

ESTRATTO



Volume 27 - Numero 6  
Giugno 2014

ISSN 0394-9303 (cartaceo)  
ISSN 1827-6296 (online)

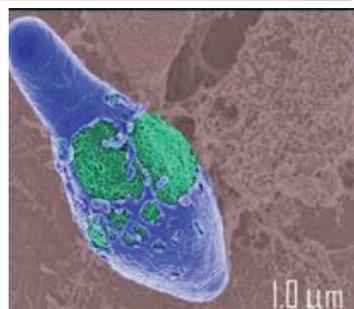
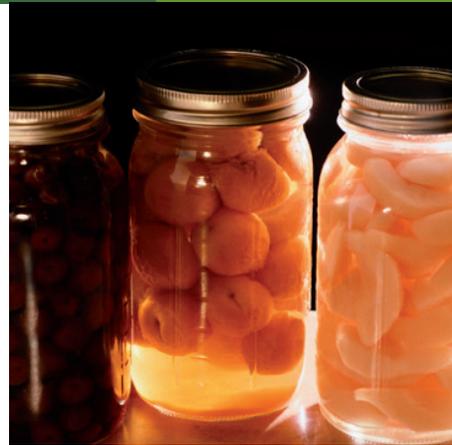
# Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

**Linee di indirizzo  
per la diagnosi microbiologica  
delle infezioni da *Clostridium difficile***

P. Spigaglia, F. Barbanti, P. Mastrantonio

Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale - 70% - DCB Roma



www.iss.it

## LINEE DI INDIRIZZO PER LA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLE INFEZIONI DA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*



Patrizia Spigaglia, Fabrizio Barbanti e Paola Mastrantonio  
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

**RIASSUNTO** - Le infezioni da *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* infection - CDI) sono la principale causa di diarrea infettiva in ambito ospedaliero e in quelle strutture in cui si pratica assistenza sanitaria, in particolare strutture riabilitative e per anziani. Questo articolo riporta l'analisi dei dati ottenuti dall'Istituto Superiore di Sanità durante l'esecuzione del Progetto "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici", finanziato dal Centro per la Prevenzione e Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute, con l'intento di fornire un protocollo utile all'organizzazione e all'orientamento delle attività dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale nella diagnostica delle CDI.  
**Parole chiave:** *Clostridium difficile*; infezioni; diagnostica

**SUMMARY** (*Guidelines for microbiological diagnosis of Clostridium difficile infection - CDI*) - *Clostridium difficile* infection (CDI) is the main cause of diarrhoea in hospitals and health care facilities, particularly for elderly. In this paper we report the results obtained during the Project "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici" (Surveillance of *Clostridium difficile* infection. Epidemiological and microbiological aspects) funded by the Centro per la Prevenzione e Controllo delle Malattie (CCM) (Centre for Disease Prevention and Control) of the Italian Ministry of Health, with the aim of providing a protocol for CDI diagnosis, useful to the activities of the laboratories of the National Health Service.  
**Key words:** *Clostridium difficile*; infection; diagnostics [patrizia.spigaglia@iss.it](mailto:patrizia.spigaglia@iss.it)

Le infezioni da *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* infection - CDI) sono la principale causa di diarrea infettiva in ambito ospedaliero e in quelle strutture in cui si pratica assistenza sanitaria, in particolare strutture riabilitative e per anziani (1, 2). Negli ultimi anni le CDI hanno avuto un'importante diffusione collocandosi tra le malattie infettive emergenti a livello mondiale.

A tale andamento non si sottrae il nostro Paese dove il numero dei casi è in aumento anche in relazione a una maggiore sensibilità dei clinici e dei microbiologi a questa patologia e al miglioramento degli strumenti diagnostici disponibili.

Nell'ambito del Progetto "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici", finanziato dal Centro per la Prevenzione e Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute, coordinato dalla Regione Emilia-Romagna, l'Unità operativa dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha valutato, tramite un'indagine nazionale

a campione con la collaborazione degli Assessorati Regionali alla Sanità e delle Province Autonome (PA), la potenzialità diagnostica della rete dei laboratori di microbiologia di tutte le Regioni italiane.

Questo articolo riporta l'analisi dei dati ottenuti durante l'esecuzione del suddetto Progetto con l'intento di fornire uno strumento utile all'organizzazione e all'orientamento delle attività dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) nella diagnostica delle CDI.

### Microbiologia ed epidemiologia delle CDI

*C. difficile* è un bacillo Gram positivo, anaerobio, sporigeno. I ceppi che causano infezione producono due tossine: la tossina A (TcdA) e la B (TcdB). Ambedue sono in grado di causare infiammazione del colon e degradazione dello strato epiteliale dell'intestino con un conseguente aumento della permeabilità intestinale che si manifesta come diarrea (3). Alcuni ►



ceppi di *C. difficile* possono produrre anche una terza tossina chiamata tossina binaria (CDT). La CDT depolimerizza l'actina del citoscheletro e aumenta l'adesione del batterio inducendo nella cellula epiteliale la produzione di protrusioni microtubolari e sembra agire in sinergia con le due tossine (4).

Le principali condizioni predisponenti alle CDI sono l'alterazione della microflora intestinale a seguito di trattamento antibiotico e l'esposizione al microrganismo. La popolazione target è costituita da pazienti anziani, in particolare degenti in strutture per acuti o lungodegenze, e da soggetti affetti da malattie croniche e/o immunodepressi. Altri fattori di rischio sono rappresentati dalle comorbidità, dagli interventi chirurgici gastrointestinali e dall'assunzione di farmaci che riducono la produzione degli acidi gastrici, come gli inibitori delle pompe protoniche (5).

Il quadro clinico è eterogeneo: dalle diarree auto-limitanti alle forme gravi, quali la colite pseudomembranosa e il megacolon tossico, che possono portare al decesso del paziente.

La percentuale dei portatori di *C. difficile* nella popolazione adulta sana è compresa tra il 5 e il 15%, ma può superare il 50% nei pazienti dei reparti di lungodegenza.

Sebbene sia ritenuta un'infezione ospedaliera, i casi di CDI nella comunità e nei soggetti finora ritenuti non a rischio, quali giovani e donne in gravidanza, sono in aumento (6).

La contaminazione avviene per via oro-fecale tramite le spore, resistenti al calore e ai comuni disinfettanti, che possono persistere nell'ambiente.

Ceppi di *C. difficile* ipervirulenti sono comparsi sin dal 2003. In particolare, *C. difficile* PCR-ribotipo 027 è stato associato a un aumento della severità dei casi, delle ricorrenze e della mortalità (7). Oltre allo 027, anche altri PCR-ribotipi epidemici sono emersi, alcuni a diffusione internazionale, come lo 078, anch'esso ipervirulento (8), altri a circolazione nazionale, come lo 018 in Italia (9).

### I saggi diagnostici

Una diagnostica rapida e appropriata è cruciale per un rapido trattamento del caso e per limitare il diffondersi dell'infezione. I test diagnostici per CDI si basano sulla ricerca di antigeni, tossine o acidi nucleici di *C. difficile* dalle feci del paziente e sulla coltura tossinogenica (10, 11).

Il test di citotossicità per la TcdB e la neutralizzazione con antisiero specifico è ritenuto il gold standard per l'alta sensibilità (10 pg di tossina) e specificità. Richiede, tuttavia, la coltivazione di linee cellulari e di almeno 48 ore per l'interpretazione dei risultati, quindi è poco utilizzato nella routine diagnostica.

Il test immunoenzimatico per l'antigene glutammato deidrogenasi (GDH), enzima metabolico presente in tutti i ceppi di *C. difficile*, è utilizzato come test di primo screening. Pur presentando un'elevata sensibilità (90%), questo saggio non distingue i ceppi tossinogenici dai non tossinogenici e, pertanto, richiede una successiva analisi del campione con un saggio che evidenzia la presenza delle tossine. Attualmente, sono in commercio test che abbinano la rilevazione del GDH con quella delle tossine al fine di velocizzare la diagnosi.

I test immunoenzimatici per la rivelazione delle tossine di *C. difficile* nel campione fecale sono i test più diffusi per la loro semplicità e rapidità di esecuzione (2 ore circa). Presentano una sensibilità media del 70% con una buona specificità (84-100%). Poiché non hanno una sensibilità elevata e risentono delle modalità di conservazione del campione (le tossine si degradano abbastanza rapidamente), sono sconsigliati come primo

test o saggio unico. Inoltre, i test che evidenziano la sola tossina A possono dare luogo a falsi negativi in presenza di ceppi produttori della sola tossina B.

I saggi molecolari hanno come target i geni per le TcdA e/o TcdB. L'alta sensibilità e specificità (mediamente del 95%) e la velocità di esecuzione rendono questi test ideali, anche se il loro costo rimane ancora elevato. Tuttavia, una positività al saggio molecolare, sebbene indichi la presenza di DNA, non necessariamente implica la presenza delle tossine nel campione. Questi saggi vanno dunque eseguiti in presenza di un chiaro quadro clinico e la produzione di tossine va possibilmente confermata.

La coltura tossinogenica prevede la semina del campione fecale su terreni selettivi, la crescita delle colonie in anaerobiosi e la valutazione della capacità dei ceppi di produrre tossine tramite saggi immunoenzimatici o molecolari. Attualmente, è ritenuto il test più sensibile e specifico (90-100%) per la diagnosi di CDI. Poiché richiede un tempo di lavoro di circa 72 ore è poco usata nella normale routine diagnostica, sebbene sia utilizzata frequentemente come test di conferma in caso di forte sospetto clinico e negatività del campione fecale ad altri test diagnostici.

Ciascun test diagnostico, come evidente, presenta delle limitazioni. Per ottenere una diagnosi rapida, sensibile e specifica, vengono quindi proposti dalla letteratura internazionale degli algoritmi diagnostici che associano metodi diversi (12-14). Non esiste un algoritmo specifico adottato internazionalmente, poiché molti sono i test diagnostici disponibili e diverse le scuole di pensiero rispetto alle loro possibili combinazioni. In generale, queste combinazioni prevedono due o tre metodi in sequenza: i primi più sensibili, i successivi più specifici.

Ultimamente, i saggi molecolari sono state proposti come test unici per la diagnosi della CDI (12, 14). Questa scelta, però, può essere svantaggiosa sia dal punto di vista economico, poiché questi test sono ancora costosi, sia dal punto di vista microbiologico poiché, come già sottolineato, la presenza di DNA non implica la presenza delle tossine nelle feci.

## Risultati dell'indagine multicentrica sulla diagnosi delle CDI in Italia

Il Progetto CCM "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici" è stato condotto tra il 2012 e il

2013. Durante il Progetto l'ISS ha effettuato un'indagine multicentrica tramite l'invio di un questionario, predisposto con nove domande relative alle tecniche e ai protocolli diagnostici impiegati per la diagnosi delle CDI, ai laboratori microbiologici di tutte le Regioni e PA. In totale, 278 questionari sono stati compilati e restituiti da 14 Regioni e dalla PA di Trento.

Dei 278 laboratori partecipanti allo studio, l'87% dichiara di eseguire di routine analisi diagnostiche per *C. difficile*, in particolare circa il 90% di questi solo su specifica richiesta del clinico.

L'88% dei laboratori esegue saggi immunoenzimatici (EIA) per la rilevazione delle tossine A e B (83%) o della sola tossina A (5%). Un terzo dei laboratori esegue il test per l'antigene GDH e circa un quarto saggi colturali per l'isolamento di *C. difficile*. Saggi molecolari per la ricerca delle tossine vengono effettuati solo dal 18% dei laboratori.

Infine, solo il 38% dei laboratori dichiara di aver adottato un algoritmo diagnostico, ossia di utilizzare una combinazione di test diagnostici in sequenza. Le risposte relative alla descrizione dell'algoritmo usato mostrano una grande eterogeneità sia per quanto riguarda la scelta che la combinazione dei saggi effettuati (Figura 1).

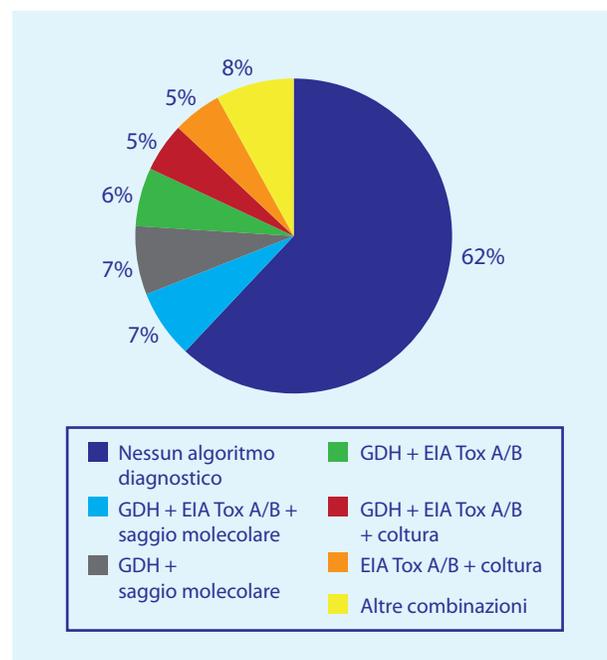


Figura 1 - Percentuale dei laboratori partecipanti allo studio che adottano uno specifico algoritmo diagnostico

## Proposta di un protocollo diagnostico per le CDI

I risultati ottenuti dall'indagine effettuata hanno dimostrato che, sebbene la diagnostica delle CDI sia effettuata dalla maggior parte dei laboratori microbiologici, ancora pochi utilizzano un algoritmo diagnostico. È, quindi, necessaria una maggiore informazione sia sulla necessità di adottare un algoritmo per una corretta diagnosi, sia sulla scelta più appropriata dei test da utilizzare in combinazione. Per questo motivo, si propone un protocollo diagnostico che offre la possibilità di

essere modulato a seconda delle possibilità dei laboratori dell'SSN (Figura 2). Le caratteristiche dei test proposti e la durata dei saggi sono riassunte nella Tabella.

Una strategia diagnostica accurata necessita, prima di tutto, di una particolare attenzione nella fase pre-analitica. Pertanto, è essenziale che i campioni fecali provengano da pazienti che presentino un quadro clinico compatibile con la CDI e che le feci siano diarroiche, non formate, corrispondenti ai valori 5-7 della scala di Bristol. I campioni devono essere esaminati entro un'ora dall'arrivo in laboratorio oppure devono essere conservati a +4 °C per non più di 48

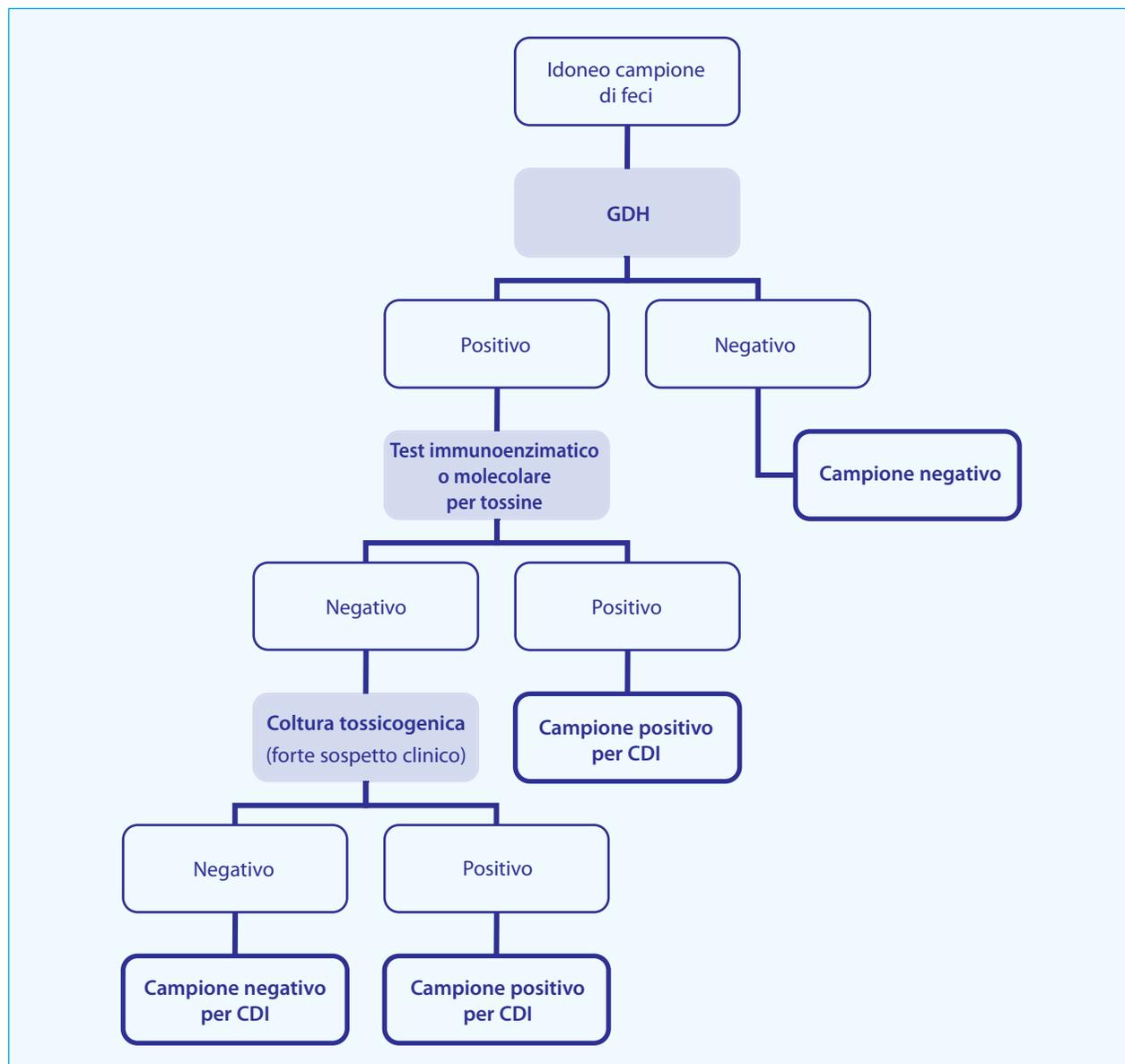


Figura 2 - Schematica rappresentazione dell'algoritmo diagnostico proposto per le infezioni da *C. difficile*

**Tabella** - Scheda tecnica dell'algoritmo diagnostico proposto per le infezioni da *C. difficile*

<b>Caratteristiche del campione fecale</b>	Feci che prendono la forma del contenitore (corrispondente alla scala 5-7 di Bristol) Conservare 1h a temperatura ambiente oppure a + 4 °C ≤48 h
<b>Ricerca dell'antigene GDH</b>	<i>Test immunoenzimatici</i> sensibilità 80-100% specificità 75-100% durata del saggio <1 h
<b>Ricerca delle tossine A e B</b>	<i>Test immunoenzimatici</i> sensibilità 30-98% specificità 84-100% durata del saggio <2 h  <i>Saggi molecolari</i> sensibilità 77-100% specificità 87-100% durata del saggio 1-3 h
<b>Coltura tossinogenica</b>	<i>Metodo di riferimento e conferma</i> Shock etanolic Semina del campione fecale su terreno selettivo Crescita delle colonie in anaerobiosi Test immunoenzimatico/molecolare per tossine su colonie sensibilità 90-100% specificità 90-100% durata del saggio 48-96 h

ore. La conservazione a -20 °C e i ripetuti scongelamenti possono compromettere l'integrità delle tossine eventualmente presenti.

Il test per il GDH viene indicato come test di screening iniziale per l'elevata specificità. In caso di positività al test, quindi di positività per *C. difficile*, si prosegue con un test immunoenzimatico o molecolare per la rivelazione delle tossine.

I kit immunoenzimatici sono numerosi e possono presentare differenze nella *performance* complessiva; si raccomanda, quindi, di prendere in considerazione quelli accreditati per maggiore sensibilità nella letteratura scientifica internazionale.

Se è nelle possibilità del laboratorio, l'identificazione molecolare di *C. difficile* tossinogenico può essere effettuata anche tramite saggi molecolari. I kit in commercio sfruttano tecnologie differenti (real-time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), microarray, ecc.) ed evidenziano i geni codificanti la TcdB o la TcdA. Alcuni kit permettono, inoltre, l'identificazione presuntiva del PCR-ribotype ipervirulento 027, grazie all'identificazione di specifiche caratteristiche molecolari (la presenza del gene *cdt* della subunità A della tossina binaria e la mutazione nucleotidica in posizione 117 ( $\Delta$ 117) del gene *tcdC*, regolatore nega-

tivo delle tossine A e B). Queste caratteristiche, però, possono essere presenti anche in ceppi diversi, quindi una tipizzazione molecolare tramite PCR-ribotyping sarà necessaria per confermare il risultato ottenuto.

Un campione positivo per GDH e positivo per le tossine al test immunoenzimatico o al test molecolare, sarà considerato positivo per CDI.

In presenza di un forte sospetto clinico, se un campione è positivo al GDH, ma negativo alle tossine, si procede alla coltura tossinogenica. L'isolamento di *C. difficile* avviene a seguito di shock etanolic e della successiva germinazione delle spore su terreno selettivo in ambiente anaerobio (giara o camera anaerobia). Brevemente, il campione fecale va trattato con un eguale volume di alcool assoluto, omogeneizzato, e lasciato a temperatura ambiente per un'ora. Dopo questo trattamento, 100 µl vanno inoculati su un terreno selettivo oppure sui nuovi terreni cromogeni che facilitano l'identificazione delle colonie di *C. difficile* dopo la germinazione delle spore. L'incubazione viene effettuata in anaerobiosi a 35 °C per 48-72 ore. Le colonie identificate come *C. difficile* saranno, quindi, esaminate per la produzione di tossine (coltura tossinogenica) tramite uso di kit immunoenzimatici o di saggi molecolari. ▶

Un campione positivo per GDH, negativo alle tossine (con test immunoenzimatico o molecolare), ma positivo alla coltura tossinogenica, sarà considerato positivo per CDI.

La ricerca di *C. difficile* in un paziente trattato per CDI è sconsigliata nel mese successivo la terapia antibiotica. Nel caso di un paziente clinicamente sospetto e con sintomi persistenti, qualora il primo campione fecale esaminato risultasse negativo per *C. difficile* e in presenza di dubbi procedurali, si potrà procedere all'analisi di un secondo campione.

## Conclusioni

Le CDI sono le infezioni gastrointestinali più comunemente associate all'assistenza sanitaria e la loro prevenzione rappresenta una delle principali sfide nell'ambito della salute pubblica.

I risultati ottenuti durante il Progetto finanziato dal Ministero della Salute, CCM 2012-2013 "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici" indicano un'elevata disomogeneità nell'approccio diagnostico delle CDI, che in molti laboratori risulta carente di sensibilità e/o specificità. Il presente articolo propone, pertanto, un algoritmo diagnostico per una diagnosi rapida, sensibile e specifica delle CDI, disegnato sulle più recenti evidenze scientifiche (9) e modulabile secondo le possibilità dei diversi laboratori. La collaborazione di Laboratori di riferimento regionali e del Laboratorio di riferimento nazionale, dopo un'adeguata organizzazione di tali servizi, potrà essere di supporto per tutti quei laboratori che, per motivi organizzativi e/o finanziari, non siano in grado di poter eseguire completamente l'algoritmo proposto o necessitino di un sostegno tecnico per la messa a punto della sua esecuzione.

L'implementazione della diagnostica delle CDI, oltre che indispensabile a fronte di un problema sanitario sempre più pressante, è necessaria affinché, anche in Italia, si possa organizzare una rete di sorveglianza epidemiologica delle CDI, come recentemente sollecitato da Direttive europee (11). ■

## Dichiarazione di conflitto di interessi

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

## Riferimenti bibliografici

1. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992;15(4):573-81.
2. Keller MJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection in the elderly. *Clin Geriatr Med* 2014;30(1):79-93.
3. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 2012;20(1):21-9.
4. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 2014;5(1):15-27.
5. Vesteinsdottir I, Gudlaugsdottir S, Einarsdottir R, et al. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(10):2601-10.
6. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, et al. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2012(1);107:89-95.
7. Cartman ST, Heap JT, Kuehne, SA, et al. The emergence of "hypervirulence" in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol* 2010;300(6):387-95.
8. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008;47(9):1162-70.
9. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, et al. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR ribotype 018. *J Clin Microbiol* 2010;48(8):2892-6.
10. Brecher SM, Novak-Weekley SM, Nagy E. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections: there is light at the end of the colon. *Clin Infect Dis* 2013;57(8):1175-81.
11. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European *Clostridium difficile* infection surveillance network (ECDIS-Net): supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level (2010-2014) ([www.ecdisnet.eu/](http://www.ecdisnet.eu/)).
12. American Society for Microbiology. A practical guidance document for the laboratory Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*. Washington DC: ASM Society; September 21, 2010 ([www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf](http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf)).
13. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15(12):1053-66.
14. Wilcox MH, Planche T, Fang FC. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? *J Clin Microbiol* 2010(12);48:4347-53.