

Lavoro di diploma 2012

Scuola Superiore Medico Tecnica Locarno

Confronto di tecniche molecolari e classiche per la diagnosi di *C. difficile* ed applicazione allo studio della prevalenza di portatori in Ticino

Autore: **Massimo Limmi**

Responsabili: Dott.ssa Antonella Demarta; Federica Mauri

Svolto presso: Istituto Cantonale di Microbiologia (I.C.M.), Bellinzona

Riassunto

Clostridium difficile è un bacillo gram positivo, anaerobio obbligato e sporigeno. Cresce ad una temperatura di 37°C ed è la causa della CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease). L'infezione da *C. difficile* colpisce soprattutto gli anziani, gli immunosoppressi ed in genere le persone ospedalizzate e trattate per lunghi periodi con antibiotici. Vi sono comunque portatori sani, come i bambini (80%), ma anche adulti anche se in percentuale minore (3%). L'azione patogena di *C. difficile* è dovuta alla produzione di due esotossine enteriche: un'enterotossina, la tossina A, ed una citotossina, la tossina B (TcdA e TcdB), che vanno ad agire sulle cellule intestinali causando disturbi di varia gravità. Vi sono ceppi che inoltre producono una terza tossina chiamata tossina binaria (CDT) che ne aumenta la patogenicità. Lo scopo della prima parte del lavoro è quello di paragonare diversi test basati sulla biologia molecolare e/o sulla reazione antigene-anticorpo (immunologici), per l'identificazione della presenza delle tossine in campioni di feci ospedaliere e verificarne l'attendibilità paragonandoli con il test enzimatico (ELISA) usato in laboratorio. I test utilizzati per questo lavoro sono: un test rapido immuno-cromatografico (X/pect® *Clostridium difficile* Toxin A/B), e due test molecolari (una PCR Multiplex "in house", ed la Real-Time PCR RIDA®GENE *Clostridium difficile* & Toxin A/B LC). Il metodo di riferimento è un test ELISA (Premier *C. difficile* Toxin A&B® della Meridian). I campioni utilizzati sono le feci native pervenute in istituto per la ricerca delle tossine di *C. difficile*. Sono stati analizzati 34 campioni positivi e negativi al test ELISA, e i risultati migliori per sensibilità, specificità, ed economicità sono stati ottenuti dalla PCR Multiplex "in house". La seconda parte del lavoro riguarda lo studio della prevalenza di portatori di *C. difficile* in Ticino. Questo studio è stato condotto utilizzando la tecnica della PCR per la ricerca della *glutamato deidrogenasi*. I dati sono stati raccolti analizzando 64 feci in CB di pazienti con diarrea, negativi alla batteriologia generale, senza richiesta di ricerca di *C. difficile*. Due campioni sono risultati positivi e quindi la prevalenza di portatori in Ticino è del 3,12 %.

Abstract

Clostridium difficile is a spore-forming gram positive, obligate anaerobe bacillus. It grows at a temperature of 37°C, and is the cause of CDAD (*Clostridium difficile* Associated Disease). Infection with *C. difficile* mainly affects the elderly, and immunosuppressed people often hospitalized and treated with antibiotics for long periods of time. However, there are categories of healthy carriers, such as children (80%), but also adults, although a lower percentage (3%). The pathogenic action of *C. difficile* is caused by the production of two enteric exotoxins: an enterotoxin, toxin A, and cytotoxin, toxin B (TcdA and TcdB), that act on intestinal cells resulting in disorders of varying severity. There are also some strains that produce a third toxin called binary toxin (CDT), that increases the pathogenicity. The aim of the study is to compare different diagnostic tests for the identification of the presence of toxins in human stool from hospital and verify the reliability comparison with the enzyme assay (ELISA) used in the laboratory. The new tests used for this study were: an immunochromatographic assay called X/pect® *C. difficile* Toxin A/B, and two molecular methods: a Multiplex PCR "in house" and a Real-time PCR called RIDA®GENE *Clostridium difficile* & Toxin A/B LC. The reference method is an ELISA test, Premier *C. difficile* Toxin A & B® of Meridian. The samples were human native stool received in the institute for

detection of *C. difficile* and its toxins. We analyzed 34 samples positive and negative by ELISA, and the best results for sensitivity, specificity, and efficiency were obtained by multiplex PCR “in house” assay. The second part of the work focussed on studying the prevalence of carriers of *C. difficile* in Ticino. To this purpose, we measured *glutamate dehydrogenase* using a PCR-based assay. Data were collected upon analysis of 64 human stool in CB from patients with diarrhea, with negative general bacteriology, and without request for *C. difficile* detection. Two samples were positive, and the prevalence of carriers in Ticino is 3,12 %.