

## Molecular typing of *C. difficile* clinical isolates in an outbreak evaluation

Luana Coltella, Cristina Russo, Livia Mancinelli, Donato Menichella

U.O.C. di Microbiologia, Dipartimento dei Laboratori, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù-IRCCS, Roma

**Key words:** *C. difficile*, Molecular typing, rep-PCR

**Tipizzazione molecolare di isolati clinici di *C. difficile* in sospetta infezione nosocomiale**

### SUMMARY

**Introduction:** *Clostridium difficile* is a Gram-positive spore-forming anaerobic bacillus. *C. difficile* is one of the major responsible of hospital acquired infections, since its spores are highly resistant to heat and common detergents treatment. The aim of this study was to exclude a nosocomial infection in an Intensive Care Unit at Bambino Gesù Children Hospital by using a molecular typing method (rep-PCR).

**Methods:** 9 *C. difficile* strains were collected within 2 weeks from 9 faecal samples, belonging to 4 patients hospitalized in the intensive care unit. Identification of *C. difficile* was obtained by phenotypic method and confirmed by genotypic methods. Susceptibility of isolates was evaluated by using E-test. Molecular typing of these strains was obtained by semi-automatic rep-PCR.

**Results:** All antibiotic susceptibility tests resulted overlapping. Genotypic analysis by rep-PCR showed that isolates belonging to the same patient had a similarity index > 96%, whereas, by comparing strains from different patients, a similarity index < 87% was observed.

**Conclusions:** Molecular fingerprinting of 9 *C. difficile* isolates arranged the strains in 4 different groups, corresponding to 4 patients. The rep-PCR with the semi-automated Diversilab platform was able to rule out the presence of a *C. difficile* nosocomial outbreak in a paediatric Intensive Care Unit. Finally, this system can be used as a "first line" tool, nevertheless, confirmation by "gold standard" fingerprinting methods is necessary. However, even though the system may seem easy to use, it is still not reproducible and criteria for interpretation of analytical results must be fully assessed by trained personnel in the practice of microbial fingerprinting.

*Clostridium difficile* è un bacillo anaerobio Gram positivo, sporigeno. I ceppi produttori delle tossine A e B sono associati a infezioni gastrointestinali la cui severità va dalla colonizzazione asintomatica alla diarrea grave, fino alla colite pseudo membranosa (*C. difficile* associated disease, CDAD) (5).

Il principale fattore di rischio per la CDAD è rappresentato da una prolungata terapia antibiotica, che danneggia la flora intestinale e permette al *C. difficile* di proliferare liberamente nella mucosa del colon (3). Attualmente *C. difficile* rappresenta uno dei maggiori responsabili delle infezioni acquisite in ambito ospedaliero, sia per la grande pressione selettiva esercitata sulla flora intestinale dalla terapia antibiotica ad ampio spettro, sia per la produzione di spore, che possono persistere nell'ambiente per molte settimane o mesi in quanto estremamente resistenti ai disinfettanti usati di routine (1).

La contaminazione ambientale avviene dopo contatto diretto con il paziente infetto o con oggetti contaminati, come i comodini, la rubinetteria, gli scarichi dei bagni, i termometri, ecc... La colonizzazione del paziente avviene per via oro-fecale attraverso l'ingestione delle spore. Le mani del personale sanitario possono rappresentare un veicolo per la diffusione dell'infezione da paziente a paziente, sintomatico o non. L'impiego di procedure assistenziali non corrette può essere responsabile, pertanto, della diffusione del germe all'interno di un reparto (2).

Nell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù è presente un sistema di sorveglianza attiva sui germi "sentinella", sospetti responsabili di infezioni trasmissibili in ambito ospedaliero, e tra questi è stato incluso *C. difficile*.

Oiettivo dello studio è stato l'impiego della rep-PCR semi-automatica come metodo di fingerprinting (4) per valutare un episodio di sospetta trasmissione nosocomiale di *C. difficile* nel reparto di Rianimazione.

Nell'arco di 2 settimane sono stati isolati 9 ceppi di *C. difficile* da 9 campioni di feci relativi a 4 pazienti afferenti al reparto di Rianimazione del nostro ospedale (Tabella 1). L'identificazione dei 9 isolati è stata ottenuta con metodo fenotipico (Rapid ANA II, Remel) e confermata con metodo molecolare (Microseq 500bp 16S rDNA, Applied Biosystem).

**Tabella 1.** Elenco degli isolati di *C. difficile*

Pazienti	pz A	pz B	pz C	pz D
n° campioni	2	4	1	2
Isolati	1-2	3-6	7	8-9

Sui 9 isolati è stata valutata la presenza del gene della tossina B utilizzando il sistema molecolare PCR real-time (Xpert *C. difficile*, GeneXpert, Cepheid).

Il saggio di antibiogramma è stato eseguito con metodica E-test sui seguenti antibiotici: Amoxicillina/Acido Clavulanico (XL), Cefotaxime (CT), Clindamicina (CM), Imipenem (IP), Penicillina G (PG), Metronidazolo (MZ), secondo gli standard CLSI.

I 9 isolati sono stati sottoposti ad estrazione overnight (UltraClean Microbial DNA Isolation kit) seguita da genotipizzazione con rep-PCR (repetitive element sequence-based PCR) semi-automatica (Diversilab, bioMérieux).

Ad eccezione di minime variazioni nei valori delle MIC (dato non riportato) i profili di antibiotico resistenza sono risultati praticamente sovrapponibili. L'unica differenza è rappresentata dagli isolati 3 e 4 del paziente B che presentano una MIC intermedia per l'imipenem, mentre gli altri isolati risultano resistenti. Tutti i ceppi sono sensibili al metronidazolo e resistenti alla clindamicina (Tabella 2).

**Tabella 2.** Confronto dei profili di antibiotico-resistenza dei diversi isolati

	XL	CT	CM	IP	PG	MZ
pz A (isolati 1-2)	S	R	R	R	R	S
pz B (isolati 3-4)	S	R	R	I	R	S
pz B (isolati 5-6)	S	R	R	R	R	S
pz C (isolato 7)	S	R	R	R	R	S
pz D (isolati 8-9)	S	R	R	R	R	S

L'analisi di fingerprinting dei 9 isolati è stata effettuata utilizzando la Pearson Correlation (PC). Il dendrogramma mostra una distribuzione degli isolati in 4 clusters ben distinti (Figura 1a) e l'immagine virtuale del gel conferma la presenza dello stesso pattern di bande negli isolati appartenenti allo stesso cluster (Figura 1b).

La matrice di similarità evidenzia come gli isolati provenienti dallo stesso paziente mostrino tra loro una similarità >96% con due eccezioni: 94% tra gli isolati 1 e 2 del paziente A e 94.7% tra gli isolati 4 e 6 del paziente B (Figura 1c).

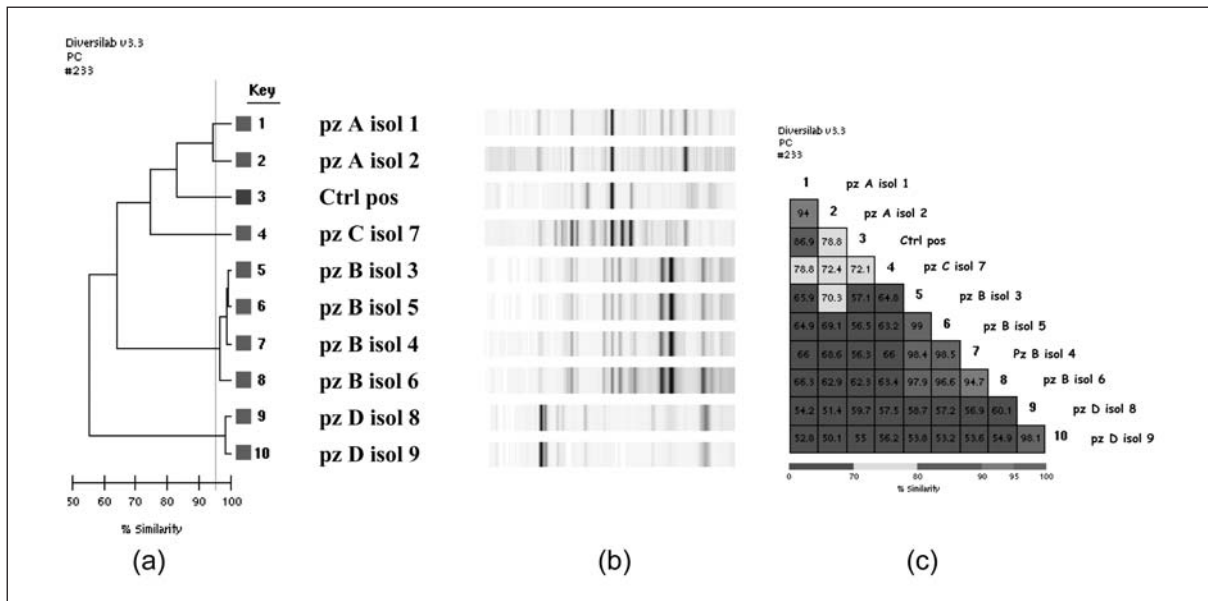
Dalla matrice di similarità si osserva inoltre che la correlazione tra gli isolati relativi ai diversi pazienti presenta una percentuale di similarità <87% (Figura 1c).

*C. difficile* rappresenta la principale causa di diarrea infettiva acquisita in ambiente ospedaliero. Le infezioni associate alle

**Corresponding author:** Luana Coltella

Via Tito Livio, 44 - Guidonia 00012 (RM) - Tel. 06/68592599 - Fax. 06/68592218

E-mail: [luana.coltella@opbg.net](mailto:luana.coltella@opbg.net)



**Figura 1.** Rappresentazione grafica mediante dendroGramma (a), immagine virtuale del gel (b) e matrice di similarità (c) dell'analisi di fingerprinting mediante rep-PCR semiautomatica.

pratiche assistenziali sono un problema di difficile gestione per la sanità pubblica. Poiché la maggior parte di esse è acquisita per contatto attraverso le mani degli operatori sanitari, l'igiene delle mani rappresenta la singola misura più efficace di prevenzione.

L'impiego di un sistema rapido di genotipizzazione ci ha permesso di definire la correlazione esistente fra 9 ceppi di *C. difficile* isolati da 4 pazienti afferenti al reparto di Rianimazione del Bambin Gesù di Roma.

Il breve intervallo di tempo in cui sono stati isolati i 9 ceppi e il confronto degli antibiogrammi, che mostrava un'alta omologia tra gli isolati, erano suggestivi di una circolazione dello stesso ceppo di *C. difficile* all'interno del reparto. La tipizzazione molecolare ha, invece, permesso di definire l'assenza di correlazione tra i diversi isolati (percentuale di identità <87%).

La rapidità della rep-PCR semi-automatica (circa 24 h) ha permesso di escludere tempestivamente che la presenza di *C. difficile* fosse correlata ad una cross-contaminazione dei pazienti.

Questa esperienza suggerisce che tale sistema potrebbe essere inserito come strumento "di prima linea" in caso di sospetto "outbreak" nosocomiale, tuttavia, i risultati ottenuti con il sistema Diversilab, devono comunque essere confermati con

l'impiego di un'altra metodica di fingerprinting considerata "gold standard" (Ribotyping o PFGE) (4).

Nella nostra esperienza il sistema di rep-PCR semi-automatico è risultato di "facile impiego" nella sorveglianza attiva delle infezioni nosocomiali. Tuttavia gli "elementi deboli" del sistema potrebbero essere rappresentati dalla bassa riproducibilità e dalla non immediata interpretazione dei risultati analitici, che devono essere comunque valutati da personale esperto nella pratica del fingerprinting microbico.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Barbut, F., G. Corthier, and Y. Charpak. 1996. Prevalence and pathogenicity of *Clostridium difficile* in hospitalized patients: a French multicenter study. Arch. Intern. Med. 156:1449-1454.
2. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. "Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile* diarrhea" J Clin Microbiol 2000; 38:2386-2388
3. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med 1994;330(4):257-62.
4. Spigaglia P. and Mastrantonio P. "Evaluation of Repetitive Element Sequence-Based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*". J. Clin. Microbiol. June 2003, p. 2454-2457
5. Sunenshine RH and McDonald LC "Clostridium difficile-associated disease: new challenges from an established pathogen" Cleve Clin J Med. 2006 Feb; 73(2):187-97.