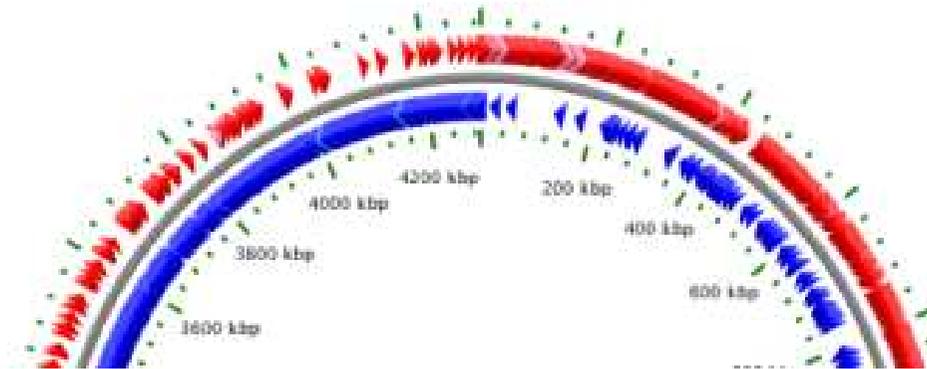
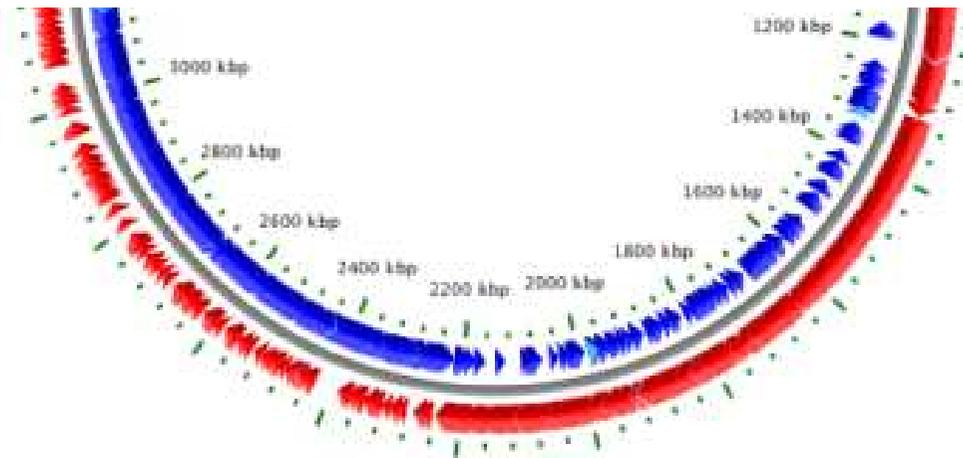


2° Congresso Triveneto di malattie infettive e microbiologia clinica



**Le infezioni da *Clostridium difficile*:
epidemiologia e aspetti microbiologici**



Dott.ssa Lucia Collini - U.O. Microbiologia e Virologia - Trento

Mestre (VE) - Ospedale Dell'Angelo - 5.X.2013

Review

Bench-to-bedside review: *Clostridium difficile* colitis

Carolyn V Gould and L Clifford McDonald

Prevention and Response Branch, Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road NE, Atlanta, GA 30333, USA

Corresponding author: L Clifford McDonald, C.McDonald1@cdc.gov

Published: 18 January 2008
This article is online at <http://ccforum.com/content/12/1/203>
© 2008 BioMed Central Ltd

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2011, p. 4040-4046
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.05053-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 12

Lack of Association between Clinical Outcome of *Clostridium difficile* Infections, Strain Type, and Virulence-Associated Phenotypes[▽]

Stéphanie Sirard, Louis Valiquette, and Louis-Charles Fortier*

Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x

New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection

S. Persson, M. Torpdahl and K. E. P. Olsen

Department of Bacteriology, Mycology and Parasitology, Unit of Gastrointestinal Infection, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY JUNE 2010, VOL. 35, NO. 6

COMMENTARY

Reexamining Methods and Messaging for Hand Hygiene in the of Increasing *Clostridium difficile* Colonization and Infection

Katherine Ellingson, PhD; Clifford McDonald, MD

S81 INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY OCTOBER 2008, VOL. 29, SUPPLEMENT 1

SUPPLEMENT ARTICLE: SHEA/IDSA PRACTICE RECOMMENDATION

Strategies to Prevent *Clostridium difficile* Infections in Acute Care Hospitals

Erik R. Dubberke, MD; Dale N. Gerding, MD; David Classen, MD, MS; Kathleen M. Arias, MS, CIC; Kelly Podgorny, RN, MS, CPHQ; Deverick J. Anderson, MD, MPH; Helen Burstin, MD; David P. Calfee, MD, MS; Susan E. Coffin, MD, MPH; Victoria Fraser, MD; Frances A. Griffin, RRT, MPA; Peter Gross, MD; Keith S. Kaye, MD; Michael Klompas, MD; Evelyn Lo, MD; Jonas Marshall, MD; Leonard A. Mermel, DO, ScM; Lindsay Nicolle, MD; David A. Pegues, MD; Trish M. Perl, MD; Sanjay Saint, MD; Cassandra D. Salgado, MD, MS; Robert A. Weinstein, MD; Robert Wise, MD; Deborah S. Yokoe, MD, MPH

MA QUANTO E' DIFFICILE QUESTO CLOSTRIDIUM?

Effective Utilization of Evolving Methods for the Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. Anna M. Kufelnick and Thomas J. Kirn, 2011 (June) MEDICAL MICROBIOLOGY

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2010, p. 605-608

0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01579-09

Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 2

Evaluation of Diagnostic Tests for *Clostridium difficile* Infection[▽]

Jonathan Swindells, Nigel Brenwald, Nathan Reading, and Beryl Oppenheim*

Department of Medical Microbiology, City Hospital, Birmingham, United Kingdom

Received 16 August 2009/Returned for modification 10 November 2009/Accepted 11 December 2009

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2009, p. 3729-3731
0095-1137/09/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01280-09

Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 47, No. 11

Comparison of a Commercial Multiplex Real-Time PCR to the Cell Cytotoxicity Neutralization Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections[▽]

Haihui Huang,^{1,2} Andrej Weintraub,² Hong Fang,² and Carl Erik Nord^{2*}

Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, 12 Wulumuqi Zhong Road, Shanghai 200040, China,¹ and Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Huddinge, SE-141 86 Stockholm, Sweden²

Received 30 June 2009/Returned for modification 17 August 2009/Accepted 31 August 2009

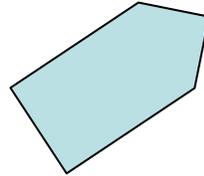
A commercial multiplex real-time PCR assay (Cepheid Xpert *C. difficile* assay) for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection was evaluated. The sensitivity and specificity of the Cepheid assay were 97.1% and 93.0% for fresh stools, using the cell cytotoxicity neutralization assay as the reference. Using PCR ribotyping as the reference for ribotype 027 strains, the corresponding figures were 100% and 98.1%, respectively.

C.difficile

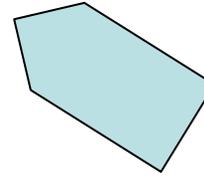
è la principale causa di diarrea infettiva nosocomiale



forte impatto



Precoce identificazione



Costante monitoraggio

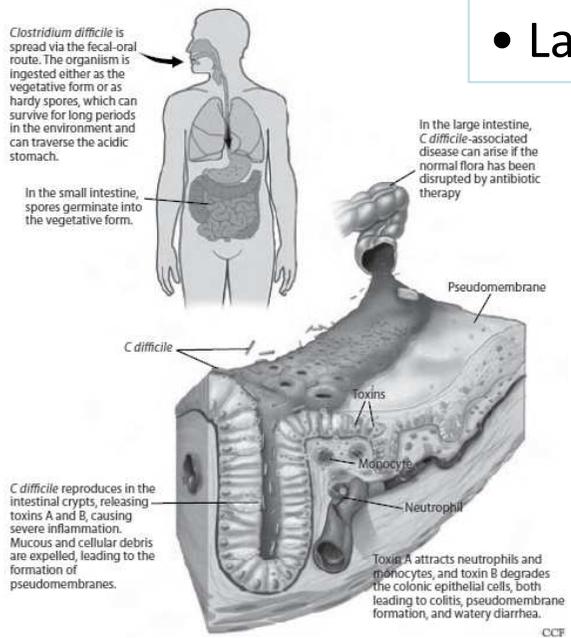


Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



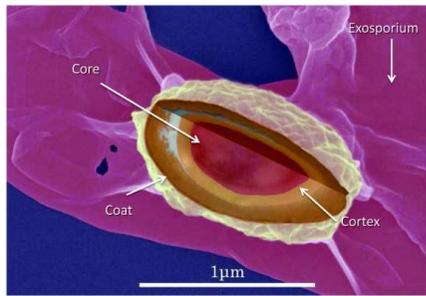
Importante riconoscere :

• La microbiologia

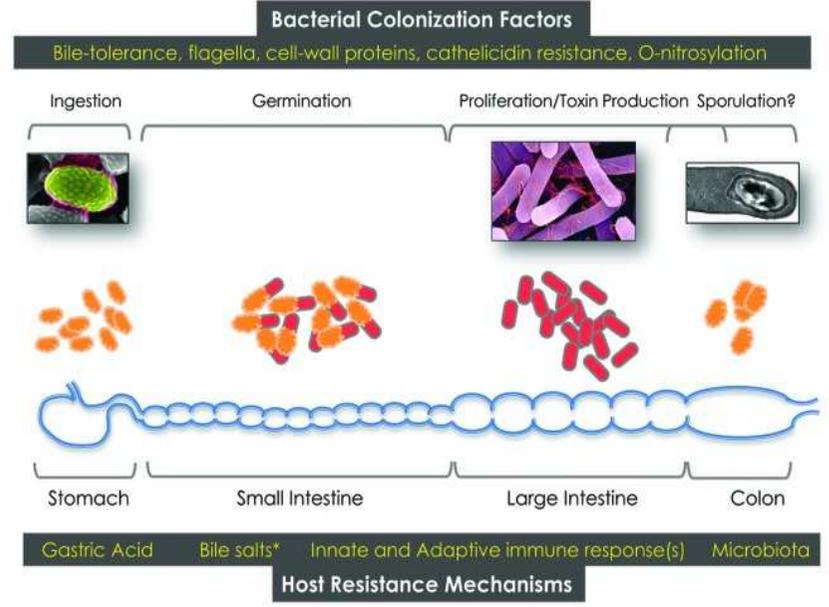
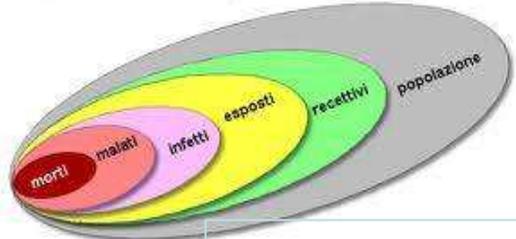


• La patogenesi

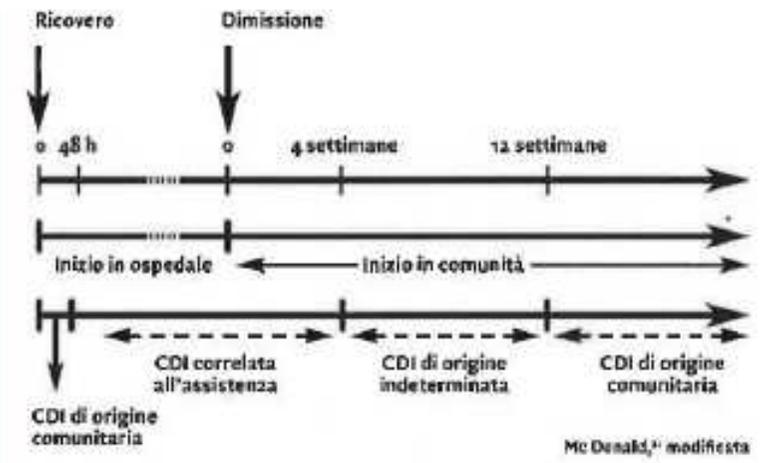
Spora → Forma Vegetativa



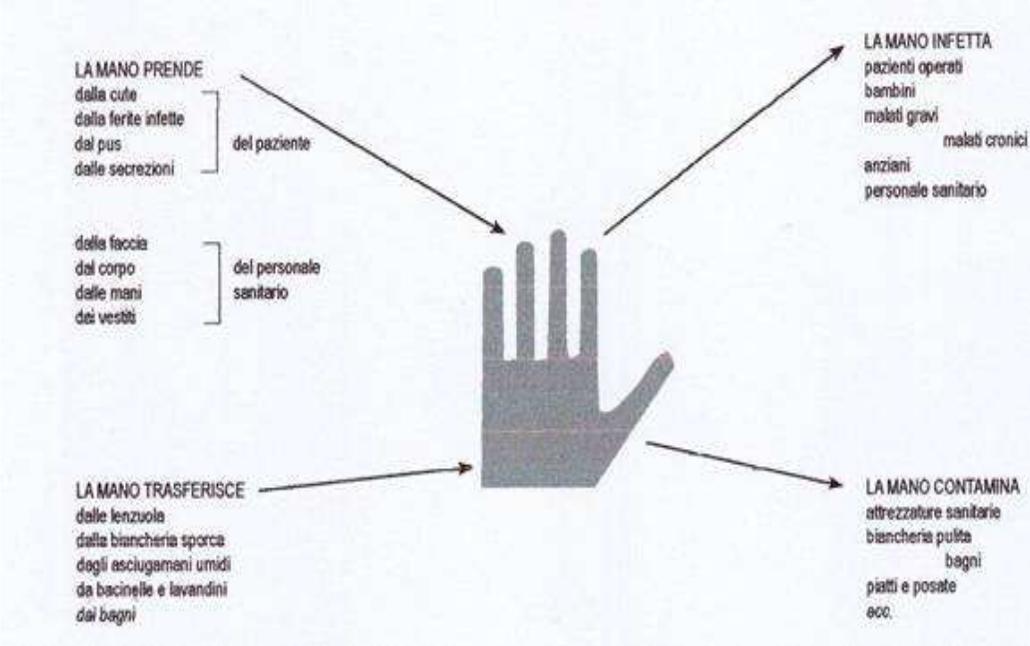
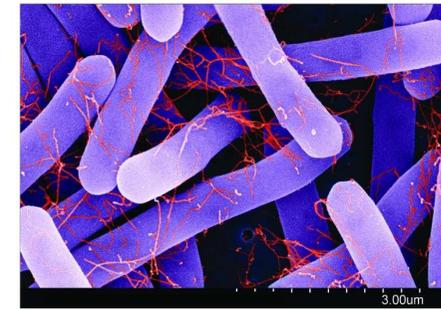
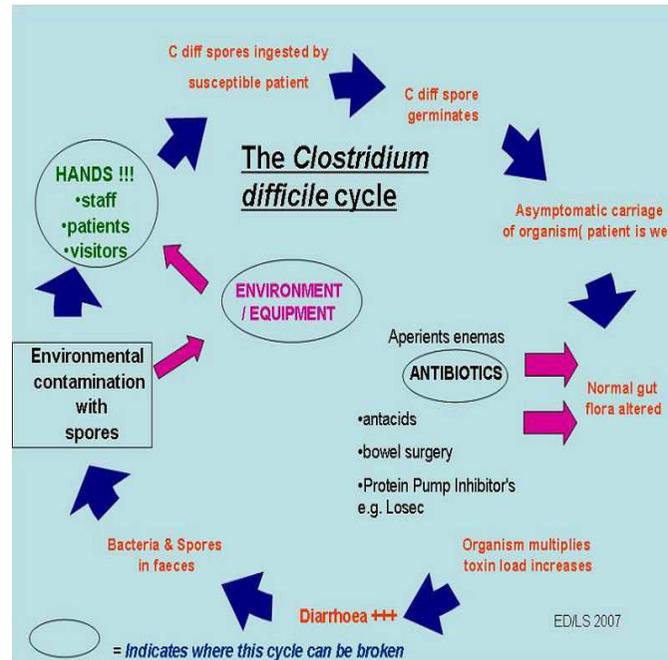
• I cambiamenti di epidemiologia



• Approccio diagnostico



Pianificare le strategie di controllo dell'infezione e prevenire la trasmissione



Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



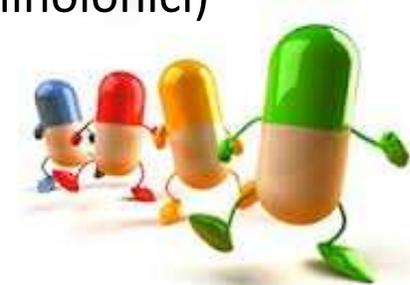
-Ospedalizzazione con tempi prolungati

Fattori di rischio

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



-età (>65 anni)



A chi lo cerchiamo???



Tutti i pazienti con diarrea insorta dopo oltre 48 ore dal ricovero

dreamstime

Pazienti con diarrea al ricovero o insorta entro le prime 48 ore dal ricovero se:

- Dimessi da un ospedale da non più di 4 settimane
- In terapia antibiotica
- Con diarrea severa

Non eseguire il test con paziente asintomatico

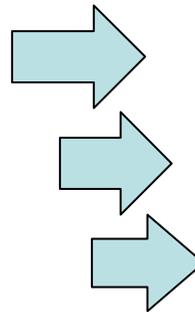
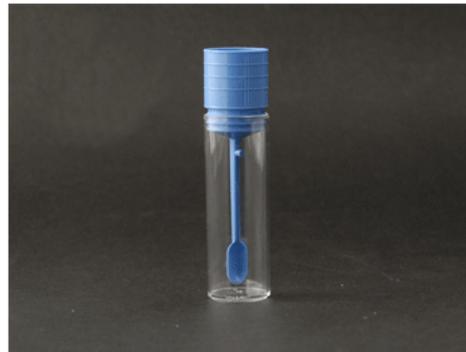


Dove lo cerchiamo????



Non su feci formate

Il tampone rettale non è idoneo



Bristol Stool Chart

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage but with cracks on its surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces. Entirely Liquid

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Guidelines for the Management of *Clostridium difficile* Infection (CDI) in all Healthcare Settings

Draft March 2009
Revised November 2011

Guide to Preventing *Clostridium difficile* Infections



GUIDELINES ID.1112 | 168-0891-2009-03097.x

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI)

M. P. Baer¹, E. J. Kuijper² and J. T. van Dissel¹
Departments of 1) Infectious Diseases and 2) Medical Microbiology, Centre for Infectious Disease, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

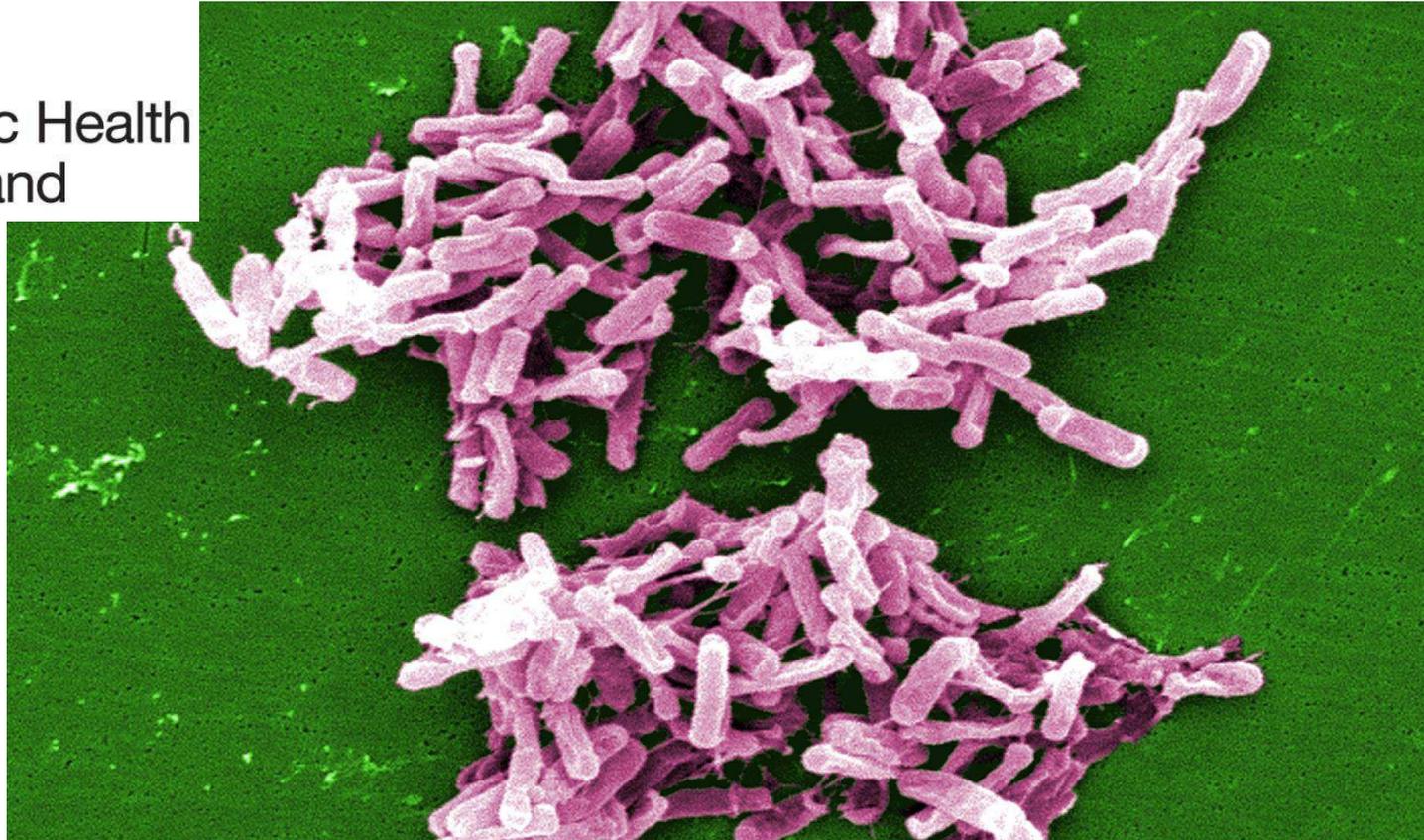


Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Updated guidance on the management and treatment of *Clostridium difficile* infection



Public Health
England



Publication date: June 2013

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

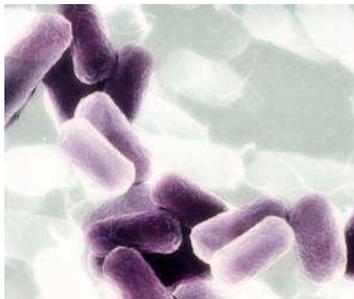
Diagnosi



Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories.
Carey-Ann D. Burnham

Il clinico è alla ricerca di un test rapido, sensibile e specifico che permetta il trattamento appropriato e l'isolamento del paziente per rapidamente limitare la trasmissione del patogeno.

Abilità nel riconoscere i ceppi iper-tossigenici di *C.difficile* resistenti alle terapie antibiotiche standard.



Evaluate and optimize
test-ordering practices and diagnostic methods

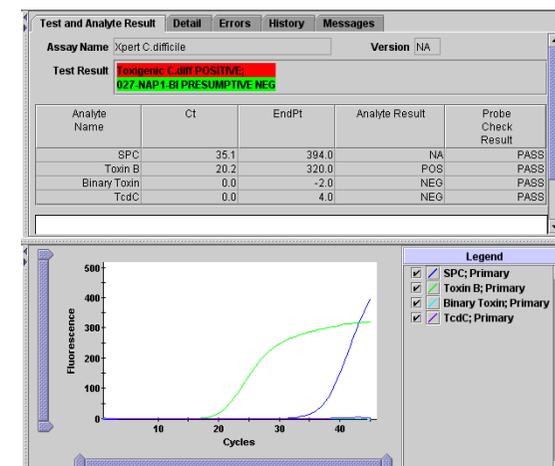
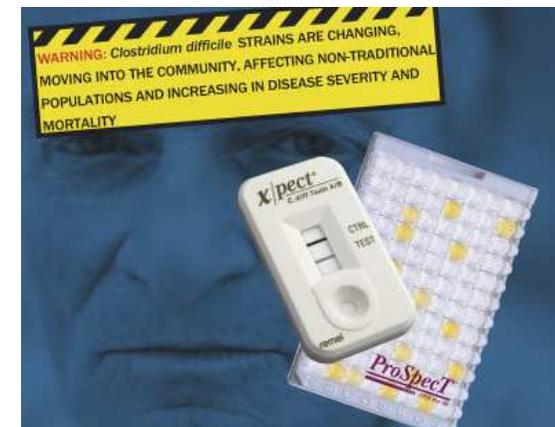
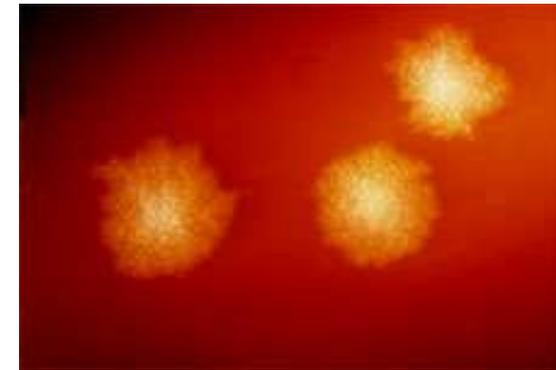
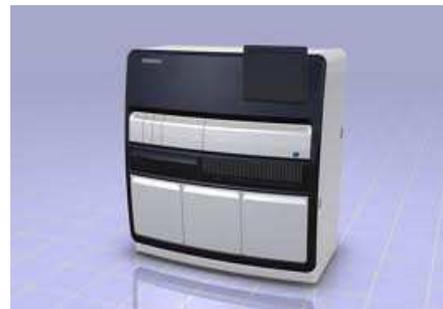


***Clostridium difficile*: valore clinico del SAGGIO DI LABORATORIO**

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Un semplice esame di laboratorio non è sufficiente a porre (o ad escludere) diagnosi di infezione da *C.difficile*

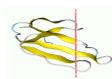
- Metodi non microbiologici:
 - Sintomatologia clinica
 - Endoscopia
- Identificazione del *C.difficile* :
 - Coltura
 - Glutamate dehydrogenase GDH
- Identificazione della Tossina
 - Ricerca della Tossina B
 - EIA
 - Test di citotossicità
 - Geni della Tossina con PCR (NAAT)



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 <i>C. difficile</i>
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



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

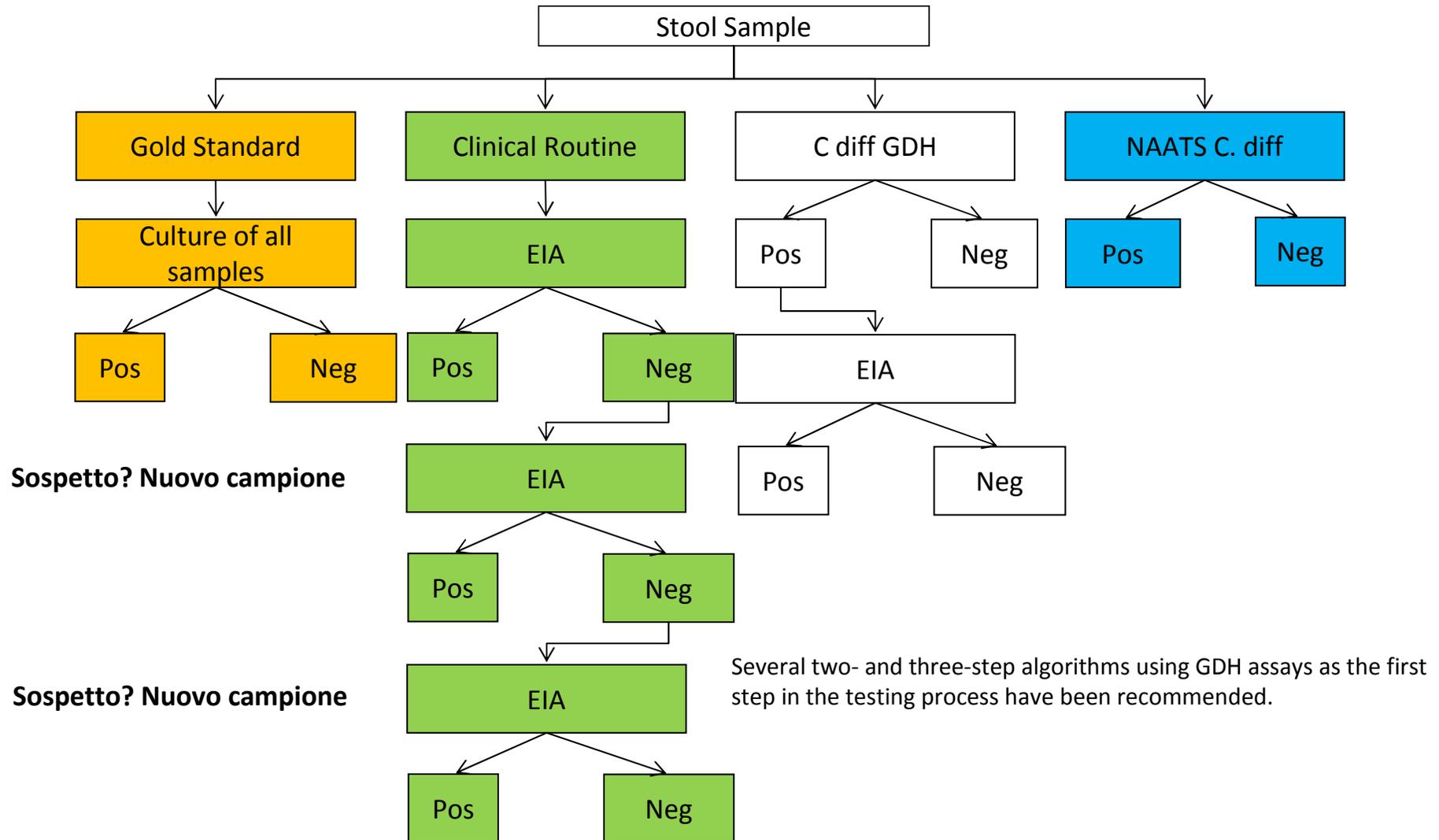
Deve essere utilizzato in combinazione con la ricerca della tossina

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



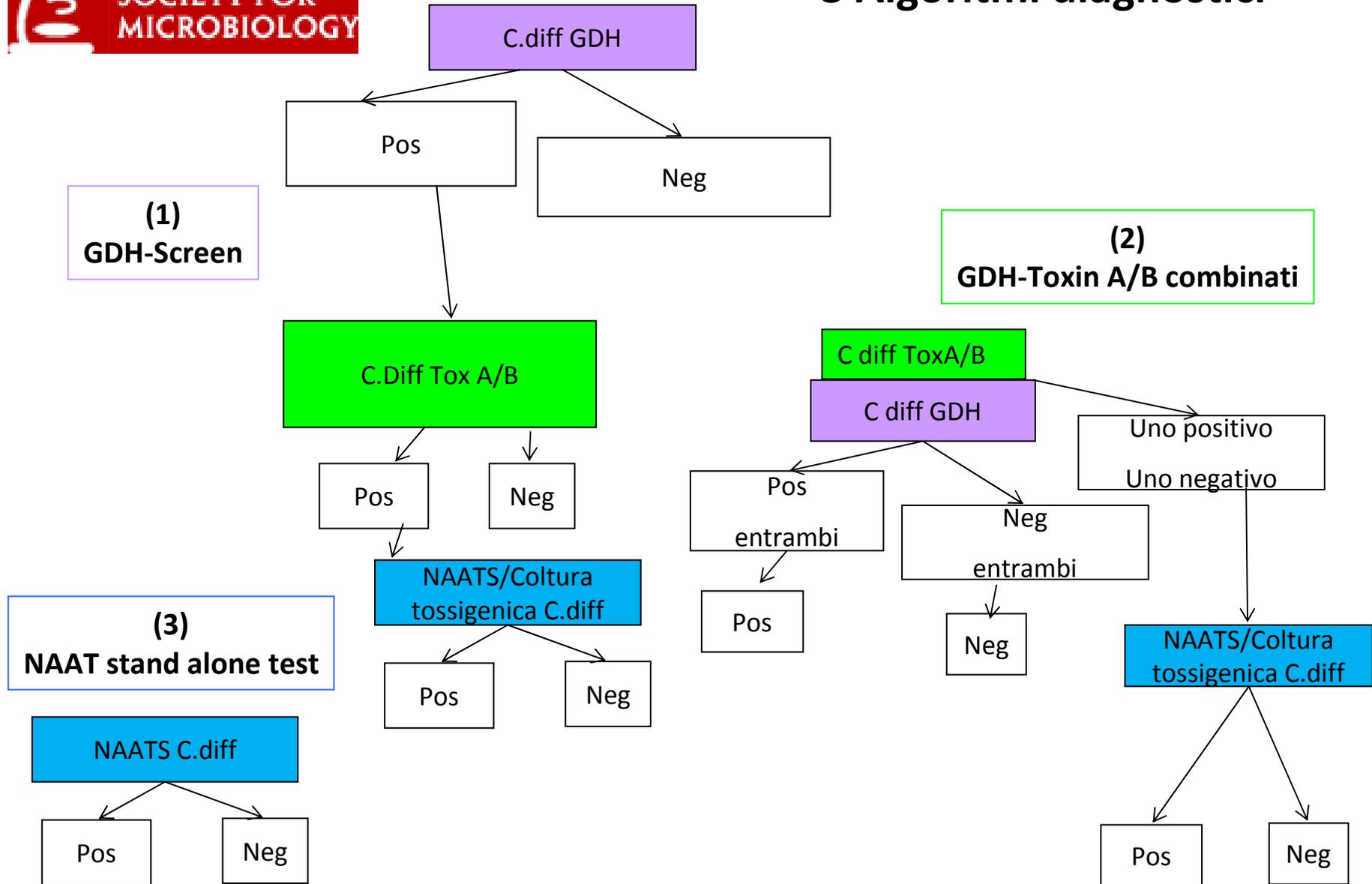
rapidità di risposta con una buona sensibilità

Algoritmi diagnostici



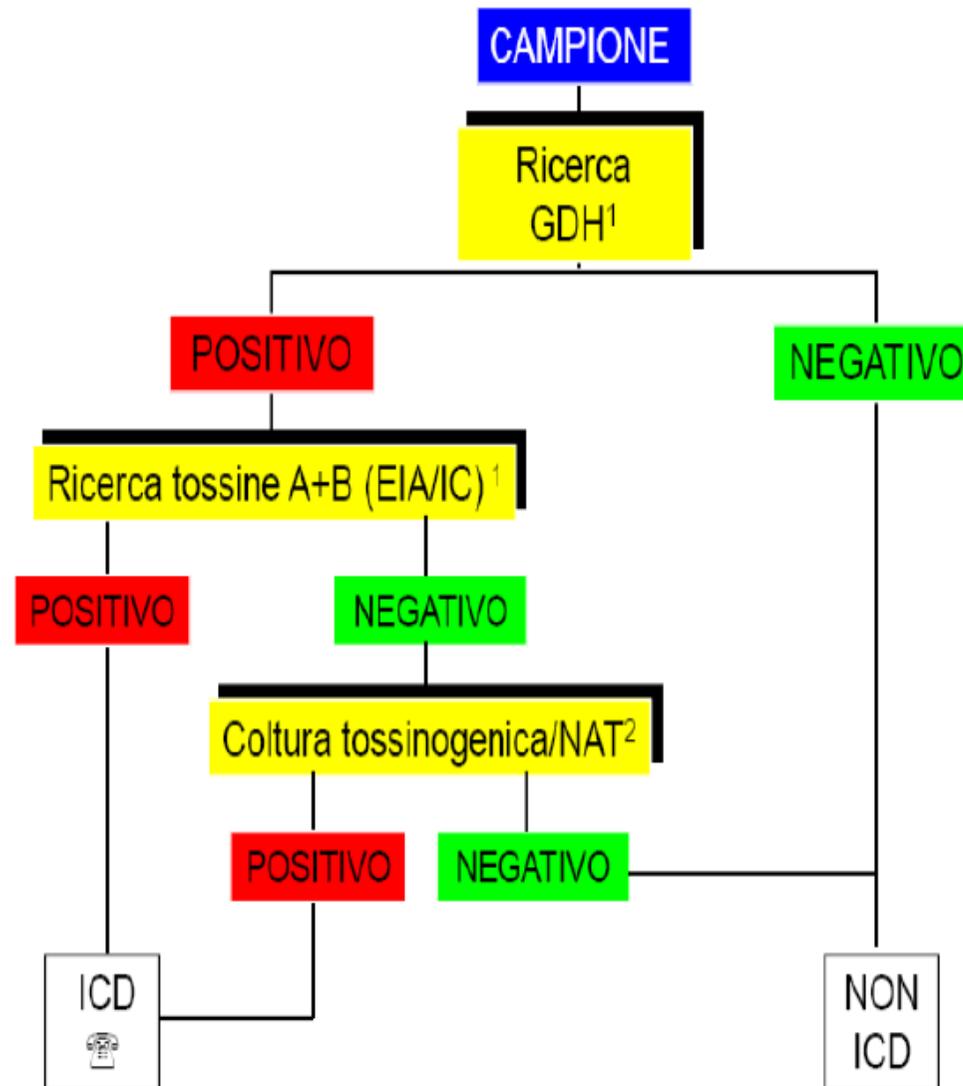


3 Algoritmi diagnostici



1 Algoritmo diagnostico

Three steps work-up





European, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *Clostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea study

20 countries participating

Concordance with 'optimal' testing methodology



Country	Number of hospitals	% using optimised algorithm for CDI diagnosis	% using any <i>C. difficile</i> toxin method (may not optimal)	% of hospitals using only molecular
Austria	9	11.1	66.7	0
Belgium	10	70.0	100	0
Bulgaria	5	0	80.0	0
Czech Republic	10	10.0	100	0
Finland	5	0	60.0	20.0
France	70	27.1	57.1	7.1
Germany	87	28.7	73.6	1.1
Greece	11	9.1	63.6	0
Hungary	10	90.0	100	0
Ireland	5	0	20.0	0
Italy	65	23.1	73.6	9.2
Netherlands	14	0	71.4	7.1
Poland	27	22.2	100	0
Portugal	11	18.2	90.9	9.1
Romania	5	0	80.0	0
Slovakia	6	0	100	0
Slovenia	2	0	0	0
Spain	51	23.5	62.7	2.0
Sweden	9	0	33.3	22.2
UK	58	53.8	75.0	0
Europe	468	27.4	72.0	3.8



Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

NAAT

NON per pazienti asintomatici

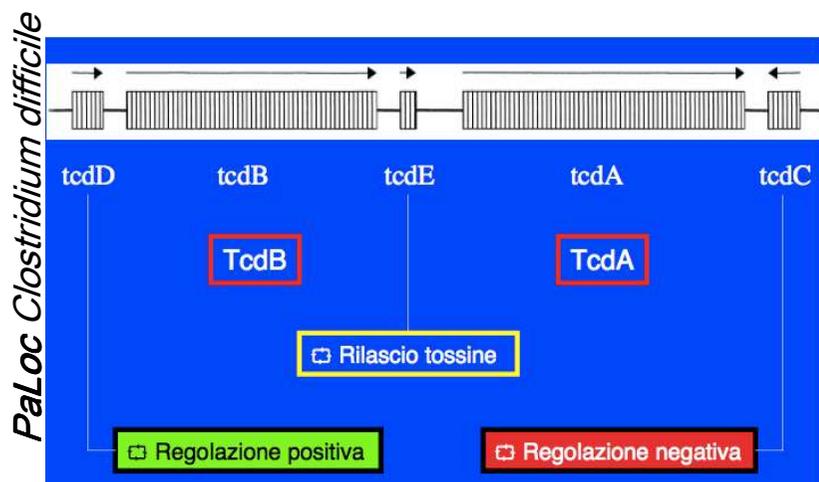
Saggi positivi dopo il trattamento non sono indice di ricaduta

Non idonei per il follow-up terapeutico (No “test of cure”)

Possono essere utilizzati *stand-alone*

i saggi molecolari ci aiutano

- Gestione dei pazienti con forte sospetto clinico ma con risultato “*C.difficile* Negativo”
- Sono necessari più test diagnostici per confermare l’infezione *C.difficile*



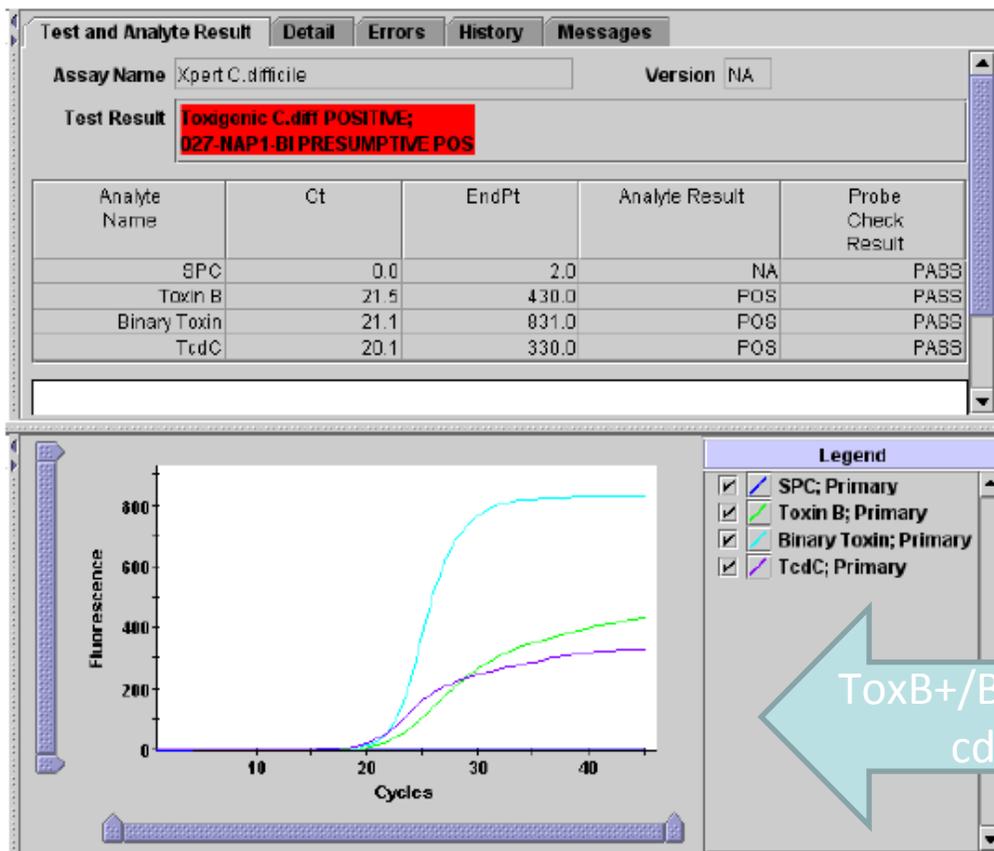
migliore uso delle risorse di laboratorio
appropriate misure di prevenzione della infezione
adeguato trattamento

Impact of toxigenic *Clostridium difficile* polymerase chain reaction testing on the clinical microbiology laboratory and inpatient epidemiology - Maureen Napierala **2013**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 76 (2013)

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Gene Xpert *Clostridium difficile*

Trova tre target: Toxin B, Binary Toxin, delezione tcdC.



Tox B+/Binary+/tcdC+:

ceppo epidemico NAP1/027/BI

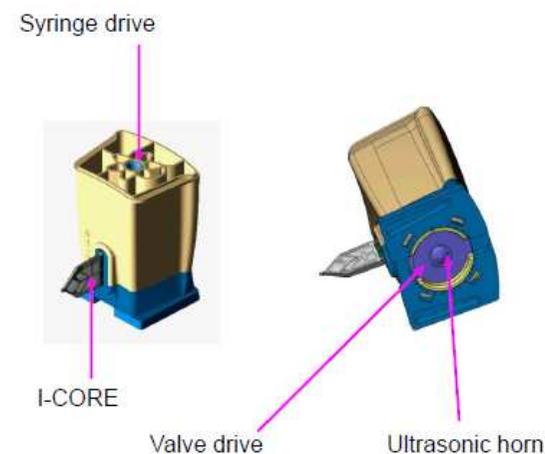
Considerare la vancomicina

orale, discontinuare i chinoloni

(moxifloxacina)

078: anche tossina binaria

Impatto significativo sull'identificazione della diagnosi: perdere tempo nella diagnosi, nel trattamento e nel controllo conseguente dell'infezione può aumentare i costi e la diffusione dell'infezione



GeneXpert®

- Incrementano i costi
- Incrementa l'ospedalizzazione del paziente
- Incrementa il tasso di mortalità



- Diagnosi di CDI in 45 minuti
- Determina se isolare o non isolare il paziente
- Determina l'ottimale opzione terapeutica
- Riduce il numero di pazienti in follow-up
- Riduce la trasmissione a livello familiare e comunitario



BD MAX™

Completa automazione in ogni fase di lavoro
(SISTEMA INTEGRATO)

Risposta rapida Tecnologie Real Time PCR (24 campioni/ corsa)

BD MAX è una piattaforma in biologia molecolare in grado di permettere all'operatore l'analisi completamente automatica dei campioni e la standardizzare dei protocolli di lavoro definiti (dalla lisi del campione alla rilevazione)

strip monouso per l'estrazione del DNA, cartridge per l'amplificazione del target

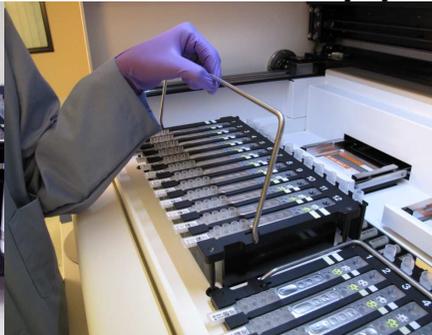


1.5 minuti/campione

Fase di pipettamento



Caricare reagenti e campioni



Mettere il rack in BD MAX™



Caricare la PCR cartridge



Creare la lista di lavoro, chiudere lo strumento e iniziare la corsa



BD MAX versus GeneXpert *C.difficile*

62 campioni di feci diarroiche (5-7 Bristol Stool Chart) sono stati analizzati con BD MAX™, metodica molecolare *walk-away* che rileva la presenza del gene *tcdB* e sistema Xpert® *C. difficile*, che utilizza una *cartridge* con amplificazione di 3 *target*: il gene della tossina B, quello della tossina binaria, e il gene regolatore *TcdC*.

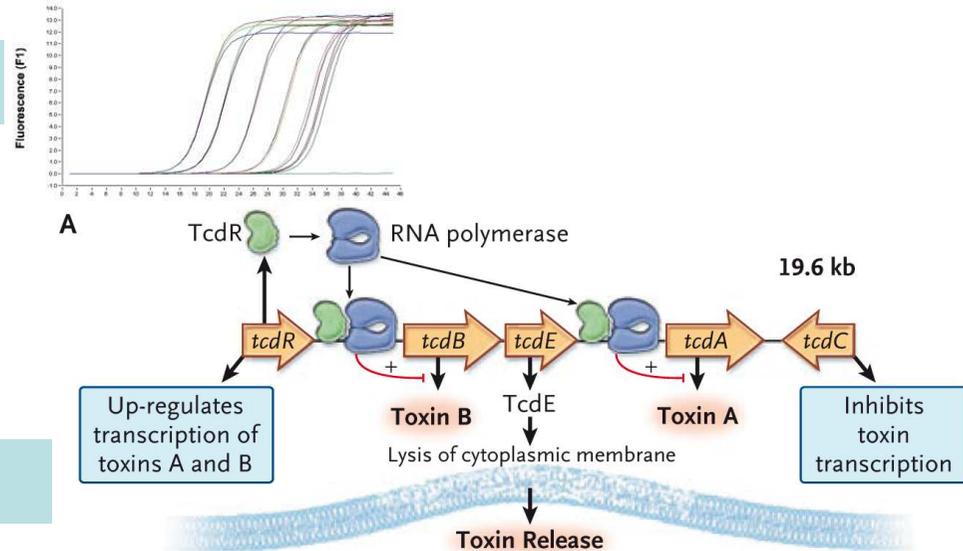
Risultati:

16 campioni sono risultati positivi e 46 negativi
(concordanza 100% BD MAX™/ Xpert® *C. difficile*).



Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Real-time PCR



Detection:

tcdA and *tcdB* gene found only in toxigenic *C. difficile*
16S-rDNA specific for *C. difficile*  ***Clostridium difficile***

tcdC gene deletion  ***Clostridium difficile* HyperTox**

Time to result

- DNA Extraction: 30 min
- Real-time PCR: 60 min

Sensitivity

- Analytical sensitivity ≤ 5 DNA copies /reaction

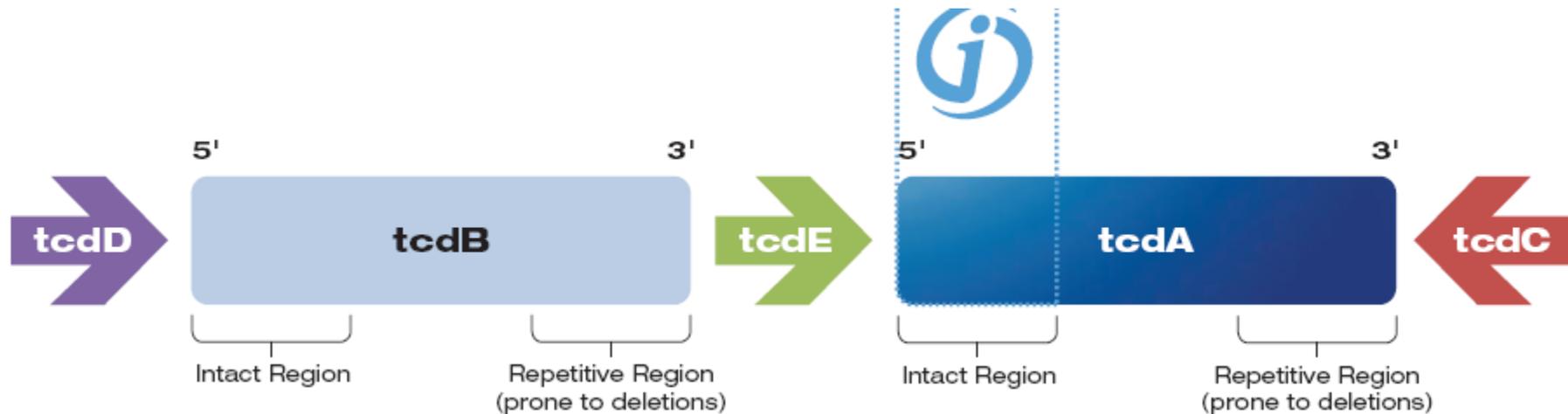
RIDA[®]GENE



illumigene[®] LAMP technology

Tecnologia *DNA strand displacement polymerase*

- meno soggetta a inibitori
- migliori *performance*



tcdA 5' region, utilized by *illumigene*[®]

- Intact and less prone to deletions
- Potential reduction in false negatives

tcdB 3' regions, utilized in current PCR platform

- More prone to deletions
- Decreasing sensitivity

L'elevata sensibilità può portare al rilevamento di *C.difficile*, anche in casi di colonizzazione asintomatica (false diagnosi di CDI)



eseguire l'analisi solo su pazienti sintomatici

Nonostante il prezzo relativamente alto per i test NAATs rispetto ad altri metodi, la sensibilità e la specificità, in combinazione con i tempi di risposta rapidi



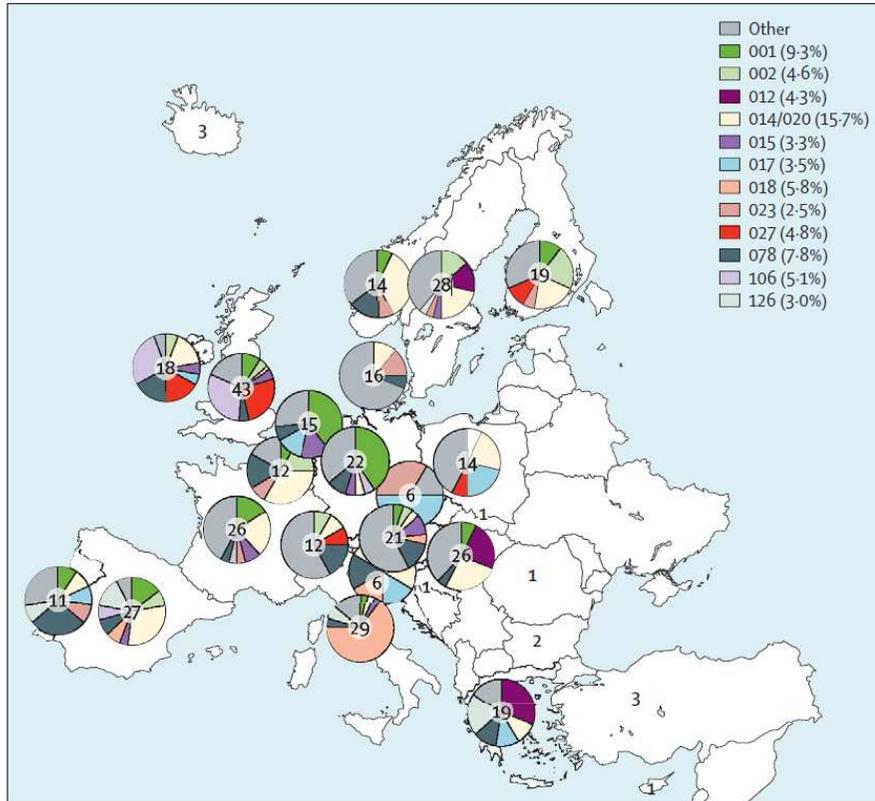
NAATs sono il futuro di saggi diagnostici CDI



Collini, et al. Comparazione tra la diagnosi molecolare di infezione da *Clostridium difficile* con RT-PCR in microfluidica e un saggio immunoenzimatico per la ricerca della glutammato-deidrogenasi. IN PRESS 2013

Epidemiologia

Epidemiologia dell'infezione sta cambiando



Incidenza di CID è in incremento

L'epidemia in Europa si caratterizza per tre aspetti distintivi:

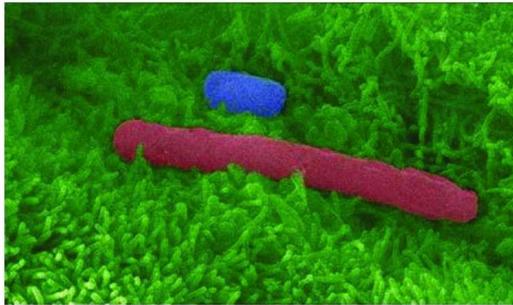
1. una diffusione in senso nord-sud;
2. la maggiore incidenza ha interessato paesi culturalmente più avanzati per quanto attiene il controllo delle infezioni nosocomiali;
3. il ruolo del ceppo *NAP1/BI/027* appare ancora limitato. L'epidemia europea ha, infatti, avuto inizio nei Paesi settentrionali (Paesi Bassi, Svezia, Gran Bretagna), per poi coinvolgere le nazioni continentali (Belgio, Germania, Austria, Francia) e, da ultimo, gli stati mediterranei (Grecia e Spagna).

Clostridium difficile: summary of actions in the European Union. C.Suetens. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



Epidemiologia



BI/NAP1/027

(restriction endonuclease analysis type BI, North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 (NAP1), polymerase chain ribotype 027)

Più resistente ai fluorochinoloni

Più virulento

Ceppo epidemico di *C. difficile*

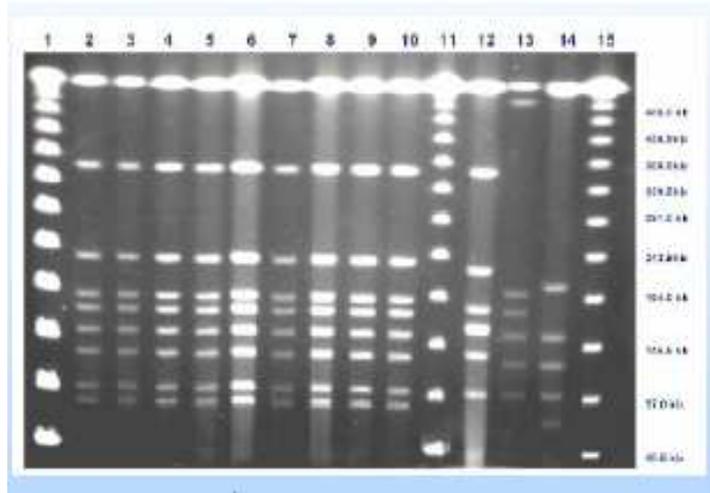
Aumentata produzione di tossina A (x18) e B (x23) e tossina binaria

Isolato in:
USA
Canada
Europa



Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Ribotipo 027 in Europa



INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY MAY 2010, VOL. 31, NO. 5

SHEA-IDS A GUIDELINE

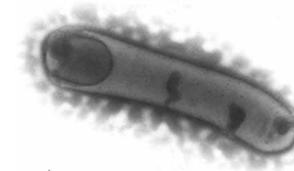
Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)

Stuart H. Cohen, MD; Dale N. Gerding, MD; Stuart Johnson, MD; Ciaran P. Kelly, MD; Vivian G. Loo, MD;
L. Clifford McDonald, MD; Jacques Pepin, MD; Mark H. Wilcox, MD

Kuijper et al. Euro Surveill. 2008

A giugno 2008, *C.difficile* Type 027 è stato registrato in 16 Stati europei; 9 di questi riferiscono *outbreak* e 7 casi sporadici.

Un nuovo ceppo (*C.difficile* Type 078), con un meccanismo di iperproduzione di tossine simile a quello di CD Type 027, è riportato in alcune nazioni europee (Belgio, Olanda, Irlanda del Nord, Scozia, Spagna).



Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078

Abraham Coninx,¹ Dennis Bakker,¹ Jeroen Coninx,¹ Sylvie B. Deboest,² Céline Hamezans,¹ Bas M. Netelema,² Albert A. Bergwerf,² Frido W. Dekker,³ and Ed J. Kuijper⁴

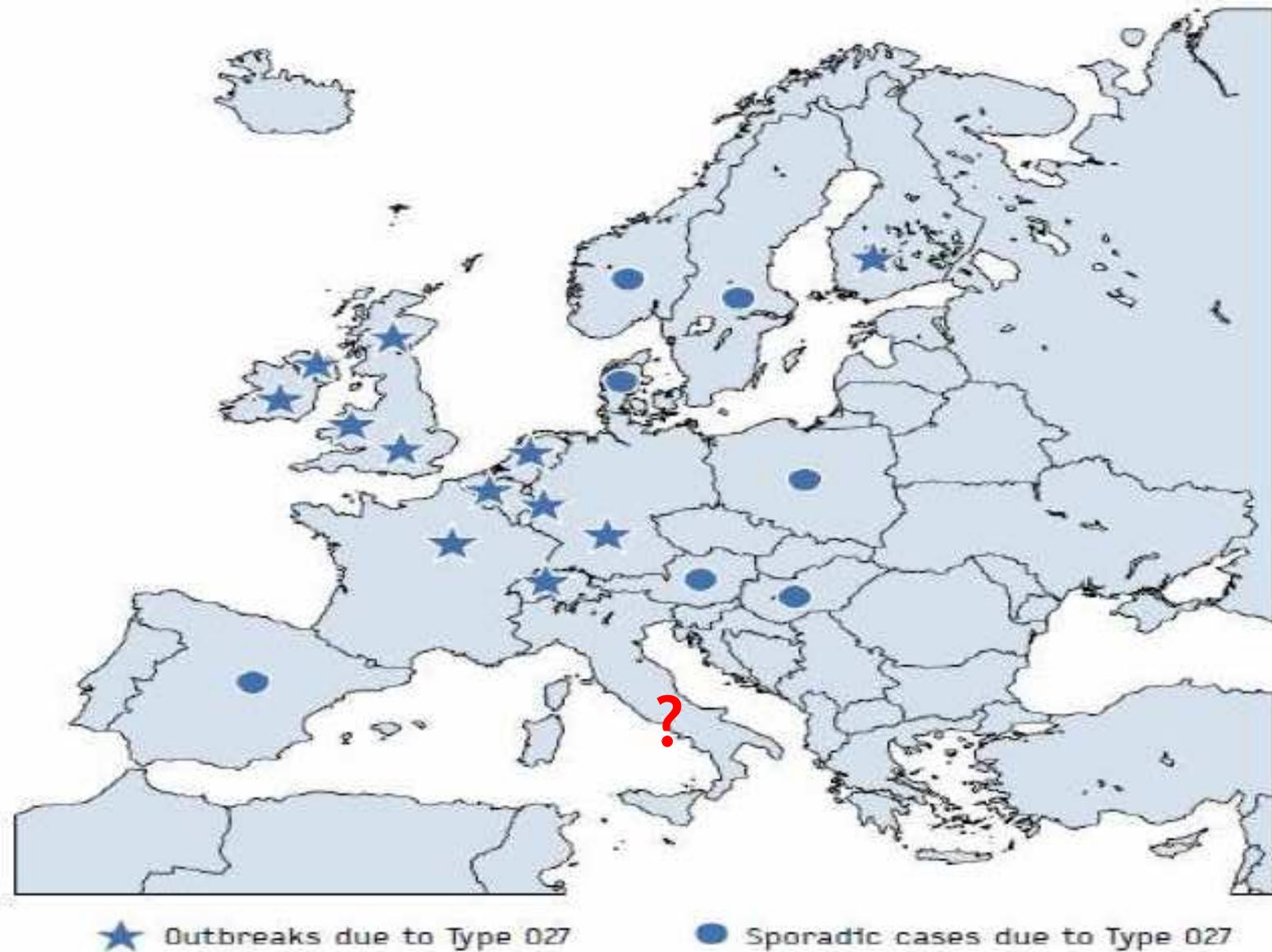
Departments of ¹Medical Microbiology and ²Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Centre, Leiden, ³Center for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, ⁴Department of Medical Microbiology, Maastricht Medical Center, Maastricht, and ⁵Department of Intensive Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

Clin.Infect.Dis. 2008

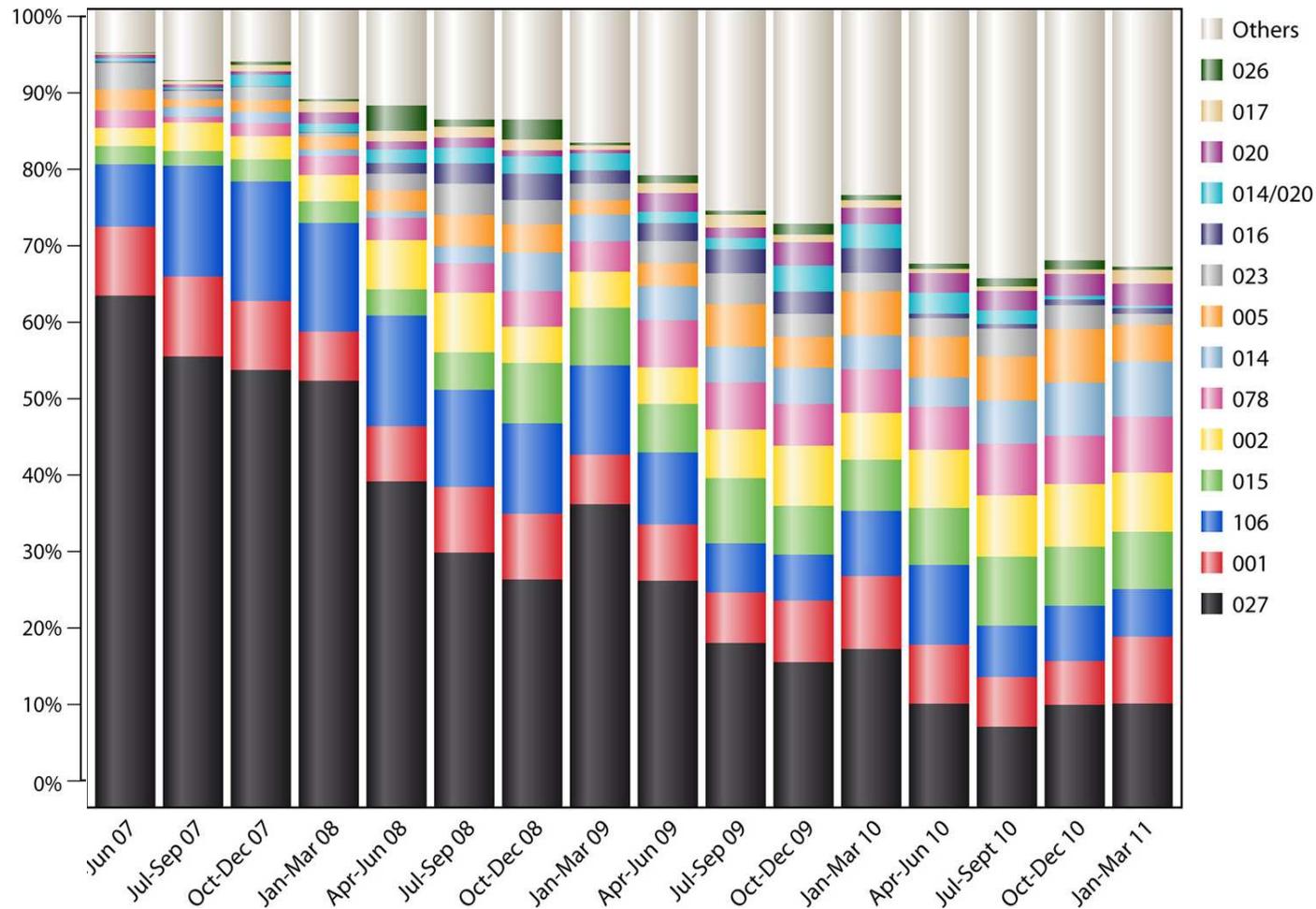
Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

FIGURE

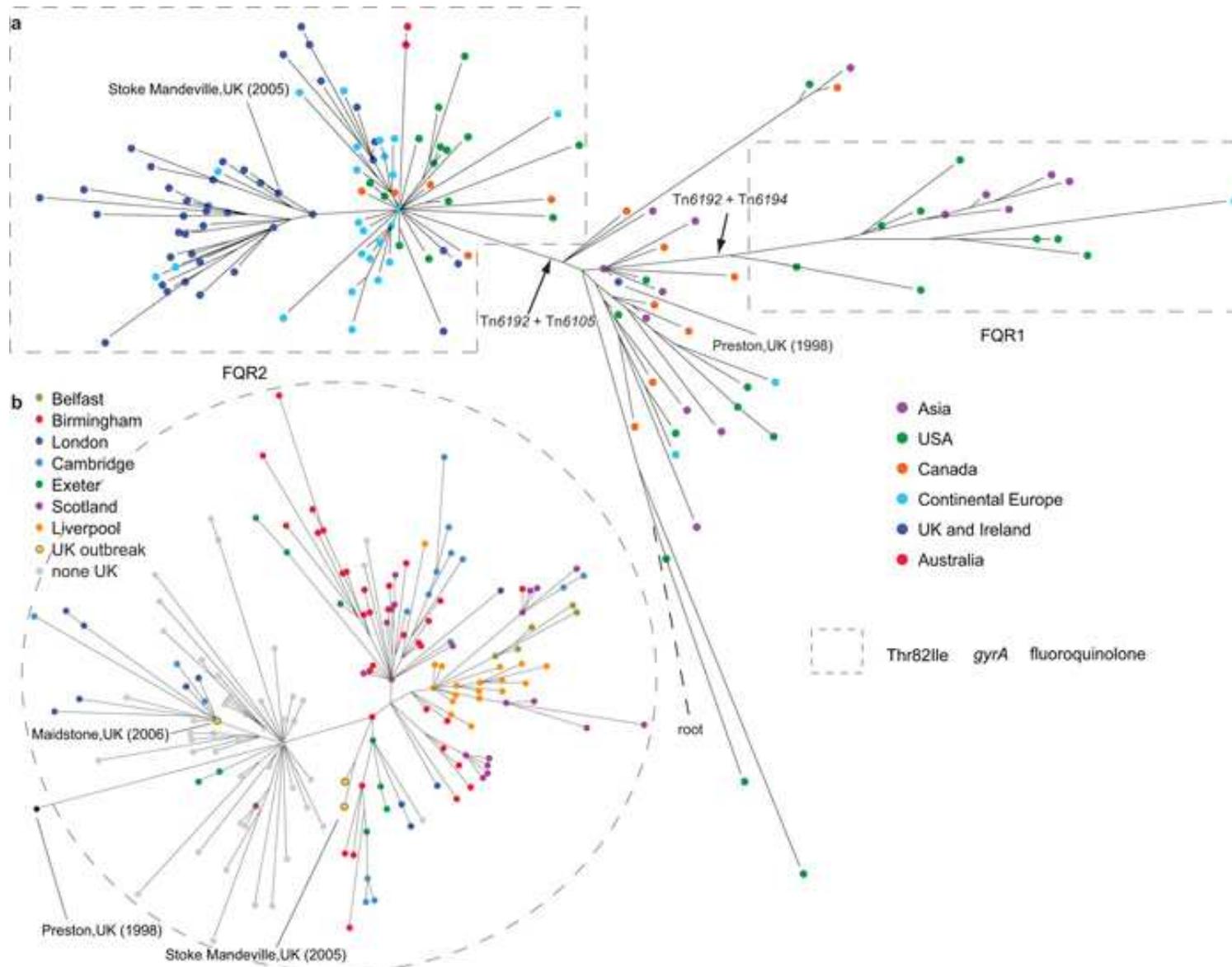
Distribution of *Clostridium difficile* Type 027 by country in Europe* as of June 2008



Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



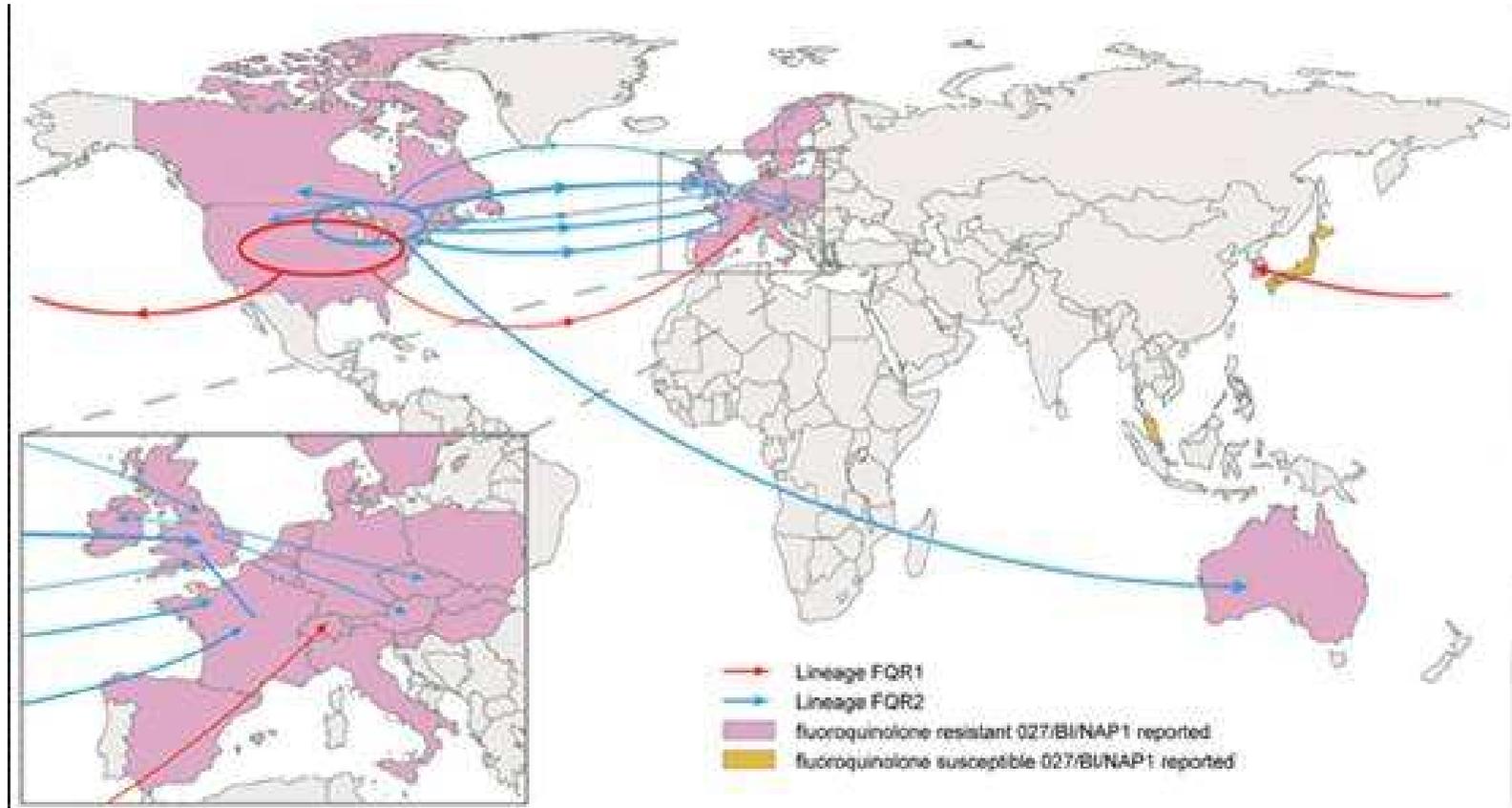
Prevalence of *C. difficile* ribotypes in England, 2007 to 2011.



Phylogeny of *C. difficile* 027/BI/NAP1 based on core genome SNPs. Colored nodes indicate the geographical source of the isolates.

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Transmission events inferred for epidemic *C. difficile* 027/B1/NAP1. Global spread of lineages FQR1 (red arrows) and FQR2 (blue arrows) inferred from phylogeographic analysis. Global map demonstrating the countries where fluoroquinolone-resistant (pink) and fluoroquinolone-sensitive (yellow) *C. difficile* 027/B1/NAP1 has been reported.



[Nat Genet.](#) 2013 Jan;45(1):109-13. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. [He M,](#) et al.
Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici



Situazione del *C.difficile* NAP1/027 in Italia

A.O.U. S.Giovanni Battista di Torino, San Raffaele di Milano:
studi di ribotyping, PCR per tossina A, B, binaria, sequenziamento gene *tcdC*

Su 259 ceppi isolati: 8 ceppi *C.difficile* ribotype 027,
7 ceppi *C.difficile* ribotype 078

CID Vol.50, 2010

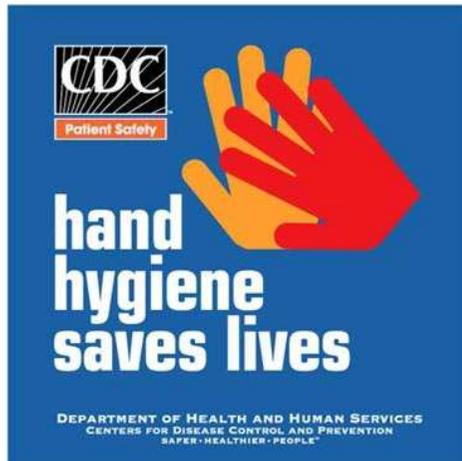
Puerpere
Bambini

Alta incidenza di casi di origine comunitaria, anche in soggetti privi dei noti fattori di rischio per l'infezione, compresi bambini di età inferiore ai due anni, adulti giovani e puerpere

Il riscontro in ambito veterinario di ceppi ipervirulenti nel bestiame (bovini, suini) e negli animali di compagnia (cani, gatti) potrebbe indicare la presenza di un reservoir che alimenta i sempre più frequenti casi di origine comunitaria

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici

Le modificazioni epidemiologiche della patologia devono, però, stimolare anche dei cambiamenti nell'approccio e nella gestione dei casi:



introduzione di programmi di controllo integrati che associano più strategie basate sul controllo delle vie di trasmissione (lavaggio delle mani, isolamento del paziente, precauzioni per i contatti) e sulla riduzione del rischio di esposizione (accurata scelta di disinfettanti ambientali, di presidi sanitari e di politiche che limitino l'uso di antibiotici ad ampio spettro)

Bomers M K et al. BMJ 2012. Detection dog on hospital ward



valutazione delle eventuali forme di infezione da *C.difficile* acquisite in comunità e in popolazioni non considerate tradizionalmente a rischio

Le infezioni da *Clostridium difficile*: epidemiologia e aspetti microbiologici