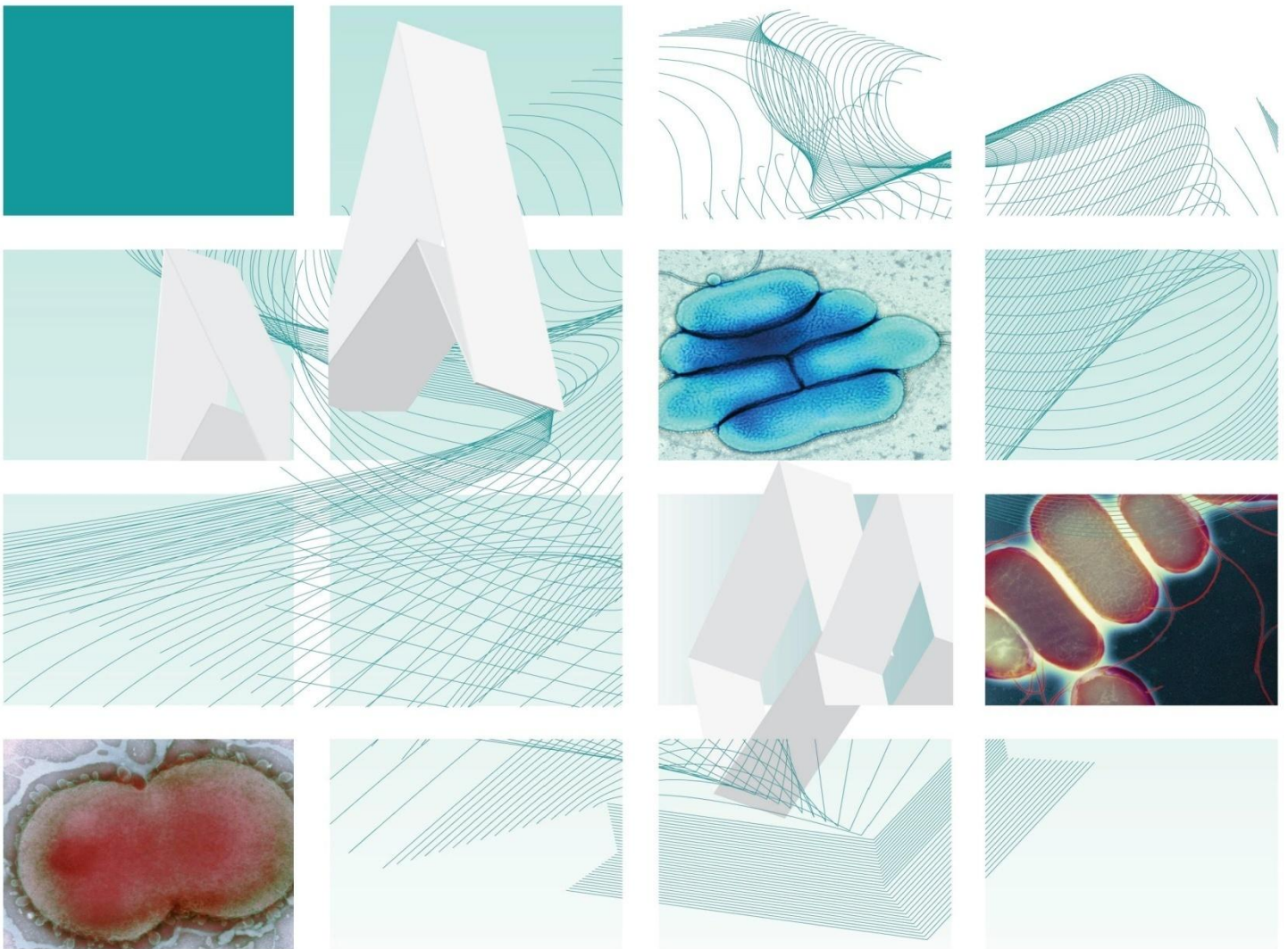




# UK Standards for Microbiology Investigations

## Ricerca di *Clostridium difficile* nelle feci



## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit  
Microbiology Services  
Public Health England  
61 Colindale Avenue  
London NW9 5EQ

E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

Website: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la azione di:



## Contenuti

---

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE .....	4
SMI RU: SCOPO E OBIETTIVO.....	6
SCOPO DEL DOCUMENTO .....	8
SCOPO .....	8
INTRODUZIONE.....	8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI .....	10
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA .....	11
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE.....	11
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE .....	12
4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE .....	12
5 PROCEDURA DI REFERTAZIONE .....	18
6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	20



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accREDITAMENTO è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accREDITAMENTO possono essere consultate: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation).

Per ulteriori informazioni sul nostro accREDITAMENTO consultare: : [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

## Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	6/03.09.18
Emissione eliminata. no	1.5
Emissione inserita no.	1.6
<b>Sezione(i) interessate</b>	<b>Modifica.</b>
Campione processing/procedure.	<p>Nella sezione 4. 3.1, il metodo dello shock alcolico è stato chiarito e reso più facile da comprendere per gli utenti.</p> <p>I tempi per l'incubazione sono stati aggiornati da 30 minuti a 60 minuti e sono stati aggiunti riferimenti bibliografici di documentazione.</p> <p>Sezione 4.6 aggiornata con informazioni sul livello minimo di identificazione in laboratorio.</p> <p>Alcune informazioni precedentemente contenute nella sezione 4. 5 sono trasferite alla sezione 4.3.1 per migliorare la lettura.</p>
Intero documento	Contenuto scientifico immutato.

Modifica No/Data.	5/02.04.14
Emissione eliminata. no	1.4
Emissione inserita no.	1.5
<b>Sezione(i) interessate/Pagina no.</b>	<b>Modifica.</b>
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di "Stato come Scopo" e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>Revisionati e aggiornati Standard di sicurezza e referenti delle denunce</p>

	Il contenuto scientifico rimane invariato.
--	--

Modifica No/Data.	4/29.03.12
Emissione eliminata. no	1.3
Emissione inserita no.	1.4
<b>Sezione(i) interessate/Pagina no.</b>	<b>Modifica.</b>
Documento intero.	<p>Documento presentato in nuovo formato.</p> <p>Il termine " contenitore a tenuta ermetica con marchiatura CE " sostituisce quello di " contenitore impermeabile sterile " (ove appropriato) e si riferisce al testo specifico nell'ambito della Direttiva UE per Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) e alla direttiva stessa EC<sup>1,2</sup>.</p> <p>Edito per chiarezza</p> <p>Riorganizzazione di parte del testo</p> <p>Minori modifiche del testo</p>
Informazione Tecnica/Limitazioni	Il testo descrive l'uso del termine contenitore impermeabile con marchiatura CE inserito.
Sezioni di prelievo campioni, trasporto, conservazione e procedura	Riorganizzati con ri-numerazione relativa.
Denuncia all'HPA	Aggiunto testo standard .
Bibliografia.	Bibliografia e ipercollegamenti in parte aggiornati

## SMI del RU<sup>#</sup>: Scopo e Obiettivo

### Utilizzatori delle SMI del RU

Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive. Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di test appropriati. I documenti forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute sia clinica che pubblica per la propria popolazione.

### Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati). Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova.

La standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori che è una condizione essenziale per interventi di sorveglianza della salute pubblica, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

La standardizzazione delle procedure diagnostiche tramite l'applicazione delle SMI aiuta a garantire uniformità nelle strategie di ricerca nei diversi laboratori nel RU ed è una condizione essenziale per la sorveglianza della salute pubblica, ricerca e sviluppo di attività.

### Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto in condizione paritaria da PHE, NHS, Royal College of Pathologists e organizzazioni professionali. L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnershipshttp>. L'inclusione del logo di un'organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del Comitato Direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano. I rappresentanti agiscono da tramite con funzione di collegamento bi-direzionale per informazione e dialogo. Le attività di rappresentanza sono ricercate tramite un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate tramite un ampio processo di consultazione.

### Assicurazione di Qualità

La NHS Evidence ha accreditato la procedura usata dai SMI Working Groups per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida emesse dall'Ottobre 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008. Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e

---

<sup>#</sup> Microbiology is used as a generic term to include the two GMC-recognised specialties of Medical Microbiology (which includes Bacteriology, Mycology and Parasitology) and Medical Virology.

# Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accreditamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Le prestazioni della SMI dipendono da personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e che i risultati siano idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

### Coinvolgimento del paziente e della comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato, la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web.

### Informazione della Gestione dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza. Lo sviluppo di metodi SMI è soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1317133470313](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313).

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

### Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, la PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della revisione successiva. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

Le SMI sono assoggettate a diritti d'autore che dovrebbero essere riconosciuti ove appropriato.

### Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2018). Processing of Faeces for *Clostridium difficile*. UK Standards for Microbiology Investigations. B 10 Emissione 1.5. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>

## Scopo del Documento

---

### Tipo di campione

Feci

### Scopo

---

Questa SMI descrive la ricerca colturale e l'identificazione del *Clostridium difficile* nelle feci. Si specifica che tutti i campioni selezionati per la ricerca devono prima essere indagati per il rilievo della tossina o della citotossicità cellulare. Oppure il laboratorio può conservare i campioni fecali positivi per la tossina per un esame colturale successivo se richiesto, o, in caso di laboratorio inglese può chiedere l'accesso al *C. difficile* Ribotyping Network for England (CDRNE) tramite i Microbiologi Regionali. Gli isolati possono essere inviati da qualsiasi luogo del Regno Unito all'Anaerobe Reference Laboratory (tranne la Scozia) per ricerche epidemiologiche associate ai laboratori della Regional PHE, in conformità al progetto di sorveglianza DH/HPA oppure al PHE Centre for Infection (Laboratory of HealthCare Associated Infection). In Scozia gli isolati possono essere inviati allo Scottish *C. difficile* Reference Service secondo gli accordi definiti con la Health Protection Scotland (HPS) come parte vincolante del programma di sorveglianza stabilito:

<http://www.documents.hps.scot.nhs.uk/hai/sshaip/guidelines/clostridium-difficile/cdiff-protocol-v2-2009-103.pdf>

[B30 – Investigation of Faeces Specimens for Bacterial Pathogens](#) e [B 8 – Identification of Clostridium Species](#) sono raccomandate per informazioni generali.

## Introduzione

---

### Infezione da *Clostridium difficile* (ICD) e Diarrea Associata agli Antibiotici (DAA)

Il *C. difficile* è un bastoncino Gram-positivo, sporigeno, anaerobio stretto, così definito per la difficoltà d'isolamento in coltura primaria e di caratterizzazione<sup>3</sup>. I ceppi tossigenici producono tossine proteiche di grandi dimensioni, A e B, entrambe rappresentano i principali fattori di virulenza<sup>4</sup>. La maggior parte della patologia correlata al *C. difficile* è di tipo intestinale, sebbene il microrganismo possa essere isolato dal sangue o dai tessuti<sup>5-9</sup>.

Modificazioni della flora intestinale dovute all'azione degli antibiotici a largo spettro e ad agenti chemioterapici possono determinare la colonizzazione da *C. difficile*; questa è la causa più comune riscontrata nella DAA<sup>10</sup>. Come agente causale di DAA può essere implicata la maggior parte dei farmaci con azione ad ampio spettro. Sono di più frequente riscontro quelli che possiedono un effetto particolarmente efficace sulla microflora del colon. Questi comprendono beta lattamici ad ampio spettro, cefalosporine, clindamicina e fluorochinoloni<sup>11</sup>. E' stato dimostrato che l'incidenza dell'infezione da *C. difficile* diminuisce quando la terapia antibiotica è posta sotto controllo.

La produzione di due tossine, A (enterotossina) e B (citotossina), causa il caratteristico danneggiamento della mucosa che si manifesta con lesioni a placca e successiva formazione di



pseudomembrane. Non tutti i ceppi di *C. difficile* producono tossina e di conseguenza non tutti generano malattia.

La malattia varia da una manifestazione diarroica autolimitante alla forma grave e progressiva che caratterizza la colite pseudomembranosa. La diagnosi più accurata di quest'ultima è ottenuta con il riscontro endoscopico di membrane o microascessi a sede colica in pazienti trattati con antibiotici, sintomatologia diarroica e presenza di *C. difficile* e delle sue tossine nelle feci.

Il microorganismo è stato isolato in corso di epidemie ospedaliere e in strutture sanitarie per anziani lungodegenti<sup>12</sup>. E' un importante causa d'infezione nosocomiale. *C. difficile* può essere isolato dal suolo, ambiente ospedaliero e dalle feci dell'uomo e degli animali<sup>13</sup>. Raramente è presente nella flora residente degli adulti, ma nei primi mesi di vita i neonati possono essere colonizzati fino al 50%, sebbene la malattia si manifesti raramente in questa età<sup>14,15</sup>. L'infezione da *C. difficile* è più frequente nelle persone anziane. Non ne sono noti i motivi, ma alcuni rilievi suggeriscono che questi pazienti sono dotati di una barriera naturale anti infettiva meno efficace<sup>16</sup>. L'importanza dell'età emerge dai grafici, (distribuzione per età) del CDSC, che evidenziano come 81% dei casi segnalati si è verificato in pazienti con età superiore a 65 anni<sup>17</sup>.

Sono particolarmente a rischio d'infezione da *C. difficile* pazienti anziani con patologie cliniche e soggetti esposti ad interventi di chirurgia generale, pazienti oncologici e quelli con insufficienza renale cronica<sup>18-21</sup>.

## Tossine del *Clostridium difficile* e Ricerca della Tossina

La presenza delle tossine di *C. difficile* nelle feci diarroiche è considerata indicativa di ICD in assenza di altra causa di affezione gastrointestinale. In corso di epidemie si consiglia di eseguire contemporaneamente l'esame colturale e la ricerca della tossina<sup>22</sup>. La coltura di feci negative per la tossina seguita dalla ricerca della stessa sull'isolato può aumentare il numero di pazienti con diagnosi accertata<sup>23</sup>.

L'uso della coltura cellulare per la ricerca delle tossine di *C. difficile* che sono dotate di effetto citopatico (neutralizzabile con antitossina di *C. sordellii*), da alcuni considerata come "standard di riferimento", richiede esperienza tecnica e il risultato finale comporta un ritardo di 24 ore (fino a 48)<sup>24</sup>. La coltura tissutale, in modo particolare con cellule Vero<sup>22</sup>, può rilevare altre citotossine fecali associate a diarrea, quale l'enterotossina di *C. perfringens*. L'effetto citopatico (ECP) non neutralizzato dall'antitossina di *C. sordellii* può suggerire la presenza di un altro patogeno.

Sono disponibili numerose confezioni commerciali EIA per la ricerca delle tossine di *C. difficile*. Alcune evidenziano la presenza della Tossina A, altre della A e della B; le loro sensibilità e specificità sono variabili<sup>25-29</sup>. Le confezioni commerciali degli EIA predisposte per la ricerca di entrambe le tossine A e B sono considerate più appropriate rispetto a quelle che rilevano solo la A; sono state infatti segnalate infezioni da ceppi A- B+<sup>30</sup>.

Sono disponibili confezioni per l'agglutinazione con particelle di lattice, ma per la loro scarsa sensibilità non sono affidabili come gli EIA<sup>31</sup>. E' stato suggerito il metodo di contro immuno-elettroforesi (CIE), ma non è raccomandato per insufficiente sensibilità e specificità<sup>32,33</sup>.

In una relazione presentata al Department of Health sono state recentemente valutate queste e altre procedure di prova<sup>34</sup>.

## Tipizzazione di *C. difficile*

La tipizzazione degli isolati di *C. difficile* è talvolta utile nell'indagine che coinvolge casi multipli d'infezione. Si utilizzano i metodi batteriofago/batteriocidina e la sierotipizzazione<sup>35,36</sup>. La PCR

ribotyping è un metodo sempre più accettato a livello internazionale e in Inghilterra la PHE ha predisposto una rete che utilizza questo metodo (CDRNE, *C. difficile* ribotyping network) da utilizzare quando si manifesta un aumento della frequenza d'infezione da *C. difficile* (ICD), o un aumento di gravità, complicanze, ricadute o percentuali di morte associate all'ICD<sup>37</sup>. L'Anaerobe Reference Laboratory di Cardiff fornisce ora lo stesso servizio per il Galles e le altre nazioni del Regno Unito (tranne che per la Scozia) e in Inghilterra esegue la tipizzazione per il progetto di sorveglianza DH/PHE. In Scozia questo servizio è fornito dallo Scottish *C. difficile* Reference Service di Glasgow con sede nello Scottish *Salmonella* Reference Laboratory. Per la differenziazione dei ceppi il Centre for Infection esegue il metodo ribotyping e altri saggi molecolari più sofisticati. Altri metodi includono lo studio dei profili delle proteine di superficie delle cellule e diversi tipi di analisi per il DNA<sup>38-40</sup>.

## Altri Microrganismi Associati alla DAA

Oltre al *C. difficile*, nella DAA sono state riscontrate infezioni da *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, specie *Candida* e specie *Salmonella*<sup>41,42</sup>.

## Informazione Tecnica/Limitazioni

---

### Limitazioni delle SMI del RU

Le raccomandazioni formulate nelle SMI del RU sono basate su prove (ad esempio sensibilità e specificità), se disponibili, opinioni degli esperti e pragmatismo, tenendo in considerazione anche delle risorse disponibili. I laboratori dovranno tenere in considerazione le esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali, se appropriato. Prima del loro uso, i laboratori devono assicurare che tutti i saggi commerciali e in-house sono stati validati e sono idonei allo scopo

### Contenitori per campioni<sup>1,2</sup>

Le SMI usano il termine "marchiatura CE del contenitore impermeabile" per descrivere quelli contrassegnati con la marchiatura CE per la raccolta e il trasporto dei campioni clinici. I requisiti per i contenitori dei campioni sono riportati nella Direttiva UE per i Dispositivi Sanitari Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) in cui si stabilisce: "La progettazione deve consentire un'agevole manipolazione e, se necessario, ridurre per quanto possibile la contaminazione dei, e perdite dal dispositivo durante l'uso e, nel caso di recipienti per campioni, il rischio di contaminazione degli stessi. Le procedure di fabbricazione devono essere adatte a questi scopi".

## 1 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>1,2,43,57</sup>

---

### 1.1 Prelievo, Trasporto, Conservazione del Campione<sup>1,2,43-56</sup>

Usare tecnica asettica

Raccogliere in appropriati contenitori marcati CE a tenuta ermetica i campioni e trasportarli in sacchetti di plastica sigillati.

E' essenziale la conformità alle normative postali e dei trasporti.

### 1.2 Procedura sul Campione<sup>1,2,43-57</sup>

Livello di Contenimento 2.

Livello di Contenimento 3 se dalle notizie cliniche o dai rilievi di laboratorio si sospetta la presenza dei seguenti microrganismi:

- *Salmonella* Typhi.
- *S. paratyphi* A, B e C.
- *E. coli* O157 produttore di vero citotossina (VTEC).
- *Shigella dysenteriae*.

In condizioni normali non si dovrebbe richiedere l'esame colturale per *C. difficile* nei pazienti per i quali si sospetta qualsiasi microrganismo di quelli descritti in precedenza. In ogni caso, se le notizie cliniche o l'esame colturale suggeriscono la presenza di uno qualunque dei microrganismi menzionati in precedenza, la preparazione di tutti i campioni e la coltura per *C. difficile* devono essere eseguite in cabina di Contenimento di Livello 3.

Le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi devono essere eseguite in una cabina microbiologica di sicurezza<sup>49</sup>.

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla manipolazione sicura di tutti i microrganismi segnalati in questa SMI.

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

## 2 Prelievo del Campione

---

### 2.1 Tipo di Campioni

Feci

### 2.2 Tempo Ottimale e Metodo di Raccolta<sup>58</sup>

Per le considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1.

Raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica se possibile<sup>58</sup>.

I campioni devono essere raccolti in una padella pulita, asciutta, monouso o contenitore simile e trasferirli in un contenitore con marchiatura CE a tenuta ermetica. Il campione è ritenuto non idoneo se nel raccoglitore sono presenti residui di sapone, detergente o disinfettante.

Feci formate non sono idonee per la ricerca di *C. difficile*. Queste devono essere rifiutate con appropriata valutazione aggiunta al referto.

## 2.3 Quantità Adeguata e Numero Appropriato di Campioni<sup>58</sup>

Per l'esame colturale e la ricerca della tossina è sufficiente un campione liquido di 1-2 ml. La ripetizione della prova sul campione non è consigliata nei 28 giorni successivi. Questa indicazione è consigliata per campioni positivi. Diversamente, un risultato negativo con sintomi persistenti dovrebbe essere controllato appena noto.

In caso di sospette epidemie, i campioni dovrebbero essere conservati a 4°C o congelati a -20°C per l'esame colturale.

Gli isolati confermati come *C. difficile* devono essere inviati per la ribotipizzazione secondo le indicazioni dell'Anaerobe Reference Laboratory (ARL: linee guida per ricerche di tipizzazione elencate on-line al sito: [www.hpa.org.uk/cfi/arl](http://www.hpa.org.uk/cfi/arl)) o a quelle equivalenti scozzesi:

<http://www.documents.hps.scot.nhs.uk/hai/sshaip/guidelines/clostridium-difficile/smf-recommended-protocol-testing-for-cdiff-2009-12.pdf>

Di solito si ritiene sufficiente l'invio di 10 isolati per ciascun episodio epidemico.

## 3 Trasporto e Conservazione del Campione<sup>1,2</sup>

### 3.1 Condizioni Ottimali di Trasporto e Conservazione del Campione

Per le considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1.

I campioni devono essere trasportati e processati il più presto possibile<sup>58</sup>.

Se la procedura è ritardata, la refrigerazione è preferibile alla conservazione a temperatura ambiente<sup>44</sup>. Refrigerare non oltre 2 giorni se la procedura non inizia entro 2 ore. Congelare a -20°C o a temperatura inferiore se si processa il campione entro 2 giorni dalla raccolta<sup>59</sup>.

Tutti i campioni fecali positivi per *C. difficile* devono essere refrigerati o congelati per eseguire la cultura e recuperare gli isolati per la tipizzazione<sup>60</sup>. Non è necessario mantenere il campione intero perché è sufficiente un'aliquota inserita in una piccola provetta eppendorf. Il periodo di conservazione deve essere determinato a livello locale, ma dove consentire un'appropriata indagine epidemiologica.

## 4 Procedura sul campione<sup>1,2</sup>

### 4.1 Selezione della prova

Su indicazione clinica, devono essere sottoposti a screening pazienti che soddisfano i seguenti criteri clinici: diarrea associata a trattamento antibiotico (soggetti di età superiore a 2 anni); colite pseudomembranosa; tutti i soggetti di età superiore a 65 anni dopo trattamento antibiotico (in Scozia tutti i pazienti di età superiore a 65 anni)<sup>61</sup>.

Seguire le indicazioni del produttore quando si utilizzano confezioni per la ricerca della tossina. Si raccomanda l'utilizzo di confezioni in grado di rilevare entrambe le tossine A e B. In caso di epidemia, per consentire il monitoraggio del ceppo, conservare tutti i campioni fecali positivi a 4°C o a -20°C per un successivo esame colturale<sup>60</sup>.

In corso di epidemia eseguire l'esame colturale e l'identificazione di *C. difficile* da campioni fecali al fine di migliorare la condizione di sorveglianza. Il metodo è descritto nella sezione 4.5 Coltura e Ricerca.

## 4.2 Aspetto

N/D

## 4.3 Preparazione del Campione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.2

### 4.3.1 Standard

#### Metodo con shock alcolico<sup>62-64</sup>

Lo shock alcolico fornisce il vantaggio di selezionare solo le spore di *C. difficile* che possono sopravvivere a questa procedura, eliminando tutti gli altri microrganismi fecali non sporigeni. Come composti selettivi si utilizzano cefoxina e cicloserina (sono stati descritti altri prodotti) e questi inibiscono di solito la maggior parte delle altre specie di clostridi. In caso d'infezione attiva, spesso si sviluppa solo una coltura pura di *C. difficile*.

Si deve notare che lo stesso terreno prodotto da fornitori diversi può generare colonie con differenti caratteristiche e le descrizioni qui riportate non hanno carattere assoluto.

- Preparare una sospensione con parti equivalenti di campione fecale e alcool assoluto in una piccola provetta dotata di tappo a vite.
- Miscelare con vortex e lasciare sedimentare per 60 min. a temperature ambiente.
- Inoculare con una pipetta monouso due gocce (circa 50-75 µl) del sedimento su agar selettivo cefoxitin-cycloserine egg yolk agar\* (CCEY) e strisciare le singole colonie. Seminare contemporaneamente i microrganismi di controllo su CCEY dalle loro sospensioni contenete le spore e incubare come di seguito specificato
- Incubare in anaerobiosi a 35°C – 37°C per 48 – 72 ore.

**Nota:** Le colture devono essere esaminate dopo incubazione notturna, ma non devono essere rimosse dalla cabina anaerobica perché la sporulazione è inibita dai terreni selettivi e le colture recenti possono morire per l'esposizione aerobica.. Se si utilizzano giare anaerobiche le colture non possono essere esaminate prima di 48 ore d'incubazione

\* L'arricchimento con tuorlo d'uovo è opzionale; può essere usato anche l'agar sangue

### 4.3.2 Metodi Supplementari

N/D

## 4.4 Microscopia

### 4.4.1 Standard

N/D

### 4.4.2 Supplementari

N/D

## 4.5 Coltura e Ricerca

### 4.5.1 Terreni di coltura, condizioni e microrganismi

Condizione clinica/ specifiche	Campione	Terreno Standard	Incubazione			Letture colture	Microrganismo(i)
			Temp °C	Atmos	Tempo		
<p>Come clinicamente indicato su pazienti che soddisfano i seguenti criteri)</p> <p>diarrea associata ad antibiotici (≥2anni)</p> <p>colite pseudomembranosa</p> <p>dopo trattamento antibiotico in tutti i pazienti con più di 65 anni</p>	Fec1	CCEY	35°C-37°C	Anaerobica	48-72 ore	>48ore*	<i>Clostridium difficile</i>
<p>*Le colture possono essere esaminate dopo l'incubazione notturna, ma non devono essere rimosse dal termostato con anaerobiosi perché la sporulazione è inibita dai terreni selettivi e le colture recenti possono morire per esposizione all'aria. Se si utilizzano giare anaerobiche, le colture non devono essere esaminate prima di 48 ore di incubazione</p>							

## 4.6 Identificazione

### 4.6.1 Livello minimo di identificazione in laboratorio

<i>Clostridium difficile</i>	Livello 'Specie'
------------------------------	------------------

I microrganismi possono essere ulteriormente identificati se questo è indicato clinicamente o epidemiologicamente.

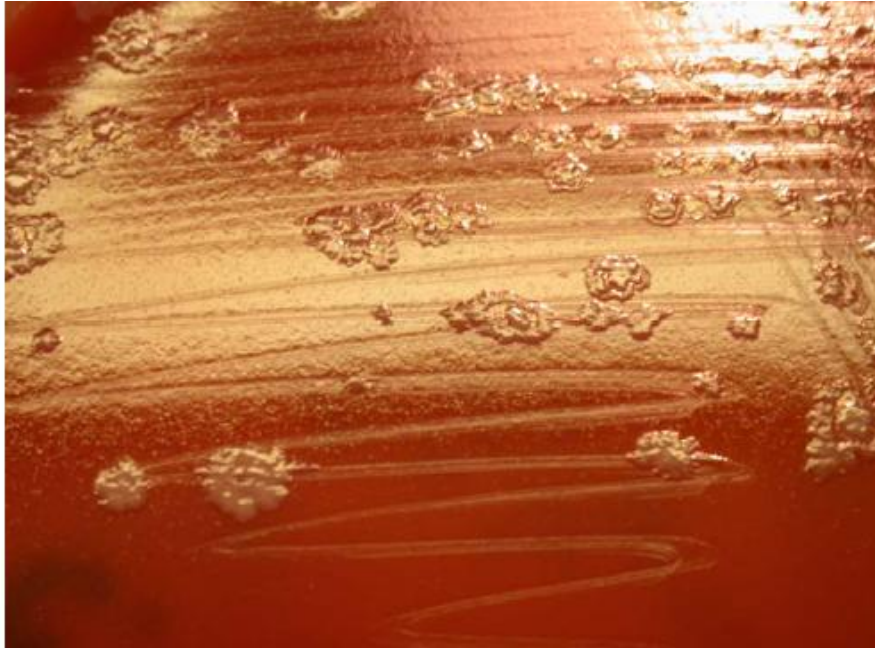
Le colonie di *C. difficile* possono essere riconosciute per le seguenti caratteristiche:

- In caso di utilizzo di agar base e tuorlo d'uovo, assenza di opacità attorno alla colonia per mancata produzione di lecitinasi (diversamente *C. bifermentans*, *C. perfringens* o *C. sordellii*). Per la morfologia delle colonie seguire le indicazioni del produttore.
- Fluorescenza giallo-verde sotto luce UV ad ampia lunghezza d'onda (consultare di seguito).
- Agglutinazione con reagente al lattice per antigene somatico di *C. difficile*. (consultare di seguito).

Per facilitare l'identificazione è opportuna la sotto-coltura di una colonia di *C. difficile* sospetta su agar sangue AAE (Agar per Anaerobi Esigenti).

### Esame delle piastre

Le colonie di *C. difficile* possono essere lisce o ruvide e possono variare considerevolmente nelle dimensioni. Le tipiche colonie possono essere osservate su Agar per Anaerobi Esigenti, su cui si sviluppano le sotto-colture di quelle sospette cresciute sui terreni selettivi (osservare la Piastra 1):



Per cortese concessione del Dr Jon Brazier dell'Anaerobic Reference Laboratory

Piastra 1. Colonie di *C. difficile*, Agar per Anaerobi Esigenti

### **Fluorescenza della colonia**

- Rimuovere dal termostato le piastre di prova e di controllo ed esaminare le colonie per emissione di fluorescenza. Esporre le colonie a luce ultravioletta di ampia lunghezza d'onda (365 nm) in camera scura o in contenitore trasparente posto in prossimità della sorgente UV e osservare per riflessione.
- Nota:** Calzare occhiali di protezione per UV.
- Le colonie di *C. difficile* possono variare per intensità di fluorescenza, ma questa apparirà di colore verde-giallo o verde pallido. La fluorescenza si manifesta in modo scarso su alcuni agar base ed è più intensa su AAE. E' importante confrontare la fluorescenza delle colonie del campione di prova con quelle del microrganismo di controllo per definire i risultati positivi e negativi. L'intensità della fluorescenza delle colonie nelle colture con > 48 ore cresciute su terreni non selettivi presenta una diminuzione per incremento della sporulazione.
  - Contrassegnare ogni colonia sospetta (fluorescente) sul fondo della piastra con la punta di un pennarello. Eseguire sotto-colture su piastre di Agar per Anaerobi Esigenti e incubare per 48 ore in anaerobiosi.

**Nota:** La colorazione Gram su crescita da agar selettivo è raramente utile, quella da agar sangue può rendere visibili spore sub-terminali con la maggior parte delle forme vegetative a bastoncino Gram positivo e alcune a gram variabile, come nella maggior parte delle altre specie di clostridi. In questo SMI non si raccomanda la colorazione Gram di routine.

### **Prova di agglutinazione al lattice per antigene**

Utilizzare l'agglutinazione al lattice per antigene somatico di *C. difficile* secondo le istruzioni indicate dalla confezione.

### **Limitazioni della prova**

E' noto che con questo reattivo sono possibili reazioni crociate con:

- *C. bifermentans*,
- *C. sordellii*,
- *C. glycolicum*.

### Controlli

Predisporre controlli nel corso delle prove colturali e su ciascun nuovo lotto di terreno (consultare 2.5).

Microrganismi di controllo richiesti:

- *C. bifermentans*
- *C. sordellii*
- *C. difficile*

Altre specie di clostridi sono spesso erroneamente riconosciute come *C. difficile*. Queste includono *C. innocuum*, *C. glycolicum*, *C. bifermentans* e *C. sordellii*. Queste possono in ogni modo essere differenziate secondo le indicazioni elencate nella Tabella 1.

**Tabella 1. Prove differenziali per il riconoscimento delle colonie di *C. difficile***

	<i>C. difficile</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. glycolicum</i>	<i>C. innocuum</i>
UV (Fluorescenza) a 365 nm	+	-	-	-	+
Agglutinazione lattice	+	+	+	+	-
Lecitinasi su terreno di Brazier CCEY	-	+	+	-	-

I microrganismi possono in seguito essere identificati se opportuno per rilievi clinici o epidemiologici. Fare riferimento alle singole SMI per l'identificazione dei microrganismi.

## 4.7 Prova di sensibilità agli antimicrobici

Fare riferimento alle linee guida della [British Society for Antimicrobial Chemotherapy \(BSAC\)](#) and/or [EUCAST](#)

## 4.8 Invio per Ricerche per Epidemie

### Isolati

Inviare i microrganismi isolati al di fuori dell'Inghilterra (eccetto la Scozia) per situazioni che richiedono la tipizzazione all'Anaerobe Reference Laboratory (ARL) per la ribotipizzazione mediante PCR. Questi isolati devono essere inviati per questo accertamento dopo verifica e accettazione da parte del laboratorio designato.

Raccogliere in modo completo con tampone la crescita di *C. difficile* sviluppata dopo 48 ore in anaerobiosi su un terreno non selettivo, quale l'AAE, e inserire il tampone in una provetta contenente terreno di trasporto con carbone.



**Nota:** E' importante Inviare la coltura dopo 48 – 72 ore per consentire la sporulazione.

Anaerobe Reference Laboratory (ARL)

NPHS Microbiology Cardiff  
University Hospital of Wales  
Cardiff  
CF14 4XW

<http://www.hpa.org.uk/cfi/arl/>

In Scozia, gli isolati da condizioni che richiedono ricerche di tipizzazione devono essere inviati allo Scottish *C. difficile* Reference Service for PCR ribotyping. Dettagli completi sulle modalità d'invio degli isolati sono disponibili sul sito web:

(<http://www.ssrl.scot.nhs.uk/cdiffhome.asp>)

### **Conservazione degli isolati**

Quando si raccoglie la crescita dalla piastra di purificazione del AAE prenderne una parte e miscelarla in una piccola provetta di recente preparazione contenete alcol/fisiologica (2:1) opportunamente contrassegnata. Conservare a -20°C. In alternativa, preparare dalle colonie una densa sospensione in alcol/fisiologica (2:1) e conservare a -70°C.

### **Feci**

In Inghilterra è ora presente una rete per la ribotipizzazione del *C. difficile* (CDRNE *C. difficile* Ribotyping Network) costituita da sei laboratori (a Leeds – centro di riferimento, Birmingham, London, Manchester, Newcastle e Southampton) accessibile previo accordo con il relativo Regional Microbiologist. Attivare l'accesso a questo sistema se il laboratorio ritiene di disporre o sospetta di disporre riscontri sull'aumentata frequenza o gravità dei casi d'infezione da *C. difficile*, compresi aumento della mortalità, complicanze o percentuali di ricadute. Per accedere al servizio compilare il modulo di richiesta standardizzato in formato elettronico ampiamente diffuso. Sul sito PHE sono disponibili altre informazioni.

### **Progetto di Sorveglianza Nazionale DH/PHE per *C. difficile***

Per i campioni inviati facenti parte del progetto di sorveglianza nazionale DH/PHE per *C. difficile* ('aggiornamento settimanale') non utilizzare il modulo per la Ricerca per Epidemia ma uno diverso, contrassegnato "DH/PHE Progetto di Sorveglianza Nazionale per *C. difficile*"; i Laboratori Regionali PHE richiederanno un numero predefinito di campioni di feci positive per la tossina in una settimana concordata in precedenza, con rotazione regionale.

### **Prova di suscettibilità agli antimicrobici**

Con il metodo E test per la determinazione della MIC di otto antibiotici l'ARL monitorizza la sensibilità agli antimicrobici di tutti gli isolati inviati nell'ambito del progetto di sorveglianza DH/PHE. E' importante che le prove siano seguite in modo continuo da tutti i laboratori del CDRNE per verificare ogni resistenza emergente nei farmaci utilizzati per la terapia, in modo particolare per metronidazolo e vancomicina. Una simile sorveglianza è condotta in Scozia dallo Scottish *C. difficile* Reference Service congiuntamente all'Health Protection Scotland (HPS).

## **4.9 Invio ai Laboratori di Riferimento**

Per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni da parte del laboratorio di riferimento [click here for user manuals and request forms](#).

Microrganismi con resistenze insolite o inattese, o qualora sussista un problema clinico o di laboratorio, o anomalie che richiedano approfondimenti devono essere inviati agli appropriati laboratori di riferimento.

Contattare gli appropriati laboratori nazionali specializzati per informazioni sulle prove disponibili tempi di risposta, procedure di trasporto e altre richieste per l'invio del campione.

Inghilterra e Galles

<http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&Page&HPAwebAutoListName/Page/1158313434370?p=1158313434370>

Scozia

<http://www.hps.scot.nhs.uk/reflab/index.aspx>

Irlanda del Nord

<http://www.publichealth.hscni.net/directorate-public-health/health-protection>

## 5 Procedura di Refertazione

---

### 5.1 Microscopia

N/D

### 5.2 Coltura

Isolati di *C. difficile* inviati per ricerche di tipizzazione. Referto successivo a seguire.

### 5.3 Tossina

Rilevata tossina di *C. difficile*

Non rilevata tossina di *C. difficile*

### 5.4 Prove di sensibilità agli antimicrobici

Refertare le sensibilità come clinicamente suggerito. Usare in modo prudente gli antibiotici secondo i protocolli locali e nazionali raccomandati

## 6 Notifica al PHE<sup>65,66</sup> o Equivalente<sup>67-70</sup>

---

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) i casi nei quali identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations 2010 il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della PHE. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio

diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente alla PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

**Nota:** La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per Human Immunodeficiency Virus HIV & Sexually Transmitted Infections STIs, Healthcare Associated Infections e HCAs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/HealthProtectionRegulations/>

In [Scotland](#)<sup>67,68</sup>, [Wales](#)<sup>69</sup> e [Northern Ireland](#)<sup>70</sup> sono vigenti altre disposizioni.

## Bibliografia

---

1. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU *in vitro* Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
2. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
3. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe M, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986. p. 1165-6
4. Groschel DH. *Clostridium difficile* infection. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:203-45.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis.[comment]. [Review] [51 refs]. *New England Journal of Medicine* 1994;330:257-62.
6. Thielman NM. Antibiotic-associated colitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Vol 1. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 1111-26.
7. Lorber B. Gas gangrene and other *Clostridium*-associated diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Vol 1. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2549-61.
8. Brook I. Clostridial infection in children. *J Med Microbiol* 1995;42:78-82.
9. Feldman RJ, Kallich M, Weinstein MP. Bacteremia due to *Clostridium difficile*: case report and review of extraintestinal *C. difficile* infections. *Clin Infect Dis* 1995;20:1560-2.
10. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 1998;40:1-15.
11. Impallomeni M, Galletly NP, Wort SJ, Starr JM, Rogers TR. Increased risk of diarrhoea caused by *Clostridium difficile* in elderly patients receiving cefotaxime. *BMJ* 1995;311:1345-6.
12. Worsley MA. A major outbreak of antibiotic-associated diarrhoea. *PHLS Microbiol Dig* 1993;97-9.
13. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:47-57.
14. Wilson KH. The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 1993;16 Suppl 4:S214-S218.
15. el Mohandes AE, Keiser JF, Refat M, Jackson BJ. Prevalence and toxigenicity of *Clostridium difficile* isolates in fecal microflora of preterm infants in the intensive care nursery. *Biol Neonate* 1993;63:225-9.
16. Borriello SP, Barclay FE. An *in-vitro* model of colonisation resistance to *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 1986;21:299-309.

17. CDSC. *Clostridium difficile* in England and Wales. CDR Weekly 2000;10:369.
18. Testore GP, Pantosti A, Cerquetti M, Babudieri S, Panichi G, Gianfrilli PM. Evidence for cross-infection in an outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a surgical unit. J Med Microbiol 1988;26:125-8.
19. Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, Agus SG. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. Arch Intern Med 1992;152:1715-7.
20. Gerard M, Defresne N, Daneau D, Van der AP, Delmee M, Bourguignon AM, et al. Incidence and significance of *Clostridium difficile* in hospitalized cancer patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:274-8.
21. Cumming AD, Thomson BJ, Sharp J, Poxton IR, Fraser A. Diarrhoea due to *Clostridium difficile* associated with antibiotic treatment in patients receiving dialysis: the role of cross infection. Br Med J (Clin Res Ed) 1986;292:238-9.
22. Brazier JS. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. Clin Infect Dis 1993;16:Suppl 4: S228-S233.
23. Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. J Med Microbiol 2005;54:187-91.
24. Liesenfeld O, Saeger F, Hahn H. Detection of *Clostridium difficile* toxin by enzyme immunoassay, tissue culture test and culture. Infection 1994;22:29-32.
25. O'Connor D, Hynes P, Cormican M, Collins E, Corbett-Feeney G, Cassidy M. Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea.[comment]. Journal of Clinical Microbiology 2001;39:2846-9.
26. Musher DM, Manhas A, Jain P, Nuila F, Waqar A, Logan N, et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin: comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. J Clin Microbiol 2007;45:2737-9.
27. Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, Carlson L, Miller P, Ulness B, et al. Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. J Clin Microbiol 2003;41:667-70.
28. Yucesoy M, McCoubrey J, Brown R, Poxton IR. Detection of toxin production in *Clostridium difficile* strains by three different methods. Clin Microbiol Infect 2002;8:413-8.
29. Vanpoucke H, De Baere T, Claeys G, Vaneechoutte M, Verschraegen G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. Clin Microbiol Infect 2001;7:55-64.
30. Al Barrak A, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. Canada Communicable Disease Report 1999;25:65-9.
31. Gilligan PH, Walden P, Kelly WF, Wait KJ, Kraft JA, Willis DH. The use of a commercially available enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* toxin A. Arch Pathol Lab Med 1993;117:507-10.

32. Poxton IR, Byrne MD. Detection of *Clostridium difficile* toxin by counterimmunoelectrophoresis: a note of caution. *J Clin Microbiol* 1981;14:349.
33. West SE, Wilkins TD. Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for detecting *Clostridium difficile* toxin. *Journal of Clinical Microbiology* 1982;15:347-9.
34. Department of Health. National *Clostridium difficile* Standards Group: Report to the Department of Health. *J Hosp Infect* 2004;56 Suppl 1:1-38.
35. Silva J, Jr., Iezzi C. *Clostridium difficile* as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* 1988;11 Suppl A:378-85.
36. Tabaqchali S, Wilks M. Epidemiological aspects of infections caused by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:1049-57.
37. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 1999;37:461-3.
38. Poxton IR, Aronsson B, Mollby R, Nord CE, Collee JG. Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea. *J Med Microbiol* 1984;17:317-24.
39. Public Health Laboratory Service. Report of the PHLS *Clostridium difficile* Working Group. *PHLS Microbiol Dig* 1994;11:22-4.
40. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *J Clin Microbiol* 2006;44:2558-66.
41. Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998;27:702-10.
42. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2006;44:2785-91.
43. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
44. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
45. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
46. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
47. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
48. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
49. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.

50. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
52. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
53. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
54. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
55. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
56. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
57. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
58. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr., et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis 2013;57:e22-e121.
59. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D, et al. Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. Star Publishing Company; 2002. p. 135-8.
60. Brazier JS, Duerden BI. Guidelines for optimal surveillance of *Clostridium difficile* infection in hospitals. Commun Dis Public Health 1998;1:229-30.
61. Chief Medical Officer and Chief Nursing Officer. Letter from the Chief Medical Officer and Chief Nursing Officer. 2007.
62. Borriello SP, Honour P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. Journal of clinical pathology 1981;34:1124-7.
63. Carson KC, Boseiwaqa LV, Thean SK, Foster NF, Riley TV. Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens--a comparison of chromID C. difficile agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. J Med Microbiol 2013;62:1423-7.
64. Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, Low DE, Staempfli H, McGeer A et al. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. J Clin Microbiol 2005;43:5341-3.
65. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories 2013. 1-37.
66. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 1-112. 2010.
67. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008.

68. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
69. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
70. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967.