Infezione da C.difficile

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

M.Rita Rossi- Cinzia Ballarini- Cristina Vallerini

UO Semplice di Microbiologia e Sierologia
Laboratorio Unico Provinciale AOU S. Anna Ferrara

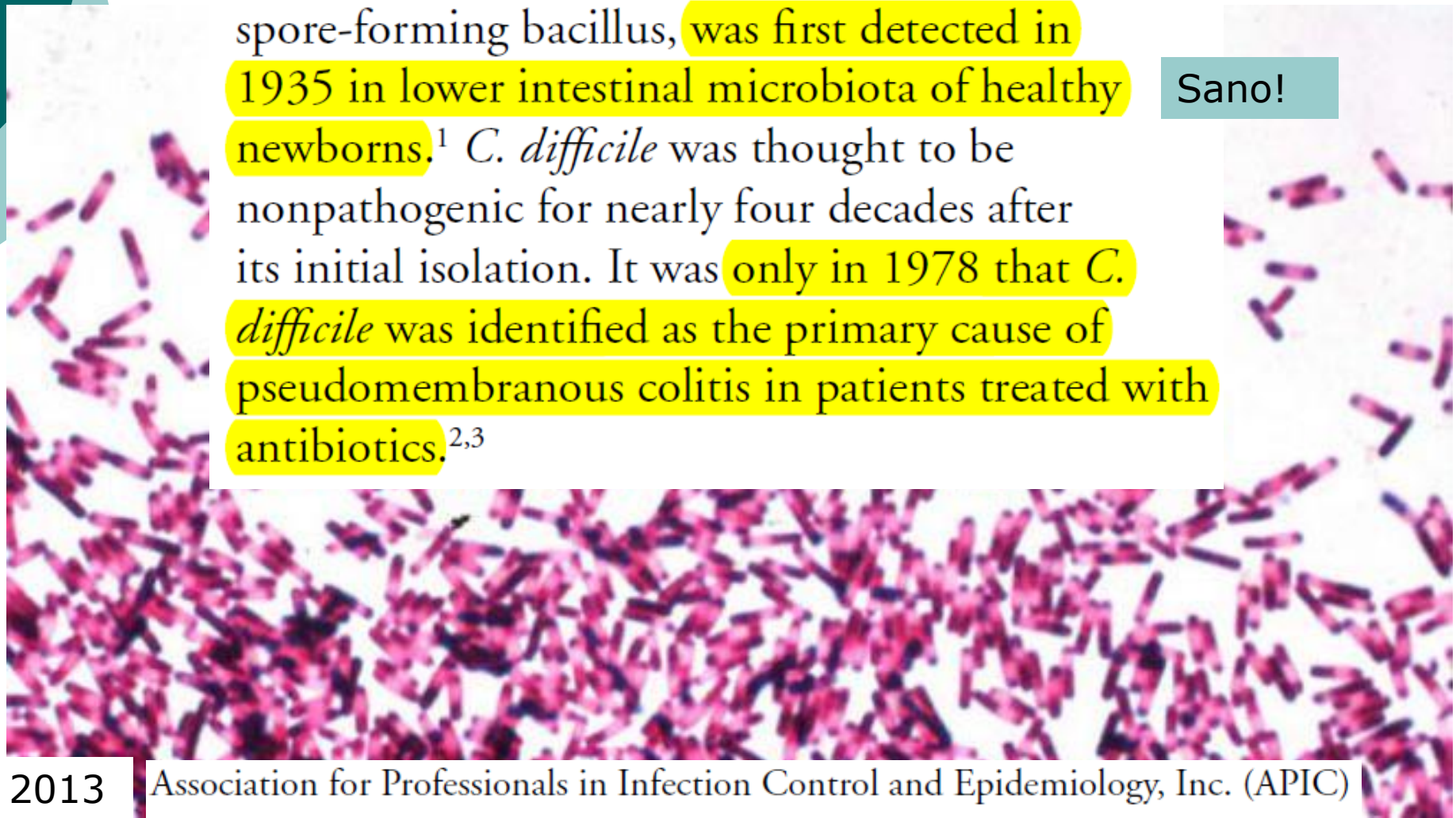
Clostridium difficile

Clostridium difficile

bacillo Gram positivo, anaerobio, **produce spore**

Clostridium difficile, an anaerobic, Gram-positive, spore-forming bacillus, was first detected in 1935 in lower intestinal microbiota of healthy newborns.[1] *C. difficile* was thought to be nonpathogenic for nearly four decades after its initial isolation. It was only in 1978 that *C. difficile* was identified as the primary cause of pseudomembranous colitis in patients treated with antibiotics.[2,3]

Sano!



Infezione da *C.difficile* (CDI)

- **Malattia infettiva emergente a livello mondiale**

- Principale causa di diarrea infettiva **in ambito ospedaliero e in strutture sanitarie,** in particolare riabilitative e per anziani

- Sintomatologia varia da **diarree** autolimitanti, a forme gravi, quali **colite pseudomembranosa e megacolon tossico** che possono portare al decesso del paziente

Infezione da *C.difficile* (CDI)

Modalità di trasmissione

Esogena

- Mani che hanno avuto contatto con persone colonizzate/infette o con superfici ambientali contaminate
- Strumentazione contaminata (es endoscopi)
- Superfici o materiali contaminati (seggette igieniche, vasche da bagno, termometri rettali…)

Endogena (rara)

- Bassa prevalenza portatori asintomatici

Infezione da *C.difficile* (CDI)

Periodo di incubazione

- **Variabile**
  - in genere si manifesta entro una settimana dall'infezione
  - oppure il paziente può rimanere asintomatico fino all'esposizione ad antibiotici
  - oppure compare alcune settimane dopo la sospensione della terapia antibiotica

Le spore emesse con le feci possono sopravvivere per più di 70 giorni

(fino a 5 mesi)

Cenni epidemiologici

- 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 una **infezione ospedaliera**, i **casi di CDI in comunità** e in soggetti finora non ritenuti a rischio, quali bambini di età inferiore ai due anni e giovani donne in gravidanza, sono **in aumento**
- Il riscontro in **ambito veterinario** di ceppi ipervirulenti nel bestiame (bovini, suini) e negli animali da affezione (cani, gatti) potrebbe indicare la presenza di un **reservoir** che alimenta i sempre più frequenti casi di origine comunitaria

Khanna S et Al Am J Gastroenterol 2012(1);107:89-95

Conseguenze delle CDI

- **Prolungamento della degenza ospedaliera** (secondo dati USA da 2.6 a 4.5 giorni)
- **Riammissione in ospedale** per indagini diagnostiche mirate (laboratoristiche, radiologiche, endoscopiche)
- **Spesa indotta** di 5.000-15.000 euro per caso (ECDC) con potenziale costo aggiuntivo di 3.000 milioni di euro/anno

Fattori predisponenti

- **Alterazione della microflora** intestinale a seguito di trattamento antibiotico

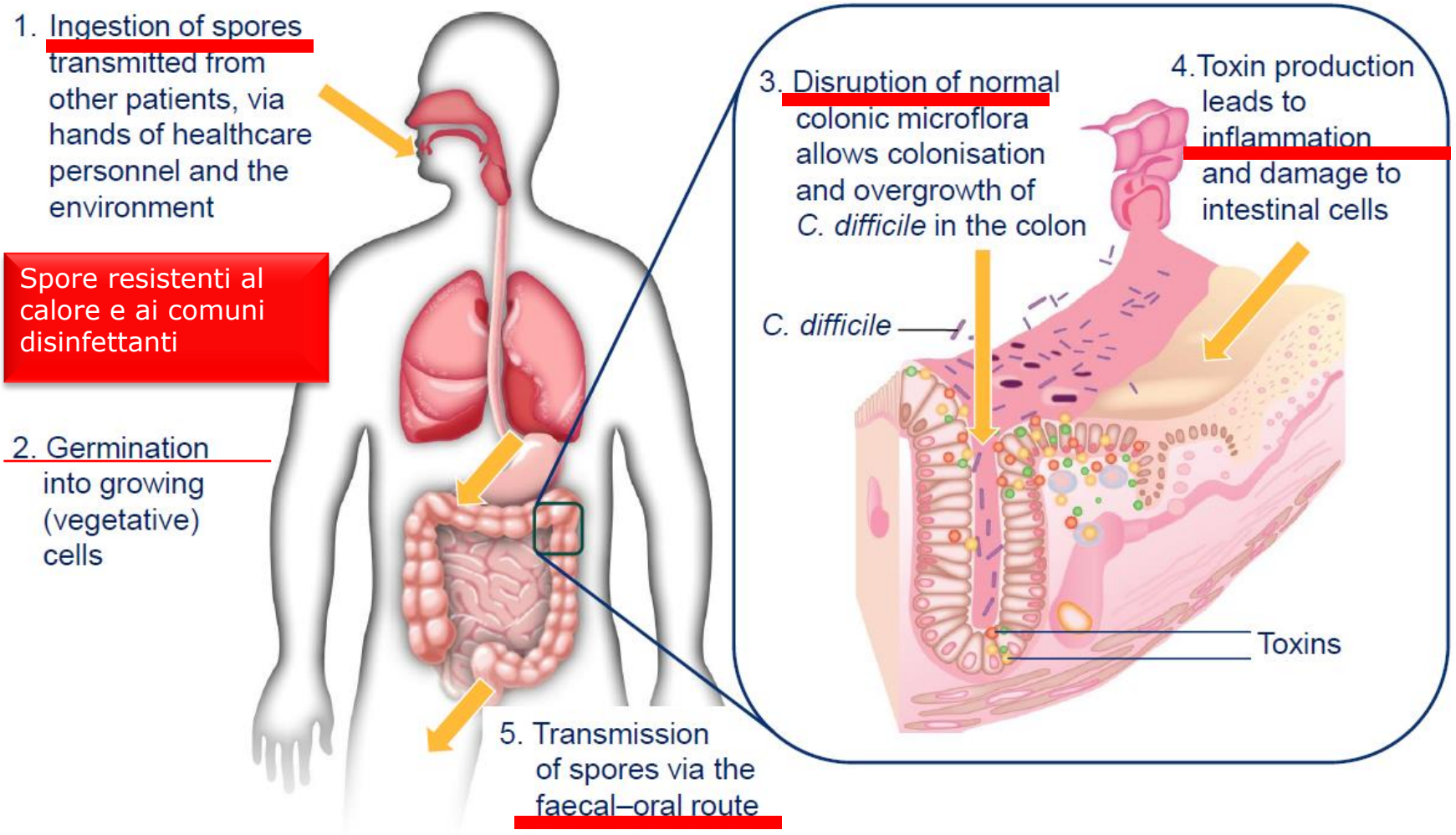
Profilassi e terapia antibiotica, soprattutto se combinata e protratta (clindamicina, ampicillina, cefalosporine 3^, fluorochinolonici)

- **Esposizione al microrganismo**
- **Comorbidità** quali interventi chirurgici gastrointestinali e assunzione di farmaci che riducono la produzione di acidi gastrici, come gli inibitori delle pompe protoniche

Antibiotici induttori di colite da CD

Frequente	Infrequente	Rara/assente
Ampicillina	Tetracicline	Aminoglicosidi
Amoxicillina	Sulfamidici	Metronidazolo
Cefalosporine	Eritromicina	Vancomicina
Clindamicina	CAF	Teicoplanina
Fluorochinoloni	Cotrimoxazolo	

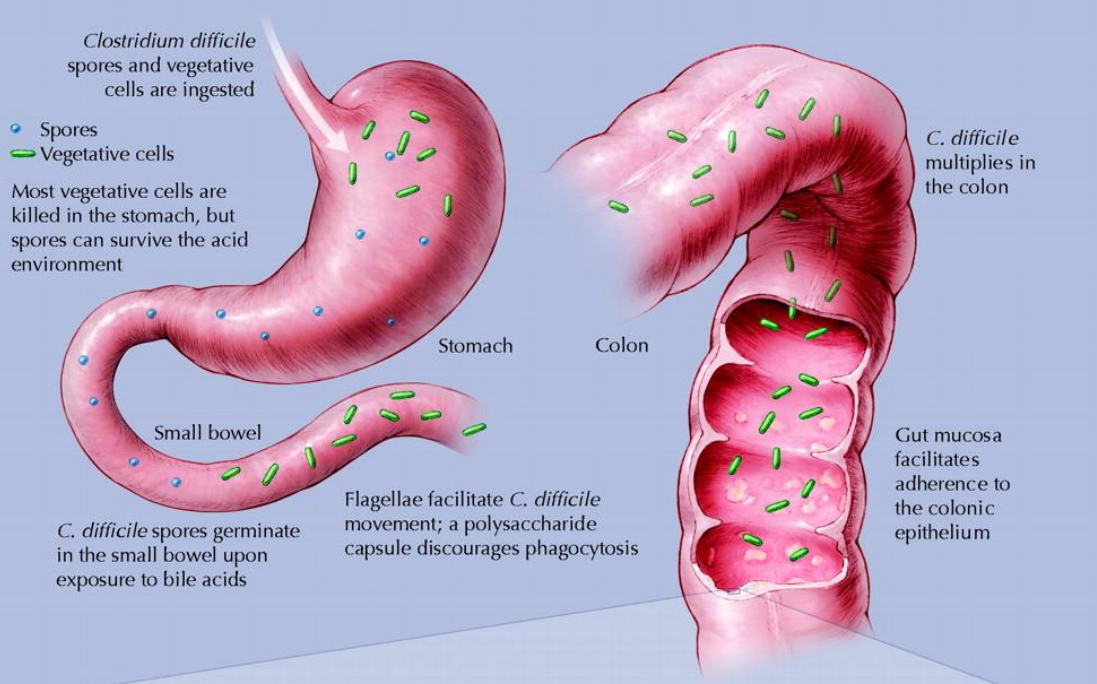
Patogenesi della infezione da *C.difficile* (CDI)

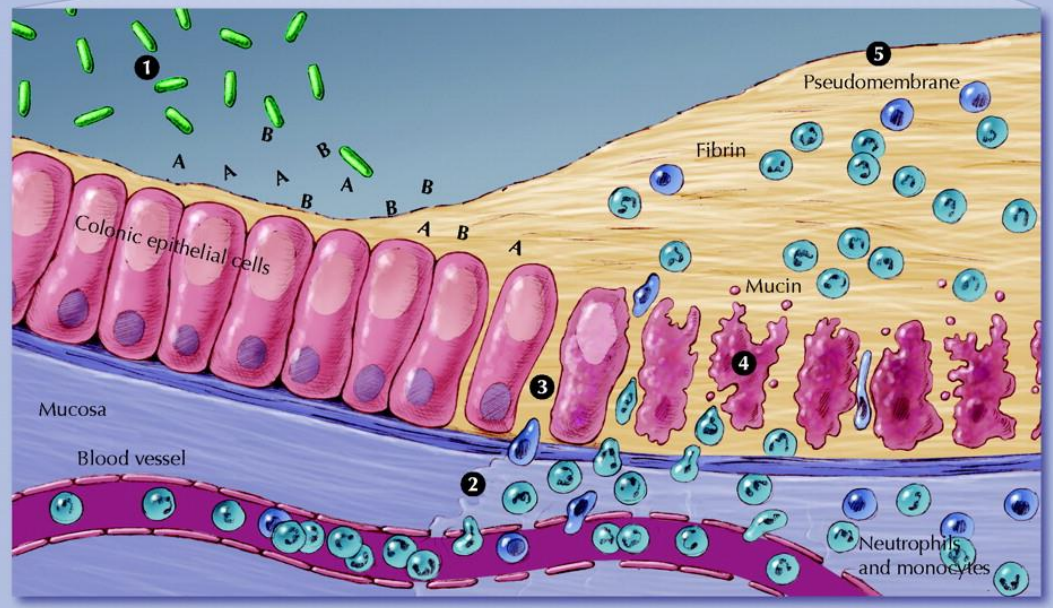


Adapted from Sunenshine RH, McDonald LC. Cleve Clin J Med 2006;73:187–97.

Patogenesi

Clostridium difficile





C. difficile vegetative cells produce toxins A and B and hydrolytic enzymes (**1**). Local production of toxins A and B leads to production of tumour necrosis factor-alpha and proinflammatory interleukins, increased vascular permeability, neutrophil and monocyte recruitment (**2**), opening of epithelial cell junctions (**3**) and epithelial cell apoptosis (**4**). Local production of hydrolytic enzymes leads to connective tissue degradation, leading to colitis, pseudomembrane formation (**5**) and watery diarrhea.

Principali Fattori di virulenza

- **Tossina A (tcdA)** enterotossica e dalla **Tossina B (tcdB)** enterotossica e citotossica
  - Entrambe si legano a recettori intraluminali delle cellule epiteliali del colon
  - sono glicosiltranferasi che agiscono disorganizzando il citoscheletro cellulare
  - L'azione delle tossine determina **intensa infiammazione del colon** con alterazione dell'epitelio intestinale e conseguente **aumento della permeabilità** che si manifesta come diarrea

- **Tossina binaria** (**CDT**): alcuni ceppi (5-6%) che presentano **mutazioni del gene tcdC** codificante per il **regolatore negativo delle tossine A e B,** producono una terza tossina chiamata CDT. CDT depolimerizza l'actina del citoscheletro cellulare e aumenta l'adesione del batterio inducendo nella cellula epiteliale la produzione di microtubuli.

Carter GP et Al Trend Microbiol 2012- Gerding DN et Al Gut Microbes 2013

Ceppi ipervirulenti

- Il ceppo **NAP1/B1/027** presenta una **delezione** di 18 paia di basi a livello di **tcdC** per cui **possiede oltre a tossina binaria** (CDT) anche **iperproduzione di tossine batteriche**

- E' correlato all'uso di **fluorochinoloni**
- Diffuso a partire dal 2003 in tutto il mondo causa infezioni gravi ed epidemie
- Le diverse denominazioni derivano dalla metodica utilizzata per l'identificazione:
  - **PCR-ribotype 027**
  - Pulse-field-type NAP1
  - Restriction endonuclease analylisis group B1

Clements ACA et Al Lancet Infect Dis 2010

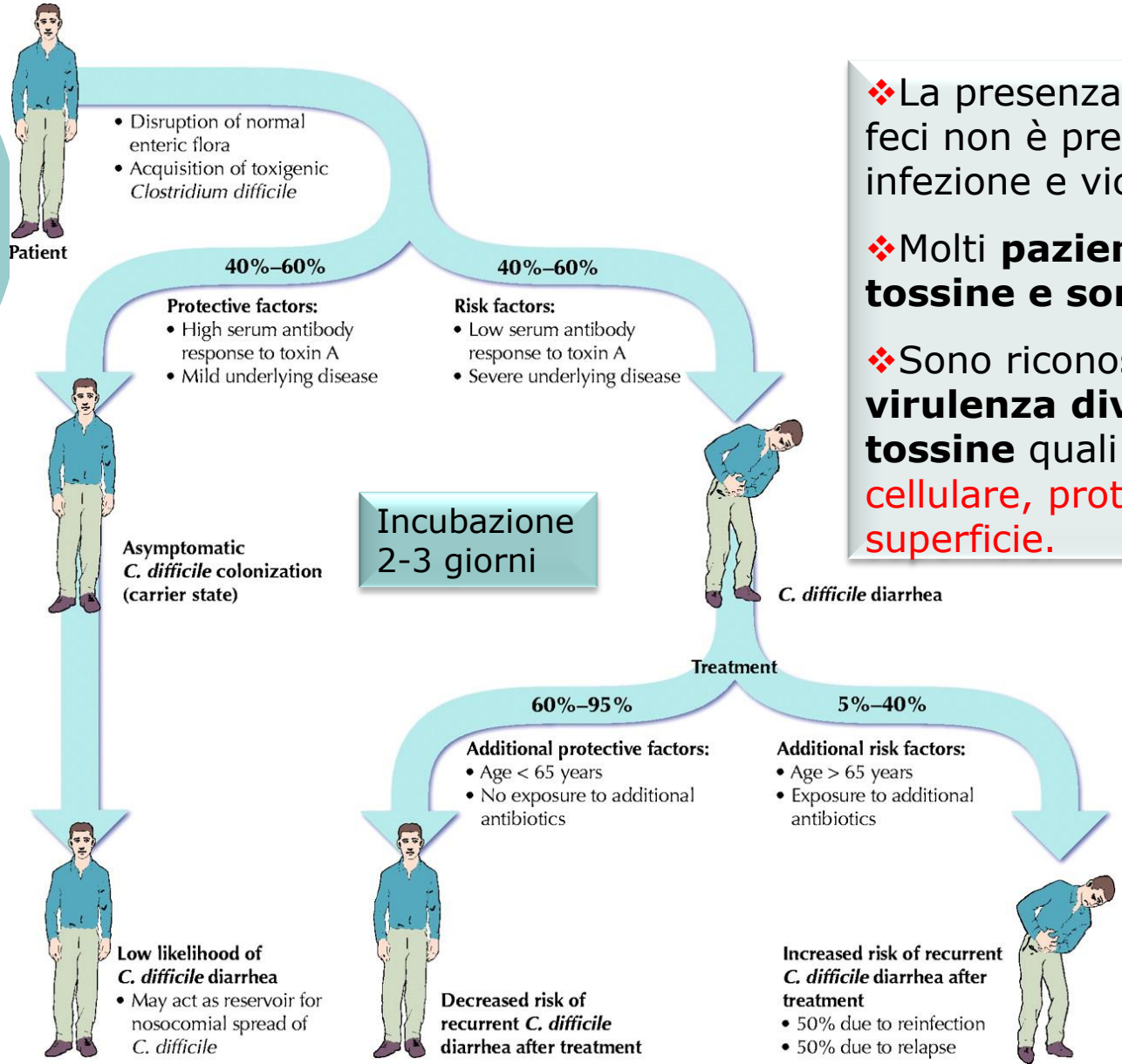
http:/www.ecdisnet.eu/

Ceppi ipervirulenti

- Il ceppo **PCR ribotipo 078**
  - Diffuso più recentemente, causa infezioni gravi sia in ambito ospedaliero che in comunità
  - Colpisce soggetti più giovani e con meno comorbidità rispetto al ribotipo 027
- Il ceppo **PCR ribotipo 018** diffuso in Italia

Goorhuis A et Al Clin Infect Dis 2008
Spigaglia P. et Al J Clin Microbiol 2010

Tossine e manifestazione clinica



- La presenza di tossine nelle feci non è predittiva al 100% di infezione e viceversa.
- Molti **pazienti presentano le tossine e sono asintomatici**.
- Sono riconosciuti **fattori di virulenza diversi dalle tossine** quali adesione cellulare, proteasi e proteine di superficie.

Finito il trattamento il paziente rimane a rischio per 3 mesi

Quali test sono attualmente disponibili per fare diagnosi di infezione da *C.difficile*?

Participants A 2 year old beagle trained to identify the smell of *C difficile* and tested on 300 patients (30 with *C difficile* infection and 270 controls).

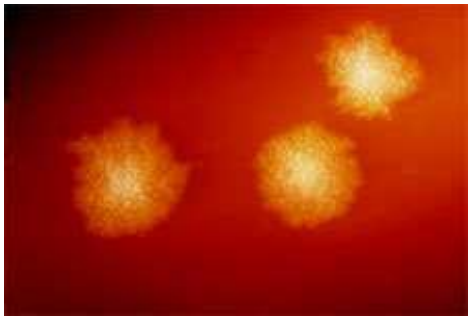
Results The dog's sensitivity and specificity for identifying *C difficile* in stool samples were both 100% (95% confidence interval 91% to 100%). During the detection rounds, the dog correctly identified 25 of the 30 cases (sensitivity 83%, 65% to 94%) and 265 of the 270 controls (specificity 98%, 95% to 99%).

***BMJ* 2012; 345 doi: http://dx.doi.org/10.1136/bmj.e7396 (Published 13 December 2012)**
Cite this as: *BMJ* 2012;345:e7396

Quali test sono attualmente disponibili per fare diagnosi di infezione da *C.difficile*?

Metodi NON microbiologici

- Sintomatologia clinica
- Endoscopia



Identificazione del *C.difficile*

- Coltura
- Glutamate dehydrogenase (GDH)

Identificazione della tossina

- Ricerca delle tossine A/B
- Test di citotossicità
- Geni delle tossine (PCR)

Diagnosi microbiologica di CDI

- I test di laboratorio per CDI sono studiati per indagare **SOLO su pazienti sintomatici**

- **Diarrea** continuativa **da almeno 3 giorni** e febbre o dolore addominale *in paziente con storia di recente esposizione a trattamento antibiotico o inspiegata leucocitosi*

DOC-287-AZ MICRO
Rev.6 gennaio 2014

- **FECI**
- **ricerca *Clostridium difficile* tossinogenico**
- Nei casi di colite pseudomembranosa, in paziente ospedalizzato in chemioantibioticoterapia è possibile rilevare nelle feci la presenza di *Clostridium difficile* tossinogenico.
- *Secondo la Bristol stool chart i **campioni di feci formate** sono da considerare **"non idonei"** per la ricerca in questione. I campioni non idonei non saranno analizzati.*
- **Materiali necessari**
- Contenitore per feci
- **Modalità di raccolta**
- Raccogliere le feci su una superficie pulita
- Trasferire nel contenitore una quantità di feci pari a un cucchiaio
- **Conservazione e invio**
- I campioni devono essere inviati al più presto in Laboratorio o conservati in frigorifero a +4°C fino a 24 ore.

Scala delle feci di Bristol

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. Completamente liquida.

Le feci DEVONO essere

NON FORMATE

Solo i tipi 5,6,7 sono idonei

Quale test eseguire ?

Table 2.1. Comparison of laboratory-based diagnostic tests for CDI.

Diagnostic test	Advantages	Disadvantages
Toxin enzyme immunoassay (EIA)	Inexpensive Rapid	Very poor sensitivity Poor specificity
Glutamate dehydrogenase	Inexpensive Rapid Good sensitivity Good negative predictive value	Very poor specificity Requires use of a second-line test for toxin detection
Toxigenic (cytotoxic) culture	Excellent sensitivity Good specificity	Requires second-line test for toxin detection 3- to 4-day turnaround time Requires expertise in culturing *C. difficile*
Cell cytotoxicity	Good sensitivity	2-day turnaround time Requires tissue culture capacity
Nucleic acid amplification (including polymerase chain reaction [PCR])	Excellent sensitivity Excellent specificity Rapid	Expensive

Vantaggi e svantaggi

- La ricerca della tossina (EIA) *stand-alone* è inadeguata.
  Bassa sensibilità basso valore predittivo negativo
- La ricerca del GDH (EIA) ha una migliore sensibilità, è più rapida e con costi inferiori
  La ricerca del GDH ha un alto valore predittivo negativo, tuttavia non distingue tra ceppi tossigenici e non tossigenici e deve essere utilizzato in combinazione con la ricerca della tossina
- **La ricerca degli acidi nucleici è rapida altamente sensibile e specifica MA… è costosa**

Algoritmi diagnostici

Idoneo campione di feci

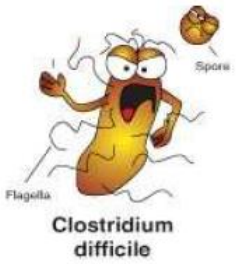
Gold Standard	Clinical Routine	C diff GDH	Xpert C. diff
Culture of all samples	EIA	Pos / Neg	Pos / Neg
Pos / Neg	Pos / Neg	EIA	
Ancora sospetto? Nuovo campione	EIA	Pos / Neg	
	Pos / Neg	PCR	
Ancora sospetto? Nuovo campione	EIA	Pos / Neg	
	Pos / Neg		

Questo algoritmo comporta una serie di ripetizioni non necessarie determinate dallo scarso valore predittivo positivo (PPV). Quando il laboratorio abbandona questo test, il volume dei test richiesti diminuisce.

Valore clinico del test

- **Il clinico è alla ricerca di un test rapido, sensibile e specifico** che permetta il trattamento appropriato e l'isolamento del paziente per limitare rapidamente la trasmissione del patogeno
- **Abilità nel riconoscere** e discriminare i ceppi tossinogenici e iper-tossinogenici di **C.difficile resistenti alle terapie antibiotiche standard**

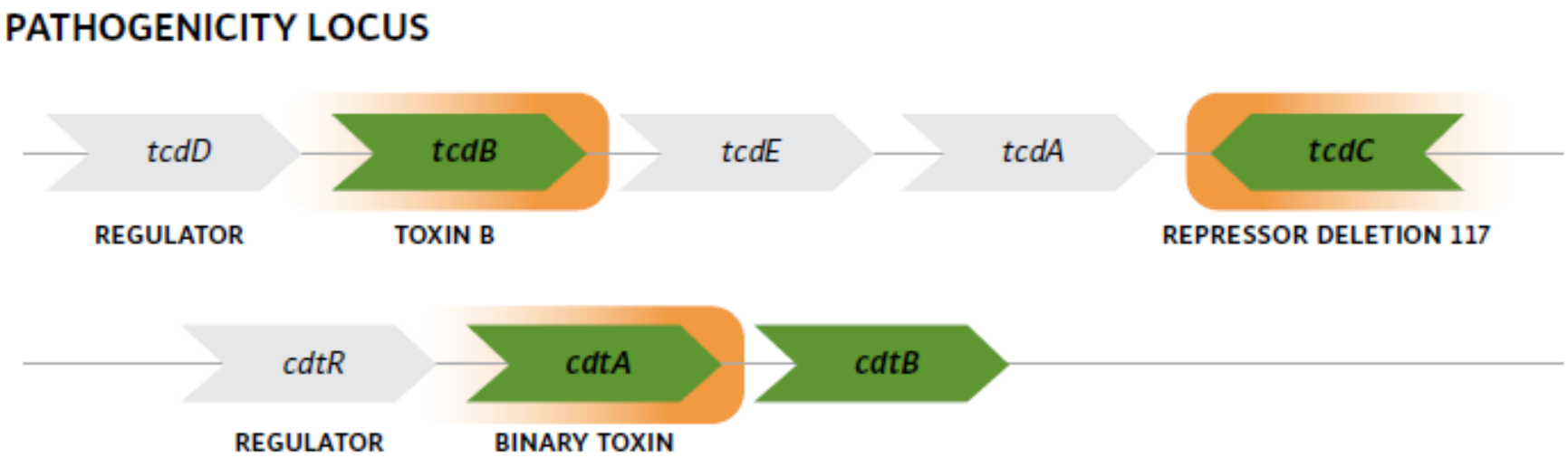
Xpert C.difficile



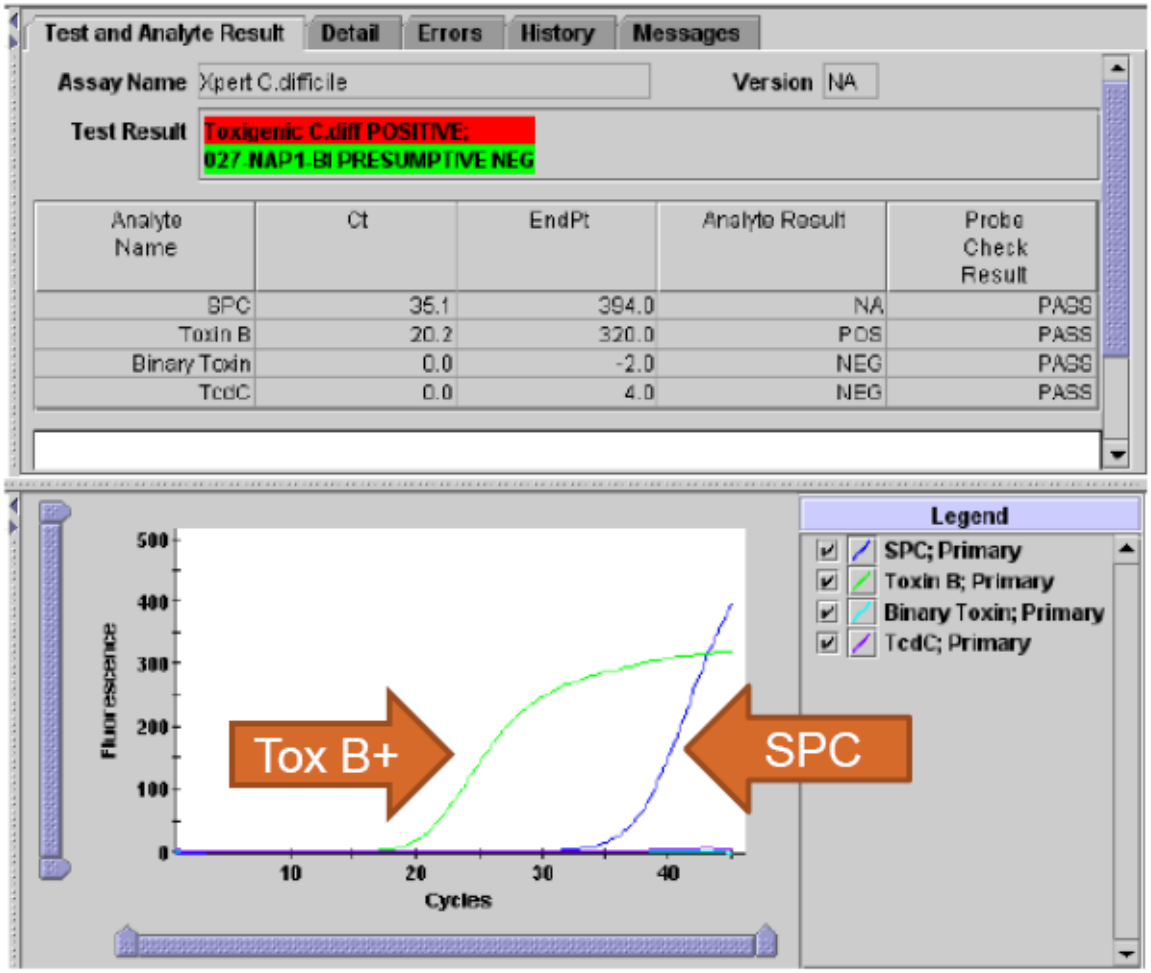
- Rapid detection of toxin B encoding *C. difficile* in stool in 47 minutes
- 2 minutes hands-on time; random access, moderate complexity
- First *C. difficile* test compared to true gold standard of toxigenic culture
- 99% Sensitive, 91% Specific vs Direct Toxigenic culture
- 94% sensitive, 94% specific vs broth enriched toxigenic culture
- Evaluation of apparent false positives (GX positive, culture negative) has shown that over half would have been called positive in other assays (GDH or toxin EIA)

Tossina B, binaria + identifies 027/BI strain

Geni target di Xpert *C.difficile*



Interpretazione risultati Xpert *C.difficile*

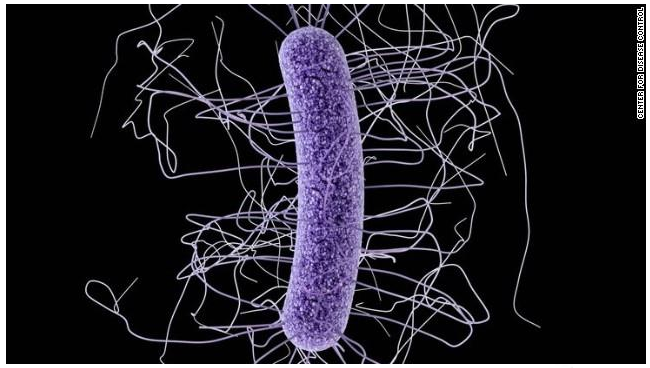


Tox B+/Binary-/tcdC-

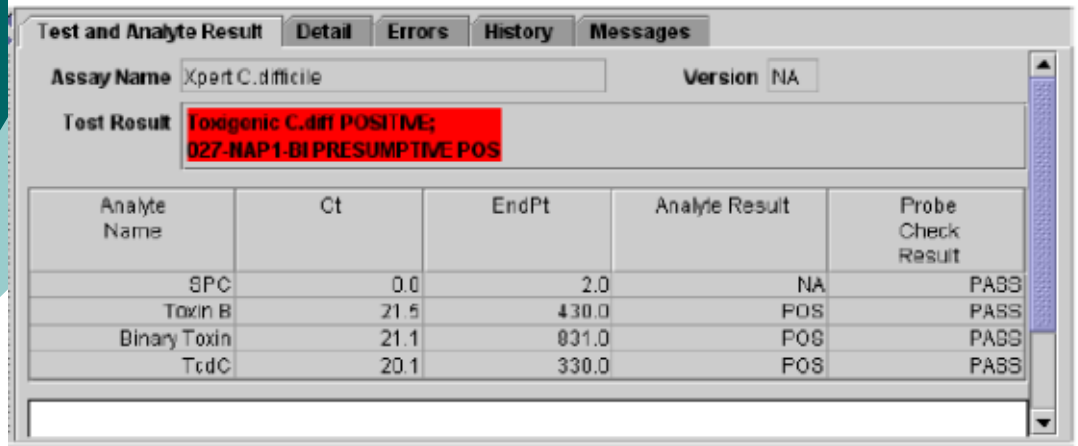
Note a referto: **considerare l'utilizzo del metronidazolo.**

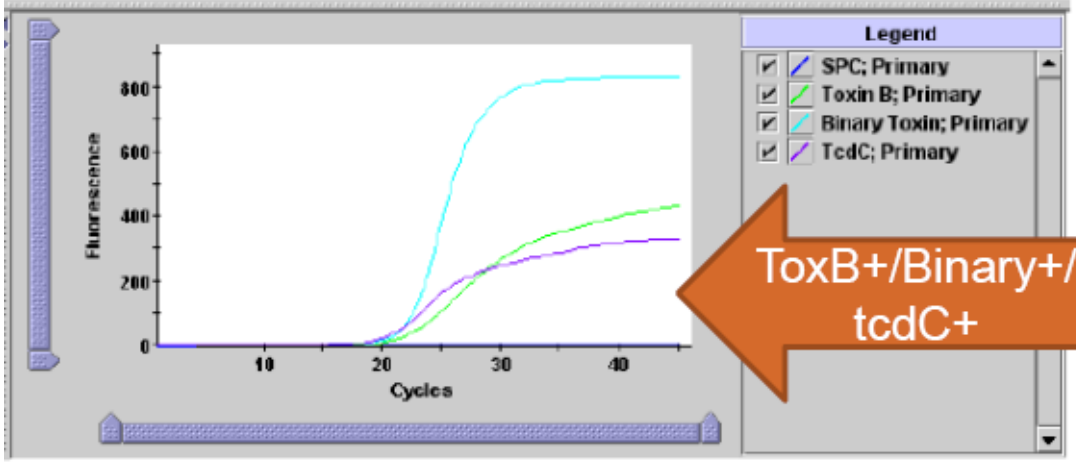
Il test è indicato per fare DIAGNOSI di infezione da C.difficile tossinogenico in pazienti SINTOMATICI CON DIARREA e NON trova indicazione per controllo della terapia.

Invitiamo ad evitare inutili ripetizioni.



Interpretazione risultati Xpert *C.difficile*





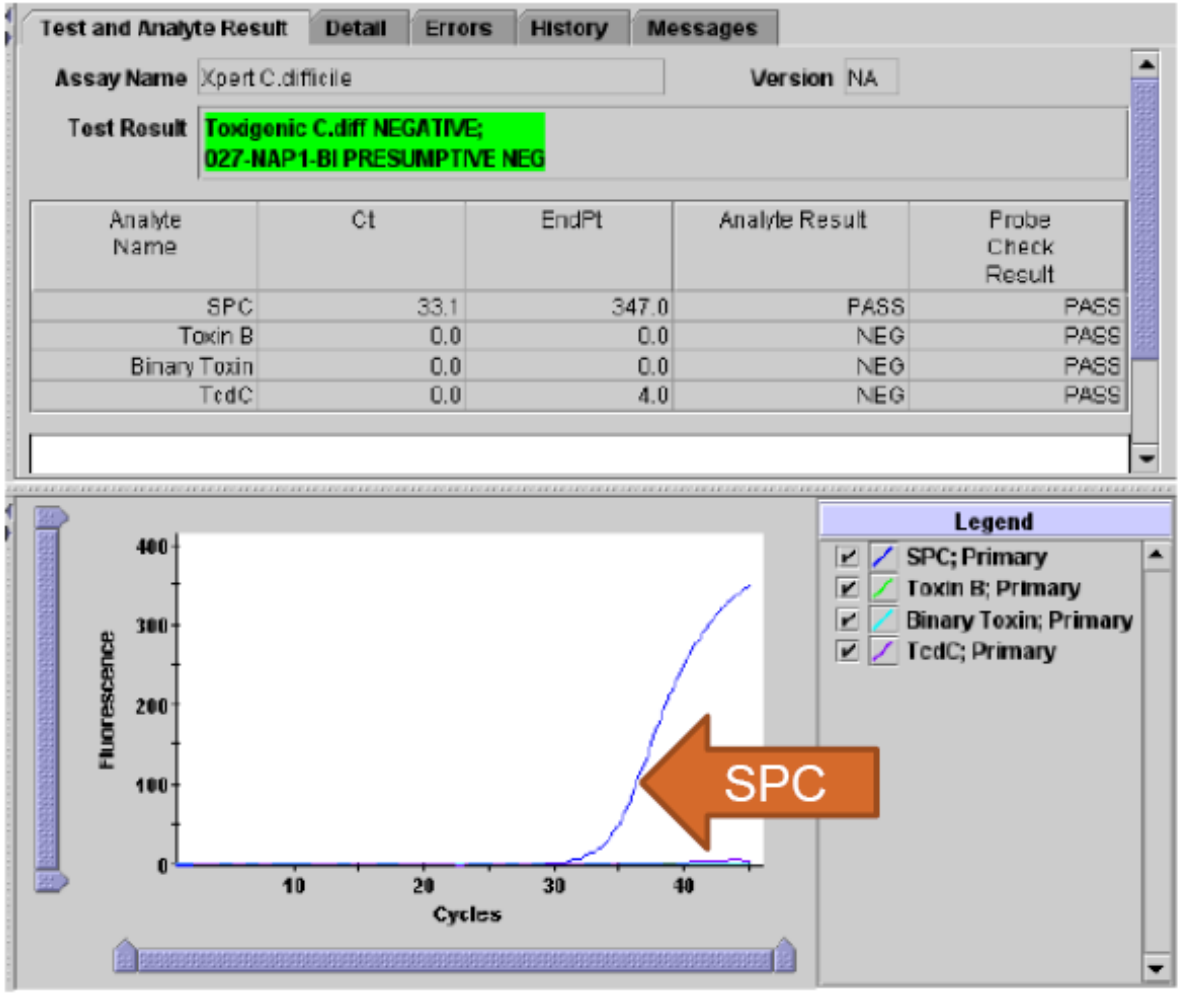
Tox B+/Binary+/tcdC+:

Note a referto:

discontinuare i chinoloni, considerare la vancomicina.

Il test è indicato per fare DIAGNOSI di infezione da C.difficile tossinogenico in pazienti SINTOMATICI CON DIARREA e NON trova indicazione per controllo della terapia.
Invitiamo ad evitare inutili ripetizioni.

Interpretazione risultati Xpert *C.difficile*



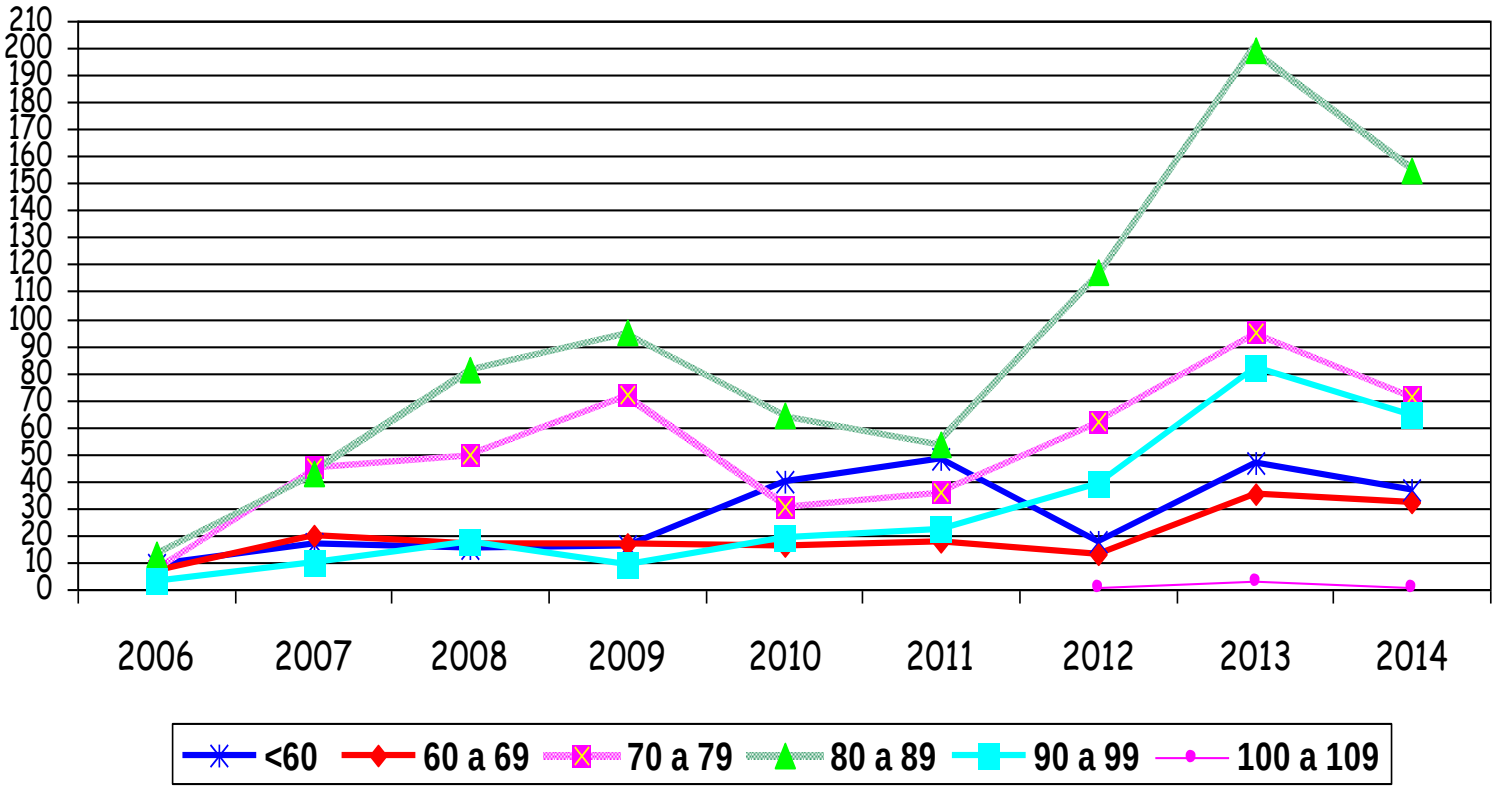
C. diff non tossigenico

Note a referto: Il test è indicato per fare DIAGNOSI di infezione da C.difficile tossinogenico
in pazienti SINTOMATICI CON DIARREA e NON trova indicazione per controllo della terapia.
Invitiamo ad evitare inutili ripetizioni.

N° casi positivi per **C.difficile**

AOU S.Anna e dal 2013 **LUP FE** Pazienti interni per classi di età e anno

(da Giugno 2008 si esegue ricerca Tossina B da luglio 2013 Real time PCR multiplex GeneXpert)



Diagnosi microbiologica di CDI quando ripetere il test ?

- In una popolazione a bassa prevalenza ripetere il test aumenta la possibilità di falsi positivi
- Nel caso di un paziente clinicamente sospetto e con sintomi persistenti, se il primo campione fecale esaminato risultasse negativo per *C. difficile* solo **in presenza di dubbi procedurali**, si potrà procedere all'analisi di un secondo campione
- **La ricerca di *C.difficile* in un paziente trattato per CDI è sconsigliata nel mese successivo la terapia antibiotica**. La guarigione non è dimostrabile attraverso i test di laboratorio
- La persistenza di positività non è predittiva di ricadute

Aspetti clinici

Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* in Adults: A Systematic Review

JAMA. 2015;313(4):398-408

Table 3. CDI Classification Based on Disease Severity

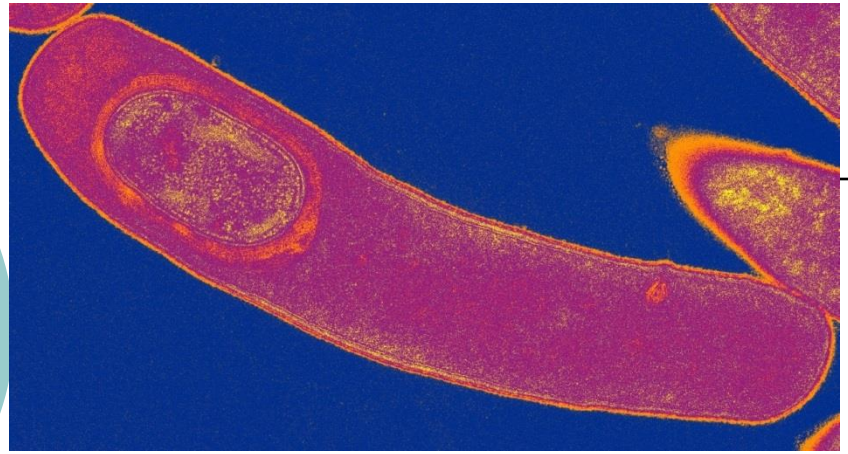
CDI Disease Category	Clinical and Laboratory Signs	Associated Risk Factors
Mild to moderate	Diarrhea without systemic signs of infection, white blood cell count <15 000 cells /mL, and serum creatinine <1.5 times baseline[15]	Antibiotic use, previous hospitalization, longer duration of hospitalization, use of proton pump inhibitors, receipt of chemotherapy, chronic kidney disease, and presence of a feeding tube[10-14]
Severe	Systemic signs of infection, and/or white blood cell count ≥15 000 cells/mL, or serum creatinine ≥1.5 times the premorbid level[15]	Advanced age, infection with BI/NAP1/027 strain[114,115]
Severe, complicated	Systemic signs of infection including hypotension, ileus, or megacolon[15]	See above,[a] plus recent surgery, history of inflammatory bowel disease, and intravenous immunoglobulin treatment[43]
Recurrent	Recurrence within 8 weeks of successfully completing treatment for CDI[16,20]	Patient age ≥65 y, concomitant antibiotic use, presence of significant comorbidities, concomitant use of proton pump inhibitors, and increased initial disease severity[16]

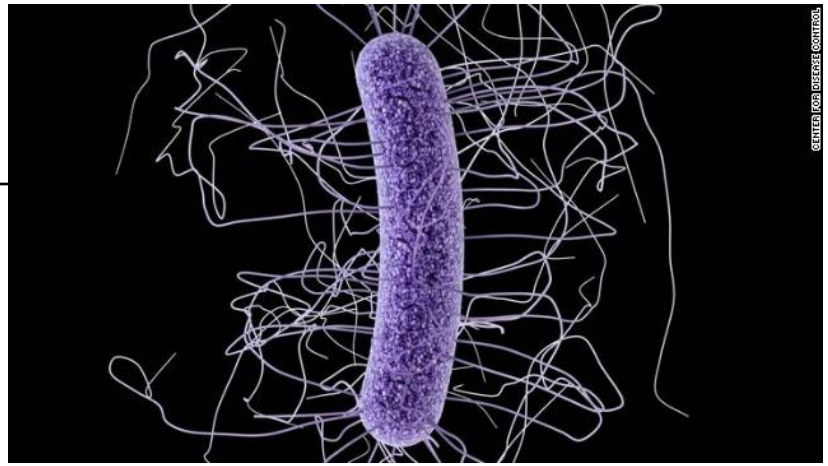
Abbreviation: CDI, *Clostridium difficile* infection.

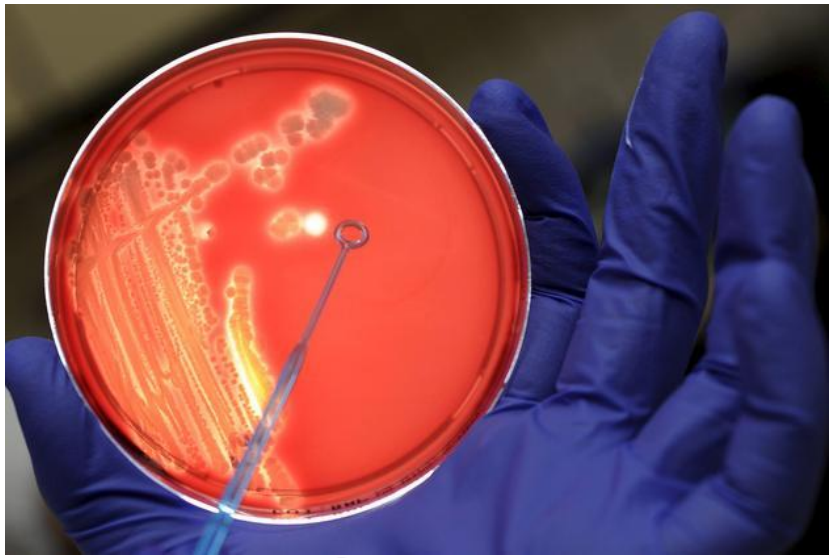
[a] Also includes associated risk factors for mild to moderate and severe CDI disease categories.

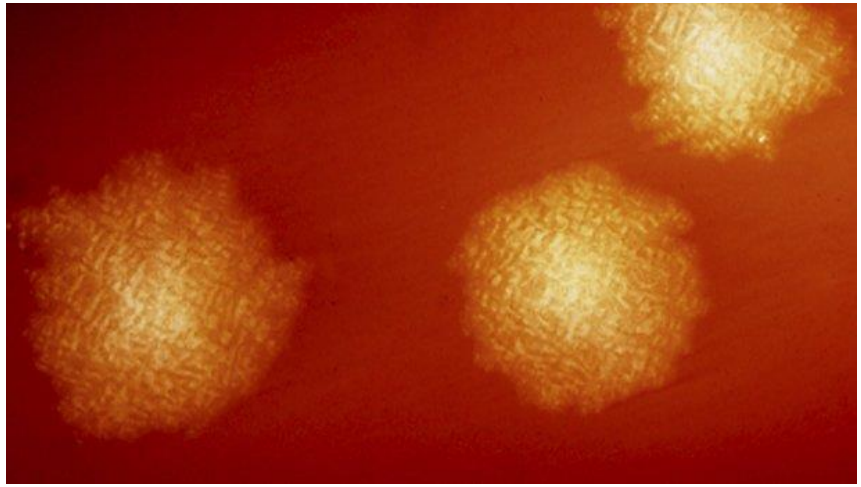
In sintesi

- *C.difficile* rappresenta una importante causa di morbidità e mortalità.
- Le strategie di trattamento si basano sulla severità della malattia e sul rischio di ricorrenza.
- Il trapianto di microbiota fecale si associa alla risoluzione dei sintomi nei casi di CDI ricorrente e il suo ruolo potrebbe svilupparsi in futuro.









Grazie per l'attenzione