

Aspetti microbiologici delle infezioni da *Clostridium difficile* in Italia: risultati di uno studio condotto negli anni 2012-2013

Patrizia Spigaglia,¹ Fabrizio Barbanti,¹ Matteo Morandi,² Maria Luisa Moro,² Paola Mastrantonio¹

¹Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy; ²Area di Programma Rischio Infettivo, Agenzia Sanitaria e Sociale, Regione Emilia Romagna, Bologna, Italy

Summary

Microbiological aspects of *Clostridium difficile* infection in Italy: results of a study performed in 2012-2013.

Background. A national project on *Clostridium difficile* infection (CDI), funded by the Center for Prevention and Control of Diseases of Italian Ministry of Health, was performed in 2012-2013. Microbiological laboratories of the National Public Health System were invited by the Istituto Superiore di Sanità to provide information on CDI diagnostics through a closed answer questionnaire.

Materials and Methods. In total, 14 regions and the independent province of Trento participated in and 278 filled questionnaires were sent back. The data obtained indicate that 87% of the laboratories routinely perform diagnostic assays for *C. difficile*. GDH detection is used as the first screening test by 33% of these laboratories. Most of them declared to use toxins enzyme immunoassays (88%), whereas a minority performs *C. difficile* culture (26%) or molecular assays (19%). Only 37% of the laboratories stated to adopt a diagnostic algorithm. The algorithms adopted are different and high heterogeneity in the combination of the assays used was observed.

Results. Fifty eight percent of laboratories declared to type *C. difficile* strains, the majority (82%) sending faecal samples or strains to a

reference laboratory. Sixty-two laboratories, routinely performing *C. difficile* culture, were invited by ISS to send five isolates for molecular typing. In total, 103 isolates from 22 hospitals were collected and 31 different PCR-ribotypes were identified. PCR-ribotype 356/607 was the most frequent (27%), followed by 018 (12%) and 027 (8%). The latter is a worldwide spread hypervirulent type only recently emerged in our country. A molecular characterization of the different PCR-ribotypes detected was also performed by Xpert® *C. difficile*.

Conclusions. The study highlights the need for a more careful selection of diagnostic algorithms to improve CDI diagnosis and the urgency to implement a National Surveillance of CDI in Italy.

Introduzione

L'infezione da *C. difficile* (*C. difficile* infection, CDI) è una delle principali infezioni acquisite in ambito ospedaliero e la più frequente a carico dell'apparato intestinale (1, 7, 12). La sintomatologia è varia: da diarree autolimitanti a forme gravi, quali colite pseudomembranosa e megacolon tossico, che possono portare al decesso del paziente (1, 12).

La CDI insorge a seguito di un trattamento antibiotico che determina l'alterazione e/o distruzione della microflora intestinale e si riscontra particolarmente nei pazienti anziani, soprattutto se ricoverati in reparti per acuti o lungodegenze, e in soggetti affetti da malattie croniche o immunodepressi (13, 15).

I principali fattori di virulenza di questo patogeno sono rappresentati dalla tossina A (TcdA) e dalla tossina B (TcdB) (2). Ambedue le tossine sono delle glicosiltransferasi che agiscono disorganizzando il citoscheletro cellulare. L'azione delle tossine determina un'intensa infiammazione del colon con alterazione dell'epitelio intestinale e conseguente aumento della permeabilità che si manifesta come diarrea. Nei ceppi che presentano mutazioni del gene *tcdC*, codificante per il regolatore negativo delle tossine A e B, è stata osservata un'aumentata produzione delle tossine (2). Alcuni ceppi di *C. difficile* producono anche una terza tossina chiamata tossina binaria (CDT). La CDT depolimerizza l'actina del citoscheletro cellulare ed aumenta l'adesione del batterio inducendo nella cellula epiteliale la produzione di protrusioni microtubolari (8).

Negli ultimi anni la CDI è divenuta uno dei più importanti problemi di salute pubblica a livello internazionale. Infatti, si è osservato non solo un aumento dell'incidenza delle infezioni ma anche della loro gravità, delle recidive e della mortalità. La causa è da ricercare nell'emergenza e nella diffusione di ceppi particolarmente virulenti, detti ipervirulenti (3, 10). In particolare, i ceppi appartenenti al PCR-

Correspondence: Patrizia Spigaglia, Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy.
Tel.: +39.06.4990.2335; Fax: +39.06.4938.7112.
E-mail: patrizia.spigaglia@iss.it

Key words: *Clostridium difficile*; infection, diagnostic tests, molecular typing.

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

©Copyright P. Spigaglia et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Microbiologia Medica 2014; 29:4722
doi:10.4081/mm.2014.4722

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

ribotype 027 (conosciuto anche come pulse-field-type NAP1, restriction endonuclease analysis group B1) si sono diffusi nel mondo a partire dall'inizio degli anni 2000 causando infezioni gravi e epidemie (4, 6). Più recentemente un altro tipo ipervirulento, il PCR-ribotype 078, è causa di infezioni gravi non solo in ambito ospedaliero ma anche in comunità (9). Rispetto ai pazienti con CDI da PCR-ribotype 027, quelli con CDI da PCR-ribotype 078 sono mediamente più giovani e presentano meno comorbidità.

In Italia non è ancora operativo un sistema di Sorveglianza Nazionale per le CDI e le informazioni relative all'incidenza di questa infezione e alle tecniche diagnostiche adottate dai laboratori nelle diverse Regioni sono disomogenee, rendendo difficile delineare un quadro complessivo. Nel 2011, il Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute ha approvato e finanziato il Progetto "Sorveglianza delle infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici" per valutare la possibilità di attuare un sistema di sorveglianza nazionale per le CDI secondo modelli già adottati in altri Paesi Europei e per avere informazioni sull'attività diagnostica per le CDI dei laboratori microbiologici del Sistema Sanitario Nazionale. I dati che si riferiscono a quest'ultimo obiettivo del Progetto sono stati raccolti dall'Unità Operativa dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), e sono riportati in questo lavoro assieme ai risultati relativi alla tipizzazione dei ceppi di *C. difficile* raccolti durante lo studio.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio ed analisi dei dati

L'Unità Operativa ISS ha effettuato un'indagine nazionale a campione, con la collaborazione degli Assessorati Regionali e delle Provincie autonome della Sanità tramite i Referenti Regionali.

L'indagine si è basata sull'invio di un questionario *ad hoc*, predisposto con nove domande, per la raccolta di informazioni sulle tecniche e sui protocolli diagnostici impiegati per la diagnosi delle CDI nei laboratori ospedalieri.

I laboratori di microbiologia delle Strutture Sanitarie operanti in ciascuna Regione sono stati contattati dal Referente Regionale e sollecitati a rispondere alle domande del questionario inviato.

I dati sono stati raccolti tra ottobre e dicembre 2012.

Raccolta, tipizzazione e caratterizzazione dei ceppi

Per ottenere informazioni sulla circolazione dei diversi PCR-ribotype negli ospedali partecipanti, è stato chiesto ai 62 laboratori che avevano dichiarato di effettuare coltura per *C. difficile* di inviare al laboratorio dell'Unità Operativa ISS cinque ceppi di *C. difficile* isolati da pazienti diversi tra luglio e novembre 2013.

La tipizzazione dei ceppi è stata effettuata tramite Capillary Gel Electrophoresis (CGE) PCR-ribotyping attualmente la tecnica più usata in Europa per la tipizzazione di *C. difficile* (11, 14). Questa metodica si basa sul polimorfismo delle sequenze di DNA che codificano per le regioni intergeniche 16S-23S dell'rRNA. I frammenti di DNA intergenico amplificati sono separati in base alla dimensione del rapporto di carica all'interno di un piccolo capillare. La marcatura dei primers con un fluoroforo permette la rilevazione per fluorescenza dei prodotti amplificati.

Il protocollo e le condizioni operative sono state precedentemente pubblicate (11). Brevemente, il DNA genomico dei ceppi è stato estratto usando NUCLEOBOND buffer set III e NucleoBond AXG 20 (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Il numero e le dimensioni dei frammenti PCR sono stati analizzati in un ABI 310 genetic analyser usando un Peak Scanner software 1.0 (Applied Biosystems). I risultati ottenuti dall'analisi sono stati sottomessi al sito web WEBRIBO

(<https://webribo.ages.at/>) dell'Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES), per la comparazione con i patterns presenti nella banca dati. I tipi predominanti sono stati anche inviati al Reference Laboratory dell'University of Leeds (UK) per un'ulteriore tipizzazione poiché la banca dati utilizzata da questa Università non è la stessa utilizzata dall'AGES.

La caratterizzazione dei diversi PCR-ribotype identificati è stata eseguita tramite Xpert® *C. difficile* (Cepheid). Questo sistema integrato, chiuso, associa alla preparazione del campione una real-time PCR che ha come target i geni *tcdB*, *ctdA* e *tcdC*, che codificano per la tossina B, la sub-unità A della tossina binaria (CDT) e il regolatore negativo delle tossine A e B, rispettivamente. In particolare, il saggio è in grado di poter identificare la delezione presente in posizione 117 del *tcdC* (117).

Analisi dei dati e filogenetica

La raccolta e l'elaborazione dei dati riportati nei questionari è stata condotta usando Epi Info™ 7, un programma che consente la costruzione di database e l'analisi dei dati relativi. L'Area Rischio Infettivo dell'Agenzia Sanitaria Sociale della Regione Emilia-Romagna ha collaborato nella predisposizione del database e nell'analisi dei dati relativi ai questionari.

La comparazione dei patterns prodotti dal PCR-ribotyping su gel di agarosio al 3% è stata ottenuta utilizzando il programma GelCompar II v6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) utilizzando il coefficiente di correlazione di Dice con un'ottimizzazione dell'1%. Il dendrogramma è stato costruito mediante il metodo Unweighted Pair Group Mean Association (UPGMA). I ceppi che mostravano una percentuale di similarità $\geq 85\%$ sono stati considerati "familiari".

Risultati

Le Regioni e le Strutture Sanitarie partecipanti allo studio

In totale sono stati compilati 278 questionari provenienti da 14 Regioni e dalla Provincia autonoma di Trento.

Non sono pervenuti i questionari dalle Regioni Basilicata, Calabria, Liguria, Molise, Puglia e dalla Provincia autonoma di Bolzano.

L'analisi delle risposte ha evidenziato che la maggior parte dei laboratori (77%) appartenevano a strutture pubbliche. Solo in Lombardia e Veneto la percentuale delle strutture private partecipanti allo studio è risultato pressoché equivalente a quella delle strutture pubbliche. La metà delle strutture partecipanti (50%) erano dotate di almeno 300 posti letto totali (Tabella 1).

La diagnostica delle infezioni da *C. difficile* e la tipizzazione dei ceppi nei laboratori microbiologici

La maggior parte dei 278 laboratori partecipanti allo studio ha dichiarato di eseguire di routine analisi diagnostiche per *C. difficile* (Tabella 2), il 90% di questi solo su specifica richiesta del clinico.

La percentuale dei laboratori che eseguono diagnosi di *C. difficile* aumenta con l'aumentare delle dimensioni della struttura, come illustrato dal grafico riportato in Figura 1.

Riguardo alle metodiche utilizzate, il 33% dei laboratori partecipanti allo studio ha dichiarato di eseguire la ricerca dell'antigene GDH come primo test di screening (Tabella 2). I saggi immunoenzimatici (EIA) per la ricerca delle tossine sono utilizzati dalla maggioranza (88%) dei laboratori. In particolare, l'83% effettua saggi per la rilevazione delle tossine A e B mentre il 5% effettua diagnosi sul rilevamento della sola tossina A. Solo una minoranza dei laboratori esegue saggi colturali per l'isolamento di *C. difficile* (26%) o saggi molecolari per la ricerca delle tossine (19%).

Considerando i dati ottenuti dalla sola diagnosi mediante saggio immunoenzimatico (EIA) per la ricerca delle tossine A e B, la percentuale media di positività per *C. difficile* è pari al 12%, in linea con quella riportata dalla maggior parte degli ospedali Europei. Va comunque sottolineata una grande eterogeneità sia nel numero dei saggi effettuati sia nella percentuale dei risultati positivi ottenuti nelle diverse Regioni, con un massimo di positività del 17% in Toscana ed un minimo del 5% in Campania.

Solo novantatré laboratori (37%) hanno dichiarato di adottare un algo-

ritmo diagnostico, ossia di eseguire due o più saggi contemporaneamente oppure in sequenza. La combinazione dei test diagnostici utilizzati negli algoritmi adottati dai diversi laboratori è riportata nella Figura 2.

Per quanto riguarda la sequenza nell'uso dei saggi, i risultati indicano l'uso prevalente della ricerca del GDH nel primo *step*, di EIA per le tossine nel secondo e di un saggio molecolare o coltura tossinogenica nel terzo.

Dai questionari raccolti si evince che il 58% (140/243) dei laboratori che effettuano diagnosi esegue anche una tipizzazione molecolare

Tabella 1. Questionari ricevuti per Regione, tipologia e dimensioni delle Strutture Sanitarie partecipanti allo studio.

Regione	Questionari ricevuti	Strutture ospedaliere		Posti letto totali					
		Pubbliche %	Private %	<100 %	100-199 %	200-299 %	300-399 %	400-499 %	≥500 %
Abruzzo	4	100	0	0	0	0	25	50	25
Campania	19	95	5	21	37	11	5	5	21
Emilia Romagna	14	100	0	0	7	7	7	7	71
Friuli Venezia Giulia	7	100	0	0	57	0	0	0	43
Lazio	9	78	22	0	11	22	22	22	22
Lombardia	96	53	47	14	29	18	15	6	19
Marche	10	100	0	0	10	30	30	0	30
Piemonte	21	100	0	5	0	10	19	29	38
Provincia Autonoma Trento	3	100	0	0	33	0	0	33	33
Sardegna	19	100	0	21	47	5	11	5	11
Sicilia	20	95	5	15	30	25	10	5	15
Toscana	20	100	0	0	20	10	25	30	15
Umbria	3	100	0	0	0	33	33	0	33
Valle d'Aosta	1	100	0	0	0	0	0	100	0
Veneto	32	53	47	22	22	6	6	3	41
Totale	278	77	23	12	25	14	14	10	26

Tabella 2. Percentuale dei laboratori che eseguono diagnosi per infezioni da *Clostridium difficile* e saggi utilizzati.

Regione	Laboratori che eseguono diagnosi %	Saggi diagnostici utilizzati su laboratori che eseguono diagnosi				
		GDH %	EIA tox A/B %	EIA tox A %	Coltura %	Saggio molecolare %
Abruzzo	100	50	50	50	0	0
Campania	53	20	80	0	40	0
Emilia Romagna	93	39	85	0	31	23
Friuli Venezia Giulia	100	0	71	0	14	29
Lazio	100	44	78	0	33	56
Lombardia	98	27	89	2	34	16
Marche	100	70	70	0	0	40
Piemonte	100	71	91	0	24	24
Provincia Autonoma Trento	100	0	33	33	0	33
Sardegna	53	10	70	0	20	20
Sicilia	60	17	58	42	17	0
Toscana	95	53	90	0	16	21
Umbria	100	33	100	0	33	0
Valle d'Aosta	100	0	100	0	100	0
Veneto	84	19	82	7	19	15
Totale	87	33	83	5	26	19

dei ceppi: 115 laboratori dichiarano di chiedere il supporto di un laboratorio di riferimento, mentre i restanti 25 dichiarano di effettuare la tipizzazione autonomamente. Tuttavia, poiché non sono stati riportati i metodi di tipizzazione adottati non è possibile stabilire l'effettiva capacità dei laboratori di poter identificare tutti i PCR-ribotype attualmente noti.

Analisi dei ceppi inviati all'Istituto Superiore di Sanità: i PCR-ribotype circolanti e le loro caratteristiche

Solo ventidue dei 62 ospedali contattati hanno inviato ceppi per la tipizzazione molecolare. In particolare, gli ospedali che hanno aderito all'invito erano situati in Lombardia, Emilia Romagna, Veneto, Toscana e Lazio. In totale, sono stati inviati ed analizzati 103 ceppi.

Come atteso, la maggior parte dei ceppi ricevuti (75.8%) era stata isolata da pazienti con un'età ≥ 65 anni, che rappresentano la popolazione più suscettibile alle CDI. Il 68% di questa popolazione era di sesso femminile.

La tipizzazione ha permesso di identificare 31 diversi PCR-ribotype ed i più frequenti sono risultati: 356/607 (27%), 018 (12%), 027 (8%), 014 (7%), 126 (7%), 046 (5%), 020 (4%) e 078 (4%) (Figura 3).

Mentre il PCR-ribotype 018 è stato predominante in Italia fino al 2011, il 356/607 è emerso recentemente. Poiché per *C. difficile* manca una nomenclatura internazionalmente adottata, la denominazione di un tipo, se nuovo o raro, può dipendere dalla banca dati utilizzata. Il

PCR-ribotype riconosciuto come 356 dall'University of Leeds (UK) è denominato 607 dall'Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES), per questo motivo abbiamo adottato la doppia nomenclatura 356/607 in questo lavoro.

Il PCR-ribotype 356/607 e lo 018 sono geneticamente correlati (Figura 4), infatti, mostrano una percentuale di similarità dell'87.5%.

Ambedue sono causa di outbreak e casi gravi. In particolare, precedenti studi hanno dimostrato che un'età ≥ 65 anni, malattie polmonari e terapie con fluorochinoloni sono significativi fattori di rischio per complicanze a seguito di CDI da PCR-ribotype 018 (18).

Il PCR-ribotype ipervirulento 027, globalmente diffuso fin dal 2002, sta emergendo nel nostro Paese solo recentemente. In particolare, i ceppi 027 identificati in questo studio sono stati isolati in Lombardia e Lazio. L'altro PCR-ribotype ipervirulento 078, causa emergente non solo di CDI ospedaliere ma anche comunitarie, non sembra ancora molto diffuso in Italia, come confermano anche i risultati ottenuti durante questo studio.

Durante lo studio, in sette delle strutture partecipanti sono stati osservati cluster epidemici, per un totale di nove cluster. I PCR-ribotype responsabili sono stati identificati come 356/607, 027, 018, 014, 020, 126, 592, 006 e 087 (questi ultimi tre isolati più raramente).

La caratterizzazione dei ceppi tramite l'Xpert® *C. difficile*, riportata nella Tabella 3, ha evidenziato come 4 PCR-ribotype (027, 033, 078 e 126), oltre ai geni per le tossine A e B, possiedono anche i geni per la tossina binaria CDT.

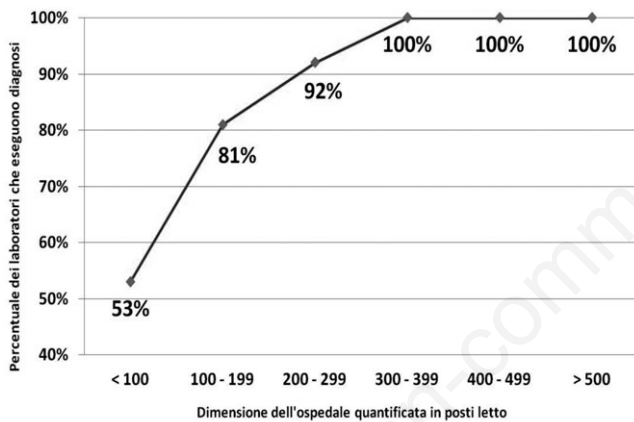


Figura 1. Percentuale dei laboratori che eseguono diagnosi per *C. difficile* e dimensioni dell'ospedale in numero di posti letto.

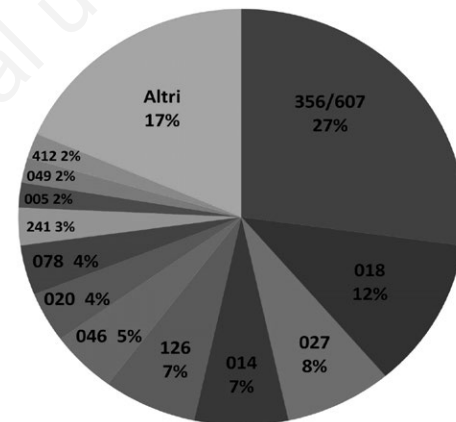


Figura 3. Percentuale dei PCR-ribotype identificati nelle 22 strutture che hanno inviato ceppi durante lo studio.

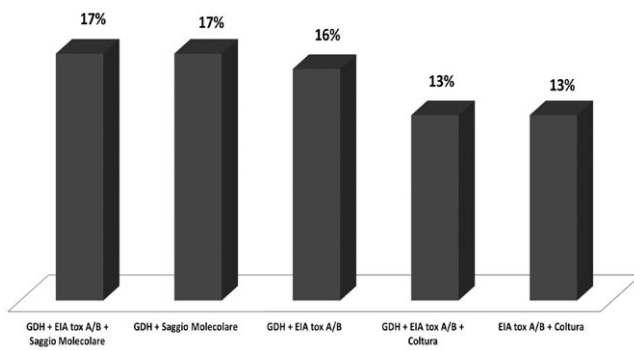


Figura 2. Combinazioni dei saggi utilizzati negli algoritmi diagnostici per infezioni da *Clostridium difficile*.

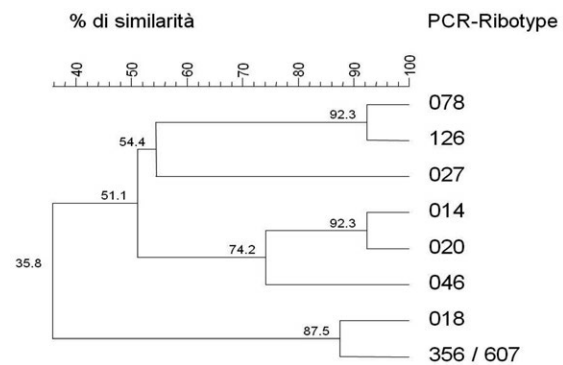


Figura 4. Dendrogramma dei principali PCR-ribotype identificati nello studio costruito secondo il metodo UPGMA.

Tabella 3. Caratterizzazione molecolare tramite l'Xpert® C. difficile dei PCR-ribotype identificati.

PCR-ribotype	Xpert C. difficile		
	tcdB	cdtA	Δ117tcdC
009, 010, 085, 592, 596	-	-	-
005, 006, 012, 014, 018, 020, 029, 046, 049 056, 070, 081, 087, 209, 235, 241, 400, 412, 356 ^a /607 ^b , 651, AI-82/1, PR07384	+	-	-
033	-	+	-
078, 126	+	+	-
027	+	+	+

^aDenominazione dell'University of Leeds, UK; ^bDenominazione WEBRIBO.

In particolare, lo 033 produce solo la CDT e presenta ampie delezioni dei geni delle tossine A e B che determinano la loro mancata produzione. Questo PCR-ribotype è quindi difficilmente identificabile tramite saggi immunoenzimatici e/o molecolari che abbiano come target le sole tossine A e B. Casi di CDI associata a questo PCR-ribotype sono stati recentemente segnalati (5) ed anche il ceppo tipizzato in questo studio è stato isolato da un caso clinico (17).

In questo studio, l'unico PCR-ribotype che mostra la delezione Δ117 del tcdC è lo 027.

Cinque ceppi, appartenenti rispettivamente ai PCR - ribotype 009, 010, 085, 592 e 596, non sono risultati produttori di tossine.

Discussione

Le infezioni da *C. difficile* rappresentano attualmente una delle principali problematiche di salute pubblica. L'incremento delle CDI negli ultimi anni è da imputare principalmente alla diffusione di ceppi ipervirulenti associati a tassi più elevati di morbilità e mortalità (3, 4, 5, 8).

In Italia è difficile poter avere un quadro complessivo delle CDI per la mancanza di una rete epidemiologica e per la frammentarietà dei dati a disposizione. Il Progetto Ministero della Salute/CCM "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici" si è posto tra gli altri obiettivi quello di esplorare la potenzialità diagnostica della rete dei laboratori di microbiologia di tutte le Regioni Italiane tramite un'indagine nazionale a campione, con la collaborazione degli Assessorati alla Sanità delle Regioni e delle Province autonome.

I risultati ottenuti indicano che l'87% dei laboratori di microbiologia esegue di routine la diagnosi per *C. difficile* con eterogeneità nell'approccio diagnostico. Solo una minoranza (37%) utilizza un algoritmo diagnostico. La scelta e la combinazione dei saggi effettuati negli algoritmi adottati sono molto diversi da struttura a struttura e spesso non adeguati per livello di sensibilità e/o specificità.

La necessità di tipizzare i ceppi circolanti nella propria struttura ospedaliera non è stata ancora recepita da parte di molti laboratori e pochi sono in grado di poter eseguire la coltura di *C. difficile*.

In particolare, lo studio evidenzia la necessità di una maggiore attenzione da parte dei microbiologi nella scelta di un adeguato algoritmo, che permetta una diagnosi certa della CDI, e di una maggiore attività di sensibilizzazione riguardo alla necessità di ottenere maggiori informazioni epidemiologiche sulla CDI, sia a livello locale che nazionale, soprattutto in considerazione della recente emergenza di ceppi ipervirulenti. A tale proposito, l'ISS ha recentemente pubblicato delle linee di indirizzo per la diagnosi microbiologica delle CDI, proponendo un algoritmo diagnostico, disegnato sulle più recenti evidenze scientifiche, che potrà essere modulato dai laboratori microbiologici secondo le loro possibilità (19). L'implementazione della diagnostica delle CDI e della tipizzazione dei ceppi permetterà di attuare anche nel nostro

Paese una Sorveglianza Nazionale di queste infezioni, come indicato da recenti direttive Europee (3).

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dal Progetto Ministero della Salute/CCM 2011 "Sorveglianza delle Infezioni da *Clostridium difficile*. Aspetti epidemiologici e microbiologici".

Si ringraziano i seguenti Referenti Regionali che hanno collaborato alla realizzazione di questo studio: M. Di Giacomo, Regione Abruzzo; A. D'Ascoli, Regione Campania; M.L. Moro, Regione Emilia Romagna; G. Cortiula, Regione Friuli Venezia Giulia; A. Vitagliano, Regione Lazio; M. Gramegna, Regione Lombardia; C. Ruta, Regione Marche; C.M. Zotti, Regione Piemonte; A. Antonelli, Regione Sardegna; M. Palermo, Regione Sicilia; G. Graziani, Regione Toscana; P. Lanzafame, Provincia Autonoma di Trento; M.L. D'Annibale, Regione Umbria; L. Sudano, Regione Valle d'Aosta; M. Saia, Regione Veneto.

Si ringraziano i Laboratori di Microbiologia che hanno aderito allo studio sia per l'invio dei questionari compilati sia per l'invio dei ceppi di *C. difficile*.

Si ringrazia inoltre Cepheid Europe per aver generosamente fornito il GeneXpert System ed i kit Xpert *C. difficile*.

Bibliografia

- Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1992; 15: 573-81.
- Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. Trends Microbiol 2012; 20: 21-9.
- Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, et al. The emergence of "hyper-virulence" in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol 2010; 300: 387-95.
- Clements ACA, Magalhães RJS, Tatem AJ, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. Lancet Infect Dis 2010; 10: 395-404.
- Eckert C, Cathala L, Marchandin H, Jean Pierre H, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. Poster 0744, 24th ECCMID 2014. Available online: [https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=barbut&entrytype\[\]=17&entrytitle\[\]=9496](https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=barbut&entrytype[]=17&entrytitle[]=9496).
- European Centre of Disease Prevention and Control (ECDC). European *Clostridium difficile* infection surveillance network (ECDIS-net): supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level (2010-2014). <http://www.ecdisnet.eu>

7. Gerding DN. *Clostridium difficile* 30 years on: what has, or has not, changed and why? J Antimicrob Agents 2009; 33 :S2-S8.
8. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. Gut Microbes 2013; 5: 1-13.
9. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008; 47: 1162-70.
10. Hunt JJ, Ballard JD. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. Microbiol Mol Biol Rev 2013; 77: 567-81.
11. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol 2008; 57: 1377-82.
12. Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998; 26: 1027-34.
13. Keller MJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* Infection in the Elderly. Clin Geriatr Med 2014; 30: 79-93.
14. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, et al. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. Euro Surveill 2013. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20381>.
15. Laffan AM, Bellantoni MF, Greenough WB 3rd, Zenilman JM. Burden of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a long-term care facility. J Am Geriatr Soc 2006; 54: 1068-73.
16. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2005; 353: 2433-41.
17. Pedroni P, Bonamini A, Indelicato I, et al. Evaluation of the presence of binary toxin in hospitalized patient with suspected *Clostridium difficile* infection. Poster 0827, 24th ECCMID 2014. Available online: [https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library?search=1¤t_page=1&search_term=Allibardi&entrytype\[\]=17&entrytitle\[\]=9587](https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library?search=1¤t_page=1&search_term=Allibardi&entrytype[]=17&entrytitle[]=9587).
18. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, Mastrantonio P. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR-ribotype 018. J Clin Microbiol 2010; 48: 2892-6.
19. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. Linee di indirizzo per la diagnosi microbiologica delle infezioni da *Clostridium difficile*. Not Ist Super Sanità 2014; 27: 11-6 (<http://www.iss.it/binary/publ/cont/ONLINE06.2014.pdf>).