

TECHNICAL REPORTS/PROCEDURE OPERATIVE

L'esame microbiologico dei campioni di feci: procedura operativa diagnostica

Daniele Crotti¹, Maria Letizia D'Annibale², Alberto Catania³, Giacomo Magnani³

¹Libero Professionista in Parassitologia e Microbiologia Medica, Perugia

²Struttura Complessa di Microbiologia, Azienda Ospedaliera, Perugia

³Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Ospedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

Infectious diarrhoea: proposal of cost-effective diagnostic procedures

PREMESSE

Batteri associati alle infezioni intestinali o gastro-intestinali

Diarrea associata ad antibiotici

Batteri implicati in tossinfezioni alimentari

Agenti virali

PROCEDURE DIAGNOSTICHE

Diagnostica di base

Diagnostica allargata

- diarrea acuta autoctona
- diarrea protratta
- diarrea nel paziente immunocompromesso
- diarrea del viaggiatore
- enterite epidemica in collettività

PREMESSE

Le infezioni intestinali diarroiche rimangono ancora oggi la causa principale di morbilità e mortalità diffusa nel mondo nonostante i progressi nella comprensione della loro epidemiologia, patogenesi e clinica.

In tale Procedura Operativa Diagnostica si analizzano gli agenti patogeni batterici e virali, che, a livello intestinale, sono responsabili della diarrea infettiva.

Per la ricerca di protozoi (o altri parassiti), responsabili di enteriti, è opportuno consultare le "Linee Guida Operative per la diagnosi delle Parassitosi Intestinali" già pubblicate su *Microbiologia Medica* 2005; 20(1): 39-46.

La diarrea acuta è definita come una patologia di durata inferiore alle 2 settimane. Per diarrea infettiva (e quindi enterite) si intende l'emissione di feci liquide o quantomeno non formate per quattro o più volte al giorno, associata solitamente ad almeno uno dei seguenti segni o sintomi: dolori addominali, nausea, vomito, malessere generale, febbre, disidratazione (diarrea moderata o severa). Si definisce diarrea lieve se non si associa a sintomi addominali o sistemici. Le feci possono essere acquose o dissenteriche e contenere un aumento di leucociti, o essere mucose e/o ematiche in modo evidente od occulto.

I meccanismi patogenetici batterici di base prevedono:

- enterocolite emorragica
- enterocolite da antibiotici/iatrogena/in pazienti ospedalizzati
- proctocoliti nel maschio omosessuale
- tossinfezioni alimentari
- situazioni particolari

RACCOLTA, CONSERVAZIONE ED INVIO DEI CAMPIONI FECALI

PROCEDURE DIAGNOSTICHE PRELIMINARI TERRENI DI COLTURA, MICROORGANISMI E MODALITÀ OPERATIVE IDENTIFICAZIONI

PROCEDURE DI REFERTAZIONE

Bibliografia

- a) la resistenza all'eliminazione tramite i fattori di adesione (*E. coli*: EAEC ed EPEC);
- b) l'invasione della mucosa (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* ed *E. coli* EIEC);
- c) la produzione di enterotossine (vibrioni ed *E. coli* enterotossigeno);
- d) la produzione di citotossine (*Shigella dysenteriae* ed *E. coli* VTEC [O-157, ad esempio]).

Tra i fattori protettivi ricordiamo la barriera acida gastrica e la fisiologica popolazione batterica intestinale.

Questa procedura raccomanda la ricerca routinaria, in campioni di feci non solide (non formate o poltacee, liquide, acquose), di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* (COPROCOLTURA: diagnostica minima).

Le ricerche colturali di *Escherichia coli* enteritogeni, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* e/o altri vibrioni (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*), la ricerca di *Clostridium difficile*, la ricerca di Rotavirus e Adenovirus, sono da intendersi come complementari o supplementari, quando motivate (diagnostica allargata).

Batteri associati alle infezioni intestinali o gastro-intestinali

Salmonella

Le infezioni da *Salmonella enterica* (salmonelle minori), bastoncello Gram negativo mobile, di cui

sono noti ben oltre 2000 sierotipi (o sottospecie o serovars), hanno un'incubazione usualmente variabile da 12 a 48 ore e sono ampiamente distribuite tra vari generi e specie animali. Le più diffuse sono attualmente *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Le salmonelle maggiori, quali *S. typhi* e *S. paratyphi* (gruppo A e B, raramente C), responsabili delle febbri tifoidee e paratifoidee, vanno ricercate soprattutto in emocolture, in quanto responsabili di sepsi ed essendo l'isolamento dalle feci raro, casuale od osservabile solo in una fase tardiva del quadro clinico.

La trasmissione è, come in tutte le infezioni intestinali, fecale-orale. Nell'uomo l'infezione si contrae per ingestione di acqua infetta o alimenti (uova o carni crude/non cotte/mal cotte [ma *Salmonella* si replica anche negli alimenti malconservati]) contaminati, oppure per contatto orale con dita contaminate con materiale fecale. Il quadro clinico è estremamente variabile.

In ambienti chiusi sono possibili episodi epidemici (2 o più individui sono colpiti), anche per trasmissione diretta da persona a persona, a causa di mancato rispetto di adeguate norme igieniche.

Tra le forme a eziologia batterica, le enteriti da *Salmonella* sono in Italia tuttora le più frequenti, seppur non dovunque.

Shigella

Si conoscono quattro specie di *Shigella*: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*. È un bastoncello Gram-negativo, immobile, ad alta contagiosità (bastano 200 germi) con incubazione breve (24-48 h).

In Italia *Shigella* è piuttosto rara, e solitamente è isolata *S. sonnei*.

S. dysenteriae (assai raramente altre) può causare grave dissenteria; febbre è sovente concomitante, ma mai nelle infezioni da *S. sonnei*.

Le shigellosi sono prettamente umane, e i microrganismi si trasmettono da persona a persona attraverso le dita, per via idro-alimentare, da fomite contaminati (la dose infettante è bassa, laddove per *Salmonella* è elevata).

In comunità chiuse, sovraffollate, a bassi standard igienici (prigioni, scuole, istituzioni per malati mentali, e simili), sono possibili epidemie, anche con decessi per disidratazione.

Campylobacter

In Italia prevalgono i ceppi termotolleranti di *Campylobacter jejuni* e, più di rado, *Campylobacter coli*. Le campylobacteriosi sono seconde, come frequenza, alle salmonellosi, seppure in alcune aree geografiche di Paesi sviluppati possono essere prevalenti. Raramente è presente *Arcobacter butzleri*, genere correlato a

Campylobacter.

Alcuni ceppi sono responsabili di enteriti invasive, con muco e sangue; alcuni sierotipi di *C. jejuni* (in particolare l'0:19) sono correlati a complicanze quali la Sindrome di Guillain-Barré. Talora si associano quadri simulanti un'appendicite.

Campylobacter alberga l'intestino di svariati animali (anche esotici), e la trasmissione è fecale-orale, analogamente a *Salmonella*, anche se è soprattutto il pollame la causa principale di infezione umana (la dose infettante è relativamente bassa, e i microrganismi non si replicano sugli alimenti).

Escherichia coli

Le infezioni intestinali sostenute da *E. coli* cosiddetti enteritogeni sono probabilmente piuttosto infrequenti in Italia, e usualmente non gravi. Il periodo d'incubazione varia da 24-72 h.

Si conoscono i seguenti "gruppi": ETEC, EPEC, EIEC, VTEC (tra cui l'EHEC 0:157), EAEC ed EaggEC.

E. coli – ETEC (enterotossigenico) è causa principale di diarrea del viaggiatore, mostrando quadri clinici variabili, ma in genere autorisolventesi.

E. coli – EPEC (enteropatogeno) può causare diarrea, anche epidemica, in bambini sotto i 3 anni di vita; sembra però essere piuttosto raro.

E. coli – EIEC (enteroinvasivo) causa un'enterite simil-dissenterica, anche severa, in Paesi in via di sviluppo; i ceppi responsabili possono essere confusi con *Shigella*.

E. coli – VTEC (verocitotossico) causa anche colite emorragica. Il sierotipo 0:157 può causare la Sindrome Uremico-Emolitica. In Italia è stato eccezionalmente descritto e sembra essere correlato soprattutto all'ingestione di carne bovina macinata malcotta. Vi possono essere episodi epidemici anche perché la dose infettante è bassa.

E. coli – EaggEC (enteroaggregante) ed *E. coli* – EAEC (enteroadesivo) causa diarrea di entità variabile in alcune parti del mondo; non sembra essere stato rilevato in Italia.

Yersinia enterocolitica

L'infezione da *Yersinia enterocolitica*, bastoncello Gram-negativo e sempre appartenente alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è rara in Italia. I sierotipi implicati sono essenzialmente l'0:3 e l'0:9. Le enteriti acute con diarrea causate da *Y. enterocolitica* solitamente non sono gravi, e possono essere accompagnate da faringite. In alcune aree geografiche italiane, i pazienti solitamente talassemici in terapia con chelanti del ferro possono sviluppare una diarrea da *Y. enterocolitica*.

L'infezione è di solito acquisita per ingestione di alimenti, acqua o latte contaminati da feci animali (il suino è spesso identificato quale sorgente di

infezione).

Le yersiniosi, comunque assai rare, possono decorrere con quadri clinici diversificati: linfadenite mesenterica, ileite terminale, pseudoappendicite, e possono residuare in sequele immunologiche (quale l'artrite reattiva), più spesso delle campylobacteriosi e delle shigellosi.

***Vibrio* spp.**

Le specie enteropatogene di *Vibrio* possono causare sintomi che vanno da forme lievi a diarree ematiche; talora il quadro clinico è assai grave (si pensi al colera). L'incubazione è fra 6 e 72 h.

Le principali specie patogene sono *Vibrio cholerae* (0:1 e 0:139), assente in Italia, e *V. parahaemolyticus* (assai raro se non eccezionale in Italia ma molto diffuso, per esempio, in Giappone). Sono bastoncelli ricurvi Gram-negativi e tipicamente alofili d'acqua marina.

I principali sintomi del colera sono rappresentati dal transito profuso di diarrea acquosa con muco ma senza sangue, conferendo un aspetto "ad acqua di riso", con l'alto rischio di perdite di liquidi, disidratazione e decesso. Il colera si presenta solitamente epidemico, ed è associato soprattutto ad acque contaminate. *V. cholerae* non 0:1/0:139 solitamente non è produttore della enterotossina responsabile della severità del quadro clinico.

V. parahaemolyticus è causa di gastroenteriti conseguenti di solito ad ingestione di frutti di mare o pesci non cotti (ma anche ingestione di acqua contaminata).

***Aeromonas* spp.**

Le specie di *Aeromonas*, e, soprattutto *A. hydrophila*, sono state implicate quali cause di diarree non gravi, soprattutto in pazienti anziani. In Italia *A. hydrophila* è rara.

In genere l'infezione è conseguenza di contaminazioni idriche.

Plesiomonas shigelloides

In Italia, *P. shigelloides* sembra essere pressoché assente. Presenta analogie con *A. hydrophila*, e il suo ruolo è in parte controverso (al pari di *Aeromonas*).

Clostridium difficile

Pur essendo causa di diarrea in ambiente comunitario, come, e forse ancora prima in ambiente ospedaliero, in soggetti non in terapia antibiotica, *C. difficile* è soprattutto correlabile alla diarrea associata agli antibiotici (vedi oltre).

Diarrea associata ad antibiotici

Clostridium difficile

C. difficile è il patogeno più frequentemente isolato da pazienti con diarrea associata a terapia con antibiotici. Quando la popolazione microbica del tratto intestinale è alterata, *C. difficile* può moltiplicarsi in modo rigoglioso, con la successiva produzione di tossine (enterotossina di tipo A e citotossina di tipo B). La tossina determina danni caratteristici della mucosa consistenti in lesioni a forma di placca che portano alla formazione delle pseudomembrane. Comunque non tutti i ceppi sono produttori di tossine ed inducono malattia.

La maggior parte dei farmaci ad ampio spettro di attività è stata implicata come agente causale di diarrea associata agli antibiotici. I più frequentemente implicati sono clindamicina, ampicillina e simili, cefalosporine.

La malattia ha uno spettro che varia da diarrea autolimitante di moderata entità a progressive e gravi forme caratteristiche di colite pseudomembranosa.

La diagnosi più accurata di colite pseudomembranosa è ottenuta con il rilievo endoscopico delle pseudomembrane o dei microascessi del colon nei pazienti trattati con antibiotici che presentano diarrea e le cui feci sono positive per *C. difficile* e la sua tossina.

La percentuale di colonizzazione dei pazienti ospedalizzati può superare il 20%. Il batterio può essere associato ad epidemie ospedaliere (ne è un'importante causa), così come in grosse strutture di ricovero per anziani. *C. difficile* può essere isolato dall'ambiente ospedaliero, e può essere riscontrato sui pavimenti, nei servizi igienici, sugli effetti personali intimi e lettereschi. Per tale motivo è indicato l'isolamento nell'individuo malato ospedalizzato.

La procedura diagnostica di riferimento è la coltura cellulare; peraltro si raccomanda solitamente la ricerca della tossina A e B con metodi ELISA (o comunque immunologici).

Batteri implicati in tossinfezioni alimentari

Sono rappresentati da *Staphylococcus aureus* (produttore di enterotossina termostabile), *Bacillus cereus* (forma emetica e forma diarroica), *Clostridium perfringens* (ingestione usualmente della tossina A).

In tale procedura vengono esclusi il botulismo e altre più eccezionali patologie come quelle da ingestioni di tossine in molluschi, pesci equatoriali ed anfibi.

Le tossinfezioni alimentari sono in Italia molto più rare del passato. Per definizione dovrebbero essere dette tali quelle gastroenteriti, con nausea, vomito e dolori addominali (e poi diarrea), senza febbre, legate all'ingestione di tossine (enterotossine) con gli alimenti contaminati (sovente vere e

proprie intossicazioni). A brevissima (entro 6 ore) o a breve incubazione (entro 12-24 ore), colpiscono varie persone, dopo pasti consumati in comune. *S. aureus* è in causa soprattutto nella ingestione di prodotti di pasticceria (a base di latte e/o uova preparati in casa, ma non solo); *B. cereus* nella ingestione di riso fritto o di creme alla vaniglia; *C. perfringens* nella ingestione soprattutto di alimenti carnei (anche nelle mense ospedaliere). La diagnosi va condotta ricercando la/e tossina/e responsabile/i nelle feci e, soprattutto, negli alimenti incriminati. Per le spore di *C. perfringens* sono inoltre necessari dei conteggi particolari. In commercio è possibile, in parte, reperire kit specifici al riguardo.

Agenti virali associati alle infezioni intestinali o gastro-intestinali

Rotavirus, Adenovirus, Calicivirus, Astrovirus, e Norovirus (già SRSV, "Norwalk-like virus") sono causa frequente di diarrea con vomito, principalmente in bambini.

In tale sede tratteremo esclusivamente di Rotavirus e Adenovirus, per i quali esistono in commercio da tempo kit idonei per il loro riconoscimento, anche se recentemente sono comparsi kit per Norovirus ed Astrovirus, virus che sembrano essere tutt'altro che infrequenti e causa solitamente di forme epidemiche.

Rotavirus

Appartenenti alla famiglia Reoviridae virus a RNA a doppio filamento, sono causa di diarrea e vomito nei bambini più piccoli. Epidemie possono insorgere in asili nido. Occasionalmente i Rotavirus causano diarrea negli anziani. Le infezioni sembrano più frequenti nei periodi invernali. L'incubazione è di 1-3 gg.

Poiché i Rotavirus sono una delle cause più frequenti di diarrea nei bambini in tenera età, andrebbero sempre cercati quando vi è vomito, o in assenza dei 3 patogeni batterici più importanti. I metodi di ricerca dei Rotavirus nei campioni fecali prelevati nella fase acuta della malattia comprendono, nella diagnostica routinaria, metodi di immunocromatografici, ELISA e l'agglutinazione con particelle di lattice.

Adenovirus

Gli Adenovirus, virus a doppia catena di DNA privi di envelope, sono implicati in molte infezioni pediatriche anche respiratorie e risultano in Europa forse secondi per importanza solo ai Rotavirus come causa di diarrea acuta nei bambini piccoli. Le epidemie sono state riscontrate negli asili nido e nei reparti pediatrici (anche per Rotavirus ciò è stato segnalato). Sono di frequen-

te osservazione diarrea prolungata e, talora, rilievo termico moderato.

Per i metodi di ricerca valgono le medesime indicazioni fatte per i Rotavirus.

PROCEDURE DIAGNOSTICHE

Diagnostica di base

La procedura diagnostica minima, per la diarrea acuta autoctona (solitamente casi sporadici), prevede la ricerca di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. In bambini con vomito anche Rotavirus andrebbe sempre ricercato.

Le negatività per tali patogeni e la persistenza di diarrea dovrebbe indurre alla ricerca di *C. difficile* (tossina A) e di Adenovirus.

Diagnostica allargata

Per la ricerca di protozoi responsabili di diarrea (e parassiti in generale) si rimanda alle Linee Guida sopra ricordate, sebbene in molte circostanze la ricerca di alcuni protozoi patogeni più frequenti (*Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*) o meno frequenti (*Cryptosporidium* spp) non andrebbe mai dissociata in un esame microbiologico delle feci.

Le situazioni in cui si deve ampliare lo spettro dei patogeni da ricercare sono deducibili da quanto esposto nelle premesse.

Negli schemi seguenti si puntualizzano alcune indicazioni operative, relativamente a determinati quadri nosologici, quali:

- diarrea protratta;
- diarrea nel paziente immunocompromesso;
- enterite epidemica in collettività;
- enterocolite emorragica;
- enterocolite da antibiotici/iatrogena/in pazienti ospedalizzati;
- proctocoliti nel maschio omosessuale;
- tossinfezioni alimentari;
- situazioni particolari.

QUADRO NOSOLOGICO	AGENTI MICROBICI DA RICERCARE
Diarrea acuta autoctona - sempre - se vomito (in bambini) - se negativa (con diarrea persistente)	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> Rotavirus <i>C. difficile</i> (tossina A/B) Adenovirus
Diarrea protratta (oltre i 14 giorni)	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> <i>Arcobacter butzleri</i> Protozoi (<i>C. difficile</i> , tossina A/B)
Diarrea nel paziente immunocompromesso	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> Protozoi
Diarrea del viaggiatore	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> <i>E. coli</i> enteritogeni (ETEC, EIEC, in particolare) vibrioni (<i>Y. enterocolitica</i>) ^{°°} protozoi
Enterite epidemica in collettività	<i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> (<i>Shigella</i>) ^{°°°} (Rotavirus) [°] protozoi (<i>E. coli</i> EPEC) ^{°°°°} (in bambini <3anni)
Enterocolite emorragica	<i>E. coli</i> VTEC (innanzitutto EHEC) <i>Campylobacter</i> (<i>Salmonella</i>) ^{°°°°} (<i>Shigella</i>) ^{°°°} e ^{°°°°}
Enterocolite da antibiotici/iatrogena/in Pazienti ospedalizzati	<i>C. difficile</i> (tossina A/B)
Proctocoliti nel maschio omosessuale	<i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter cinaedi</i> / <i>H. fennelliae</i> Protozoi Patogeni genitali
Tossinfezioni alimentari	tossina <i>S. aureus</i> (se possibile) ^{°°°°°} tossina <i>C. perfringens</i> (se possibile) ^{°°°°°} tossina <i>B. cereus</i> (se possibile) ^{°°°°°} <i>Salmonella</i>
Situazioni particolari	Vedi PREMESSE

Note: °se presente vomito; °°se proveniente da Paesi in cui è nota l'endemia; °°°se ne è nota l'endemia; °°°°se negativi i precedenti; °°°°°ricerca di tossina/e con kit specifici (se in dotazione; altrimenti inviare a centri specialistici al riguardo)

RACCOLTA, CONSERVAZIONE ED INVIO DEI CAMPIONI FECALI

Tempo ottimale di raccolta del campione	In fase acuta e prima possibile dopo l'esordio clinico
Tipo di campione	Feci spontaneamente emesse
Modalità di raccolta	I campioni devono essere raccolti in una padella (o superficie) asciutta e pulita e quindi trasferiti in contenitori trasparenti, rigidi e a tenuta sicura.
Quantità adeguata	5 – 10 grammi; 5 – 10 ml (se feci liquide)
Numero appropriato di campioni	I campione fecale è sufficiente. Può rendersi necessario un secondo campione su richiesta da parte del microbiologo
Conservazione dei campioni e sicurezza operativa	In contenitori rigidi (vedi sopra) a loro volta in sacchetti di plastica chiusi (a doppia tasca: 1 per il campione fecale, 1 per la scheda specifica)
Tempo tra la raccolta del campione e la procedura analitica	I campioni devono essere trasportati in laboratorio quanto prima possibile (<i>Shigella</i> è particolarmente labile); in ogni caso entro 2 ore (datando ora di emissione). Per Rotavirus/Adenovirus si possono conservare overnight a 2-6°C (meglio se nella soluzione tamponata prevista nel kit in uso). Per qualsivoglia anomalia contattare il laboratorio. Se è richiesto anche l'esame parassitologico consultare le Linee Guida AMCLI-CoSP (Rif. Bibliografico n. 8)
Qualità e idoneità del campione	Allegare sempre la scheda specifica (adeguatamente compilata).

PROCEDURE DIAGNOSTICHE PRELIMINARI

Valutazione macroscopica	Aspetto: i campioni devono essere descritti come solidi (non idonei, solitamente), non formati, liquidi o acquosi. Segnalare la presenza di muco/sangue.
Valutazione microscopica	<ul style="list-style-type: none"> - 40 x 10 al MO in SF: valutare leucociti, fagociti, sangue occulto (in caso ricorre a test specifico). La presenza di sangue si correla a enterocoliti/dissenterie batteriche (e amebiche: la presenza di leucociti si correla a infezioni batteriche (<i>Campylobacter</i>, <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i>); Le infezioni da Adenovirus e Rotavirus (tranne casi rarissimi) decorrono senza muco né sangue. - 100 x 10 (immersione dopo colorazione di Gram): a discrezione e in casi specifici (può essere utile per <i>Campylobacter</i>); - per parassiti: consultare le Linee Guida Operative di AMCLI-CoSP (Rif. Bibliografico n. 8)
Procedura sul campione fecale: tutti i batteri patogeni	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diffondere una piccola quota (alcune gocce) di materiale fecale (anche risospeso in SF) su una piastra per l'esame colturale, utilizzando un'area di circa 1/3 – ¼ della superficie disponibile (si possono usare bastoncini rigidi sterili). 2. Diffondere l'inoculo con ansa sterile per ottenere colonie isolate. 3. Inoculare un volume di feci (in rapporto 1:5 – 1:9) in un brodo di arricchimento. Dopo l'incubazione eseguire le sottocolture utilizzando un'ansa sterile inserita per raccogliere il campione al di sotto della superficie del brodo e seminare su terreni appropriati. <p>Vedi punto 2.</p>
Procedura sul campione: <i>Campylobacter</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vedi sopra. 2. Tecnica membrana filtrante (preferibile, soprattutto se la ricerca è estesa a tutte le specie di tale genere e a generi correlati): risospingere una parte delle feci in brodo Brucella (o SF), meglio se preriscaldato; omogeneizzare bene (p. es. con palline di vetro). 3-4 gocce vengono deposte sopra una membrana filtrante sterile (0.45 – 0.65 µ) a sua volta appoggiata sulla superficie di una piastra di agar sangue. Questa piastra viene posta a 37°C in aerobiosi per 45', quindi, dopo la rimozione della membrana, incubata a 37°C in microaerofilia per 24-48 ore (per <i>C. jejuni/coli</i>); sino a 5 giorni per tutti gli altri.
Procedure sul campione: Rotavirus / Adenovirus	Tecniche differenziate (vedi sistema in uso)
Procedure sul campione: <i>C. difficile</i> (tossina A e B)	Tecniche differenziate (vedi sistema in uso)

TERRENI DI COLTURA, MICROORGANISMI E MODALITÀ OPERATIVE

Microorganismi	Terreni di coltura	Incubazione: temperatura	Incubazione: atmosfera	Incubazione: tempi	Letture colture
<i>Salmonella Shigella</i>	Agar SS (o XLD o HEA) e McConkey	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i> agar-Selettivo	35 – 42° C	microaerofilia	40 – 48 ore	sup. 40 ore
	Agar sangue (se membrana)	35 – 37° C	microaerofilia	18 – 48 ore (5 – 7 giorni)	sup. 18 ore
<i>Salmonella</i>	Brodo Selenite (sub-coltura il giorno dopo: vedi sopra)	35 – 37° C	aerobiosi	8 – 24 ore (vedi sopra)	- (vedi sopra)
<i>E. coli</i> (tutti tranne EHEC)	Agar McConkey	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>E. coli</i> – EHEC (O:157)	Agar McConkey-sorbitolo	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>Yersinia</i>	Agar CIN	28 – 30° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>Vibrio</i>	Agar TCBS	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
	+ Agar McConkey	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i> agar-Selettivo	28 – 30° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
	(o Agar McConkey)	28 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>Plesiomonas</i>	Agar McConkey	35 – 37° C	aerobiosi	16 – 24 ore	sup. 16 ore
<i>C. difficile</i> (in casi epidemici o particolari)	Agar CCFA (o altro selettivo specifico), dopo shock alcolico (in etanolo x 1 ora) o termico (80° C x 10')	35 – 37° C	anaerobiosi	40 – 48 ore	sup. 40 ore
Per Parassiti : consultare Linee Guida AMCLI CoSP (Rif. Bibliografico n.8)					

IDENTIFICAZIONI

Livello minimo	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> <i>C. difficile</i> Rotavirus/Adenovirus	A livello di genere A livello di genere A livello di genere Tossina A/B Kit commerciale
Livello standard	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> /Arcobacter <i>E. coli</i> EHEC (O:157) <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>C. difficile</i> Rotavirus/Adenovirus	A livello di genere e sierogruppo A livello di specie A livello di specie A livello di specie e sierotipo A livello di specie A livello di specie A livello di specie A livello di specie Tossina A/B Kit commerciale
Laboratorio di Riferimento	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> /Arcobacter/ <i>Helicobacter</i> <i>E. coli</i> (tutti quando possibile) <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>C. difficile</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	A livello di specie/sierotipo (in caso: fagotipo) A livello di specie/sierotipo (per <i>S. sonnei</i> , in caso: fagotipo) A livello di specie (tipizzazione in epidemie) A livello di specie, sierotipo, test tossina per VTEC A livello di specie, sierotipo A livello di specie, sierotipo A livello di specie, sierotipo A livello di specie A livello di specie A livello di specie, tossina A, tossina B (tipizzazione in epidemie) A livello di specie, sierotipo, tossina A livello di specie, quantizzazione, sierotipo, tossina A livello di specie, tossina, fagotipo

PROCEDURE DI REFERTAZIONE

Aspetto	Segnalare la presenza di muco/sangue.
Esame microscopico	Riportare la presenza di leucociti/fagociti (sangue occulto). Riportare, se presenti, parassiti (per i quali vedi Linee Guida AMCLI CoSP, Rif. Bibliografico n.8)
Culture e tecniche differenziate	Refertare la presenza o la assenza di patogeni specifici (vedi Capitolo 2 PROCEDURE DIAGNOSTICHE). Referto scritto: 48-72 ore (in caso sarà emesso un referto successivo). Per i pazienti ospedalizzati comunicare immediatamente le positività.
Prove di sensibilità	Refertare le sensibilità come clinicamente indicato.
Annotazioni particolari	Provvedere ad eventuali commenti circa il significato clinico, le caratteristiche epidemiologiche, la terapia antibiotica, a discrezione del medico microbiologo.

BIBLIOGRAFIA

1. Albert MJ, Faruque ASG, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. case-Control Study of Enteropathogens Associated with Childhood Diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3458-64.
2. Aleksic S, Bockemuel J. *Yersinia* and Other *Enterobacteriaceae*. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH Eds. American Society for Microbiology, 7th Ed., Whashington DC 1999: 483-91.
3. Altwegg M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: *Ibidem*; 507-15.
4. Angulo J, Swerdlow DL. Bacterial infections in persons infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21(suppl 1): 84-93.
5. Balakrish Nair G, Albert MJ, Shimada T, Takeda Y. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera. *Rev Med Microbiology* 1996; 7(1): 43-51.
6. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby Ed, 9th ED, St. Louis MI 1994: 234-48.
7. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 573-81.
8. Bernieri F, Casella P, Crotti D, et al. Linee Guida Operative per la diagnosi delle Parassitosi Intestinali. *Microbiologia Medica* 2005; 20(1): 39-46.
9. Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH Eds. American Society for Microbiology, 7th Ed, Whashington DC 1999; 459-72.
10. Bourgault AM, Yechouron A, Gaudreau C, Gilbert H, Lamothe F. Should all stool specimens be routinely tested for *Clostridium difficile*? *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 219-23.
11. Butzler JP. New aspects in the diagnosis and treatment of infectious diarrhoea. *G Ital Chemioter* 1991; 38: 3-6.
12. Caprioli A, Crotti D, Luzzi I. Le Infezioni Gastroenteriche. *Microb Med* 2001, Numero Monografico AMCLI, volume 16, numero 1.
13. Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, et al. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 876-83.
14. Casemore DP, Roberts C. Guidelines for screening for cryptosporidium in stools: Report of a joint working group. *J Clin Path* 1993; 46(1): 2-4.
15. Chalmers RM, Salmon RL. Primary Care Surveillance for Acute Bloody Diarrhea, Wales. *EID* 2000; 6: 412-14.
16. Crotti D. Aspetti attuali nella diagnosi delle infezioni intestinali. La coprocoltura in chiave moderna. DOCUMENTA. Ed. Scientifiche Mascia Brunelli – Biolife, Milano 1997.
17. Crotti D. Infezioni intestinali sostenute da *Campylobacter jejuni/coli* nella seconda metà degli anni '90: aspetti clinico-microbiologici e fenotipi di resistenza. *GIMMOC* 2002; Vol. VI N°1: 19-24.
18. Crotti D. Parassitosi intestinali autoctone nella seconda metà degli anni '90: considerazioni critiche diagnostiche. *Microb Med* 2002; 17(1): 7-13.
19. Crotti D, D'Annibale ML. *Dientamoeba fragilis* e dientamoebosi: aspetti di parassitologia clinica e diagnostica di laboratorio. *Parassitologia* 2001; 43: 135-8.
20. Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Medori MC, Ubaldi M. Diarre acute e protratte nella popolazione del territorio perugino: diagnosi microbiologica delle enteriti ed aspetti clinico-epidemiologici relativi al 2001. *Le Infezioni in Medicina* 2002; 2: 81-7.
21. Crotti D, Medori MC, D'Annibale ML, Fonzo G, Del Sante M. Infezione da *Clostridium difficile* in pazienti con diarrea nosocomiale e acquisita in comunità a Perugia. *Microb Med* 2001; 16(3): 313-5.
22. Crotti D, Medori MC, Fonzo G, Del Sante M, D'Annibale ML. Diarre in età pediatrica: l'infezione, la diagnosi, l'eziologia. *Microb Med* 1999; 14(4): 263-8.
23. Dehodhar LP, Sraswarthi K, Varudkar A. *Aeromonas* species and their association with human diarrheal disease. *J Clin Microbiol* 1991; 29(5): 853-6.
24. de Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek M, et al. Gastroenteritis in Sentinel General Practices, the Netherlands. *EID* 2001; 7(1): 82-91.
25. Dionisi AM, Crotti D, Pezzotti G, et al. CAMPYG: sorveglianza delle infezioni da *Campylobacter* in Italia. *Microb Med* 2002; 17(1): 58-63.
26. Eko FO, Rotimi VO. *Vibrio parahaemolyticus* in humans: disease spectrum, epidemiology and laboratory identification. *Rev Med Microbiology* 1995; 6(2): 137-45.
27. Gascon J, Vargas M, Schellenberg D, et al. Diarrhea in Children under 5 Years of Age from Ifakara, Tanzania: a Case-Control Study. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4459-62.
28. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *CID* 2001; 32: 331-51.
29. Guerrant RL, Steiner TS. Principles and syndromes of enteric infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practise of Infectious Diseases (5th edition) New York 2000; 1076 – 1111.
30. Hedberg CW, et al. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 671.
31. Kuroki S, Saida T, Nukina M, et al. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. *Ann Neurol* 1993; 33: 243-7.
32. Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Enteric Virus Infections and Diarrhea in Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Children. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2873-7.
33. Lopez L, Castillo FJ, Fernandez MA, et al. Astrovirus Infection Among Children with Gastroenteritis in the City of Zaragoza, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 545-7.
34. Luzzi I, Covacci A, Censini S, et al. Detection of a Vacuolating Cytotoxin in Stools from Children with Diarrhea. *CID* 1996; 23: 101-06.
35. Miller JM, Holmes HT. Specimen Collection, Transport, and Storage. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH Eds. American Society for Microbiology, 7th Ed. Washington DC 1999: 33-42.
36. Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: *Ibidem*, 716-24.
37. Pedler SJ, Orr KE. Examination of faeces for bacterial pathogens. *J Clin Pathol* 1990; 43: 410-15.
38. Presterl E, Nadrchal R, Wolf D, Rotter M, Hirschl AM. Enterotoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* among Isolates from Patients with Diarrhea in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 209-12.

39. Rossi S, Crotti D. Enterite acuta autoctona da *Plesiomonas shigelloides*. *Microb Med* 1999; 14(4): 341-2.
40. Schwaber MJ, Simhon A, Block C, Roval V, Federber N, Shapiro M. Factors Associated with Nosocomial Diarrhea and *Clostridium difficile*-Associated Disease on the Adult Wards of an Urban Tertiary Care Hospital.
41. Settle CD, Wilcox MH. Comparison of the Oxoid *Clostridium difficile* toxin A detection kit with cytotoxin detection by a cytopathic effect method examined at 4, 6, 24 and 48 h. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 698-701.
42. Steiner TS, Amidou Samie, Guerrant RL. Infectious diarrhea: new pathogens and new challenges in developed and developing areas. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 408-10.
43. Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, et al. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2134-9.
44. Tozzi AE, Caprioli A, Minelli F, et al. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infs Associated with Hemolytic Uremic Syndrome, Italy, 1988-2000. *EID* 2003; 9(1): 106-8.
45. Tozzi AE, Minelli F, Goriotti S, et al. Infezioni da VTEC in Italia, 1988-2000. *Microb Med* 2002; 17(1): 64-9.
46. Vargas M, Gascon J, Jmenez De Anta MT, Vila J. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among Shogella Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3608-11.
47. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, et al. *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. *EID* 2003; 9(5): 552-5.
48. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 247-62.

Crotti Daniele

Strada Comunale per Pilonico Paterno 4,
06080 Pianello, Perugia
Telefono: 075 602372
E-mail: nenedc@tin.it