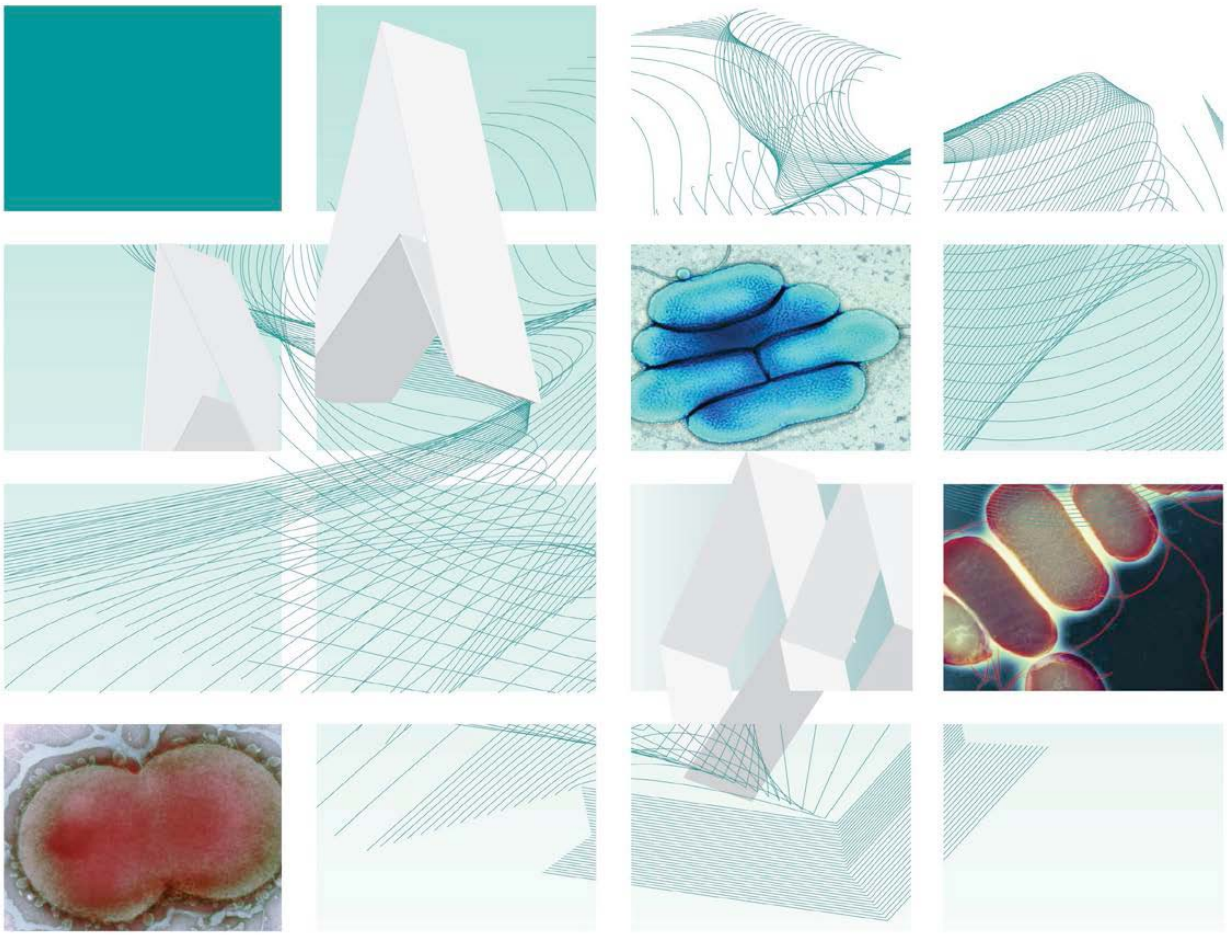
Public Health England

NHS

Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di specie *Clostridium*



NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

Emesso da Standards Unit, Microbiology Services, PHE

© Crown copyright 2016

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 https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee).

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

Website: https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories

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

I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI 2

TABELLA MODIFICHE 4

RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO 6

SCOPO DEL DOCUMENTO 9

INTRODUZIONE 9

INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI 13

1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA 14

2 MICRORGANISMO BERSAGLIO 14

3 IDENTIFICAZIONE 14

4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE *CLOSTRIDIUM* 20

5 REFERTAZIONE 21

6 INVIO 22

7 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE 22

BIBLIOGRAFIA 24

NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

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.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : 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

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

Modifica No/Data.	7/01.03.16
Emissione eliminata. no	4
Inserito no.	4.1
Sezione(i) interessate	**Modifica**
Sezione 4.	Corretto errore nel diagramma di flusso

Modifica No/Data.	6/12.01.15
Emissione eliminata. no	3.2
Emissione inserita no.	4
Sezione(i) interessate	**Modifica**
Documento intero.	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov.uk.
Pagina 2	Loghi aggiunti aggiornati
Intero documento	Documento presentato in un nuovo formato. Riorganizzazione di parte del testo. Edito per chiarezza. Aggiornata informazioni relativa a *Clostridium difficile*. Procedure di prova aggiornate. Rimozione delle informazioni riguardanti il Laboratorio di Riferimento.
Scopo del documento	Aggiornato scopo del documento per includere collegamento web a B 10
Introduzione	Tassonomia della specie *Clostridium* aggiornata. Aggiunte altre informazioni alla sezione Caratteristiche. Sono menzionate le specie clinicamente importanti e descritte le loro caratteristiche. Utilizzare bibliografia aggiornata.

	Aggiornata la Sezione sui Principi di Identificazione per informare gli utenti di inviare per ulteriore identificazione le specie *Clostridium* all'appropriato laboratorio di riferimento.
Informazione Tecnica/limitazioni	Aggiunta di informazioni con bibliografia riguardante colorazione Gram, sensibilità agli antibiotici, sporulazione e sistemi di identificazione commerciali con riferimento bibliografico
Considerazioni sulla sicurezza	Aggiornamento sulle infezioni da laboratorio acquisite con riferimento bibliografico.
Microrganismi bersaglio	La sezione sui microrganismi bersaglio è stato aggiornata e presentata in modo chiaro. Bibliografia aggiornata.
Identificazione	Eseguite modifiche per aggiornamento su 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 per adeguamento degli standard nella pratica. Sottosezione 3.5 è stata aggiornata per includere i Metod Molecolari Rapidi. 3.6 E' stata riformulata per informare gli utenti di fare riferimento al manuale dell'appropriato laboratorio per gli invii.
Identificazione diagramma di flusso	Eseguita modifica del diagramma di flusso per l'identificazione di specie per facilitare la consultazione.
Refertazione	Le sottosezioni 5.2 e 5.6 sono state aggiornate per adeguare la procedura di refertazione.
Invio	Aggiornati gli indirizzi dei laboratori di riferimento.
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata.

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

- 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.
- Le SMI 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 ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories. L'inclusione del logo di una 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 rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

[#] 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.

Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI L'accreditamento è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 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 non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali 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 dal 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 risultati 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 coinvolgendo 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 e 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 assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity. 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, 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 prossima revisione. 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.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

Citazione Suggerita per questo Documento

Public Health England. (2016). Identification of *Clostridium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 8 Emissione 4.1. https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'identificazione delle specie *Clostridium.*

Sono note numerose specie di clostridi, riscontrate nelle feci animali e nell'ambiente. In questa SMI saranno discusse solo quelle associate con l'infezione dell'uomo.

Per maggiori informazioni sul *Clostridium difficile*, fare riferimento a B 10 - Investigation of Faecal Specimens for *Clostridium difficile*.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI.

Introduzione

Tassonomia

Il genere *Clostridium* appartiene alla famiglia delle Clostridiaceae cui attualmente appartengono 203 specie e 5 sottospecie, con poche specie patogene per l'uomo. Di queste, 21 sono state riclassificate in altri generi, 5 all'interno del genere e 1 non classificata[1].

Nel 1994 l'eterogeneità di questa specie è stata confermata con il sequenziamento del gene 16S rRNA [2]. Ciò è stato ribadito dal lavoro di Yutin e al. che ha affermato come, rispetto alle caratteristiche fenotipiche, i 16S rRNA e le sequenze delle proteine ribosomali sono i migliori indicatori di vicinanza evolutiva. Questo genere, come molti altri, ha subito una serie di revisioni dovuta alla crescente disponibilità dei dati genomici. L'analisi delle proteine di un certo numero di componenti di questo genere ha suggerito anche da un'altra revisione[3]. I principali risultati dell'ipotesi suggerita sono:

- Il gruppo *Selenomonas-Megasphaera-Sporomusa* è ancora appartenente al genere *Clostridium*
- Il *Clostridium difficile* e i microrganismi a esso strettamente correlati sono collocati all'interno della famiglia *Peptostreptococcaceae.* Secondo questa proposta, la specie *Clostridium difficile* diverrebbe *Peptoclostridium difficile*
- I componenti della famiglia *Ruminococcaceae* appartengono al genere *Clostridium*
- E 'stato inoltre proposto di creare sei nuovi generi per classificare validamente le 78 specie descritte che non rientrano nella famiglia *Clostridiaceae*. Questi generi sono: *Erysipelatoclostridium*, *Gottschalkia*, *Lachnoclostridium*, *Peptoclostridium*, *Ruminiclostridium* e *Tyzzerella*

La specie tipo è rappresentata da *Clostridium butyricum*.

Caratteristiche

I *Clostridium* sono filogeneticamente eterogenei e sono Gram positivi, ma possono decolorarsi facilmente e apparire Gram negativi o Gram variabili, sono sporigeni e non sporigeni, cocchi e bastoncini anaerobi e non anaerobi[4].

I ceppi *Clostridium* con importanza clinica solitamente sono bastoncini Gram-positivi (alcuni Gram variabili), di 0,3-2,0 x 1,5 - 20.0 µm spesso disposti in coppie o corte catene, con estremità arrotondate o a volte appuntite o tozze. Sono frequentemente pleomorfi e variano notevolmente nella tolleranza all'ossigeno. Alcune specie come *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium haemolyticum* possono richiedere incubazione prolungata su piastre pre-ridotte o

preparate al momento e la loro completa manipolazione in ambiente anaerobico. Al contrario, *Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum* e *Clostridium carnis* sono aerotolleranti e formano colonie su piastre di agar sangue incubate in atmosfera di aria arricchita con 5-10% di CO_2[5].

Praticamente tutti i componenti del genere, tranne *Clostridium perfringens*, sono mobili con flagelli peritrichi e formano endospore ovali o sferiche che possono rigonfiare la cellula. Possono essere saccarolitici o proteolitici e sono solitamente catalasi negativi. Molte specie producono potenti esotossine.

Tossine delle specie *Clostridium*

Le specie *Clostridium* clinicamente significative producono tossine di tipo diverso. Nelle malattie che causano, la produzione di queste tossine determina caratteristiche cliniche distinte; ad esempio, tetano botulismo insorgono per la produzione di neurotossine notoriamente ritenute tra le sostanze più letali per l'uomo[6]. Le tossine dei clostridi sono proteine biologicamente attive con caratteristiche antigeniche e pertanto possono essere neutralizzate con antisieri specifici.

Nel corso dell'indagini primaria, il rilievo di particolari tossine direttamente da alcuni campioni clinici può rendere inutile l'isolamento del microrganismo, come ad esempio per *C. difficile* (consultare B 10 - Investigation of Faecal Specimens for *Clostridium difficile*). La coltura è richiesta per la tipizzazione (epidemie o casi) e per le prove di sensibilità.

Clostridium perfringens è la specie di *Clostridium* più frequentemente isolata. Fra le principali tossine letali prodotte se ne distinguono cinque tipi (AE)[5].

Clostridium tetani produce due esotossine, tetanolisina e tetanospasmina – La tetanolisina provoca la lisi dei globuli rossi e non provoca effetti noti in corso di infezione da *C. tetani*, mentre la tetanospasmina è una neurotossina che provoca le manifestazioni cliniche del tetano[6].

Anche *Clostridium botulinum* produce neurotossine (queste sono note come i veleni naturali più potenti) che causano il botulismo, malattia caratterizzata da paralisi discendente simmetrica[7]. Sono noti sette tipi di tossina (AG), l'uomo è sensibile alle tossine di tipo A, B, E, F e G; i tipi A, B, C e D causano intossicazione negli animali. Sebbene meno frequenti, esistono ceppi bivalenti che producono due diversi tipi di tossine e queste sono modulate dalla tossina predominante prodotta. Ceppi di *C. baratii* e *C. butyricum* sono stati implicati come agenti causali di botulismo in quanto producono rispettivamente anche i tipi F ed E[6,8]. *C. argentinense* (in precedenza *C. botulinum* tipo G) produce la neurotossina botulinica.

Clostridium difficile è la specie di *Clostridium* tossigenico più comune. Questi microrganismi producono due esotossine potenti - Tossina A (enterotossina) e la tossina B (attività citotossica)[6].

I tipi di *Clostridium novyi* sono tre, classificati come A, B, e uno tipo non patogeno C, differenziati per la tipologia delle tossine che producono. Le tossine sono designate da lettere greche[6].

Clostridium sordellii produce tre tossine, come il non patogeno *C. bifermentans*; quali una lecitinasi, una emolisina ossigeno-labile, e la fibrinolisina. E'anche noto per la più importante tossina letale denominata beta-tossina che lo differenzia da *C. bifermentans*. Questa beta-tossina contiene in realtà due tossine: la tossine letale (LT) e la tossina emorragica (HT)[6].

Altre specie di Clostridium producono tossine simili a quello prodotta da *C. perfringens*.

Le specie clinicamente importanti sono:

Clostridium perfringens

Sono bastoncini diritti, non mobili gram-variabili con estremità smussata, isolati o in coppia, larghezza 0.6 - 2.4 µm e lunghezza di 1.3 - 19.0 µm, raramente sporigeni. Crescono in modo ottimale a temperature comprese tra 20 e 50° C, con optimum per la maggior parte dei ceppi a 45° C. Dopo una notte d'incubazione su agar sangue si formano grandi colonie isolate. Queste possono essere piatte e ruvide o lisce e rilevate, non-emolitiche o con una ristretta area di emolisi completa all'interno di una zona più ampia di emolisi parziale. L'emolisi è più evidente su agar sangue di montone rispetto a quelle sviluppate su agar sangue di cavallo[9]. I microrganismi sono positivi per lecitinasi, nitrati, fermentazione degli zuccheri ma negativi per i test della lipasi, indolo e dell'ureasi.

Clostridium tetani

Le cellule sono di 0,5-1.7 – per 2.1 - 18.1 µm e spesso possiedono endospore terminali che conferiscono loro un aspetto a "bacchetta da tamburo". Le cellule in coltura superiore a 24 ore possono apparire Gram negative. Sono mobili con flagelli peritrichi. La temperatura ottimale di crescita è 37° C e crescono poco o nulla a 25 o 42° C.

La crescita può assumere aspetto di pellicola, e non di colonie isolate, per la vigorosa motilità che censente loro di sciamare dopo 48 ore d'incubazione. Su agar sangue, le colonie sono piatte, traslucide, e grigie con una superficie opaca, mostrano una zona di β-emolisi e diametro da 4 a 6 mm. Le colonie presentano margini irregolari e rizoidi. Sono negative per la fermentazione degli zuccheri, lecitinasi, lipasi, ureasi, test di riduzione di nitrati, forniscono risultati variabili con il test dell'indolo.

Clostridium botulinum

Le cellule sono di forma bacillare gram variabili e mostrano abbondanti spore libere sub-terminali. I tipi proteolitici A, B e F producono inizialmente colonie rizoidi isolate che diffondono e si fondono fra loro. L'emolisi è variabile, ma l'odore è intenso e simile a quello di uova avariate per produzione di H_2S. I microrganismi sono positivi per lipasi e negativi per i test indolo e dell'ureasi. I risultati sono variabili per reazione della lecitinasi.

Sono stati isolati da campioni clinici quali - feci, ferite, tessuto, e pus nonché dagli alimenti.

Clostridium difficile

Le cellule presentano forma di bastoncini mobili, con dimensioni di 0,5 -1,9 per 3,0 - 16.9 µm, producono spore ovali sub-terminali e mostrano una crescita ottimale su agar sangue a temperature del corpo umano in assenza di ossigeno. Le colonie di *C. difficile* hanno diametro di 4 - 6 millimetri, sono irregolari, rilevate, opache, grigie e bianche dopo 48 ore d'incubazione. Possono essere isolate da campioni fecali utilizzando agar CCFA (cicloserina cefoxitina fruttosio) o agar CCEY cicloserina cefoxitina tuorlo d'uovo (cycloserine cefoxitin egg yolk). Fermentano gli zuccheri, ma sono negativi per i test lecitinasi, lipasi e indolo.

Fare riferimento per ulteriori informazioni alla B 10 - Investigation of Faecal Specimens for *Clostridium difficile*.

Clostridium Novyi

Le cellule sono bastoncini mobili, gram variabile, con *occasionali* spore sub-terminali. Le dimensioni cellulari sono 0,5 -1,6 per 1,6 – 18 µm, tranne quelle di tipo *C.novyi* B, che sono più grandi, 1,1-2,5 per 3,3 - 22.5 µm. L'isolamento e l'identificazione di *C. novyi* sono difficili per la loro assoluta richiesta di anaerobiosi. Richiedono la presenza di tioli per le loro esigenze metaboliche, difficoltà di coltura e di sviluppo [10]. La crescita è stimolata da carboidrati fermentabili,

siero o sangue digerito con pepsina. Dopo incubazione notturna in condizioni anaerobiche su agar sangue, le colonie appaiono piccole, piatte, ruvide o rizoidi, traslucide, emolitiche con un bordo che diffonde e diametro di 1 - 5 mm e dopo incubazione di 48-72 ore, spesso si fondono per formare una sottile crescita diffusa che può coprire l'intera piastra; è frequente β-emolisi evidente in modo da rendere la piastra di agar sangue completamente trasparente. La crescita è scarsa nel brodo nutriente o in quello con carne cotta. Fermentano glucosio e liquefanno la gelatina. L'attività proteolitica è variabile. Sono positivi per le reazioni lecitinasi e lipasi ma danno risultati variabili per test dell'indolo.

C. Novyi tipo A di solito non è reattivo con le confezioni commerciali d'identificazione anaerobiche e frequentemente non è identificato con analisi di questo tipo. *C. Novyi* tipo B presenta diverse caratteristiche fenotipiche e può essere identificato per le proprie reazioni biochimiche[9].

Clostridium sordellii

Le colonie sono grandi, grigio-bianche e irregolari, a volte con bordo a "foglia di felce". Producono indolo e lecitinasi e fermentano gli zuccheri. Sono anche ureasi positive,ciò le differenzia da *C. bifermentans*, generalmente considerato non-patogeno.

Clostridium septicum

Sono cellule a bastoncino con gram variabile e numerose spore sub-terminali. Su agar sangue, crescono rapidamente e di solito producono una densa diffusione sciamante di tipo emolitico. La coltura non emana odore caratteristico. Sono negativi per i test della lecitinasi, lipasi, indolo e ureasi.

Sono facilmente identificati con confezioni disponibili in commercio. La fonte più comune deglii isolati di *C. septicum* negli ultimi anni è stata l'emocoltura di pazienti con neoplasie del colon o del cieco[9].

Principi di Identificazione

Le indicazioni per identificare alcune specie patogene possono essere ottenute osservando caratteristiche quali: aspetto delle colonie, colorazione di Gram e presenza o assenza di β-emolisi. Per ottenere un'identificazione presunta si possono eseguire altre prove fenotipiche[11]. È importante assicurarsi che la coltura sia pura, poiché la sottile crescita di alcune specie *Clostridium* con diffusione può mascherare i microrganismi contaminanti.

Se è richiesta la conferma di specie di *Clostridium*, gli isolati devono essere inviati alla Anaerobe Reference Unit, Public Health Wales, Cardiff.

Se è richiesta la conferma di *C. difficile*, fare riferimento alla B 10 - Investigation of Faecal Specimens for *Clostridium difficile*.

Se si sospetta *C. botulinum*, i campioni di siero, le feci del paziente e gli alimenti coinvolti dovrebbero essere indirizzati direttamente alla Foodborne Pathogens Reference Section, Colindale.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Sensibilità agli antibiotici

E' stata dimostrata una ridotta sensibilità di *C. difficile* al metronidazolo[12].

Sporulazione

Alcune specie di *Clostridium,* tra le quali *C. carnis*, *C. histolyticum* e *C. tertium* possono crescere, ma non produrre spore in atmosfera ambiente[5].

Colorazione di Gram

È importante garantire che la coltura sia pura, poiché la sottile crescita diffondente di alcune specie *Clostridium* può mascherare microrganismi contaminanti.

Possono verificarsi errori nell'esecuzione corretta della colorazione Gram (molti anaerobi possono apparire Gram negativi per eccesso di decolorizzazione). Ad esempio, la colorazione di Gram negativa delle specie *Clostridium*, soprattutto di *C. clostridioforme*, può determinare erroneamente la sua identificazione come *Bacteroides*[11].

Sistemi di identificazione commerciali

L'uso delle sole confezioni disponibili in commercio per identificare gli anaerobi può non essere accurato; per esempio *C. novyi* tipo A non è di solito reattivo con le confezioni commerciali d'identificazione per anaerobi e frequentemente non è identificato con questi metodi. *C. novyi* tipo A presenta diverse caratteristiche fenotipiche e si differenzia per le sue reazioni biochimiche[9].

1 Considerazioni sulla Sicurezza[13-29]

Microrganismi del Gruppo di Rischio 2

Sono state segnalate infezioni acquisiste in laboratorio[30.31].

Fare riferimento alle linee guida sulla sicurezza nella manipolazione dei microrganismi documentati in questa SMI.

Eseguire le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi in cabina di sicurezza microbiologica[21].

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

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni di spedizione postale e di trasporto.

2 Microrganismi Bersaglio

Specie Clostridium Segnalate come Causa di Malattia nell'Uomo[5,11]

C. perfringens, C. septicum, C. novyii type A, C. sordellii, C. tetani, C. difficile, C. botulinum, C. butyricum, C. baratii, *C. tertium, C. histolyticum*

Specie non patogene di *Clostridium* Frequentemente Isolate e che possono Causare Infezione Umana[5,32,33]

C. sporogenes, C. ramosum. C. innocuum, C. paraputrificum, C. cadaveris, C. bifermentans, C. fallax, C. clostridioforme

3 Identificazione

3.1 Aspetto Microscopico

Colorazione Gram (TP 39 - Staining Procedures)

Le specie *Clostridium* sono bastoncini Gram-positivi, possono contenere una sola endospora. Alcune specie possono essere Gram variabili.

Colorazione delle spore

Utilizzata per definire l'aspetto e la posizione delle spore (il contrasto di fase è un'opzione alternativa).

C. perfringens	Ovale, subterminale

Nota: Le spore *C. perfringens* sono raramente osservate in vivo, di solito nelle condizioni in vitro. Non sporulano sui normali terrene di di agar. Anche a *C. perfringens* appartengono ceppi non sporulanti

C. botulinum	Ovale, subterminale
C. difficile	Ovale, subterminale
C. novyi	Ovale, subterminale
C. sordellii	Ovale, subterminale

C. septicum	Ovale, subterminale
C. tetani	Rotonda, terminale(dando un aspetto a bacchetta di tamburo)

3.2 Terreno di Primo Isolamento

Agar contente sangue incubato in anaerobiosi a 35°C - 37°C per 40-48 ore

Agar tuorlo d'uovo incubato in anaerobiosi a 35°C - 37°C per 16-24 ore

Se la coltura è per *C. difficile* tossigeno, l'agar Cycloserine Cefoxitina fruttosio (CCFA) o l'agar Cefoxitina Cycloserine tuorlo d'uovo (CCEY) dovrebbero essere seminati e incubati in anaerobiosi a 35-37° C per 24 – 48 ore. Gli antibiotici cicloserina e cefoxitina inibiscono la crescita di molti batteri diversi *C. difficile*[11].

3.3 Aspetto delle Colonie

L'aspetto delle colonie varia con le specie e di seguito è riportata una succinta descrizione di quelle più importanti

Microrganismo	**Caratteristiche di crescita su agar contenete sangue dopo incubazione anaerobica a 35°C – 37°C for 40–48 ore**
C.Botulinum/sporigene	Colonie larghe (3 mm), irregolarmente circolari, lisce, grigiastre, traslucide con margine fibrillare che può diffondere. La maggior parte dei ceppi sono β-emolitici; producono lipasi.
C. difficile	Colonie lucenti, grigie, rotonde, con margine rugoso; fluorescenza verde-gialla alla luce UV (360 nm. ± 20nm). Di solito non sono emolitiche, sviluppano caratteristico odore fetido.
C. novyi	Colonie rilevate, circolari, che divengono piatte ed irregolari con l'invecchiamento della coltura. Le colonie tendono a fondersi formando una crescita diffusa con una doppia zona di β-emolisi. Il tipo A produce lecitinasi e lipasi.
C. perfringens	Colonie grandi, lisce, regolarmente convesse, ma possono essere piatte con margine irregolare. Di solito presentano una doppia area di β-emolisi, produce lecitinasi.
C. septicum	Di solito produce una crescita diffusa consistente con un'area ridotta di β-emolisi
C.sordelli/b fermentans	Colonie bianche, convesse, rotonde, con margine frastagliato, che può diffondere. Possono essere β-emolittiche, producono lecitinasi, indolo positive
C. tetani	Sottile crescita diffusa che può apparire β-emolitica (può essere di difficile osservazione)
Altre specie *Clostridium*	L'aspetto della colonia è vario, ma può produrre una crescita diffusa che può essere o non β-emolitica

3.4 Procedure di Prova

Per differenziare le specie *Clostridium* possono essere utilizzati i seguenti accertamenti. Se clinicamente indicato, consultare l'appropriata Reference Unit Anaerobe per identificazione successiva.

3.4.1 Test biochimici

Test di Nagler TP 22 - Nagler Test

Il test nagler determina la capacità del microrganismo di produrre l'enzima lecitinasi. Quelli che producono lecitinasi sono identificati da una zona di opalescenza attorno alle singole colonie su agar tuorlo d'uovo. La lecitinasi di *C. perfringens* è inibita dall'antitossina di *C. perfringens* tipo A.

Pure *Clostridium baratii*, *Clostridium absonum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium Sordelli* e *Clostridium novyi* producono lecitinasi. *C. Sordelli* e *C. bifermentans* producono enzimi che sono strettamente correlati alla alfa tossina (lecitinasi) di *C. perfringens* che possono produrre un parziale reazione crociata[34].

Il risultato positivo al test di Nagler è indicato dalla produzione di lecitinasi e dall'inibizione dovuta all'antitossina.

Nota: Negli ultimi anni, la diffusione dell'utilizzo del test di Nagler è diminuita per la ridotta disponibilità dell'antitossina. Un'alternativa al test di Nagler utilizzata in alcuni laboratori è il Camp test Inverso

CAMP test Inverso.

Il CAMP test Inverso est può essere usato per la differenziare *C. perfringens* da altre specie *Clostridium*. I *C. perfringens* produttori di alfa tossina e gruppo B degli streeptococchi β-emolitici crescono con aspetti caratteristici su agar sangue; tuttavia si deve porre attenzione per garantire l'uso di colture pure[35].

Test per Indolo TP 19 - Indole Test

Il test per l'indolo determina la capacità di un microrganismo di produrre indolo dalla degradazione del triptofano.

Gli anaerobi, in particolare le specie *Clostridium*, formano indolo, ma può rapidamente scomporsi quando prodotto; quindi, possono verificarsi false reazioni negative[36].

I Ceppi di *C. Novyi* A danno risultati variabili con il test dell'indolo, ma di solito sono indolo negativi.

Test della Lipasi

Il test della lipasi determina la capacità dei microrganismi di produrre l'enzima lipasi che catalizza l'idrolisi dei trigliceridi e digliceridi in acidi grassi e glicerolo. Ciò è dimostrato dalla lucentezza iridescente sulle colonie che si sviluppano sul terreno nella piastra. Questo aspetto aiuta la differenziazione delle specie *Clostridium*.

C. botulinum, *C. sporogenes*, *C. Novyi A*, *C. ghonii* e *C. cochlearium* producono lipasi. *C. leptum* ha reazioni lipasi variabili, ma di solito è lipasi negativo.

Test dell'Ureasi TP 36 - Urease Test

Il test dell'ureasi è utilizzato per determinare la capacità di un microrganismo di scindere l' urea con produzione dell'enzima ureasi.

C. sordellii è ureasi positivo; ciò lo differenzia da *C. bifermentans*, che gli assomiglia ma è ureasi negativo.

3.4.2 Sistemi di identificazione commerciali

I laboratori devono seguire le istruzioni del produttore; i test rapidi e le confezioni commerciali devono essere validati prima dell'uso e dimostrare di essere idonei agli scopi prefissati.

3.4.3 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry

Il metodo Matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica della cellula batterica ed è emerso come una tecnologia nuova per l'Identificazione delle specie. Ha dimostrato di essere uno strumento rapido e potente per riproducibilità, sensibilità e velocità analitica. Il vantaggio fornito dal MALDI-TOF consiste nella disponibilità dei risultati delle analisi in poche ore rispetto a diversi giorni richiesti dagli altri metodi. La velocità e semplicità della preparazione dei campioni, associata all'acquisizione dei risultati e al costo ridotto dei materiali necessari, rende questo metodo particolarmente adatto all'uso di routine[37].

Questa tecnologia è stata utilizzata per identificare le specie *Clostridium* e differenziare i diversi ribotipi fra gli isolati di *Clostridium difficile*. Comunque è essenziale un ampio archivio per identificare le specie e i ceppi strettamente correlati ed è anche necessaria la disponibilità di ceppi per ottimizzare le banche dati[38,39].

Altra limitazione all'uso di questa tecnica è dovuta alla presenza di spore di specie *Clostridium* e delle colture troppo recenti ora utilizzate per ridurre al minimo l'interferenza spettrometrica[39].

3.4.4 Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica perché semplice, rapida, sensibile e specifica. La base per le applicazioni diagnostiche della PCR in microbiologia è la rivelazione degli agenti infettivi e la possibilità di differenziare ceppi non patogeni dai patogeni, tramite la rilevazione di geni specifici.
Tuttavia, questo metodo ha dei limiti. Sebbene il gene 16S rRNA sia generalmente scelto per la progettazione di primer PCR specie-specifici per l'identificazione, la loro progettazione è difficile quando le sequenze dei geni omologhi hanno elevata affinità.

Questa tecnica è stato utilizzata con successo per l'identificazione di specie *Clostridium* quali *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. baratii* e *C. butyricum*, *C. Novyi*, *C. difficile*[40-44].

3.5 Identificazione Successiva

Metodi rapidi

Recentemente sono stati sviluppati numerosi metodi rapidi di tipizzazione per isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari, come la Pulsed- Field Gel Electrophoresis (PFGE), Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP),16S rDNA gene sequencing, PCR-restriction fragment length Polymorphism (PCR-RFLP), Microarray analysis, Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MVLA) e anche il whole-genome sequencing (WGS). Tutti questi approcci permettono di identificare i sottotipi di ceppi, ma lo ottengono con diversa accuratezza, potere discriminante, e riproducibilità.

Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono accessibili solo ai laboratori di riferimento e sono difficili da implementare in un laboratorio clinico per l'identificazione batterica di routine.

Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Il Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism è un metodo ad alta risoluzione per l'intero genoma ed è utilizzato come strumento economicamente conveniente per l'analisi rapida ed efficiente della diversità genetica nell'ambito dei genomi batterici. E 'utile per una vasta gamma di applicazioni quali l'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi isolati da campioni clinici,

per l'identificazione di genotipi epidemici, per studi di micro e macro-variazione, e della genetica delle popolazioni.

Il metodo FAFLP ha numerosi vantaggi rispetto ad altre tecniche di studio dell'impronta genetica del DNA perché valuta l'intero genoma per le sequenze conservate e quelle in rapida evoluzione in un modo relativamente corretto. Il numero di frammenti ottenuti per scopi comparativi tra isolati è significativamente maggiore di quelli evidenziati dalla pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), rendendosi così più discriminante rispetto alla PFGE, inoltre i risultati della FAFLP sono molto riproducibili grazie a precisi parametri ciclici PCR molto riproducibili.

Questo metodo relativamente veloce può essere applicato a diversi clostridi e utilizzato per generare librerie d'identificazione. Le librerie con profili AFLP ben definiti di ceppi *Clostridium* forniscono un prezioso strumento addizionale alla possibilità d'identificazione delle specie *Clostridium*.

Questa tecnica è stata utilizzata per tipizzare il genotipo di *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. Novyi* e *C. perfringens*[45-48]. E 'stata anche utilizzata per differenziare *C. bifermentans* e ceppi di *C. sordellii* (che sono fenotipicamente molto simili) e per ceppi di *C. perfringens*[49].

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva la variazione genetica tra ceppi con rari tagli ottenuti con enzimi di restrizione e successiva separazione su gel di agarosio dei grandi frammenti genomici ottenuti. La PFGE è nota per avere un'elevata capacità discriminante ed è frequentemente utilizzata per le indagini di epidemie. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. Inoltre, in funzione delle sue caratteristiche quali, richiesta di tempo (30 ore o più per l'esecuzione), attrezzature speciali e lettura dei risultati spesso soggettiva; la PFGE non è diffusamente usata se non nei laboratori di riferimento[50,51].

La PFGE è considerata uno metodo molto utile per l'analisi epidemiologica molecolare dei tipi proteolotici di *C. botulinum* A e B perché ha consentito una loro differenziazione, ma non ha avuto molto successo con i *C. botulinum* non-proteolitici[52]. È stata usata per la tipizzazione di *C. difficile*, anche se una parte considerevole dei ceppi non sono classificabili con questa tecnica per la degradazione del DNA durante la procedura; rendendo non interpretabili le migrazioni su gel o la probabile formazione di spore[53].

La PFGE è stata utilizzata anche per stabilire che *C. perfringens* è un agente eziologico di epidemie di origine alimentare e per rivelare la sua ampia diversità genetica quando isolato da sorgenti diverse[54].

16S rDNA gene sequencing analysis

Il metodo di identificazione genotipico, noto come sequenziamento del gene 16S rRNA usato per studi filogenetici è stato in grado di riclassificare i batteri in modo completo in nuove specie, o anche generi. E' stato anche usato per descrivere nuove specie che non-sono mai state coltivate con successo.

Questo è stato utilizzato per differenziare le specie *Clostridium*, ad esempio C*. novyi* tipo A da *C. botulinum* tipo C che sono strettamente correlati[9].

Microarrays

Le tecnologie microarray DNA possono fornire informazioni dettagliate e clinicamente rilevanti sugli isolati determinando simultaneamente la presenza o l'assenza di un gran numero di geni di virulenza associati con un singolo test; tuttavia, il loro valore clinico è limitato dalla complessa

metodologia che non è adatta per uso di routine nei laboratori diagnostici di microbiologia.

Questa tecnica è stata utilizzata e ha dimostrato elevato grado di rilevazione e d'identificazione delle specie patogene di *Clostridium* e presenta vantaggi rispetto ai metodi convenzionali tradizionali. E' stata anche particolarmente utile per efficienza e specificamente per l'identificazione di tutte le specie *Clostridium* presenti in popolazioni batteriche miste. La capacità a elevato rendimento di questa tecnica è molto utile nel rilevamento e analisi dei ceppi epidemici e per studi epidemiologici di infezioni da *Clostridium*[7].

Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MVLA)

La Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MVLA) è un metodo utilizzato per eseguire la tipizzazione molecolare di particolari microrganismi. Utilizza la variazione naturale del numero di sequenze di DNA ripetute in tandem trovate in molti differenti loci nel genoma di diversi microrganismi. I profili di tipizzazione molecolari sono utilizzati per studiare le vie di trasmissione, per valutare fonti di infezione e anche l'impatto indotto dall'intervento umano sulla composizione delle popolazioni batteriche, come la vaccinazione e l'uso di antibiotici.

Questa è stata utilizzata con successo nella tipizzazione di *C. perfringens* e varianti emergenti di *C. difficile*[55,56].

Whole Genome Sequencing (WGS)

Conosciuto anche come sequenziamento del genoma completo, completo sequenziamento del genoma, o intero sequenziamento del genoma. È una procedura di laboratorio che determina la sequenza genomica completa del DNA di un organismo in una sola volta. Sono note diverse tecniche a elevato rendimento disponibili e utilizzate per sequenziare un intero genoma, come pyrosequencing, tecnologia nanoporo, iIlumina sequencing, ion torrent sequencing, ecc. Il metodo di sequenziamento costituisce una grande promessa per una rapida, precisa e completa identificazione delle vie di trasmissione batterica in ambito ospedaliero e comunitario, con concomitante riduzione delle infezioni, morbilità e costi.

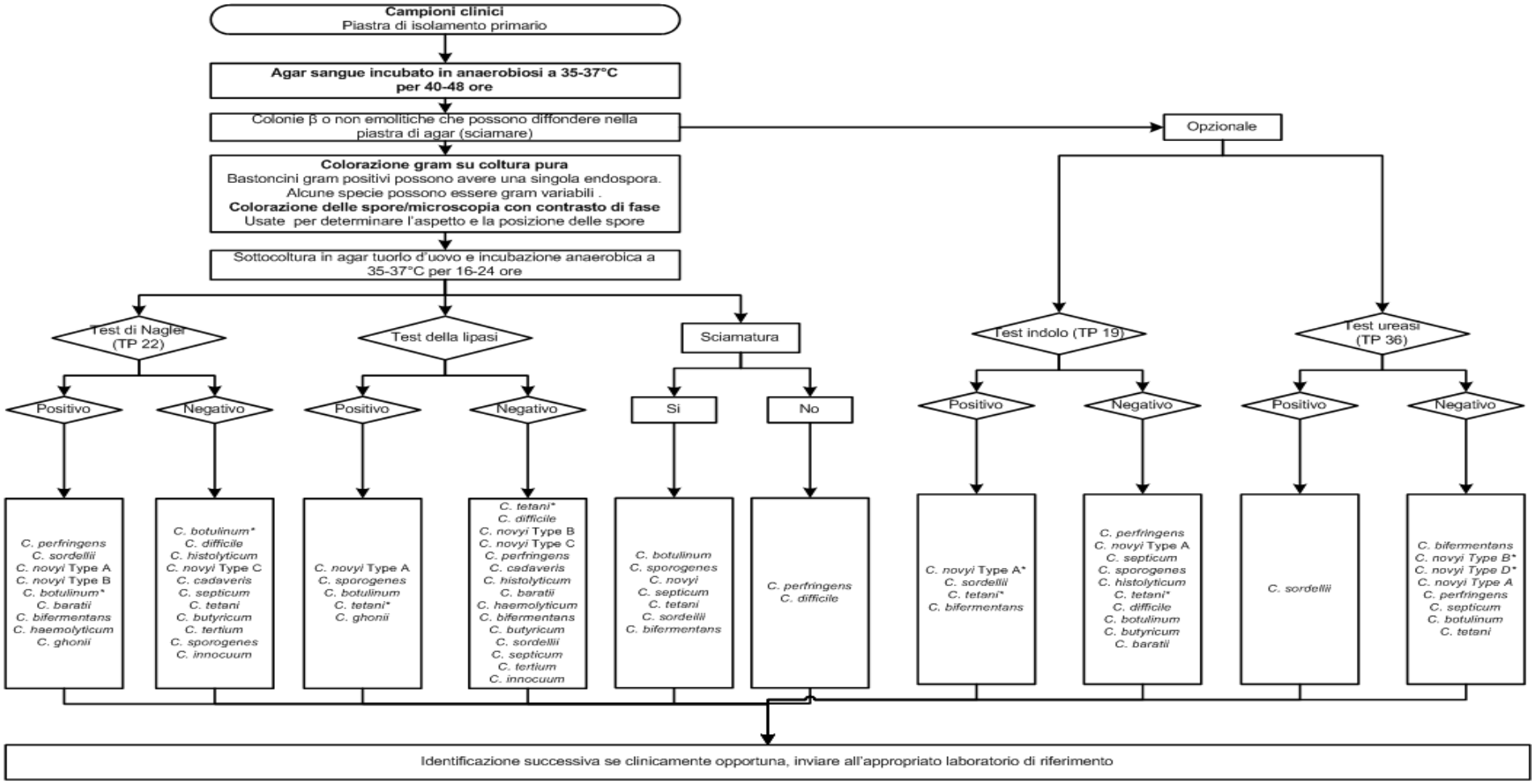
E' stato utilizzato con successo per indagare la filogenesi, il trasferimento genico orizzontale, la ricombinazione e la micro e macroevoluzione dei principali patogeni acquisiti in ospedale, *C. difficile* e pure *C. botulinum* proteolitici e *C. perfringens*[57-59].

3.6 Conservazione e Invio

Se è richiesta un'identificazione successiva, fare riferimento al manuale dell'appropriato laboratorio di riferimento per i dettagli d'invio.

Si raccomanda la conservazione con congelamento (-20° C) dei campioni fecali positivi per tossina nel caso si presenti la richiesta di altre indagini con successiva coltura[60,61].

4 Identificazione di specie *Clostridium*



* Possono dare risultati variabili del test

Il diagramma di flusso è solo indicativo.

5 Refertazione

5.1 Identificazione Presunta

Se rilevate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram della coltura e gli isolati sono metronidazolo sensibili.

5.2 Conferma dell'Identificazione

Successiva alle procedure di'identificazione, come indicato nel presente documento e/o referto del Laboratorio di Riferimento.

5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutte le colture positive da sedi normalmente sterili.

In accordo con i protocolli locali il medico microbiologo deve essere informato anche della specie presunta o confermata di *Clostridium*, e quando il modulo di richiesta contiene informazioni importanti quali

- Casi di trauma, ferite penetranti, fratture esposte o ritenzione di corpo estraneo, o inoculazione nota per abuso di droghe (specialmente eroina)
- Aborto settico
- Sospetta mionecrosi da clostridi, miofascite (necrotizzante), infezione di ferita chirurgica (in modo particolare nei casi di malattia occlusiva dei vasi periferici e/o diabete mellito)
- Altre condizioni cliniche gravi quali l'alcolismo o abusi di sostanze, immunodeficienza, tumori, oppure persone in trattamento per neoplasie (includendo neutropenia e/o mucosite)
- Intossicazione alimentare (specialmente se si manifesta paralisi discendente con interessamento dei nervi cranici) e/o consumo inusuale di alimenti importati (sospetto di botulinismo)
- Ricerca in corso di epidemie
- Colite pseudomembranosa o diarrea in corso di terapia antibiotica
- Sospetto tetano

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico

5.4 CCDC

Fare riferimento alle Memorandum locale di Informazione

5.5 Public Health England[62]

Fare riferimento alle linee guida del CDSC e ai documenti del COSUVUR

5.6 Gruppo controllo Infezione

Informare secondo i protocolli locali il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati presunti o confermati

Invio

6.1 Laboratorio di Riferimento

Per informazioni sugli accertamenti disponibili, i tempi di risposta, le procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti il laboratorio di riferimento rivolgersi all'appropriato laboratorio di riferimento.

https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services

Contattare il centralino della PHE: Tel. +44 (0) 20 8200 4400

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni sulle prove disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed eventuali altri richieste per 'invio del campione:

Inghilterra e Galles

https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services

Scozia

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

Irlanda del Nord

http://www.belfasttrust.hscni.net/Laboratory-MortuaryServices.htm

7 Notifica al PHE[62,63] o Equivalente[64-67-]

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) tutti i casi nei quali s'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 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 al 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 HCAIs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification

Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010

Esistono accordi diversi in Scotland[64,65], Wales[66] and Northern Ireland[67].

Traduzione a cura di Roberto Rescaldani, già primario del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori – Monza.
Collaboratori: Roberto Rossetti, già Primario del Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile di Pistoia ASL 3
Monica Raggi, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza
I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI – www.apsi.it - Webmaster Sergio Malandrin, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

Bibliografia

1. Euzeby,JP. Genus *Clostridium*. 2013.

2. Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, et al. The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol 1994;44:812-26.

3. Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. Environ Microbiol 2013.

4. Finegold SM, Song Y, Liu C. Taxonomy – General Comments and Update on Taxonomy of Clostridia and Anaerobic cocci. Anaerobe 2002;8:283-5.

5. Koneman EW, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W J, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p. 709-84

6. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990;3:66-98.

7. Janvilisri T, Scaria J, Gleed R, Fubini S, Bonkosky MM, Gr+Âhn YT, et al. Development of a microarray for identification of pathogenic Clostridium spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2010;66:140-7.

8. Kalia VC, Mukherjee T, Bhushan A, Joshi J, Shankar P, Huma N. Analysis of the unexplored features of rrs (16S rDNA) of the Genus Clostridium. BMC Genomics 2011;12:18.

9. Brazier JS, Duerden BI, Hall V, Salmon JE, Hood J, Brett MM, et al. Isolation and identification of Clostridium spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. J Med Microbiol 2002;51:985-9.

10. Moore WB. Solidified media suitable for the cultivation of Clostridium novyi type B. J Gen Microbiol 1968;53:415-23.

11. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D. Preliminary Identification Methods, Identification using pre-formed enzyme tests, Advanced Identification Methods, Laboratory tests for diagnosis of C. difficile Enteric Disease. Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. Star Publishing Company; 2002. p. 54-141.

12. Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P, et al. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in Clostridium difficile. J Antimicrob Chemother 2008;62:1046-52.

13. 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".

14. 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.

15. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.

16. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.

17. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.

18. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).

19. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32

20. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.

21. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.

26. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.

27. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.

28. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.

29. 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

30. Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. Health Lab Sci 1976;13:105-14.

31. Baron EJ, Miller JM. Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risks. 3 2008;60:241-6.

32. Poduval RD, Mohandas R, Unnikrishnan D, Corpuz M. Clostridium cadaveris bacteremia in an immunocompetent host. Clin Infect Dis 1999;29:1354-5.

33. Gucalp R, Motyl M, Carlisle P, Dutcher J, Fuks J, Wiernik PH. Clostridium cadaveris bacteremia in the immunocompromised host. Med Pediatr Oncol 1993;21:70-2.

34. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, editors. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 531

35. Buchanan AG. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of Clostridium perfringens. J Clin Microbiol 1982;16:761-2.

36. Reed RW. Nitrate, Nitrite and Indole Reactions of Gas Gangrene Anaerobes. J Bacteriol 1942;44:425-31.

37. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2008;74:5402-7.

38. Veloo AC, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. Anaerobe 2011;17:211-2.

39. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2013;26:547-603.

40. Grant KA, Kenyon S, Nwafor I, Plowman J, Ohai C, Halford-Maw R, et al. The identification and characterization of Clostridium perfringens by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. Foodborne Pathog Dis 2008;5:629-39.

41. Satterfield BA, Stewart AF, Lew CS, Pickett DO, Cohen MN, Moore EA, et al. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the Clostridium botulinum toxin genes A, B, E and F. J Med Microbiol 2010;59:55-64.

42. Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing Clostridium botulinum, Clostridium baratii and Clostridium butyricum. J Appl Microbiol 2009;107:465-73.

43. Akbulut D, Grant KA, McLauchlin J. Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the Clostridium botulinum types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism. Foodborne Pathog Dis 2004;1:247-57.

44. Belanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid detection of Clostridium difficile in feces by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003;41:730-4.

45. Keto-Timonen R, Nevas M, Korkeala H. Efficient DNA fingerprinting of Clostridium botulinum types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis. Appl Environ Microbiol 2005;71:1148-54.

46. Klaassen CH, van Haren HA, Horrevorts AM. Molecular fingerprinting of Clostridium difficile isolates: pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 2002;40:101-4.

47. McLauchlin J, Salmon JE, Ahmed S, Brazier JS, Brett MM, George RC, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium novyi*, *C. perfringens* and *Bacillus cereus* isolated from injecting drug users during 2000. J Med Microbiol 2002;51:990-1000.

48. McLauchlin JC, Ripabelli G, Brett MM, Threlfall EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. International Journal of Food Microbiology 2000;56:21-8.

49. Keto-Timonen R, Heikinheimo A, Eerola E, Korkeala H. Identification of Clostridium species and DNA fingerprinting of Clostridium perfringens by amplified fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2006;44:4057-65.

50. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol 2006;55:645-59.

51. Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of listeria monocytogenes via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Int J Food Microbiol 1996;32:343-55.

52. Nevas M, Lindstrom M, Hielm S, Bjorkroth KJ, Peck MW, Korkeala H. Diversity of proteolytic Clostridium botulinum strains, determined by a pulsed-field gel electrophoresis approach. Appl Environ Microbiol 2005;71:1311-7.

53. Alonso R, Martin A, Pelaez T, Marin M, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of Clostridium difficile. J Med Microbiol 2005;54:155-7.

54. Johansson A, Aspan A, Bagge E, Baverud V, Engstrom BE, Johansson KE. Genetic diversity of Clostridium perfringens type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. BMC Microbiol 2006;6:47.

55. Youhanna S, Sawires S, Songer JG. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. Anaerobe 2005;11:262-72.

56. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of Clostridium difficile isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J Clin Microbiol 2007;45:1024-8.

57. Parkhill J, Wren BW. Bacterial epidemiology and biology--lessons from genome sequencing. Genome Biol 2011;12:230.

58. Sebaihia M, Peck MW, Minton NP, Thomson NR, Holden MT, Mitchell WJ, et al. Genome sequence of a proteolytic (Group I) Clostridium botulinum strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. Genome Res 2007;17:1082-92.

59. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, et al. Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:996-1001.

60. Department of Health, Health Protection Agency. Clostridium difficile Infection: How to deal with the problem. 2009.

61. Health Protection Scotland. Protocol for the Scottish surveillance programme for Clostridium difficile associated disease. 2009.

62. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.

63. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.

64. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).

65. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.

66. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.

67. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).