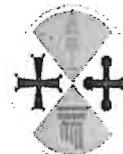


**S**ERVIZIO  
**S**ANITARIO  
**R**EGIONALE



**GRANDE OSPEDALE METROPOLITANO**  
**"Bianchi - Melacrino - Morelli"**

*Reggio Calabria*



REGIONE CALABRIA

Dipartimento Tutela della Salute  
e Politiche Sanitarie

## PDTA –per la diagnosi e il controllo della diffusione di *Clostridium difficile*

<b>Ed. 00</b>		
<b>Rev.</b>		
<b>DATA</b>		
<b>Redazione</b>	<i>dr. Francesco D'Aleo</i> <i>Responsabile UOC Microbiologia e Virologia</i>	
	<i>dr.ssa Martina Bonofiglio</i> <i>Dirigente Biologo UOC Microbiologia e Virologia</i>	
	<i>dr.ssa Angela Oliva</i> <i>Dirigente Biologo UOC Microbiologia e Virologia</i>	
	<i>dr.ssa Domenica Ielo</i> <i>Dirigente Biologo UOC Microbiologia e Virologia</i>	
<b>Verifica</b>	<i>dr. Francesco Moschella</i> <i>COVID Manager</i>	
	<i>dr. Demetrio Marino</i> <i>Responsabile UOSD Governo Clinico e Risk Management</i>	
	<i>dr. Santo Ceravolo</i> <i>Dirigente Responsabile Ricerca e Governo dell'Eccellenza e della Qualità</i>	
	<i>dr.ssa Maria Marino</i> <i>Direzione Medica di Presidio</i>	
<b>Approvato</b>	<i>dr. Salvatore Costarella</i> <i>Direttore Sanitario Aziendale</i>	

**U.O.C. di Microbiologia e Virologia**  
responsabile: dr. Francesco D'Aleo

---

PDTA –per la diagnosi e il controllo della diffusione  
di *Clostridium difficile*

## **INDICE**

- 1. Premessa**
- 2. Patogenesi**
- 3. Fattori di rischio**
  - 1. Scopo e Applicazione**
  - 2. Diagnosi di Laboratorio**
  - 3. Tipologia di campioni**
  - 4. Elenco strumentazione**
  - 5. Registri-etichette-documenti**
  - 6. Riferimenti**

## 1. Premessa:

In passato la diarrea associata al *Clostridium difficile* (CD) era considerata una malattia "fastidiosa". Lo scenario è cambiato radicalmente a partire dai primi anni 2000, con un aumento sia dell'incidenza che delle forme clinicamente gravi di infezione da CD (ICD). Il CD è un bacillo Gram positivo, anaerobio e sporigeno, largamente diffuso nel suolo, presente nel tratto intestinale degli animali che colonizza molti bambini di età inferiore ad un anno ed una piccola percentuale di adulti sani (3-4%). Esistono diversi ceppi di CD, alcuni non producono tossine e non sono patogeni; hanno interesse clinico i ceppi produttori di enterotossina A e/o citotossina B. Queste tossine si legano alla superficie delle cellule epiteliali della mucosa intestinale e, una volta internalizzate, catalizzano la glicosilazione di alcune proteine citoplasmatiche: il collasso del citoscheletro che ne consegue, insieme alla chemiotassi dei neutrofili e alla liberazione di citochine, induce apoptosi e morte cellulare. La tossina B ha attività citotossica più potente della tossina A.

## 1. Patogenesi

La sequenza degli eventi che portano allo sviluppo delle patologie da CD sono:

- alterazione della flora microbica intestinale prevalentemente a seguito di terapia antibiotica, recente o pregressa;
- esposizione a CD e colonizzazione;
- produzione di tossine e conseguenti danni tissutali indotti da queste. In assenza di una efficace risposta immune compaiono i danni tissutali indotti; se la risposta immune è efficace il soggetto non sviluppa malattia, ma diviene portatore asintomatico

I quadri clinici associati a CD sono :

- *Sindrome diarroica lieve*: possono essere presenti febbre (30-50% dei pazienti), leucocitosi (50-60%), dolori addominali o crampi (20-33%); sono stati descritti anche nausea, malessere, anoressia, ipoalbuminemia, presenza di sangue occulto nelle feci, disidratazione.
- *Colite senza pseudomembrane*.
- *Colite Pseudo Membranosa*: necrosi epiteliale, ulcerazioni della parete intestinale con formazione di pseudomembrane costituite da mucina, fibrina, leucociti, frammenti cellulari.

- *Colite fulminante*: megacolon tossico, perforazione intestinale e morte. Si sviluppa approssimativamente nell'1-3% dei casi che si infettano.
- *Altre complicanze addominali*: volvolo, enteropatia proteino-disperdente, diarrea ricorrente associata a CD(20% dei pazienti).
- *Manifestazioni extraintestinali*: batteriemia, ascesso splenico, osteomielite, Sindrome di Reiter.

## 2. Fattori di rischio

a.i) **Età**. Tutte le età sono potenzialmente a rischio. L'età superiore a 60 anni è di per sé un fattore di rischio, che diviene più significativo oltre gli 80 anni. In controtendenza recenti dati del sistema di sorveglianza inglese, che nel 2007 ha rilevato un aumento del 20% di infezioni nella popolazione di età inferiore a 60 anni.

a.ii) **Sesso**. Il sesso femminile è più a rischio.

a.iii) **Patologie associate**: insufficienza renale

a.iv) cronica, uremia, fibrosi cistica, infezione da HIV, patologie chirurgiche del tratto

a.v) intestinale e biliare, malattie infiammatorie del colon, trapianto di fegato.

a.vi) **Riduzione delle difese immunitarie, anche per terapie farmacologiche**. Negli Stati Uniti circa il 60% dei bambini e adulti presentano IgG anti-CD, ma non è chiaro entro quali livelli l'immunità umorale sia protettiva; è possibile che IgA intestinali possano "bloccare" il legame recettoriale; inoltre un'inadeguata risposta immunitaria potrebbe predisporre il paziente a recidive.

a.vii) **Alimentazione con sondino naso-gastrico, gastrostomia**.

a.viii) Sono popolazioni emergenti a rischio i **bambini** (da 1-2 a 12 anni) e le **puerpere** (frequente contatto con le feci del neonato).

a.ix) **Terapia antibiotica** soprattutto se combinata e protratta effettuata con farmaci ad ampio spettro d'azione, che alterano la normale flora batterica intestinale riducendo la resistenza alla colonizzazione da CD. Virtualmente ogni antibiotico può essere associato con ICD. Nella pratica alcune classi (es. cotrimoxazolo) sono raramente all'origine del problema;

ampicillina, fluorochinoloni, clindamicina e cefalosporine sono considerati antibiotici predisponenti.

a.x) **Altri farmaci:** antineoplastici, emollienti fecali, farmaci per i disturbi correlati alla secrezione acida gastrica (in particolare inibitori di pompa protonica), lassativi utilizzati nei modi utili per la preparazione alla colonscopia.

a.xi) **Ospedalizzazione**, soprattutto se protratta, e/o dimora in strutture assistenziali (aumentata esposizione a CD). La durata della degenza è altamente correlata con l'acquisizione del CD (il 50% dei pazienti può divenire positivo dopo 4 settimane di degenza).

### 3. **Scopo e campo di applicazione**

L'obiettivo di tale percorso è quello di identificare uno strumento metodologicamente standardizzato che supporti e migliori il percorso diagnostico nei pazienti in cui è in atto o si sospetta un'infezione da CD. Tale percorso diagnostico si rende necessario al fine di sottoporre il paziente ad esami microbiologici necessari ed appropriati nella valutazione del rischio di infezione da CD, al fine di rendere operative strategie gestionali volte ad impedire la disseminazione di CD in ambiente ospedaliero attraverso l'adozione, durante le manovre assistenziali, di misure precauzionali aggiuntive alle normali applicazioni standard.

### 4. **Diagnosi di laboratorio**

La diagnosi si basa sulla ricerca nelle feci di CD e/o di suoi antigeni, tossine o acidi nucleici:

- Ricerca dell'antigene comune (*glutammato deidrogenasi -GDH*), indice di presenza di *C. difficile*. Il test (CLIA) è dotato di buona sensibilità, ma, in caso di positività, richiede conferma per evidenziare anche la presenza delle tossine A e B.
- Ricerca delle *tossine A e B* (CLIA): mediamente sensibile (75%), anche in relazione al cut-off utilizzato, è dotato di buona specificità (90%-100%); per la sua praticità e affidabilità è il test attualmente più diffuso nei laboratori. L'utilizzo di questo test come unico strumento per la diagnosi di infezione da *C. difficile* è tuttavia criticato per due motivi: 1) ha sensibilità meno elevata rispetto alla ricerca dell'antigene, 2) le tossine si degradano piuttosto rapidamente se il campione non viene conservato a 2°-8°C.

▪ Amplificazione di acidi nucleici (NAT): Sono disponibili in commercio test in PCR real-time in grado di identificare, a partire dal campione i ceppi ipervirulenti in base al riconoscimento di sequenze dei *geni ctdB*, della *tossina binaria* e di *ctdC mutato*. L'automazione delle fasi di estrazione, amplificazione e lettura, insieme al tempo di esecuzione di poco più di un'ora, ne fanno il test diagnostico ideale.

## 5. Tipologia di campioni:

### Fase Pre-Analitica

Il test deve essere eseguito unicamente **su campioni di feci non formate**, corrispondenti ai valori da 5 a 7 di un'apposita classificazione (Bristol scale). Campioni idonei: feci diarroidiche (che assumono la forma del contenitore). **Le feci formate e il tampone rettale sono campioni non idonei e non saranno accettati. E' sufficiente l'invio di un solo campione di feci; in caso di negatività e di forte sospetto clinico è possibile l'invio di un secondo campione a distanza di 24 ore. In caso di positività l'esame non va ripetuto (non è necessaria la ripetizione dell'esame prima della dimissione). Tutte le richieste improprie di ripetizione dell'esame non saranno espletate.**

### Bristol Stool Chart

Tipo 1		Grumi duri separati tra loro, come noci (difficili da espellere)
Tipo 2		A forma di salsiccia, ma formata da grumi uniti tra loro
Tipo 3		Come un salame, ma con crepe sulla sua superficie
Tipo 4		Come una salsiccia o un serpente, liscia e morbida
Tipo 5		Pezzi separati morbidi con bordi come tagliati/spezzati; chiara (facile da evacuare)
Tipo 6		Pezzi soffici/flocculari con bordi frastagliati, feci pastose
Tipo 7		Acquosa, nessun pezzo solido <b>Completamente liquida</b>

**Trasporto e conservazione del campione:** le feci devono essere inviate al laboratorio entro 1 ora dall'emissione (scrivere sul campione l'orario) oppure possono essere conservate a +4°C per non più di 48 ore. La conservazione a -20°C (specie in presenza di ripetuti scongelamenti) compromette l'integrità delle tossine eventualmente presenti nel campione; quest'ultimo può essere mantenuto a temperatura ambiente senza pregiudizio per la vitalità delle spore di *C. difficile*.

**Accesso al laboratorio:** il laboratorio deve essere in condizioni di eseguire il test sette giorni su sette. Il tempo di risposta deve essere il più breve possibile: il risultato di un eventuale test positivo deve essere comunicato tempestivamente al reparto e al personale addetto al controllo delle infezioni, così come la richiesta di effettuare ulteriori controlli in caso di esito dubbio.

#### **Fase Analitica**

Concordemente con le più recenti linee guida internazionali, nel nostro laboratorio la diagnosi di CDI si basa sulle seguenti indagini:

-Ricerca dell'antigene comune (glutammato deidrogenasi -GDH), indice di presenza di CD. Il test è eseguito con metodiche immuno-enzimatiche (CLIA- LIAISON® XL – Diasorin Inc).

-Ricerca delle tossine A e B: Il test risente maggiormente delle modalità di conservazione del campione perché le tossine si degradano piuttosto rapidamente se il campione non viene conservato a 2°-8°C. Il test è eseguito con metodiche immuno-enzimatiche (CLIA- LIAISON® XL – Diasorin Inc).

-Amplificazione di acidi nucleici (NAT) :il test in PCR real-time (

Allplex™ Gastrointestinal Full Panel Assay CE- Seegene Inc.) è in grado di identificare, a partire dal campione, i ceppi tossinogenici e iper virulenti (ribotipo027/NAP1/B1), in base al riconoscimento delle sequenze dei geni *ctdB*, della tossina binaria e di *ctdC* mutato. L'automazione completa delle fasi di estrazione, amplificazione e lettura, insieme al tempo di esecuzione dura circa 3 ore.

## 6. Elenco strumentazione

- n° 1 LIAISON® XL – (Diasorin Inc)
- n° 2 Nimbus IVD Seegen Inc.
- n° 2 CFX96™ Real-time PCR (Bio-Rad) con software CFX Manager 1.6

## 7. Registri – Etichette – Documenti

- Tutti i campioni processati presso UOC di Microbiologia e Virologia sono riportati, con apposita etichetta su sistema LIS; entrambi consentono una rapida consultazione e verifica dei risultati.
- Per le relative richieste e codici d'esame è possibile consultare l'apposito manuale pubblicato sul sito Aziendale: *“Manuale per il prelievo, trasporto e conservazione dei campioni biologici”*.
- L'UOC di Microbiologia e Virologia conserva le relative linee di indirizzo e gli aggiornamenti ministeriali.

## 8. RIFERIMENTI

Le Raccomandazioni propongono le misure di controllo messe a punto da:

1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseasesb.European C.difficile.
2. Infection Control Groupc.European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS).
3. Guidelines for Diagnosis, treatment, and prevention of C.difficileinfections 2013 Am J Gastroenterol.
4. Servizio Sanitario Nazionale Regione Piemonte: Clostridium difficile.La prevenzione del contagio. 2004

5. Marcel JP et al. Healthcare-associated Infections : think globally, act locally. Clin. Microbiol. Infect 2008; 14: 895-907.
6. Diagnosis and treatment of Clostridium difficile in adults: a systematic review N Bagdasarian, K Rao, PN Malani - Jama, 2015 .
7. Percorso Diagnostico presentato durante il XXXVIII Congresso Nazionale AMCLI – Rimini, 17-20 novembre 2009 Revisione del Percorso diagnostico 2015 Enteriti d'origine infettiva (Esame microbiologico delle feci).