



# Tipizzazione molecolare di *Clostridium difficile*

**Prisca Cima**

Formazione tecnica in analisi biomediche  
Scuola superiore medico tecnica, Locarno  
2008/2009

Lavoro di diploma svolto presso l'Istituto Cantonale di Microbiologia,  
Bellinzona

**Responsabili:** Antonella Demarta  
AnnaPaola Caminada

# Indice

<b>1.0</b>	<b>RIASSUNTO /ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.0</b>	<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>5</b>
<b>3.0</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
3.1	Il <i>Clostridium difficile</i> .....	6
3.2	Patogenicità .....	6
3.2.1	Fattori di virulenza .....	7
3.3	Manifestazioni cliniche e prevenzione .....	7
3.4	Resistenza .....	8
3.5	Tipizzazioni molecolari .....	8
3.5.1	Tipizzazione tramite MALDO TOF .....	8
3.6	Scopo del lavoro.....	8
<b>4.</b>	<b>MATERIALE E METODI.....</b>	<b>9</b>
4.1	Ceppi Batterici.....	9
4.2	Terreni di coltura .....	9
4.3	Estrazione DNA .....	9
4.4	PCR ribotyping 16S-23S.....	10
4.4.1	Migrazione in gel d'Agarosio per ribotipo .....	10
4.5	Multiplex PCR tossine .....	12
4.5.1	Migrazione in gel d'Agarosio per tossinotipo .....	12
4.6	Ricerca geni tossina A .....	13
4.6.1	Migrazione in gel d'Agarosio per ricerca gene tossina A.....	14
4.7	PCR 16S .....	14
4.7.1	Migrazione in gel d'Agarosio per PCR 16s .....	16
4.8	Sequenziamento .....	16
4.8.1	Purificazione prodotto PCR.....	16
4.8.2	Reazione di sequenza.....	17
4.8.3	Purificazione con Sephadex G-50 .....	17
4.8.4	Sequenziamento .....	17
4.9	MALDI-TOF .....	17
<b>5.</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>18</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>25</b>
<b>7.</b>	<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>26</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>27</b>
<b>9.</b>	<b>ALLEGATI .....</b>	<b>29</b>

9.1	Allegato 1- ceppi analizzati .....	29
9.2	Allegato 2- Thio .....	30
9.3	Allegato 3- Agar Sangue .....	30
9.4	Allegato 4- Skim Milk .....	30
9.5	Allegato 5- Master mix.....	30
9.6	Allegato 6- Agarosio .....	31
9.7	Allegato 7- TBE .....	31
9.8	Allegato 8- GelRed .....	31
9.9	Allegato 9- Peso molecolare .....	31
9.10	Allegato 10- Loading buffer .....	31
9.11	Allegato 11- BigDye kit.....	32
9.12	Allegato 12- Sephadex G-50.....	32
9.13	Allegato 13- DHB .....	32

## 1. Riassunto

Il *C. difficile* è un bacillo gram positivo, anaerobico e sporigeno, con una temperatura ottimale di crescita di 36°C.

È molto diffuso nel suolo, nei sedimenti marini, nelle acque luride e nelle feci di esseri umani e di animali grazie alle sue spore molto resistenti anche in ambiente aerobico.

Causa infezioni del tratto gastro-intestinale, può colpire persone immunocompromesse o che hanno iniziato una cura antibiotica.

L'infezione da *C. difficile* si manifesta con febbre, perdita di appetito, nausea e dolori addominali.

Di particolare importanza è il ribotipo 027, in quanto ritenuto un ceppo molto virulento, che si sta propagando in tutto il mondo, ed è già stato isolato anche in Svizzera (Basilea).

Lo scopo di questo lavoro è caratterizzare stipiti di *C. difficile* isolati in Ticino, valutando le eventuali correlazioni tra le varie infezioni occorse negli ospedali e verificando l'eventuale presenza del ribotipo 027.

Sono stati inoltre testati i campioni per quanto riguarda il profilo tossigenico, in quanto la produzione di tossine è ritenuto un ulteriore fattore di virulenza. Attualmente dalle analisi svolte all'ICM in routine è unicamente possibile capire se il ceppo è produttore di tossine o meno senza poterle però differenziare.

Sono stati analizzati 52 campioni, ma ne sono stati presi in considerazione 46.

L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite il kit InstaGene Matrix (Bio-Rad).

Per la tipizzazione è stata utilizzata la PCR ribotyping.

Per la determinazione delle tossine è stata utilizzata una multiplex PCR.

I campioni sono stati inoltre sottoposti ad analisi MALDI-TOF, che è uno spettrometro di massa.

Come risultato abbiamo ottenuto due dendrogrammi, uno dalla PCR ribotyping, al quale è poi associato ospedale di provenienza dei campioni e profilo tossigenico ed un altro dendrogramma ottenuto dall'analisi di spettrometria di massa.

Paragonando i risultati della PCR ribotyping con il ceppo di riferimento (ribotipo 027) si è esclusa la presenza di questo ribotipo virulento in Ticino.

Analizzando i dendrogrammi si sono potuti discutere molti punti. Comparando i due dendrogrammi non si notano similitudine nella disposizione dei campioni.

## 1. Abstract

*Clostridium difficile* is a bacillus gram positive, anaerobic and sporogenic which has an optimal growth temperature of 36°C.

It is very diffuse in soil, marine sediment, sewage and in human and animal faeces, due to a very resistant spore that also lives in an aerobic environment.

It causes intestinal infections and affects the elderly, immunocompromised people, and those who have begun an antibiotic therapy.

The infection is characterized by fever, appetite lost, nausea and abdominal pain.

The most important strain belongs to the ribotype 027, a very virulent type, which is spreading all over the world and has already been isolated in Switzerland (Basel).

The aim of this work is to characterize *C. difficile* stains isolated in Ticino, evaluating the relations among the infections occurred in hospitals and verifying whether the ribotype 027 is present.

At present in routine analysis carried out at ICM is only possible to understand if a strain can produce toxins or not but the method in use can not differentiate them. In our study, the toxigenic profile of each strain has been established.

In this study 52 samples were analysed, but were taken into account only 46. DNA extraction was performed using the kit InstaGene Matrix (Bio-Rad).

Typings were made through the PCR ribotyping.

A multiplex PCR has been carried on for the determination of the toxins.

The samples were also analysed with MALDI-TOF, which is a mass spectrometer.

As a result, we have obtained two dendrograms, one from the PCR ribotyping, to which hospital origin of the samples and toxinotype were associated, and the second from mass-spectrometry.

Comparing the results of PCR ribotyping with the reference strain for the ribotype 027, the presence of this virulent ribotype in Ticino was excluded.

Analyzing the dendrograms many discussion points were emerged. Comparing the two dendrograms no similarity appears in the disposition of sample.