



Procedura di Sistema di Gestione per la Qualità

**Diagnosi di infezione da *Clostridium difficile***

INDICE

1.0 SCOPO DEL DOCUMENTO	pag. 2
• CAMPO DI APPLICAZIONE	pag. 2
• TERMINOLOGIA E ABBREVIAZIONI	pag. 6
2.0 RESPONSABILITA'	pag. 6
3.0 RIFERIMENTI	pag. 6
4.0 ARCHIVIAZIONE	pag. 6
5.0 CRITERI E STRUMENTI DI VALUTAZIONE	pag. 6

Data Emissione	N° Pag.	Redazione a cura	Revisione metodologica	Verifica/ Approvazione DS
10_02_2015	6	Dott. S. Dodaro M&V	Dott. M.Loizzo Qualità e Accreditamento	Dott. F. Rose
		Dott. D. Perugini M&V	Revisione Clinica Dott. F. Luciani M.Infettive	
		Dott. C. Giraldi M&V	Dott. A. Noto Medicina Interna	

## 1.0 SCOPO DEL DOCUMENTO

La procedura è finalizzata ad avere un percorso diagnostico condiviso per le infezioni da *Clostridium difficile*. Obiettivo principale del documento è rendere disponibile agli operatori sanitari/assistenziali uno strumento di lavoro che possa essere di utile riferimento per definire le modalità, i tempi e l'interpretazione dei test diagnostici utilizzati.

### • CAMPO DI APPLICAZIONE

*Clostridium difficile* (CD) è un bacillo gram positivo, anaerobio, sporigeno, largamente diffuso nel suolo, presente nel tratto intestinale degli animali e che colonizza circa il 3% degli adulti sani; in ambito clinico è responsabile di diverse tipologie di infezioni (*C. difficile-associated disease*, CDAD, o infezione da *C. difficile*, CDI) di differente gravità. I principali fattori di virulenza sono legati alla produzione di una enterotossina (tossina TcdA) e una citotossina (tossina TcdB). Vi sono ceppi di *C. difficile* che non sono produttori di tossine, altri che producono una singola tossina (gene TcdA o TcdB) e altri ancora che producono entrambe le tossine. Solamente i ceppi produttori di tossina sono stati identificati come responsabili di CDAD. Alcuni ceppi producono un'ulteriore tossina, la ADP-ribosil transferasi actina-specifica o CDT, chiamata tossina binaria, che li rende particolarmente patogeni. Questa tossina non è relazionata con la tossina A e la tossina B. Le tossine prodotte entrano nelle cellule epiteliali intestinali tramite endocitosi, distruggono l'actina del citoscheletro, causandone la morte della cellula. Esse inducono inoltre la produzione di TNF $\alpha$  e IL-1. In Europa, si sta diffondendo un ceppo particolarmente virulento di CD, caratterizzato dal ribotipo 027, dotato di elevata produzione di tossina attribuita a delezioni nel gene regolatore *tcdC*.

La gravità della CDAD è variabile: l'infezione si può manifestare come diarrea lieve, ma può anche giungere a determinare colite pseudomembranosa, megacolon tossico e perforazione intestinale. Le manifestazioni cliniche gravi, alle quali soprattutto si associa un rischio di mortalità, sono più frequenti se l'infezione è sostenuta da nuovi ceppi più virulenti. L'infezione da CD è tipicamente di origine nosocomiale e si manifesta con discreta frequenza anche con carattere epidemico.

### **Fisiopatologia e modalità di trasmissione**

La sequenza di 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 (ad esempio, pazienti adulti dopo degenza ospedaliera e terapia antibiotica);
- produzione di tossine. 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. L'infezione si verifica a seguito di trasmissione fecale-orale, per ingestione di spore che sopravvivono nell'ambiente acido dello stomaco e si trasformano nella forma vegetativa nel colon. Il paziente colonizzato/infecto è la fonte primaria di CD:
- nelle feci di adulti asintomatici immunocompetenti CD è riscontrabile in circa il 3% dei casi: in larga misura si tratta di ceppi non patogeni, circa lo 0,6% sono ceppi produttori di tossina. I portatori asintomatici rappresentano un *reservoir* di CD che può contribuire alla sua disseminazione nell'ambiente;
- nei soggetti ospedalizzati il numero di colonizzati raggiunge il 7-25 %, con una percentuale di ceppi produttori di tossina del 2-8%;
- i neonati (sino al compimento del primo anno di età) spesso sono portatori asintomatici, anche di ceppi produttori di tossina. La colonizzazione pare favorita dall'imaturità della flora batterica intestinale e la mancata evoluzione verso la malattia è dovuta all'incapacità della tossina di legarsi ai recettori degli enterociti, anch'essi ancora immaturi. Per via diretta o indiretta CD contamina l'ambiente, che diviene la fonte secondaria.

### **Fattori di rischio**

- Fattori legati all'ospite.

- Età. Tutte le età sono potenzialmente a rischio, con eccezione dei bambini piccoli, che non presentano manifestazioni cliniche per immaturità recettoriale. 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.

- Riduzione delle difese immunitarie, anche per terapie farmacologiche.
  - Co-morbidità severe quali insufficienza renale cronica, fibrosi cistica, chirurgia del tratto intestinale e biliare, neoplasie ematologiche, morbo di Crohn, colite ulcerativa, ecc.
  - Alimentazione con sondino naso-gastrico, gastrostomia.
  - Sono popolazioni emergenti a rischio i bambini (da 1-2 a 12 anni) e le puerpere (frequente contatto con le feci del neonato).
- Ospedalizzazione, soprattutto se protratta, e/o dimora in strutture assistenziali (aumentata esposizione a CD).
  - Terapia antibiotica, soprattutto se:
    - combinata e/o protratta
    - effettuata con farmaci ad ampio spettro d'azione, che alterano la normale flora batterica intestinale riducendo la resistenza alla colonizzazione da CD.
  - Terapia con farmaci inibitori di pompa protonica: classe farmacologia relativamente nuova, che ha avuto un notevole incremento d'uso nella pratica clinica.

#### **Definizione di caso per la sorveglianza**

Poiché la diarrea non costituisce più la manifestazione esclusiva, oggi è più appropriato parlare di malattia o di infezione da CD (CDAD/CDI). Inoltre, il riscontro di infezioni di origine comunitaria ha indotto a modificare in senso estensivo le tradizionali definizioni della malattia.

**Caso di CDAD/CDI:** paziente con diarrea o megacolon tossico che presenta uno o più dei seguenti criteri:

- test di laboratorio positivo per tossina A e/o B o per un ceppo di CD tossinogenico nelle feci identificati mediante coltura o altri metodi;
- colite pseudomembranosa all'esame endoscopico o in corso di intervento chirurgico;
- colite pseudomembranosa ad un esame istopatologico.

**Caso di CDAD/CDI ricorrente (recidiva):** nuovo episodio che si verifica entro 8 settimane dopo la completa risoluzione di un precedente episodio. Le recidive si registrano per il 20% dopo il primo episodio, per il 40% dopo il secondo e per il 60% dopo più di due episodi.

**Caso grave di CDAD/CDI:** comparsa di uno o più degli eventi sottoelencati entro 30 giorni dall'insorgenza:

- ricovero in unità terapia intensiva per complicanze (es., shock);
- colectomia per megacolon tossico, perforazione ecc.;
- decesso.

**CDAD/CDI correlata all'assistenza, insorta in ospedale o in struttura residenziale (Healthcare Facility associated/HCF onset):** patologia insorta dopo più di 48 ore dal ricovero in ospedale o dall'ammissione in una struttura residenziale.

**CDAD/CDI correlata all'assistenza, insorta in comunità (Healthcare Facility associated/Community onset):** patologia insorta in comunità. Prevenzione e controllo delle infezioni da C. difficile o entro 48 ore dal ricovero in paziente dimesso da un ospedale o da una struttura residenziale da non più di 4 settimane.

**CDAD/CDI di origine comunitaria (Community associated):** patologia insorta in comunità o entro 48 ore dal ricovero in paziente che non sia stato ricoverato in ospedale/struttura sanitaria nei precedenti tre mesi.

#### **DIAGNOSI ENDOSCOPICA**

- In caso di colite pseudomembranosa (CPM) la diagnosi è endoscopica.

#### **DIAGNOSI DI LABORATORIO**

##### **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 diarroiche (che assumono la forma del contenitore).

**Campioni non idonei:** feci formate, tampone rettale.

**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.

## 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>

### Fase Analitica

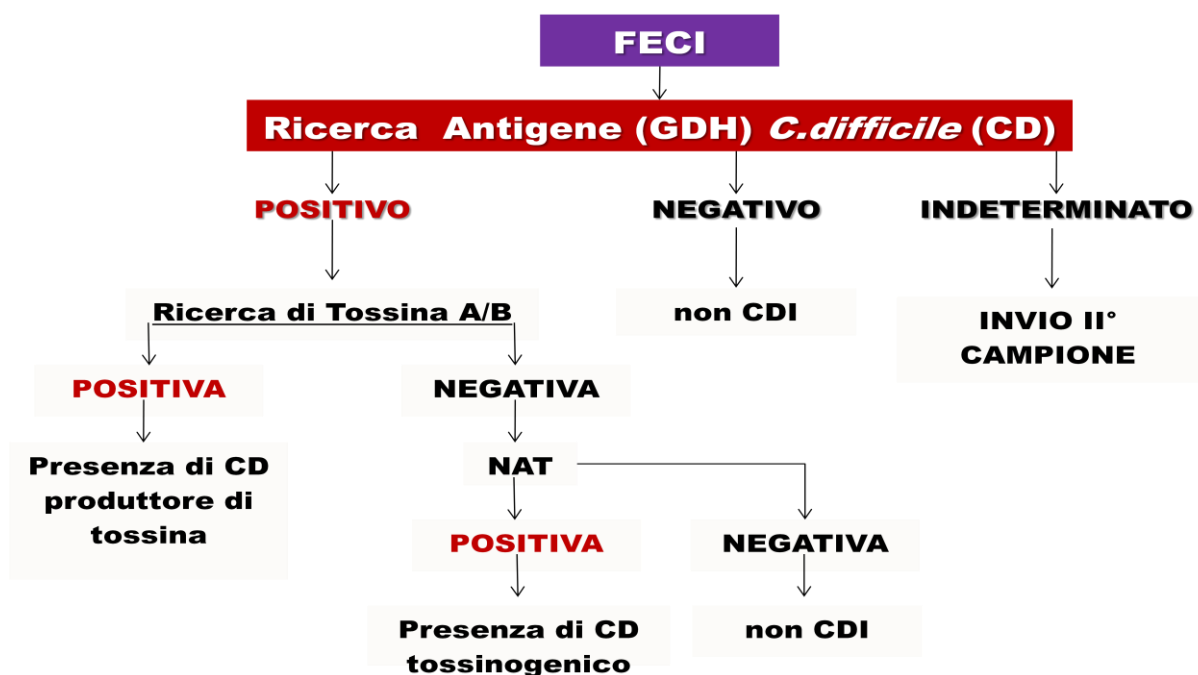
Concordemente con le più recenti linee guida internazionali, nel nostro laboratorio la diagnosi di CDI si basa sulle seguenti indagini:

- **Ricerca dell'antigene comune** (glutammato deidrogenasi - GDH), indice di presenza di *CD*. Il test è eseguito con metodiche immunocromatografiche (*C. difficile* GDH - Beta Diagnostici ME).
- **Ricerca delle tossine A e B**: rispetto al test antigenico, 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 immunoenzimatiche (*Vidas C. difficile* Toxin A&B - Biomerieux) e/o immunocromatografiche (*C. difficile* tossina A+B - Beta Diagnostici ME).
- **Amplificazione di acidi nucleici (NAT)**: il test in PCR real-time (*Xpert C.Difficile* – *GeneXpert Cepheid*) è in grado di identificare, a partire dal campione, i ceppi tossinogenici e ipervirulenti (ribotipo O27/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 un'ora. L'algoritmo diagnostico si basa sui seguenti step:

- Ricerca di GDH su feci con punteggio secondo Scala di Bristol da 5 a 7.
- GDH negativo: referto con la nota "Assenza di infezione da *C. difficile*".
- GDH negativo o indeterminato e presenza di elementi clinico-anamnestici suggestivi di infezione: referto con la nota "si richiede l'invio di un nuovo campione di feci, entro un'ora dall'emissione delle stesse".
- Se GDH positivo, si esegue la ricerca delle tossine A e B.
- Tossine A e/o B positive: referto con la nota "Presenza di *C. difficile* produttore di tossina".
- Se tossine A e/o B negative, si procede all'esecuzione della NAT.
- NAT positivo: referto con la nota "Presenza di *C. difficile* tossinogenico".
- NAT negativo: referto con la nota "Assenza di infezione da *C. difficile*".

## Infezione da *C.difficile* (CDI)

### Flusso di lavoro



• **TERMINOLOGIA E ABBREVIAZIONI**

CD	Clostridium difficile
CDAD	Malattia da Clostridium difficile (Clostridium difficile Associated Disease)
CDI	Infezione da Clostridium difficile
CPM	Colite Pseudo Membranosa
EIA	Test con Metodo immunoenzimatico
GDH	Glutammato deidrogenasi o antigene comune
IC	Test con Metodo immunocromatografico
NAT	Test di amplificazione degli Acidi Nucleici

**2.0 RESPONSABILITA'**

**C.Giraldi, D. Perugini, S. Dodaro**  
**UOC Microbiologia e Virologia**

**3.0 RIFERIMENTI**

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

- a. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
- b. European *C.difficile* - Infection Control Group
- c. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)
- d. Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS)
- e. Guidelines for Diagnosis, treatment, and prevention of *C.difficile* infections 2013 Am J Gastroenterol.

**4.0 ARCHIVIAZIONE**

L'originale di questa procedura sarà conservato nel "Manuale della Qualità". Una copia sarà messa a disposizione di tutto il personale operante presso l'UO nel "Manuale della Documentazione".

**5.0 CRITERI E STRUMENTI DI VALUTAZIONE**

**1° INDICATORE:**

n. campioni di feci per ricerca CD con score da 5 A 7 / n. campioni di feci per ricerca CD TOTALI

**STANDARD: non inferiore al 80%**

**2° INDICATORE:**

n° test di immunogromatografia per Antigene GDH positivi / n° tossina A e B del CD eseguite

**STANDARD: non inferiore al 95%**

**3° INDICATORE:**

n° test di immunogromatografia per antigene GDH positivi e tossina A e B negative / n. ricerca NAT CD

**STANDARD: non inferiore al 95%**

**4° INDICATORE:**

n.isolati CD (alert) / n. schede di segnalazione per probabile infezione ospedaliera compilate dal gruppo operativo CIO al letto del paziente

**STANDARD: non inferiore al 95%**

I report di verifica dell'aderenza allo standard saranno valutati a 6-12 mesi dalla dott.ssa S.Dodaro.