

**STUDIO PILOTA DELLA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA
*CLOSTRIDIODES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE***

PROGETTO “SOSTEGNO ALLA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI CORRELATE ALL’ASSISTENZA ANCHE A SUPPORTO DEL
PNCAR”, FINANZIATO DAL CENTRO NAZIONALE PER LA PREVENZIONE E IL CONTROLLO DELLE MALATTIE (CCM) E
COORDINATO DALL’ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (ISS)

**BREVE GUIDA ALLA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* E
ALL’ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI *C. DIFFICILE***

Versione 2.0 del 17/03/2022

RESPONSABILE SCIENTIFICO DELLO STUDIO

Patrizia Spigaglia

Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento Malattie Infettive

Reparto Antibiotico Resistenza e Patogeni Speciali (ARPS)

Tel. 06 4990 2822

patrizia.spigaglia@iss.it

GRUPPO DI LAVORO DELLA SORVEGLIANZA DELLE CDI

Fabrizio Barbanti

Roberta Creti

Paolo D'Ancona

Patrizia Spigaglia

Dipartimento di Malattie Infettive - Istituto Superiore di Sanità

Maria Adriana Cataldo

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) Lazzaro Spallanzani

Nicola Petrosillo

Servizio Controllo delle Infezioni e Consulenze Infettivologiche, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico

Maria Luisa Moro

Enrico Ricchizzi

Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale - Regione Emilia-Romagna

1. Riferimenti bibliografici

La presente guida riporta in forma ridotta e in lingua italiana le raccomandazioni dell'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) sulla diagnosi delle CDI e sull'isolamento ed identificazione di *C. difficile*. I riferimenti bibliografici seguiti nella preparazione della guida sono i seguenti:

- a) European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection. Stockholm: ECDC; 2018.
- b) European Centre for Disease Prevention and Control. European Surveillance of Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* infections. Surveillance protocol version 2.4. Stockholm: ECDC; 2019.

2. Diagnosi della CDI

Nelle Procedure Operative Standard (SOP) dell'ECDC viene sottolineato che:

- Nessun test attualmente in commercio può essere utilizzato singolarmente (stand-alone test) per la diagnosi della CDI
- Si raccomanda l'uso di un algoritmo diagnostico a due step, che includa un test per l'identificazione delle tossine libere nelle feci (**Tabella 1**).
- Per i campioni di feci negativi per la presenza di tossine libere di *C. difficile* ma positivi al saggio immunoenzimatico (EIA) per l'antigene glutammato deidrogenasi (GDH), si dovrà eseguire un ulteriore test molecolare (NAAT) o un test di coltura tossinogenica per discernere i casi di infezione da quelli di portatore asintomatico, con una attenta valutazione clinica del paziente.

Tabella 1. Algoritmi diagnostici per la diagnosi di *C. difficile* raccomandati da ESGCD e ESCMID

Categorization of CDI diagnostics	CDI diagnostic algorithm		
	First test	Second test	Optional third test
ESCMID-recommended	NAAT	Toxin A/B EIA	N/A
	GDH EIA	Toxin A/B EIA	NAAT or toxigenic culture
	GDH and Tox A/B EIA	NAAT or toxigenic culture*	N/A
Not recommended	All other algorithms		

3. Isolamento di *C. difficile*

- Le feci possono essere direttamente inoculate su terreno selettivo (ad esempio: taurocolato-cefoxitin-cycloserine agar [TCCA], cefsulodin-cycloserine-egg yolk agar [CCEY], terreni cromogeni come CLO medium e chromID *C. difficile* agar).
- Per aumentare la selettività è consigliabile eseguire uno shock alcolico o termico precedentemente all'inoculo.

Shock alcolico:

- Prelevare ~1 mL o una piccola porzione di feci per preparare una sospensione 1:1 in 70% di alcool metilico o 96% etanolo.
- Vortex e lasciare a temperatura ambiente per 45 min.
- Inoculare 2 gocce (circa 50 - 75 μ L) della sospensione su una piastra selettiva e seminare ad isolamento.
- Trasferire immediatamente la piastra in una giara o una cabina anaerobica e incubare a 35/37°C per 24 - 48 h (preferibilmente 48 h).

Shock termico:

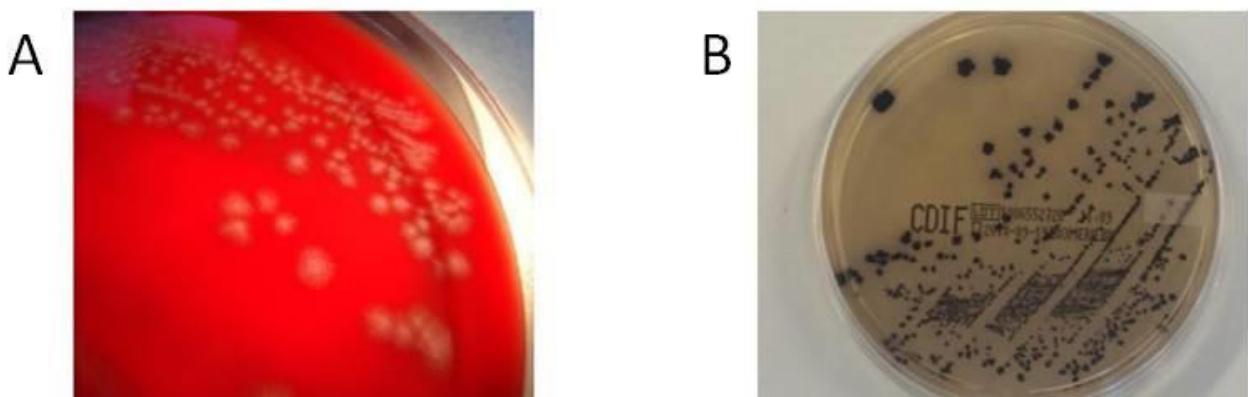
- Mescolare ~1 mL o una piccola porzione di feci a 1 mL PBS e riscaldare a 80 °C per 10 min.
- Centrifugare (4 000 x g per 1 min) e inoculare 100 μ L di supernatante su una piastra selettiva e seminare ad isolamento
- Trasferire immediatamente la piastra in una giara o in una cabina anaerobica e incubare a 35/37°C per 24 - 48 h (preferibilmente 48 h).

- Alcuni supplementi come il taurocolato possono stimolare la germinazione delle spore.
- Le colonie fresche (vegetative) su agar selettivo sono sensibili all'ossigeno quindi le piastre non vanno esposte all'aria per più di 30 min.
- Diversamente, le colonie mature (sporulanti) su agar non selettivo sono tolleranti all'ossigeno e possono rimanere sul bancone per alcuni giorni.

4. Identificazione e conferma delle colonie come isolati di *C. difficile*

- L'identificazione può essere eseguita tramite la valutazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie che possono variare nella dimensione (diametro <1–5 mm) anche sulla stessa piastra (**Fig.1**).
- Colorazione Gram: bacilli Gram+ con spore sub-terminali.
- Luce UV: fluorescenza giallo-verde.

Fig. 1: Colonie di *C. difficile* su Agar Sangue (A) e terreno cromogeno (B)



NB: Su terreno cromogeno le colonie di alcuni ribotipi (RT) di *C. difficile* possono apparire non pigmentate (ad es. RT 023, 056, 058, 059 e 248 sul chromID *C. difficile* agar).

Conferma isolamento:

L'isolamento di *C. difficile* può essere confermato tramite:

- PCR per il gene per la glutammato deidrogenasi (GDH) o trioso fosfato isomerasi (TPI)
- Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)
- Saggio di agglutinazione con metodi che utilizzano *C. difficile* latex slide.
- Dischetti di Prolina-aminopeptidasi

Identificazione delle tossine:

L'identificazione delle tossine di *C. difficile* può essere eseguita tramite:

- Multiplex PCR che ha come target i geni delle tossine A, B e binaria (CDT) di *C. difficile*.
- Test di neutralizzazione citotossica (CCNA).
- Test immunoenzimatico (EIA) per le tossine A e B di *C difficile*.

Controllo di qualità:

Utilizzare sempre un ceppo di *C. difficile* noto come controllo per tutti i test.