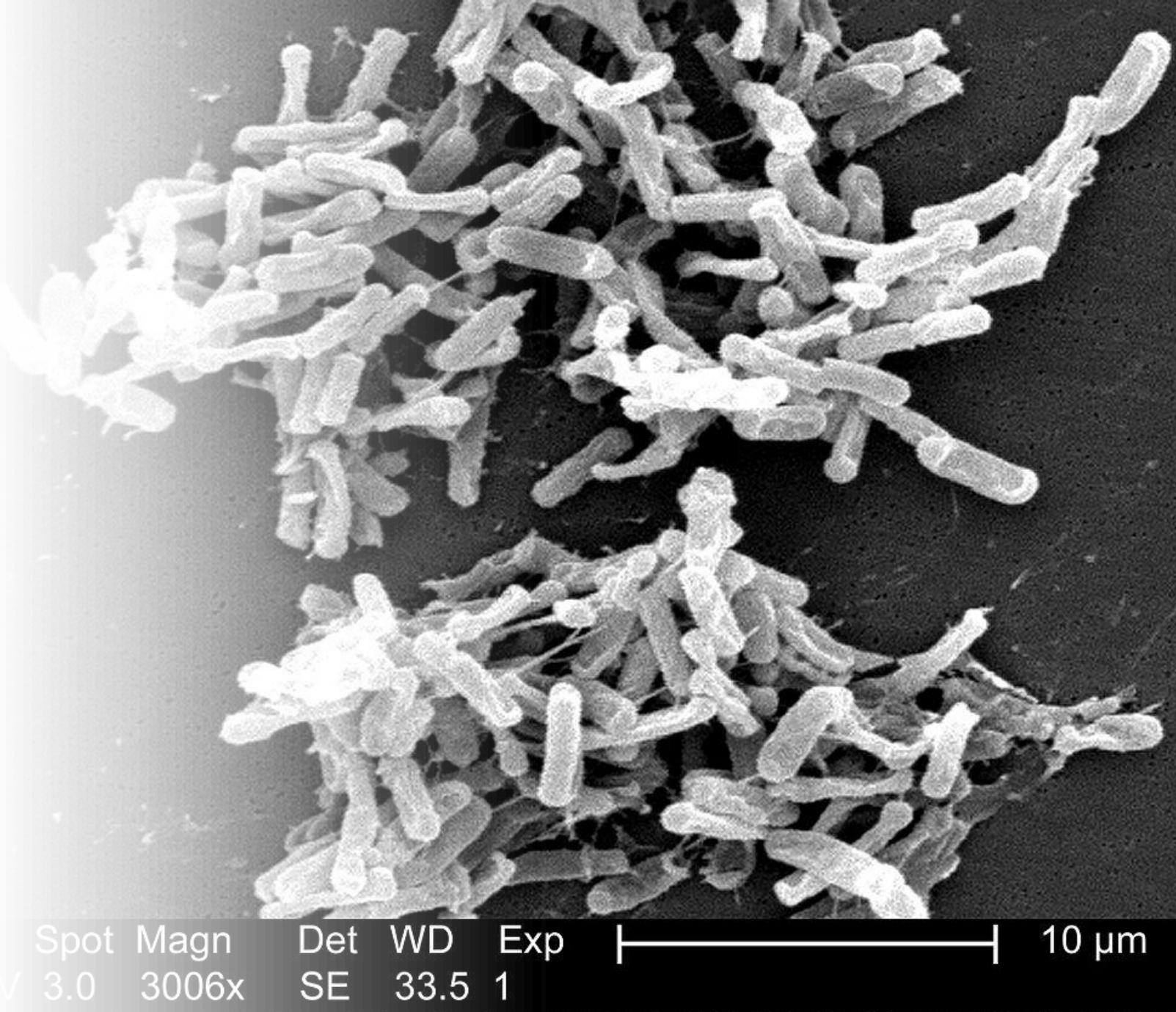


Critically Appraised Topic

Clostridioides difficile diagnostiek

Inhoudstabel

- Epidemiologie
- Pathofysiologie
- CAT-vragen
 - Overzicht diagnostische testen
 - Analyse aanvragen UZL
- Conclusie



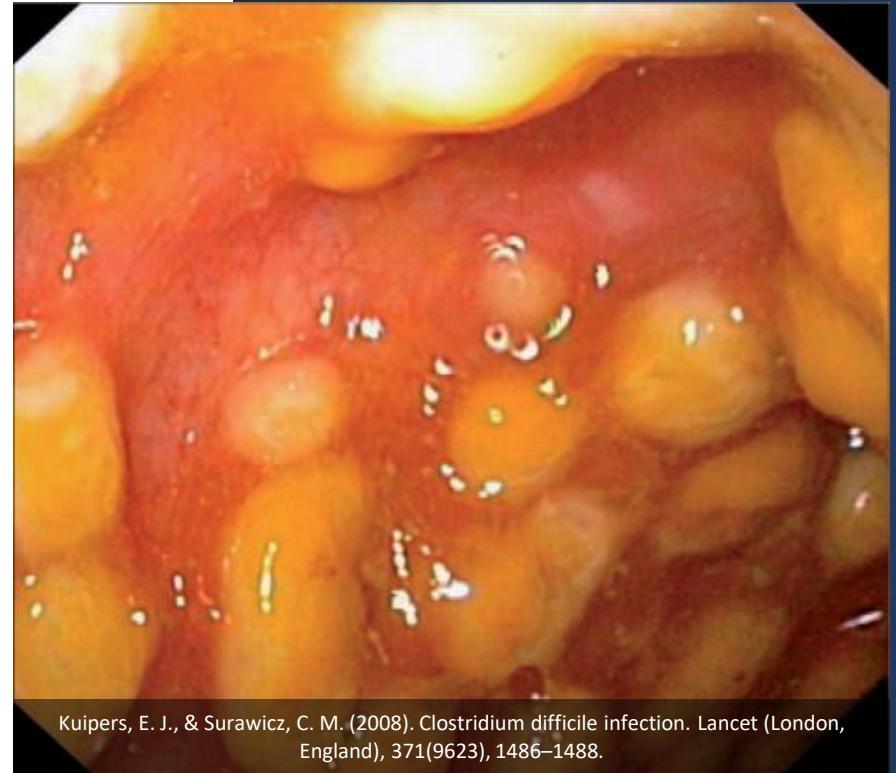
Epidemiologie - Geschiedenis

- 1935: Eerste beschrijving¹
 - Commensaal in gezonde neonaten
 - *Bacillus difficile*
 - Anaerobe, beweeglijke, plompe gram positieve staven
 - Sporenvorming
 - Exotoxines
 - Zeer pathogeen voor konijnen en cavia's

INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS
WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE,
BACILLUS DIFFICILIS
IVAN C. HALL, PH.D.
AND
ELIZABETH O'TOOLE

Epidemiologie - Geschiedenis

- 1978: Oorzaak van antibiotica-geassocieerde pseudomembraneuze colitis + benaming *Clostridium difficile*¹
- 1978-2000: Frequentste oorzaak van antibiotica-geassocieerde diarree.²
- 2000-2005: Wereldwijde toename (2-15x) van de prevalentie³⁻⁵
 - Hypervirulente ribotypes
 - Verhoogde toxineproductie
 - Toegenomen antibioticaresistentie (Bv 027, frequent FQ-resistant)



Kuipers, E. J., & Surawicz, C. M. (2008). *Clostridium difficile infection*. Lancet (London, England), 371(9623), 1486–1488.

Epidemiologie - Geschiedenis

- 2007 Opstart van het nationaal surveillantie programma
 - Verplichte deelname voor algemene ziekenhuizen (KB. 26/06/2007)
- 2015 Einde van de verplichte deelname voor de ziekenhuizen
 - KB 08/01/2015
- 2016 Her-classificatie als *Clostridioides difficile*¹



Epidemiologie – *C. difficile*

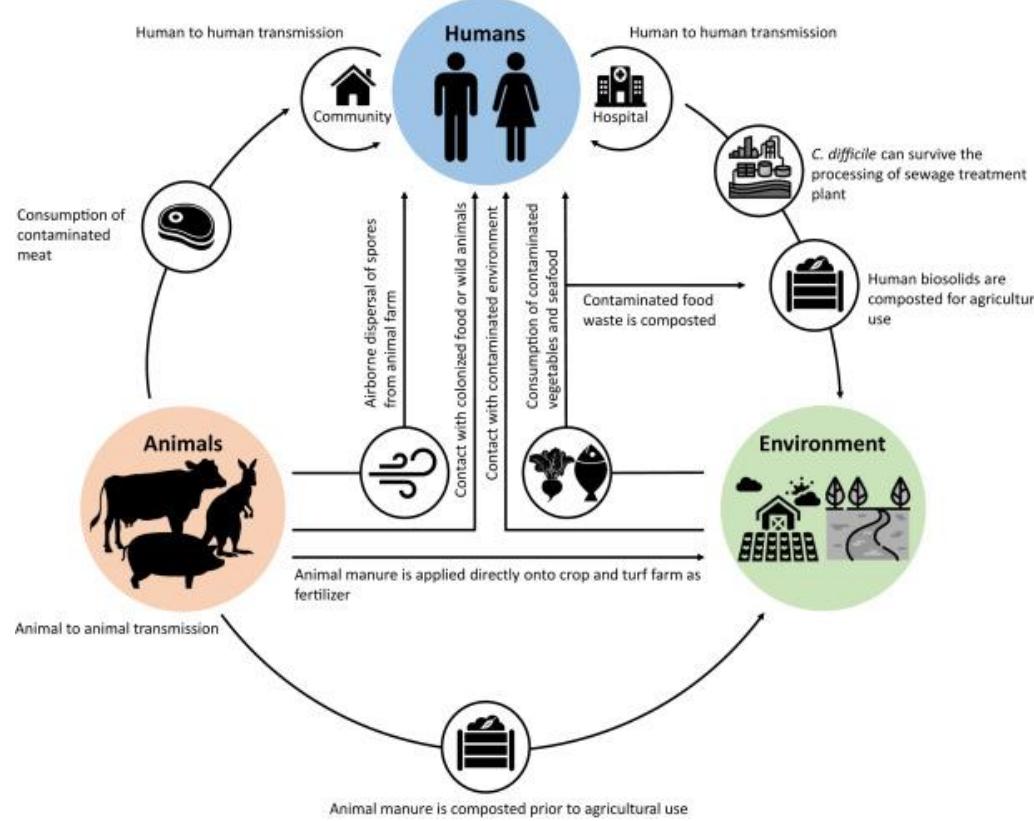
Dragerschap/kolonisatie

- Patiënten bij ziekenhuisopname >8%¹
 - Associatie met eerdere ziekenhuisopname
 - Hoger risico op CDI
- Gezonde volwassenen 1-10%¹⁻²
 - Hogere percentages gemeten in verpleegkundigen werkzaam in ziekenhuizen
- Gezonde neonaten 30-70%³⁻⁴
 - Dalende trend gedurende de eerste 2 levensjaren

Alomtegenwoordig in omgeving⁵

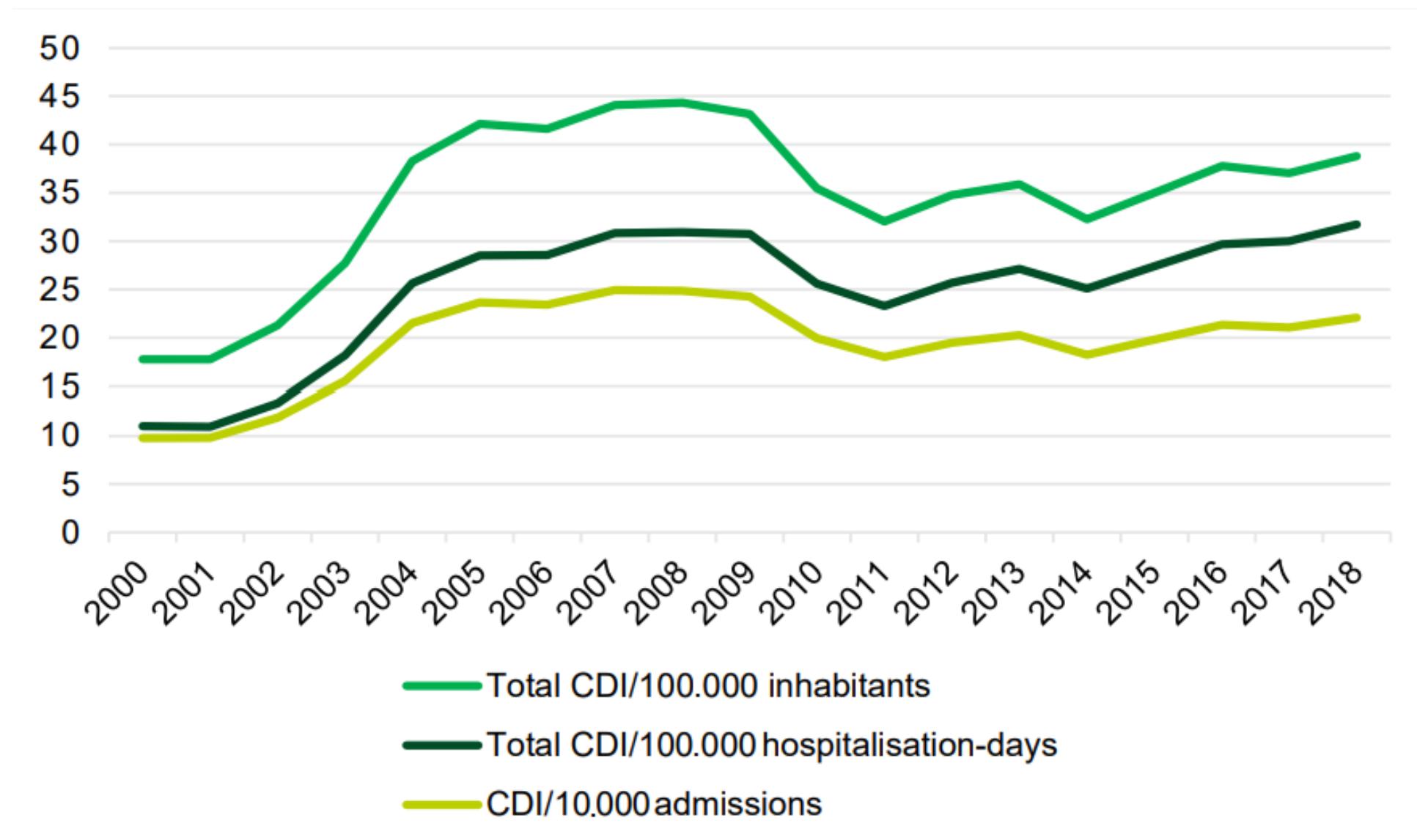
Belangrijke nosocomiale pathogeen⁶

- Echter community-CDI: stijgende trend



Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile and One Health*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(7), 857–863.

Epidemiologie – Overzicht CDI



Epidemiologie – Risicofactoren & Mortaliteit

- Mortaliteit
 - Piek in 2004 met ± 780 overlijdens ten gevolge van C. difficile enterocolitis
 - Dalende trend van 2004-2012
 - Relatief stabiel sindsdien met in 2017 nog 91 overlijdens
- Risicofactoren HA-CDI
 - Breed-spectrum-Antibiotica
 - Proton-pomp-inhibitie
 - Ouderdom (>65j)
 - Langere ziekenhuisopname
 - Opname op intensieve zorgen



Epidemiologie – Illustratie ziekteleast België

- In 2019 werden 4225 gevallen geregistreerd¹
 - 56% Ziekenhuis gerelateerd
 - 44% Rusthuis/community-gerelateerd
- Zang et al (2016) Meta-analyse: Estimating cost of hospital management of CDI²
 - 23.329 dollar/ CA-CDI
 - 53.487 dollar/ HA-CDI
- Geschatte kost van 163 miljoen euro in 2019



Epidemiologie - Typering

- Typering = Identificatie van een stam verder dan het species-niveau
- Verschillende technieken mogelijk
 - Capillaire-elektroforese polymerase ketting reactie (CE-PCR)
 - Pulsed Field gel electrophoresis
 - Multilocus sequencing
 - Whole genome sequencing
- Verschillende classificatiesystemen
- Complexe techniek en interpretatie
 - Referentiecentrum (Université catholique de Louvain UCL)

Pathofysiologie - Ziektebeeld

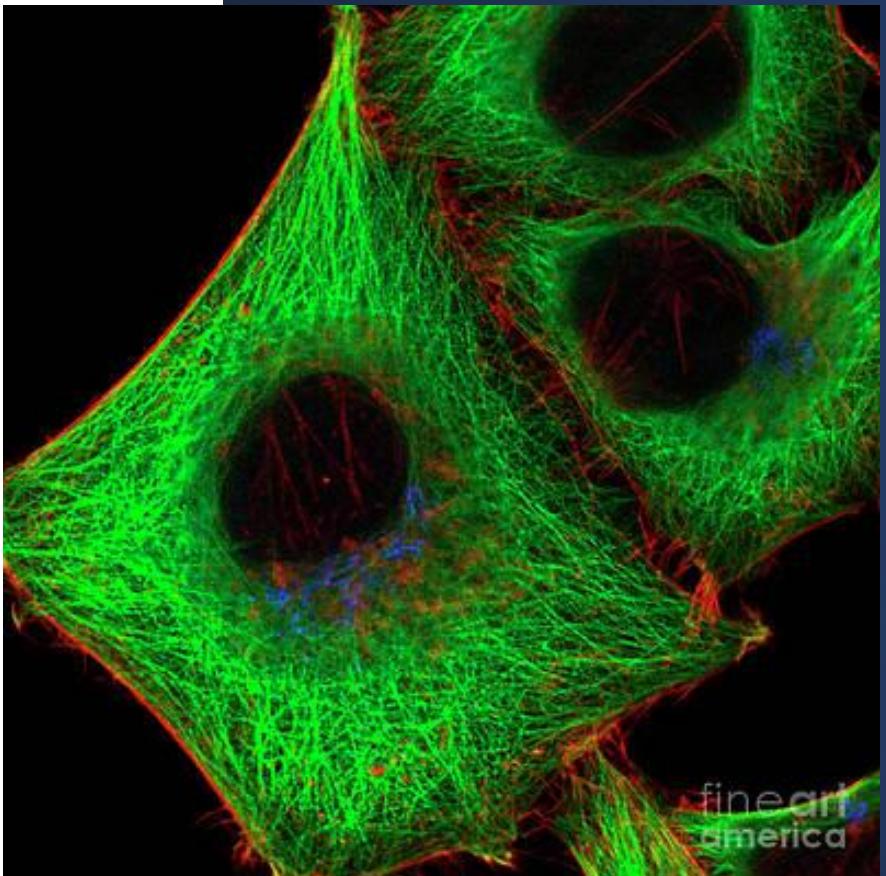
- Belangrijkste verwekker van nosocomiale diarree
 - Vaak met buikkrampen, pijn en koorts
- Variabele ernst
 - Asymptomatisch dragerschap => ernstige pseudomembraneuze colitis/ toxisch megacolon

Pathofysiologie – Infectie/kolonosatie

- Faeco-orale inname van sporen
- Belangrijkste bescherming = Normale darmflora
 - Vermoedelijk via modificatie van galzuren
- Intestinale dysbiose => Kolonisatie/overgroei
- Non-invasief
 - Pathogeniciteit gelinkt aan enzymen en toxines

Pathofysiologie - Toxines

- Pathogenicity locus¹
 - Toxin A
 - Toxin B
- Entero/cytotoxisch²
 - Beschadiging van het epitheliale cytoskelet
 - Toename van vocht-secretie
- *C. difficile* transferase³
 - Binary toxin
 - Vermoedelijk belangrijke rol in pathogeen vermogen



Huidige werkwijze in UZL (2014-Heden)

Macroscopische evaluatie

- Annuleren van vaste/gevormde stalen

Gecombineerde test voor GDH en toxines (Quik Chek Complete, Techlab)

- Rapid membrane immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase antigen and Toxins A and B in fecal specimens.
- Aflezing na 10 minuten

Arbitrerende PCR (*Xpert C. difficile Cepheid*)

- Qualitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay
- 45 minuten tot resultaat
- Targets: Toxine B gen

Same day result

CAT-Vragen

- 1) Welke diagnostische onderzoeken zijn momenteel beschikbaar en aangewezen voor de diagnose van een C. difficile infectie?
- 2) Hoe is de hoeveelheid en aard van aanvragen geëvolueerd doorheen het afgelopen decennium?
- 3) Wat zijn mogelijke wijzingen die we aan onze huidige werkwijze kunnen doen, rekening houdend met de antwoorden op vraag 1 & 2?

Vraag 1: Diagnostische methoden

- Klinische diagnose, ondersteund door laboratoriumgegevens!
 - Belangrijk bij afwijkende pre-test probabiliteit
 - Bv. Outbreak context, jonge kinderen etc...
 - Diarree!
 - 3 stoelgangen/24u die de vorm van het recipiënt aannemen

Aanwezigheid *C. difficile*

(Toxicogene) Cultuur

Glutamate dehydrogenase

Nucleïnezuur amplificatie tests

Aanwezigheid toxines

Cell culture cytotoxicity neutralization assay

Toxine enzyme immunoassay

Anaerobe kweek met bepaling van toxineproductie

- Referentiemethode
- Inoculatie van stoelgangsstaal op cultuur
 - 2-7 dagen!
 - Voorbehandeling mogelijk
 - Bv. Hitte of Ethanol
- Selectieve bodems
 - Cycloserine – cefoxitine – fructose
 - Germinatie bevorderen
 - Eierdooier - Taurocholate

Anaerobe kweek – Chromogene platen

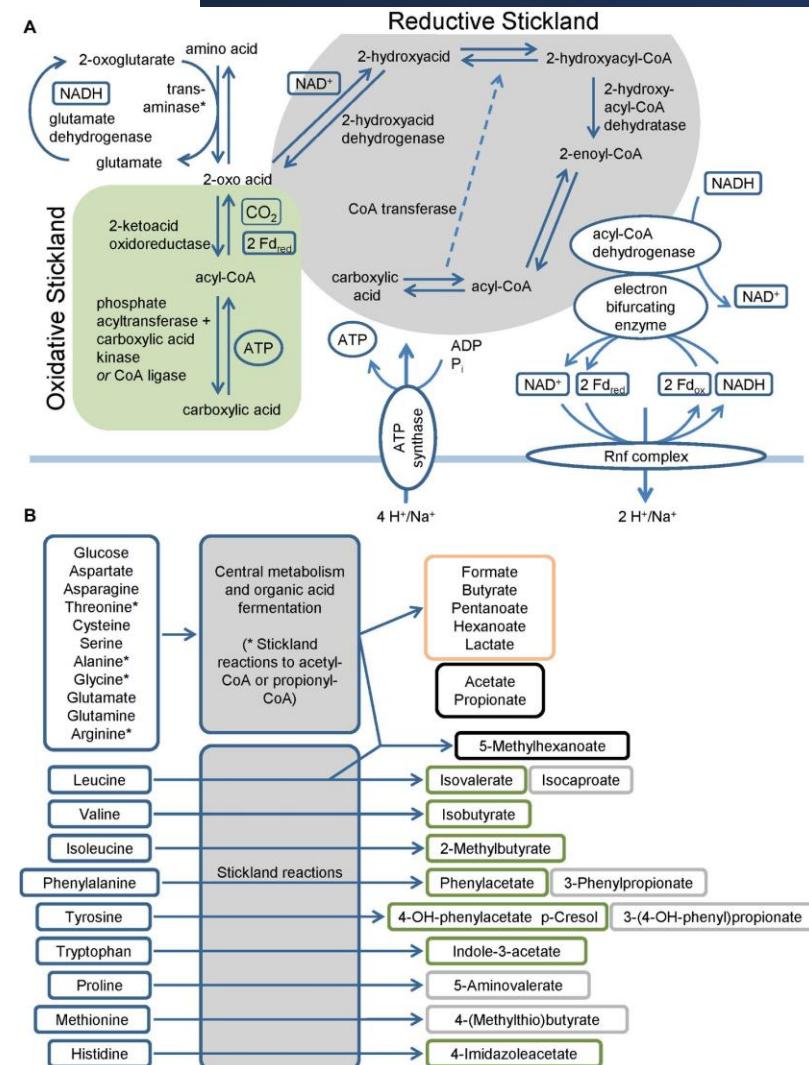
- Bv. ChromID C. difficile (BioMérieux); CHROMagar C. difficile (CHROMAGAR)
- Vergelijking met klassieke cultuurmedia ¹⁻⁷
 - Betere sensitiviteit
 - Snellere aflezing mogelijk
- Sommige ribotypes geven geen gekleurde kolonies
 - Afwezigheid van β -glucosidase (Ribotype BR023, UCL typing class 4)
 - Kleurloze kolonies

Overzicht van studies die ChromID C. difficile (Biomerieux) vergeleken met klassieke media

Author/ reference	Year	#samples/ samples	positive	Sample treatment	Test media	Sensitivity (%) evaluated at	
						24u	48u
Eckert et al. / 29	2013	406/54	None		ChromID	74.1	87
					TCCA		85.2
					CLO		70.4
Carson et al. / 26	2013	50/47	None		ChromID	100	
					TCCFA		87
		100/96	Alcohol		ChromID	99	
					TCCFA		96
Yang et al. / 31	2014	289/49	None		ChromID	93.9	98
					CCFA	18.4	30.6
Han et al. / 27	2014	185/36	Heat		ChromID	58.3	100
					CDSA		83.3
Shin et al. / 28	2014	530/180	Alcohol		ChromID	55.6	85
					CDSA	19.4	75.6

Glutamaat dehydrogenase (GDH)

- Metabool enzyme ¹
- “Common antigen”
 - Gedeeld antigen binnen vroegere Clostridium genus
 - Ook in verschillende anaeroben aanwezig
- Sterke expressie door *C. difficile*



Neumann et al. (2019) Metabolism the Difficile Way: The Key to the Success of the Pathogen *Clostridioides difficile*
Meina Front. Microbiol., 15 February

Glutamaat dehydrogenase (GDH)

- Verschillende beschikbare technieken
 - Lateral flow immunochromatographic assay
 - Microwell enzyme immuno assay
 - Chemiluminescent assay
 - Enzyme-linked fluorescent assay
- Arimoto et al (2016): Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for Clostridium difficile: Systematic review and meta-analysis
 - 42 studies; 3055 pos – 26188 neg
 - Pooled sensitivity 91,1% (87,1-94%) – LR+ 10,4
 - Pooled specificity 91,2% (89,2-92,8%) – LR- 0,098

Nucleïnezuur-amplificatie tests (NAAT)

- Verschillende technieken
 - Polymerase chain reaction (PCR)
 - Helicase-dependent amplification (HDA)
 - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
- Crobach et al (2016): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection: Meta-analysis.
 - 32 studies
 - Vergelijken met TC: Sensitiviteit 95% (92-97%); specificiteit 98% (97-99%)
 - Vergelijken met CCCNA: Sensitiviteit 96% (93-98%); specificiteit 94% (93-95%)

Assay	Manufacturer	Gene targets	Method	TAT (h)	Performance characteristics	
					Sensitivity	Specificity
Prodesse	Hologic	<i>tcdB</i>	qPCR	4	77–100	94–99
ProGastro						
Cd						
Xpert	Cepheid	<i>tcdB/tcdC</i>	qPCR	1	90–100	93–99
Illumigene	Meridian	<i>tcdA</i>	LAMP	1	82–100	94–100
Simplexa	Focus Diagnostics	<i>tcdB</i>	qPCR	1	87–98	99–100
BDMAX	BD Diagnostics	<i>tcdB</i>	qPCR	2	86–98	89–100
Verigene	Nanosphere/Lumine x	<i>tcdB</i>	PCR; nanoparticle hybridization	2	91–95	93–99
Aries C difficile Complete Kit	Luminex	<i>tcdA/tcdB</i>	qPCR	2.3	93	97
AmpliVue	Quidel	<i>tcdA</i>	Helicase dependent amplification	1.5	92–96	99–100
Lyra	Quidel	<i>tcdA/tcdB</i>	qPCR	2–3	82–89	97–99
Solana	Quidel	<i>tcdA</i>	Helicase dependent amplification	0.5	93	99
Cobas	Roche	<i>tcdB</i>	qPCR	0.5–1.5 b	93	99
ICEPlex	Primera DX	<i>tcdB</i>	qPCR	4	90	97
IMDx C difficile for Abbott m2000	IMDx	<i>tcdA</i>	qPCR	3	62–84	94–99
		<i>tcdB</i>				
		<i>tcdBv</i>				
Artus C difficile QS- RGQ	Qiagen	<i>tcdA</i>	qPCR	3.75 for	100	90–100
		<i>tcdB</i>		24 samples		
GenePOC	GenePOC	<i>tcdB</i>	qPCR	1.5	81	97

Reproduced from Carroll et al. (2020).
Laboratory Tests for the Diagnosis of Clostridium difficile

Nucleïnezuur-amplificatie tests

Stel ziekteprevalentie = 5 -10%

- PPV van 46-61%

Belangrijk risico op vals-positiviteit

- Toegenomen kosten door onnodige isolatiemaatregelen, verlenging van opname, etc.
- Onnodig gebruik van antibiotica
 - Inductie van resistentie
 - Toegenomen kolonisatie door VRE

Cell Culture Cytotoxicity Neutralization Assays

- 2^{de} referentiemethode
- Filtraat van stoelgang inoculeren op een celkweek
 - Evalueren van cytopathogeen effect na 24-48 uur
 - Neutralisatie door middel van antisera ter objectivatie
- Complex, lange TAT.
- Zelden nog gebruikt.



Toxin enzyme immune-assay (EIA)

- Verschillende technieken
 - Solid phase microwell
 - Chromatographic cassettes
 - Lateral flow membranes
 - Chemiluminiscent immunoassay
 - Enzyme linked fluorescent assay
 - Etc.
- Crobach et al (2016): European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection: Meta-analysis.
 - 29 studies
 - Vergelijken met TC: Sensitiviteit 57% (51-63%); specificiteit 99% (98-99%)
 - Vergelijken met CCCNA: Sensitiviteit 83% (76-88%); specificiteit 99% (98-99%)

Overzicht van test-modaliteiten

Test	Voordelen	Nadelen
Toxicogene cultuur	Zeer goede sensitiviteit (Referentie methode) Organisme beschikbaar voor verdere testen	Lange TAT Complex/omslachtig Veel manuele handelingen
GDH	Goede sensitiviteit Snelle, goedkope test	Geen onderscheid tussen kolonisatie en infectie
NAAT	Zeer goede sensitiviteit/specificiteit Snelle test	Kostelijke test Nog sterkere detectie van kolonisatie
CCCNA	Goede sensitiviteit (Referentie-methode) Toont de aanwezigheid van toxines aan	Lange TAT Celkweek is zeer complex Veel manuele handelingen
Toxin EIA	Snelle test Zeer goede specificiteit Test de aanwezigheid van toxines	Lage sensitiviteit

Een enkele test versus een seriële aanpak

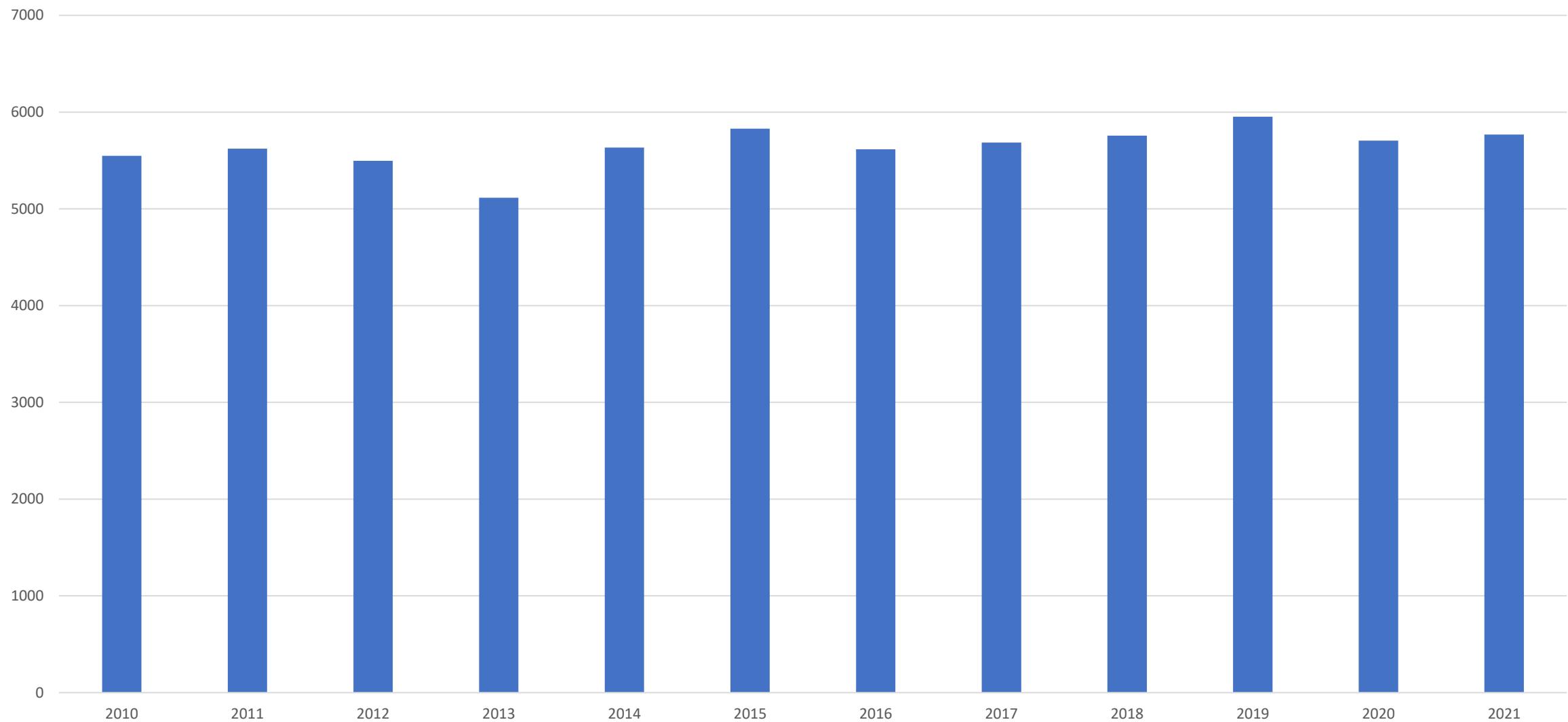
- Impact op kliniek
 - Nood aan relatief snelle diagnostiek
- Geen enkele snelle test is op zich geschikt voor diagnostiek
 - Meest specifieke (Toxin EIA)
 - Prevalentie van 5% => PPV 81%
 - GDH en NAAT
 - Geen onderscheid tussen drager en CDI
- Minimaliseren van # testen
 - Eerst een heel gevoelige methode => voor negatieve stalen stopt de flow
 - Confirmatie met een zeer specifieke methode => dubbel positief is zeker reel
 - Wat te doen met discordante resultaten?

Society	Guideline	Country	Year	Target population	Recommended testing strategy	Repeat testing	Infant	Culture
Infectious diseases Society if America (IDSA)/ Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)	Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children	America	2017	Unexplained new-onset ≥3 stools in 24hours	Stool toxin test in multistep algoritm (GDH + toxin; GDH + toxin with NAAT arbitration; NAAT + toxin)	Do not perform repeat testing withing 7 days and do not test asymptomatic patients	Do not routinely test infants ≤12 months of age with diarrhea. (1-2y only after exclusion of other causes)	Gold standard, not recommended for routine work-up
American College of Gastro-enterology (ACG)	Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of Clostridioides difficile Infections	America	2021	3 or more unformed stools in 24 hours	CDI testing algoritms should include a highly sensitive (GDH/NAAT) followed by a highly specific testing modality. (Toxin EIA) Arbitration reserved for patients with high clinical suspicion.	No mention	No mention	Gold standard, but impractical outside of research setting
Australian Infection Control Association (AICA)	Infection control guidelines for patients with Clostridium difficile infection in healthcare settings	Australia	2011	Only perfomed on unformed stools unless ileus is suspected.	Combination of a sensitive and specific test.	Not recommended during the same episode.	No mention	No mention
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection	Europe	2016	All unformed fecal samples and rectal swabs in case of ileus.	2 stage algorithm consisting of a screening test with high sensitivity (NAAT or GDH) followed by a highly specific (Toxin EIA) test. NAAT or TC as arbitration of discordant results based on clinical evaluation or local infection prevention guidance.	Not routinely recommended during the same episode, justifiable during outbreak (lower NPV due to higher prevalence). Test of cure is not recommended.	Do not routinely test infants ≤3 years. Testing reserved for physician's request.	Every laboratory should be able to isolate C. difficile
Hoge gezondheidsraad (HGR)	Recommendations for the control and prevention of <i>Clostridium difficile</i> in health care facilities.	Belgium	2019	Fresh and liquid stool. Swabs have insufficient volume to perfom testing.	3-step algorithm consisting of GDH+Toxin IA arbitrated by PCR (preliminary result) followed by TC the next day.	No mention	No mention	Present in the recommended approach
Scottish Health protection Network	Guidance on Prevention and Control of Clostridium difficile Infection (CDI) in health and social care settings in Scotland.	Scotland	2017	Restricted to diarrheal samples.	2-step algorithm consisting of GDH or NAAT followed by Toxin IA or CCCNA	Not recommended. Test of clearance is not recommended.	Do not routinely test infants ≤3 years. Testing reserved for physician's request.	No mention
RijksInstituut voor Volksgezondheid en milieu (RIVM)	Guidance document: Clostridium difficile	Netherlands	2014	restricted to diarrheal samples. Swabs are inadequate.	2 step algorithm consisting of GDH as a screening test followed by a test with high specificity. Arbitrated by a repeat sample, PCR or TC.	Possible to arbitrate discordant screening results.	Do not routinely test infants ≤2 years.	Possible as arbitrage, not required.

Vraag 2: Analyse aanvragen UZL

- Query van alle C. Difficile aanvragen van 01/01/2010 – 31/12/2021
- Implementatie van arbitrerende PCR in oktober 2013
 - Analyse op jaarbasis beginnende 2014

C.difficile Requests per Year in UZL



Positivity rate

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Total	5633	5829	5616	5685	5757	5951	5706	5769
GDH pos/Tox pos	297	202	148	180	140	210	197	195
GDH neg/Tox neg	4737	5029	4927	5023	5080	5218	5083	5198
GDH pos/Tox neg	591	581	536	474	534	505	426	372
GDH neg/Tox pos	6	16	5	8	3	18	0	4
PCR pos	276	244	270	222	275	240	186	186
PCR neg	321	361	272	260	262	285	239	190
Positivity rate	10.2%	7.7%	7.4%	7.1%	7.2%	7.6%	6.7%	6.6%

Aantal aanvragen voor elke patiënt

total requests	Unique patients	Year	# Requests/ Patiënt																																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24
5633	3285	2014	2204	567	228	98	51	39	27	13	10	6	5	4	2	3	0	4	2	1	0	0	5	4	2	3	0	4	2	1	0	0	0	0	0
5829	3516	2015	2399	610	225	104	59	51	23	13	6	8	3	1	2	2	0	0	0	0	0	1	3	1	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5616	3483	2016	2413	598	221	102	57	35	14	13	6	3	1	3	3	1	0	2	0	0	0	0	1	3	3	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0
5685	3504	2017	2435	595	224	100	49	34	29	12	5	8	0	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2	0	0	0	1	1	0	0	1	0
5757	3550	2018	2468	607	216	99	61	30	19	10	9	6	1	3	2	3	1	2	0	0	0	0	1	3	2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	1
5951	3599	2019	2503	581	211	115	73	30	21	17	8	5	6	1	4	1	3	2	0	0	0	0	6	1	4	1	3	2	0	0	0	1	0	0	0
5706	3468	2020	2374	598	225	108	55	30	23	12	6	7	4	4	2	3	0	1	1	0	0	0	4	4	2	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0
5769	3598	2021	2512	586	246	115	53	28	13	15	4	8	3	2	0	0	1	0	1	1	0	1	3	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0

Aantal herhaalde aanvragen binnen bepaald interval (gem n = 2180)

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
>1 day	94%	95%	96%	96%	97%	97%	97%	97%
<1 day	5%	4%	4%	4%	3%	3%	3%	3%
>7 days	55%	60%	63%	63%	63%	62%	64%	62%
<7 days	45%	40%	37%	37%	37%	37%	36%	38%
>14 days	37%	42%	42%	43%	42%	43%	41%	41%
<14 days	63%	58%	58%	57%	58%	57%	59%	59%

Aantal herhaalde aanvragen binnen bepaald interval (gem n = 2180)

	Delta <1d	N/N	P/P	P/N/N	P/N/P
Resultaat 1	N/N	55	0	0	1
	P/P	2	1	0	0
	P/N/N	0	1	2	1
	P/N/P	1	0	0	1

	delta <7d	N/N	P/P	P/N/N	P/N/P
Resultaat 1	N/N	661	21	8	16
	P/P	15	11	2	8
	P/N/N	10	2	19	2
	P/N/P	24	5	3	11

	delta <14d	N/N	P/P	P/N/N	P/N/P
Resultaat 1	N/N	1043	31	18	19
	P/P	23	12	3	13
	P/N/N	20	3	29	2
	P/N/P	36	5	5	16

- Respectievelijk 91%, 85% en 86% hetzelfde resultaat
- 5% van de negatieve resultaten is positief bij herhaling (constant)

Kinderen 0-2j

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Total	5633	5829	5616	5685	5757	5951	5706	5769
Amount 0-2y	553	374	331	334	497	361	257	234
%	9.8%	6.4%	5.9%	5.9%	8.6%	6.1%	4.5%	4.1%

Macroscopic Evaluation

Year	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Total	5633	5829	5616	5685	5757	5951	5706	5769
No description	1060	842	863	1003	933	2486	3975	4008
Semi-solid	2801	3035	3041	2933	3189	2196	1029	1011
Liquid	1274	1402	1341	1376	1287	1051	561	566
Slimy	313	385	254	279	318	164	93	86
Formed	333	313	223	238	158	151	99	137
Bloody	73	87	71	63	70	41	24	33

Conclusions

Aantal aanvragen	Positiviteitsratio	Pediatrische aanvragen	Macroscopische evaluatie
<ul style="list-style-type: none">• Stabiel doorheen de jaren• Significant aantal repeat testen (38% binnen 7d): Mogelijkheid tot implementatie van een pop-up of restrictie op aanvragen binnen tijdspanne.	<ul style="list-style-type: none">• Dalende trend, benaderd nationaal gemiddelde (5,3%)• Mogelijks effect van ziekenhuishygiëne/stricter antibioticabeleid vs subtiele shifts in aanvraaggedrag/prevalentie?• Significant aantal onnodiige Toxine-testen. Mogelijkheid tot optimalisatie flow.	<ul style="list-style-type: none">• 4% is niet significant• Derdelijns centrum => veel immuun gecompromitteerde kinderen	<ul style="list-style-type: none">• Geen verschil in positiviteitsratio. Significantie?• Gevormde stalen annuleren

To Do

- Contact opnemen met IT:
 - Macroscopische evaluatie van stoelgang bij *C. difficile* aanvraag
- MLT-overleg
 - Herinneren dat gevormde stoelgangstalen geannuleerd mogen worden
- Contact opnemen met Pediatrie mbt indicatiestelling *C. difficile*
- Kost-effectiviteit van de huidige werkwijze vergelijken met andere commerciële testen.