



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica  
Corso di Laurea in Biologia Biomedica e Biomolecolare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

ALGORITMI DIAGNOSTICI NELLE INFEZIONI DA *CLOSTRIDIOIDES*  
*DIFFICILE* ED APPROCCIO ALL'APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA

RELATORE:

Prof.ssa Elisa GAMALERO CORRELATORE:

Dr. Andrea ROCCHETTI

CANDIDATO:

Christian NANI

20038528

Anno Accademico 2025-2026

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

"Amedeo Avogadro"



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica  
Corso di Laurea in Biologia Biomedica e Biomolecolare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

ALGORITMI DIAGNOSTICI NELLE INFEZIONI DA *CLOSTRIDIODES*  
*DIFFICILE* ED APPROCCIO ALL'APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA

RELATRICE:

Prof.ssa Elisa GAMALERO

CORRELATORE:

Dr. Andrea ROCCHETTI

CANDIDATO:

Christian NANI

20038528

Anno Accademico 2025-2026

*Alla Mia Famiglia,  
porto sicuro lungo il mio cammino.  
E a me stesso,  
per aver mantenuto la rotta con tenacia, nonostante maree incerte.*

## Sommario

Sommario.....	4
1.INTRODUZIONE.....	6
1.1 Significatività epidemiologica dell'infezione da <i>Clostridioides difficile</i> .....	6
1.2 Proprietà microbiologiche del <i>Clostridioides difficile</i> .....	8
1.2.1 Genomica e plasticità genetica del <i>C. difficile</i> .....	8
1.3 La sporulazione: struttura, resistenza e ruolo nella patogenesi .....	9
1.3.1 Disbiosi intestinale e perdita della resistenza antimicrobica alla colonizzazione .....	11
1.3.2 Metabolismo batterico e regolazione della sporulazione .....	13
1.4 Regolazione genetica e locus di patogenicità (PaLoc) .....	13
1.4.1 Tossine TcdA e TcdB: struttura molecolare e meccanismo d'azione .....	14
1.4.2 Attività enzimatica delle tossine.....	15
1.4.3 Tossina binaria CDT e ceppi ipervirulenti.....	15
1.4.4 Danno epiteliale e attivazione della risposta infiammatoria .....	15
1.4.5 Alterazione della barriera intestinale e progressione del danno mucosale.....	16
1.5 Risposta immunitaria nella CDI .....	17
1.5.1 Risposta immunitaria innata.....	17
1.5.2 Risposta immunitaria adattativa e risposta contro le recidive.....	17
1.5.3 Immunità protettiva e colonizzazione asintomatica .....	18
1.6 Diagnosi di laboratorio della CDI.....	18
1.7 Terapia antibiotica della CDI secondo le linee guida internazionali .....	20
1.7.1 Gestione delle recidive .....	22
1.7.2 Nuove strategie terapeutiche emergenti .....	23
1.8 Trapianto di microbiota fecale e modulazione immunitaria .....	23
1.9 Antimicrobial Stewardship e impatto economico dell'infezione da <i>C. difficile</i> .....	24

1.10	Appropriatezza prescrittiva clinica e progetto “Less is more” .....	27
1.11	“Il microbiota, la nonna e l’UPO” e il microbiota intestinale .....	29
2.	SCOPO DELLA TESI.....	33
3.	MATERIALI E METODI.....	35
3.1	Sede dello studio e contesto sperimentale .....	35
3.2	Accettazione, gestione e preparazione dei campioni biologici .....	35
3.3	Biosicurezza: utilizzo della cappa di sicurezza biologica e DPI .....	36
3.4	Controllo di qualità e analisi dati .....	37
3.4.1	Controllo qualità e calibrazione degli strumenti .....	37
3.4.2	Gestione, tracciabilità e protezione dei dati .....	37
3.4.3	Analisi statistica dei dati e limiti metodologici .....	38
3.5	Prelievo del campione.....	38
3.6	Sistema Relab: descrizione e flusso operativo.....	39
3.6.1	Componenti Relab.....	39
3.6.2	Analisi e interpretazione dati.....	41
3.7	Sistema GeneXpert .....	42
3.8	Metodiche per la valutazione della correttezza prescrittiva .....	46
4.	RISULTATI E ANALISI DATI.....	48
4.1	Valutazione Diagnostica .....	48
4.2	Valutazione Appropriatezza prescrittiva .....	52
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	57
6.	BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA .....	64
7.	RINGRAZIAMENTI.....	67

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 Significatività epidemiologica dell'infezione da *Clostridioides difficile*

Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha osservato un cambiamento significativo nell'epidemiologia dell'infezione da *Clostridioides difficile* (CDI). Storicamente questa patologia era considerata prevalentemente una infezione nosocomiale, mentre al giorno d'oggi si assiste a un aumento dei casi acquisiti in comunità (Community-Associated CDI). Questo fenomeno suggerisce che i meccanismi di diffusione dell'agente patogeno siano più complessi rispetto alla considerazione che si aveva in passato, coinvolgendo fattori ambientali, alimentari e animali. Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato la presenza di *C. difficile* anche in ambienti extra-ospedalieri, come allevamenti, prodotti alimentari e superfici ambientali. È proprio la capacità del batterio di formare spore altamente resistenti che contribuisce alla sua sopravvivenza in contesti molto diversi, facilitando la sua diffusione su scala globale. Un altro elemento che ha contribuito all'aumento dell'incidenza è rappresentato dall'invecchiamento della popolazione. I pazienti anziani risultano maggiormente suscettibili alla CDI a causa della presenza di comorbidità, una frequente esposizione ad antibiotici e ricoveri ospedalieri ripetuti.

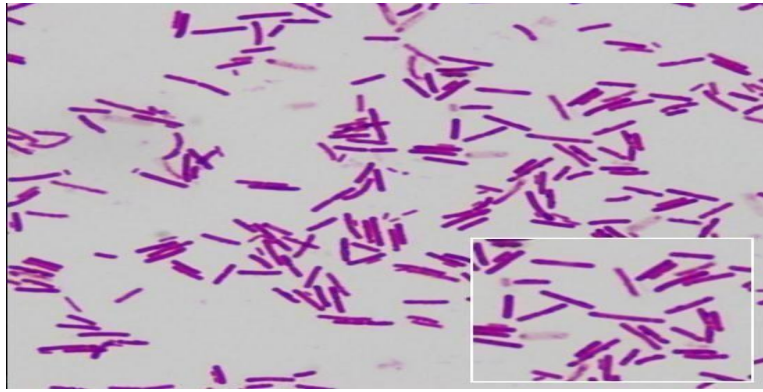
Al giorno d'oggi l'infezione da *Clostridioides difficile* (CDI) rappresenta un paradigma di interazione complessa tra microbiota, agente patogeno e sistema immunitario. Viene considerata uno dei principali fattori eziologici di diarrea infettiva, associata ad assistenza sanitaria globale. Può dare infezioni più o meno severe, con sintomatologia che vanno da semplici scariche diarroiche fino alla colite ulcerosa, colite pseudomembranosa, con placche giallastre sulla mucosa intestinale. In casi più gravi può peggiorare fino a condizione di disidratazione grave, sanguinamento intestinale e perforazione del colon. In ambito clinico rappresenta una problematica di primaria importanza dal punto di vista ospedaliero e territoriale (Seekatz et al., 2025; Chilton et al., 2025). Negli ultimi due decenni l'incidenza delle infezioni da *C. difficile* ha evidenziato un incremento notevole, correlato da una aumentata diffusione di ceppi ipervirulenti, con elevata capacità tossigenica e resistenza antimicrobica, e un conseguente aumento dell'utilizzo e somministrazione di antibiotici ad ampio spettro (Chilton et al., 2025; Dureja et al., 2022).

<b>Categoria</b>	<b>Fattore di rischio</b>	<b>Meccanismo</b>
Terapia farmacologica	Uso antibiotici	Alterazione microbiota
Farmaci	Inibitori pompa protonica	Alterazione pH gastrico
Età	>65 anni	Riduzione immunità
Ricovero ospedaliero	Degenza prolungata	Maggiore esposizione spore
Comorbidità	Immunosoppressione	Ridotta risposta immune

**Tabella 1:** *Principali fattori di rischio per CDI*

(Fonte: McDonald et al., 2018; Dureja et al., 2022)

L'infezione da *C. difficile* è tradizionalmente considerata un'infezione di carattere nosocomiale, ossia prevalente in soggetti anziani sottoposti a terapie antibiotiche prolungate o con comorbosità. Tuttavia, viene riconosciuta anche in ambito comunitario, andando a coinvolgere e interessare pazienti senza ospedalizzazione recente o privi di esposizione antibiotica documentata. Dal punto di vista geografico ed epidemiologico, in Europa e negli Stati Uniti d'America la CDI riguarda centinaia di migliaia di casi annui, con un impatto economico significativo legato a diverse dinamiche, tra le quali citiamo la necessità di isolamento da parte dei pazienti, il prolungamento delle degenze, l'utilizzo di procedure diagnostiche ripetute e la somministrazione di terapie specifiche (Chilton et al., 2025; Chen et al., 2026). La sintomatologia clinica della CDI è eterogenea. Nelle forme lievi presenta dolore addominali e altri sintomi sistemici, associati a scariche diarroiche acquose; nei casi più severi possono comparire stati febbrili, colite pseudomembranosa, leucocitosi marcata, perforazione intestinale fino ad arrivare a shock settico (Wen et al., 2026; Alam et al., 2024). Un aspetto degno di nota è rappresentato dall'elevata frequenza di recidive: circa il 20-30% dei pazienti sviluppa un nuovo episodio in seguito al primo trattamento, mentre oltre il 40-50% nei pazienti con episodi multipli precedenti (Vitiello et al., 2024; Cosimato et al., 2026). Questa propensione verso fenomeni recidivi suggerisce un insieme di fattori eziologici (Tabella 1) che possono agire in maniera simultanea e congiunta, come ad esempio la persistenza sporale, una risposta immunitaria incompleta e l'alterazione del microbiota.



**Figura 1:** Colorazione di Gram di *C. difficile*, con evidenza di bacilli Gram-positivi sporigeni  
(Fonte: Alam et al., 2024.)

## 1.2 Proprietà microbiologiche del *Clostridioides difficile*

Il *Clostridioides difficile* è un batterio Gram positivo, mobile, sporigeno e anaerobio obbligato (Figura 1). Appartiene alla famiglia delle Peptostreptococcaceae (Alam et al., 2024; Awad et al., 2014). Presenta una elevata capacità di sopravvivenza ambientale, grazie alla formazione di endospore metabolicamente inattive, ma altamente resistenti. Un'altra caratteristica peculiare è la sua trasmissibilità marcata. Questo microrganismo è in grado di persistere per periodi prolungati su superfici ambientali, grazie ad una parete cellulare multi-laminare, che conferisce al batterio una protezione contro agenti chimici e fisici. Di conseguenza anche la trasmissione oro-fecale e la contaminazione nosocomiale sono facilitate (Chilton et al., 2025).

Inoltre, l'emergere di ceppi ipervirulenti e multi-resistenti, insieme al tasso di recidiva, rendono necessario un continuo aggiornamento delle strategie terapeutiche e diagnostiche.

In condizioni normali la sua crescita è sotto il controllo degli acidi grassi a catena corta (SCFA), come ad esempio acetato, butirato o propionato. Inoltre, il *C. difficile* può sfruttare a proprio vantaggio l'acido sialico, uno zucchero liberato dal muco intestinale.

### 1.2.1 Genomica e plasticità genetica del *C. difficile*

Negli ultimi anni lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento genomico ha permesso di approfondire in modo significativo la struttura genetica di *C. difficile*. Il genoma di questo microrganismo presenta una notevole plasticità genetica, caratterizzata dalla presenza di numerosi elementi mobili, tra cui trasposoni, plasmidi e sequenze di inserzione.

Questi elementi genetici mobili svolgono un ruolo fondamentale nell'evoluzione del patogeno, consentendo il trasferimento orizzontale di geni associati alla virulenza e alla resistenza

antimicrobica. La capacità di acquisire nuovi determinanti genetici rappresenta uno dei fattori che contribuiscono all'emergere di ceppi epidemici e ipervirulenti.

Le analisi di genomica comparativa hanno evidenziato una notevole eterogeneità tra i diversi ribotipi di *C. difficile*, con differenze significative nei profili di virulenza e nei meccanismi di adattamento all'ospite.

### 1.3 La sporulazione: struttura, resistenza e ruolo nella patogenesi

Un aspetto particolarmente rilevante nello studio e ricerca del *C. difficile* è rappresentato dalla sua capacità di alternare due stati fisiologici distinti: la forma vegetativa metabolicamente attiva e la forma sporale dormiente. Questo meccanismo consente al batterio di adattarsi a condizioni ambientali variabili, garantendo la propria sopravvivenza anche in contesti ostili.

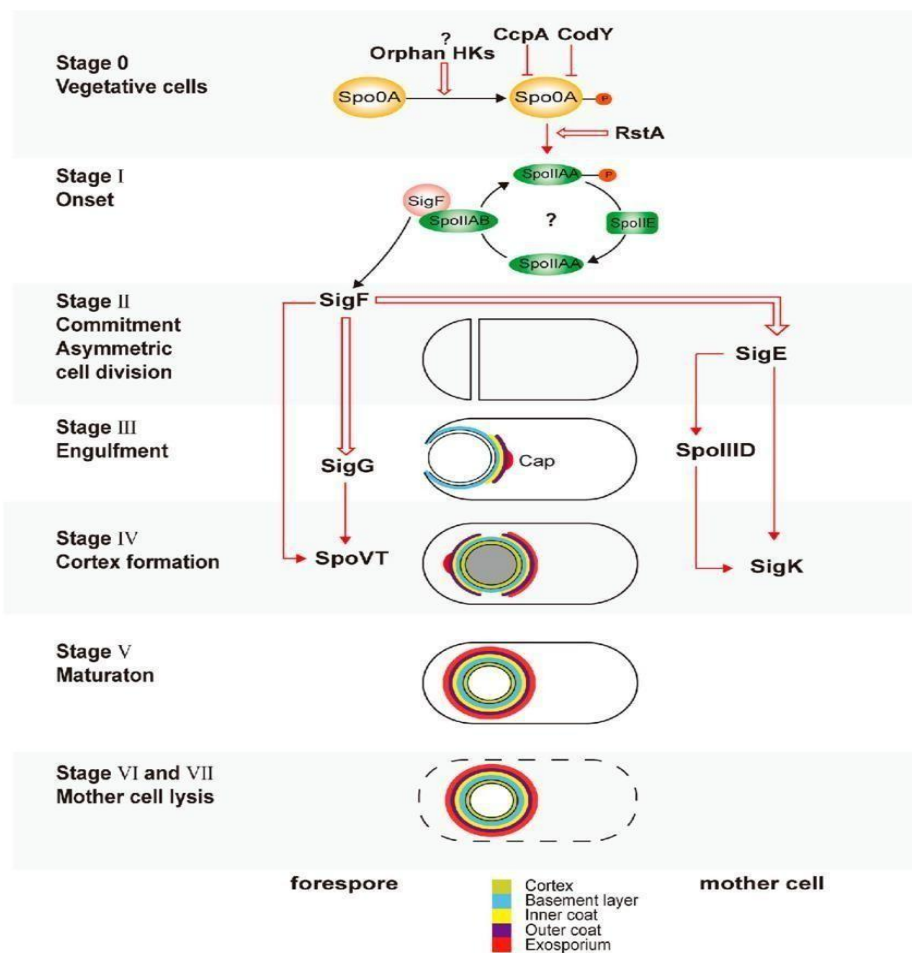
Le spore di *C. difficile* presentano una struttura altamente specializzata composta da diversi strati protettivi, tra cui la corteccia formata da peptidoglicani, e un rivestimento proteico esterno chiamato "coat". Alcuni ceppi possiedono uno strato addizionale denominato "exosporium", che contribuisce alle capacità di resistenza ambientale e di adesione alle superfici biologiche.

Dal punto di vista clinico, la presenza delle spore è simbolo di una sfida significativa per il controllo delle infezioni ospedaliere. Le spore possono persistere per settimane o mesi sulle superfici ambientali, favorendo la trasmissione nosocomiale. Le superfici frequentemente contaminate includono letti ospedalieri, maniglie delle porte, servizi igienici e dispositivi medici.

Il ruolo dell'ambiente nella diffusione dell'infezione ha portato allo sviluppo di strategie di controllo sempre più rigorose, che includono l'utilizzo di disinfettanti sporicidi e procedure di sanificazione ambientale mirate.

Le endospore batteriche, una volta ingerite, attraversano l'ambiente acido gastrico rimanendo indenni e raggiungono l'intestino tenue, dove in presenza di sali biliari specifici (ad esempio il taurocolato) ne viene indotta la germinazione, modulata dal metabolismo dei sali biliari secondari (prodotti da batteri commensali) e dalla composizione del microbiota intestinale (Dureja et al., 2022; Cheng et al., 2023). In particolare, un microbiota integro garantisce la conversione dei sali biliari da primari a secondari, esercitando un'azione inibitoria sulla germinazione sporale. Al contrario una condizione di disbiosi favorisce il passaggio della spora nella sua forma vegetativa attiva (Figura2). Questo processo è dovuto ad alterazioni nel metabolismo biliare, con una inadeguata conversione dei sali biliari. La disponibilità di molecole promotrici della germinazione sporale subisce un incremento significativo (Dureja et al., 2022). In seguito a germinazione, la spora vegetativa attiva di *C. difficile* ha bisogno di sopravvivere in un ambiente intestinale complesso e immunologicamente attivo. Questa

problematica viene risolta grazie all'interazione coordinata tra segnali metabolici, risposta dell'organismo ospite e fattori di virulenza. Inoltre, l'ancoraggio alla mucosa intestinale è mediato da proteine di superficie e dalle adesine. Un ulteriore aspetto da sottolineare è rappresentato dall'eccezionale plasticità genomica. L'espressione di geni di virulenza è stata correlata, in studi recenti, allo stato metabolico del batterio stesso. Di conseguenza la trascrizione dei geni tossinici è up-regolata dalla disponibilità dei nutrienti, dalla presenza di specifici amminoacidi, i quali favoriscono indirettamente l'espressione tossinica attraverso dei regolatori globali, e dalla concentrazione di glucosio (Seekatz et al., 2025; Chilton et al., 2025). Quindi l'integrazione tra virulenza e metabolismo dimostra la capacità di persistenza del *C. difficile*, massimizzando la sua fitness.



**Figura 2:** Struttura sporale e processo di sporulazione di *C. difficile* (Fonte: Smits WK et al., 2016)

Per quanto riguarda il fenomeno della recidiva della CDI, si osservano due principali meccanismi:

1. Persistenza sporale e nuova germinazione;

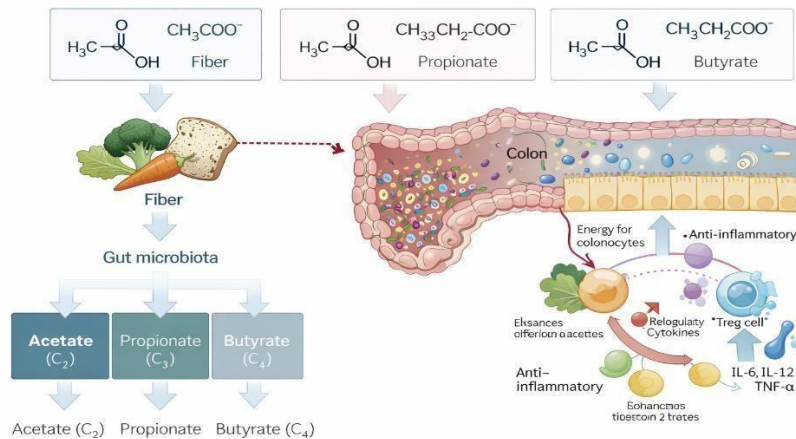
## 2. Rifallimento della clearance immunologica.

Le spore sono in grado di persistere nell'intestino anche in seguito a trattamento antibiotico efficace contro la forma vegetativa. La ricomparsa dei sintomi, in presenza di un microbiota ancora alterato, può essere ricondotta a una nuova germinazione sporale.

Allo stesso modo una riesposizione alle tossine può determinare un nuovo episodio clinico, in soggetti con risposta immunitaria incompleta (Wang et al., 2024). Lo studio e la comprensione dei meccanismi immunologici e microbiologici alla base della recidiva microbica hanno permesso un orientamento verso strategie terapeutiche innovative, tra cui l'utilizzo di anticorpi monoclonali e interventi di modulazione del microbiota intestinale.

### 1.3.1 Disbiosi intestinale e perdita della resistenza antimicrobica alla colonizzazione

Il microbiota intestinale può essere definito come un ecosistema complesso costituito da trilioni di microrganismi. L'interazione dinamica tra essi e l'ospite permette il mantenimento dell'omeostasi immunologica e metabolica. In condizione fisiologiche, come già anticipato in precedenza, il microbiota possiede la funzione di resistenza alla colonizzazione, sfavorendo la crescita e lo sviluppo di agenti patogeni opportunisti, grazie a meccanismi competitivi e processi metabolici (Seekatz et al., 2025; Chilton et al., 2025). Tuttavia, diversi fattori epigenetici, come ad esempio fattori comportamentali o fattori ambientali, possono influenzarne la composizione. Ad esempio, studi epidemiologici hanno evidenziato una stretta correlazione tra il fumo di sigaretta e la colonizzazione asintomatica da *C. difficile*, suggerendo che lo stile di vita può determinare alterazioni metaboliche, le quali a loro volta modulano il rischio di acquisizione dell'agente patogeno (Chen et al., 2026). Un ulteriore fattore che è in grado di alterare la composizione e l'azione del microbiota intestinale è rappresentato dall'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro. Determina una riduzione delle popolazioni commensali protettive, tra le quali si ricordano i batteri produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA). Questi acidi grassi, in particolare il butirato, il propionato e acetato, svolgono un ruolo principale nel mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale, nonché nella modulazione di risposte immunitarie mucosali (Figura 3). Sebbene la terapia antibiotica rappresenti ancora il cardine del trattamento, al contempo costituisce uno dei maggiori fattori di rischio per l'insorgenza dell'infezione, favorendo una condizione di disbiosi per la colonizzazione del patogeno.



**Figura 3:** SCFA: produzione, struttura chimica e funzione intestinale (Fonte: Seekatz et al., 2025)

Il *C. difficile* ha sviluppato progressivamente resistenza verso diverse classi di antibiotici, tra cui macrolidi, clindamicina, fluorochinoloni, metronidazolo e vancomicina (Dureja et al., 2022; Wickramage et al., 2021). Si è assistito a una manifestazione di ceppi multi-drug resistant (MDR), la quale ha contribuito alla diffusione di ribotipi epidemici, caratterizzati da un'aumentata capacità di trasmissione e severità clinica.

I meccanismi di resistenza messi in atto dal *C. difficile* sono riconducibili a tre categorie principali (Dureja et al., 2022; Wickramage et al., 2021):

### 1. Modificazione del sito bersaglio dell'antibiotico

Mutazioni nei geni che codificano per enzimi bersaglio degli antibiotici (ad esempio DNA girasi nel caso dei fluorochinoloni) possono ridurre l'affinità del farmaco, causando perdita di efficacia.

### 2. Acquisizione di geni di resistenza

Il trasferimento genico orizzontale consente l'acquisizione di determinanti di resistenza da altri microrganismi intestinali. Questo trasferimento avviene attraverso elementi genetici mobili, come plasmidi e trasposoni.

### 3. Meccanismi di efflusso o inattivazione del farmaco

Sistemi di efflusso contribuiscono alla diminuzione della concentrazione intracellulare del farmaco, mentre in alcuni casi si osservano meccanismi enzimatici che ne riducono l'attività.

In ambito clinico, la resistenza del patogeno ai fluorochinoloni ha avuto un impatto determinante nella diffusione del ribotipo 027, considerato responsabile di rilevanti epidemie ospedaliere all'inizio degli

anni 2000. È infatti associato a una maggior produzione tossinica e a quadri clinici più severi (Wickramage et al., 2021).

### 1.3.2 Metabolismo batterico e regolazione della sporulazione

La sporulazione rappresenta un processo biologico altamente regolato che consente al *C. difficile* di adattarsi a condizioni ambientali sfavorevoli (Smits et al., 2016). Questo processo non è esclusivamente una risposta passiva allo stress ambientale, ma è regolato da complessi network genetici e metabolici che integrano segnali provenienti dall'ambiente circostante.

Diversi studi hanno dimostrato che la disponibilità di nutrienti gioca un ruolo centrale nel controllo della sporulazione. In condizioni di abbondanza di fonti energetiche, il batterio tende a mantenere la forma vegetativa metabolicamente attiva. Al contrario, quando l'ambiente diventa povero di nutrienti o caratterizzato da condizioni ostili, vengono attivati specifici pathway regolatori che inducono la formazione delle spore.

Uno dei principali regolatori della sporulazione nei batteri appartenenti al genere *Clostridioides* è rappresentato dal fattore di trascrizione Spo0A, che agisce come un vero e proprio interruttore molecolare capace di coordinare l'attivazione dei geni coinvolti nel processo di sporulazione (Smits et al., 2016). L'attivazione di Spo0A avviene attraverso un sistema di fosforilazione che integra diversi segnali ambientali, tra cui la disponibilità di nutrienti, la densità batterica e la presenza di metaboliti prodotti dal microbiota intestinale.

Nel contesto dell'infezione da *C. difficile*, la regolazione della sporulazione assume un ruolo particolarmente rilevante per la persistenza del patogeno nell'ambiente ospedaliero. Le spore sono infatti estremamente resistenti ai comuni disinfettanti e possono sopravvivere su superfici ambientali per lunghi periodi di tempo. Questo fenomeno contribuisce alla trasmissione nosocomiale dell'infezione e rappresenta una delle principali sfide per il controllo delle infezioni ospedaliere.

## 1.4 Regolazione genetica e locus di patogenicità (PaLoc)

Il locus di patogenicità (PaLoc) può essere definito come una regione genomica di circa 19,6 mila basi, contenente i geni codificanti per le due tossine TcdA e TcdB, oltre ai geni regolatori coinvolti nell'espressione delle tossine stesse (Wen et al., 2025; Awad et al., 2014). Il PaLoc rappresenta il principale determinante molecolare della virulenza del *C. difficile*, e comprende cinque geni principali:

- tcdA, codificante la tossina A;
- tcdB, codificante la tossina B;

- tcdR, codificante un fattore sigma alternativo positivo;
- tcdC, considerato un regolatore negativo;
- tcdE, implicato nel rilascio delle tossine.

Il fattore sigma codificato dal gene tcdR permette la trascrizione dei geni tossinici andando a legare l'RNA polimerasi, permettendo l'avvio dell'espressione genica. Questo fattore detiene una regolazione positiva sulla produzione tossinica, causata da una risposta a segnali metabolici intracellulari e ambientali (Seekatz et al., 2025; Wen et al., 2025). Al contrario, il gene tcdC rappresenta il principale fattore regolatore negativo dell'espressione tossinica; di conseguenza sono state osservate mutazioni o delezioni di tcdC in associazione con ceppi produttori di tossina, come ad esempio il ribotipo epidemico 027 (Wen et al., 2025; Awad et al., 2014). La regolazione del locus di patogenicità è legata in modo stretto con il metabolismo batterico. Infatti, la disponibilità di macronutrienti (carboidrati e amminoacidi su tutti) modula l'espressione delle tossine attraverso procedimenti di repressione catabolica. In presenza di ambiente disbiotico intestinale, una carenza di nutrienti sopracitati porta all'aumento della produzione tossinica. Questo dimostra che l'espressione di virulenza da parte del batterio rappresenta una strategia adattativa a stress metabolico (Seekatz et al., 2025; Chilton et al., 2025).

#### 1.4.1 Tossine TcdA e TcdB: struttura molecolare e meccanismo d'azione

Le tossine TcdA e TcdB appartengono alla famiglia delle “Large Clostridial Toxins (LCTs) e rappresentano i principali mediatori del danno mucosale nelle infezioni da *C. difficile* (Wen et al., 2025; Alam et al., 2024). Sono proteine di grandi dimensioni (308 kDa per TcdA e 270kDa per TcdB) che possiedono diversi domini funzionali:

1. Dominio centrale di traslocazione;
2. Dominio C-terminale di legame al recettore;
3. Dominio auto-proteasico;
4. Dominio N-terminale glucosiltransferasico

Le tossine vanno a legarsi a recettori cellulari specifici, in particolare ai proteoglicani di membrana e ai membri della famiglia delle proteine “Frizzled”. Questo legame innesca un processo di endocitosi mediata da clatrina, con conseguente formazione di endosomi contenenti all'interno la tossina (Alam et al., 2024). L'endosoma va incontro a un processo di acidificazione, subendo un cambiamento conformazionale nella tossina, cosicché il dominio di trasloca si inserisce nella membrana endosomiale, determinando la formazione di un poro attraverso il quale viene permesso il trasferimento del dominio catalitico nel citoplasma cellulare.

#### 1.4.2 Attività enzimatica delle tossine

Il dominio glucosiltransferasico utilizza UDP-glucosio come donatore per trasferire un residuo glucosilico su Rho-GTPasi specifiche (RhoA, Rac1, Cdc42). In sostanza questa è una modificazione post-traduzionale che inattiva, in maniera irreversibile, le GTPasi, impedendo la loro conseguente interazione con effettori intracellulari (Wen et al., 2025; Alam et al., 2024).

Le Rho-GTPasi sono considerate una componente fondamentale per il mantenimento dell'architettura citoscheletrica e per l'integrità delle giunzioni cellulari serrate. L'inattivazione determina:

- Disorganizzazione delle fibre di actina;
- Aumento della permeabilità para-cellulare;
- Perdita delle tight junction;
- Arresto del ciclo cellulare;
- Attivazione di processi apoptotici.

N.B. La tossina B è reputata la tossina predominante nella patogenesi umana, in quanto mostra una maggiore potenza citotossica rispetto alla tossina A (Alam et al., 2024).

#### 1.4.3 Tossina binaria CDT e ceppi ipervirulenti

In biologia esiste una terza tossina, prodotta da alcuni ceppi di *C. difficile*, soprattutto quelli associati a epidemie ospedaliere, nota come “Clostridioides difficile transferase” (CDT) (Alam et al., 2024; Awad et al., 2014). Questo prodotto tossigenico è una tossina binaria composta da due subunità:

- CDTa, subunità con attività ADP-ribosiltransferasica;
- CDTb, responsabile del legame alla superficie cellulare.

La subunità CDTa modifica l'actina G attraverso una reazione di ADP-ribosilazione, inducendo la depolimerizzazione delle fibre di actina, con riorganizzazione del citoscheletro. Viene favorita e facilitata la formazione di protrusioni cellulari microtubulo-dipendenti, andando ad aumentare l'adesione batterica alla superficie epiteliale della cellula (Alam et al., 2024). La presenza della CTD è stata associata in ambito clinico ad un incremento del rischio di recidiva.

#### 1.4.4 Danno epiteliale e attivazione della risposta infiammatoria

Un'azione sinergica delle tossine può causare una compromissione della barriera epiteliale intestinale. La disgregazione delle giunzioni serrate favorisce la traslocazione di antigeni e agenti microbici nel compartimento sottomucoso, segnando l'inizio di una intensa azione infiammatoria (Wang et al., 2024; Alam et al., 2023). Le tossine attivano l'inflammasoma NLRP3, cioè un complesso multiproteico intracellulare, coinvolto nella maturazione delle citochine proinfiammatorie IL-1 $\beta$  e

IL18. Esse vengono rilasciate contemporaneamente ad un reclutamento massivo di neutrofili e alla formazione di pseudomembrane, costituite da fibrina, cellule infiammatorie e detriti cellulari (Wang et al., 2024). Proprio la risposta neutrofilica, sebbene considerata fondamentale per il contenimento dell'infezione, gioca un ruolo importante per il danno mucosale e per la severità clinica delle forme più severe e fulminanti, attraverso il rilascio di proteasi, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e NETs ("Neutrophil extracellular traps"). L'azione sinergica di questi fattori contribuisce alla sintomatologia sistemica tipica, tra cui stati febbrili (Wang et al., 2024; Alam et al., 2023).

#### 1.4.5 Alterazione della barriera intestinale e progressione del danno mucosale

La compromissione della barriera epiteliale intestinale rappresenta uno degli eventi chiave nella patogenesi della CDI (Leffler & Lamont, 2015). Le tossine prodotte da *C. difficile* determinano una profonda alterazione dell'architettura cellulare dell'epitelio intestinale, interferendo con l'organizzazione del citoscheletro e con l'integrità delle giunzioni intercellulari.

In condizioni fisiologiche, le cellule epiteliali intestinali sono unite tra loro attraverso complessi sistemi di giunzioni serrate (tight junctions), che regolano la permeabilità della barriera intestinale. Le tossine TcdA e TcdB sono in grado di destabilizzare queste strutture, causando un aumento della permeabilità paracellulare e favorendo il passaggio di antigeni e microrganismi nel compartimento sottomucoso (Leffler & Lamont, 2015).

Questo processo determina l'attivazione di una risposta immunitaria locale caratterizzata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie e dal reclutamento di cellule immunitarie. L'infiltrazione neutrofilica rappresenta una delle caratteristiche istopatologiche più tipiche della colite associata a *C. difficile*. Con il progredire del danno epiteliale, la mucosa intestinale può sviluppare lesioni caratteristiche note come pseudomembrane, costituite da fibrina, cellule infiammatorie e detriti cellulari. Queste strutture rappresentano un segno distintivo della colite pseudomembranosa e sono associate alle forme più severe di infezione.

Per quanto riguarda il concetto di variabilità genetica, le tossine TcdA e TcdB rappresentano i principali fattori di virulenza di *C. difficile*; tuttavia, studi recenti hanno evidenziato una significativa variabilità genetica nei geni che codificano queste proteine. Questa variabilità può influenzare l'attività biologica delle tossine e la severità del quadro clinico.

Le analisi molecolari hanno identificato diverse varianti alleliche dei geni tossinici, associate a differenze nella capacità citotossica e nella risposta immunitaria dell'ospite. Alcuni ceppi presentano mutazioni che determinano una maggiore produzione di tossine, contribuendo allo sviluppo di infezioni più gravi.

## 1.5 Risposta immunitaria nella CDI

### 1.5.1 Risposta immunitaria innata

La risposta immunitaria innata rappresenta la prima linea di difesa dell'ospite contro *C. difficile*, svolgendo un ruolo chiave nella determinazione dell'entità del danno tissutale e della severità del quadro clinico (Wang et al., 2024; Alam et al., 2023). In un primo momento le tossine TcdA e TcdB esercitano un'azione citotossica diretta sulle cellule epiteliali, ma in secondo luogo attivano i recettori per il riconoscimento del pattern molecolare (PRRs), tra i quali si possono osservare i Toll-like receptors (TLRs). Questa interazione tossine-recettori induce l'attivazione di pathway di segnalazione intracellulari, quali Nf-kb, con una produzione di citochine pro-infiammatorie tra cui TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Wang et al., 2024). L'IL-8 ha un ruolo cruciale nel reclutamento dei neutrofili nella mucosa intestinale.

Come accennato in precedenza, l'infiltrato neutrofilico osservato nelle forme più severe di CDI è considerato uno dei protagonisti istopatologici nella colite pseudomembranosa. Anche i macrofagi intestinali e le cellule dendritiche sono attori principali nella risposta innata, in quanto permettono la fagocitosi di antigeni batterici, presentandoli al compartimento adattativo.

### 1.5.2 Risposta immunitaria adattativa e risposta contro le recidive

La risposta immunitaria adattativa è il secondo protagonista dell'azione immunitaria contro la CDI, con maggior controllo a lungo termine e prevenzione delle recidive (Wang et al., 2024; Alam et al., 2023).

Diversi studi hanno mostrato che pazienti in grado di sviluppare una risposta anticorpale robusta contro TcdA e TcdB presentano un rischio significativamente inferiore di recidiva. In particolare, i pazienti con migliore prognosi sono risultati quelli con elevati valori di IgG anti-TcdB (Wang et al., 2024). Per quanto riguarda la risposta adattativa vera e propria hanno un ruolo primario le cellule T helper CD4+. Inoltre, la polarizzazione verso sottopopolazione come Th1 e Th17 influenza l'entità dell'infiammazione e la clearance batterica. Le cellule Th17 promuovono il reclutamento neutrofilico producendo IL-17, mentre le cellule T regolatorie (T-reg) sono in grado di limitare un'infiammazione eccessiva.

Sono stati effettuati studi su pazienti sottoposti a trapianto di microbiota fecale, caratterizzati da infezioni ricorrenti. Essi hanno mostrato delle modificazioni transitorie in sottogruppi immunitari periferici, con variazioni nelle cellule NKT e T-reg subito dopo il trattamento, evidenziando un rimodellamento immunitario, indotto proprio dal ripristino dell'eubiosi intestinale (Cosimato et al., 2026). Nuovamente si può constatare la forte bidirezionalità tra microbiota intestinale e sistema

immunitario: l'immunità contribuisce alla stabilità dell'ecosistema microbico intestinale, mentre il microbiota ha un forte impatto nella modulazione della risposta immune.

### 1.5.3 Immunità protettiva e colonizzazione asintomatica

Lo sviluppo di sintomi clinici in pazienti colonizzati da *C. difficile* non è sempre rilevabile. La colonizzazione asintomatica può risultare una condizione frequente, soprattutto in ambienti ospedalieri e nelle strutture di assistenza a lungo termine (Chen et al., 2026).

Questi individui asintomatici tendono a sviluppare risposte immunitarie umorali di rilievo contro le tossine, determinando un ruolo di protezione verso l'immunità adattativa precoce (Wang et al., 2024; Alam et al., 2023). La colonizzazione può favorire un priming immunologico, riducendo il rischio di progressione verso la manifestazione clinica della malattia. Un aspetto negativo dei portatori asintomatici è la loro potenziale capacità di rappresentare un serbatoio epidemiologico per la trasmissione dell'agente patogeno, rendendo complessa la gestione clinica in ambito ospedaliero. Ad oggi le linee guida in vigore non raccomandano lo screening abituale dei soggetti asintomatici, al fine di evitare trattamenti inappropriati e sovradiagnosi non necessarie (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023; Johnson et al., 2021).

## 1.6 Diagnosi di laboratorio della CDI

La recente evoluzione delle tecnologie diagnostiche ha portato allo sviluppo di algoritmi diagnostici sempre più sofisticati per la rilevazione della CDI. L'obiettivo principale di questi algoritmi è quello di bilanciare i parametri di sensibilità e specificità, evitando sia falsi negativi che sovradiagnosi dovute alla colonizzazione asintomatica (McDonald et al., 2018).

Nonostante i notevoli progressi tecnologici nella diagnostica microbiologica, la diagnosi di infezione da *Clostridioides difficile* presenta ancora alcune criticità. Una delle principali problematiche riguarda la distinzione tra colonizzazione asintomatica e infezione clinicamente rilevante.

L'introduzione dei test molecolari ad elevata sensibilità, come i test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), ha migliorato la capacità di rilevare la presenza del patogeno nei campioni fecali. Tuttavia, tali metodiche sono in grado di identificare anche pazienti colonizzati dal batterio ma privi di sintomatologia clinica.

Questo fenomeno può determinare un aumento dei casi di sovradiagnosi, con conseguente rischio di trattamenti antibiotici non necessari. Per questo motivo le linee guida internazionali raccomandano

che i test diagnostici per *C. difficile* vengano eseguiti esclusivamente su pazienti con sintomatologia compatibile con infezione attiva (Johnson et al., 2021).

La corretta interpretazione dei risultati di laboratorio richiede quindi una stretta integrazione tra valutazione clinica e dati microbiologici. In questo contesto, la collaborazione tra clinici e microbiologi rappresenta un elemento fondamentale per garantire una diagnosi accurata e appropriata. Un approccio molto utilizzato nei laboratori di microbiologia clinica prevede l'utilizzo di algoritmi diagnostici a due o tre step. In una prima fase viene eseguito il test per la rilevazione dell'antigene GDH, caratterizzato da elevata sensibilità ma limitata specificità. In seguito, i campioni positivi vengono sottoposti al test immunoenzimatico per la ricerca delle tossine A e B. Infine, nei casi di discordanza tra GDH positivo e tossine negative, viene effettuata una conferma mediante test molecolare NAAT.

La diagnosi della CDI rappresenta un elemento cardine nella gestione della malattia, in quanto ha il compito di distinguere la colonizzazione asintomatica dall'infezione clinica rilevante (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023; Johnson et al., 2021).

Infatti, l'identificazione del microrganismo o dei suoi geni non equivale in maniera necessaria alla manifestazione della malattia attiva; pertanto, l'interpretazione dei test di laboratorio deve sempre avvenire in un contesto clinico. Le linee guida internazionali raccomandano di eseguire il test solamente su pazienti con diarrea significativa, definita come:

- $\geq 3$  evacuazioni non formate nelle 24 ore;
- Assenza di altre cause evidenti di scariche diarroiche (esempio utilizzo di lassativi recenti); -  
Feci di consistenza Bristol 5-6-7.

Anche se portatori del batterio non è raccomandato testare pazienti asintomatici, né ripetere il test entro 7 giorni dal precedente risultato negativo nello stesso episodio clinico, salvo peggioramento o nuova insorgenza di sintomi (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023; Johnson et al., 2021).

La diagnosi laboratoristica si basa attualmente su approcci multipli che combinano test ad alta sensibilità e specificità (Figura 4), grazie a un algoritmo comunemente raccomandato che include (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023):

1. Test per la ricerca dell'antigene GDH (glutammato deidrogenasi): elevata sensibilità;
2. Test immunoenzimatico (EIA) per tossine A/B: buona specificità;
3. NAAT (test di amplificazione degli acidi nucleici): in caso di discordanza.

L'utilizzo dei test NAAT, nonostante l'elevata sensibilità, può determinare sovradiagnosi in presenza di colonizzazione asintomatica, se non accompagnata da una rigorosa selezione clinica del paziente (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023).

Anche l'appropriatezza prescrittiva dei test diagnostici è considerata un aspetto chiave della gestione clinica. L'esecuzione di test su pazienti non eleggibili può determinare:

- Falsi positivi;
- Trattamenti antibiotici non necessari;
- Ulteriore disbiosi;
- Incremento dei costi sanitari e di laboratorio.

In conclusione, la sinergia tra valutazione clinica e diagnostica di laboratorio è essenziale al fine di garantire una gestione ottimale dell'infezione da *C. difficile*.

**Test di laboratorio per diagnosi di infezione da *C. difficile*<sup>a</sup>**

Test	Sensibilità	Specificità	Target
Coltura tossinogenica (TC)	Alta	Bassa <sup>a</sup>	Forma vegetativa o spore
Amplificazione di acido nucleico (NAAT)	Alta	Bassa/media	Acido nucleico
Glutammato deidrogenasi (GDH)	Alta	Bassa <sup>a</sup>	Antigene comune di CD
Neutralizzazione della citotossicità in coltura cellulare (CCNA)	Alta	Alta	Tossine libere di CD
Immunoanalisi enzimatica delle tossine A e B (EIA)	Bassa	Media	Tossine libere di CD

<sup>a</sup>Deve essere combinato con un test per la ricerca delle tossine.

**Figura 4:** Test diagnostici di laboratorio nelle CDI  
(Fonte: Johnson S et al., 2021)

### 1.7 Terapia antibiotica della CDI secondo le linee guida internazionali

La gestione terapeutica della CDI si basa su una stratificazione della gravità clinica, su fattori di rischio individuali correlati al paziente e sulla presenza di eventuali recidive (Vitiello et al., 2024; Johnson et al., 2021).

Le linee guida dell'Infectious Diseases Society of America (IDSA), della Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) e le raccomandazioni europee, indicano la vancomicina orale e la

fidaxomicina come farmaci di prima linea per il trattamento del primo episodio di CDI (Vitiello et al., 2024; Johnson et al., 2021).

La vancomicina orale è considerata una alternativa valida nelle forme severe non fulminanti; la fidaxomicina invece è un antibiotico macrociclico a spettro d'azione ridotto, che presenta un impatto minore sul microbiota intestinale rispetto alla vancomicina, associata a un minor tasso di recidiva nei pazienti ad alto rischio (Vitiello et al., 2024). Nei casi lievi è raccomandato il metronidazolo, un farmaco ampiamente utilizzato in passato ma attualmente meno, a causa del rischio di effetti collaterali sistemici e della ridotta efficacia (Vitiello et al., 2024). Nelle forme fulminanti viene indicato un trattamento combinato e sinergico tra vancomicina orale e metronidazolo per via endovenosa, con una valutazione chirurgica nei casi con refrattarietà. Queste ultime forme sono caratterizzate da ipotensione, ileo o megacolon tossico (Figura 5) (Vitiello et al., 2024).

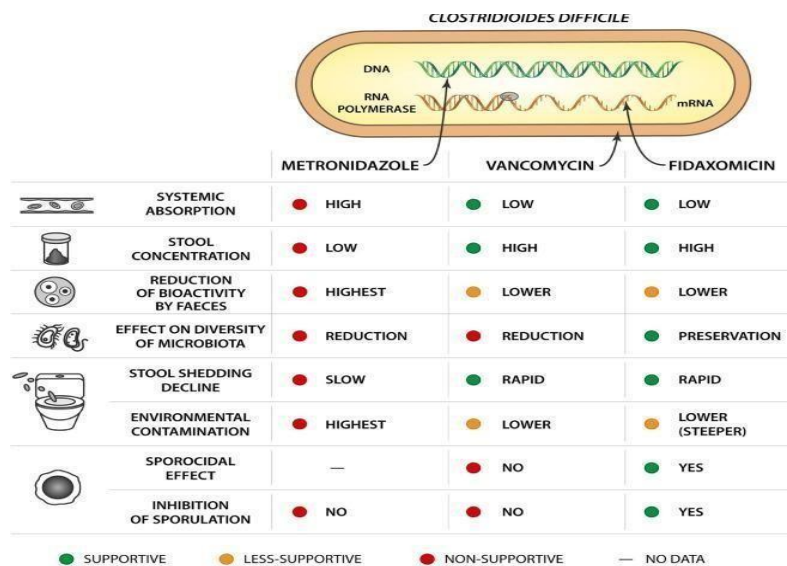
Oltre al metronidazolo troviamo anche cefalosporine di terza generazione, clindamicina e carbapenemi, associate a un rischio maggiore di sviluppare l'infezione, in quanto sono agenti che causano una marcata riduzione della biodiversità microbica e alterano il metabolismo dei sali biliari (Tabella 2) (Dureja et al., 2022; Wickramage et al., 2021).

<b>Classe antibiotica</b>	<b>Esempi</b>	<b>Meccanismo di rischio</b>	<b>Livello di rischio CDI</b>
Fluorochinoloni	Ciprofloxacina, Levofloxacina	Alterazione microbiota intestinale	Alto
Cefalosporine 3° generazione	Ceftriaxone, Cefotaxime	Riduzione biodiversità batterica	Alto
Clindamicina	Clindamicina	Forte impatto sul microbiota anaerobio	Alto
Carbapenemi	Meropenem, Imipenem	Ampio spettro antibatterico	Moderato
Penicilline	Amoxicillina	Alterazione moderata microbiota	Moderato

<b>Classe antibiotica</b>	<b>Esempi</b>	<b>Meccanismo di rischio</b>	<b>Livello di rischio CDI</b>
Tetracicline	Doxiciclina	Minore alterazione microbiota	Basso

**Tabella 2:** *Antibiotici associati a rischio di CDI*  
**(Fonte:** Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018)



**Figura 5:** Azione dei principali antibiotici nella terapia antimicrobica

(Fonte: Vitiello A et al., 2024)

### 1.7.1 Gestione delle recidive

Una delle criticità maggiori nella gestione della CDI è rappresentata dal fenomeno della recidiva. I fattori che aumentano il rischio di recidiva includono:

- Comorbidità;
- Età avanzata;
- Immunosoppressione;
- Persistente disbiosi;
- Risposta anticorpale insufficiente contro le tossine.

In caso di prima recidiva, le linee guida raccomandano cicli di vancomicina a dosaggio decrescente o fidaxomicina, mentre nelle recidive multiple viene indicato il trapianto di microbiota fecale (FMT) (Vitiello et al., 2024; Cosimato et al., 2026).

La razionalità biologica del FMT è racchiusa nel ripristino della biodiversità microbica intestinale, nel metabolismo dei sali biliari e nella ricostituzione della resistenza alla colonizzazione. I tassi di successo riportati in letteratura superano l'80-90% nei pazienti con infezioni ricorrenti e non sporadiche (Cosimato et al., 2026).

### 1.7.2 Nuove strategie terapeutiche emergenti

Negli ultimi anni sono state sviluppate nuove strategie terapeutiche finalizzate a migliorare la gestione delle infezioni ricorrenti da *Clostridioides difficile*. Tra queste, un ruolo di crescente importanza è rappresentato dagli anticorpi monoclonali diretti contro le tossine batteriche. Il bezlotoxumab è un anticorpo monoclonale umano che neutralizza la tossina B di *C. difficile*, riducendo il rischio di recidiva nei pazienti ad alto rischio (Johnson et al., 2021). Questo farmaco viene somministrato in associazione alla terapia antibiotica standard e ha dimostrato di ridurre significativamente il tasso di recidive nei pazienti con infezione primaria o ricorrente.

Parallelamente, la ricerca scientifica sta esplorando nuove strategie basate sulla modulazione del microbiota intestinale. Tra queste, lo sviluppo di consorzi batterici definiti rappresenta un approccio promettente per ripristinare l'equilibrio del microbiota senza ricorrere al trapianto fecale tradizionale.

### 1.8 Trapianto di microbiota fecale e modulazione immunitaria

L'interesse scientifico verso il trapianto di microbiota fecale non riguarda esclusivamente la CDI, ma si estende anche ad altre patologie associate ad alterazioni del microbiota intestinale. Diversi studi sono mirati allo studio del potenziale utilizzo del FMT in condizioni specifiche, come la malattia infiammatoria intestinale, la sindrome dell'intestino irritabile e alcune patologie metaboliche.

Il razionale biologico alla base di queste applicazioni è caratterizzato dalla capacità del microbiota di influenzare numerosi processi fisiologici dell'organismo, tra cui il metabolismo energetico, la modulazione immunitaria e la comunicazione con il sistema nervoso centrale attraverso il cosiddetto asse intestino-cervello.

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è considerato una delle innovazioni terapeutiche più significative degli ultimi anni nella gestione della CDI ricorrente. Consiste nel trasferimento di microbiota intestinale da un donatore sano a un paziente affetto da CDI, mediante la somministrazione per via endoscopica, naso-enterica o attraverso capsule orali (Cosimato et al., 2026).

Il FMT esercita anche un effetto immunomodulatore: studi recenti hanno documentato e mostrato modificazioni nei sottogruppi di cellule immunitarie periferiche, incluse variazioni nelle cellule T regolatorie (T-reg) e nelle cellule T natural-killer (NKT) (Cosimato et al., 2026). Questo suggerisce che la remissione clinica non è dovuta solo alla competizione microbica, ma anche alla ricalibrazione dell'equilibrio immunologico.

Ad oggi sono in fase di sviluppo consorzi batterici standardizzati che tendono ad offrire un'alternativa più controllata e riproducibile rispetto al materiale derivato da donatore (Quinn-Bohmann et al., 2026).

## 1.9 Antimicrobial Stewardship e impatto economico dell'infezione da *C. difficile*

In ambito di sanità moderna, i programmi di Antimicrobial Stewardship assumono un ruolo sempre più centrale nella prevenzione e nel controllo delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria. L'utilizzo inappropriato di antibiotici ad ampio spettro modifica profondamente la composizione del microbiota intestinale, riducendo la competizione microbica e favorendo la proliferazione di microrganismi patogeni opportunisti come *Clostridioides difficile* (McDonald et al., 2018).

Il concetto di diagnostic stewardship si riferisce all'ottimizzazione delle richieste di test diagnostici al fine di migliorare l'appropriatezza clinica e ridurre l'utilizzo non necessario delle risorse sanitarie. Nel caso della CDI, la richiesta inappropriata di test diagnostici rappresenta una problematica rilevante. L'esecuzione di test su pazienti privi di sintomi compatibili con infezione attiva può portare all'identificazione di colonizzazione asintomatica, con conseguente rischio di trattamenti antibiotici non necessari.

L'implementazione di sistemi informatici ospedalieri in grado di limitare automaticamente le richieste inappropriate di test ha dimostrato di ridurre significativamente il numero di analisi non indicate.

Questo approccio consente di migliorare l'efficienza del laboratorio e di ridurre i costi sanitari. Numerosi studi dimostrano che l'introduzione di programmi strutturati di stewardship antimicrobica permette una riduzione significativa dell'incidenza delle infezioni da *C. difficile* all'interno delle strutture ospedaliere. Questi programmi prevedono interventi multidisciplinari che coinvolgono microbiologi, infettivologi, farmacisti ospedalieri e personale clinico, con l'obiettivo di ottimizzare la scelta della terapia antibiotica per ogni singolo soggetto.

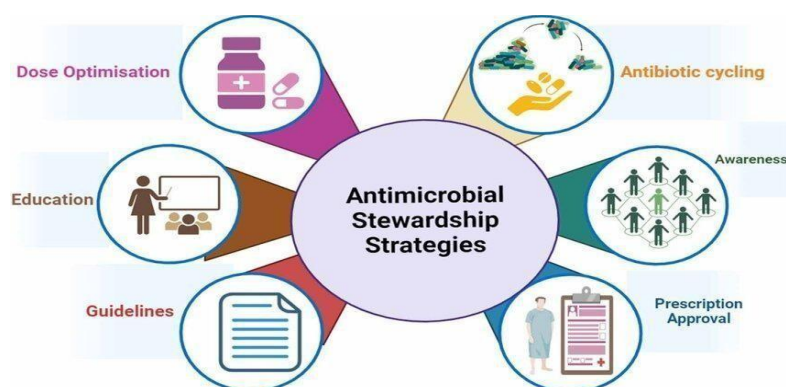
Tra le strategie più efficaci sono incluse la revisione periodica delle terapie antibiotiche, la limitazione dell'uso di molecole ad alto rischio di indurre disbiosi intestinale e l'implementazione di protocolli di de-escalation terapeutica. Queste misure consentono non solo di ridurre l'incidenza delle CDI, ma anche di contrastare il fenomeno globale della resistenza antimicrobica.

L'infezione da *C. difficile* costituisce uno degli esempi più emblematici delle conseguenze sistemiche e cliniche per quanto riguarda l'uso inappropriato degli antibiotici. Si può osservare una stretta correlazione tra la CDI e la pressione selettiva esercitata dai trattamenti antimicrobici sul microbiota intestinale (Chilton et al., 2025; Dureja et al., 2022). I programmi di Antimicrobial Stewardship (AMS) detengono un ruolo centrale nella prevenzione primaria e secondaria della CDI. L'Antimicrobial stewardship è intesa come un insieme coordinato di interventi finalizzati a migliorare e misurare l'utilizzo appropriato di antibiotici, attraverso la scelta del farmaco, del dosaggio, della via di somministrazione e della durata della terapia, con il fine di ottimizzare gli esiti clinici, riducendo gli effetti indesiderati e limitando l'insorgenza di resistenze antimicrobiche (Figura 6).

Come anticipato in precedenza, l'AMS non si limita alla prescrizione terapeutica, ma include anche la cosiddetta "Diagnostic stewardship", ossia l'ottimizzazione delle richieste di test microbiologici. Come descritto in precedenza l'esecuzione inappropriata di test per il *C. difficile* in pazienti asintomatici può portare a falsi positivi da colonizzazione, con un conseguente trattamento antibiotico non necessario, oltre ad un'ulteriore alterazione del microbiota (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023; Johnson et al., 2021).

Dal punto di vista economico, la CDI comporta un notevole aumento dei costi sanitari diretti e indiretti. Tra quelli diretti troviamo:

- Isolamento del paziente;
- Prolungamento della degenza ospedaliera;
- Terapia farmacologica specifica;
- Interventi chirurgici nei casi complicati;
- Procedure diagnostiche ripetute.



**Figura 6:** Rappresentazione del concetto di Antimicrobial Stewardship (Fonte: McDonald LC et al., 2018)

D'altra parte, i costi indiretti includono perdita di produttività, aumento del tasso di mortalità nei pazienti fragili e necessità di assistenza a medio-lungo termine.

In diversi contesti sanitari sono state condotte stime che indicano un aumento della durata media della degenza ospedaliera, con conseguente incremento della spesa complessiva per ogni paziente. A ragione di ciò, le forme ricorrenti comportano un'ulteriore escalation dei costi, a causa di terapie ripetute e l'utilizzo di approcci complessi come il trapianto di microbiota fecale (Vitiello et al., 2024; Cosimato et al., 2026).

Anche l'introduzione di antibiotici a spettro ristretto, come la fidaxomicina, può comportare un maggiore costo iniziale rispetto alla vancomicina; nonostante ciò, una riduzione delle forme recidive

si traduce in un risparmio economico complessivo nel medio-lungo periodo, per una riduzione degli interventi terapeutici e dei ricoveri ripetuti.

Numerosi studi hanno evidenziato come la CDI sia associata a un significativo aumento della durata della degenza ospedaliera, a una maggiore necessità di isolamento dei pazienti e a un incremento complessivo dei costi sanitari.

Dal punto di vista clinico, la gestione dei pazienti affetti da CDI richiede spesso l'adozione di misure di controllo delle infezioni, tra cui l'isolamento in stanza singola, l'utilizzo di dispositivi di protezione individuale da parte del personale sanitario e procedure di sanificazione ambientale più rigorose. Queste misure sono fondamentali per limitare la trasmissione nosocomiale del patogeno, ma comportano inevitabilmente un aumento dell'impegno organizzativo e dei costi assistenziali. Un ulteriore elemento che contribuisce all'impatto economico della CDI riguarda il prolungamento della durata della degenza ospedaliera. Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti con infezione da *C. difficile* possono presentare un aumento medio della degenza compreso tra 3 e 10 giorni rispetto ai pazienti non infetti. Questo incremento della permanenza in ospedale si traduce in un aumento dei costi sanitari diretti, legati all'assistenza clinica, alle terapie farmacologiche e agli esami diagnostici. Dal punto di vista diagnostico, l'utilizzo di algoritmi che combinano test immunologici e metodiche molecolari consente di migliorare l'accuratezza della diagnosi, ma comporta anche un maggiore utilizzo di risorse laboratoristiche. In questo contesto, l'appropriatezza prescrittiva assume un ruolo fondamentale per garantire un utilizzo efficiente delle risorse diagnostiche e per evitare richieste di esami non pienamente giustificate dal quadro clinico.

Inoltre, la CDI può determinare un impatto economico indiretto legato alla gestione delle recidive, che rappresentano una complicanza frequente dell'infezione. È stato stimato che circa il 20–25% dei pazienti sviluppa una recidiva dopo il primo episodio di infezione, con conseguente necessità di ulteriori trattamenti e controlli diagnostici.

Alla luce di queste considerazioni, la promozione di strategie di “diagnostic stewardship” e di “antimicrobial stewardship” rappresenta uno strumento fondamentale per migliorare la gestione della CDI, ridurre i costi sanitari e garantire un utilizzo più appropriato delle risorse diagnostiche e terapeutiche.

<b>Ambito</b>	<b>Beneficio</b>
Clinico	Riduzione infezioni CDI
Epidemiologico	Controllo resistenza antimicrobica
Economico	Riduzione costi sanitari
Organizzativo	Migliore gestione antibiotici

**Tabella 3:** *Vantaggi dei programmi di Antimicrobial Stewardship*  
(Fonte: McDonald et al., 2018; Dureja et al., 2022)

Per riassumere, la CDI è un esempio paradigmatico di come un'infezione opportunistica sia in grado di generare un circolo vizioso tra l'uso di antibiotici, disbiosi, fenomeni recidivati e incremento dei costi sanitari complessivi. Per combattere questo sistema si ricorre all'integrazione di programmi di antimicrobial stewardship, protocolli diagnostici appropriati e strategie preventive per i sistemi sanitari, con l'obiettivo di scoraggiare l'incidenza della malattia e l'impatto economico a livello clinico (Tabella 3).

### 1.10 Appropriata prescrizione clinica e progetto “Less is more”

Come già accennato in precedenza l'appropriatezza prescrittiva rappresenta un elemento cardine nella gestione clinica della CDI, e si basa su linee guida stipulate da diverse autorità sanitarie nazionali e internazionali. In particolare, nel Laboratorio di Microbiologia e Virologia presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, il workflow e la diagnostica per l'infezione da *C. difficile* seguono un protocollo locale basato su raccomandazioni e direttive clinicodiagnostiche nazionali e internazionali (IDSA/SHEA 2021, ESCMID 2021, nonché protocolli di sorveglianza ECDC/ISS, citati nel capitolo “Bibliografia”).

Nel corso del periodo di tirocinio formativo svolto presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, sotto la guida e gestione del Dottor Andrea Rocchetti, Primario del reparto di Microbiologia e Virologia, è stato sviluppato un progetto trimestrale denominato “Less is more”, finalizzato alla valutazione e al miglioramento dell'appropriatezza prescrittiva in ambito clinico-laboratoristico.

Questo progetto ospedaliero è nato con l'esigenza di garantire una maggiore qualità e sicurezza delle cure, riducendo l'inappropriatezza delle prescrizioni cliniche, gli sprechi e le inefficienze. La finalità progettuale è in linea con le iniziative nazionali e internazionali, prendendo spunto e riferimento dalla campagna Choosing Wisely.

L'obiettivo del progetto è quindi promuovere e implementare 10 best practices al fine di aumentare l'appropriatezza clinica, facendo riferimento alle prescrizioni di indagini e trattamenti nell'ambito delle malattie infettive, limitando l'uso sbagliato ed eccessivo delle stesse.

L'attività progettuale ha previsto una fase iniziale di analisi preliminare della richiesta degli esami microbiologici, con valutazione critica delle prescrizioni pervenute al laboratorio dai vari reparti ospedalieri, e un conseguente confronto con i criteri di appropriatezza definiti nei protocolli aziendali e nelle linee guida di riferimento.

All'interno di questo progetto multidisciplinare, ciascun tirocinante ha approfondito un ambito specifico di interesse. Il mio contributo si è focalizzato sull'infezione da *Clostridioides difficile*, patologia di particolare rilevanza in ambito ospedaliero per impatto clinico, epidemiologico ed economico. L'attenzione è stata rivolta alla valutazione dell'appropriatezza delle richieste diagnostiche (in particolare test per la rilevazione delle tossine e test molecolari), alla corretta applicazione dei criteri clinici per l'esecuzione dell'esame e alla coerenza con l'algoritmo diagnostico adottato dal laboratorio (Tabella 4).

Sono stati analizzati i criteri di selezione dei campioni, la congruità delle richieste rispetto al quadro clinico riportato e la ripetizione di test in intervalli temporali non indicati dalle raccomandazioni.

BEST PRACTICE	NON raccogliere ed elaborare abitualmente campioni per il test del <i>C. difficile</i> in caso di feci non liquide o se il paziente ha avuto un risultato precedente del test di amplificazione dell'acido nucleico (positivo o negativo) entro gli ultimi 7 giorni.
DESCRIZIONE	La raccolta e il trattamento per la rilevazione di <i>C. difficile</i> avvengono solo su campioni di feci liquide, poiché un test positivo senza fenomeni di diarrea rappresenta quasi sicuramente la colonizzazione di <i>C. difficile</i> . I guadagni diagnostici sono minimi con la ripetizione del test di amplificazione dell'acido nucleico entro 7 giorni da un test precedente negativo. Anche ripetizione del test della tossina da <i>C. difficile</i> mediante immunodosaggio enzimatico entro 7 giorni da test negativo ha scarsa resa diagnostica, ma giustificata solo per alcuni casi selezionati. La letteratura scientifica ha dimostrato che l'uso di sistemi informatici ospedalieri per limitare la ripetizione di test diagnostici ha ridotto la prescrizione del 91%.
CODICE ESAMI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CLOSTRIDIUM GDH: 90.85.3</li> <li>• CLOSTRIDIUM TOSSINE: 90.91.1</li> </ul>

**Tabella 4:** Linee guida per il monitoraggio della prescrizione dei test del *C. difficile*, secondo progetto “Less is more” presso l’AOU di Alessandria.

(Fonte: elaborazione progetto di tesi – Laboratorio di Microbiologia e Virologia AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, 2026)

### 1.11 “Il microbiota, la nonna e l’UPO” e il microbiota intestinale

All’interno delle aule universitarie dell’Università del Piemonte Orientale (UPO) è nato un progetto chiamato “Il microbiota, la nonna e l’UPO”, sottoforma di libro scritto dagli studenti e dalle studentesse di Biologia, compreso il sottoscritto, guidati dal Dottor Rocchetti, docente del corso di Tecniche microbiologiche (Figura 7) (Rocchetti A (ed.), 2025). Il tema principale riguarda lo studio

del microbiota intestinale, correlato alla terapia rappresentata dal trapianto di microbiota fecale, al fine di migliorare lo stato di salute di pazienti affetti da condizione di disbiosi intestinale.

Come già ampiamente descritto in precedenza, il microbiota è considerato un complesso sistema di batteri, funghi, virus e altri microrganismi che popola stabilmente il nostro intestino, con lo scopo di favorire il nostro benessere e la nostra sopravvivenza. Parlando di microbiota si fa riferimento alla visione dell'essere umano come organismo olobionte, ossia come un'entità biologica costituita da un organismo ospite e da tutti i suoi microrganismi simbiotici, i quali non condividono lo stesso DNA, ma collaborano in modo funzionale per contribuire alla fitness del sistema (Medicalive, 2021). Il microbiota intestinale svolge diverse funzioni fondamentali per l'organismo. Dal punto di vista metabolico, i microrganismi commensali aiutano a scomporre numerosi elementi della dieta. Un esempio cardine è rappresentato dalla fermentazione delle fibre alimentari, da cui derivano sostanze preziose come gli acidi grassi a catena corta (SCFA), con funzione antinfiammatoria. Il microbiota agisce anche come barriera biologica modulando il sistema immunitario contro l'azione degli agenti patogeni. Ad esempio, contrasta la crescita microbica alterando il pH o inducendo la produzione di citochine. Il microbiota può essere modulato in termini funzionali e di composizione, da parte di elementi di carattere epigenetico, tra i quali troviamo:

- Alimentazione;
- Attività fisica;
- Qualità del sonno;
- Uso di antibiotici;
- Esposizione ad inquinanti;
- Stress psicosociale.

Anche dal punto di vista genetico il microbiota è stato studiato mediante l'utilizzo di tecniche avanzate di sequenziamento del DNA, come il sequenziamento del DNA ribosomiale 16S, l'analisi shotgun, le tecniche omiche (in particolare proteomica, metabolomica e trascrittomica) (Hug et al., 2016).

L'aspetto di primaria rilevanza è detenuto dal concetto di disbiosi. Un microbiota squilibrato è dovuto all'azione di fattori esogeni ed endogeni specifici, come ad esempio dieta squilibrata, assunzione errata o abuso di farmaci, abuso di alcol, il fumo, lo stress con attivazione dell'asse ipotalamoipofisurrene (HPA) e la iperproduzione di cortisolo, considerato l'ormone responsabile dello stato di stress. Le conseguenze di una condizione di disbiosi possono essere severe, con la possibile insorgenza di malattie e disordini gastro-intestinali. In particolare, per rimanere in tema di batteri appartenenti alla famiglia dei Clostridi, diversi studi hanno correlato lo sviluppo dell'autismo

con fattori genetici e ambientali specifici. Ad esempio, analizzando un campione di feci di un bambino autistico è stata rilevata la presenza di una grande quantità di specie batteriche opportuniste del genere *Clostridium*. Questo fenomeno è dovuto all'utilizzo di antibiotici per il trattamento di soggetti affetti da autismo, con una conseguente riduzione dei batteri "amici" e la creazione di un ambiente favorevole alla crescita e colonizzazione da parte di agenti patogeni e opportunisti (Martirosian et al., 2011).

Negli ultimi anni è stata consolidata la pratica del trapianto di microbiota fecale, in particolare nel trattamento di recidive di CDI, per la quale risultano inefficacia i trattamenti convenzionali, basati sull'uso di antibiotici e sulla terapia immunomodulante (Medicina Informa).

Il trapianto di microbiota fecale è regolamentato dal Centro Nazionale Trapianti, creato all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità che coordina e gestisce le attività di donazione e di trapianto, in collaborazione con il Ministero della Salute (Istituto Superiore di Sanità). Per garantire il successo del trapianto, occorre seguire le linee guida dettate dal Centro Nazionale Trapianti, le quali racchiudono i requisiti necessari, come l'età e test di screening. Il processo di approvazione è diviso in tre fasi: fase iniziale di pre-screening, valutazione clinica e analisi di laboratorio (Porcari et al., 2023).

Abbiamo descritto il trapianto di microbiota, messo in atto principalmente in seguito a colonizzazione da *C. difficile*. Tuttavia, prima di procedere al trapianto bisogna confermare la diagnosi di infezione, attraverso esame delle feci ricercando la presenza di tossine prodotte, e l'esame del sangue, al fine di verificare un aumento di globuli bianchi. Altri esami maggiormente invasivi possono includere la colonscopia, per osservare in maniera diretta la mucosa del colon o individuare eventuali lesioni (Cui et al., 2016).

Dal punto di vista procedurale, il trapianto di microbiota fecale prevede l'inserimento di circa 200300 millilitri di feci nel colon del paziente, provenienti da un donatore idoneo, trattate e diluite in soluzione salina sterile (Cui et al., 2016).

Una volta effettuato il trapianto con materiale fecale "a fresco", il paziente viene solitamente dimesso dopo una degenza di massimo 72 ore. Gli eventi avversi post-trapianto spesso risultano essere a breve termine, come diarrea, dolori addominali, stipsi e febbre. Quelli più gravi fanno riferimento a batteriemia, perforazione intestinale e, in casi estremamente rari, decesso (Ramai et al., 2018).

Per concludere, ad oggi è possibile effettuare il trapianto di microbiota fecale per il trattamento di CDI, in quanto l'efficacia è stata a lungo approvata in ambito clinico e ospedaliero. Tuttavia, il trapianto è il simbolo di un approccio promettente anche per altre patologie legate al microbiota intestinale, come patologie metaboliche, neurologiche e psichiatriche.



**Figura 7:** Copertina del libro “Il microbiota, la nonna e l’UPO”

(Fonte: Rocchetti A (ed.), 2025)

## 2.SCOPO DELLA TESI

Il mio tirocinio si è svolto nell'arco di un periodo semestrale tra il 2025 e il 2026 (in particolare nei mesi da settembre 2025 a febbraio 2026) presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria. Il progetto si è basato su un duplice studio riguardante il batterio *Clostridioides difficile*, attraverso un'analisi di carattere epidemiologico mediante l'utilizzo di algoritmi diagnostici, e in maniera correlata un approccio mirato sulla tematica dell'appropriatezza prescrittiva clinica e ospedaliera. Oltre alla valutazione dell'appropriatezza prescrittiva e all'analisi dei dati epidemiologici raccolti durante il periodo di tirocinio, il presente lavoro di tesi si propone anche di evidenziare il ruolo fondamentale del laboratorio di microbiologia clinica nella gestione delle infezioni da *Clostridioides difficile*.

Il laboratorio rappresenta infatti un punto di collegamento tra il sospetto clinico formulato dal medico e la conferma diagnostica mediante metodiche analitiche. Attraverso l'applicazione di algoritmi diagnostici strutturati e l'utilizzo di tecnologie avanzate, il laboratorio contribuisce in maniera concreta alla rapidità e all'accuratezza della diagnosi.

Un ulteriore obiettivo del progetto è evidenziare come la collaborazione tra personale clinico e personale di laboratorio possa migliorare la qualità delle cure offerte al paziente, riducendo il rischio di diagnosi inappropriate e promuovendo un utilizzo più razionale delle risorse diagnostiche disponibili.

In particolare, è stata effettuata una raccolta dati su campioni di feci fresche che quotidianamente arrivavano in laboratorio. In primo luogo, si eseguiva il processo diagnostico nella sua interezza, dalla fase di check-in del campione fino alla diagnosi di possibili infezioni, con esito positivo o negativo, mediante lo strumento dei sistemi Relab "Analizzatore STANDARD™ F2400 C. difficile GDH FIA", per l'analisi qualitativa dell'antigene GDH di *C. difficile* in campioni fecali, ed eventuali analisi molecolari, attraverso lo strumento GeneXpert mediante metodica di PCR quantitativa, per la ricerca di parametri come la tossina binaria o il ribotipo 027.

Il lavoro è stato ulteriormente sviluppato anche da un punto di vista qualitativo, attraverso un processo di congelamento dei campioni con positività al ribotipo 027 o recidivati. Il solo scopo di tale procedimento era evidenziare pazienti con possibile interessamento in termini di trapianto di microbiota fecale e permettere l'approfondimento di studi trasversali su questo argomento.

In secondo luogo, il progetto di tesi ha riguardato la registrazione delle informazioni relative ai pazienti in un apposito file Excel (ad esempio età, reparto di provenienza, ID del campione, esito positivo o negativo di discordanza dalle linee guida per la richiesta dell'esame diagnostico) e tutti i dati relativi a ogni singolo campione (tra cui esito del test per la ricerca di GDH, eventuale presenza di tossine, risultati di indagini molecolari).

Lo scopo principale del progetto eseguito durante il periodo di tirocinio è quindi la dimostrazione dei vantaggi riscontrabili in una corretta appropriatezza prescrittiva in ambito clinico-ospedaliero. Il vantaggio maggiormente riscontrabile consiste in una corretta diagnosi laboratoristica, modulata da un'adeguata prescrizione dei test da eseguire da parte dei vari reparti ospedalieri, attenendosi alle linee guida nazionali e internazionali. Da parte sua il personale di laboratorio ha il compito di verificare la corretta richiesta per eseguire un test specifico, basandosi su parametri come la scala Bristol o osservando la cartella clinica del paziente.

Un secondo vantaggio, conseguente al primo, riguarda il miglioramento dell'efficacia, della sensibilità e della produttività clinica, con una riduzione in termini di tempi e costi effimeri da parte del laboratorio, ma soprattutto con uno sviluppo nella cura del paziente.

# 3.MATERIALI E METODI

## 3.1 Sede dello studio e contesto sperimentale

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Alessandria rappresenta un nodo centrale per la diagnostica microbiologica clinica e per la sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria.

All'interno di questo contesto vengono eseguite analisi microbiologiche di diversa natura, tra cui indagini batteriologiche, virologiche, micologiche e molecolari.

L'organizzazione del laboratorio segue un flusso operativo standardizzato suddiviso in tre fasi principali:

- 1) fase pre-analitica, che comprende l'accettazione e la verifica dell'idoneità del campione;
- 2) fase analitica, che include l'esecuzione delle metodiche diagnostiche;
- 3) fase post-analitica, che riguarda la validazione dei risultati e la refertazione.

Questa organizzazione consente di garantire la tracciabilità dei campioni, il controllo della qualità e l'affidabilità dei risultati diagnostici.

Come anticipato in precedenza, le attività sperimentali sono state svolte presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.

Il laboratorio svolge attività e indagini di diagnostica microbiologica clinica, finalizzata all'identificazione di agenti patogeni responsabili di infezioni virali, micotiche e batteriche, in supporto alle attività ambulatoriali e ai reparti ospedalieri. La gestione dei campioni biologici segue le procedure operative standard (SOP) al fine di garantire qualità analitica, tracciabilità e sicurezza. Il percorso diagnostico osservato e applicato durante il periodo di stage ha incluso metodiche immunologiche di screening (per la ricerca dell'antigene GDH), di supporto diagnostico (per la ricerca delle tossine), in aggiunta a metodiche molecolari basate su PCR in tempo reale con piattaforma GeneXpert, per garantire la conferma e la caratterizzazione dei ceppi tossigenici.

## 3.2 Accettazione, gestione e preparazione dei campioni biologici

La fase preanalitica è considerata uno dei momenti più critici del processo diagnostico. Errori in questa fase possono compromettere l'intera analisi laboratoristica.

Durante l'accettazione dei campioni vengono verificati diversi parametri:

- corretta identificazione del paziente;
- congruenza tra la richiesta clinica e l'esame richiesto;

- integrità del contenitore di trasporto;
- idoneità del materiale biologico.

Nel caso della diagnosi di infezione da *C. difficile* vengono accettati esclusivamente campioni fecali liquidi o semiliquidi compatibili con quadro clinico di diarrea. Campioni formati o non adeguatamente identificati possono essere rifiutati secondo le procedure operative standard del laboratorio.

Un ulteriore elemento importante riguarda il tempo di trasporto del campione. Idealmente le feci devono essere analizzate entro poche ore dalla raccolta, oppure conservate a temperatura controllata per preservare l'integrità degli antigeni e del DNA batterico.

I campioni interessati da analisi sono campioni fecali provenienti da pazienti con sospetto clinico di infezione da *Clostridioides difficile*. Il campione viene raccolto in contenitori sterili monouso, correttamente identificati e trasportati fino al laboratorio nel minor tempo possibile. Il controllo delle contaminazioni rappresenta un aspetto fondamentale per garantire l'affidabilità dei risultati analitici. I campioni fecali sono caratterizzati da una matrice biologica complessa e possono contenere numerosi microrganismi appartenenti al microbiota intestinale.

All'arrivo in laboratorio ciascun campione deve essere accettato e registrato nel sistema informatico gestionale (LIS), con un codice univoco utili a garantire la tracciabilità del campione e la ricostruzione del suo percorso analitico. Di conseguenza la fase preanalitica prevede la verifica dell'integrità del contenitore di trasporto, un'adeguata identificazione del campione e l'assenza di perdite, oltre alla corretta conservazione e la prioritizzazione in base alle richieste cliniche. Successivamente la manipolazione dei campioni fecali richiede particolare attenzione, eseguendo le attività mediante procedure di biosicurezza e decontaminazione adeguate, per limitare la formazione di aerosol e ridurre il rischio di contaminazioni crociate.

### 3.3 Biosicurezza: utilizzo della cappa di sicurezza biologica e DPI

Le procedure di biosicurezza adottate all'interno del laboratorio sono conformi alle normative internazionali relative alla gestione di agenti biologici potenzialmente patogeni.

L'utilizzo corretto dei dispositivi di protezione individuale (DPI) rappresenta inoltre un elemento fondamentale. Gli operatori utilizzano camici monouso, guanti e dispositivi di protezione facciale, seguendo protocolli rigorosi di vestizione e svestizione per ridurre il rischio di contaminazioni crociate.

L'apertura dei campioni fecali avviene all'interno di una cappa biologica di classe 2. Questo processo per garantire la protezione dell'operatore, del campione biologico e dell'ambiente, grazie a un flusso

d'aria controllato e a filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) in grado di contenere aerosol e particelle contaminanti.

Prima di procedere all'avvio delle attività, la superficie di lavoro deve essere decontaminata con l'utilizzo di disinfettanti idonei. Il termine delle attività invece prevede un'ulteriore sanificazione e lo smaltimento dei materiali monouso, secondo le regole interne di smaltimento dei rifiuti biologici.

### 3.4 Controllo di qualità e analisi dati

#### 3.4.1 Controllo qualità e calibrazione degli strumenti

Al fine di garantire l'affidabilità delle analisi diagnostiche, il laboratorio adotta procedure di controllo qualità e calibrazione periodica degli strumenti.

Queste procedure comprendono controlli interni giornalieri e controlli esterni periodici, organizzati da programmi di valutazione inter-laboratorio. La calibrazione degli strumenti diagnostici viene effettuata utilizzando standard di riferimento forniti dai produttori dei kit diagnostici.

Questo modo di agire consente di verificare la precisione e l'accuratezza delle misurazioni effettuate dagli analizzatori automatici.

Nel caso degli strumenti basati su immunofluorescenza o PCR in tempo reale, la calibrazione include la verifica delle curve di risposta e la valutazione della stabilità del segnale fluorescente.

#### 3.4.2 Gestione, tracciabilità e protezione dei dati

La gestione dei dati rappresenta un aspetto fondamentale della diagnostica laboratoristica. Tutti i risultati ottenuti durante il processo analitico vengono registrati nel sistema informatico gestionale del laboratorio (LIS).

Il sistema LIS garantisce una completa tracciabilità del campione biologico, dalla fase di accettazione fino alla refertazione finale.

Ogni campione viene associato a un identificativo univoco che permette di ricostruire tutte le fasi del processo diagnostico.

La tracciabilità dei dati rappresenta un requisito fondamentale per assicurare la qualità del processo. Le attività di raccolta e analisi dei dati sono state condotte nel rispetto delle normative vigenti in materia di protezione dei dati personali.

Di conseguenza, tutte le informazioni cliniche utilizzate per l'analisi epidemiologica sono state trattate in forma anonima, al fine di garantire la riservatezza dei pazienti. L'utilizzo di dati provenienti da attività diagnostiche di routine non ha comportato interventi aggiuntivi sui pazienti.

Pertanto, lo studio rientra nell'ambito delle analisi osservazionali basate su dati clinici già disponibili. Questo approccio consente di svolgere analisi epidemiologiche utili al miglioramento delle pratiche diagnostiche senza compromettere la tutela della privacy dei pazienti.

### 3.4.3 Analisi statistica dei dati e limiti metodologici

Per l'analisi dei dati raccolti è stata utilizzata una metodologia di statistica descrittiva. Le variabili considerate includono caratteristiche demografiche dei pazienti, risultati dei test diagnostici, risultati dei test in termini di appropriatezza prescrittiva e distribuzione delle richieste provenienti dai diversi reparti ospedalieri. I dati sono stati organizzati in tabelle e grafici riassuntivi al fine di facilitarne l'interpretazione. Sono state calcolate frequenze assolute e percentuali per descrivere la distribuzione dei risultati. L'analisi statistica descrittiva consente di individuare eventuali pattern epidemiologici e di valutare l'appropriatezza delle richieste diagnostiche. Come in molti studi osservazionali basati su dati di laboratorio, anche il presente lavoro presenta alcune limitazioni metodologiche.

In primo luogo, lo studio è stato condotto in un singolo centro ospedaliero e i risultati potrebbero non essere completamente generalizzabili ad altre realtà sanitarie. Inoltre, il periodo di osservazione è limitato alla durata del tirocinio formativo, ossia su un periodo semestrale.

Studi condotti su intervalli temporali più lunghi potrebbero fornire informazioni epidemiologiche più complete.

Nonostante tali limitazioni, l'analisi effettuata consente comunque di ottenere indicazioni utili riguardo ai pattern prescrittivi e alla gestione diagnostica delle infezioni da *Clostridioides difficile*.

## 3.5 Prelievo del campione

All'interno della cappa biologica viene aperto il contenitore contenente il materiale fecale, ne viene prelevata una piccola quantità utilizzando un'ansa sterile (1 µL) o un tampone monouso, e trasferito in una provetta contenente il buffer di estrazione fornito dal kit diagnostico, nel caso specifico dal kit "STANDARD *C. difficile* GDH FIA" della ditta Relab (Figura 8). Il buffer ha diverse funzioni nella fase preanalitica:

- Diluizione e dispersione della matrice fecale, complessa e ricca di sostanze interferenti;
- Rilascio e solubilizzazione degli antigeni target (GDH e/o tossine);
- 

Stabilizzazione del campione per corretta lettura strumentale.

Una corretta preparazione del buffer è essenziale per minimizzare risultati non interpretabili o falsamente negativi, dovuti a campioni con una disomogeneità nella distribuzione dei campioni o una

presenza di grumi. L'omogeneizzazione viene ottenuta grazie a miscelazione mediante vortex mixer. Il vortex è uno strumento di laboratorio progettato per la miscelazione rapida di soluzione e sospensioni, attraverso un movimento oscillatorio ad alta frequenza della base di appoggio. Dal punto di vista operativo l'omogeneizzazione permette di rompere aggregati, aumentare la superficie di contatto tra campione e buffer per l'estrazione degli antigeni e garantire un risultato immunologico ottimale.



**Figura 8:** Immagine dei kit diagnostici per GDH e tossine A e B utilizzati in laboratorio (**Fonte:** STANDARD™ F C. difficile GDH FIA kit diagnostico – SD Biosensor / Relab)

### 3.6 Sistema Relab: descrizione e flusso operativo

A questo punto l'elaborazione e la lettura dei test immunologici (GDH e tossine) viene eseguito mediante sistema automatizzato RELAB, basato sull'utilizzo di card diagnostiche monouso dove viene depositata la sospensione risultante. Il sistema è progettato per ridurre la variabilità operatore-dipendente, per standardizzare le fasi di lettura dei campioni e per fornire una risposta rapida compatibile con le esigenze cliniche.

#### 3.6.1 Componenti Relab

Il sistema Relab comprende:

- Unità strumentale di lettura e alloggiamento per la card;
- Sistema ottico per la rilevazione del segnale (per misure di assorbanza e riflettanza o variazioni cromatiche);
- Un software/firmware interno per la gestione dei tempi di incubazione, acquisizione del segnale e interpretazione automatizzata.

Le card sono progettate per contenere zone di reazione dove avviene l'interazione antigene-anticorpo, generando un segnale misurabile. Prima della lettura del campione, lo strumento effettua una lettura preliminare della card in bianco, al fine di definire una baseline strumentale, garantendo un'accuratezza ottimale della successiva misurazione del segnale specifico del campione.

In particolare, all'interno del Laboratorio di Microbiologia e Virologia di Alessandria è presente lo strumento "STANDARD F2400", un analizzatore automatico da banco basato su immunofluorescenza (FIA – Fluorescent Immunoassay) utilizzato nei laboratori clinici per l'analisi qualitativa o quantitativa di diversi biomarcatori (Figura 9). Il sistema utilizza delle microsferi fluorescenti per la rilevazione, e una sorgente UV LED per eccitare il fluoroforo, permettendo una rilevazione molto sensibile del segnale analitico.

È progettato per analisi rapide su molti parametri clinici, con capacità di analizzare fino a 24 test simultanei e circa 70 test/ora.

Il sistema è progettato per combinare rapidità di esecuzione e semplicità operativa e precisione analitica, consentendo l'esecuzione simultanea di più analisi tramite l'impiego di dispositivi test monouso specifici per ciascun analita.

Dal punto di vista strutturale la struttura portante è costituita da un telaio interno metallico che garantisce stabilità meccanica e protezione dei componenti elettronici e ottici interni, mentre l'involucro esterno è realizzato in plastica ad alta resistenza, generalmente ABS, progettato per assicurare isolamento, durabilità e facilità di pulizia. L'alimentazione elettrica avviene tramite una rete standard con tensione compresa tra 100 e 240 volt e frequenza di 50 o 60 hertz, permettendo l'utilizzo dello strumento in diversi contesti laboratoristici.

La parte frontale dello strumento presenta un display touchscreen a colori, attraverso il quale l'operatore può gestire l'intero processo analitico. L'interfaccia grafica consente la registrazione dei campioni, la selezione del tipo di test, il monitoraggio dello stato dell'analisi e la visualizzazione dei risultati finali. Nella stessa area sono presenti gli slot di inserimento delle cassette test e i sistemi di lettura automatica dei codici a barre, che permettono allo strumento di riconoscere il tipo di analisi e le informazioni relative al lotto dei reagenti. Il sistema è inoltre dotato di porte di comunicazione, generalmente USB e connessioni dedicate ai sistemi informativi di laboratorio, che consentono l'integrazione con i software gestionali e la trasmissione automatica dei risultati nei database clinici. Il funzionamento dell'analizzatore si basa sull'utilizzo di cassette diagnostiche monouso specifiche per ciascun test. Ogni cassetta contiene al proprio interno una membrana di reazione e i reagenti necessari per l'analisi immunologica. All'interno del dispositivo test sono presenti anticorpi monoclonali specifici per l'analita da determinare e particelle fluorescenti che fungono da marcatori. Il cuore del sistema di rilevazione è costituito dal modulo ottico di immunofluorescenza. All'interno dello strumento è presente una camera di lettura completamente schermata dalla luce esterna, progettata per garantire condizioni di analisi stabili e riproducibili. In questa camera è installata una sorgente luminosa a LED ultravioletto che ha il compito di eccitare le particelle fluorescenti presenti nella zona di reazione della cartuccia. Quando queste particelle vengono irradiate dalla luce UV,

emettono una radiazione fluorescente a lunghezza d'onda maggiore. Il segnale luminoso emesso viene raccolto da un sistema di filtri ottici che selezionano la lunghezza d'onda desiderata e convogliato verso un sensore fotometrico ad alta sensibilità, generalmente costituito da un fotodiode o da un rilevatore ottico equivalente.

L'intensità della fluorescenza rilevata è direttamente proporzionale alla quantità di complesso immunologico formato nella linea di test e, di conseguenza, alla concentrazione dell'analita presente nel campione biologico. Il segnale luminoso rilevato dal sensore viene convertito in un segnale elettrico che viene successivamente elaborato dal software interno dello strumento. Il sistema informatico integrato utilizza algoritmi di calcolo e curve di calibrazione preimpostate per trasformare il segnale fluorescente in un risultato interpretabile dal punto di vista clinico.

La memoria interna dello strumento è in grado di memorizzare diverse migliaia di risultati, permettendo la consultazione e la revisione dei dati anche a distanza di tempo. Il sistema può inoltre essere collegato ai sistemi informativi di laboratorio, consentendo il trasferimento automatico dei risultati e l'integrazione con i database clinici ospedalieri. Questa funzionalità facilita la gestione del flusso di lavoro e riduce il rischio di errori nella trascrizione dei dati.



**Figura 9:** *Strumento Relab utilizzato nel Laboratorio di Batteriologia*  
(**Fonte:** manuale tecnico STANDARD™ F2400 analyzer (SD Biosensor))

### 3.6.2 Analisi e interpretazione dati

In seguito alla preparazione del campione, una quota della sospensione viene applicata sulla card e inserita nell'alloggiamento del RELAB per l'analisi. Il tempo complessivo di analisi è di circa 15 minuti, al termine del quale lo strumento fornisce un risultato positivo/negativo e il valore del COI (Cut-Off Index). Per quanto riguarda questo valore:

- **COI ≤ 1 → test negativo** (il batterio o la tossina non è rilevata); -
- COI > 1 → test positivo** (presenza del batterio/tossina).

I risultati di GDH e tossine vengono valutati in relazione al sospetto clinico. Un GDH positivo indica la presenza di *C. difficile*, ma non per forza un'infezione attiva; mentre la presenza delle tossine

supporta un quadro compatibile con CDI. In caso di test di GDH positivo e tossine negative occorre la conferma con test molecolare per una valutazione della presenza di ceppi tossigenici.

Dal punto di vista operativo, il processo analitico risulta relativamente semplice e rapido. Dopo la preparazione del campione e l'applicazione nel dispositivo del test, la cartuccia viene inserita nello strumento e il sistema avvia automaticamente la fase di lettura. Il modulo ottico esegue la rilevazione della fluorescenza generata nella zona di reazione e il software elabora i dati ottenuti per produrre il risultato finale.

In conclusione, lo STANDARD F2400 rappresenta un sistema analitico avanzato basato sulla tecnologia di immunofluorescenza, progettato per garantire sensibilità analitica elevata, rapidità di esecuzione e facilità d'uso. L'integrazione tra dispositivi test monouso, sistema ottico di rilevazione fluorescente e software di elaborazione dei dati consente l'identificazione accurata di numerosi biomarcatori clinici. Grazie alla sua struttura compatta e alla possibilità di integrazione con i sistemi informativi di laboratorio, questo analizzatore costituisce uno strumento particolarmente utile nei contesti diagnostici moderni, dove la rapidità e l'affidabilità delle analisi rappresentano requisiti fondamentali per il supporto alla pratica clinica.

### 3.7 Sistema GeneXpert

Il sistema GeneXpert è una piattaforma diagnostica automatizzata basata sulla metodica di PCR in tempo reale (Real-Time PCR) che integra, in un unico dispositivo, tutte le fasi analitiche dalla preparazione del campione alla rilevazione del prodotto amplificato, grazie all'amplificazione non solo di una specifica sequenza genetica, ma anche a un monitoraggio in tempo reale dell'aumento dell'amplificato mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti (Figura 11).

Nel caso di CDI utilizza il test molecolare denominato "Xpert *C. difficile* Assay", che permette la rilevazione diretta del DNA del batterio e dei geni responsabili nella produzione delle tossine.

La struttura del sistema presenta un'unità modulare dove ogni modulo rappresenta un piccolo laboratorio PCR indipendente, dotato di un sistema di termociclazione per il controllo della temperatura, sensori ottici per la rilevazione della fluorescenza e meccanismi fluidici per il movimento interno dei reagenti. Tutto il sistema è collegato a un computer che gestisce il software di controllo dell'analisi, registrando i segnali fluorescenti e interpretando i risultati finali. L'elemento cardine del sistema è la cartuccia monouso, una piccola unità chiusa in plastica contenente tutti i reagenti necessari per l'analisi molecolare, inclusi i primer, le sonde fluorescenti, i tamponi di lisi, gli enzimi della PCR e i controlli interni. La cartuccia presenta microcamere e canali che garantiscono lo spostamento dei reagenti e del campione nelle fasi di analisi.

Dal punto di vista analitico, una piccola quota di materiale fecale viene trasferita in un tampone di preparazione, con lo scopo di omogeneizzare il campione e iniziare la lisi cellulare batterica. In seguito, il campione viene pipettato nella camera di caricamento della cartuccia, chiusa e inserita nel modulo GeneXpert. Avvengono reazioni di lisi cellulari e purificazione del DNA, e successivo trasferimento dell'estratto nella camera di amplificazione dove avviene la PCR in tempo reale. I primer e le sonde fluorescenti sono progettati per riconoscere specifiche sequenze genetiche del batterio, in particolare il gene *tcdB* che codifica per la tossina B. Altre versioni del test rilevano altri geni come quelli associati alla tossina binaria o mutazioni del gene *tdcC* che caratterizzano per ceppi iper-virulenti. Se il DNA è presente nel campione, la PCR produce un numero elevato di copie e la sonda fluorescente emette un segnale luminoso rilevato dal sistema ottico del modulo. Viene determinato il valore Ct dal software in base all'intensità della fluorescenza, cioè il numero del ciclo oltre il quale il segnale supera una soglia stabilita di fluorescenza. All'interno del sistema esistono controlli interni per garantire l'affidabilità del risultato. L'intera procedura dura circa 40 minuti e al termine il software fornisce automaticamente l'interpretazione del test, indicando se il campione risulta positivo o negativo per *C. difficile* tossigenico (Figura 10).

Negli ultimi anni lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da *Clostridioides difficile* si è arricchito grazie all'introduzione delle tecniche di epidemiologia molecolare. L'utilizzo di metodiche di tipizzazione genetica consente infatti di identificare e tracciare la diffusione dei diversi ceppi batterici all'interno delle strutture sanitarie e nella comunità.

Tra le principali tecniche utilizzate vi sono il ribotyping PCR, la multilocus sequence typing (MLST) e il sequenziamento genomico completo (whole genome sequencing). Queste metodiche permettono di distinguere i diversi ceppi circolanti e di individuare eventuali cluster epidemici.

L'analisi molecolare ha evidenziato la diffusione globale di alcuni ribotipi particolarmente virulenti, tra cui il ribotipo 027 e il ribotipo 078, associati a una maggiore produzione di tossine e a quadri clinici più severi.

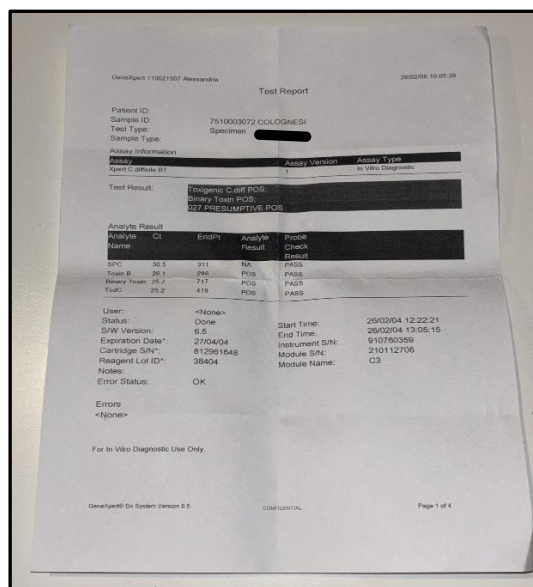
Quindi, l'analisi mediante sistema GeneXpert, oltre a supportare la ricerca e conferma della presenza di *C. difficile* tossigenico, fornisce informazioni di carattere clinico-epidemiologico, su parametri relativi alla tossina binaria e al ribotipo 027.

La tossina binaria (CDT) consiste in un fattore di virulenza presenti in determinati ceppi batterici, con maggiore severità clinica. La positività a questo parametro rappresenta un'informazione importante in termini di sorveglianza e gestione clinica.

Il ribotipo 027 invece è noto per la sua associazione con ceppi iper-virulenti e focolai epidemici. Nei casi in cui il sistema GeneXpert rileva positività compatibile con il ribotipo 027, il campione viene

conservato mediante congelamento a basse temperature per studi e ricerche successivi, legati ad indagini epidemiologiche, approfondimenti interni laboratoristici o analisi di tipizzazione.

Inoltre, lo strumento è collegato a una stampante, al fine di raccogliere e archiviare anche con modalità cartacea i vari risultati ottenuti dall'esame diagnostico, attraverso un foglio riassuntivo degli esiti per i parametri appena descritti.



**Figura 10:** Foglio illustrativo con esiti diagnostico dello strumento GeneXpert  
(Fonte: elaborazione personale – Laboratorio di Microbiologia e Virologia AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)

Rispetto ai metodi tradizionali questo sistema rappresenta un vantaggio in termini di riduzione dei tempi diagnostici, aumentando la sensibilità e la specificità dell'identificazione dell'agente batterico. Inoltre, grazie all'automatizzazione, garantisce un minor rischio di contaminazioni e richiede il minimo intervento da parte dell'operatore di laboratorio.



**Figura 11:** Immagine dello strumento GeneXpert (sistema Cepheid)  
 (Fonte: Cepheid Inc. GeneXpert System Operator Manual)

Un ultimo aspetto importante riguarda i controlli di qualità periodici e le attività di manutenzione programmata degli strumenti visti in precedenza, al fine di mantenere sempre delle prestazioni analitiche ottimali e stabili. I risultati ottenuti vengono registrati nel LIS, garantendo l'aspetto della tracciabilità del campione e delle fasi di processamento dello stesso, oltre all'archiviazione per eventuali analisi retrospettive.

SISTEMA DIAGNOSTICO	TECNOLOGIA	TARGET ANALITICO	VANTAGGI	LIMITI
STANDARD™ F2400 (Relab)	Immunofluorescenza	Antigene GDH di <i>Clostridioides difficile</i>	Elevata sensibilità nello screening iniziale	Non distingue ceppi tossigenici
Test tossine A/B	Immunoenzimatico (EIA)	Tossine TcdA e TcdB	Elevata specificità diagnostica	Sensibilità inferiore rispetto ai test molecolari

GeneXpert	PCR Real-Time	Geni tossinici (tcdB) e ribotipo 027	Elevata sensibilità e rapidità di risposta	Possibile rilevazione di colonizzazione asintomatica
Algoritmo diagnostico combinato	Approccio multiparametrico	Antigene + tossine + PCR	Migliore accuratezza diagnostica	Maggiore complessità organizzativa

**Tabella 5:** *Confronto tra i principali sistemi diagnostici utilizzati nel laboratorio di microbiologia per la diagnosi di CDI*

(Fonte: Johnson et al., 2021)

### 3.8 Metodiche per la valutazione della correttezza prescrittiva

L'analisi dell'appropriatezza prescrittiva rappresenta uno strumento fondamentale per migliorare la qualità delle cure e permettere un'ottimizzazione nell'utilizzo delle risorse sanitarie. In ambito microbiologico, l'esecuzione di test diagnostici non appropriati può generare conseguenze cliniche rilevanti, tra cui diagnosi errate, trattamenti antibiotici non necessari o aumento del rischio di resistenze antimicrobiche.

Per questo motivo, molti ospedali hanno implementato dei sistemi di controllo informatico integrati nei software gestionali di laboratorio, in grado di segnalare richieste potenzialmente inappropriate o ripetizioni di esami entro intervalli temporali non raccomandati.

Il presente progetto è stato condotto con l'obiettivo di valutare l'appropriatezza prescrittiva degli esami di laboratorio richiesti dai diversi reparti ospedalieri. Questo studio presenta anche un carattere retrospettivo, fondato sull'analisi delle richieste di esami di laboratorio, in particolare della ricerca diretta della presenza di *C. difficile*, registrate nel sistema informatico gestionale del laboratorio (LIS).

La raccolta dei dati è stata eseguita mediante Trackcare, una piattaforma informatica gestionale utilizzata per la gestione e l'archiviazione dei processi clinici e diagnostici all'interno della struttura ospedaliera. Questo approccio ha permesso l'accesso alle richieste di esami di laboratorio provenienti dai reparti diversi, osservando le informazioni associate a ciascuna correlazione, tra le quali:

- Tipologia di esami richiesto;
- Reparto o unità operativa richiedente;
- Data della richiesta;
- Eventuali informazioni cliniche associate alla prescrizione

Una volta estratti, i dati sono stati raccolti e organizzati utilizzando il software Microsoft Excel, come si può osservare successivamente nella sezione "Analisi dati". Excel è stato dunque utilizzato per:

- Organizzazione e sistematizzazione dei dati raccolti;
- Classificazione delle richieste di esami;
- Elaborazione e rappresentazione dei dati mediante tabelle e grafici riassuntivi;
- Calcolo delle frequenze delle prescrizioni e dell'appropriatezza;

La valutazione dell'appropriatezza prescrittiva è stata effettuata confrontando le richieste di esami di laboratorio con i criteri di appropriatezza, definiti dalla letteratura scientifica e dalle linee guida nazionali e internazionali.

In particolare, le analisi diagnostiche sono state effettuate considerando:

- Pertinenza clinica dell'esame richiesto rispetto al contesto clinico;
- Presenza di eventuali richieste ripetute in intervalli di tempo non appropriati (entro sette giorni dall'ultimo esame);
- Congruenza delle richieste con le indicazioni raccomandate dalle linee guida di laboratorio (Valore di scala Bristol  $\geq 5$ );
- Richiesta contemporanea di test di GDH e film Array gastrointestinale.

Questa analisi ha permesso di osservare pattern prescrittivi caratterizzati da richieste inappropriate o non ottimale dal punto di vista dell'utilizzo delle risorse diagnostiche.

## 4. RISULTATI E ANALISI DATI

L'interpretazione dei dati raccolti durante il periodo di osservazione deve essere inserita in un contesto epidemiologico più ampio. L'analisi delle richieste diagnostiche per la ricerca di *C. difficile* consente infatti di individuare pattern prescrittivi e di valutare il grado di adesione dei clinici alle linee guida internazionali.

Un aspetto di particolare rilevanza riguarda la distribuzione delle richieste provenienti dai diversi reparti ospedalieri. Reparti caratterizzati da una maggiore esposizione a terapie antibiotiche, come medicina interna, geriatria, terapia intensiva o i pazienti ambulatoriali tendono generalmente a presentare una frequenza più elevata di richieste diagnostiche per CDI.

L'analisi dei dati permette inoltre di evidenziare eventuali discrepanze tra il sospetto clinico e i criteri di appropriatezza diagnostica raccomandati. In alcuni casi, infatti, i test possono essere richiesti anche in assenza dei criteri clinici necessari, come la presenza di diarrea significativa o l'assenza di altre cause plausibili.

Di conseguenza, questa modalità di osservazione sottolinea l'importanza di programmi di formazione e sensibilizzazione rivolti al personale sanitario, finalizzati a migliorare l'appropriatezza delle prescrizioni diagnostiche e a promuovere una gestione più razionale delle risorse di laboratorio.

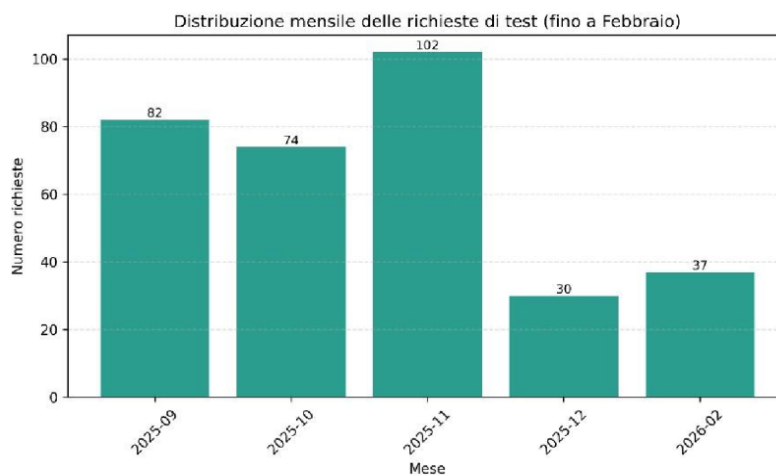
### 4.1 Valutazione Diagnostica

Dal punto di vista clinico, l'analisi dei risultati ottenuti consente di trarre alcune considerazioni importanti, riguardanti la gestione diagnostica della CDI all'interno della struttura ospedaliera. In primo luogo, l'utilizzo di un algoritmo diagnostico strutturato permette di migliorare significativamente l'accuratezza della diagnosi, riducendo il rischio di falsi positivi associati alla sola rilevazione del batterio.

L'integrazione tra test immunologici e metodiche molecolari rappresenta oggi uno degli approcci più efficaci nella diagnostica microbiologica della CDI. I test immunologici consentono una rapida identificazione dei campioni sospetti, mentre le tecniche molecolari permettono una caratterizzazione più precisa dei ceppi batterici.

Un ulteriore elemento di interesse riguarda la possibilità di identificare ceppi ipervirulenti, come il ribotipo 027, che risultano associati a quadri clinici più severi e a un maggiore rischio di trasmissione nosocomiale. La sorveglianza di questi ceppi rappresenta un elemento fondamentale per il controllo delle infezioni ospedaliere.

Nel periodo di tirocinio sono state prese in considerazione e valutate le richieste di esami provenienti dai diversi reparti ospedalieri e ambulatoriali, con la finalità di descrivere la distribuzione delle prescrizioni nel tempo, analizzando molteplici variabili associate all'epidemiologia clinica e all'appropriatezza prescrittiva. Come descritto in precedenza è stata condotta un'analisi mediante elaborazione dei dati raccolti in laboratorio quotidianamente, in correlazione ad una consultazione del referto clinico attraverso il sistema TrackCare e l'organizzazione dei dati tramite Microsoft Excel.



**Grafico 1:** *Distribuzione mensile del numero di richieste di test di GDH nel periodo di tirocinio*

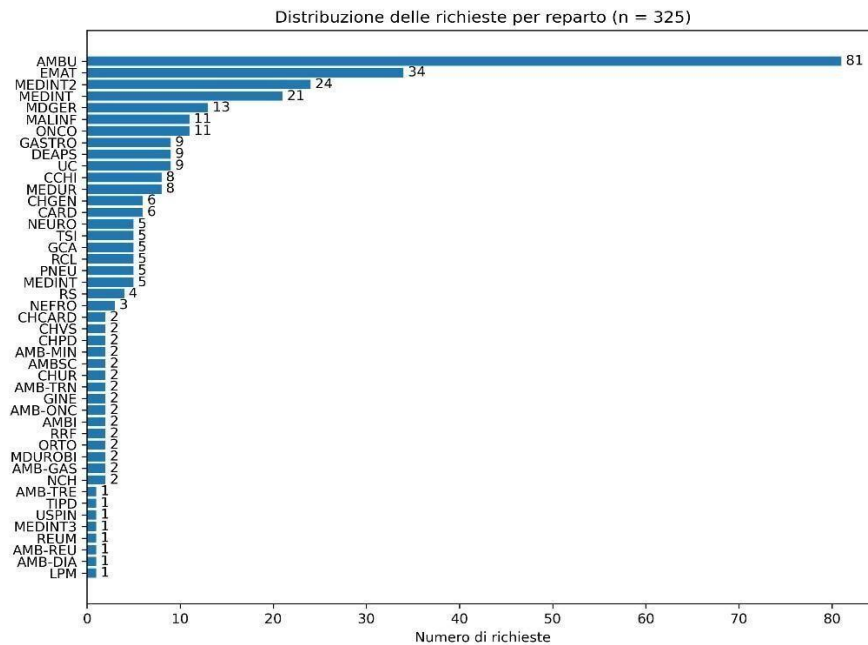
*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.)*

Nel grafico 1 si può osservare la suddivisione dei 325 campioni osservati durante il periodo di tirocinio per ogni mese, da settembre 2025 a febbraio 2026. La valutazione del volume mensile è un primo indicatore che permette la descrizione dell'attività diagnostica complessiva, in relazione al test per la ricerca di GDH. Per quanto riguarda il focus sull'appropriatezza prescrittiva, questo dato assume importanza in quanto permette di contestualizzare indicatori successivi, come un aumento del numero di richieste non legato a un miglioramento dell'attività diagnostica.

Successivamente le richieste pervenute sono state distribuite rispetto al reparto richiedente di provenienza (Grafico 2). Come mostrato nel grafico seguente, alcune unità operative sono responsabili della richiesta della maggior parte delle prescrizioni. Questo dato è correlato alla tipologia di pazienti gestiti nei diversi reparti e alla maggiore frequenza di sospetto clinico per l'infezione da *C. difficile*. In particolare, vengono interessati reparti che gestiscono pazienti fragili, più esposti a terapia antibiotica e più frequentemente ospedalizzati. Questo secondo dato è

fondamentale nell'ottica della stewardship diagnostica, in quanto vengono individuati i punti dove intervenire con efficacia, in termini di standardizzazione e sensibilizzazione dei criteri prescrittivi.

Dal punto di vista metodologico, l'analisi per reparto offre una distinzione tra elevata frequenza di richiesta giustificata e una possibile tendenza a un utilizzo eccessivo del test.

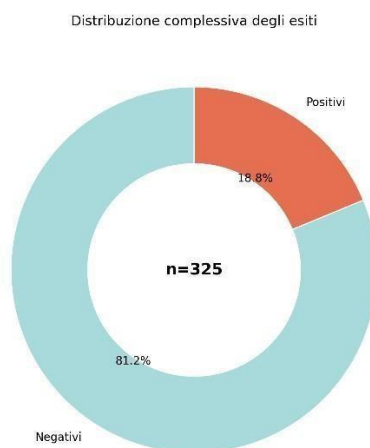


**Grafico 2:** *Distribuzione dei campioni per reparto richiedente*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS.*

*Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.)*

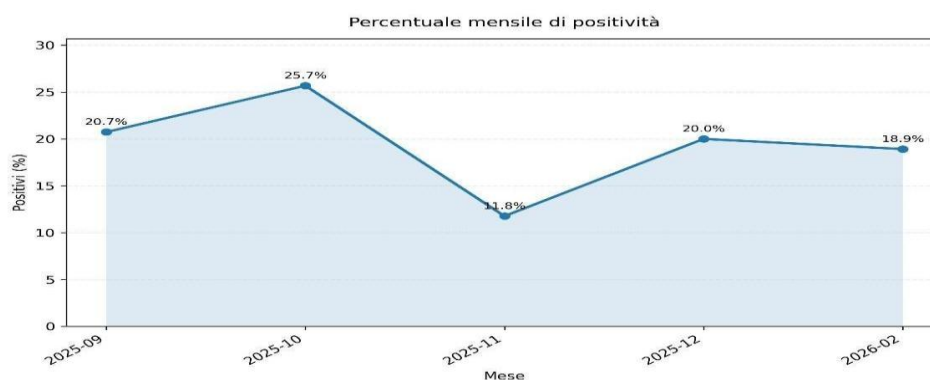
Gli esiti dei 325 campioni analizzati sono così distribuiti: 264 campioni negativi e 61 campioni positivi. Si può osservare questa distribuzione nel grafico 3. La prevalenza di esiti negativi è in linea con quanto si osserva solitamente nella pratica clinica; infatti, il test spesso è utilizzato con lo scopo di escludere la diagnosi di pazienti con sintomatologia sospetta. Questo aspetto dimostra ulteriormente la funzione del laboratorio come strumento che supporta il ragionamento clinico, e non solamente come strumento di conferma di casi già visibilmente probabili. Quindi la percentuale di pazienti risultati positivi corrisponde a circa il 18,8% del totale dei campioni esaminati, mentre i negativi rappresentano circa l'81,2%.



**Grafico 3:** *Distribuzione complessiva degli esiti dei test*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

In aggiunta alla distribuzione degli esiti, è stata osservata la percentuale mensile di positività, ottenuta mettendo a rapporto tutti i campioni positivi con il totale delle richieste per ciascun mese. Il risultato mostra l'andamento temporale della resa diagnostica del test per pazienti con CDI, ed è riportato nel grafico 4. Questo dato permette la descrizione della produttività clinico-diagnostica del processo prescrittivo mese per mese. Le variazioni riflettono diversi parametri: stagionalizzazione dell'affluenza e dell'ospedalizzazione, cambiamenti della sensibilità dei clinici verso il sospetto diagnostico di *C. difficile*, o una selezione diversa dei pazienti da sottoporre al test.



**Grafico 4:** *Andamento mensile delle percentuali di positività dei test per GDH*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

Tra i 325 campioni considerati, sono stati identificati 13 campioni ripetuti. In laboratorio, la ripetizione del test può essere giustificata solo in specifici contesti clinici o temporali, mentre la richiesta ravvicinata in assenza di nuove indicazioni può rappresentare un utilizzo non ottimale delle risorse.

La ripetizione del test risulta un indicatore chiave, derivante da vari fattori: persistenza della sintomatologia, richieste duplicate, oppure ricorso non standardizzato al test nei diversi reparti. La sola presenza di test ripetuti non è correlabile al concetto di inappropriatezza, ma rappresenta un parametro da monitorare attentamente, soprattutto in associazione ad altri parametri, come risultati precedenti recenti, campioni non ideali per il processo diagnostico o richieste eseguite contestualmente con altre metodiche.

Nel contesto di questo studio, il numero contenuto di test ripetuti è indice che la ripetizione non rappresenta il principale problema prescrittivo del campione analizzato. Tuttavia, il dato ha una rilevanza qualitativa, perché ogni ripetizione deve essere valutata in rapporto alla distanza temporale dalla precedente richiesta e al quadro clinico del paziente.

#### 4.2 Valutazione Appropriatezza prescrittiva

All'interno dello studio sono stati registrati 67 casi di discordanza. Questo parametro ha rilevanza metodologica, clinica e organizzativa, riflettendo in modo indiretto:

- la sensibilità e la specificità tra i test utilizzati nelle diverse fasi dell'infezione;
- le variazioni nella qualità del campione;
- la complessità interpretativa del percorso diagnostico per *C. difficile*.

In ambito laboratoristico, le discordanze rappresentano una delle aree più interessanti da analizzare, in quanto necessitano l'integrazione di risultati con un quadro clinico completo. La loro presenza non è automaticamente indice di errore, ma segnala quei casi dove viene richiesta particolare attenzione in seguito a lettura del risultato.

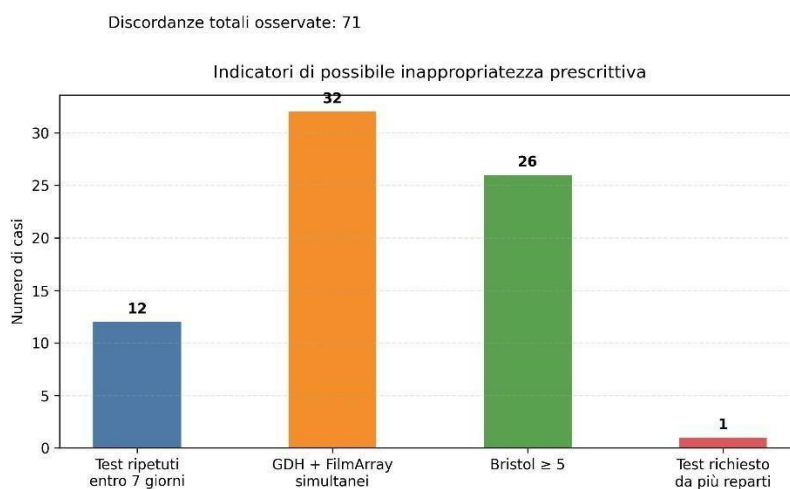
Le discordanze sono anche un elemento chiave nel contesto della complessità del processo prescrittivo; infatti, una quota significativa di risultati discordanti rende ancora più importante la motivazione per la richiesta del test, seguendo i criteri clinici condivisi e l'interpretazione laboratoristica supportata da un algoritmo diagnostico adeguato.

Al fine di offrire una valutazione dell'appropriatezza concreta e solida sono stati esplorati alcuni indicatori operativi specifici. Nel grafico 5 sono sintetizzati cinque categorie utili alla lettura critica del comportamento prescrittivo:

- test eseguiti entro 7 giorni dalla precedente richiesta: 12 casi;
- campioni con Scala di Bristol < 5: 26 casi;
- richieste simultanee di GDH e FilmArray: 32 casi;
- esami richiesti da più reparti contemporaneamente: 1

La presenza di campioni con Bristol inferiore a 5 può indicare una selezione non ottimale del campione; la contemporanea richiesta di più metodiche può riflettere un'adesione errata a un algoritmo sequenziale di laboratorio, mentre la contemporanea richiesta per lo stesso paziente da parte di reparti diversi suggerisce una mancata comunicazione ospedaliera inter-reparto.

Quindi il dato quantitativamente più rilevante è rappresentato dalle discordanze. Questi risultati suggeriscono che l'area più interessante, in termini di miglioramento della stewardship diagnostica, non sia tanto il numero assoluto di richieste, quanto piuttosto la qualità del percorso prescrittivo e interpretativo.



**Grafico 5:** Indicatori di inappropriata prescrittiva osservati

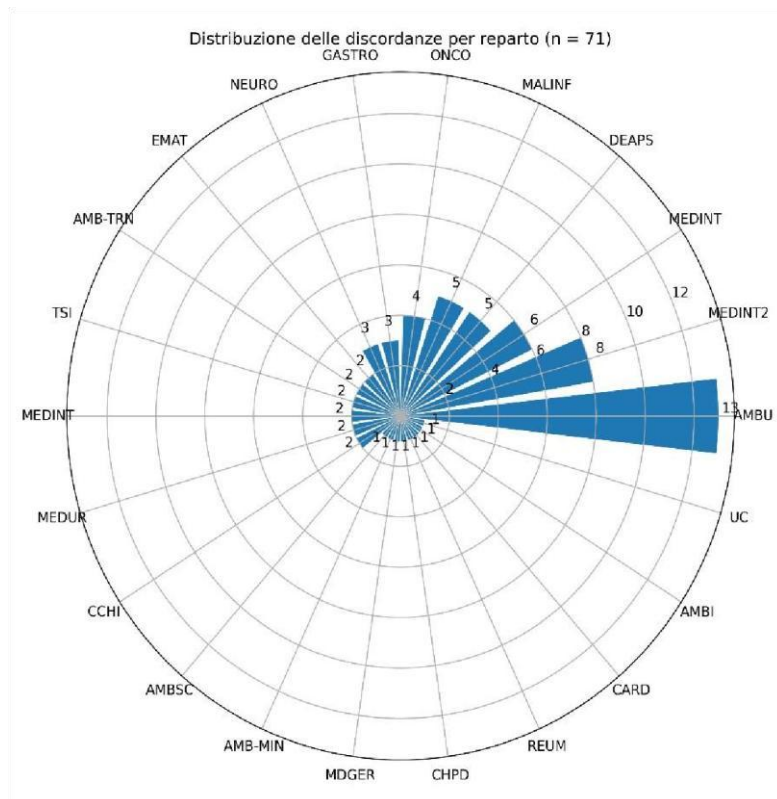
*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS.*

*Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

Un ulteriore analisi per approfondire il fenomeno dell'appropriatezza prescrittiva riguarda la distribuzione delle discordanze diagnostiche in relazione al reparto di provenienza delle richieste. L'identificazione del reparto richiedente rappresenta infatti uno strumento importante per la comprensione di specifiche criticità durante il percorso diagnostico. Nel periodo di interesse sono

state individuate 71 discordanze diagnostiche, distribuite tra diverse unità operative dell'ospedale. L'analisi della loro distribuzione per reparto consente di individuare concentrazioni di questi eventi in specifiche aree cliniche, verosimilmente correlate al volume di richiesta diagnostica e alla tipologia dei pazienti assistiti.

La rappresentazione grafica della distribuzione delle discordanze per reparto (Grafico 6) consente la visualizzazione immediata del relativo contributo che ogni unità operativa dà alla comparsa di tali eventi, fornendo uno strumento utile in termini di interpretazione valutativa dell'appropriatezza prescrittiva.



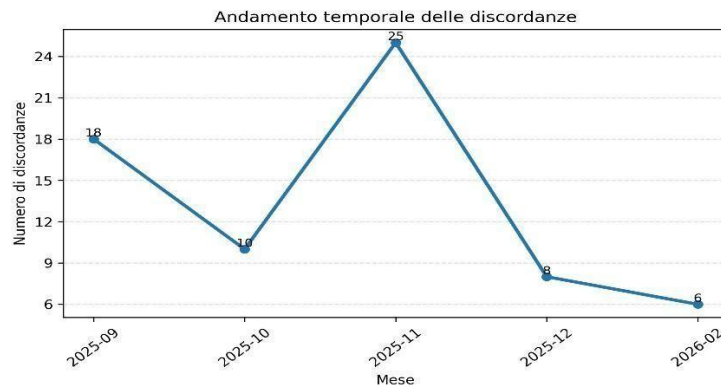
**Grafico 6:** *Distribuzione delle discordanze diagnostiche tra i diversi reparti di provenienza*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

L'approfondimento sul fenomeno delle discordanze diagnostiche osservate nel corso dello studio, è proseguito attraverso un'analisi del loro andamento temporale nel periodo considerato. Questa valutazione consente di comprendere se tali eventi si distribuiscono in modo uniforme nel tempo oppure se ci siano variazioni tra i diversi mesi del periodo analizzato (Grafico 7).

In primo luogo, è stato analizzato l'andamento complessivo delle discordanze su base mensile, per valutare eventuali fluttuazioni nel numero di casi osservati durante il periodo di studio. Tale analisi permette di

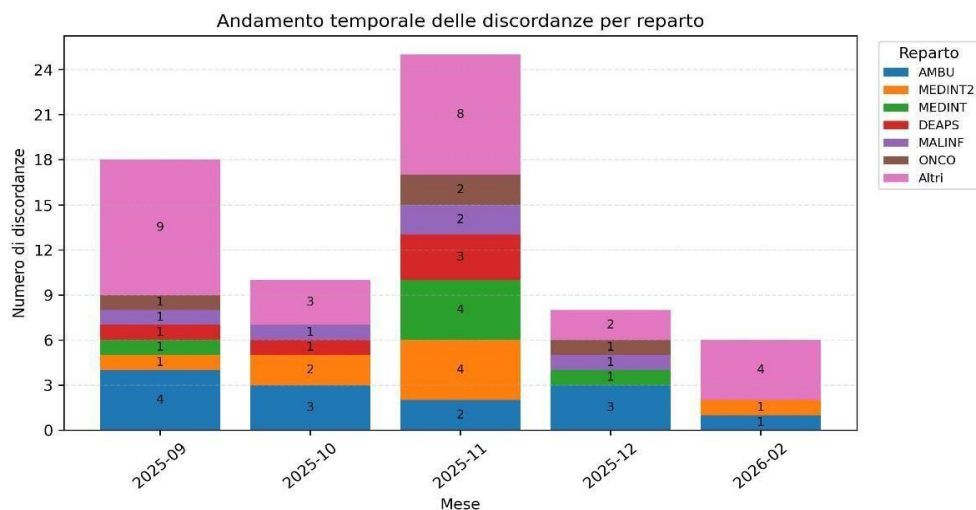
individuare possibili incrementi o riduzioni nel tempo della frequenza delle discordanze, fornendo una visione generale della loro distribuzione temporale.



**Grafico 7:** *Andamento totale delle discordanze mese per mese*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

Successivamente, l'analisi è stata approfondita considerando la provenienza delle richieste dai diversi reparti ospedalieri (Grafico 8). La valutazione della distribuzione temporale delle discordanze in relazione al reparto di origine consente infatti di evidenziare il contributo delle principali unità operative alla comparsa di tali eventi e di osservare eventuali differenze tra i diversi contesti clinico-assistenziali. La rappresentazione seguente mostra la distribuzione mensile nei principali reparti di provenienza delle richieste diagnostiche.



**Grafico 8:** *Andamento delle discordanze diagnostiche nei principali reparti interessati*

*(Fonte: elaborazione personale su dati del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria)*

La valutazione e osservazione dell'andamento temporale complessivo delle discordanze evidenzia come tali eventi siano distribuiti lungo tutto il periodo di studio, con un numero variabile di casi osservati nei diversi mesi. Sebbene non risulti un netto andamento crescente o decrescente, si osservano alcune oscillazioni nella frequenza delle discordanze che riflettono le variazioni nel volume delle richieste diagnostiche o nelle caratteristiche della popolazione di pazienti sottoposti a indagine.

L'approfondimento della distribuzione temporale in relazione al reparto di provenienza delle richieste permette di evidenziare come il contributo alle discordanze non sia distribuito in maniera omogenea e uniforme tra le diverse unità operative. Alcuni reparti risultano responsabili di una quota maggiore di discordanze nel corso del periodo analizzato, in relazione al più elevato numero di richieste diagnostiche provenienti da tali contesti assistenziali o alla tipologia dei pazienti assistiti.

L'analisi combinata dell'andamento temporale complessivo e della distribuzione per reparto consente quindi di ottenere una visione più completa del fenomeno, permettendo di individuare non solo quando si verificano con maggiore frequenza le discordanze, ma anche in quali contesti clinici esse risultano più frequentemente osservate. Tali informazioni rappresentano un elemento utile nell'ambito della valutazione dell'appropriatezza prescrittiva e possono contribuire all'identificazione di eventuali aree nelle quali potrebbero essere implementate strategie di miglioramento del percorso diagnostico.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Grazie a questo progetto è stato possibile analizzare l'approccio degli algoritmi diagnostici e dell'appropriatezza prescrittiva nella gestione dell'infezione da *Clostridioides difficile* (CDI) all'interno di un contesto ospedaliero. L'analisi è stata condotta su un totale di 325 campioni fecali raccolti durante il periodo di tirocinio, compreso tra settembre 2025 e febbraio 2026, presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria. Questo tipo di approccio ha consentito non solo di osservare l'attività diagnostica del laboratorio nel periodo considerato, ma anche di valutare il grado di aderenza dei comportamenti prescrittivi alle raccomandazioni delle linee guida internazionali e alle strategie di stewardship diagnostica (Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018).

L'infezione da *C. difficile* rappresenta attualmente una delle principali cause di diarrea associata all'assistenza sanitaria (Healthcare-Associated Infection, HAI). Studi epidemiologici internazionali hanno stimato un'incidenza compresa tra 2 e 7 casi ogni 10.000 giornate di degenza ospedaliera, con oltre 450.000 casi annui negli Stati Uniti (McDonald et al., 2018; Chilton et al., 2025). L'infezione comporta inoltre un significativo aumento della mortalità e dei costi sanitari, legati principalmente al prolungamento della degenza ospedaliera, alla necessità di isolamento dei pazienti e all'utilizzo di terapie antibiotiche specifiche (Seekatz et al., 2025). Questi dati evidenziano come la CDI rappresenti non solo un problema clinico rilevante, ma anche una sfida organizzativa ed economica per i sistemi sanitari, rendendo fondamentale l'adozione di strategie diagnostiche e terapeutiche appropriate.

Nel contesto del presente studio, l'analisi del volume di richieste diagnostiche ha permesso di osservare l'attività del laboratorio nel periodo considerato e di valutare l'andamento temporale delle prescrizioni. I 325 campioni analizzati rappresentano infatti un indicatore dell'intensità dell'attività diagnostica e del livello di sospetto clinico nei confronti della CDI nei diversi reparti ospedalieri. In particolare, è noto che reparti caratterizzati da una maggiore esposizione a terapia antibiotica, come medicina interna, geriatria e terapia intensiva, tendono a presentare un numero più elevato di richieste diagnostiche per questa infezione (Chilton et al., 2025; Dureja et al., 2022).

Dal punto di vista metodologico, il workflow diagnostico adottato nel laboratorio si basa su un algoritmo diagnostico a più livelli, che prevede una prima fase di screening mediante rilevazione dell'antigene GDH seguita dalla ricerca delle tossine A e B e, nei casi discordanti, dalla conferma mediante metodica molecolare NAAT basata su PCR in tempo reale. Questo approccio è attualmente raccomandato dalle principali linee guida internazionali, tra cui quelle dell'Infectious Diseases Society of America (IDSA) e della European Society of Clinical Microbiology and Infectious

Diseases (ESCMID), poiché consente di bilanciare sensibilità e specificità diagnostica, riducendo il rischio di falsi positivi o falsi negativi (Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018). Il test GDH è caratterizzato da una sensibilità molto elevata, generalmente superiore al 90–95%, ma presenta una specificità limitata, in quanto rileva sia ceppi tossigeni sia ceppi non tossigeni (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023).

I test immunologici per la ricerca delle tossine A e B mostrano invece una specificità più elevata ma una sensibilità inferiore, generalmente compresa tra il 60% e il 75% (Johnson et al., 2021). Per questo motivo l'utilizzo di algoritmi diagnostici a più step rappresenta attualmente la strategia più efficace per la diagnosi della CDI, in quanto consente di combinare i vantaggi delle diverse metodiche disponibili. In letteratura è ampiamente documentato che l'impiego di un algoritmo sequenziale migliora l'accuratezza diagnostica rispetto all'utilizzo di un singolo test, riducendo al tempo stesso il rischio di sovradiagnosi legata alla colonizzazione asintomatica da *C. difficile* (McDonald et al., 2018; Chilton et al., 2025).

Un elemento di particolare interesse emerso dal presente studio riguarda la presenza di 13 test ripetuti su un totale di 325 campioni analizzati. Questo dato corrisponde a circa il 4% delle richieste totali, suggerendo che la ripetizione del test non rappresenta la principale criticità nel contesto analizzato. Tuttavia, la ripetizione degli esami deve essere sempre valutata in relazione alla distanza temporale dalla precedente richiesta e al quadro clinico del paziente, poiché richieste ravvicinate non giustificate possono determinare un utilizzo non ottimale delle risorse diagnostiche (Johnson et al., 2021). Uno dei risultati più significativi emersi dall'analisi riguarda la presenza di 71 casi di discordanza diagnostica. Considerando il numero totale di campioni analizzati, questo valore rappresenta una quota rilevante del campione complessivo, circa il 21,9% dei campioni totali analizzati. Le discordanze costituiscono un aspetto particolarmente interessante dal punto di vista diagnostico, poiché riflettono la complessità dell'interpretazione dei risultati microbiologici nella CDI. In molti casi, esse possono essere attribuite alla differente sensibilità e specificità dei test utilizzati nelle diverse fasi dell'algoritmo diagnostico, alla qualità del campione biologico o alla presenza di colonizzazione asintomatica. È noto, infatti, che una quota variabile tra il 5% e il 15% dei pazienti ospedalizzati può essere colonizzata da *C. difficile* senza sviluppare sintomi clinici (Chilton et al., 2025; Wang et al., 2024).

Nel contesto dello studio, la valutazione dell'appropriatezza prescrittiva ha permesso di identificare diversi indicatori di potenziale inappropriatezza. Tra questi sono stati osservati:

- 12 test richiesti entro 7 giorni da una precedente richiesta;
- 26 campioni con scala di Bristol inferiore a 5;

- 32 richieste simultanee di GDH e FilmArray;
- 1 caso di richiesta simultanea da parte di reparti diversi.

Questi dati evidenziano come l'appropriatezza prescrittiva non dipenda esclusivamente dal numero di richieste diagnostiche, ma soprattutto dalla qualità del processo decisionale che porta alla richiesta del test.

La presenza di campioni con scala di Bristol inferiore a 5 rappresenta un indicatore importante di selezione non ottimale dei pazienti da sottoporre al test diagnostico. Le linee guida internazionali raccomandano infatti di eseguire il test per *C. difficile* esclusivamente in pazienti con diarrea significativa, definita come almeno tre evacuazioni non formate nelle 24 ore e in assenza di altre cause plausibili di diarrea (Johnson et al., 2021). L'esecuzione del test in assenza di tali criteri aumenta il rischio di identificare colonizzazioni asintomatiche e può condurre a trattamenti antibiotici non necessari, con potenziali conseguenze negative sul microbiota intestinale (Seekatz et al., 2025). Un ulteriore elemento di interesse riguarda la richiesta simultanea di test GDH e di pannelli diagnostici multipli come il FilmArray gastrointestinale. Questo comportamento prescrittivo può riflettere una mancata adesione all'algoritmo diagnostico sequenziale raccomandato dalle linee guida, determinando un utilizzo non ottimale delle risorse diagnostiche e un possibile incremento dei costi sanitari. L'introduzione di programmi di diagnostic stewardship ha dimostrato di ridurre significativamente questo fenomeno, migliorando l'aderenza alle linee guida e l'efficienza complessiva dei sistemi diagnostici (Johnson et al., 2021).

Nel presente progetto di tesi, il programma ospedaliero "Less is more" rappresenta un esempio concreto di applicazione di strategie di diagnostic stewardship. L'obiettivo principale di questo progetto è quello di migliorare l'appropriatezza delle richieste diagnostiche e ridurre gli sprechi sanitari attraverso l'adozione di protocolli condivisi tra clinici e microbiologi. In questo senso, i risultati ottenuti confermano l'importanza di un approccio multidisciplinare nella gestione della CDI, in cui la collaborazione tra laboratorio e reparti clinici rappresenta un elemento fondamentale per garantire un utilizzo appropriato delle risorse diagnostiche (Chilton et al., 2025).

Dal punto di vista epidemiologico, i risultati ottenuti confermano inoltre il ruolo centrale della CDI come infezione nosocomiale associata alla terapia antibiotica. È noto che oltre l'80–90% dei pazienti con CDI presenta una storia recente di esposizione ad antibiotici, in particolare fluorochinoloni, cefalosporine e clindamicina (Dureja et al., 2022). Questi farmaci possono alterare profondamente la composizione del microbiota intestinale, riducendo la resistenza alla colonizzazione e favorendo la proliferazione del patogeno (Seekatz et al., 2025).

Un ulteriore aspetto rilevante riguarda l'identificazione di ceppi ipervirulenti, come il ribotipo 027, che rappresenta uno dei principali responsabili delle epidemie ospedaliere osservate negli ultimi

decenni. Questo ceppo è caratterizzato da una maggiore produzione di tossine e da una maggiore capacità di diffusione all'interno di ambienti sanitari (Wen et al., 2025). Nel contesto del presente studio, i campioni positivi per ribotipo 027 o per tossina binaria sono stati conservati mediante congelamento per eventuali studi successivi, con l'obiettivo di supportare attività di sorveglianza epidemiologica e ricerca laboratoristica.

Nel complesso, i risultati ottenuti nel presente studio appaiono sostanzialmente concordi con quanto riportato nella letteratura scientifica sulla diagnosi e sulla stewardship diagnostica dell'infezione da *Clostridioides difficile*. In particolare, l'adozione di un algoritmo diagnostico a più step, basato su screening con antigene GDH, ricerca delle tossine e conferma molecolare nei casi discordanti, risulta in linea con le raccomandazioni delle linee guida internazionali, che indicano questo approccio come il più appropriato per bilanciare sensibilità e specificità diagnostica e per ridurre il rischio di sovradiagnosi legato alla colonizzazione asintomatica (Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018). Anche nel presente studio, infatti, le discordanze osservate confermano che la diagnosi di CDI non può basarsi su un singolo test, ma richiede sempre un'integrazione tra dato microbiologico e contesto clinico, in accordo con quanto già evidenziato in letteratura.

Anche i dati relativi all'appropriatezza prescrittiva risultano concordi con studi precedenti, secondo cui una quota non trascurabile delle richieste diagnostiche per *C. difficile* può essere considerata non pienamente appropriata, soprattutto quando il test viene richiesto in assenza di diarrea significativa, su campioni non idonei oppure con ripetizioni ravvicinate non giustificate. In particolare, il dato secondo cui fino al 20–30% delle richieste può risultare inappropriato supporta l'interpretazione dei risultati osservati, collocando il presente studio in un quadro coerente con quanto già descritto in altri contesti ospedalieri (McDonald et al., 2018).

Per quanto riguarda le discordanze diagnostiche, anche questo elemento appare in linea con la letteratura, che sottolinea come esse rappresentino una componente attesa e clinicamente rilevante del percorso diagnostico della CDI, più che un'anomalia metodologica. La presenza di risultati discordanti può infatti riflettere le differenti performance dei test, la qualità del campione, la fase dell'infezione o la presenza di colonizzazione asintomatica; pertanto, i risultati del presente studio non si pongono in contrasto con i dati precedenti, ma anzi confermano la complessità interpretativa già descritta da linee guida e review recenti (Johnson et al., 2021; Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, 2023).

Dal punto di vista epidemiologico, i risultati del presente lavoro risultano ancora una volta concordi con gli studi precedenti che identificano la CDI come infezione fortemente associata all'assistenza sanitaria e all'esposizione antibiotica. Anche il riferimento ai ceppi iper-virulenti, come il ribotipo 027, si inserisce in modo coerente nel quadro già delineato da studi precedenti, che associano questi

ceppi a una maggiore produzione di tossine e a un più elevato potenziale epidemico in ambito ospedaliero (Wen et al., 2025; Chilton et al., 2025).

Nel complesso, quindi, il presente studio non mostra elementi di reale contrasto con la letteratura, ma si colloca piuttosto in una posizione di conferma dei principali dati già noti. L'aspetto originale non risiede tanto nell'identificazione di risultati opposti rispetto alla letteratura, quanto nell'aver documentato, in un contesto ospedaliero specifico, come le criticità diagnostiche e prescrittive descritte in letteratura siano effettivamente presenti anche nella pratica quotidiana e possano essere intercettate mediante un approccio strutturato di diagnostic stewardship. In questo senso, il progetto "Less is more" rappresenta un'applicazione concreta e locale di principi già supportati dalla letteratura internazionale, confermandone la validità anche nel contesto osservato.

Nonostante i risultati ottenuti forniscano indicazioni utili sul ruolo degli algoritmi diagnostici e dell'appropriatezza prescrittiva nella gestione della CDI, il presente studio presenta alcune limitazioni che devono essere considerate nell'interpretazione dei dati. In primo luogo, l'analisi è stata condotta in un singolo centro ospedaliero e su un periodo temporale limitato, compreso tra settembre 2025 e febbraio 2026. Questo aspetto potrebbe limitare la capacità di generalizzare i risultati ad altri contesti sanitari caratterizzati da differenti organizzazioni laboratoristiche, popolazioni di pazienti o pattern prescrittivi (Chilton et al., 2025; Seekatz et al., 2025). Inoltre, l'analisi si è basata principalmente su dati derivanti dalle richieste diagnostiche registrate nel sistema informatico del laboratorio e sulla valutazione di indicatori di appropriatezza prescrittiva, senza includere in maniera sistematica ulteriori variabili cliniche dei pazienti, come la gravità del quadro clinico, la storia terapeutica completa o l'esito clinico dell'infezione. L'integrazione di queste informazioni potrebbe consentire, in studi futuri, una valutazione ancora più approfondita dell'impatto clinico delle strategie diagnostiche adottate (Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018).

Un ulteriore limite riguarda il carattere prevalentemente descrittivo dell'analisi statistica. Sebbene questo approccio sia adeguato a una prima valutazione dei comportamenti prescrittivi e dell'attività diagnostica del laboratorio, studi futuri potrebbero prevedere analisi statistiche più approfondite e l'inclusione di un numero maggiore di campioni, al fine di identificare eventuali associazioni tra specifici fattori clinici e risultati diagnostici (Seekatz et al., 2025; Dureja et al., 2022).

In prospettiva futura, questo potrebbe essere supportato dallo sviluppo di programmi strutturati di stewardship diagnostica, attraverso l'implementazione di sistemi informatici avanzati all'interno dei software gestionali di laboratorio. L'introduzione di sistemi di alert automatici o di blocco delle richieste ripetute entro intervalli temporali non raccomandati potrebbe infatti sostenere il personale clinico nella fase di prescrizione degli esami e favorire una maggiore aderenza alle linee guida (Johnson et al., 2021; McDonald et al., 2018). Ad esempio, uno studio condotto nel 2020, ha osservato

una riduzione del 41% delle richieste di test per *C. difficile* dopo l'introduzione di un sistema di alert nel software di prescrizione, migliorando al contempo l'appropriatezza diagnostica (Boly et al., 2020).

Un altro ambito di sviluppo riguarda il rafforzamento delle attività di sorveglianza epidemiologica delle infezioni da *Clostridioides difficile*. Il monitoraggio continuo dei casi diagnosticati in laboratorio, associato alla raccolta sistematica di dati clinici ed epidemiologici, potrebbe permettere di individuare precocemente eventuali variazioni nell'incidenza della malattia o la diffusione di ceppi particolarmente virulenti, come il ribotipo 027. In questo contesto, la conservazione dei campioni positivi osservata durante il presente studio rappresenta un'importante opportunità per future indagini microbiologiche e molecolari (Wen et al., 2025; Chilton et al., 2025).

Infine, il rafforzamento della collaborazione tra laboratorio di microbiologia, clinici e servizi di controllo delle infezioni rappresenta un elemento fondamentale per garantire una gestione integrata e multidisciplinare della CDI. L'adozione di protocolli condivisi, l'aggiornamento continuo del personale sanitario e l'implementazione di strategie di antimicrobial e diagnostic stewardship potranno contribuire in maniera significativa al miglioramento dei percorsi diagnostici e alla riduzione dell'impatto clinico ed epidemiologico di questa infezione (Dureja et al., 2022; Seekatz et al., 2025).

Dal punto di vista personale e formativo, l'esperienza di tirocinio e lo sviluppo del presente progetto di tesi hanno rappresentato un'importante occasione di crescita non solo professionale ma anche umana. L'attività svolta all'interno del laboratorio di microbiologia mi ha permesso di entrare in contatto diretto con la realtà della pratica clinico-diagnostica ospedaliera, comprendendo come il lavoro di laboratorio non sia un processo isolato, ma parte integrante di un sistema complesso in cui collaborano diverse figure professionali, con l'obiettivo comune di garantire la migliore assistenza possibile al paziente.

Durante questo percorso ho avuto la possibilità di sviluppare maggiore senso critico nell'analisi dei dati, precisione nell'osservazione delle procedure diagnostiche e consapevolezza dell'importanza delle scelte effettuate nel contesto sanitario. Ho inoltre potuto apprezzare il valore della collaborazione tra professionisti, dell'organizzazione del lavoro e della responsabilità che ogni operatore sanitario assume nel proprio ruolo.

Questa esperienza ha contribuito a rafforzare non solo le mie competenze scientifiche e metodologiche, ma anche la mia sensibilità nei confronti dell'impatto che l'attività diagnostica può avere sulla gestione clinica dei pazienti. Il contatto con l'ambiente ospedaliero mi ha permesso di

comprendere come dietro ogni campione analizzato vi sia una persona e una storia clinica, rafforzando così la consapevolezza del valore umano che accompagna il lavoro nel campo della salute.

In questo senso, il percorso svolto rappresenta non soltanto una tappa conclusiva del mio percorso universitario, ma anche un'importante base di partenza per il futuro professionale, fornendomi strumenti, competenze e motivazioni per affrontare con responsabilità e consapevolezza le sfide del lavoro nel campo biomedico.

## 6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- **Seekatz AM, Abt MC, Young VB et al.** Advances in understanding the pathogenesis of *Clostridioides difficile* infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2025;39(3).
- **Chilton CH, Viprey V, Normington C et al.** Pathogenesis and control of *Clostridioides difficile*. *Nat Rev Microbiol.* 2025;23(8).
- **Wen X, Liu X, Wan K et al.** Mechanisms of *Clostridioides difficile* glucosyltransferase toxins and their roles in pathology. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025; 15:1641564.
- **Wang L, Villafuerte Gálvez JA, Lee C et al.** Understanding host immune responses in *Clostridioides difficile* infection: implications for pathogenesis and immunotherapy. *Immunotherapy.* 2024;16(5).
- **Poxton IR, McCoubrey J, Blair G.** The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(8):421-427.
- **Dureja C, Olaitan AO, Hurdle JG.** Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Curr Opin Microbiol.* 2022; 65:83-90.
- **Wickramage I, Spigaglia P, Sun X.** Antibiotic resistance mechanisms of *Clostridioides difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(11):2899-2910.
- **Buddle JE, Fagan RP, Smith A et al.** Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence.* 2023;14(1):2150452.
- **Alam MZ, Madan R, Singh P et al.** *Clostridioides difficile* toxins: interactions with host cells and their role in pathogenesis. *Toxins (Basel).* 2024;16(6):241.
- **Cheng JKJ, Unnikrishnan M, Smith R et al.** *Clostridioides difficile* infection: navigating host-pathogen interactions in the gut. *Microbiology (Reading).* 2023;169(3):001306.
- **Alam MZ, Markantonis JE, Fallon JT et al.** Host immune responses to *Clostridioides difficile* infection and potential novel therapeutic approaches. *Trop Med Infect Dis.* 2023;8(12):506.
- **Awad MM, Johanesen PA, Carter GP et al.** Virulence factors of the sporulating anaerobe *Clostridium difficile*. *Virulence.* 2014;5(6).
- **Eriksen LL, Støy S, Hansen MM et al.** Dynamics of circulating immune cell subsets after fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Clin Transl Gastroenterol.* 2026;17(1): e1008.

- **Vitiello A, Sabbatucci M, Zovi A et al.** Advances in therapeutic strategies for management of *Clostridioides difficile* infection. *J Clin Med.* 2024;13(5):1331.
- **Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs.** Laboratory testing algorithms and performance for *Clostridioides difficile*: review of external quality assessments 2012–2023. 2023.
- **Cosimato I, Brescia A, Franci G et al.** Emerging therapeutic approaches for gut microbiota modulation. *Pharmaceutics.* 2026;18(2):197.
- **Quinn-Bohmann N, Carr AV, Gibbons SM et al.** Metabolic modeling reveals determinants of probiotic and prebiotic treatment efficacy across multiple human clinical studies. *PLoS Biol.* 2026;24(1): e3003638.
- **Chen HM, Yang TW, Ko WC et al.** Smoking and *Clostridioides difficile* colonization in adults  $\geq 40$  years: a community-based microbiota study. *Infect Drug Resist.* 2026;19.
- **McDonald LC, Gerding DN, Johnson S et al.** Clinical practice guidelines for *Clostridioides difficile* infection in adults and children: 2017 update by IDSA and SHEA. *Clin Infect Dis.* 2018;66(7): e1-e48.
- **Johnson S, Lavergne V, Skinner AM et al.** Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin Infect Dis.* 2021;73(5): e1029-e1044.
- **Van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH et al.** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(Suppl 2): S1-S21.
- **European Centre for Disease Prevention and Control.** European surveillance of *Clostridioides difficile* infections. Stockholm: ECDC; 2019.
- **Istituto Superiore di Sanità.** Sorveglianza delle infezioni da *Clostridioides difficile*. Roma: ISS.
- **Azienda Sanitaria Locale AL.** Raccomandazioni per la diagnosi, il trattamento, la prevenzione e il controllo dell'infezione da *Clostridioides difficile*. Alessandria: ASL AL; 2024.
- **Rocchetti A (ed.).** *Il microbiota, la nonna e l'UPO*. Pavia: PAGEPress Publications; 2025.
- **Medicalive R.** L'epigenetica e l'olobionte umano-microbiota. 2021 Jun 30. Available from: <https://medicalive.it/lepigenetica-e-olobionte-umano-microbiota/>

- **Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K et al.** A new view of the tree of life. *Nat Microbiol.* 2016;1(5).
- **Martirosian G, Ekiel A, Aptekorz M et al.** Fecal lactoferrin and *Clostridium* spp. in stools of autistic children. *Anaerobe.* 2011;17(1):43-45.
- **Medicina Informa.** Trapianto di microbiota per le infezioni intestinali resistenti. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=cmRm2ISnN6M>
- **Istituto Superiore di Sanità. Centro Nazionale Trapianti.**  
Available from: <https://www.iss.it/centro-nazionale-trapianti>
- **Porcari S, Benech N, Valles-Colomer M et al.** Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: from microbiome to clinic. *Cell Host Microbe.* 2023;31(5):712733.
- **Cui B, Li P, Xu L et al.** Step-up fecal microbiota transplantation strategy. *Gut Microbes.* 2016;7(4):323-328.
- **Ramai D, Zakhia K, Fields PJ et al.** Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods and cost-effectiveness. *Ann Gastroenterol.* 2018.
- **Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016).** *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16020.
- **Leffler DA, Lamont JT (2015).** *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1539-1548.
- **Boly FJ, Reske KA, Kwon JH.** The Role of Diagnostic Stewardship in *Clostridioides difficile*. Testing: Challenges and Opportunities. *Current Infectious Disease Reports.* 2020;22(3):7.

## 7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Dottor Andrea Rocchetti per avermi permesso di svolgere il mio personale percorso di tirocinio formativo e il progetto di tesi magistrale presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell’Azienda Ospedaliera Universitaria SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, per la disponibilità nei miei confronti e le nozioni che mi ha trasmesso con passione.

Un ringraziamento sincero e di cuore anche a tutto il personale tecnico del Laboratorio di Microbiologia e Virologia, per gli insegnamenti delle metodiche e procedure laboratoristiche da utilizzare, e per il tempo dedicatomi.

Ringrazio la Professoressa Elisa Gamalero, nonché relatrice di questa tesi, per la sua dedizione e pazienza nel seguirmi in ogni passaggio della tesi e per la sua disponibilità nel fornirmi tutti gli strumenti e l’aiuto necessario per la stesura di questo elaborato finale.

Il Ringraziamento più sincero va ai miei genitori, protagonisti di questa tesi in quanto è a Voi che la dedico. Grazie per il costante supporto, sostegno e fiducia che mi dimostrate ogni giorno, per avermi seguito in questo percorso universitario giunto al termine ma soprattutto per tutte le piccole azioni quotidiane fatte con amore. Spero di rendervi orgogliosi di me almeno la metà di quanto voi rendete me.

Ringrazio i miei fratelli, Jacopo e Nicholas, mia cugina Eleonora e tutta la mia famiglia per credere sempre in me e seguirmi con entusiasmo e curiosità in tutto ciò che faccio. Grazie anche a tutti i miei amici, in particolare a Fede e Edo, compagni di risate e momenti indimenticabili.

Grazie a Giulia, mia compagna di vita che con amore, orgoglio nei miei confronti e pazienza mi ha aiutato ad affrontare tutte le sfide personali con entusiasmo, sapendo di potermi affidare in maniera stabile al suo consiglio.

Infine, un ringraziamento speciale va a me stesso, per la tenacia, l’impegno e la costanza dimostrati durante questi anni accademici, nonostante gli impegni sportivi ed extra-universitari. Ho la certezza di aver agito sempre in buona fede seguendo le mie idee, e continuerò a farlo per i miei prossimi progetti e scelte future, con l’unico obiettivo di rendere orgogliose le persone a cui tengo con tutto il mio cuore.

*Alessandria, 27.03.2026*

*Christian*