

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Microbiologia e Virologia

Ciclo XX

Applicazione di metodologie molecolari nella diagnosi di
malattia da infezione associata a *Clostridium difficile*

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Chezzi

Tutore:
Chiar.ma Prof.ssa Maria Grazia Menozzi

Dottorando:
Dott. Mirko Buttrini

2009

"...Già più d'una volta c'è occorso di far menzione sul nostro lavoro; ma c'è occorso sempre in momenti di gran fretta: sicchè non abbiám mai potuto darne più di un cenno alla sfuggita. Ora però, all'intelligenza del nostro racconto si richiede proprio d'averne qualche notizia più particolare. Son cose che chi conosce la storia le deve sapere; ma siccome, per un giusto sentimento di noi medesimi, dobbiam supporre che quest'opera non possa essere letta se non da ignoranti, così non sarà male che ne diciamo qui quanto basti per infarinare che n'avesse bisogno..."

-I Promessi Sposi-

A TE NOMO...

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
INTRODUZIONE	pag.7
✚ BATTERI ANAEROBI	pag.8
✚ GENERE CLOSTRIDIUM	pag.11
✚ <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	pag.14
• Morfologia	pag.14
• Aspetti ecologici	pag.14
✚ VIRULENZA DI <i>C. DIFFICILE</i>	pag.16
• Adesività, proteine di superficie e chemiotassi di <i>C. difficile</i>	pag.17
• Capsula	pag.19
• Enzimi idrolitici	pag.20
• Tossine e <i>Locus</i> di patogenicità	pag.21
✓ Tossine A e B	pag.21
✓ Tossina binaria	pag.26
✓ Gene regolatore positivo <i>tcdR</i>	pag.28
✓ Gene regolatore negativo <i>tcdC</i>	pag.29
✓ Gene <i>tcdE</i>	pag.31
• Variazioni nel PaLoc: Tossinotipo	pag.31
✚ EPIDEMIOLOGIA	pag.35
✚ DIAGNOSI DI LABORATORIO	pag.39
SCOPO	pag.45
MATERIALI E METODI	pag.48
✚ Ceppi batterici, campioni e pazienti	pag.48
✚ Diagnosi rapida diretta sul campione: ricerca della Glutammato-deidrogenasi (GDH) e della tossina A	pag.48
✚ Diagnosi batteriologica tradizionale: isolamento ed identificazione di <i>C. difficile</i>	pag.48
• Esame colturale	pag.48

<ul style="list-style-type: none"> • Isolamento di <i>C. difficile</i> • Identificazione biochimica di <i>C. difficile</i> 	pag.49
✚ Conservazione dei ceppi	pag.49
✚ Caratterizzazione della tossinogenicità dei ceppi di <i>C. difficile</i> : ricerca dei geni <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i>	pag.49
✚ Caratterizzazione della tossinogenicità dei ceppi di <i>C. difficile</i> : ricerca dei geni <i>cdtA</i> e <i>cdtB</i>	pag.51
✚ Verifica della produzione della tossina A <i>in vitro</i>	pag.53
✚ Tipizzazione molecolare dei ceppi di <i>C. difficile</i> – PCR-Ribotyping	pag.54
✚ Analisi molecolare del <i>Locus</i> di patogenicità – Toxinotyping	pag.55
✚ Analisi molecolare del <i>Locus</i> di patogenicità – Analisi del gene regolatore negativo <i>tcdC</i>	pag.57
✚ Saggi di sensibilità <i>in vitro</i> ai chemioantibiotici	pag.61
RISULTATI	pag.62
✚ Ricerca dei geni <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> , codificanti per le tossine principali A e B, mediante duplex PCR	pag.62
✚ Messa a punto ed applicazione di una PCR in grado di rilevare i geni <i>cdtA</i> e <i>cdtB</i> codificanti per la tossina binaria	pag.64
✚ Caratterizzazione del ribotipo mediante “PCR-ribotyping”	pag.69
✚ Analisi del PaLoc dei ceppi di <i>C. difficile</i> <i>cdtA/B+</i>	pag.74
<ul style="list-style-type: none"> • “toxinotyping” • analisi del gene regolatore negativo <i>tcdC</i> 	pag.74 pag.77
✚ Verifica della sensibilità <i>in vitro</i> ad alcuni chemioantibiotici	pag.85
✚ Disamina delle cartelle cliniche di pazienti coinvolti in due epidemie nosocomiali	pag.86
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.89
ALLEGATO A	pag.94
BIBLIOGRAFIA	pag.96

RIASSUNTO

Clostridium difficile è un bacillo anaerobio, Gram-positivo, sporigeno, di forma rettangolare, responsabile di una malattia diarroica e/o di coliti di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa. I principali fattori di virulenza di *C. difficile* sono rappresentati da due tossine: la tossina A (TcdA, enterotossina) e la tossina B (TcdB, citotossina), codificate dai geni *tcdA* e *tcdB* localizzati nel *Locus* di patogenicità di *C. difficile* (PaLoc), dove si trovano anche i geni *tcdD* e *tcdC*, regolatori rispettivamente positivo e negativo per la produzione delle due tossine principali, nonché il gene *tcdE*, che facilita l'esocitosi delle due tossine stesse. Alcuni ceppi di *C. difficile* producono tossine A e B varianti in seguito a delezioni e/o mutazioni nella sequenza dei geni codificanti, *tcdA* e *tcdB*, localizzati nel PaLoc. Ad oggi sono stati identificati 27 tipi di varianti, denominate da I a XXVII.

Recentemente è stata dimostrata per alcuni ceppi di *C. difficile* la produzione di una terza tossina, una tossina binaria, composta da due diversi domini: una componente enzimatica denominata CDTa ed una componente di legame denominata CDTb [6]. Quest'ultima tossina è una ADP-ribosiltransferasi actino-specifica e catalizza la reazione di ADP-ribosilazione dei monomeri di actina portando ad una disorganizzazione del citoscheletro. Essa è sintetizzata a partire da due diversi geni, *cdtA* e *cdtB*, che sono localizzati fuori dal PaLoc. Tossine binarie, prodotte da altri Clostridi, sono state implicate in diverse patologie intestinali sia umane che animali. Per esempio, *C. perfringens* tipo E produce una tossina iota, che è stata indicata come fattore scatenante di enterotossiemie in animali; una tossina binaria è, inoltre, il solo fattore di virulenza identificato per *Clostridium spiroforme*, implicato in enteriti di conigli ed in un caso di colite nell'uomo [144].

La maggior parte dei ceppi di *C. difficile* varianti per le tossine A e B produce questa tossina binaria. La presenza di questi geni è pertanto considerata un buon indicatore per la rivelazione di ceppi varianti di *C. difficile* [143].

Numerosi episodi epidemici, con la segnalazione di un'incremento di morbilità e mortalità, sono stati associati alla comparsa di un nuovo ceppo ipervirulento, caratterizzato come PCR ribotipo 027/ tossinotipo III, a partire dal 2003 principalmente in Nord America, ma ora con crescente frequenza anche in Europa [6, 31]. Questo clone epidemico variante presenta una mutazione del gene *tcdC*, il regolatore negativo delle tossine A e B, che probabilmente determina la loro aumentata produzione.

Infatti, ceppi varianti di *C. difficile* A+B+, che presentano contemporaneamente i geni codificanti per la tossina binaria, studiati dal punto di vista molecolare hanno evidenziato parziali delezioni del gene *tcdC*. Questo gene, localizzato nel PaLoc, codifica per un repressore in grado di

inattivare il fattore σ (regolatore positivo), che viene prodotto dal gene *tcdD*, quest'ultimo anch'esso presente nel PaLoc [6, 176]. In particolare queste varianti, che presentano delezioni di 18, 36 o 39 pb nel gene *tcdC* determinano un'inattività del repressore prodotto dal gene stesso con un conseguente aumento della produzione delle tossine A e B e della virulenza dei ceppi. E' opportuno sottolineare, inoltre, che questi ceppi varianti di *C. difficile* presentano particolari resistenze ad antibiotici verso i quali fino ad ora erano ritenuti sensibili, come vancomicina e metronidazolo oltre a eritromicina, clindamicina e fluorochinoloni.

Batteri a diffusione nosocomiale ed, in particolare, *Clostridium difficile* rappresentano un grave problema per le strutture ospedaliere in relazione alla salute dei pazienti ricoverati, ma anche dal punto di vista economico. I laboratori di batteriologia anaerobica come il nostro della sezione di Microbiologia- dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio- Università degli Studi di Parma, che scelgono di completare la diagnosi di laboratorio di malattia da infezione associata a *C. difficile* (CDAD) con l'isolamento e l'identificazione dei ceppi, raggiungono contemporaneamente una più elevata efficienza diagnostica e possono procedere ulteriormente con indagini mirate a fini epidemiologici.

Il primo obiettivo, pertanto, della presente Tesi è stato necessariamente lo sviluppo di metodi molecolari di tipizzazione per fornire dati epidemiologici rapidi ed attendibili al fine di evitare e/o contenere il diffondersi di possibili epidemie nosocomiali. La messa a punto ed applicazione delle metodologie molecolari, necessarie allo scopo, sono state eseguite analizzando 438 ceppi di *C. difficile* isolati nel corso di setti anni (2000-2006) e conservati in collezione. Inizialmente, per caratterizzare la tossinogenicità dei ceppi sono state applicate le seguenti metodologie in ordine cronologico: una duplex PCR per la ricerca dei geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti per le tossine principali A e B di *C. difficile*, ed una PCR in grado di rilevare i geni *cdtA* e *cdtB* codificanti per la tossina binaria. Inoltre, è stata eseguita mediante "PCR-ribotyping" la tipizzazione dei ceppi isolati, allo scopo di tracciare un quadro epidemiologico completo della circolazione dei ribotipi di *C. difficile* nel nostro ambiente ospedaliero nell'ampio arco di tempo considerato, colmando contemporaneamente un vuoto di conoscenza al riguardo e confermando i due episodi epidemici sospettati su basi cliniche, osservati nel 2003 e nel 2006.

Come ulteriore obiettivo è stato approfondito lo studio molecolare dei ceppi di *C. difficile*, risultati varianti *cdtA/B+*, con l'analisi del PaLoc mediante "toxintyping" e successiva analisi del gene regolatore negativo *tcdC* nonché con la verifica della loro sensibilità *in vitro* ad alcuni chemioantibiotici, fluorochinoloni in particolare come "marker" di patogenicità.

Da ultimo, allo scopo di stabilire una correlazione tra il ceppo batterico tossinogenico (ordinario e/o variante) e gravità della malattia è stata eseguita un'attenta disamina delle cartelle

cliniche di 63 pazienti per la maggior parte coinvolti nei due episodi epidemici (sospettati su basi cliniche nel dicembre 2002-settembre 2003 ed in aprile-settembre 2006) utilizzando nella valutazione il questionario elaborato e proposto dallo Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD) dell' European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).

In questo studio dei 438 ceppi di *C. difficile* esaminati, complessivamente isolati da 334 pazienti ricoverati in diversi reparti dell'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma e conservati in collezione, 390 sono risultati tossinogenici e di questi 125 (32,1%) hanno presentato i geni codificanti per la tossina binaria CDT, che caratterizza i ceppi varianti. Questi ceppi rappresentano il 44% dei ceppi tossinogenici isolati negli anni 2001-2003 e solo il 13% dei ceppi isolati negli anni 2004-2006, un dato che appare in controtendenza rispetto a quelli osservati in altri Paesi [107].

Nella tipizzazione di tutti questi 438 ceppi mediante "PCR-ribotyping" sono stati trovati 76 differenti ribotipi, denominati arbitrariamente dal numero 1 al numero 76. In particolare, per quanto riguarda i 125 ceppi *ctdA+* *ctdB+* sono stati trovati 8 differenti ribotipi. Il ribotipo più diffuso tra i ceppi varianti è il ribotipo 1, che caratterizza il 94,4% di questi ceppi (118 su 125 totali); in particolare, 103 ceppi (82,4%) appartengono al sottotipo 1a.

Va sottolineato che, grazie ad una collaborazione con la dott.ssa Limbago del Centers for Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, U.S.A., i nostri ceppi varianti ribotipo 1a sono stati riclassificati mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e rinominati secondo la nomenclatura internazionale mediante PCR-ribotyping come NAP7/ribotipo.

Quarantatrè dei 125 ceppi potenzialmente CDT+ sono stati selezionati per le successive fasi di analisi del PaLoc e della sensibilità *in vitro* ai chemioantibiotici. Dei 43 ceppi varianti selezionati in base al ribotipo ed analizzati mediante "toxintyping" l' 86% appartiene al tossinotipo V, che caratterizza anche la totalità dei ceppi ribotipo 1.

Quattro dei 125 ceppi potenzialmente CDT+ sono stati tipizzati come tossinotipo XXIV, ma hanno mostrato un ribotipo differente tra loro: 5 (2 ceppi), 11 e 16. Il tossinotipo XXIV è raramente descritto in letteratura; è caratterizzato da un PaLoc analogo al quello del ceppo di riferimento VPI 10463 (tossinotipo "0"), ma possiede i geni codificanti per la tossina binaria *tcdA* e *tcdB* contrariamente a quanto osservabile nel ceppo di riferimento stesso.

Una revisione di ceppi isolati nel recente passato ha messo in evidenza casi di malattia da infezione associata a *C. difficile* causati da ceppi tossinotipo V. Questo tossinotipo è stato segnalato come una delle cause di epidemia in suini neonati e vitelli; inoltre, ceppi tossinotipo V sono considerati una crescente causa di CDAD nell'uomo. In uno studio condotto da Jung et al. ceppi isolati da alimenti di origine animale e ceppi isolati dall'uomo hanno mostrato elevato grado di somiglianza fenotipica e genotipica ed in alcuni casi apparivano indistinguibili. Inoltre, tutti i ceppi, sia

di origine animale sia di origine umana, presentavano una delezione di 39 pb nel gene *tcdC* ed i geni codificanti la tossina binaria. Sebbene *C. difficile* sia riconosciuto come causa di malattia in diverse specie animali [62, 119, 197] poche ricerche sono state condotte sulla potenziale trasmissione interspecie animale-uomo. Alcuni studi hanno suggerito la possibile trasmissione di *C. difficile* tra uomo e animali domestici [111, 132], ma non sono state documentate trasmissioni interspecie e pochi studi hanno esaminato il possibile legame tra CDAD nell'uomo ed il potenziale veicolo offerto da prodotti alimentari animali. L'identificazione della stessa variante tossinotipica per entrambi i ceppi (umani e animali) in questo studio suggerisce tre possibili cause di trasmissione: 1) l'esposizione di esseri umani e animali ad una comune sorgente ambientale di *C. difficile*, 2) la malattia nell'uomo è causata dalla trasmissione diretta o indiretta da animali vivi infetti, e 3) la malattia umana è legata al consumo di prodotti provenienti da animali. Tuttavia, la somiglianza genetica dei ceppi umani e animali e la crescente importanza del tossinotipo V nelle CDAD umane, dopo la loro comparsa negli animali, suggerisce una via di trasmissione da animale a uomo mediante alimenti o altre forme di sottoprodotti di origine animale.

Inoltre ceppi tossinotipo V sembrano essere un importante causa di CDAD legata alla produzione alimentare suina in alcune parti d'Europa, così come in Nord America [141].

Lo studio epidemiologico condotto da Jhung riporta anche che tutti i ceppi tossinotipo V isolati da cibi animali e da uomo mostrano una iperproduzione delle tossine A e B (264 µg/mL e 62 µg/mL, rispettivamente, dopo 72h) rispetto al ceppo di riferimento tossinotipo "0" VPI 10463 (85 µg/mL e 9 µg/mL, rispettivamente, dopo 72h).

Risulta di conseguenza interessante osservare come, nel nostro studio, i 18 ceppi varianti dei 38 NAP7/ribotipo 078 tossinotipo V siano stati isolati in un arco di tempo di 10 mesi (Dicembre 2002-Settembre 2003) da 15 pazienti ricoverati in 3 diversi reparti geriatrici localizzati nello stesso edificio, aventi in comune il Centro Riabilitativo. Cinque di questi 15 pazienti hanno presentato episodi recidivanti di CDAD in un periodo compreso tra 1 e 3 mesi dal primo episodio, che rappresentano molto probabilmente delle recidive, essendo sostenute dallo stesso ceppo ipervirulento come sopradescritto. Tutti i ceppi appartenenti a questi 15 pazienti sono risultati inoltre resistenti a moxifloxacina ed eritromicina (MIC \geq 32 mg/mL), come riportato in letteratura relativamente a ceppi particolarmente virulenti responsabili di episodi epidemici nosocomiali. Infatti, in particolare, la letteratura riporta che sia i ceppi ipervirulenti Nap1/Ribotipo 027 sia i ceppi Nap7/Ribotipo 078 sono risultati costantemente resistenti ai fluorochinoloni, fatto che pertanto potrebbe avere offerto loro un vantaggio, venendo selezionati in corso di terapia *in vivo* e conseguentemente nell'ambiente [22, 51, 89, 145].

Nel nostro studio, relativamente all'analisi mediante PCR-ribotyping dei 313 ceppi non varianti, è stata riscontrata la presenza di 4 ribotipi predominanti: il ribotipo 13 (45 ceppi, 14,4%), il ribotipo 17 (85 ceppi, 27,3%), il ribotipo 18 (32 ceppi, 10,3%) e il ribotipo 33 (28 ceppi, 9%). Tra questi, un ceppo appartenente al ribotipo 17 è stato responsabile dell'epidemia, che ha coinvolto 42 pazienti ricoverati nei Reparti pneumologici (apr.-sett. 2006).

L'analisi del gene regolatore negativo *tcdC* ha mostrato che i ceppi ribotipo 1 tossinotipo V posseggono un allele, già descritto in letteratura [42], denominato A1, che presenta oltre ad una delezione di 39 pb una mutazione non senso con la conseguente produzione di una proteina tronca, composta da soli 61 aminoacidi rispetto ai 232, che compongono la proteina integra e funzionale. All'interno del ribotipo 1 solo i tre ceppi ribotipo 1c tossinotipo V hanno mostrato la presenza di una nuova sequenza allelica denominata "nuovo 1", dotata di 4 mutazioni puntiformi silenti, che pertanto non producono un'alterazione nella sequenza aminoacidica rispetto a quella del ceppo di riferimento VPI 10463.

Una variabilità maggiore si è osservata, al contrario, con i ceppi che presentavano ribotipo diverso da 1. Il ceppo ribotipo 4 tossinotipo IV presenta un allele non ancora descritto in letteratura denominato "nuovo 2". Questo allele oltre a 4 mutazioni puntiformi silenti, due mutazioni puntiformi con cambiamento aminoacidico e una delezione di 54 pb, presenta una mutazione non senso con conseguente produzione di una proteina composta da una nuova sequenza di soli 61 aminoacidi.

Il ceppo ribotipo 10 tossinotipo IX presenta un allele non ancora descritto in letteratura denominato "nuovo 3". In questo allele è presente una delezione puntiforme, che porta allo slittamento di tutte le basi, conducendo ad una mutazione non senso con conseguente produzione di una proteina composta da soli 65 aminoacidi non ancora descritta in letteratura.

Inoltre, il ceppo CD 2276 ribotipo 14 tossinotipo V, per il quale sono stati disegnati primers specifici, è dotato di un allele non ancora descritto denominato "nuovo 4". Esso presenta 8 mutazioni puntiformi silenti, 3 mutazioni puntiformi (Serina → Isoleucina; Alanina → Ac. Aspartico; Prolina → Serina), una delezione di 18 pb, ma soprattutto due mutazioni di stop, che portano alla formazione di una proteina tronca formata da 61 aminoacidi non ancora descritta in letteratura.

Il ceppo ribotipo 16 tossinotipo XXIV presenta 4 mutazioni puntiformi silenti, una mutazione puntiforme (Glicina → Valina) ed una delezione di 18 pb. Questo allele non ancora descritto in letteratura è stato denominato "nuovo 5" e porta ad una sequenza aminoacidica completamente nuova.

Riassumendo, sono state trovate 5 nuove sequenze alleliche e tre proteiche non ancora descritte in letteratura. Per le proteine risultate tronche si può ipotizzare una non funzionalità della proteina stessa. Pertanto per i ceppi ribotipo 1a tossinotipo V, predominanti nel nostro ambiente tra quelli produttori anche della tossina binaria (82,4 %), che posseggono una proteina TcdC di soli 61 aminoacidi e quindi non funzionale, può essere ipotizzata una iperproduzione delle tossine principali A e B. La gravità della CDAD, riscontrata nei 15 pazienti ricoverati in 3 diversi reparti geriatrici e coinvolti nella epidemia ospedaliera sopradescritta (dic. 2002-sett. 2003), è probabilmente correlata a questa alterazione del gene *tcdC* da noi dimostrata nei ceppi ribotipo 1a tossinotipo V isolati da tutti i pazienti indagati. L'ipotesi dovrebbe essere dimostrata verificando l'effettiva produzione delle tossine A e B da parte di questi ceppi, mediante Westen Blot come descritto da Matamouros e collaboratori [120].

Occorre inoltre sottolineare che in uno dei quattro ceppi tossinotipo XXIV sono state riscontrate 5 mutazioni puntiformi (4 silenti) ed una delezione di 18 pb. Mutazioni insolite per questo tossinotipo, che normalmente presenta un PaLoc identico a quello del ceppo VPI 10463. La letteratura attuale riporta che l'unica differenza tra il tossinotipo XXIV e il tossinotipo "0" è la presenza dei geni della tossina binaria nel primo, geni però situati esternamente al PaLoc [158, 161, 164].

Va infine sottolineata la presenza di un nuovo tossinotipo non ancora descritto in letteratura [164]. Questo è un dato molto significativo, ma non deve comunque sorprendere dal momento che solo in questi ultimi anni è stata considerata l'importanza del tossinotipo. Questa nuova consapevolezza ha portato ad indagare il PaLoc di ceppi isolati in tutto il mondo, portando ad un continuo aggiornamento dei tossinotipi trovati [164].

In conclusione, è importante sottolineare che nessun ceppo isolato dai pazienti del nostro ospedale nel periodo considerato è risultato PCR-ribotype 027 toxinotype III, il clone epidemico attualmente circolante in molti Paesi Europei e non, responsabile di gravi epidemie con esito mortale per alcuni pazienti. Analogamente nessuno dei nostri ceppi di *C. difficile* è risultato A-B+, benché questi ceppi siano ormai considerati responsabili di infezioni ospedaliere ed acquisite in comunità [164]. Tuttavia, il nostro studio sottolinea inequivocabilmente l'importanza dell'analisi molecolare, che va condotta per un attento e costante monitoraggio dei ceppi di *C. difficile* circolanti in ambiente ospedaliero. Queste indagini molecolari si sono rese ormai indispensabili per la sempre più elevata diffusione di ceppi ipervirulenti, come dimostrano i ceppi Nap7/Ribotipo078 tossinotipo V, comparsi nel nostro ospedale nel 2002-2003, responsabili di una grave epidemia ospedaliera.

INTRODUZIONE

Batteri a diffusione nosocomiale come, tra i batteri anaerobi, *Clostridium difficile* rappresentano un grave problema per le strutture ospedaliere in relazione alla salute dei pazienti ricoverati, ma anche dal punto di vista economico. I laboratori, che scelgono di completare la diagnosi di laboratorio di malattia da infezione associata a *C. difficile* (CDAD) con l'isolamento e l'identificazione dei ceppi raggiungono contemporaneamente una più elevata efficienza diagnostica e possono procedere ulteriormente con indagini mirate a fini epidemiologici. In questo caso sorge la necessità di sviluppare metodi molecolari di tipizzazione per fornire dati epidemiologici rapidi ed attendibili al fine di evitare e/o contenere il diffondersi di possibili epidemie nosocomiali. Metodi di tipizzazione, inizialmente sviluppati sullo studio di caratteristiche fenotipiche dei batteri, si stanno spostando sullo studio di caratteristiche genotipiche. I markers epidemiologici basati su caratteristiche genotipiche sono, infatti, più discriminanti rispetto a quelli basati su caratteristiche fenotipiche [187].

Per meglio comprendere i criteri, che stanno alla base delle tecniche di batteriologia anaerobia necessarie per una corretta diagnosi di laboratorio e per una sorveglianza epidemiologica, non si può prescindere da una descrizione se pur sintetica delle caratteristiche biologiche fenotipiche e genotipiche dei batteri anaerobi in generale e dei Clostridi, in particolare di *C. difficile*.

BATTERI ANAEROBI

I batteri in generale vengono suddivisi in base al loro rapporto con l'ossigeno in:

- Aerobi obbligati
- Aerobi-anaerobi facoltativi
- Microaerofili
- **Anaerobi aerotolleranti**
- **Anaerobi obbligati (moderati e/o stretti)**

I batteri anaerobi sono suddivisi pertanto in due gruppi principali: anaerobi aerotolleranti ed anaerobi obbligati.

Dal punto di vista operativo il termine anaerobi aerotolleranti è usato per descrivere batteri anaerobi, in grado di crescere anche su terreni all'agar incubati in atmosfera ambiente o in un termostato al 5-10% di CO₂, ma che danno una crescita ottimale per quantità e grandezza delle colonie solo in condizioni anaerobiche. Esempi di questi batteri sono *Clostridium histolyticum* e *Clostridium tertium* [105]. Al contrario, i batteri anaerobi obbligati vengono definiti come batteri incapaci di crescere sulla superficie di un terreno solido incubato in atmosfera ambiente o in una atmosfera contenente il 5-10% di CO₂. Questi ultimi sono ulteriormente suddivisi in due gruppi in base alla loro capacità di crescere in presenza di basse tensioni di ossigeno e/o di tollerarlo. Infatti, i batteri anaerobi obbligati stretti non sono capaci di crescere sulla superficie dell'agar esposta a concentrazioni di O₂ al di sopra dello 0,5%; sono un esempio di questi batteri *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* ed il genere *Treponema*. Il secondo gruppo di anaerobi obbligati, o anaerobi obbligati moderati, sono batteri, che possono crescere anche quando esposti a concentrazioni di ossigeno intorno al 3%; si possono citare ad esempio le specie *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*.

Sempre dal punto di vista operativo è opportuno sottolineare come alcuni batteri anaerobi stretti sono uccisi con un'esposizione all'ossigeno atmosferico di dieci minuti su un bancone di laboratorio, mentre la maggior parte delle specie anaerobie obbligate isolate da infezioni umane è in grado di tollerare esposizioni all'ossigeno di maggiore durata. Le cause della differente sensibilità all'ossigeno degli anaerobi sono diverse, ma fondamentalmente questa dipende dalla loro produzione di superossido dismutasi, catalasi e perossidasi, che sono protettivi nei confronti dei prodotti tossici dell'ossigeno [105].

Durante lo sviluppo ed il metabolismo batterico vengono generati dei prodotti di riduzione dell'ossigeno, che vengono secreti nell'ambiente circostante. Tra questi l'anione superossido (O₂⁻)

è generato per riduzione univalente dell'ossigeno stesso; è prodotto durante l'interazione dell'ossigeno molecolare con vari costituenti cellulari, che includono flavine ridotte, flavoproteine, chinoni, tioli e proteine con ponti sulfidrilici. L'anione superossido è in grado di partecipare in un numero di reazioni distruttive potenzialmente letali per la cellula. Inoltre, i prodotti di reazioni secondarie possono amplificare la tossicità. Ad esempio, una ipotesi è che l'anione superossido reagisca con il perossido di idrogeno nella cellula (reazione di Haber-Weiss) producendo idrossi radicali liberi (OH^\cdot e OH^\cdot). In particolare OH^\cdot è il più potente ossidante biologico conosciuto e può virtualmente attaccare ogni sostanza organica nella cellula. Una reazione susseguente tra l'anione superossido ed il radicale idrossilico libero produce alla presenza di superossido-dismutasi (SOD) ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), che è ugualmente in grado di danneggiare la cellula. La SOD catalizza inoltre la conversione dei radicali superossidi (O_2^\cdot) alla presenza di ioni idrogeno in perossido di idrogeno ed ossigeno molecolare. Il perossido di idrogeno generato in questa reazione è un agente ossidante, ma non danneggia la cellula tanto quanto l'anione superossido e tende a diffondere fuori dalla cellula. Parecchi microrganismi possiedono l'enzima catalasi o perossidasi od entrambi per eliminare H_2O_2 . La catalasi utilizza il perossido di idrogeno come un ossidante (accettore di elettroni) e come un riducente (donatore di elettroni) per convertire il perossido in acqua ed ossigeno molecolare, mentre la perossidasi usa un riducente diverso da H_2O_2 .

Batteri facoltativi ed aerobi, se privi di SOD, posseggono generalmente alti livelli di catalasi o di perossidasi. In loro presenza ad elevate concentrazioni può diminuire il bisogno di SOD, dal momento che essi possono efficacemente allontanare H_2O_2 prima, che possa reagire con il superossido a formare il più attivo radicale idrossilico. Tuttavia, la maggior parte di questi microrganismi mostrano una positiva correlazione tra l'attività della SOD e la resistenza agli effetti tossici dell'ossigeno. In altri casi batteri facoltativi ed aerobi hanno mostrato di saper produrre alti livelli di SOD.

Gli anaerobi più sensibili all'ossigeno come regola producono poca o nessuna SOD. In aggiunta all'attività della SOD, il livello al quale un microrganismo introduce e riduce ossigeno è stato considerato uno dei fattori alla base dell'ossigeno tolleranza. E' stato dimostrato che anaerobi molto sensibili, che venivano uccisi dopo brevi esposizioni all'ossigeno, riducevano relativamente larghe quantità di ossigeno e non mostravano un'attività superossido-dismutasica. Al contrario microrganismi più tolleranti riducevano molto poco ossigeno ed, inoltre, dimostravano alti livelli di attività superossido-dismutasica.

Il continuo spettro di tolleranza all'ossigeno tra i batteri (variabile da specie a specie e talvolta da ceppo a ceppo) appare dovuta in parte all'attività degli enzimi SOD, catalasi e perossidasi nella cellula ed in parte alla quantità di ossigeno, che la cellula è in grado di accumulare.

Chiaramente un insieme di fattori influenza l'ossigeno tolleranza: la localizzazione degli enzimi protettivi (superficie cellulare verso il citoplasma); la quantità di prodotti tossici dell'ossigeno (ad esempio, radicali idrossilici od ossigeno singoletto) che la cellula può produrre e la sensibilità dei componenti cellulari esposti ai prodotti tossici dell'ossigeno [20].

La maggior parte degli anaerobi, isolati nel laboratorio da campioni biologici scelti e raccolti adeguatamente, appartengono alla categoria degli anaerobi obbligati moderati. Gli anaerobi obbligati stretti sono rari nelle infezioni dell'uomo. Tuttavia sia gli anaerobi stretti sia quelli moderati si ritrovano in una varietà di habitat come costituenti della popolazione batterica normalmente residente (ad esempio, nell'intestino e nell'orofaringe) [105].

E' interessante notare come i batteri anaerobi siano prevalenti in certe zone del corpo umano esposte all'aria (cute, naso, bocca e gola) e la ragione della loro prevalenza è attribuibile principalmente al consumo di ossigeno ad opera dei batteri facoltativi ed aerobi contemporaneamente presenti ed, in particolare, alla loro concentrazione in microambienti con ridotto potenziale di ossido-riduzione, quali rime gengivali, cripte tonsillari e follicoli piliferi [20].

Va tuttavia sottolineato che i batteri anaerobi possono potenzialmente causare infezioni in ogni distretto dell'organismo.

La tassonomia dei batteri anaerobi ha avuto un importante impulso a partire dal 1990 conseguentemente alla diffusione di sofisticati studi genetici, che hanno permesso di recente di stabilire cambiamenti più significativi di quanto non si siano potuti ottenere con studi fenotipici ed indagini molecolari di base. L'introduzione di nuovi generi e/o specie è risultata particolarmente evidente nell'ambito dei batteri Gram-negativi anaerobi appartenenti ai generi *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Bacteroides* e dei batteri Gram-positivi non sporigeni (ad esempio, *Actinomyces*, *Atopobium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Pseudoramibacter*) [20].

GENERE *CLOSTRIDIUM*

Il genere *Clostridium* fu identificato per la prima volta da Prazmowski nel 1880 [10]. E' composto da un gruppo eterogeneo di bacilli Gram-positivi, sporigeni, anaerobi; tuttavia alcune specie presentano delle difficoltà a colorarsi e possono assumere una colorazione Gram-variabile o addirittura presentarsi come Gram-negativi quando sottoposti alla colorazione di Gram [94]. Si tratta di bacilli in gran parte mobili per la presenza di flagelli peritrichi e raramente risultano essere capsulati. Producono spore generalmente localizzate nella porzione terminale o subterminale del corpo batterico (figure 1 e 2) [10].

Figura 1. Ciclo vitale del genere *Clostridium*.

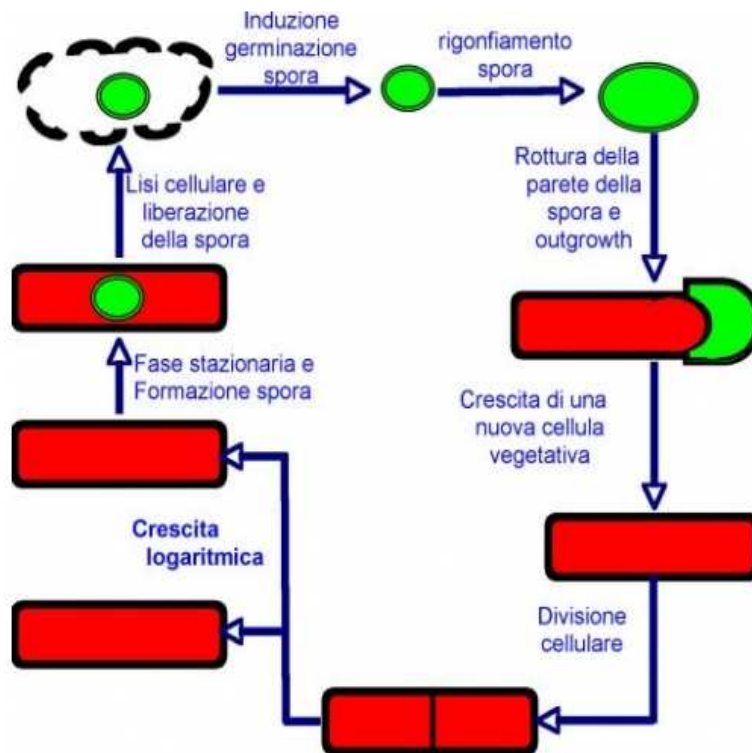
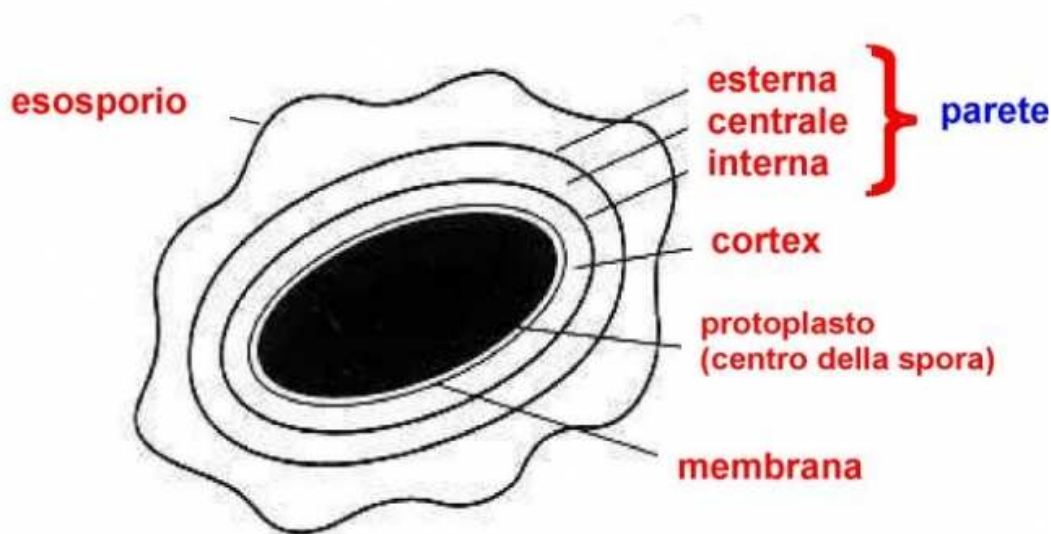


Figura 2. Struttura di una spora.



La maggior parte dei clostridi è normalmente saprofitica ed è largamente distribuita nell'ambiente (si ritrovano principalmente negli strati del suolo poveri di ossigeno); inoltre i clostridi costituiscono parte della normale popolazione batterica residente nell'intestino [94].

Filogeneticamente il genere *Clostridium* risulta essere estremamente eterogeneo, molte specie sono associate ad altri generi sporigeni e non sporigeni [94].

Il genere *Clostridium* è molto eterogeneo riguardo all'ossigeno; si ritrovano, infatti, vicino a specie moderatamente aerotolleranti (*C. aerotolerans*, *C. histolyticum*, ecc.), specie di anaerobi obbligati (*C. perfringens*, *C. haemolyticum*, ecc.) che mancano del sistema dei citocromi e di catalasi, e producono ATP esclusivamente mediante reazioni di fosforilazione a livello del substrato[10].

Tuttavia diversità genetiche significative all'interno di questo genere, rilevate mediante sequenziamento del gene 16S rRNA e costruzione di un albero filogenetico, hanno permesso una più accurata distinzione all'interno di questo genere [5]. Questi studi hanno portato alla suddivisione delle diverse specie di Clostridi in diversi "cluster". In particolare specie di Clostridi di rilevante interesse medico sono prevalentemente inserite nel "clusters" 1, che corrisponde al rRNA gruppo 1 di Johnson e Francis [90].

La maggior parte delle infezioni causate da questi microrganismi sono di origine endogena. Tuttavia in poche circostanze possono essere riscontrate intossicazioni esogene, come ad esempio in caso di tossinfezioni alimentari (*C. perfringens*, *C. botulinum*).

I clostridi producono una grandissima varietà di enzimi, che possono ritrovarsi nell'ambiente, alcuni dei quali dotati di alta tossicità per gli organismi animali e quindi da considerare come delle vere e proprie esotossine. Proprio all'azione di due di queste esotossine, la potentissima tossina tetanica e la tossina botulinica, dobbiamo patologie umane di notevole interesse, che vedono come agenti eziologici *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, responsabili rispettivamente del tetano e del botulismo. In entrambe le infezioni l'effetto delle tossine si esplica attraverso l'inibizione della trasmissione degli impulsi nervosi nei nervi motori provocando, nel soggetto colpito, la morte per paralisi [10].

Le affezioni umane sono la conseguenza di un'introduzione accidentale nei tessuti delle forme vegetative o delle spore, come nel caso del tetano e della gangrena, oppure dell'assunzione delle tossine con alimenti contaminati, come nel caso del botulismo o di altre tossinfezioni alimentari (ad esempio: *C. perfringens*) [10].

Le infezioni endogene coinvolgono clostridi, che fanno parte della popolazione microbica residente dell'ospite e sono comunque molto più comuni delle infezioni esogene. Come spesso accade per altre infezioni endogene, dove sono coinvolti batteri anaerobi, anche nella malattia da clostridi l'infezione è legata a particolari circostanze. Fattori predisponenti l'infezione da clostridi sono traumi, procedure operatorie, stasi vascolare, malattie debilitative come leucemia, carcinomi e diabete mellito, trattamenti in pazienti oncologici con agenti immunosoppressori o chemioterapici e/o dopo trattamenti con antibiotici [5].

CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Morfologia

Clostridium difficile, originariamente noto con il nome di *Bacillus difficile*, fu isolato per la prima volta nel 1935 da Hall e O'Toole dal suolo [194] ed è attualmente riconosciuto responsabile di una malattia diarroica e/o di coliti (CDAD) di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa (PMC).

È un bacillo anaerobio, sporigeno, di forma rettangolare, che si colora come Gram positivo se sottoposto alla colorazione di Gram, ma che può presentare una certa variabilità nel caso si prendano in considerazione colonie più vecchie.

Un'osservazione di *C. difficile* al microscopio ottico, partendo da colture agarizzate invecchiate di almeno 72 ore, mette in luce oltre alla sua forma bastoncellare lunga circa 6-8 micron la presenza della spora di forma ovale nella porzione subterminale, che non deforma il corpo batterico. La sporulazione risulta più evidente durante questa fase di crescita dal momento che il batterio, in questo lasso di tempo, ha raggiunto un avanzato stato di mortalità.

Una più attenta analisi evidenzia la tipica struttura "bisporale", in cui due forme batteriche di *C. difficile* si dispongono a coppia con le parti terminali, dove è situata la spora, in posizione opposta una all'altra.

Dopo 24 ore di incubazione in atmosfera anaerobia la colonia di *C. difficile* ad un'osservazione macroscopica appare grigia, frastagliata, rugosa e non emolitica dalle dimensioni di 3-5 mm, sebbene alcuni ceppi possano presentare un alone verdastro dovuto ad un emolisi di tipo α nei terreni contenenti sangue; dopo 48 ore, invece, la colonia assume la cosiddetta forma ad "uovo fritto" con centro di colore bianco-grigiastro dovuto ad un fattore associato alla sporulazione e bordi rialzati.

Un'altra caratteristica di questo microrganismo è la persistente produzione di un pungente ed inconfondibile odore di cavallo [33].

Aspetti ecologici

C. difficile è normalmente un innocuo batterio ambientale. Come avviene per altre specie batteriche è l'intervento dell'uomo, che crea le condizioni favorevoli attraverso le quali il batterio può divenire causa significativa di malattia e mortalità nell'uomo stesso. In particolare, l'infezione da parte di *C. difficile* è facilitata dalla compromissione della normale popolazione batterica

intestinale, spesso causata dall'uso di agenti antimicrobici, che indeboliscono la resistenza alla sua colonizzazione.

Il primo studio che ha ricercato in modo specifico *C. difficile* nell'ambiente è stato svolto da Hafiz [76] in Pakistan nel 1974. Hafiz ha isolato il microrganismo dal suolo, dal fango di fiume, dal fieno e dallo sterco di cammello, di asino, di mucca e di cavallo. Precedentemente, anche altri Autori avevano trovato il batterio nel suolo, ma solamente in luoghi geograficamente in relazione con la presenza di scarichi fognari umani o di pazienti con infezione attiva da *C. difficile*; al contrario, altri ricercatori non sono riusciti ad isolare il batterio dal suolo [33]. Tutto questo suggerisce una distribuzione ineguale di questo batterio nell'ambiente e mette in luce come le metodologie di campionamento possano rendere estremamente variabili i risultati.

Il più grande studio di ricerca di *C. difficile* condotto nell'ambiente è stato quello di Al Saif & Brazier, che nel 1996 hanno esaminato 2580 campioni ambientali nella zona di Cardiff, Galles. Sono stati esaminati campioni di suolo, acqua (di mare, fiume o piscina), verdure crude, rifiuti di aziende agricole e di allevamento animale, oltre a superfici in case, ospedali e cliniche veterinarie utilizzando una metodica accurata per poter aumentare la possibilità di rinvenire le spore del batterio. I loro risultati hanno mostrato un tasso di positività del 7,1%; in particolare *C. difficile* è stato isolato con maggiore frequenza dal suolo (21%), animali domestici (7%) e ospedali (20%). Molto significativa è stata la positività dell' 87,5% delle acque dei fiumi e del 46,7% delle acque dei laghi, così come il 50% delle piscine, 2,4% di verdure crude e 2,2% delle superfici in case private. Anche in questo caso, la metodologia potrebbe avere svolto un fattore chiave. Tali dati ambientali possono spiegare come la popolazione in comunità possa essere esposta periodicamente a *C. difficile*.

VIRULENZA DI *C. DIFFICILE*

Relativamente a questo argomento sembra opportuno premettere alcune caratteristiche generali. Il corpo umano, come quello di tutti gli esseri viventi, è colonizzato da microrganismi che sono acquisiti durante la nascita e che nel corso della vita possono subire variazioni di qualità e quantità. Questi microrganismi rappresentano la popolazione microbica normalmente residente, ma che occasionalmente può essere costituita da altri microrganismi in transito. Il ruolo di questa popolazione è fondamentale per le difese dell'organismo. In particolare nei confronti dei batteri patogeni è:

- 1) in competizione per le sostanze nutrienti,
- 2) in competizione per i recettori sulle cellule,
- 3) produce batteriocine,
- 4) produce acidi grassi o altri metaboliti tossici per molti batteri,
- 5) stimola il sistema immune nella componente dei macrofagi e
- 6) nella produzione di immunoglobuline (IgA).

I pazienti ricoverati in ospedale sono spesso soggetti ad infezioni causate da microrganismi presenti in ambiente nosocomiale o appartenenti alla popolazione microbica dell'ospite. Questi individui rappresentano un facile bersaglio per i batteri a causa della debolezza dei naturali meccanismi di difesa, collegati alla loro malattia di base o perché a volte sottoposti a manovre invasive ed a trattamenti con farmaci in grado di alterare il microambiente di alcuni distretti dell'organismo. L'acquisizione di microrganismi da parte del paziente trova le sue origini nella capacità stessa del ceppo di aderire agli strati epiteliali e invadere i tessuti sottostanti, e nelle variazioni che subiscono le mucose dell'ospite affetto da malattia.

La capacità dei microrganismi di aderire agli epitelii è mediata da strutture specializzate dette adesine, riconosciute negli acidi lipoteicoici per i Gram-positivi e in speciali proteine spesso rappresentate da fimbrie o pili per i Gram-negativi.

Nell'individuo sano è presente sulla superficie delle cellule epiteliali una proteina, la *fibronectina*, con cui interagiscono stereo-specificamente le adesine dei batteri Gram-positivi, prevenendo così l'adesione dei Gram-negativi. La fibronectina è una glicoproteina prodotta dagli epatociti e distribuita in forma solubile in tutti i liquidi organici, viene secreta nelle cavità naturali dell'organismo dove si deposita sulla superficie delle mucose ed è inoltre presente nei tessuti dove forma un reticolo fibrillare. La fibronectina è coinvolta in alcuni processi biologici tra cui la

fagocitosi, la rigenerazione dei tessuti e nella differenziazione cellulare, ma soprattutto come già accennato gioca un ruolo fondamentale nell'adesione dei batteri alle mucose.

In conseguenza di varie affezioni, traumi, ustioni o insufficiente nutrizione, il tasso di fibronectina nel plasma si riduce e scompare dalla superficie delle cellule epiteliali. In questa situazione i batteri Gram-negativi trovano recettori non ancora completamente caratterizzati essenziali per colonizzare gli epiteli, mentre i batteri gram-positivi perdono la capacità di aderirvi.

La naturale presenza di fibronectina nelle ferite accidentali o causate da strumenti, così come sulla superficie di cateteri di varia natura, predispone alla colonizzazione di batteri Gram-positivi, in particolare Stafilococchi. A seconda delle situazioni, quindi, questa glicoproteina può rappresentare un fattore favorente l'adesività di cocchi gram-positivi sulle ferite e sui cateteri.

Il paziente sottoposto a terapia è un soggetto, che presenta un ecosistema alterato, con elevate possibilità di subire infezioni da parte dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi di origine sia esogena sia endogena. Gli interventi più opportuni per prevenire l'insorgenza di queste infezioni consistono nel controllo microbiologico dei siti di acquisizione (apparato respiratorio e urinario) al momento del ricovero e successivamente in modo periodico e nell'uso mirato degli antibiotici.

Adesività, proteine di superficie e chemiotassi di *C. difficile*

Dal momento in cui *C. difficile* è stato isolato da tessuto intestinale umano nel 1979 e da tessuto proveniente dall'intestino cieco del criceto nel 1984 [24, 26], diversi studi hanno cercato di confrontare la capacità di ceppi non tossinogenici non virulenti e di quelli moderatamente e/o altamente tossinogenici e virulenti di aderire a differenti regioni del tratto gastrointestinale [28]. Il meccanismo di colonizzazione dell'intestino da parte di *C. difficile* ed in particolare il processo di adesione alla mucosa, tuttavia, non è ancora stato interamente chiarito [183]. E' opportuno sottolineare, che ceppi tossinogenici hanno dimostrato una capacità più pronunciata nell'adesione alla mucosa intestinale. In uno studio condotto nel 2007 da Taha 19/20 ceppi umani e 6/6 ceppi di cavallo sono stati in grado di aderire in varia misura alle cellule intestinali. Non sorprende il fatto che i ceppi umani, quando esaminati su cellule intestinali di cavallo e Caco-2, hanno mostrato una migliore adesione alle cellule intestinali umane (Caco-2) piuttosto che a quelle di cavallo. D'altra parte, ceppi isolati da cavalli hanno dimostrato l'esatto contrario. Inoltre, uno dei ceppi umani, tossina A/B negativo, ha mostrato un legame alla mucosa intestinale leggermente meno stabile rispetto a quello di ceppi più virulenti senza tuttavia dimostrarne un rapporto statisticamente significativo.

Studi sull'interazione tra il batterio e la cellula ospite sono stati eseguiti per trovare eventuali fattori di adesione in *C. difficile*. Queste ricerche hanno permesso di scoprire la presenza di fimbrie in alcuni ceppi [27].

Anche se fimbrie o pili sono fattori di virulenza essenziali in molti batteri Gram-negativi, non sono stati trovati nella maggior parte dei batteri patogeni Gram-positivi e vi sono pochi dati non conclusivi sulla loro presenza in *C. difficile*. Questi studi segnalano la presenza di fimbrie in ceppi di *C. difficile* isolati da varie fonti, mettendo però in luce il fatto che solo poche cellule in una determinata popolazione di *C. difficile* posseggono fimbrie, mentre nella maggior parte dei casi vi è completa assenza delle fimbrie stesse. Inoltre, non è stata dimostrata alcuna correlazione tra la presenza di fimbrie e la capacità di produrre tossine e/o lo stato di malattia. Nello studio condotto da Taha, ad esempio, non sono state rilevate fimbrie sulla superficie cellulare di ceppi di *C. difficile* isolati durante la loro ricerca [183].

Tutto ciò fa quindi supporre che il processo di adesione *in vitro* di *C. difficile* a colture cellulari sia mediato da strutture cellulari (adesine) diverse dalle fimbrie [183]. Tuttavia, bisogna sottolineare come le condizioni di crescita utilizzate non sono considerate ideali per la produzione di fimbrie ed inoltre che si possono presentare *in vivo* pattern diversi di espressione.

Eveillard et al. [58] e Karjalainen et al. [97] hanno segnalato due proteine di superficie cellulare stimulate dal calore, che sembrano essere responsabili dell'adesione di *C. difficile* alla cultura di cellule tissutali. Inoltre, Walligora et al. [195] hanno caratterizzato molecole proteiche sulla superficie di *C. difficile* in grado di aderire a cellule in coltura. Altri ricercatori hanno scoperto che le proteine flagellari di *C. difficile* sono implicate nell'adesione alla mucosa dell'intestino di topo [184].

Il meccanismo di colonizzazione si suppone sia un processo a due fasi. I ceppi batterici di *C. difficile* sono inizialmente in grado di interagire con i microvilli apicali di cellule epiteliali intestinali e di cominciare a produrre le tossine A e B, che rompono le funzioni della barriera intestinale. Le cellule basali dell'epitelio intestinale diventano così accessibili e una grande quantità di batteri è in grado di interagire con i recettori attraverso le loro proteine di superficie. Inoltre, a mediare il legame dei batteri al tessuto ospite possono intervenire le adesine. I flagelli contribuiscono alla virulenza dei batteri attraverso la chemiotassi, portando così il maggior numero di cellule batteriche nella zona danneggiata.

Attualmente sono state caratterizzate alcune delle proteine di superficie di *C. difficile*: le proteine dello strato S, la flagellina FliC, la componente strutturale maggiore del filamento flagellare, la proteina flagellare cap FliD, e le proteine di parete cellulare Cwp66 e Cwp84. FliD ha dimostrato avere sia *in vitro* che *in vivo* proprietà adesive e, in particolare, ha dimostrato di giocare

un ruolo importante nel legame alla mucosa. Cwp66 è una proteina di superficie composta da due domini di struttura. Il dominio C-terminale (Cwp66-Cter), esposto alla superficie cellulare, è formato da motivi ripetuti ed è stato descritto come una adesina; il dominio N-terminale (Cwp66 - Nter), che mostra omologia con l'autolisina CwlB di *Bacillus subtilis*, si suppone ancorare *C. difficile* alla parete cellulare. Cwp84 è una proteina con attività proteolitica, che potrebbe avere un ruolo nel stimolare una risposta immune specifica in pazienti con CDAD [135].

Nel 1993 Mulligan et al. hanno dimostrato l'esistenza di una risposta immunitaria diretta anche nei confronti di queste proteine di superficie di *C. difficile* in pazienti colonizzati con il batterio [130]. In generale è stato osservato che il livello della risposta immunitaria dell'ospite alle tossine è correlato con la gravità della malattia con un conseguente effetto protettivo verso l'insorgenza di recidive della malattia stessa [110]. E' stato altresì dimostrato da Drudy et al. che anche un elevato livello di immunoglobulina M (IgM) contro le proteine dello strato S di *C. difficile* riducono il rischio di recidive di malattia associata a *C. difficile* [49]. Infine, Péchiné e collaboratori hanno messo in evidenza che i livelli di anticorpi contro FliC, FliD, e Cwp66-Nter erano significativamente più elevati in un gruppo di controllo rispetto ad un gruppo di pazienti con CDAD, suggerendo che queste proteine siano in grado di indurre una risposta immunitaria, svolgendo un importante ruolo nel meccanismo di difesa dell'ospite [134].

In conclusione, questi studi hanno dimostrato che, dopo la diagnosi di CDAD e almeno per le successive due settimane, sono rintracciabili nel siero dei pazienti anticorpi diretti contro le proteine di superficie di *C. difficile*, suggerendo che queste proteine siano fattori di virulenza. Inoltre, lo studio della loro variabilità genica e delle corrispondenti proteine, in combinazione con la loro immunogenicità e la risposta dell'ospite, aiuta ad identificare eventuali antigeni protettivi. Questi antigeni, da soli o in combinazione, potrebbero essere utilizzati per prevenire la colonizzazione intestinale da parte di *C. difficile*. Studi preliminari di potenziali modelli vaccinali sono, ad oggi, in fase di sperimentazione in animali [135].

Capsula

C. difficile richiede opsonizzazione perché si verifichi una fagocitosi significativa, suggerendo l'esistenza di un fattore anti-fagocitario sulla sua superficie cellulare [43]. La rimozione dei carboidrati della superficie cellulare non ha influenzato il grado di fagocitosi, suggerendo la possibilità che *C. difficile* possa avere una capsula polisaccaridica come è stato successivamente dimostrato da Davies e collaboratori [45]. La capsula è considerata per molti batteri un importante fattore di virulenza; la possibilità che anche *C. difficile* possa produrne una come altri Clostridi

patogeni, *C. perfringens* ad esempio, depone per un ulteriore fattore di virulenza a disposizione del batterio stesso.

Enzimi idrolitici

Poche ricerche sono state condotte sugli enzimi idrolitici di *C. difficile*. Uno studio svolto da Hafiz & Oakley [77] ha messo in evidenza come tutti i 21 ceppi da loro esaminati nello studio sono risultati positivi per un'attività ialuronidasi, anche se la quantità di enzima prodotta è risultata essere variabile. Popoff & Dodin [147], saggiando 25 ceppi provenienti da neonati, non hanno peraltro riscontrato alcuna attività neuraminidasi.

Steffen & Hentges [178], in uno studio di produzione di enzimi idrolitici da parte di anaerobi coinvolti in infezioni umane, hanno messo in evidenza una produzione da parte di un ceppo di *C. difficile* di ialuronidasi, condroitina-sulfatasi, gelatinasi e collagenasi, ma non di eparinasi, fibrinolisi, lecitinasi e lipasi.

Seddon e colleghi hanno intrapreso uno studio più dettagliato su enzimi idrolitici, che potessero essere coinvolti nel danno al tessuto connettivo [167]. È stato dimostrato che la maggior parte dei ceppi esaminati aveva attività ialuronidasi, condroitina-sulfatasi e eparinasi, anche se quest'ultima è risultata essere generalmente debole. Ceppi altamente virulenti sono risultati più attivi rispetto a ceppi meno virulenti. Inoltre è stata rilevata anche un'attività collagenasi, pur risultando più debole e limitata a ceppi altamente virulenti.

Tossine e *Locus* di patogenicità

La patogenicità di *C. difficile* si basa sull'azione di almeno una delle due grandi esotossine prodotte e secrete dal batterio stesso, denominate tossina A (TcdA) e tossina B (TcdB), che appartengono alla famiglia delle glicotossine [15, 96, 154, 180, 194].

Inoltre, una tossina con attività ADP-ribosiltransferasica actino-specifica, tossina binaria (CDT), è stata individuata ed identificata in alcuni ceppi di *C. difficile*, anche se il suo ruolo patogenetico non è ancora stato completamente chiarito.

Le tossine A e B sono codificate dai geni *tcdA* e *tcdB*, rispettivamente. Essi sono localizzati in un *locus* di 19,6 KB denominato *locus* di patogenicità (PaLoc). Tre ulteriori geni, *tcdC*, *tcdD* e *tcdE* che codificano per un regolatore negativo (*tcdC*) e uno positivo (*tcdD*), nonché per una proteina che facilita la secrezione delle due tossine (*tcdE*) sono localizzati in questo *locus* [78, 84, 117].

Variazioni nella struttura del PaLoc sono alla base della formazione di differenti tossinotipi. Ad oggi sono stati individuati 27 tossinotipi differenti (I-XXVII) [156, 157, 165, 185].

Tossine A e B

Le tossine A e B prodotte da *Clostridium difficile* sono comunemente note come enterotossina (tossina A) e citotossina (tossina B); questa terminologia è nata dalle osservazioni sul meccanismo d'azione delle due tossine: dalla dimostrazione di un accumulo di fluido nel modello animale sperimentale, che utilizza anse intestinali di coniglio, e dagli effetti citopatici in colture di monostrati cellulari di tessuto, rispettivamente.

Le modalità di azione sono simili; esse penetrano nella cellula mediante un meccanismo di endocitosi, colpiscono il citoscheletro di actina e sono responsabili della morte della cellula. Esse inoltre inducono la produzione del fattore α di necrosi tumorale (TNF α) e di interleuchina proinfiammatoria (Ils), che contribuiscono alla risposta immune e alla formazione della pseudomembrana [149].

Una caratteristica importante di queste due grandi tossine (tossina A, 308 kDa; tossina B, 269 kDa) è data dalla loro modularità. Esse sono infatti costituite da tre distinti domini [86, 192].

Il dominio N-terminale (aa 1-543), chiamato anche dominio "A" è di tipo catalitico e possiede la piena attività biologica [59, 82]. Il dominio C-terminale è formato da oligopeptidi ripetuti ed è deputato al legame tossina – recettore [63, 81, 186, 200]. Il dominio centrale rappresenta la parte più grande delle due proteine ed è caratterizzata da un piccolo tratto idrofobo

(aa 956-1128), che si pensa possa mediare l'inserimento nella membrana durante il processo di traslocazione.

Il dominio centrale di traslocazione ed il dominio di legame C-terminale sono classicamente definiti come una singola unità, denominata dominio "B" [96, 193]. In particolare, solo il dominio N-terminale "A" è traslocato nel citosol delle cellule bersaglio [140, 163]. Pertanto, una proteolisi controllata e limitata è una tappa essenziale nell'assorbimento delle tossine glicosilanti dei clostridi.

I bersagli intracellulari delle glicosiltransferasi batteriche sono piccole GTPasi della famiglia Rho [95], che comprende una famiglia di circa 20 proteine, che legano GTP. Le proteine Rho funzionano come interruttori molecolari e sono coinvolte in numerosi processi di segnalazione cellulare tra cui la regolazione del citoscheletro di actina, l'adesione, la migrazione e la polarità cellulare. Esse controllano anche le attività enzimatiche, la trascrizione genica, la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi [57].

Le tossine A e B catalizzano la mono-O-glicosilazione delle GTPasi Rho in residuo aminoacidico di treonina (Thr35/37), che è essenziale per lo svolgimento delle funzioni da parte delle GTPasi [95]. La glicosilazione blocca l'attivazione delle GTPasi Rho mediante i loro attivatori (fattori di scambio del nucleotide guanina, GEFs), inibendo l'interazione con i loro effettori (ad esempio le proteine chinasi), bloccando il loro ciclo membrana-citosol e favorendo il legame alla membrana. L'inibizione delle funzioni di Rho è data probabilmente dal blocco del sito attivo della GTPasi di Rho dovuto alla glicosilazione da parte delle tossine [72, 168, 190]. Ciò porta, tra l'altro, alla depolimerizzazione del citoscheletro di actina, all'arrotondamento cellulare ed, infine, all'apoptosi [96, 194].

Il dominio N-terminale biologicamente attivo, che è trasportato nel citosol, comprende i primi 543 aa [163]. La recente determinazione della struttura tridimensionale di questo frammento ha messo in luce il suo stretto legame con altre glicosiltransferasi batteriche appartenenti alla famiglia GT-A [152]. Il nucleo catalitico è costituito da 234 aa ed è formato da una struttura mista α/β con la maggioranza dei foglietti β disposti in posizione parallela così come avviene per la porzione centrale. I restanti 309 residui sono principalmente α eliche, di cui le prime quattro eliche N-terminali sono molto probabilmente coinvolte nel legame alla membrana, assicurando una stretta vicinanza dell'enzima ai suoi substrati. Caratteristico per i membri della famiglia GT-A è il motivo DXD coinvolto nella complessazione degli ioni manganese, dell'UDP e del glucosio. Mutazione di questi essenziali residui di aspartato portano all'inattivazione della tossina [36]. Il co-substrato per le glicosiltransferasi batteriche è UDP-glucosio; solo la tossina α di *Clostridium novyi* utilizza UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) [170]. Questa differenza di specificità del co-substrato è basata su ostacoli sterici di aminoacidi ingombranti (ad esempio Ile383/Gln385 nella tossina B), che

bloccano il sito catalitico per la più ingombrante UDPGlcNAc. Nella tossina α di *Clostridium novyi* piccoli residui di serina e alanina in posizioni specifiche consentono a UDP-GlcNAc di entrare nel sito catalitico [87]. Ancora poco si sa circa la struttura molecolare dei determinanti, che stanno alla base delle differenze nel riconoscimento di substrato da parte di diverse glicosiltransferasi. Un modello preliminare, basato su studi cristallografici, propone che le GTPasi si leghino alle glucosiltransferasi con la stessa regione consenso e in modo del tutto comparabile a quanto avviene normalmente quando si legano alle molecole effettrici [54, 85].

Il dominio C-terminale delle tossine A e B è formato da oligopeptidi ripetuti (regione CROPs) (figura 3), che sono coinvolti nel legame al recettore. La natura del recettore non è ancora stata individuata, ma ci sono suggerimenti per un ruolo di legame da parte di carboidrati della tossina. Studi recenti hanno dimostrato che il dominio C-terminale possiede una struttura a solenoide, composta da 7 grandi ripetizioni formate da 30 residui e 32 piccole ripetizioni composte da 15-21 residui. I grandi e piccoli peptidi ripetuti hanno un'unica struttura a forcina β formata da filamenti β antiparalleli composti da 5-6 residui. Le forcine β sono collegate da anse di 7-10 residui in piccole ripetizioni, e da 18 residui in lunghe ripetizioni. Ogni forcina è ruotata di 120° , con una conseguente struttura "screw-like". Tuttavia, poiché i residui aminoacidici identificati, coinvolti nei legami a carboidrati non sono conservati in tossine glicosilanti di altri clostridi, i recettori ancora sono da definire [73].

La parte centrale delle tossine occupa più del 50% del totale delle dimensioni, ma poco si sa sulle sue esatte funzioni. E' caratterizzata da un tratto idrofobico, che è molto probabilmente responsabile della penetrazione nella membrana [193]. Pertanto, questa regione può essere definita come "dominio di traslocazione". Studi di delezione hanno dimostrato l'importanza della regione idrofobica per l'attività della tossina [12]. Lo stesso lavoro indica anche un largo impatto sull'attività citotossica della proteina da parte dei residui specifici localizzati sia all'interno del dominio di traslocazione, ma anche al di fuori della regione idrofobica stessa. Per esempio, lo scambio di cisteina 698 a serina o di istidina 653 a glutamina nella tossina B riduce il titolo di citotossicità di circa il 90 o 99%, rispettivamente. E' stato quindi proposto, che alcuni residui possano essere coinvolti nell'assorbimento e nella processazione delle tossine [12].

Figura 3. Rappresentazione schematica dei domini delle tossine A e B.



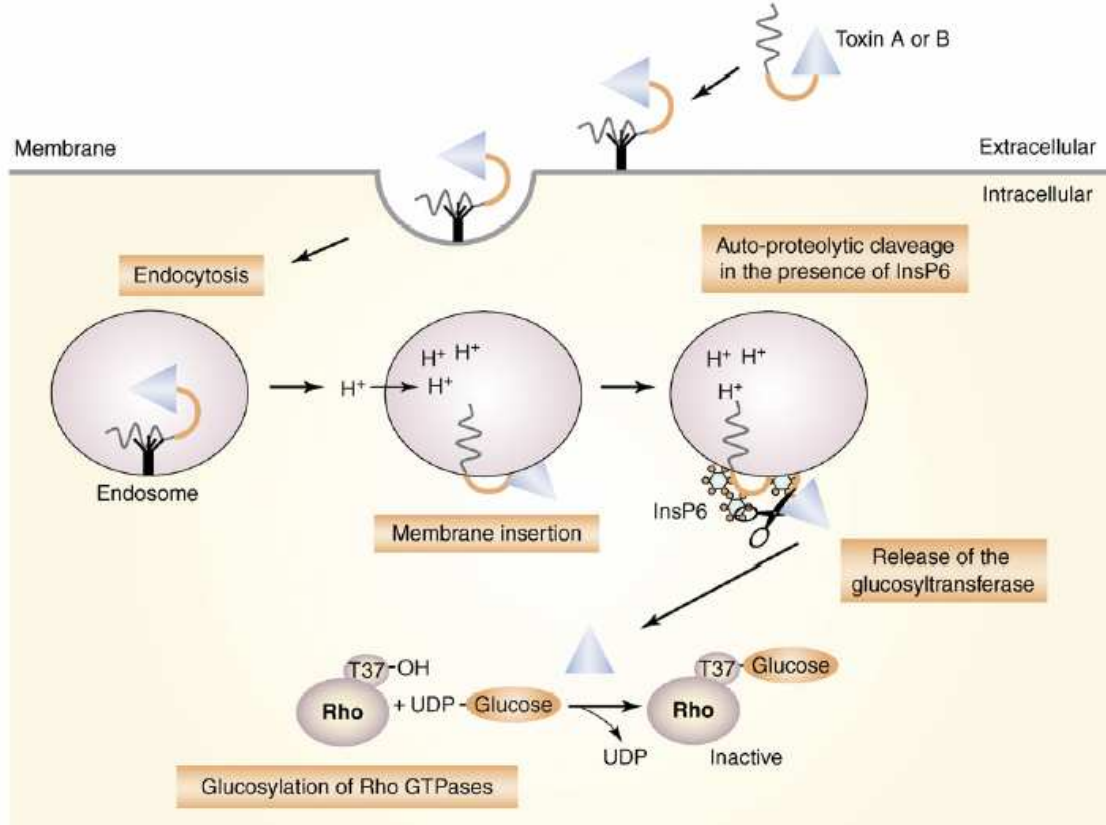
Tratta da "Processing of Clostridium difficile toxins" e modificata.

A seguito del legame al recettore (figura 4), le tossine vengono endocitate [61]; tuttavia il preciso processo di endocitosi non è noto. Dopo endocitosi, le tossine passano attraverso la membrana precoce endosomale nel citosol. Questo processo dipende dall'acidificazione degli endosomi mediante H^+ -ATPasi vescicolare. Bafilomicina, che blocca le H^+ -ATPasi, inibisce l'ingresso nel citosol delle tossine e l'intossicazione delle cellule [13].

L'esatto meccanismo del processo di traslocazione, tuttavia, rimane uno dei più enigmatici "puzzle" dell'azione di queste tossine. Recenti studi indicano che le tossine devono essere elaborate per poter raggiungere il citosol. Infatti, solo il dominio catalitico N-terminale di 543 amminoacidi è espresso nel citosol [140, 163].

La ricerca di un sito di possibile proteolisi, coinvolto nella trasformazione delle tossine, ha portato all'inaspettata constatazione che le tossine A e B sono trasformate mediante un processo di auto-proteolisi [151]. Ancora più sorprendente è il fatto che l'inositolo 6-fosfato (InsP6) è risultato essere un fattore essenziale per l'attivazione della proteolisi [151], tuttavia il suo ruolo funzionale non è chiaro. InsP6 potrebbe essere coinvolto nella stabilizzazione della conformazione della tossina, che è essenziale per l'attività proteolitica e/o della corretta scissione.

Figura 4. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione delle tossine A e B.

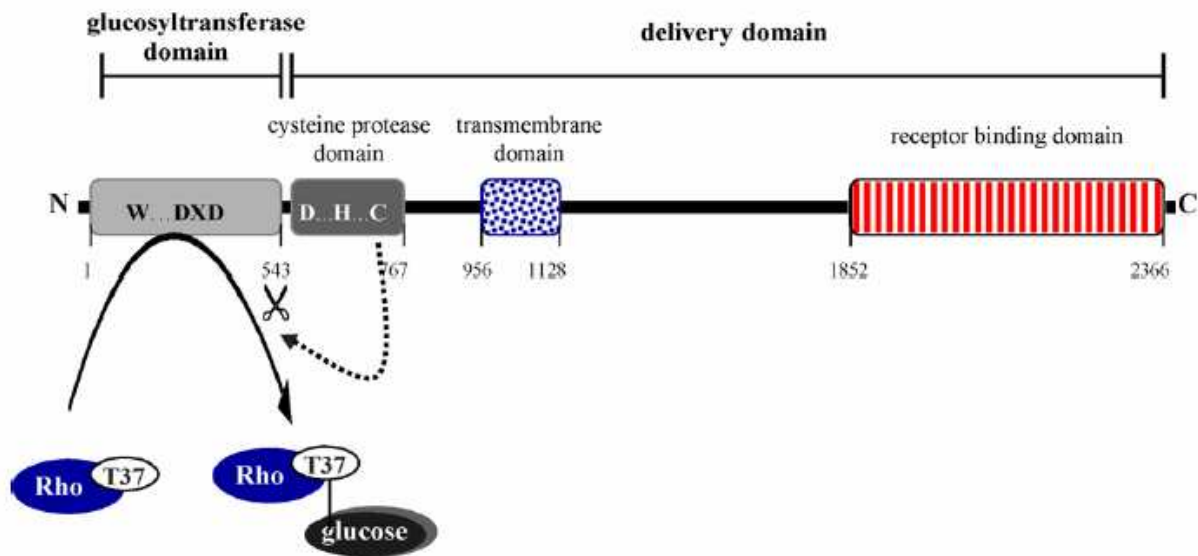


Tratta da "Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model" e modificata.

Recentemente è stato dimostrato che la tossina B possiede un'attività aspartato-proteasica, che è responsabile della scissione della tossina dal momento che l'inibitore della aspartato-proteasi EPNP (1,2-epossi-3-p-nitrofenossipropane) blocca la processazione della tossina B. Questo residuo è classificato come aspartato 1665 e fa parte di un breve Asp-Xaa-Gly (DXG) motivo osservato in molte aspartato-proteasi [151]. Un'altra ipotesi descrive un'attività cisteina-proteasica come responsabile della processazione delle tossine. Esistono diverse prove a sostegno di questa ipotesi. Primo, come osservato frequentemente per cisteina-proteasi, il ditiotreitolo attiva la scissione autocatalitica della tossina. In secondo luogo, l'attività autocatalitica è bloccata da N-ethylmaleimide, un tipico inibitore della cisteina-proteasi. In terzo luogo, le tossine di *C.difficile* presentano parti di sequenza simili con un motivo, recentemente identificato come dominio autocatalitico cisteina-proteasi all'interno della struttura della RTX (si ripete in tossine) della tossina del *Vibrio cholerae*. In aggiunta, diversi residui catalitici essenziali, tra cui la triade putativo catalitica D587, H653 e C698, risultano essere conservati[55, 171].

Secondo questo modello (figura 5), il dominio di taglio cisteina-proteasi, che è adiacente al dominio glicosiltransferasi, è responsabile della processazione della tossina.

Figura 5. Rappresentazione schematica del dominio di glicosilazione delle tossine A e B.



Tratta da “*Clostridium difficile* toxins: More than mere inhibitors of Rho proteins” e modificata.

Tossina binaria

Oltre alla produzione delle due tossine A e B, alcuni ceppi di *C. difficile* producono una terza tossina, nota come tossina binaria (CDT) [74, 138, 177].

Questa tossina è un ADP-ribosiltransferasi actino-specifica formata da due distinte subunità, denominate CDTa, che è la componente enzimatica, e CDTb, la componente di legame [14, 148]. Essa presenta un alto grado di somiglianza nella sequenza aminoacidica con la tossina iota di *Clostridium perfringens* tipo E, con la tossina di *Clostridium botulinum* tipo C e D, e con la tossina di *Clostridium spiroforme* [138].

Sebbene il suo ruolo nella patogenesi di CDAD è ancora da definire, studi recenti hanno dimostrato che la produzione di CDT è molto più diffusa in ceppi isolati da animali. Va comunque sottolineato che il ceppo endemico ipervirulento NAP1/027 produce questa terza tossina [108].

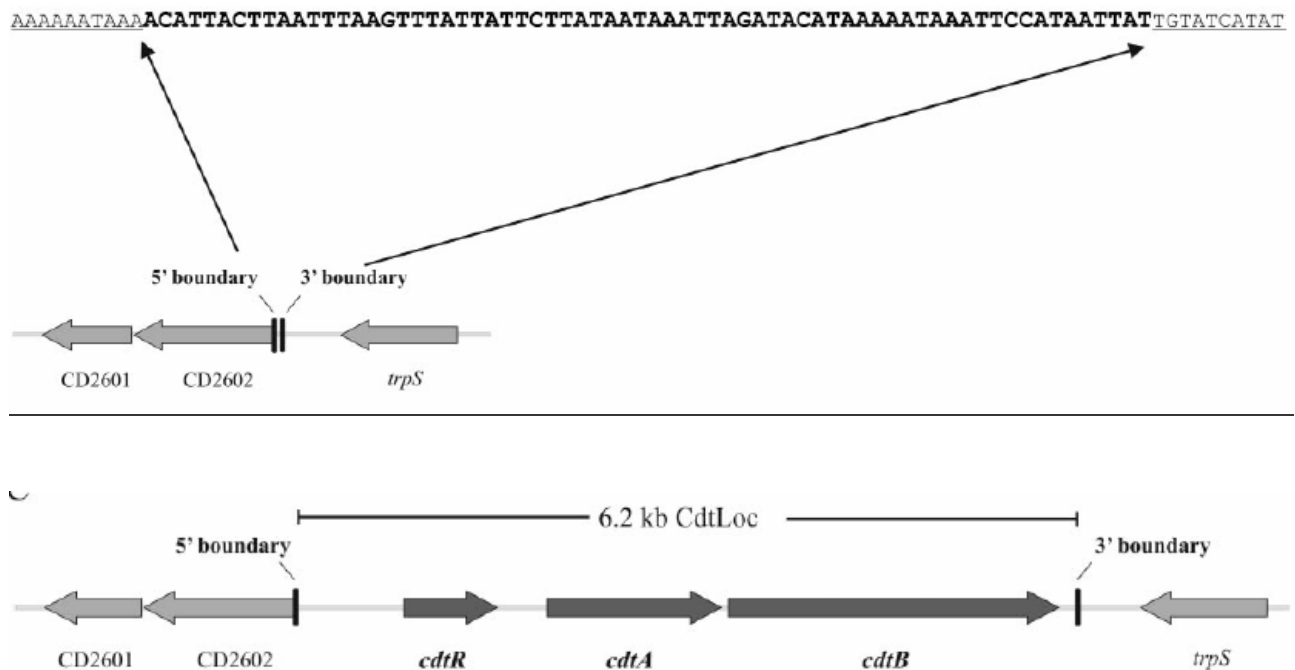
CDTb si lega a recettori cellulari ancora non identificati, favorendo l'internalizzazione della componente enzimatica nel citosol, dove CDTa catalizza l'ADP-ribosilazione dei monomeri di actina e la conseguente distruzione del citoscheletro [3, 172].

CDT è codificata a partire da due geni, *cdtA* e *cdtB*, che sono trascrizionalmente collegati e si trovano nel cromosoma di *C. difficile* in un luogo separato dal PaLoc [138]. A differenza di quanto avviene per le tossine A e B, pochi studi sono stati realizzati per esaminare la regolazione dell'espressione di questa tossina, che costituisce potenzialmente un importante fattore di virulenza.

Uno studio recente condotto da Carter e collaboratori ha riscontrato la presenza di un regolatore funzionale appartenente alla famiglia LytTR, che hanno chiamato CdtR, in grado di attivare la produzione di CDT in *C. difficile*. Inoltre, lo studio mostra che il gene *cdtR* e i geni

cdtA/B sono geneticamente collegati come parte del *locus* CDT (CdtLoc) (Figura 6). Infine, in ceppi CDT negativi è stata individuata una sequenza nucleotidica di 68 pb assente in ceppi isolati, che presentano il CdtLoc [38].

Figura 6. Rappresentazione schematica del *locus* CDT (CdtLoc).



Tratta da "Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator" e modificata.

I primi 43 aminoacidi N-terminali di CDTA e i primi 42 aminoacidi N-terminali di CDTb compongono un peptide segnale, che verrà tagliato. La massa molecolare delle proteine mature, dedotte dalla sequenza, è di 47,9 kDa per CDTA e 98,8 kDa per CDTb. La componente enzimatica CDTA è stata ulteriormente caratterizzata: la sua porzione N-terminale è coinvolta in interazioni con la componente di legame; la sua parte C-terminale possiede l'attività enzimatica [160].

C. difficile può produrre tre diverse tossine; utilizzando una loro combinazione possono essere differenziati cinque tipi di ceppi variamente produttori delle tossine stesse: A+B+CDT-, A+B+CDT+, A-B+CDT-, A-B+CDT+, A+B-CDT+, A-B-CDT+ e A-B-CDT-. La correlazione di alcuni tipi di produzione di tossine con la malattia non è ancora conosciuta. Il ceppo CD196, in cui la tossina binaria è stato originariamente descritta, è stato isolato da una giovane donna con colite pseudomembranosa (PMC); vari Autori suggeriscono che ceppi CDT-positivi possono provocare sintomi più gravi rispetto a ceppi CDT-negativi [148]. Tuttavia, i dati ottenuti su ceppi CDT+

dimostrano che essi possono essere isolati da pazienti, che presentano l'intero spettro di malattie tipiche di *C. difficile*, che vanno da lieve diarrea a PMC [67, 157, 161].

Va sottolineato come altre tossine binarie prodotte da differenti clostridi causano infezioni intestinali [37]; come ad esempio *C. perfringens* tipo E [139], o come *C. spiroforme*, dove la tossina binaria sembra essere il solo fattore di virulenza di questo batterio, che provoca gravi malattie intestinali nei conigli. Tuttavia un ceppo di *C. spiroforme* è stato descritto in un caso di diarrea in un'infezione umana [9, 37]. Per questo si ritiene che la tossina binaria di *C. difficile* potrebbe agire come un ulteriore fattore di virulenza.

Il gruppo di ceppi di *C. difficile* che producono solo CDT e non TcdA e TcdB (CDT+A-B-) risulta il più adatto per studiare il ruolo della tossina nella patogenesi. Purtroppo la prevalenza di tali ceppi è molto bassa e stimata intorno all' 1,9% [67].

I ceppi CDT+ A- B- possono essere suddivisi in due sottogruppi. Un sottogruppo (tossinotipo XI) ha ancora una porzione del gene *tcdA*, ma le tossine TcdA e TcdB non sono prodotte [159]. L'altro sottogruppo non presenta alcuna regione rilevabile del *locus* di patogenicità [67]. Va ricordato che sono stati isolati ceppi produttori della sola tossina binaria anche da pazienti sintomatici.

Gene regolatore positivo *tcdR*

Il gene *TcdR*, localizzato all'interno del PaLoc, presenta somiglianze con attivatori trascrizionali di diverse specie di *Clostridium* e con famiglie di fattori σ di RNA polimerasi trovate in molti organismi [117, 128]. Nel 1997 Moncrief et al., [128] lavorando con *E. coli*, fornirono per la prima volta evidenze sperimentali sul ruolo di regolatore positivo di TcdR nell'espressione dei geni codificanti le tossine A e B. Questi risultati sono stati confermati da esperimenti simili condotti su *C. perfringens* [117] e successivamente su *C. difficile* [118]. Evidenze genetiche e biochimiche hanno mostrato che TcdR funziona come fattore σ della RNA polimerasi. Questo fattore σ è indispensabile per l'inizio della trascrizione dai promotori *tcdA* e *tcdB* [117]. Inoltre, TcdR attiva anche la sua stessa espressione autoamplificandosi [118].

Proteine simili a TcdR sono state trovate in altri clostridi patogeni, quali *Clostridium botulinum* (BotR), *Clostridium tetani* (TetR) e *Clostridium perfringens* (UviA).

Tutte queste proteine agiscono come fattori σ alternativi, che sono indispensabili per la sintesi delle neurotossine botulinica e tetanica e di una batteriocina UV-inducibile in *C. perfringens* [52, 150].

Questi fattori σ clostridiali differiscono nella struttura e nella funzione da altri sottogruppi della famiglia σ^{70} tanto da essere assegnati ad un loro gruppo (gruppo 5). L'espressione di TcdR è influenzata dalla composizione del terreno, dalla temperatura di crescita e dalla fase di crescita cellulare, così come avviene per l'espressione dei geni delle tossine [99, 118]. Quindi l'attivazione dell'espressione di TcdR è il fattore scatenante per la trascrizione genica delle tossine. È interessante notare che lo stesso modello di espressione è osservato per tutti i geni del PaLoc fatta eccezione per *tcdC*, che è principalmente espresso nel corso della fase rapida di crescita esponenziale, mentre la sua espressione si spegne quando le cellule entrano nella fase di crescita stazionaria [84].

Gene regolatore negativo *tcdC*

TcdC, il cui gene è localizzato all'interno del PaLoc, svolge il ruolo di regolatore negativo nella produzione delle due principali tossine A e B [84]. L'emergere di ceppi che producono elevati livelli di tossine ha portato ad individuare soppressioni o mutazioni “frameshifts” all'interno del gene *tcdC*, rafforzando il suo ruolo di regolatore negativo [115, 196].

Il ruolo regolatore di TcdC è stato studiato per la prima volta *in vivo* mediante fusione del promotore del gene *tcdA* con il gene reporter *gusA*, che codifica per la β -glucuronidasi di *E. coli* [120]. L'espressione di TcdR (regolatore positivo) *in trans* attiva il promotore del gene *tcdA* con conseguente espressione del gene *gusA*. Tuttavia, quando TcdC è stato co-espresso con TcdR, l'attività del promotore è stata fortemente ridotta. Questa è stata la prima prova diretta che TcdC regola negativamente la trascrizione di *tcdA* [120].

TcdC è una proteina acida con una massa molecolare di 26 kDa [30]. Govind et al. (2006) [75] hanno recentemente dimostrato che TcdC è una proteina associata alla membrana, in accordo con la scoperta di un dominio transmembrana trovato nella regione N-terminale della proteina. Inoltre, TcdC si unisce per formare dei dimeri, in accordo con la presenza di un motivo “coiled-coil” trovato nella metà delle proteine TcdC esaminate [120].

Tuttavia, queste caratteristiche biochimiche non hanno definitivamente indicato in che modo TcdC potrebbe agire. Analisi della sua sequenza rivelano che TcdC non è simile a qualsiasi altra proteina regolatrice nota e non è stato individuato un dominio di legame al DNA.

Una delle ipotesi, basata sulle proprietà di TcdC, propone il funzionamento di TcdC come anti fattore σ . Gli anti fattori σ sono spesso proteine transmembrana, che regolano l'espressione genica attraverso la modulazione dell'attività di un fattore σ simile [35, 79].

Tuttavia, esistono numerosi differenti meccanismi attraverso i quali fattori σ e anti- σ possono interagire [1, 98, 127]. In generale, il principio di base è quello di sequestrare il fattore σ , impedendo così la formazione dell'oloenzima RNA polimerasi attivo (RNAP). Per esempio, in assenza di condizioni di stress, RseA, proteina transmembrana antagonista di *E. coli* σ^E , si lega a σ^E , inibendo la trascrizione del gene. Tuttavia, sotto stress la degradazione di RseA, che si verifica all'interno della membrana, favorisce il rilascio di σ^E precedentemente sequestrato [1]. Pertanto, σ^E è libero di formare un oloenzima attivo e di attivare la trascrizione di promotori σ^E -dipendenti.

La ricerca *in vitro* sull'inizio della trascrizione ha messo in evidenza come TcdR dirige RNAP, il sito attivo dell'enzima, a riconoscere il promotore ed iniziare la trascrizione di *tcdA*. Tuttavia, quando TcdR è preincubato con TcdC, prima dell'aggiunta del nucleo RNAP, la trascrizione di *tcdA* è inibita. Non esistono interazioni tra TcdC ed il promotore di *tcdA* come dimostrato mediante GMSA (gel mobility shift assays). Ciò è coerente con l'assenza di qualsiasi dominio di legame al DNA in TcdC e indica che TcdC deve inibire l'espressione dei geni delle tossine senza interagire direttamente con i loro promotori.

TcdC destabilizza il complesso TcdR-oloenzima legato al promotore di *tcdA*. L'aggiunta di TcdC durante la formazione del complesso TcdR più RNA polimerasi per formare l'oloenzima attivo diminuisce l'affinità dell'oloenzima per il promotore di *tcdA*. TcdC sembra così agire come interferente nella formazione del complesso oloenzima-Promotore di *tcdA*. Sia TcdR libero che legato all'oloenzima sono sensibili al TcdC. Al contrario, una volta formato il complesso stabile con il promotore *tcdA*, TcdC non può rompere il legame della RNA polimerasi con il promotore [120], suggerendo che TcdC agisce in una fase iniziale di inizio trascrizione.

Durante l'inizio della trascrizione, vi sono tre tappe principali: il legame tra il fattore σ ed il nucleo RNAP, il riconoscimento del promotore da parte dell'oloenzima attivo e la formazione del complesso aperto, seguita dalla formazione del primo legame fosfodiesterico (iniziazione) e dal processo di allungamento [71]. Alcuni studi hanno confermato che TcdR si lega al centro dell'RNAP e l'aggiunta di TcdC diminuisce l'associazione di TcdR con il nucleo RNAP; perciò TcdC sequestra TcdR nella forma di classico anti fattore σ [79].

È interessante notare che anche TcdC interagisce direttamente con l'RNAP, una proprietà non osservata con altri anti fattore σ . Non può essere quindi esclusa la possibilità che TcdC, interagisca direttamente con il nucleo RNAP, competendo con TcdR per il legame al nucleo RNAP e riducendo la stabilità del complesso TcdR-RNAP. [53].

Nonostante il fatto che TcdC è in grado di trattenere TcdR come dimostrato da Matamouros et al. nel 2007 [120], non è stato possibile dimostrare una diretta interazione tra TcdR e TcdC mediante analisi SPR (“surface plasmon resonance”).

Rimane ancora irrisolto il quesito su come TcdC inattivi o destabilizzi il complesso TcdR-RNAP prima della formazione del complesso aperto [120].

Gene *tcdE*

Il ruolo del TcdE non è ancora stato completamente chiarito. Sulla base della somiglianza con proteine “holin” di batteriofagi, si pensa che questa proteina possa svolgere una funzione di trasporto; la proteina TcdE è stata proposta essere un’importante fattore per il rilascio delle tossine A e B di *C. difficile* nell'ambiente [53]. Infatti, risultati preliminari mostrano che TcdE è in grado di completare uno fago λ privato delle sue proteine “holin” in *Escherichia coli* (B. Dupuy e M. Santos, dati non pubblicati)[53].

Variazioni nel PaLoc: Tossinotipo

Per lungo tempo, si è comunemente accettata la possibile distinzione tra ceppi di *C. difficile* tossinogenici, che producono entrambe le tossine (A+B+) e provocano la malattia, e ceppi non tossinogenici (A-B-), che non producono alcuna tossina e non provocano malattia.

Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che *C. difficile* è una specie molto eterogenea e che possono essere differenziati due tipi di varianti:

- ✓ **Ceppi varianti nei geni che codificano le tossine:**
definita come variante tossinotipica e caratterizzata da cambiamenti nei geni *tcdA* e *tcdB*.
- ✓ **Ceppi varianti nella produzione delle tossine:**
varianti, caratterizzate dalla produzione della sola tossina B o dalla produzione della tossina binaria CDT.

Come facilmente intuibile, vi è una grande sovrapposizione tra i tipi di varianti; ceppi varianti nella produzione delle tossine sono quasi sempre anche ceppi varianti nei geni che codificano per le tossine. Per queste ragioni vengono ad oggi adottati i termini “ceppo ordinario” per descrivere quei ceppi, che producono le tossine A e B (ma non CDT) e hanno un PaLoc identico a quello del ceppo di riferimento VPI 10463, in cui questa regione è stato sequenziata per prima, e “ceppo variante”, per descrivere eventuali ceppi che differiscono dal ceppo VPI 10463 sia nella sequenza del DNA nel PaLoc sia nella produzione delle tossine [164].

Il ceppo di riferimento VPI 10463 rappresenta il tossinotipo 0 (zero). Tutti i ceppi che differiscono da questo devono essere assegnati ad uno dei 27 tossinotipi varianti ad oggi conosciuti, denominati con numeri romani (I-XXVII). Queste varianti presentano cambiamenti nel PaLoc: inserzioni, delezioni e mutazioni puntiformi. E' interessante osservare, come i tre tipi di mutazioni sembrano prevalere in parti specifiche del PaLoc. Le delezioni sono localizzate per la maggior parte nel gene *tcdA* e fino ad oggi non è nota alcuna forma di delezione significativa a carico del gene *tcdB*. La ragione è data probabilmente dalla differenza nella regioni ripetute (CROPs) caratteristiche della regione 5' dei geni *tcdA* e *tcdB*. Non solo questa regione è più grande nel gene *tcdA* ma è costituita da 30 ripetizioni; le ripetizioni sono conservate e possono essere raggruppate in cinque classi sia a livello nucleotidico che a livello aminoacidico.

Nel gene *tcdB* sono presenti 24 ripetizioni e possono essere raggruppate in gruppi di omologia solo a livello aminoacidico [56]. La presenza di brevi tratti omologhi di DNA presenti nel gene *tcdA* probabilmente consente eventi di ricombinazione all'interno di questo gene con conseguente delezione o inserimento di frammenti ripetuti. Nel gene *tcdB*, le ripetizioni non sono conservate a livello nucleotidico e, pertanto, la ricombinazione non si verifica.

Al contrario, mutazioni puntiformi rilevate mediante prodotti PCR sono significativamente più comuni all'interno del gene *tcdB* rispetto al gene *tcdA*.

La maggior parte delle mutazioni di questo tipo sono presenti nella regione catalitica di entrambe le tossine.

Oltre ai due geni delle tossine, all'interno della PaLoc sono presenti i tre geni *tcdC*, *tcdR* e *tcdE*. Tra questi occorre segnalare come il gene *tcdC* sia molto variabile. Ad oggi sono stati individuati quattro tipi di delezioni presenti in diversi tossinotipi [175, 177]. Curry et al. nel 2007 hanno sequenziato il gene *tcdC* di 199 ceppi e hanno trovato 17 diversi genotipi. Molti di questi genotipi hanno mutazioni non senso o delezioni di nucleotidi che, a causa di "frameshifts", introducono una mutazione non senso. Il gene *tcdC* risulta essere notevolmente modificato anche nel tossinotipo X [173].

Inserimenti di lunghezza superiore ad un codone sono stati osservati anche a monte del gene *tcdR* (150 bp in diversi tossinotipi), e tra i geni *tcdB* e *tcdE* solo nel tossinotipo X [174], e nel gene *tcdA* nei tossinotipi XIV, XVII, XXII e XXIII [69, 126].

Alcuni tossinotipi varianti sono mutati solo in una parte dei geni delle tossine e sono definiti come tossinotipi minori (I, II, XII, XIII, XVIII - XX, XXIV). Di solito, l'unica differenza all'interno di tutto il PaLoc è una delezione o inserimento nel frammento A3. I tossinotipi minori sono per la maggior parte rappresentati da pochi ceppi conosciuti.

Nei casi in cui sono stati individuati più ceppi appartenenti a quel tossinotipo (come nel caso del tossinotipo I), i ceppi non risultano simili tra loro se saggiati con altri metodi di genotipizzazione.

Una interessante eccezione è data dal tossinotipo XII. Per definizione, appartiene ai tossinotipi minori perché le modifiche sono limitate solo ad una parte del gene *tcdA*. Al contrario, il tossinotipo XII presenta un frammento B1 modificato derivante da un gene *tcdB* mutato. Alcuni dei ceppi isolati, aventi tossinotipo XII, sono stati analizzati mediante altri metodi di tipizzazione e tutti sono risultati appartenere al sierogruppo S1 e al ribotipo 056.

Un altro tossinotipo minore (XXIV) presenta differenze dal tossinotipo 0 solo nel gene *tcdC*.

I tossinotipi principali mostrano cambiamenti in tutti e tre i frammenti di entrambi i geni codificanti le tossine. Mentre alcuni dei tossinotipi principali contengono solo un singolo rappresentante conosciuto, altri possono includere diverse centinaia di ceppi noti.

Tutti i ceppi appartenenti ad uno stesso tossinotipo producono lo stesso modello di tossine. Esistono poche eccezioni a questa regola:

- ✓ ceppi tossinotipo 0 con fenotipo A-B+CDT+ [93];
- ✓ ceppi tossinotipo V con fenotipo A-B+ [68];
- ✓ ceppi tossinotipo IX, con fenotipo A+B-CDT+.

Il fenotipo A+B- è già stato descritto in letteratura se pur sporadicamente [40, 198]. In alcuni casi, tuttavia, i ceppi sono stati chiamati A+B- perché con i primers e le condizioni usate non veniva amplificato il gene *tcdB*, ma non sono mai stati saggiati per la produzione della tossina B [40]. Pertanto, è molto probabile che questi ceppi avessero una forma variante del gene *tcdB* ed effettivamente appartenessero ad un tossinotipo variante conosciuto A+B+.

Di recente, in Canada sono stati segnalati ceppi che posseggono entrambi i geni delle tossine (saggiati con PCR), ma presentano una produzione carente della tossina B [115]. Questi ceppi risultano positivi a saggi commerciali per il rilevamento della sola tossina A e negativi su colture cellulari per il saggio di citotossicità.

Mediante tossinotyping, questi ceppi sono stati raggruppati nel tossinotipo IX, che di solito produce TcdA, TcdB e CDT. Al contrario, questo sottotipo del tossinotipo IX non è citotossico.

Ceppi di *C. difficile* con tossinotipo 0 presentano un fenotipo A+B+CDT-. Un identico fenotipo è stato trovato in quasi tutti i minori ed in alcuni principali tossinotipi varianti. La maggior parte delle principali varianti tossinotipiche risulta produttore anche della tossina binaria CDT (A+B+CDT+). È importante notare che la presenza di un CdtLoc intatto è correlata con varianti tossinotipiche. CDT, quindi, è prodotta quasi esclusivamente da ceppi con PaLoc alterato in modo

significativo, considerando che ceppi tossinotipo “0” o tossinotipi minori con lievi variazioni nel PaLoc difficilmente producono la tossina binaria [179]. Esistono, tuttavia, eccezioni a questa regola. Sono stati descritti ceppi che contengono geni *tcdA* e *tcdB* identici al tossinotipo 0, ma sono CDT positivi [175, 177]. L'unico cambiamento nel PaLoc è riscontrato nel gene *tcdC*; tali ceppi sono raggruppati nel tossinotipo XXIV [177]. Ceppi con fenotipo, A-B-CDT+ possono essere ulteriormente differenziati in due sottogruppi. Uno è caratterizzato dalla completa assenza del PaLoc, ma presenta i geni che codificano per CDT [68, 70]; l'altro (tossinotipo XI) possiede i geni per CDT intatti, ma ha un PaLoc troncato e quindi non funzionante. Mentre ceppi PaLoc-negativi, CDT-positivi sono molto rari, ceppi tossinotipo XI sono trovati regolarmente (tabella 1).

Tabella 1.

Tossine prodotte	Tossinotipo	Indicazioni molecolari
A+B+CDT-	0 TM: I, II, XII, XVIII, XIX, XX TP: XXI	CDT-: assenza di buona parte o dell'intero CDT locus.
A+B+CDT+	TM: III, IV, V, VI, VII, IX, XIV, XV, XII, XIII TP: XXIV	CDT+: presenza dell'intero CDT locus.
A-B+CDT-	VIII 0-like	A-: mutazione non senso in posizione 47 A-: meccanismo non conosciuto
A-B+CDT+	X XVI, XVII V-like	A-: riarrangiamento nel PaLoc e grossa delezione A-: meccanismo non conosciuto
A+B-CDT+	XI-like	A-: meccanismo non conosciuto
A-B-CDT+	XIa, XIb Ceppi senza PaLoc	A-B-: piccole modifiche non funzionali nel PaLoc A-B-: assenza del PaLoc
A-B-CDT-	Ceppi senza PaLoc e senza CDTlocus	Completa assenza dei geni <i>cdt</i> e <i>tcd</i>

Legenda:

TM: Tossinotipi minori

TP: Tossinotipi principali

I ceppi A- B- sono stati i primi ceppi varianti di *C. difficile* ad essere ben caratterizzati [29, 48, 114].

Attualmente esistono quattro varianti tossinotipiche con fenotipo A-B+: VIII, X, XVI e XVII (Tabella 2). Inoltre, un unico ceppo tossinotipo 0 [93] e un altro ceppo tossinotipo V [68] sono risultati avere un'espressione fenotipica delle tossine A-B+. Il tossinotipo VIII comprende più di 100 ceppi isolati ed è descritto in tutto il mondo. Al contrario, solo uno o due ceppi sono noti per gli altri tre tossinotipi A-B+.

EPIDEMIOLOGIA

C. difficile è responsabile fino al 20% dei casi di diarrea associata a terapia antibiotica (AAD) e di quasi tutti i casi di PMC [19, 103]. La maggior parte dei casi di diarrea associata a *C. difficile* (CDAD) è dovuta a recenti esposizioni ad agenti antimicrobici; tuttavia CDAD è stata rilevata anche in pazienti non esposti a terapia antibiotica, ma che presentavano insufficienza renale, diabete mellito o che avevano subito interventi chirurgici a livello intestinale [7, 16, 129]. Circa 3 milioni di casi di CDAD sono segnalati ogni anno tra i pazienti ricoverati nei soli ospedali statunitensi, rispetto ai circa 20.000 casi ambulatoriali [80, 91, 123, 146]. E' stato stimato che l'1-3% degli adulti sani sono normalmente colonizzati da *C. difficile*; al contrario il 5-15% degli adulti sottoposti a terapia antibiotica, pur non presentando diarrea, ospitano *C. difficile* tossinogenico [18, 60, 191].

Storicamente il 20% degli adulti ricoverati in ospedale sono colonizzati o acquisiscono *C. difficile* durante il ricovero, con conseguente CDAD di varia gravità che, secondo le stime, colpisce un terzo di questi pazienti [17, 60, 65, 103].

Casi di CDAD grave, che richiedono un intervento chirurgico o che portano a shock, megacolon e perforazione, o addirittura a morte, storicamente sono stati stimati nel 3% di tutti i casi.

Al di là dell'esposizione agli antibiotici, fattori di rischio per infezioni da *C. difficile* includono notoriamente età avanzata, chirurgia gastrointestinale, durata del soggiorno ospedaliero, l'uso di agenti antineoplastici, nutrizioni di tipo parenterale e l'uso di lassativi [7, 19, 103].

Uno studio osservazionale condotto da Pepin et al. [137] in Quebec, ha segnalato un aumento dell'incidenza di *C. difficile* da 35,6 per 100.000 persone nel 1991 a 56,3 per 100.000 persone nel 2003. La percentuale di casi gravi è aumentata dal 7,1% nel 1991 al 18,2% nel 2003 ($p < 0,001$) e la percentuale di pazienti morti entro 30 giorni dalla diagnosi è aumentata dal 4,7% nel 1991 al 13,8% nel 2003 ($p < 0,001$) [137].

È interessante notare come casi di CDAD attribuiti a ceppi A-B+, se pur sporadici, sono stati associati ad un tasso di mortalità più elevata (14% -66%) [4, 51, 69, 106, 142, 161, 188]. L'elevata mortalità associata a questi ceppi A-B+ può essere dovuta ad un eccesso di produzione di tossina B, che è una enterotossina molto potente, che produce almeno dieci volte più danni negli espianti di colon umano di quanto faccia la tossina A [153,166].

Infine, i casi di CDAD grave, sostenuti da ceppi tossinogenici, sono stimati intorno al 3% mentre quando è implicato il ceppo ipervirulento NAP1/ribotipo027 è stato osservato un aumento percentuale fino all'11%.

Studi osservazionali hanno dimostrato un aumentato tasso di contaminazione delle superfici nelle camere dei pazienti con CDAD (49%) rispetto ai portatori asintomatici (29%); pazienti in camere doppie hanno avuto tassi più elevati di infezione [11, 66, 116, 104, 191]. Studi accurati, mirati a possibili interventi preventivi e/o di contenimento, hanno dimostrato che l'uso regolare di guanti monouso, l'uso di termometri singoli, pulizia delle mani con clorexidina e pulizia ambientale con una soluzione di ipoclorito al 10% hanno notevolmente ridotto il tasso di acquisizione di CDAD [8, 34, 92, 103, 121].

Negli ultimi 5 anni, si è presentato un cambiamento nell'epidemiologia delle CDAD. Tra febbraio 2003 e giugno 2005, gravi CDAD sono state identificate in popolazioni che precedentemente venivano ritenute a basso rischio, quali ad esempio persone giovani con malattie di base non gravi, donne partorienti entro 4 settimane, pazienti non ricoverati in ospedale nei precedenti 3 mesi, molti dei quali non hanno avuto alcuna esposizione ad agenti antimicrobici [39]. Questo cambiamento è associato all'isolamento di un nuovo ceppo; sebbene la sua presenza oggi è stata segnalata in più parti nel mondo, la sua "nascita" è stata riscontrata in Nord America.

Questo nuovo ceppo denominato NAP1/ribotipo027, ormai ampiamente caratterizzato produce una maggiore quantità di tossine A e B *in vitro* e *in vivo* (la concentrazione della tossina B, *in vitro*, ad esempio, è 23 volte superiore rispetto al ceppo "wild-type" VPI 10463), presenta una delezione nel gene *tcdC* che potenzialmente incrementa la produzione delle tossine, produce la tossina binaria ed è resistente alle cefalosporine di terza generazione ed ai fluorochinoloni [2, 122, 196]. Tutti i ceppi isolati caratterizzati come NAP1/ribotipo027 sono risultati Tossinotipo III. Pazienti infetti con il ceppo NAP1/ribotipo027 tendono ad avere manifestazioni cliniche più gravi, pseudomembrane e leucocitosi [122]. Lo stesso ceppo emergente è stato responsabile dei focolai di CDAD, che nel corso del 2003 hanno interessato 12 ospedali in Quebec e 1703 pazienti. L'incidenza di CDAD è stata stimata intorno a 22,5 ogni 1.000 ricoverati e la mortalità entro i 30 giorni dalla diagnosi è stata del 6,9% [113]. Uno studio, condotto in Canada da Pepin et al. [136] tra il 2003 ed il 2004 su 293 pazienti ricoverati in ospedale con CDAD, ha messo in evidenza come più del 50% dei casi erano riferibili a pazienti di età superiore agli 80 anni e come la percentuale di mortalità entro i 30 giorni dalla diagnosi è stata del 21,8%. In questi casi, anche se cefalosporine, clindamicina, macrolidi penicilline sono stati considerati alti fattori di rischio per provocare CDAD ("adjusted hazard ratio" o "aHR" = 1,56-1,89), l'uso di fluorochinoloni è stato il fattore di rischio più significativo (aHR = 3,44) e la durata dell'uso di antibiotici è stato associato con un rischio maggiore di CDAD.

L'incidenza di CDAD, che varia in un intervallo di 0-15 casi ogni 100 pazienti ospedalizzati quando non è presente un focolaio endemico, aumenta a 16-20 casi ogni 100 pazienti nel corso di un "outbreak" [124].

L'incidenza di CDAD in pazienti ospedalizzati dipende dai tipi di pazienti, dall'uso di antibiotici e dalla presenza o assenza di un focolaio endemico. Negli Stati Uniti, l'incidenza di CDAD ha continuato ad aumentare dagli anni 1990, nonostante gli efficaci controlli delle infezioni e dei programmi di trattamento [124].

L'incidenza di CDAD in molti ospedali americani, canadesi ed europei è aumentata notevolmente dal 2003; in questi ultimi cinque anni si è registrato un aumento della frequenza di malattie gravi o fulminanti e CDAD ricorrenti [124].

Il ceppo predominante di *C. difficile*, isolato dai pazienti durante il focolaio nella provincia del Quebec, è stato un ceppo atipico BI/NAP1/027 (analisi con endonucleasi di restrizione [REA] gruppo BI, analisi mediante elettroforesi in campo pulsante [PFGE] tipo NAP1 [North American PFGE tipo 1] e reazione polimerasica a catena (PCR) ribotipo 027) [83, 109, 113, 115, 196].

Il ceppo BI/NAP1/027 è stato isolato per la prima volta nel 1984, ma in quegli anni era raramente isolato da pazienti. In aggiunta, il primo ceppo BI/NAP1/027 isolato non era resistente ai fluorochinoloni [122].

Il ceppo BI/NAP1/027 atipico è resistente ai fluorochinoloni, possiede i geni che codificano per la tossina binaria e possiede una mutazione sul gene che codifica per il regolatore negativo TcdC in posizione 117, che interferisce con la regolazione di TcdA e TcdB [162].

Ceppi con mutazioni nel gene, che codifica per TcdC, hanno dimostrato una produzione maggiore di 16 volte per TcdA e 23 volte per TcdB rispetto al ceppo di *C. difficile* VPI10463 [196]. Dal momento che i fluorochinoloni sono attualmente comunemente prescritti, lo sviluppo di resistenza in ceppi di *Clostridium difficile* è diventata una preoccupazione clinica. Questo ceppo atipico ipervirulento BI/NAP1/027 è stato isolato, oltre al Canada, negli Stati Uniti [122, 131] nel Regno Unito [108], in Olanda [107, 189], Belgio [47], Giappone [100] e Francia [182].

Inoltre, il ceppo ipervirulento BI/NAP1/027 è stato tipizzato nel 50% dei ceppi di *C. difficile* isolati in un focolaio in Pennsylvania (U.S.A.) [22], nel 74% in un focolaio in Francia [41] e nel 54% degli isolati in un focolaio epidemico nel Maine (U.S.A.) [102]. Allo stato attuale, sebbene il ceppo BI/NAP1/027 sia stato isolato anche in animali, quali ad esempio bovini, non vi è alcun elemento di prova per sostenere l'idea, che la sua trasmissione sia veicolata da alimenti [155].

Esistono ormai linee guida internazionali e studi, che ne hanno dimostrato la validità, che sostengono l'efficacia di diverse strategie nel controllo di focolai endemici dovuti a *C. difficile*. La prima strategia, che può essere utilizzata, ha come obiettivo l'interruzione delle vie di trasmissione

di *C. difficile* per mezzo dell'utilizzo di guanti monouso e dell'isolamento dei pazienti positivi per *C. difficile* o, qualora questo non fosse possibile, per mezzo di precauzioni nel contatto con il paziente stesso [23, 66, 92, 123]. Una seconda strategia, che può essere utilizzata, persegue la riduzione del rischio di esposizione alle spore di *C. difficile* mediante utilizzo di disinfettanti ambientali [125, 169] o di strumentazioni mediche monouso [88]. Una terza strategia prevede la riduzione del pool di pazienti potenzialmente a rischio, limitando l'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro [22, 44]. Un'ulteriore strategia è quella di ridurre il numero di casi infettivi mediante una diagnosi rapida ed un trattamento tempestivo ed efficace [124, 181]. Tuttavia, anche se alcuni episodi endemici vengono controllati mediante l'uso di un solo tipo di intervento, è ormai accettato universalmente che molti focolai necessitano, per essere controllati, di interventi multipli [8, 50, 133].

DIAGNOSI DI LABORATORIO

Dal momento in cui, più di 20 anni fa, *C. difficile* venne riconosciuto come causa di colite pseudomembranosa e di diarrea associata a terapia antibiotica (AAD), molti laboratori cominciarono ad usare come terreno selettivo cicloserina-cefoxitina-fruttosio-agar (CCFA) sviluppato da George e collaboratori come aiuto nella diagnostica *in vitro* di malattia associata a *C. difficile*. I batteri isolati erano presuntivamente identificati attraverso la loro colonia e la morfologia cellulare, il saggio di fluorescenza, il profilo degli acidi volatili ed altre caratteristiche fenotipiche. In aggiunta alla ricerca colturale di *C. difficile* veniva saggiata la presenza delle tossine del microrganismo mediante coltura tissutale con monostrati di cellule umane. L'identificazione delle tossine veniva confermata con antitossina contro *C. difficile*, resa disponibile dal Virginia Polytechnic Institute Anaerobe Laboratory (Blacksburg, Va., U.S.A.) o antitossina contro *C. sordellii*, che produce tossine cross-reagenti conosciute come tossina letale (LT) e tossina emorragica. La ricerca mediante coltura tissutale non era altamente standardizzata, i risultati dipendevano della linea cellulare utilizzata, dalla diluizione fecale e dall'interpretazione della citotossicità o dell'arrotondamento cellulare. A causa di tutto questo rimaneva senza risposta il quesito se il 25% delle cellule arrotondate dovesse essere considerato una reazione positiva [198].

Venti anni dopo, il saggio di citotossicità su coltura di tessuto è ancora utilizzato come aiuto nella diagnostica; al contrario, la coltura batterica nella maggioranza dei casi non lo è più. In generale, molti laboratori utilizzano ormai saggi immunologici, basati sull'uso di anticorpi, dal momento che offrono un alto rapporto costo-beneficio ed un risultato da poche ore a pochi minuti rispetto ai 2-5 giorni richiesti per la coltura batterica ed il saggio su coltura tissutale. In aggiunta, molti di questi saggi basati sull'uso di anticorpi sono più semplici e facili da applicare. Ad oggi sul mercato sono presenti molte dozzine di saggi commerciali basati sull'utilizzo di anticorpi per la diagnosi di *C. difficile*. Essi ricercano la sola tossina A o le tossine A e B contemporaneamente, oppure un antigene di superficie comune. Quest'ultimo antigene fu così denominato a seguito di studi effettuati nella metà degli anni '80, che dimostrarono che esso era comunemente prodotto sia da ceppi di *C. difficile* tossinogenici che non tossinogenici. L'antigene fu in realtà identificato come una glutammato-deidrogenasi (GDH) in base alla sua sequenza genica, alla sua omologia con gli altri enzimi GDH ed alla sua attività enzimatica. Il primo saggio diagnostico per *C. difficile*, basato sull'utilizzo di anticorpi introdotto sul mercato, "Rapid latex test for *C. difficile* toxin A" della ditta Culturette (Marion Scientific, Div. Marion Laboratories, Inc., Kansas City, Mo., USA), era in realtà un saggio di agglutinazione al lattice per la ricerca dell'antigene di superficie comune, come è stato dimostrato e pubblicato da Wilkins e Lyster nel 2003 [198].

Tutti i saggi, che permettono la ricerca *in vitro* di *C. difficile*, possono essere considerati importanti aiuti diagnostici per il medico curante. Data la significativa percentuale di pazienti portatori di *C. difficile* non tossinogenico e di pazienti asintomatici pur in presenza di ceppi tossinogenici, questi saggi non devono essere eseguiti da soli ed è importante una loro integrazione con la storia del paziente. Più del 50% dei neonati, per esempio, acquisiscono *C. difficile* tossinogenico nella nursery dell'ospedale; in qualche circostanza neonati asintomatici possono avere livelli di tossina comparabile a quella osservata in pazienti adulti con colite pseudomembranosa. In rari occasioni, CDAD può verificarsi in neonati compromessi (ad esempio in neonati prematuri che sono settici e che hanno ricevuto terapia antibiotica), ma ne sono stati riportati solo pochi casi isolati. In aggiunta ai neonati asintomatici, molti adulti ospedalizzati diventano portatori asintomatici dopo terapia antibiotica. Infatti, la percentuale di pazienti, che diventa portatore, può essere più alta rispetto al numero di pazienti che sviluppano severe diarree e coliti a seguito dell'infezione. Generalmente questi pazienti hanno un alto numero di microrganismi nel loro colon, ma il livello della tossina nelle loro feci è molto variabile. In generale i pazienti non affetti tendano ad essere giovani ed in buona salute [198].

La situazione è ulteriormente complicata dal fatto che il 20% circa dei pazienti, positivi per la GDH di *C. difficile*, sono portatori di ceppi di *C. difficile* non tossinogenici. I ceppi non tossinogenici non sono responsabili della diarrea poiché non producono tossine, ma questi pazienti devono essere monitorati attentamente sia perché sono suscettibili di infezione con un ceppo tossinogenico, sia perché possono essere presenti *in vivo* ceppi diversi contemporaneamente [198].

L'epidemiologia di un "outbreak" può essere monitorata solo attraverso l'esame colturale, ma questo è fatto raramente poiché le procedure sono lunghe (72 ore di incubazione in condizioni anaerobie) e costose. Anche quando viene fatta la coltura, l'accuratezza dei risultati varia fortemente tra i vari laboratori, poiché le tecnologie sofisticate per batteri anaerobi sono spesso assenti e i metodi di arricchimento e i terreni non sono standardizzati [198].

Sebbene l'indagine citotossica risulti lunga (48h per definire un campione negativo) e possa essere considerata tediosa (i campioni devono essere centrifugati e filtrati prima di essere saggiati), qualche laboratorio utilizza questo metodo perché molto sensibile. Il saggio rivela picogrammi delle tossine di *C. difficile* (principalmente la tossina B), e risulta il più sensibile tra quelli attualmente disponibili. Data la sua grande sensibilità, il saggio citotossico è spesso riconosciuto come "gold standard"; esso, comunque, è anche il saggio meno controllato e reazioni non specifiche sono comuni. L'aggiunta di troppo materiale fecale alla coltura tissutale, ad esempio, può causare reazioni false-positive. Gli attuali saggi commerciali raccomandano una diluizione finale, che oscilla tra 1:40 a 1:50, per minimizzare le possibilità di un arrotondamento cellulare non specifico. I

laboratori, che si avvalgono del saggio di citotossicità, utilizzano generalmente monostrati di colture tissutali umane commercialmente disponibili, ma utilizzano anche linee cellulari “fatte in casa”, che includono cellule K-1 dell’ovaio del porcellino d’India e cellule fibroblasti polmonari MRC-5. Ognuna di queste linee cellulari dà risultati affidabili quando le condizioni sono attentamente controllate e il tecnico è esperto, ma nella mani di un tecnico inesperto, il saggio su linee tissutali “fatte in casa” può risultare molto impreciso [198].

I saggi commerciali per la GDH di *C. difficile* sono disponibili da non più di 10 anni. GDH è un enzima essenziale ed è prodotto costitutivamente da tutti i ceppi di *C. difficile* sia tossinogenici sia non tossinogenici. Per questa ragione i saggi che ricercano la GDH non distinguono tra queste due tipologie di ceppi. Tuttavia, la GDH è considerata essere un buon indicatore nello “screening” per *C. difficile*, poiché l’enzima è prodotto in grande quantità e può essere ricercato direttamente nei campioni di feci [198].

I saggi commerciali per la ricerca della GDH richiedono un tempo di ricerca variabile tra i 15 e 45 minuti (a seconda del saggio utilizzato), altra ragione per la quale vengono utilizzati in molti laboratori [198].

Va sottolineato che l’antisiero contro la GDH di *C. difficile* di alcuni di questi saggi commerciali cross reagisce con la GDH di altri anaerobi, inclusi *C. sporogenes*, *P. anaerobius* e *C. botulinum* proteolitico. Esistono però attualmente sul mercato saggi, che hanno evitato questo potenziale rischio utilizzando anticorpi monoclonali specifici, che reagiscono solo con la GDH di *C. difficile*. La grande utilità di un saggio della GDH è il suo utilizzo per discriminare i campioni negativi e selezionare quelli destinati ad ulteriori approfondimenti. A causa della presenza frequente di ceppi non tossinogenici in pazienti con AAD, Wilkins et al. (2003) ritengono, che i saggi per l’antigene comune dovrebbero essere confermati con un’indagine per la ricerca delle tossine. Attraverso questo approccio, le infezioni da *C. difficile* tossinogenico possono essere confermate e l’esposizione dei pazienti a infezioni secondarie, a seguito di terapie non necessarie con metronidazolo o vancomicina, possono essere ridotte [198].

I saggi immunoenzimatici EIA o ELISA, che rilevano la tossina A, sono entrati sul mercato più di 10 anni fa. Essi esibiscono una sensibilità > 80% comparabile a quella della ricerca della citotossicità, che varia in un intervallo dell’85-95%. Sebbene la sensibilità è più bassa rispetto al saggio di citotossicità, la maggior rapidità di esecuzione, la maggior facilità di utilizzo, il fatto che siano meno costosi e più efficaci con molti campioni, hanno permesso a questi saggi di prevalere nei laboratori, che ricercano quotidianamente *C. difficile* [198].

Fino a poco tempo fa saggi immunoenzimatici, che ricercavano entrambe le tossine A e B erano considerati non necessari. La tossina A si era dimostrata essere una enterotossina molto

potente, che era capace di causare diarrea e danneggiare la mucosa intestinale; sembrava logico, quindi, utilizzare la sola tossina A come “marker” diagnostico. In aggiunta, solo un ceppo A-B+, CCUG 8864, era stato descritto quando comparve sul mercato il primo saggio immunoenzimatico, che rilevava la sola tossina A. Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato come la tossina B del ceppo 8864 sia più enterotossica rispetto ai tipici ceppi A+B+ [198].

Da allora alcuni gruppi di ricerca hanno iniziato ad identificare diversi ceppi A-B+ da pazienti con CDAD. In queste circostanze, non sono stati identificati altri enteropatogeni o tipici ceppi A+B+. Basandosi sui recenti dati, possono essere tratte numerose conclusioni sul significato clinico di ceppi di *C. difficile* A-B+. Per prima cosa, i ceppi A-B+ sono in grado di causare malattia, che può essere grave o fatale se non è diagnosticata e trattata prontamente. In secondo luogo, l'incidenza di ceppi isolati A-B+ è in costante aumento. In terzo luogo, analogamente ai tipici ceppi A+B+, questi ceppi sono in grado di diffondere e causare epidemie in ambienti chiusi. Infine questi ceppi, che possono causare CDAD, non sono rilevati da questi saggi non essendo in grado di reagire con saggi immunoenzimatici specifici contro la sola tossina A. Per queste ragioni diversi Autori suggeriscono l'utilizzo di saggi immunoenzimatici, che rilevano entrambe le tossine, ormai ampiamente diffusi in commercio. Non solo questi saggi, rivolti ad entrambe le tossine A e B, rivelano ceppi A-B+, ma risultano più sensibili per i campioni “borderline”, che contengono solo bassi livelli di tossina A. Anche i ceppi A-B+ producono la GDH e la loro presenza sarà rilevabile con i saggi commerciali che la ricercano [198].

L'assenza di reattività dei ceppi A-B+ con saggi immunoenzimatici specifici contro la tossina A può essere spiegata a livello molecolare. Ceppi A-B+ hanno il gene *tcdA* deletato, che provoca un'assenza di quella parte della tossina (specificatamente le unità ripetute immunodominanti, che comprendono la regione di legame CROP), che è riconosciuta normalmente dagli anticorpi usati nei saggi immunoenzimatici specifici contro la tossina A [198].

Inoltre sono stati isolati anche ceppi di *C. difficile*, che producono una tossina B aberrante e una completa tossina A funzionale ed infine sono stati riportati ceppi A+B- isolati da cavalli. Questa è la prova, che la presenza di vari sottogruppi sottintende l'esistenza di differenti tipi di tossina e che ognuna di queste può essere capace di infettare e/o di causare malattia in animali e uomini. I dati attuali indicano che questi ceppi atipici di *C. difficile* possono effettivamente essere rilevati nei campioni fecali con saggi, che ricercano entrambe le tossine e/o la GDH. Per queste ragioni, viene consigliato l'utilizzo di saggi immunoenzimatici che rilevano entrambe le tossine o come primo saggio o come saggi successivi per i campioni, che risultano positivi alla GDH [198]. Scegliere tra saggi rapidi per la ricerca della GDH o della tossina A è difficile. Il saggio per la GDH offre un alto valore predittivo negativo, ma, d'altra parte, non distingue la presenza di ceppi

tossinogenici o non tossinogenici nel campione di feci. Saggi rapidi per la ricerca delle tossine A e B offrono questo vantaggio, ma forniscono risultati falsi-negativi poiché di minore sensibilità [198].

Ad oggi la miglior diagnosi possibile di laboratorio di CDAD si basa sull'isolamento del batterio dal campione di feci mediante l'esame colturale e sul rilevamento della produzione delle tossine, che può avvenire attraverso l'evidenziazione dell'effetto citopatico del filtrato fecale su linee cellulari o con un saggio immunoenzimatico. La rivelazione della citotossina è richiesta da molti Autori specialmente negli USA per la diagnosi tradizionale, ma per ottenere un risultato ottimale sono necessari sia l'esame colturale sia la rilevazione delle tossine [46].

Sono da citare altri saggi indiretti, che aiutano nell'identificazione di *C. difficile*, quali: la gas-cromatografia diretta sul campione, che svela la presenza nel campione biologico di metaboliti caratteristici quali acido butirrico ed, in particolare, acido isocaproico ed il saggio di agglutinazione al lattice, che rivela la presenza della Glutammato-deidrogenasi (GDH) presumibilmente prodotta *in vivo* da *C. difficile*; questi saggi tuttavia da soli non sono sufficientemente sensibili e specifici e richiedono altri saggi aggiuntivi.

Per una diagnosi batteriologica ottimale dovrebbero essere analizzate solo feci liquide, a meno che non si tratti di uno studio epidemiologico. A causa della rapida perdita di attività citotossica dovrebbero essere analizzati solo campioni freschi e dovrebbero essere conservati a $\leq 4^{\circ}$ C nel caso in cui i saggi non possano essere eseguiti velocemente. Brazier, in uno studio pubblicato nel 1993, riporta una completa inattivazione in circa il 20% dei campioni inviati per posta [32].

Per quanto riguarda l'esame colturale viene ancora oggi proposto il terreno selettivo CCFA [64]. Gli agenti selettivi sono cicloserina ad una concentrazione di 500 mg/L e cefoxitina ad una concentrazione di 16 mg/L; queste concentrazioni in alcuni studi [112] sono state ridotte a 250 mg/L e 8 mg/L, rispettivamente. Originariamente nella formulazione del terreno era compreso anche il supplemento "egg-yolk", che può essere sostituito dal sangue. La preincubazione delle piastre in anaerobiosi può migliorare le possibilità di isolare il batterio; sono state proposte diverse modificazioni per aumentare la sensibilità dell'esame colturale specialmente in studi epidemiologici o nelle campionature ambientali. L'aggiunta di taurocolato di sodio nella misura di 1 g/L permette una migliore germinazione delle spore [199] ed è consigliata quando si analizzano campioni ambientali o quando l'esame colturale risulta negativo in presenza di esame citotossico positivo; anche il pretrattamento dei campioni di feci con shock termico o etanolico può essere usato per aumentare la sensibilità dell'esame colturale [25].

L'esame colturale è un metodo molto sensibile, ma non molto specifico in quanto consente l'isolamento anche di ceppi di *C. difficile* non tossinogenici. Il metodo è piuttosto lento, ma

permette di poter saggiare i ceppi isolati per studiare la loro tossinogenicità, che è l'unica via da percorrere in caso di investigazioni epidemiologiche [46].

L'identificazione definitiva avviene mediante la colorazione di Gram e l'utilizzo di saggi biochimici individuali e/o di pannelli specifici relativi a sistemi commerciali automatici per l'identificazione di batteri anaerobi [46].

Diversi studi hanno messo in evidenza come l'unione dell'esame colturale con la rilevazione della tossinogenicità può essere considerato il sistema più sensibile e specifico per arrivare a fare una diagnosi di CDAD; in questo modo l'esame colturale su terreno selettivo per *C. difficile* è seguito dalla determinazione della tossinogenicità del ceppo eventualmente isolato mediante l'esame citotossico o l'esame immunoenzimatico.

Per quanto riguarda i metodi molecolari impiegati nella diagnosi sono stati meno studiati rispetto a quelli utilizzati per la diagnosi di altre malattie infettive; questo è dovuto sia ai buoni risultati ottenuti con i metodi tradizionali, sia alla difficile applicazione dei metodi molecolari direttamente nei campioni fecali a causa della complessità dei metodi in particolare di estrazione, così come riportato da Kato et al., [101] che li rendono non applicabili in una diagnosi routinaria.

SCOPO

Clostridium difficile è un bacillo anaerobio, Gram-positivo, sporigeno, di forma rettangolare, responsabile di una malattia diarroica e/o di coliti di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa. I principali fattori di virulenza di *C. difficile* sono rappresentati da due tossine: la tossina A (TcdA, enterotossina) e la tossina B (TcdB, citotossina), codificate dai geni *tcdA* e *tcdB* localizzati nel *Locus* di patogenicità di *C. difficile* (PaLoc), dove si trovano anche i geni *tcdD* e *tcdC*, regolatori rispettivamente positivo e negativo per la produzione delle due tossine principali, nonché il gene *tcdE*, che facilita l'esocitosi delle due tossine stesse. Alcuni ceppi di *C. difficile* producono tossine A e B varianti in seguito a delezioni e/o mutazioni nella sequenza dei geni codificanti, *tcdA* e *tcdB*, localizzati nel PaLoc. Ad oggi sono stati identificati 27 tipi di varianti, denominate da I a XXVII.

Recentemente è stata dimostrata per alcuni ceppi di *C. difficile* la produzione di una terza tossina, una tossina binaria, composta da due diversi domini: una componente enzimatica denominata CDTa ed una componente di legame denominata CDTb [6]. Quest'ultima tossina è una ADP-ribosiltransferasi actino-specifica e catalizza la reazione di ADP-ribosilazione dei monomeri di actina portando ad una disorganizzazione del citoscheletro. Essa è sintetizzata a partire da due diversi geni, *cdtA* e *cdtB*, che sono localizzati fuori dal PaLoc. Tossine binarie, prodotte da altri Clostridi, sono state implicate in diverse patologie intestinali sia umane che animali. Per esempio, *C. perfringens* tipo E produce una tossina iota, che è stata indicata come fattore scatenante di enterotossiemie in animali; una tossina binaria è, inoltre, il solo fattore di virulenza identificato per *Clostridium spiroforme*, implicato in enteriti di conigli ed in un caso di colite nell'uomo [144].

La maggior parte dei ceppi di *C. difficile*, varianti per le tossine A e B, produce questa tossina binaria. La presenza di questi geni è pertanto considerata un buon indicatore per la rivelazione di ceppi varianti di *C. difficile* [143].

Numerosi episodi epidemici, con la segnalazione di un'incremento di morbilità e mortalità, sono stati associati alla comparsa di un nuovo ceppo ipervirulento, caratterizzato come PCR ribotipo 027/ tossinotipo III, a partire dal 2003 principalmente in Nord America, ma ora con crescente frequenza anche in Europa [6, 31]. Questo clone epidemico variante presenta una mutazione del gene *tcdC*, il regolatore negativo delle tossine A e B, che probabilmente determina la loro aumentata produzione.

Infatti, ceppi varianti di *C. difficile* A+B+, che presentano contemporaneamente i geni codificanti per la tossina binaria, studiati dal punto di vista molecolare hanno evidenziato parziali delezioni del gene *tcdC*. Questo gene, localizzato nel PaLoc, codifica per un repressore in grado di

inattivare il fattore σ (regolatore positivo), che viene prodotto dal gene *tcdD*, quest'ultimo anch'esso presente nel PaLoc [6, 176]. In particolare queste varianti, che presentano delezioni di 18, 36 o 39 pb nel gene *tcdC* determinano un'inattività del repressore prodotto dal gene stesso con un conseguente aumento della produzione delle tossine A e B e della virulenza dei ceppi. E' opportuno sottolineare, inoltre, che questi ceppi varianti di *C. difficile* presentano particolari resistenze ad antibiotici verso i quali fino ad ora erano ritenuti sensibili, come vancomicina e metronidazolo oltre a eritromicina, clindamicina e fluorochinoloni.

Batteri a diffusione nosocomiale ed, in particolare, *Clostridium difficile* rappresentano un grave problema per le strutture ospedaliere in relazione alla salute dei pazienti ricoverati, ma anche dal punto di vista economico. I laboratori di batteriologia anaerobica come il nostro della sezione di Microbiologia- dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio- Università degli Studi di Parma, che scelgono di completare la diagnosi di laboratorio di malattia da infezione associata a *C. difficile* (CDAD) con l'isolamento e l'identificazione dei ceppi, raggiungono contemporaneamente una più elevata efficienza diagnostica e possono procedere ulteriormente con indagini mirate a fini epidemiologici.

Il primo obiettivo, pertanto, della presente Tesi è necessariamente lo sviluppo di metodi molecolari di tipizzazione per fornire dati epidemiologici rapidi ed attendibili al fine di evitare e/o contenere il diffondersi di possibili epidemie nosocomiali. La messa a punto ed applicazione delle metodologie molecolari necessarie allo scopo verranno eseguite analizzando 438 ceppi di *C. difficile* isolati nel corso di setti anni (2000-2006) e conservati in collezione. In particolare, per caratterizzare la tossinogenicità dei ceppi verranno applicate le seguenti metodologie in ordine cronologico: una duplex PCR per la ricerca dei geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti per le tossine principali A e B di *C. difficile*, ed una PCR in grado di rilevare i geni *cdtA* e *cdtB* codificanti per la tossina binaria. Inoltre, la tipizzazione dei ceppi isolati a fini epidemiologici verrà raggiunta mediante "PCR-ribotyping".

Come ulteriore obiettivo ci si propone di approfondire lo studio molecolare dei ceppi di *C. difficile* risultati varianti *cdtA/B+* con l'analisi del PaLoc mediante "toxintyping" e successiva analisi del gene regolatore negativo *tcdC*, nonché con la verifica della loro sensibilità *in vitro* ad alcuni chemioantibiotici, fluorochinoloni in particolare come "marker" di patogenicità.

Da ultimo, allo scopo di stabilire una correlazione tra il ceppo batterico tossinogenico (ordinario e/o variante) e gravità della malattia verrà eseguita un'attenta disamina delle cartelle cliniche di 63 pazienti per la maggior parte coinvolti in due importanti episodi epidemici (sospettati su basi cliniche nel dicembre 2002-settembre 2003 ed in aprile-settembre 2006) utilizzando nella

valutazione il questionario elaborato e proposto dallo Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD) dell' European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici, campioni e pazienti

Sono stati studiati 438 ceppi di *Clostridium difficile*, isolati nell'arco di sette anni (2000-2006), da un totale di 6357 campioni fecali, provenienti da 2646 pazienti, ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Parma e/o Ambulatoriali, per i quali il medico curante aveva posto il quesito diagnostico di confermare attraverso le indagini di laboratorio il sospetto clinico di malattia da infezione associata a *C. difficile* (CDAD).

Al fine di stabilire una correlazione tra il ceppo batterico tossinogenico (ordinario e/o variante) e gravità della malattia sono state inoltre valutate le cartelle cliniche di 63 pazienti per la maggior parte coinvolti in due importanti episodi epidemici (dic. 2002-sett. 2003; apr.-sett. 2006) seguendo le indicazioni riportate nel questionario elaborato e proposto dallo Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD) dell' European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (allegato A).

Diagnosi rapida diretta sul campione: ricerca della Glutammato-deidrogenasi (GDH) e della tossina A

La ricerca della Glutammato-deidrogenasi (GDH) e della tossina A di *C. difficile* è stata eseguita sul campione fecale al suo arrivo in Laboratorio mediante il saggio immunoenzimatico Triage (Biosite, U.S.A.) seguendo le indicazioni della Ditta produttrice. Tuttavia, se il campione non poteva essere analizzato immediatamente, è stato possibile conservarlo per 24 ore ad una temperatura compresa tra i 2°-8°C. In caso di inevitabili ritardi più consistenti nell'esecuzione delle indagini, i campioni potevano venire congelati a -20°C.

Diagnosi batteriologica tradizionale: isolamento ed identificazione di *C. difficile*

Su tutti i campioni di feci sono state eseguite le sottodescritte tappe procedurali previste dal nostro protocollo interno:

- ✓ Esame colturale. Il campione è stato seminato contemporaneamente su terreno selettivo cefoxitina-cicloserina-fruttosio-agar (CCFA) (Kima, Italia), su Schaedler-agar ((Kima, Italia) ed in brodo Cooked Meat (Kima, Italia) utilizzato per aumentare la concentrazione

delle spore nel campione da sottoporre successivamente a shock termico, ottenendo un isolamento selettivo dei Clostridi presenti dopo arricchimento secondo le indicazioni del Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual [94].

- ✓ Isolamento di *C. difficile*. A partire dalla coltura, sviluppatasi dopo 48 ore di incubazione in cabina anaerobia Microflow Anaerobic System (M.D.M., InterMed, Inghilterra) e successivamente Bactron Anaerobic/Environmental Chamber (P.B.I. international, Milano, Italia), le colonie morfologicamente riferibili a *C. difficile* sono state sottocoltivate su una piastra di Schaedler agar e su una di agar sangue di cavallo al 10% (Kima, Italia) incubate, rispettivamente, in anaerobiosi ed in termostato con atmosfera arricchita dal 5%-10% di CO₂ per sottoporle al “saggio di aerotolleranza”.
- ✓ Identificazione biochimica di *C. difficile*. Sul batterio isolato in coltura pura si è proceduto all'identificazione biochimica mediante sistema rapido (Rapid ID32A bio-Mérieux, France) basato sulla ricerca di enzimi preesistenti nella cellula batterica che, non dipendendo da una loro induzione per l'attacco dei substrati, consentono una lettura dei risultati in 4 ore di incubazione a 37° C in termostato ad aria.

Conservazione dei ceppi

Dopo l'identificazione, i ceppi batterici di *C.difficile* isolati sono stati congelati a -80°C e conservati in collezione. E' stato adottato il metodo MicrobankTM (ProLab Diagnostics, USA), che prevede l'utilizzo di contenitori dotati di brodo di coltura e di palline di materiale poroso, che servono come supporto solido in grado di adsorbire la coltura batterica.

Caratterizzazione della tossinogenicità dei ceppi di *C. difficile*: ricerca dei geni *tcdA* e *tcdB*

Sono stati sottoposti a Duplex PCR per verificare la presenza nel *Locus* di patogenicità dei geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti per le due tossine principali A e B, 438 ceppi isolati nel periodo considerato. Sono stati amplificati un frammento del gene *tcdA* di 624-pb ed un frammento del gene *tcdB* di 412-pb mediante la metodica descritta da P. Spigaglia and P. Mastrantonio (2002) e da noi modificata nel corso dello studio [175].

Estrazione del DNA.

Una colonia di *C. difficile* è stata trasferita mediante ansa monouso in provetta tipo Eppendorf contenente 100 µl di acqua distillata sterile e sottoposta all'azione del vortex per separare in maniera ottimale le cellule batteriche nel liquido; la provetta è stata quindi inserita in bagnetto termostato a 99°C per 10 min. per poter rompere le cellule mediante il calore e quindi estrarre il DNA batterico.

La sospensione è stata centrifugata a 11000 g per 2 min. per far depositare sul fondo della provetta i detriti cellulari e utilizzare il sopranatante per le fasi di amplificazione. Il DNA estratto è stato conservato a – 80°C fino al momento dell'utilizzo.

Amplificazione.

I primers TA1, TA2 e TB1, TB2 utilizzati per l'amplificazione dei geni *tcdA* e *tcdB* sono stati tratti dal lavoro di Spigaglia P. e Mastrantonio P. [175] e sintetizzati dalla ditta Primm (San Raffaele Biomedical Science Park, Milano, Italia), seguendo le sequenze nucleotidiche sottodescritte.

<i>tcdA</i>	TA1	5' – ATG ATA AGG CAA CTT CAG TGG – 3'	21pb
	TA2	5' – TAA GTT CCT CCT GCT CCA TCA A – 3'	22pb
<i>tcdB</i>	TB1	5' – GAG CTG CTT CAA TTG GAG AGA – 3'	21pb
	TB2	5' – GTA ACC TAC TTT CAT AAC ACC AG– 3'	23pb

Il ceppo di riferimento (*C. difficile* VPI 10463) utilizzato nell'ambito della ricerca, avente tossinotipo A+B+, è stato gentilmente fornito dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma (I.S.S.) nel contesto della collaborazione scientifica con la prof.ssa Paola Mastrantonio e la dott.ssa Patrizia Spigaglia.

Sono riportati di seguito i parametri definitivi della miscela e del protocollo di amplificazione (Schema 1 e 2), da noi modificati rispetto al lavoro originario e utilizzati con successo. La miscela di reazione è stata sottoposta ad amplificazione in termociclatore Perkin Elmer Cetus 9600.

Schema 1

Miscela di amplificazione dei geni <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer TA1	10 pmol
Primer TA2	10 pmol
Primer TB1	5 pmol
Primer TB2	5 pmol
dNTP	200 µM
MgCl ₂	1,5 mM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto	5 µl

Schema 2

Protocollo di amplificazione	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 95°C	2 minuti
30 cicli a { 95°C 60°C 72°C	30 secondi 30 secondi 30 secondi
1 ciclo finale a 72°C	5 minuti

Rivelazione.

I prodotti di amplificazione (10 µl) sono stati mescolati con 1µl di tampone di corsa addizionato di 9 µl di acqua distillata sterile; questa sospensione è stata caricata su gel di agaroso all'1% in tampone TAE 1X (tampone TAE 1X: Tris 40 mM, acido acetico 40mM ed EDTA 1 mM, pH 8,3) colorato con 5 µl di bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è stata eseguita per 30 min. con un voltaggio pari a 120 Volts.

Il ceppo VPI 10463 è stato utilizzato come controllo positivo.

Caratterizzazione della tossinogenicità dei ceppi di *C. difficile*: ricerca dei geni *cdtA* e *cdtB*

Sono stati sottoposti a PCR, per verificare la presenza dei geni *cdtA* e *cdtB* codificanti per le due componenti della tossina binaria (CDT), 438 ceppi isolati nel periodo considerato. Sono stati amplificati un frammento del gene *cdtA* di 375-pb ed un frammento del gene *cdtB* di 520-pb mediante la metodica descritta da Stubbs et al. (2004) e da noi modificata nel corso dello studio.

Estrazione del DNA.

Una colonia di *C. difficile* è stata trasferita mediante ansa monouso in provetta tipo Eppendorf contenente 100 µl di acqua distillata sterile e sottoposta all'azione del vortex per separare in maniera ottimale le cellule batteriche nel liquido; la provetta è stata quindi inserita in

bagnetto termostato a 99°C per 10 min. per poter rompere le cellule mediante il calore e quindi estrarre il DNA batterico.

La sospensione è stata centrifugata a 11000 g per 2 min. per far depositare sul fondo della provetta i detriti cellulari e utilizzare il soprannatante per le fasi di amplificazione. Il DNA estratto è stato conservato a – 80°C fino al momento dell'utilizzo.

Amplificazione.

I primers cdtApos, cdtArev e cdtBpos, cdtBrev, utilizzati per l'amplificazione dei geni *cdtA* e *cdtB* codificanti per le due componenti della tossina binaria, sono stati tratti dal lavoro di S. Stubbs., M. Rupnik et. al. [179] e sintetizzati dalla ditta Primm, seguendo le sequenze nucleotidiche sottodescritte.

<i>cdtA</i>	cdtApos	5' – TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG – 3'	20pb
	cdtArev	5' – AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG – 3'	23pb
<i>cdtB</i>	cdtBpos	5' – CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G – 3'	22pb
	cdtBrev	5' – AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC – 3'	21pb

Il ceppo di riferimento (*C. difficile* 51377) utilizzato nell'ambito della ricerca, avente tossinotipo A+B+CDT+, è stato gentilmente fornito dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma (I.S.S.) nel contesto di una collaborazione scientifica con la prof.ssa Paola Mastrantonio e la dott.ssa Patrizia Spigaglia.

Sono riportati negli schemi operativi, di seguito, i parametri definitivi delle miscele di amplificazione dei geni *cdtA* e *cdtB* e del protocollo di amplificazione, da noi ampiamente modificati rispetto al lavoro originario e utilizzati con successo (Schema 3, 4, 5)

La miscela di reazione è stata sottoposta ad amplificazione in termociclatore Perkin Elmer Cetus 9600.

Schema 3

Miscela di amplificazione del gene <i>cdtA</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer cdtApos	0,3 µM
Primer cdtArev	0,3 µM
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 4

Miscela di amplificazione del gene <i>cdtB</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer cdtBpos	0,4 µM
Primer cdtBrev	0,4 µM
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 5

Protocollo di amplificazione	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 95°C	2 minuti
30 cicli a $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 52^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	1 minuto 1 minuto 1 min 20 sec
1 ciclo finale a 72°C	5 minuti

Rivelazione.

Dieci µl di ciascun prodotto di amplificazione sono stati mescolati con 1µl di tampone di corsa addizionato di 9 µl di acqua distillata sterile; questa sospensione è stata caricata su gel di agaroso all'1% in tampone TAE 1X (tampone TAE 1X: Tris 40 mM, acido acetico 40mM ed EDTA 1 mM, pH 8,3) colorato con 5 µl di bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è stata eseguita per 30 min. con un voltaggio pari a 120 Volts.

Il ceppo CD5177 (descritto da Rupnik nel sito www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/) è stato utilizzato come controllo positivo.

Verifica della produzione della tossina A *in vitro*

I ceppi di *C. difficile*, che presentavano i geni *cdtA* e *cdtB*, nonché i ceppi che presentavano una discrepanza di risultato tra la ricerca diretta nel campione fecale della tossina A e del suo gene

nel ceppo mediante PCR, sono stati sottoposti alla ricerca *in vitro* della tossina A stessa mediante saggio immunoenzimatico Triage.

I ceppi di *C. difficile* cresciuti su piastra di Schaedler agar sono stati subcoltivati in Cooked Meat Broth ed incubati in anaerobiosi. Dopo 72 ore di incubazione, 100 µl di terreno liquido contenente la coltura del ceppo di *C. difficile* sono stati usati per eseguire il saggio immunoenzimatico, seguendo le tappe procedurali analoghe a quelle utilizzate per la ricerca della tossina A direttamente nel campione fecale.

Tipizzazione molecolare dei ceppi di *C. difficile* – PCR-Ribotyping

Sono stati tipizzati mediante PCR-ribotyping tutti i 438 ceppi di *C. difficile* isolati nei 7 anni presi in considerazione. La metodica utilizzata è quella riportata da Bidet et al. [21].

Estrazione del DNA

Due o tre colonie del ceppo di *C. difficile*, isolato da materiale biologico, cresciute in Schaedler agar sono state prelevate con un'ansa monouso e sono state stemperate in una provetta tipo Eppendorf contenente 100 µl di acqua distillata; le provette sono state tenute per 10 min. a 100°C e successivamente sono state sottoposte a centrifugazione per 2 min. a 11000 g in centrifuga per eliminare i detriti cellulari. Il surnatante, contenente il DNA di *C. difficile*, è stato trasferito in una nuova provetta Eppendorf.

Amplificazione.

I primers RtFR1 e RtFR2 utilizzati sono stati tratti dal lavoro di Bidet et al. [21] e sintetizzati dalla ditta Primm, seguendo le sequenze nucleotidiche sottodescritte.

RtFR1	5' – GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT – 3'	20pb
RtFR2	5' – CCC TGC ACC CTT AAT AAC TTG ACC – 3'	24pb

Durante questa analisi è stato utilizzato come riferimento il ceppo di *Clostridium difficile* ribotipo 027/NAP1, che è stato gentilmente fornito dall'I.S.S. di Roma, ritenuto tra i più virulenti conosciuti fino ad oggi per escluderne la sua eventuale circolazione nel nostro ambiente.

Di seguito negli schemi operativi sono riportati i parametri della miscela e del protocollo di amplificazione (Schema 6 e 7) secondo le indicazioni fornite da Bidet et al. [21].

La miscela di reazione è stata sottoposta ad amplificazione in termociclatore Perkin Elmer Cetus 9600 e/o GeneAmp PCR System 9700.

Schema 6

Miscela di amplificazione	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer RtFR1	10 pmol/ µL
Primer RtFR2	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 7

Protocollo di amplificazione	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 95°C	6 minuti
30 cicli a $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 57^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	1 minuto 1 minuto 2 minuti
1 ciclo finale a 72°C	7 minuti

Rivelazione

Dieci µl di ciascun amplificato sono stati mescolati con 1 µl di tampone di corsa addizionato di 9 µl di acqua distillata sterile e successivamente sono stati caricati su gel di agarosio al 3% in tampone TAE 1X, precolorato con bromuro di etidio, per una corsa di 5 ore a 85 V.

I ceppi risultati discrepanti di una sola banda sono stati assegnati allo stesso ribotipo, seguendo i criteri internazionalmente accettati [21].

Analisi molecolare del *Locus* di patogenicità – Toxinotyping

Sono stati analizzati mediante toxinotyping 43 ceppi di *C. difficile*, selezionati in base alla presenza dei geni *cdtA* e *cdtB*, in base al ribotipo ed in base all'appartenenza allo stesso paziente.

Estrazione del DNA

Il genoma dei 43 ceppi di *C. difficile* sottoposti a “toxinotyping” è stato estratto e purificato mediante Kit di estrazione NucleoBond (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Amplificazione

I primers A3C, A4N e B1C, B2N utilizzati in questo studio sono stati descritti da Rupnik et al. [158] e sintetizzati dalla ditta Primm, seguendo le sequenze nucleotidiche sottodescritte. Con i primers A3C ed A4N è stata eseguita l'analisi del gene codificante per la tossina A e con i primers B1C e B2N l'analisi del gene codificante per la tossina B.

<i>tcdA</i>	A3C	5' –TAT TGA TAG CAC CTG ATT TAT ATA CAA G– 3'	28pb
	A4N	5' –TTA TCA AAC ATA TAT TTT AGC CAT ATA TC– 3'	29pb
<i>tcdB</i>	B1C	5' –AGA AAA TTT TAT GAG TTT AGT TAA TAG AAA– 3'	30pb
	B2N	5' –CAG ATA ATG TAG GAA GTA AGT CTA TAG– 3'	27pb

L'amplificazione dei geni, codificanti rispettivamente per le tossine A e B, è stata condotta separatamente con un' unica variante rappresentata nelle due miscele dal tipo di primer utilizzato. I parametri operativi sono riportati di seguito (Schema 8, 9, 10, 11) e le condizioni utilizzate sono quelle descritte da Spigaglia P. e Mastrantonio P [175]. La miscela di reazione è stata sottoposta ad amplificazione in termociclatore GeneAmp PCR System 9700.

Schema 8

Miscela di amplificazione <i>tcdA</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer A3C	10 pmol/ µL
Primer A4N	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto con kit	2 µl

Schema 9

Miscela di amplificazione <i>tcdB</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer B1C	10 pmol/ µL
Primer B2N	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto con kit	2 µl

Schema 10

Protocollo di amplificazione <i>tcdA</i>	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 94°C	4 minuti
35 cicli a { 94°C 50°C 72°C	1 minuto 1 minuto 4 minuti
1 ciclo finale a 72°C	10 minuti

Schema 11

Protocollo di amplificazione <i>tcdB</i>	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 94°C	4 minuti
35 cicli a { 94°C 55°C 72°C	30 secondi 30 secondi 3 minuti
1 ciclo finale a 72°C	10 minuti

Purificazione dell'amplificato

L'amplificato ottenuto è stato fatto correre su gel di agarosio all'1% e purificato mediante il Kit NucleoSpin Extract II (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Analisi di restrizione

Il prodotto, purificato da residui della mix PCR e da eventuali bande aspecifiche, è stato sottoposto ad analisi di restrizione. In particolare, per quanto concerne il frammento B1 (amplificato con i primers B1C e B2N) l'analisi di restrizione è stata eseguita con gli enzimi AccI e HincII, mentre per il frammento A3 (amplificato con i primers A3C ed A4N) l'analisi di restrizione è stata eseguita con l'enzima EcoRI. La digestione dei frammenti è stata eseguita in bagnetto termostato a 37°C "overnight". Di seguito sono riportati i parametri di digestione dei frammenti A3 e B1 (Schema 12 e 13).

Schema12

Frammento A3	
Enzima EcoRI	
DNA eluito	15 µl
Enzima EcoRI	6 µl
Soluzione tampone	3,5 µl
Tampone eluizione	10,5 µl

Schema 13

Frammento B1			
Enzima AccI		Enzima HincII	
DNA eluito	11 µl	DNA eluito	11 µl
Enzima	4 µl	Enzima	4 µl
Soluzione tampone	3,5 µl	Soluzione tampone	3,5 µl
Tampone eluizione	16,5 µl	Tampone eluizione	16,15 µl
		BSA	0,35 µl

Il prodotto, ottenuto in seguito all'analisi di restrizione, è stato interamente caricato con l'aggiunta di 1 µl di tampone di corsa su gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE 1X, precolorato con bromuro di etidio, per una corsa di 3 ore a 90 V.

I patterns ottenuti sono stati confrontati con quelli di riferimento pubblicati da Rupnik M. e presenti sul sito internet www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/

Analisi molecolare del *Locus* di patogenicità – Analisi del gene regolatore negativo *tcdC*

E' stato analizzato il gene regolatore negativo *tcdC* dei 43 ceppi di *C. difficile*, precedentemente selezionati in base alla presenza dei geni *cdtA* e *cdtB*, in base al ribotipo ed in base all'appartenenza allo stesso paziente.

Estrazione del DNA

Il genoma dei 43 ceppi di *C. difficile* è stato estratto e purificato mediante Kit di estrazione NucleoBond (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Amplificazione

I primers utilizzati C1, C2 Tim2 e Struppi2 sono stati tratti dal lavoro di Spigaglia e Mastrantonio [175] e sintetizzati dalla ditta Primm, seguendo le sequenze nucleotidiche sottodescritte.

C1	5' -TTA ATT AAT TTT CTC TAC AGC TAT CC- 3'	26pb
C2	5' -TCT AAT AAA AGG GAG ATT GTA TTA TG- 3'	26pb
Tim2	5' -GCA CCT CAT CAC CAT CTT CAA- 3'	21pb
Struppi2	5' -TCT AAT AAA AGG GAG ATT GTA TTA TG- 3'	26pb

I ceppi di riferimento A+B+CDT+ (*C. difficile* 51377 e VPI 10463) utilizzati nell'ambito di questa indagine presentano, rispettivamente, una delezione di 36 pb e nessuna delezione.

Di seguito sono riportati i parametri operativi delle miscele e dei protocolli di amplificazione del gene *tcdC* codificante per l'enzima regolatore negativo, relativamente all'utilizzo dei primers C1, C2 (Schema 14 e 15) e Tim2, Struppi2 (Schema 16 e 17)

Schema 14

Miscela di amplificazione <i>tcdC</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer C1	10 pmol/ µL
Primer C2	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 15

Protocollo di amplificazione <i>tcdC</i>	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 94°C	5 minuti
30 cicli a { 94°C 50°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuti
1 ciclo finale a 72°C	7 minuti

Schema 16

Miscela di amplificazione <i>tcdC</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer Tim2	10 pmol/ µL
Primer Struppi2	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 17

Protocollo di amplificazione <i>tcdC</i>	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 95°C	4 minuti
30 cicli a { 95°C 52°C 72°C	1 minuto 30 secondi 30 secondi
1 ciclo finale a 72°C	5 minuti

E' opportuno sottolineare, in particolare, che i primers C1 e C2 amplificano l'intero gene *tcdC*, mentre i primers Tim2 e Struppi2 amplificano la regione ipervariabile interna al gene.

Rivelazione.

Dieci µl di ciascun prodotto di amplificazione sono stati mescolati con 1µl di tampone di corsa addizionato di 9 µl di acqua distillata sterile; questa sospensione è stata caricata su gel di agaroso all'1% in tampone TAE 1X (tampone TAE 1X: Tris 40 mM, acido acetico 40mM ed EDTA 1 mM, pH 8,3) colorato con 5 µl di bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è stata eseguita per 30 min. con un voltaggio pari a 120 Volts.

Purificazione dell'amplificato

L'amplificato ottenuto è stato fatto correre su gel di agarosio all'1% e purificato mediante il Kit NucleoSpin Extract II (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Sequenziamento genico

In base ai risultati ottenuti con la metodica sopra descritta per l'analisi del gene regolatore negativo *tcdC* sono stati selezionati 8 ceppi, sui quali eseguire il sequenziamento genico. Per questi ceppi, il gene *tcdC* è stato amplificato anche con i primers C3f e C4r, da noi nell'ambito dello studio disegnati "ad hoc", esterni al gene *tcdC* per l'analisi delle regioni 3' e 5' del gene stesso. Questi primers sono stati disegnati per poter amplificare il gene *tcdC* del ceppo CD2276, che non presentava alcuna amplificazione con i primers classici C1 e C2.

Estrazione del DNA

Il genoma degli 8 ceppi di *C. difficile* è stato estratto e purificato mediante Kit di estrazione NucleoBond (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Amplificazione

I nuovi primers C3f e C4r sono stati sintetizzati dalla ditta Primm, seguendo le sequenze nucleotidiche da noi disegnate e vengono sottodescritti.

C3f	5' –AGC CTT GTA ACT GTT TAT TTG C 3'	22pb
C4r	5' –GTA AAA TTA TGC TTA GGG GAA A– 3'	22pb

Di seguito sono riportati i parametri delle miscele e dei protocolli di amplificazione del gene *tcdC* con i primers C3f e C4r (Schema 18 e 19).

Schema 18

Miscela di amplificazione <i>tcdC</i>	
Componenti	Concentrazione
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 9,0)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Triton X-100	0,1%
Primer C3f	10 pmol/ µL
Primer C4r	10 pmol/ µL
dNTP	200 µM
TaqDNA polimerasi	1,5 U
DNA estratto da colonia bollita	5 µl

Schema 19

Protocollo di amplificazione <i>tcdC</i>	
Fasi di amplificazione	Durata di ciascuna fase
1 ciclo iniziale a 94°C	4 minuti
30 cicli a { 94°C 54°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuto
1 ciclo finale a 72°C	5 minuti

Rivelazione.

Trenta µl di ciascun prodotto di amplificazione sono stati mescolati con 1µl di tampone di corsa; questa sospensione è stata caricata su gel di agaroso all'1% in tampone TAE 1X (tampone TAE 1X: Tris 40 mM, acido acetico 40mM ed EDTA 1 mM, pH 8,3) colorato con 5 µl di bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è stata eseguita per 30 min. con un voltaggio pari a 120 Volts.

I ceppi CD5177 (descritto da Rupnik) e VPI10463 sono stati utilizzati come controllo positivo.

Purificazione dell'amplificato

L'amplificato ottenuto è stato fatto correre su gel di agarosio all'1% e purificato mediante il Kit NucleoSpin Extract II (M-Medical, Milano, Italia) secondo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice.

Sequenziamento

Gli 8 ceppi selezionati sono stati sequenziati mediante kit Big Dye Terminator V1.1 dell'Applied Biosystems (California, U.S.A.).

Saggi di sensibilità *in vitro* ai chemioantibiotici

Per i 43 ceppi A+B+CDT+ precedentemente selezionati è stata saggiata la loro sensibilità a moxifloxacina come rappresentante dei fluorochinoloni mediante E-Test (AB Biodisk, Solna, Svezia) ed a vancomicina, eritromicina, clindamicina e metronidazolo mediante Sensititre (Trek diagnostic system ltd., England), seguendo le indicazioni riportate dalle ditte produttrici.

La suddivisione nelle categorie Sensibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R) si è basata, seguendo le indicazioni internazionalmente accettate [145] sui sottodescritti valori di “breakpoints” espressi come concentrazione minima inibente (M.I.C.) in mcg/ml:

Vancomicina – M.I.C. \leq 4 mcg/ml (**S**); M.I.C. = 4 - 8 mcg/ml (**I**); M.I.C. \geq 8 mcg/ml (**R**)

Eritromicina – M.I.C. \leq 8 mcg/ml (**S**); M.I.C. = 8 - 32 mcg/ml (**I**); M.I.C. \geq 32 mcg/ml (**R**)

Clindamicina – M.I.C. \leq 2 mcg/ml (**S**); M.I.C. = 2 - 8 mcg/ml (**I**); M.I.C. \geq 8 mcg/ml (**R**)

Metronidazolo – M.I.C. \leq 8 mcg/ml (**S**); M.I.C. = 8 - 32 mcg/ml (**I**); M.I.C. \geq 32 mcg/ml (**R**)

Moxifloxacina – M.I.C. \leq 2 mcg/ml (**S**); M.I.C. = 2 - 8 mcg/ml (**I**); M.I.C. \geq 8 mcg/ml (**R**)

RISULTATI

La presentazione dei risultati ottenuti si articola secondo le fasi della ricerca, principalmente rivolte allo studio della tossinogenicità dei ceppi, del loro ribotipo e tossinotipo, nonché ad approfondimenti della struttura molecolare del *Locus* di patogenicità (PaLoc) dei ceppi tossinogenici, come segue:

1. Ricerca dei geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti per le tossine principali A e B, mediante duplex PCR
2. Messa a punto ed applicazione di una PCR in grado di rilevare i geni *cdtA* e *cdtB* codificanti per la tossina binaria
3. Caratterizzazione del ribotipo mediante “PCR-ribotyping”
4. Analisi del PaLoc dei ceppi di *C. difficile* *cdtA/B+*
 - a. “toxotyping”
 - b. analisi del gene regolatore negativo *tcdC*
5. Verifica della sensibilità *in vitro* ad alcuni chemioantibiotici
6. Disamina delle cartelle cliniche di pazienti coinvolti in due epidemie nosocomiali

1. Ricerca dei geni *tcdA* e *tcdB* codificanti per le tossine principali A e B mediante PCR

Il saggio, rivolto a rilevare la presenza dei geni codificanti per le due tossine principali A e B, è stato eseguito mediante reazione polimerasica a catena sui 438 ceppi di *C. difficile* isolati nel corso di setti anni (2000-2006) e conservati in collezione. In particolare, la metodologia applicata prevedeva la contemporanea ricerca dei due geni mediante una duplex-PCR, e l'utilizzo come controllo positivo del ceppo di riferimento VPI 10463 tossinotipo “0”.

Il quadro generale dei risultati raggiunti è mostrato in tabella 2; dei 438 ceppi complessivamente caratterizzati 48 (11%) sono risultati non tossinogenici (*tcdA-* *tcdB-*) e 390 (89%) tossinogenici (*tcdA+* *tcdB+*).

Tabella 2 - Tossinogenicità mediante PCR di 438 ceppi di *C. difficile* isolati in sette anni (2000-2006)

Anno	Ceppi N°	Ceppi non tossinogenici <i>tcdA/B-</i> <i>cdtA/B-</i>		Ceppi tossinogenici			
				<i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B+</i>	<i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B-</i>		
		N°	(%)	N° (%)	N° (%)		
2000	6	1	(16,6%)	3	(50%)	2	(33,4%)
2001	50	15	(30%)	9	(18%)	26	(52%)
2002	39	8	(20,5%)	20	(51,3%)	11	(28,2%)
2003	124	8	(6,4%)	65	(52,4%)	51	(41,2%)
2004	26	2	(7,7%)	10	(38,5%)	14	(53,8%)
2005	65	10	(15,4%)	6	(9,2%)	49	(75,4%)
2006	128	4	(3,1%)	12	(9,4%)	112	(87,5%)
Totale	438	48	(11%)	390 (89%)		125	(32,1%)
						265	(67,9%)

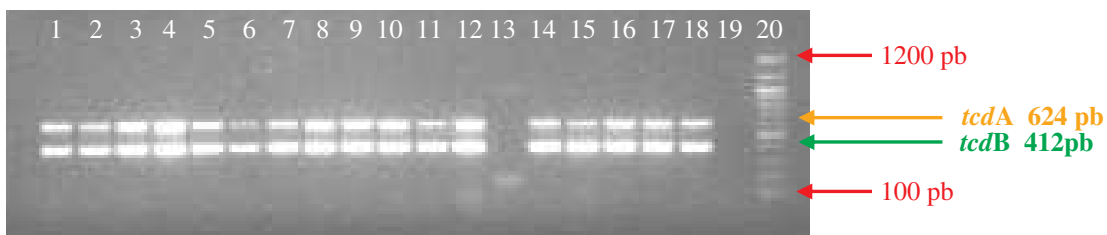
Nelle **figure 7 e 8** sono mostrati esempi di applicazione della duplex PCR su alcuni dei 438 ceppi caratterizzati.

Figure 7 e 8 - Esempio di corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1% degli amplificati di alcuni ceppi di *C. difficile* saggiati mediante duplex PCR per la ricerca dei due geni codificanti per le tossine A e B.

Linee 1-18: ceppi di *C.difficile*.

Linea 19: controllo positivo (*C. difficile* VPI 10463 *tcdA+* *tcdB+*).

Linea 20: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).



Linee 1-17: ceppi di *C.difficile*.

Linea 18: controllo positivo (*C. difficile* VPI 10463 *tcdA+* *tcdB+*).

Linea 19: controllo negativo ("0 DNA").

Linea 20: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Durante questa analisi è sempre stata riscontrata la presenza o l'assenza contemporanea dei due geni *tcdA* e *tcdB*; in particolare non è mai stata riscontrata la presenza di ceppi potenzialmente produttori di una sola tossina: *tcdA-tcdB+* o *tcdA+tcdB-*.

2. Messa a punto ed applicazione di una PCR in grado di rilevare i geni codificanti per la tossina binaria *cdtA* e *cdtB*

Il primo passo è stato quello di verificare l'efficacia dei primers e del protocollo di amplificazione tratti dal lavoro di Stubbs S., Rupnik M., et al. [179] sul ceppo di riferimento 51377 utilizzato nell'ambito di questa ricerca, avente tossinotipo A+B+CDT+, gentilmente fornito dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma (I.S.S.) nel contesto di una collaborazione scientifica con la prof.ssa P. Mastrantonio e la dott.ssa P. Spigaglia.

Il ceppo pervenuto a noi in Cooked meat è stato seminato su piastre di Schaedler agar e dopo incubazione per 24 ore in anaerobiosi, è stato congelato in cryobank a -80°C . Successivamente è stata allestita l'estrazione del DNA genomico mediante bollitura.

I primers da noi utilizzati, sintetizzati dalla ditta BIOSENSE e pervenuti a noi liofilizzati, sono stati sliofilizzati e portati attraverso opportune diluizioni alla concentrazione di nostro interesse ($0,15\ \mu\text{M}$). Sono quindi state amplificate e successivamente rivelate le regioni cromosomiche contenenti i due geni delle due diverse componenti della tossina binaria.

In questa prima amplificazione di prova il controllo positivo è stato saggiato in triplo ed in ogni singola provetta sono stati inseriti i due primers per entrambe le tossine.

La rivelazione è stata effettuata in gel di agarosio all'1,5% (0,6 grammi di agarosio in 40 ml di TAE 1x) con l'aggiunta di $0,9\ \mu\text{l}$ di bromuro di etidio. Sono stati sottoposti a rivelazione $15\ \mu\text{l}$ di ciascun amplificato.

Come si può facilmente evincere dalla **figura 9**, il risultato ottenuto non è quello previsto ed auspicato.

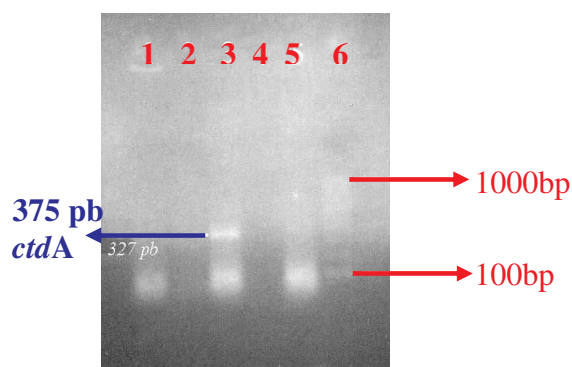


Figura 9

Linee 1, 3, 5;: controllo positivo (ceppo di riferimento di *Clostridium difficile* 51377 *cdtA/B+*);

Linee 2, 4: controllo negativo (0 DNA);

Linea 6: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Delle due bande attese (una di 375 pb corrispondente al gene *cdtA* e una di 510 bp corrispondente al gene *cdtB*) è stata rivelata solo la banda relativa al gene *cdtA* in uno dei tre controlli (**figura 9**, linea 3).

Per risolvere il problema, innanzitutto, sono state suddivise le reazioni di amplificazione per i due geni delle due diverse componenti della tossina. In particolare, è stata allestita una reazione di amplificazione, in cui sul ceppo di riferimento veniva ricercato in doppio il gene *cdtA* variando la concentrazione dei primers *cdtArev* e *cdtApos* da una concentrazione di 0,15µM a una concentrazione di 0,2µM (**figura 10**, linee 1,2), mantenendo costanti tutti gli altri parametri; parallelamente è stata allestita una reazione di amplificazione, in cui sul ceppo di riferimento veniva ricercato in doppio il gene *cdtB* variando la concentrazione dei primers *cdtBrev* e *cdtBpos* da una concentrazione di 0,15µM a una concentrazione di 0,2µM (**figura 10**, linee 4,5), mantenendo costanti tutti gli altri parametri. Analogamente, utilizzando le nuove concentrazioni dei primers sono stati ricercati contemporaneamente i geni *cdtA* e *cdtB* (**figura 10**, linee 7,8).

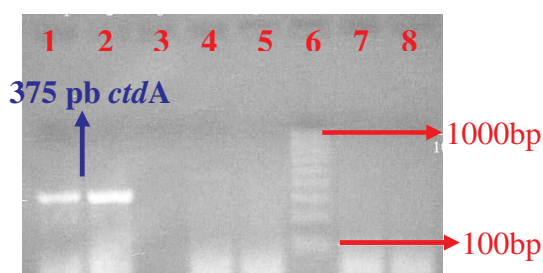


Figura 10

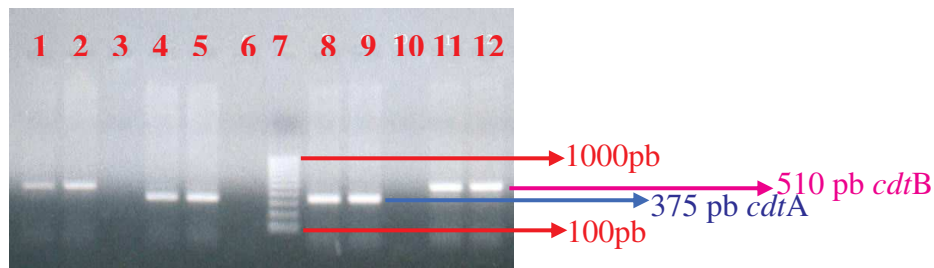
Linee 1, 2: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtA*;
Linea 3: controllo negativo (0 DNA);
Linee 4, 5: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtB*;
Linea 6: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad);
Linee 7, 8: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR per i geni *cdtA* e *cdtB*.

L'amplificazione ha dato un risultato positivo per il gene codificante per la componente CDTa solo quando ricercata singolarmente; al contrario, non sono mai state osservate le bande di amplificazione attese in corrispondenza del gene codificante per la componente CDTb e quelle della componente CDTa quando i due geni sono stati ricercati contemporaneamente.

A questo punto l'attenzione è stata rivolta esclusivamente al gene *cdtB*. Dopo ripetuti esperimenti, nei quali sono stati variati alcuni parametri, è stato possibile ottenere le bande di amplificazione corrispondenti ai geni attesi (**figura 11**).

Figura 11

Linee 1,2: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtB* ad una concentrazione di primers pari a 0,3 μ m;
Linee 4, 5: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtA* ad una concentrazione di primers pari a 0,15 μ m;
Linee 8, 9: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtA* ad una concentrazione di primers pari a 0,2 μ m;
Linee 11, 12: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtB* ad una concentrazione di primers pari a 0,4 μ m;
Linee 3, 6, 10: controllo negativo (0 DNA);
Linea 7: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).



Di seguito sono riportate le modifiche da noi definitivamente apportate, per ottenere le bande sopra riportate, rispetto al lavoro originale di Stubbs S. et al. preso come riferimento:

- ✓ Concentrazione dei due primers per il gene *cdtA* portata da 0,15 a 0,3 μ M
- ✓ Concentrazione dei due primers per il gene *cdtB* portata da 0,15 a 0,4 μ M
- ✓ Concentrazione della TaqDNA polimerasi portata da 1U a 1,5U
- ✓ Il tempo della fase di denaturazione, durante i cicli di amplificazione, portato da 45 secondi ad 1 minuto

Ottenute le bande relative ai due geni separatamente, l'attenzione si è spostata sulla possibilità di una rilevazione contemporanea dei due geni. Si è cercato di allestire un metodo di duplex PCR, che permettesse in modo rapido ed efficace la rilevazione contemporanea dei due geni della tossina binaria in modo analogo, a quello utilizzato per rivelare i geni delle tossine A e B di *C. difficile*. Dopo numerosi esperimenti i risultati ottenuti sono rimasti discordanti e non sempre riproducibili (figura 12).

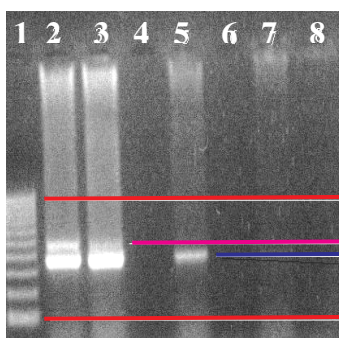


Figura 12

Linee 2, 3, 5, 7, 8: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR per i geni *cdtA* e *cdtB* a concentrazioni scalari di *cdtB*, 0,2 μ M, 0,3 μ M, 0,4 μ M, 0,5 μ M, 0,6 μ M;
Linee 4, 6: controllo negativo (0 DNA);
Linea1: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Di conseguenza, per una immediata interpretazione visiva dei risultati, durante la fase di rivelazione su gel di agarosio all'1% sono stati caricati nello stesso pozzetto di partenza i due diversi amplificati, relativi ai geni codificanti per le due componenti della tossina binaria, appartenenti allo stesso ceppo in esame. Come mostrato nella **figura 13**, le bande che rivelano la presenza dei geni *cdtB* (510 pb) e *cdtA* (375 pb) risultano perfettamente distinguibili ed interpretabili.

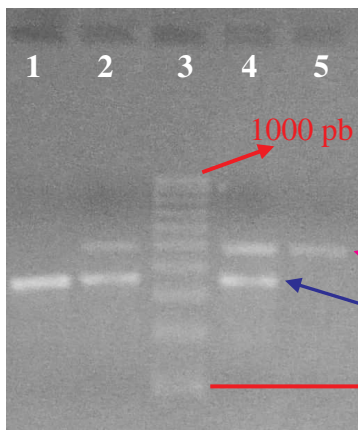


Figura 13

Linea 1: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR solo per il gene *cdtA*;
 Linee 2, 4: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*) sottoposto a PCR per i geni *cdtA* e *cdtB*, amplificati separatamente e fatti correre nello stesso pozzetto;
 Linea 5: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*);
 Linea 3: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Partendo da questo protocollo operativo, sono stati saggiati, per la presenza dei geni codificanti per le due componenti della tossina binaria, un totale di 438 ceppi di *C. difficile* isolati nel corso di 7 anni (2000-2006).

I risultati da noi ottenuti hanno rilevato complessivamente la presenza dei due geni codificanti per la tossina binaria (*cdtA* e *cdtB*) nel 32,1% dei ceppi saggiati (125 sul totale di 438 ceppi presi in esame) (**figure 14, 15; tabella 2 bis**).

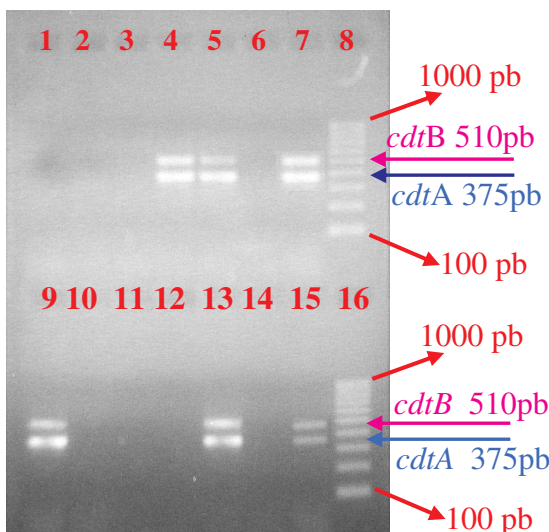


Figura 14

Linee 1-5 e 9-13: ceppi di *C. difficile* saggiati per la presenza dei geni codificanti per le due componenti della tossina binaria. In particolare, i ceppi nelle posizioni **4, 5, 9 e 13** risultano essere positivi;
 Linee 6 e 14: controllo negativo (0 DNA);
 Linee 7 e 15: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*);
 Linee 8 e 16: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

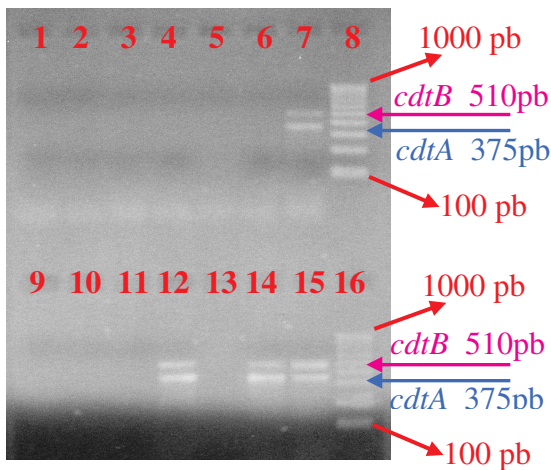


Figura 15

Linee 1-5 e 9-14: ceppi di *C. difficile* saggiati per la presenza dei geni codificanti per le due componenti della tossina binaria. In particolare, i ceppi nelle posizioni **12 e 14** risultano essere positivi;

Linee 6: controllo negativo (0 DNA);

Linee 7 e 15: controllo positivo 51377 (ceppo di riferimento *cdtA/B+*);

Linee 8 e 16: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Tabella 2 bis- Tossinogenicità mediante PCR di 438 ceppi di *C. difficile* isolati in sette anni (2000-2006)

Anno	Ceppi N°	Ceppi non tossinogenici		Ceppi tossinogenici			
		<i>tcdA/B-</i> <i>cdtA/B-</i>		<i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B+</i>	<i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B-</i>		
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
2000	6	1	(16,6%)	3	(50%)	2	(33,4%)
2001	50	15	(30%)	9	(18%)	26	(52%)
2002	39	8	(20,5%)	20	(51,3%)	11	(28,2%)
2003	124	8	(6,4%)	65	(52,4%)	51	(41,2%)
2004	26	2	(7,7%)	10	(38,5%)	14	(53,8%)
2005	65	10	(15,4%)	6	(9,2%)	49	(75,4%)
2006	128	4	(3,1%)	12	(9,4%)	112	(87,5%)
Totale	438	48	(11%)	390 (89%)			
				125 (32,1%)	265 (67,9%)		

Interessante è sottolineare come, considerando i risultati ottenuti solamente negli anni 2002-2003, la percentuale di ceppi *cdtA+* *cdtB+* è pari al 52,1% (Tabella 2 bis).

Per tutti questi 125 ceppi è stata dimostrata attraverso la duplex PCR la contemporanea presenza dei geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti per le due principali tossine di *C. difficile*, nonché la produzione *in vitro* della tossina A (TcdA) mediante un sistema immunoenzimatico Triage (Biosite Incorporated, San Diego, U.S.A.) (**figure 16 e 17**) eseguito direttamente sulla coltura del ceppo

batterico, ottenuta dopo 72 ore di incubazione. Inoltre, in tutti questi ceppi si è sempre riscontrata la simultanea presenza dei due geni codificanti per le due componenti della tossina binaria. Non sono stati, quindi, trovati ceppi che presentassero singolarmente uno dei due geni *cdtA* e *cdtB*.

Figura 16 - Esempio di corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% di alcuni ceppi *cdtA+* e *cdtB+*, saggiati mediante duplex PCR per la ricerca dei geni codificanti per le tossine A e B.

Linee 1-6: ceppi di *C.difficile cdtA+* e *cdtB+*;

Linea 7: controllo positivo (*C. difficile* VPI 10463 *tcdA+* *tcdB+*);

Linea 8: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

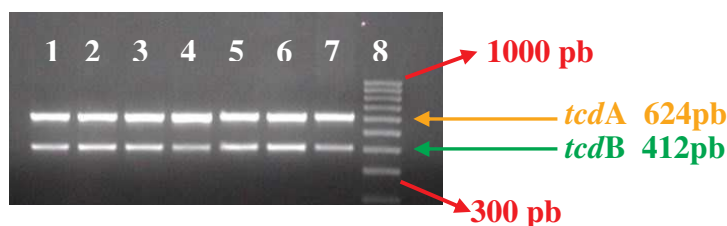
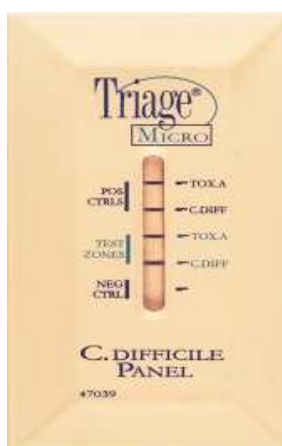


Figura 17 - Esempio positivo di ricerca *in vitro* della produzione della tossina A (TcdA) mediante sistema immunoenzimatico Triage di ceppi *cdtA/B+*.



3. Caratterizzazione del ribotipo mediante “PCR-ribotyping”

Tutti i 438 ceppi isolati sono stati tipizzati molecularmente mediante “PCR-ribotyping”; questa tecnica si basa sul polimorfismo delle regioni “spacer” degli operoni per il 16S ed il 23S rRNA.

I risultati ottenuti mostrano, nell’ambito dei 125 ceppi dotati dei geni codificanti per la tossina binaria (**tabella 3**), come il ribotipo 1 sia quello predominante (94,4%) all’interno del nostro ospedale. Tra i 4 sottogruppi appartenenti al ribotipo 1, il sottogruppo 1a è quello più rappresentativo (82,4%) con maggiore incidenza negli anni 2002-2003.

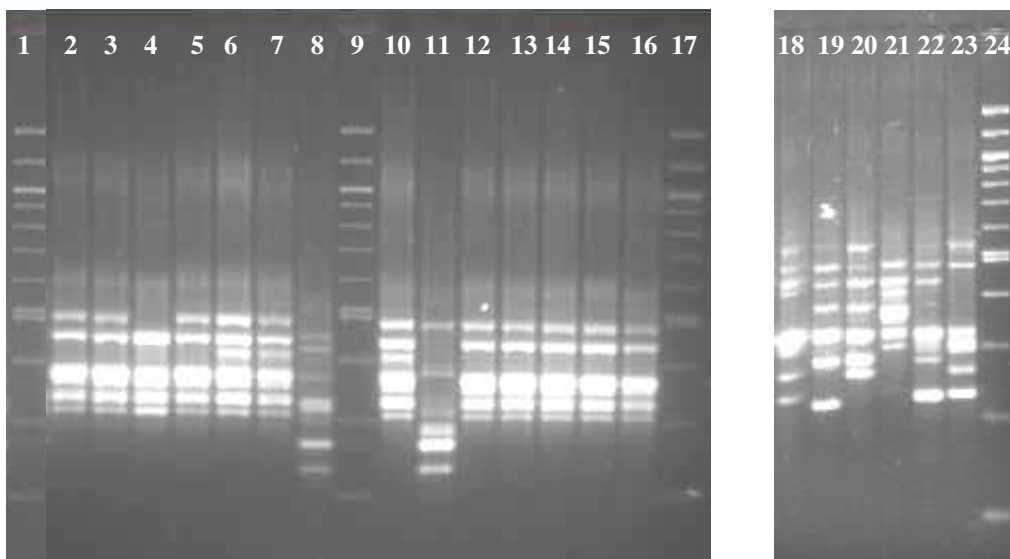
Occorre inoltre sottolineare che tutti i ceppi potenzialmente produttori della terza tossina, non appartenenti al ribotipo 1, posseggono ribotipi diversi tra loro.

Tabella 3 - Distribuzione dei ribotipi trovati per i 125 ceppi *cdtA+* *cdtB+*.

Anno	Ceppi varianti N°	Ribotipi ceppi varianti (<i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B+</i>)				
		1				Altri (4,5,10,11,14,15,16)
		1a	1b	1c	1d	
		N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)
2000	3	3 (100%)	-	-	-	-
2001	9	4 (44,4%)	4 (44,4%)	1 (11,2%)	-	-
2002	20	17 (85%)	-	-	-	3 (15%) (Ribotipo 4, 10, 14)
2003	65	56 (86,1%)	6 (9,2%)	-	1 (1,6%)	2 (3,1%) (Ribotipo 5, 16)
2004	10	9 (90%)	-	-	-	1 (10%) (Ribotipo 11)
2005	6	3 (50%)	-	2 (33,4%)	-	1 (16,6%) (Ribotipo 5)
2006	12	11 (91,6%)	1 (8,4%)	-	-	-
Totale	125	118 (94,4%)				7 (5,6%)
		103 (82,4%)	11 (8,8%)	3 (2,4%)	1 (0,8%)	

Di seguito sono riportate le immagini di corse elettroforetiche comprendenti i profili degli 8 ribotipi trovati nell'ambito dei ceppi varianti (**figura 18**).

Figura 18 - Profilo elettroforetico degli 8 ribotipi trovati mediante “PCR-ribotyping” nei 125 ceppi potenzialmente produttori della tossina binaria.



Linea 1, 9, 17 e 24: indicatore di pesi molecolari (100 bp DNA Ladder, Biolabs Inc);
Linea 2, 3, 5, 12, 13, 14, 15, 16: ribotipo 1a;
Linea 4: ribotipo 1c;
Linea 6, 7, 10: ribotipo 1b;
Linea 8: ceppo epidemico di *C. difficile* ribotipo 027/NAP1 tossinotipo III;
Linea 11: ribotipo 4;
Linea 18: ribotipo 10;
Linea 19: ribotipo 14;
Linea 20: ribotipo 16;
Linea 21: ribotipo 1d;
Linea 22: ribotipo 11;
Linea 23: ribotipo 5.

I risultati ottenuti applicando questa metodologia ai 313 ceppi non varianti sono riportati nella **tabella 4**. In totale sono stati riscontrati 68 differenti ribotipi e sono stati trovati quattro ribotipi predominanti: 13 (45 ceppi), 17 (85 ceppi), 18 (32 ceppi) e 33 (28 ceppi) variamente distribuiti negli anni. Gli altri ribotipi appartenenti ai ceppi non varianti sono stati isolati casualmente negli anni nei vari reparti.

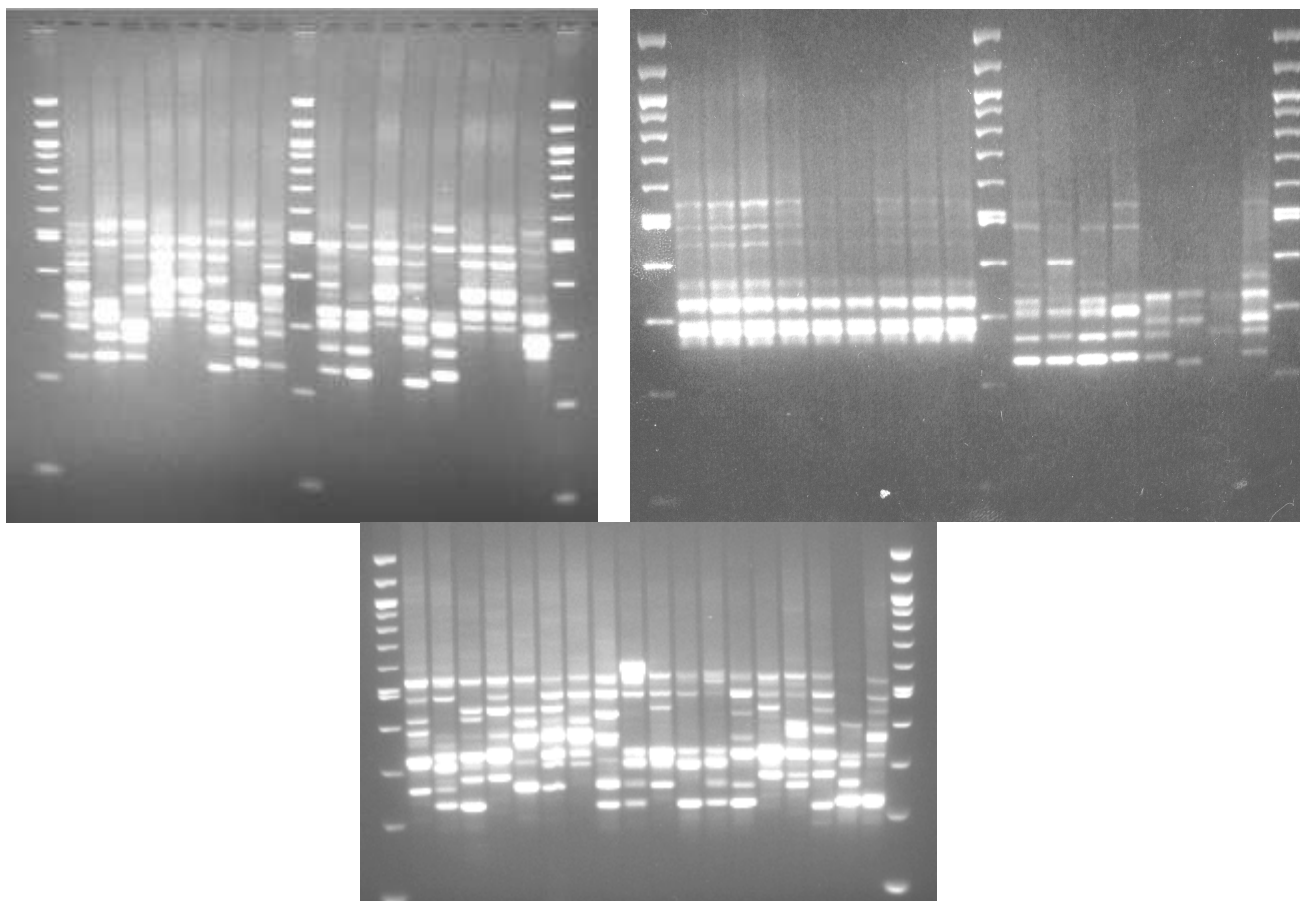
Da segnalare come il ceppo con ribotipo 17 è stato responsabile di un'epidemia in 30 pazienti ricoverati nei reparti pneumologici (apr.-sett. 2006).

Tabella 4 - Distribuzione dei ribotipi complessivamente riscontrati nei 313 ceppi di *C. difficile* non tossinogenici (*tcdA/B-* *cdtA/B-*) e tossinogenici non varianti (*tcdA/B+* *cdtA/B-*)

Anno	Ceppi N°	Ribotipi ceppi <i>tcdA/B-</i> <i>cdtA/B-</i> e <i>tcdA/B+</i> <i>cdtA/B-</i>				
		13	17	18	33	Altri ribotipi (2-3, 6-9, 12, 14-15, 19-32, 34-79)
		N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N°
2000	3	-	-	-	-	3
2001	41	4 (9,8%)	-	2 (4,8%)	-	35
2002	19	7 (36,9%)	-	1(5,3%)	-	11
2003	58	34 (58,6%)	-	-	4 (6,9%)	20
2004	16	-	1 (6,3%)	1 (6,3%)	3 (18,8%)	11
2005	59	-	7 (11,8%)	4 (6,8%)	21 (35,6%)	27
2006	116	-	77 (66,4%)	24 (20,7%)	-	15
Totale	313	45 (14,4%)	85 (27,3%)	32 (10,3%)	28 (9%)	122 (39%)

Di seguito sono riportate le immagini di corse elettroforetiche comprendenti alcuni dei ribotipi trovati nell'ambito dei ceppi non varianti (**figure 19, 20 e 21**).

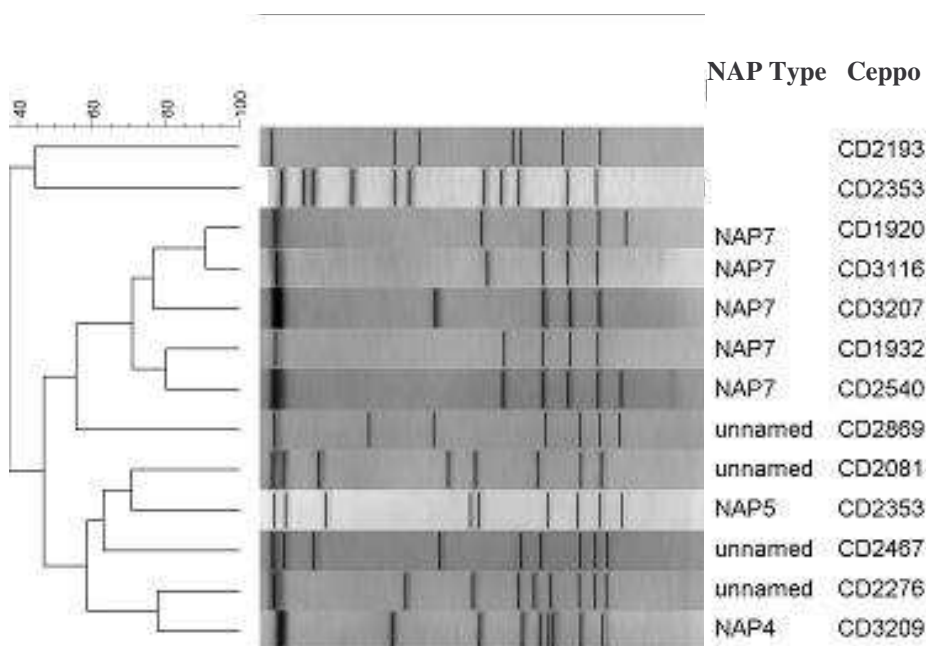
Figure 19, 20 e 21 - Profili elettroforetici di alcuni dei 68 ribotipi riscontrati nei 313 ceppi di *C.difficile* non tossinogenici (*tcdA/B-* *cdtA/B-*) e tossinogenici non varianti (*tcdA/B+* *cdtA/B-*)



Nella **Figura 22** (pag. 74) viene inoltre riportata la distribuzione dei diversi ribotipi riscontrati nei 438 ceppi di *C. difficile* analizzati, varianti e non varianti.

Infine, grazie ad una collaborazione con la dott.ssa B. Limbago del Centers for Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, U.S.A., i nostri ceppi varianti ribotipo 1a sono stati riclassificati mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e rinominati secondo la nomenclatura internazionale mediante PCR-ribotyping come NAP7/ribotipo 078 (**Figura 23**).

Figura 23 - Profili elettroforetici di alcuni ribotipi varianti di *C.difficile* caratterizzati mediante PFGE.



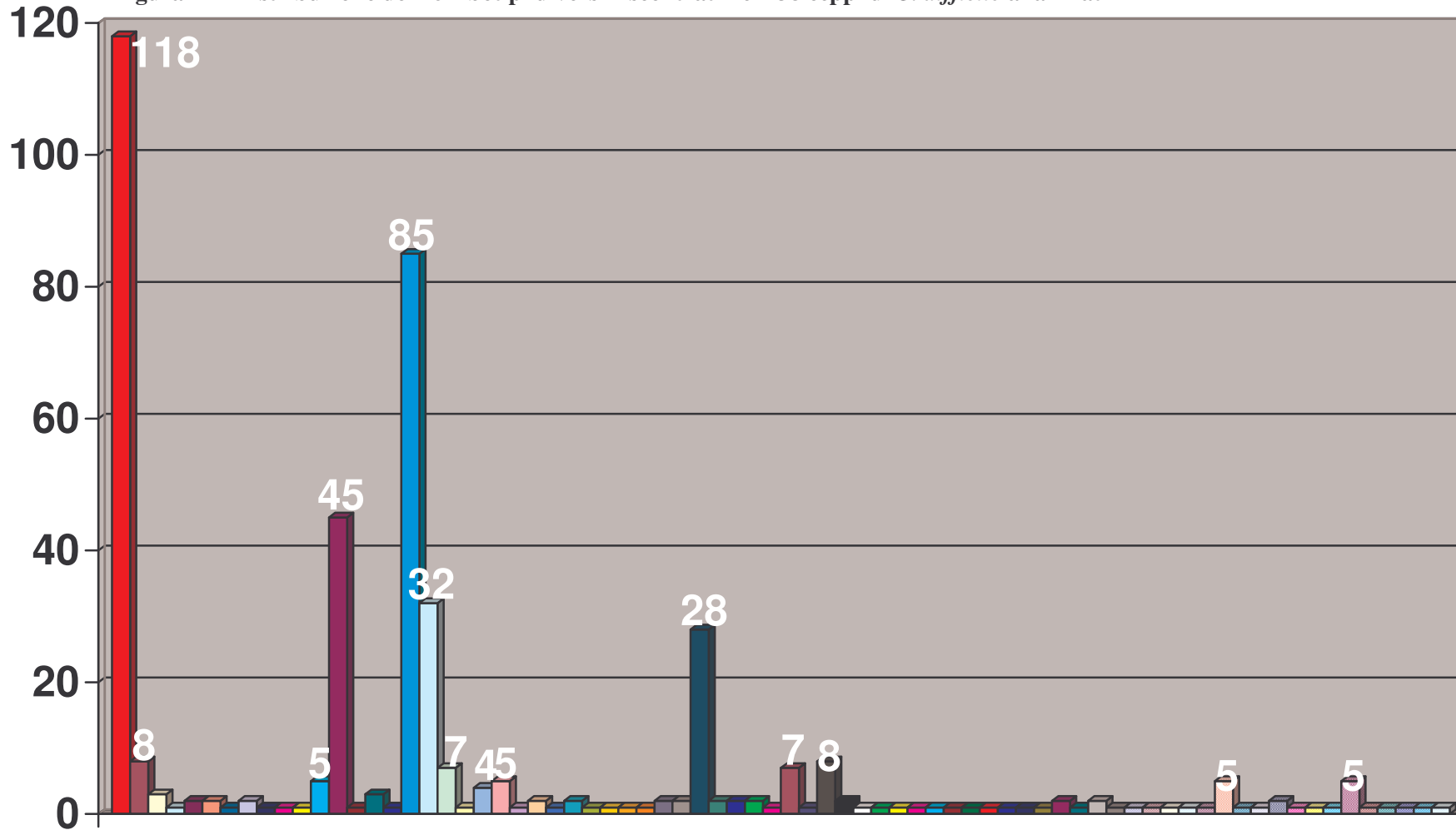
4. Analisi del Locus di patogenicità (PaLoc) dei ceppi *cdtA/B+* di *C. difficile*

Sono stati selezionati 43 ceppi dei 125 positivi per i geni codificanti per la CDT da sottoporre alle fasi successive dello studio molecolare, che prevedevano:

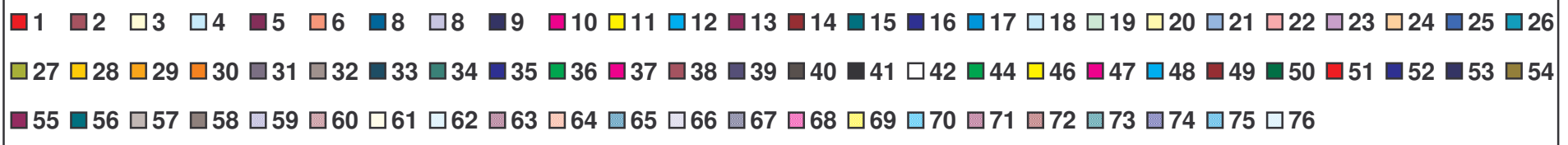
- a) una definizione del loro tossinotipo mediante “Toxinotyping”,
- b) l’analisi del gene regolatore negativo *tcdC*.

I criteri utilizzati nella loro selezione sono stati la loro appartenenza ad un diverso ribotipo ed il rilevamento temporale di uno stesso ribotipo nell’ambito di ciascun paziente.

Figura 22 - Distribuzione dei 76 ribotipi diversi riscontrati nei 438 ceppi di *C. difficile* analizzati



Legenda ribotipi:



a. “toxintyping”

La metodica di “toxintyping” si basa sull’amplificazione dei frammenti A3 e B1 dei geni *tcdA* e *tcdB*, rispettivamente, localizzati nel PaLoc e codificanti per le due principali tossine di *Clostridium difficile* e successiva analisi di restrizione. L’utilizzo di enzimi di restrizione (EcoRI, AccI e HincII) mette in luce le possibili varianti molecolari grazie ad un diverso comportamento dei frammenti genomici amplificati all’azione degli enzimi stessi.

I patterns ottenuti sono stati confrontati con quelli di riferimento pubblicati da Rupnik M. e presenti sul sito internet www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/

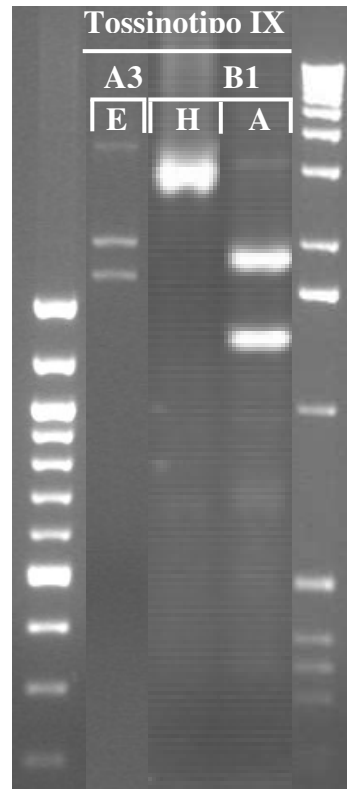
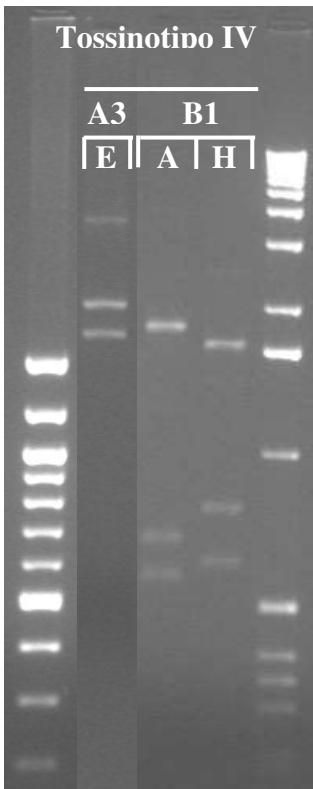
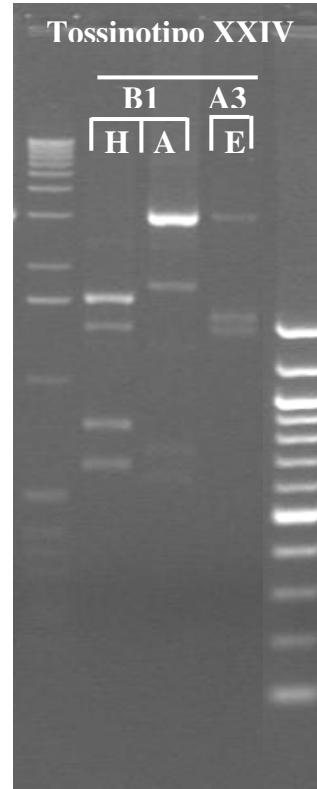
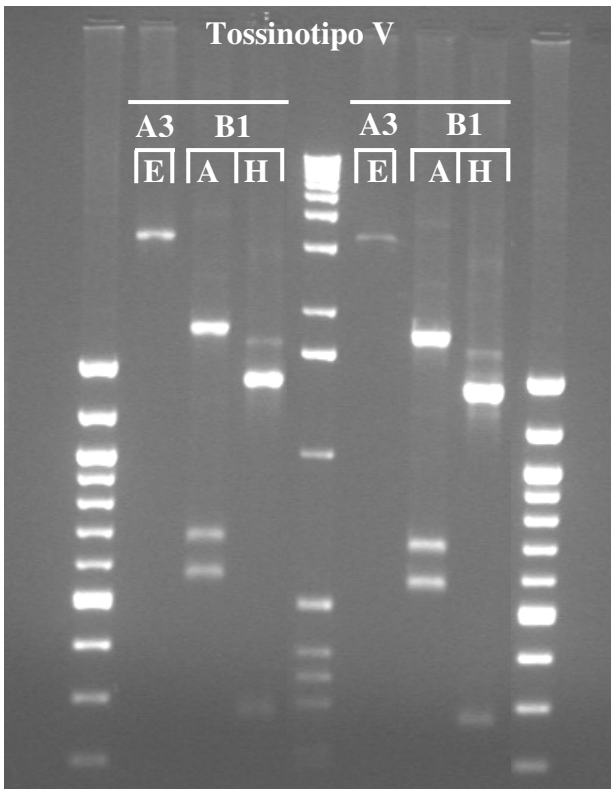
I risultati ottenuti sui 43 ceppi di *C. difficile*, sottoposti a “toxintyping”, indicano che il tossinotipo V predomina nettamente nel nostro ambiente (37 dei 43 ceppi, pari all’86%). Il tossinotipo XXIV comprende 4 ceppi sul totale esaminato (9,3%), un solo ceppo appartiene al tossinotipo IV (2,35%) ed uno al tossinotipo IX (2,35%).

I risultati ottenuti sono riportati complessivamente in **tabella 5** ed esemplificati nelle **figure 24, 25, 26 e 27**.

Tabella 5 - Correlazione tra i tossinotipi ed i PCR-ribotipi di 43 dei 125 ceppi varianti di *C. difficile* isolati nel corso di sette anni (2000-2006).

Anno	Ceppi varianti N°	Tossinotipo di ceppi varianti con ribotipo 1				Tossinotipo di ceppi varianti con ribotipo diverso da 1 (N°)
		1a (N°)	1b (N°)	1c (N°)	1d (N°)	
2000	3	V (2)	-	-	-	-
2001	9	V (1)	V (3)	V (1)	-	-
2002	20	V (4)	-	-	-	IV, IX, V (3)
2003	65	V (11)	V (3)	-	V (1)	XXIV (2)
2004	10	-	-	-	-	XXIV (1)
2005	6	V (3)	-	V (2)	-	XXIV (1)
2006	12	V (4)	V (1)	-	-	-

Figure 24, 25, 26 e 27 - Esempificazione in sequenza dei quattro tossinotipi trovati (V, XXIV, IV, IX) in base alla loro frequenza di isolamento.



b. analisi del gene regolatore negativo *tcdC*

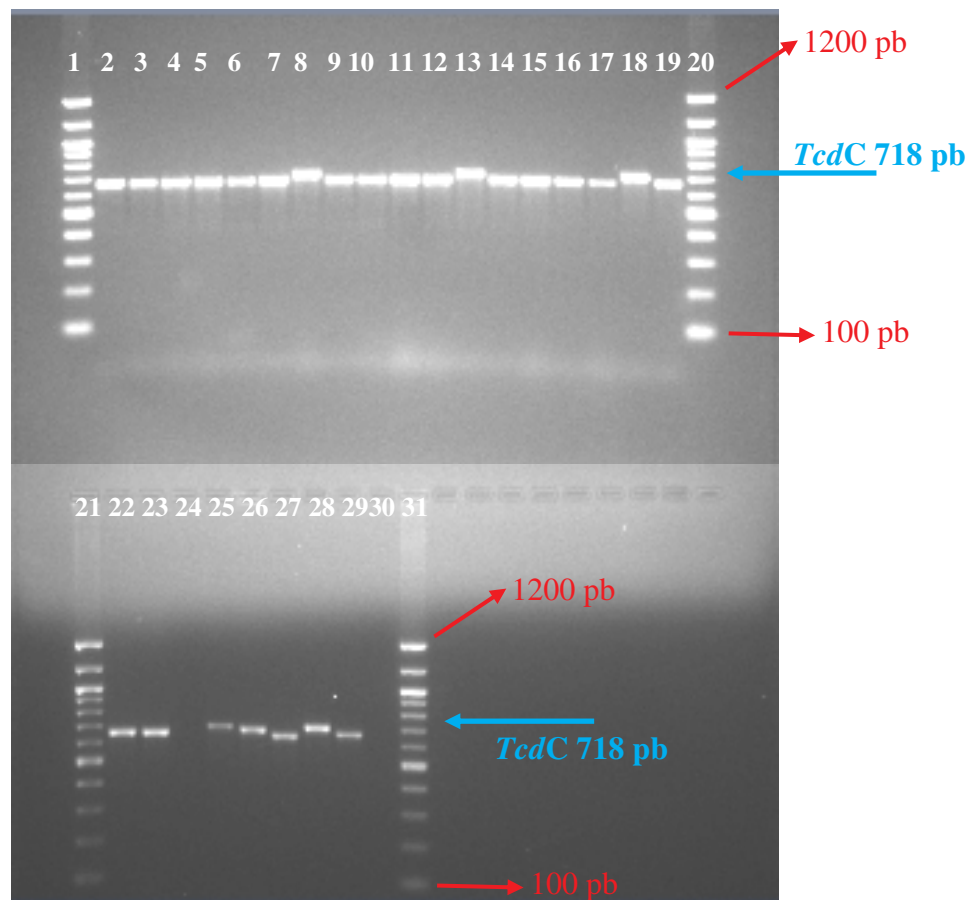
Nel PaLoc di *C. difficile* il gene *tcdC* codifica per un enzima regolatore negativo, che agisce sul fattore σ , subunità dell'oloenzima RNA polimerasi. Questo fattore σ prodotto dal gene *tcdD*, ugualmente situato nel PaLoc, riconosce i promotori dei geni *tcdA*, *tcdB* e *tcdD* situati a -10 pb e -35pb dall'inizio di ogni singolo gene, favorendo il legame della RNA polimerasi al filamento di DNA nel punto specifico per la trascrizione del gene stesso.

Recenti studi hanno individuato diverse possibili delezioni (18pb, 36pb, 39pb) nel gene *tcdC*, che inattivano il repressore da esso prodotto. Questa inattivazione porta, quindi, ad una iperproduzione delle due tossine principali di *C. difficile*.

I ceppi di riferimento A+B+CDT+ (*C. difficile* 51377 e VPI 10463) utilizzati nell'ambito di questa indagine presentano, rispettivamente, una delezione di 36 pb e nessuna delezione.

Inizialmente è stato amplificato con i primers C1 e C2 l'intero gene *tcdC* di tutti i 43 ceppi selezionati in precedenza (**figura 28**).

Figura 28 - Corsa elettroforetica di alcuni dei 43 ceppi selezionati dopo amplificazione del gene *tcdC* con i primers C1 e C2 per visualizzare eventuali delezioni nel gene stesso.



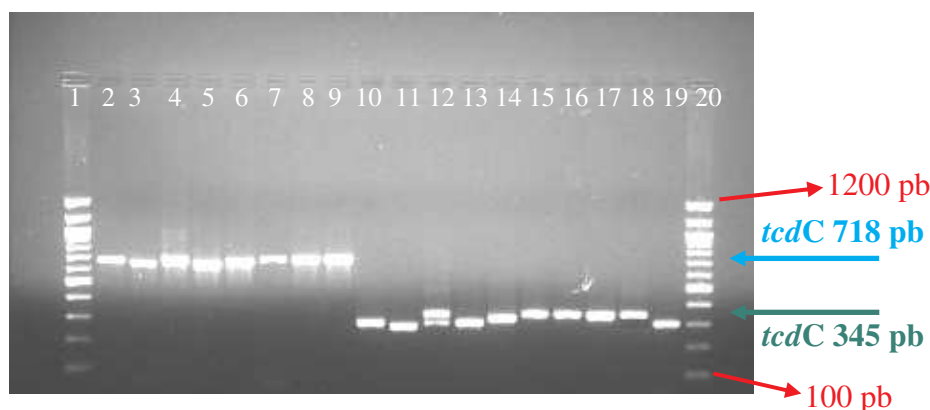
Linee 2-17, 22-27: ceppi di *C. difficile* amplificati con i primers C1 e C2 per la ricerca di variazioni nel gene regolatore negativo *tcdC*;
 Linee 18, 28: Ceppo di controllo VPI 10463 senza delezione;
 Linee 19, 29: Ceppo di controllo 51377 con delezione 36 pb;
 Linee 1, 20, 21, 31: indicatore di pesi molecolari (100 bp DNA Ladder, Biolabs Inc);
 Linea 30: controllo negativo (0 DNA).

I risultati ottenuti hanno mostrato che:

- ✓ tutti i 4 ceppi tossinotipo XXIV non sembrano presentare delezioni indipendentemente dal ribotipo;
- ✓ tutti i ceppi tossinotipo V ribotipo1 (1a, 1b, 1c, 1d) presentano una delezione, che sembra uguale tra loro;
- ✓ l'unico ceppo tossinotipo IV ribotipo 4 presenta una delezione apparentemente diversa da quella presentata dai ceppi tossinotipo V;
- ✓ il ceppo tossinotipo IX ribotipo 10 non presenta alcuna delezione;
- ✓ il ceppo tossinotipo V ribotipo 14 non è stato mai amplificato con questi primers indipendentemente dalle varie prove eseguite.

Successivamente, al fine di sequenziare la regione ipervariabile del gene di nostro interesse, sono stati selezionati 8 ceppi in base ai risultati ottenuti nell'amplificazione precedente ed amplificati con i primers Tim2 e Struppi 2 (**figura 29**).

Figura 29 - Amplificazione degli 8 ceppi selezionati con i primers C1 e C2 (linee 2-9) e con i primers Tim2 e Struppi2 (linee 10-16).



Linee 1, 20: indicatore di pesi molecolari (100 bp DNA Ladder, Biolabs Inc);

Linea 2: CD1920, Ribotipo 1c Tossinotipo V;

Linea 3: CD2081, Ribotipo 4 Tossinotipo IV;

Linea 4: CD2193, Ribotipo 10 Tossinotipo IX;

Linea 5: CD2353, Ribotipo 1a Tossinotipo V;

Linea 6: CD2467, Ribotipo 16 Tossinotipo XXIV;

Linea 7: CD2869, Ribotipo 11 Tossinotipo XXIV;

Linea 8: CD3207, Ribotipo 1c Tossinotipo V;

Linea 9: CD3209, Ribotipo 5 Tossinotipo XXIV;

Linea 10: CD1920, Ribotipo 1c Tossinotipo V;

Linea 11: CD2081, Ribotipo 4 Tossinotipo IV;

Linea 12: CD2193, Ribotipo 10 Tossinotipo V;

Linea 13: CD2353, Ribotipo 1a Tossinotipo V;

Linea 14: CD2467, Ribotipo 16 Tossinotipo XXIV;

Linea 15: CD2869, Ribotipo 11 Tossinotipo XXIV;

Linea 16: CD3207, Ribotipo 1c Tossinotipo XXIV;

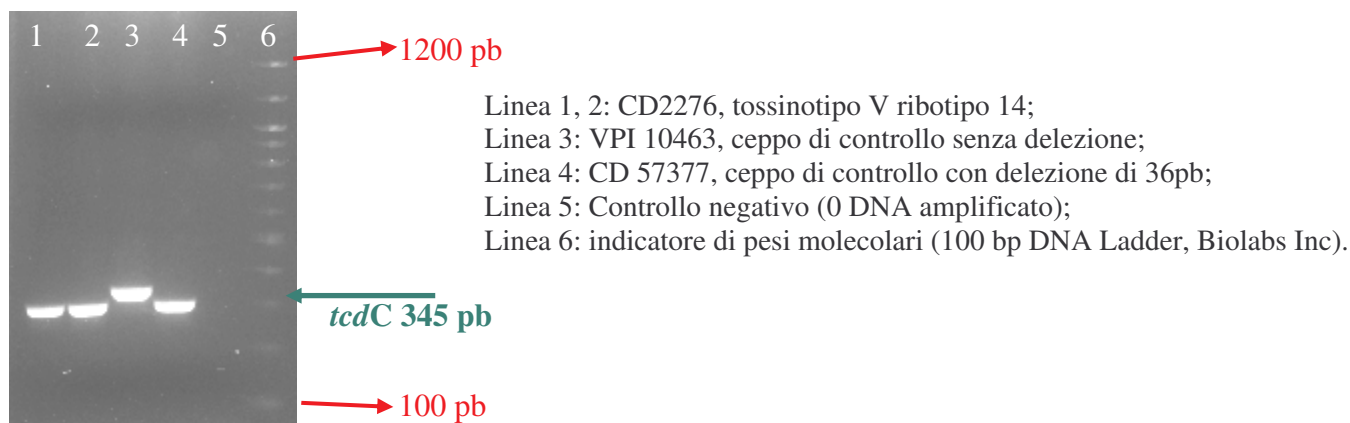
Linea 17: CD3209, Ribotipo 5 Tossinotipo XXIV;

Linea 18: VPI 10463 ceppo di controllo senza delezione;

Linea 19: CD 57377 ceppo di controllo con delezione di 36pb (Rupnik).

Da ultimo, è stato saggiato con i primers Tim2 e Struppi2 il ceppo CD 2276 tossinotipo V ribotipo XIV, che non presentava alcuna amplificazione con i primers C1 e C2 (**figura 30**).

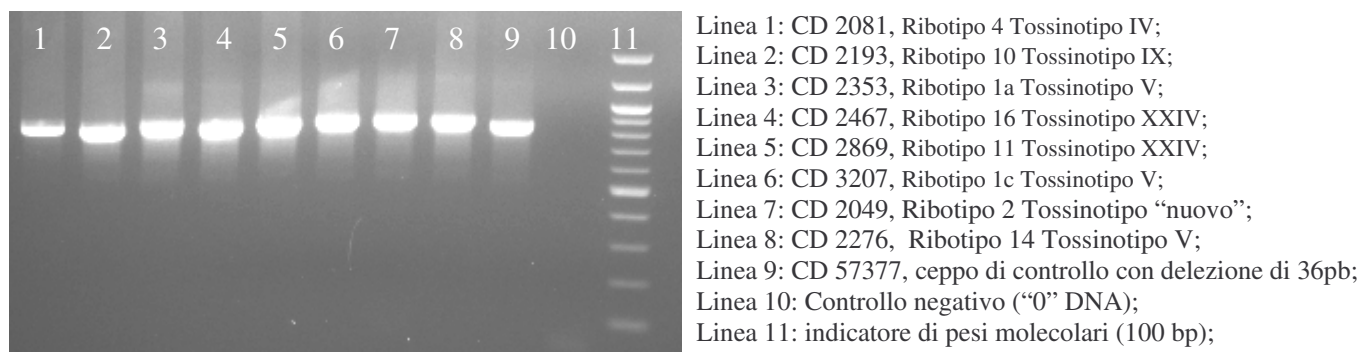
Figura 30 - Ceppo CD 2276 amplificato con i primers Tim2 e Struppi2.



Per questo nostro ceppo CD 2276 è stata ipotizzata una mutazione a livello dei siti di aggancio dei primers C1 e C2; al fine di procedere al successivo sequenziamento del gene *tcdC* relativamente al ceppo CD 2276 sono stati costruiti, in collaborazione alla dottoressa Patrizia Spigaglia (I.S.S., Roma), primers “ad hoc” C3f e C4r esterni al gene *tcdC*, che si presumeva permettessero l’amplificazione dell’intero gene.

Analogamente al ceppo CD 2276, tutti gli altri ceppi precedentemente selezionati sono stati amplificati con questi primers per poter meglio analizzare le regioni 5’ e 3’ del gene di ogni singolo ceppo. Gli amplificati ottenuti sono mostrati in **figura 31**.

Figura 31 - Amplificazione degli 8 ceppi selezionati con i primers C3f e C4r.



Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dal sequenziamento del gene *tcdC* di questi 8 ceppi selezionati (elencati nella legenda della Fig. 5) rispetto al ceppo di riferimento VPI 10463.

Ceppo N°

Sequenze nucleotidiche

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTATTTTCTCTACAGCTATCCTGGTATAGTTATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTATTTTCTCTACAGCTATCCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCCTGGTATAGTTATATTTCCACCCATAGTTGATTC 60
***** ** *****

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAATACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAAACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAAACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAATACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAATACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAATACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAAACTCT 120
ATAAGTTATAGTTCAGCACCTATACTCTTATAGTTATGTAATCATCCTCTAAACTCT 120

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180
TGAAGGAGTTATTGATTTTTATAACTACATAGTACAACCTTATCATAAATTTCCAGACAC 180

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240
AGCTAATCTTATTTGCACCTCATCACCATCTCAATAACTTGAATAACCTTACCTTCAA 240

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300
TTTTACCTTTTGTACTTATAATCATCAGGTGTTCTAGCTAATTGGTCATAAGTAATACC 300

VPI10463
2081_C
2193_C
2467_C
3207_C
2869_C
2049_C
2353_C
2276_C

AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360
AGTATCATATCCTTTCTCTCTCTCTCTTTTTTTCGTTGTTCTTCAGCCTTTTGTAGC 360

CD 2049 e CD2869: Allele VPI 10463

CD 2353: Allele A1 già descritto in letteratura

CD 3207: Allele “nuovo 1”
✚ 4 mutazioni puntiformi silenti

CD2081: Allele “nuovo 2”
✚ 4 mutazioni puntiformi silenti
✚ 2 mutazioni puntiformi
• Glicina → Ac. Aspartico
• Lisina → Asparagina
✚ Delezione di 54 pb
✚ 1 mutazione di stop (dopo 195 pb → 65 aa)

CD 2193: Allele “nuovo 3”
✚ 2 mutazioni puntiformi
• Glicina → Asparagina
• Glicina → Ac. aspartico
✚ Delezione puntiforme (da qui in avanti tutto il gene risulta sciftato di una base azotata)

CD 2276 Allele “nuovo 4”
✚ 8 mutazioni puntiformi silenti
✚ 3 mutazioni puntiformi
• Serina → Isoleucina
• Alanina → Ac. Aspartico
• Prolina → Serina
✚ 2 mutazioni di stop
✚ Delezione di 18 pb

CD 2467 Allele “nuovo 5”
✚ 4 mutazioni puntiformi silenti
✚ 1 mutazione puntiforme
• Glicina → Valina
✚ Delezione 18 pb

Tabella 5 - Caratterizzazione molecolare della tossinogenicità degli 8 ceppi varianti di *C. difficile* selezionati.

N° ceppo	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	Tossinotipo	Allele <i>tcdC</i>	Proteina TcdC
2353	1a	+	+	+	+	V	Allele già descritto come A1	Sequenza nuova: troncata a 61aa = CD 2276
3207	1c	+	+	+	+	V	“nuovo 1”	Proteina completa VPI10463
2049	2	+	+	-	-	“nuovo”	Allele uguale a VPI 10463	Proteina completa VPI10463
2081	4	+	+	+	+	IV	“nuovo 2”	Sequenza nuova: troncata a 61aa
2193	10	+	+	+	+	IX	“nuovo 3”	Sequenza nuova: troncata a 65aa
2869	11	+	+	+	+	XXIV	Allele uguale a VPI 10463	Proteina completa VPI10463
2276	14	+	+	+	+	V	“nuovo 4”	Sequenza nuova: troncata a 61aa = CD 2353
2467	16	+	+	+	+	XXIV	“nuovo 5”	Sequenza nuova

Generalmente i ceppi appartenenti allo stesso ribotipo sono uguali tra loro e hanno di conseguenza un PaLoc identico. Tuttavia, nell’ambito dei nostri ceppi tutti appartenenti al ribotipo 2, è stato ritrovato il ceppo CD 2049, che si comporta in modo anomalo, in quanto presenta i geni *tcdA* e *tcdB* che, al contrario, non si riscontrano negli altri 7 ceppi appartenenti allo stesso ribotipo (figura 32).

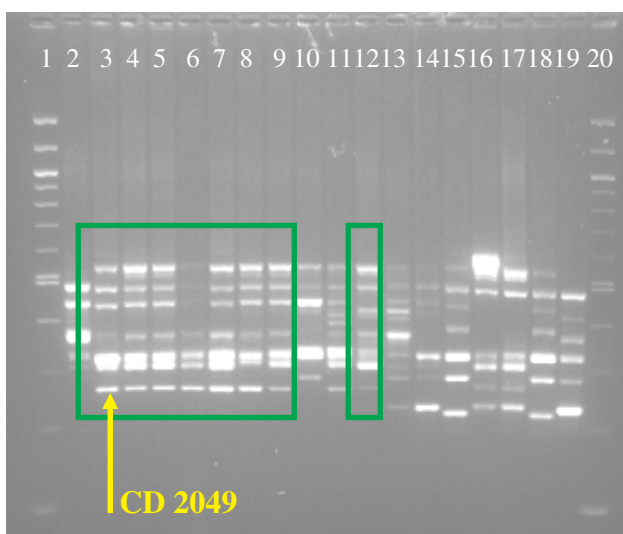


Figura 32

Corsa elettroforetica mediante “PCR-ribotyping” degli 8 ceppi selezionati di *C. difficile* con ribotipo 2

Linea 3: ceppo CD 2049 *tcdA*+, *tcdB*+ ribotipo 2

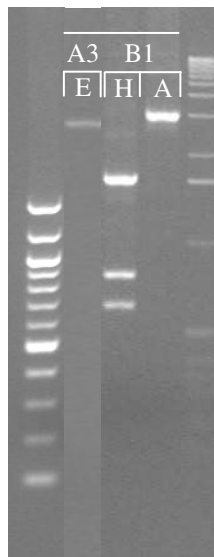
Linee 4-9 e 12: ceppi *tcdA*-, *tcdB*- ribotipo 2

Linee 2, 10-11 e 12-19: ceppi di *C.difficile* con ribotipo diverso da 2

Linee 1 e 20: indicatore di pesi molecolari (100 pb Molecular Ruler, Biorad).

Questo ceppo è stato quindi sottoposto anche ad analisi molecolare del PaLoc sia mediante “toxinotyping” sia mediante sequenziamento del gene *tcdC*. Mentre il risultato del “toxinotyping” ha mostrato la presenza di un tossinotipo non ancora descritto in letteratura (**figura 33**) il sequenziamento del gene *tcdC* non ha mostrato alcuna alterazione in questo gene rispetto a quello del ceppo di riferimento VPI 10463.

Figura 33 – Corsa elettroforetica del ceppo 2049 ribotipo 2 tossinotipo “nuovo”.



5. Verifica della sensibilità *in vitro* ad alcuni chemioantibiotici

Occorre premettere che il saggio di sensibilità *in vitro* è stato eseguito a fini epidemiologici: la resistenza eventualmente rilevata è infatti utilizzabile come indicatore suggestivo della possibile virulenza del ceppo, come suggerito dalla letteratura [22, 51, 145].

Pertanto, sui 43 ceppi *cdtA/B+*, selezionati in precedenza per lo studio del PaLoc, è stata saggiata la sensibilità a moxifloxacina come rappresentante dei fluorochinoloni mediante E-Test (AB Biodisk, Solna, Svezia) e la loro sensibilità a vancomicina, eritromicina, clindamicina, metronidazolo mediante Sensititre (Trek diagnostic system ltd., England) ed i risultati ottenuti sono mostrati nella **tabella 6**.

Tabella 6 - Risultati del saggio di sensibilità *in vitro* di 41 ceppi di *C. difficile* a 5 chemio-antibiotici

Categoria	Vancomicina N° ceppi (%)	Eritromicina N° ceppi (%)	Clindamicina N° ceppi (%)	Metronidazolo N° ceppi (%)	Moxifloxacina N° ceppi (%)
Sensibile	42 (97,7)	22 (51,2)	40 (93)	42 (97,7)	21 (48,8)
Intermedio	1 (2,3)	0	2 (4,6)	0	1 (2,4)
Resistente	0	21 (48,8)	1 (2,4)	1 (2,3)	21 (48,8)

Questi risultati mettono in evidenza come il 48,8% dei ceppi saggiati sia resistente a moxifloxacina ed eritromicina. Va sottolineato che nel 90,5% dei casi la resistenza a questi due antibiotici era simultanea.

Il ceppo resistente alla clindamicina era come prevedibile ugualmente resistente anche all'eritromicina, mentre quello resistente al metronidazolo era sensibile a tutti gli altri farmaci saggiati.

6. Disamina delle cartelle cliniche in particolare di pazienti coinvolti in due epidemie nosocomiali

Al fine di stabilire una correlazione tra il ceppo batterico tossinogenico (ordinario e/o variante) e gravità della malattia è stata eseguita un'attenta disamina delle cartelle cliniche di 63 pazienti per la maggior parte coinvolti in due importanti episodi epidemici (dic. 2002-sett. 2003; apr.-sett. 2006) utilizzando nella valutazione il questionario elaborato e proposto dallo Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD) dell' European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).ù

Epidemia nosocomiale (dicembre 2002-settembre 2003)

In un arco di tempo di 10 mesi sono stati isolati 18 ceppi di *C. difficile* dei 38 complessivamente ritrovati, successivamente caratterizzati nell'ambito del nostro studio come ceppi varianti NAP7/ribotipo 078 tossinotipo V, da 15 pazienti ricoverati in 3 diversi reparti geriatrici tutti localizzati nello stesso edificio ed aventi in comune il Centro Riabilitativo. L'età media dei pazienti era di 72 anni (intervallo da 48 a 95 anni) e tutti i pazienti presentavano gravi condizioni di comorbidità durante il decorso di una CDAD clinicamente

severa. Dieci pazienti, infatti, erano affetti da vasculopatie cerebrali, tre pazienti erano stati ricoverati per riabilitazione, resasi necessaria come conseguenza di postumi di fratture agli arti inferiori, ed una paziente di 80 anni presentava al momento del ricovero una diarrea profusa, che persisteva da 10 giorni durante la degenza in un altro ospedale prima del trasferimento nel reparto geriatrico. Dopo 4 giorni dal ricovero la diagnosi rapida di laboratorio, condotta sul campione fecale di quest' ultima paziente, risultava positiva per la ricerca della GDH e della tossina A di *C. difficile* a conferma del sospetto clinico di CDAD. Si trattava cronologicamente del primo paziente, in cui la CDAD in atto era sostenuta da questo ceppo ipervirulento, che è circolato poi nei reparti sopraccitati e negli altri 14 pazienti esaminati.

Cinque di questi 15 pazienti sono andati incontro a episodi ricorrenti di CDAD in un periodo compreso tra 1 e 3 mesi dal primo episodio, che hanno rappresentato molto probabilmente delle recidive, essendo sostenute dallo stesso ceppo ipervirulento come sopradescritto. Nessuno dei pazienti è deceduto durante il ricovero, ma non è stato possibile sapere il decorso clinico successivo nei tre mesi dall'avvenuta dimissione.

Epidemia nosocomiale (aprile- settembre 2006)

In un arco di tempo di 6 mesi sono stati isolati 63 ceppi di *C. difficile*, successivamente caratterizzati nell'ambito del nostro studio come ceppi non varianti A+B+CDT- ribotipo 17 tossinotipo 0, da 42 pazienti ricoverati in diversi reparti pneumologici, tutti localizzati nello stesso edificio. L'età media dei pazienti era di 70,5 anni (intervallo da 44 a 99 anni) e tutti i pazienti presentavano al momento del ricovero una grave insufficienza respiratoria dovuta a patologie polmonari acute o croniche, accompagnata da importanti condizioni di comorbidità su base cardiaca e/o cerebrale nonché oncologica (4 pazienti). E' stato possibile definire il decorso clinico della CDAD per la quasi totalità dei pazienti da severo (57,1% dei casi, per due dei quali era stata anche confermata con la colonscopia una colite ulcerosa) a grave (40,5%). Uno solo di questi è andato incontro ad un secondo episodio di CDAD a distanza di un mese dal primo episodio, che ha rappresentato una recidiva della malattia, essendo sostenuta dallo stesso ceppo A+B+CDT- ribotipo17 tossinotipo 0. Quattordici pazienti su un totale di 42 (33,33%) sono deceduti durante il ricovero entro un mese dalla diagnosi di CDAD, ma è stato possibile solo in tre casi ipotizzare che *C. difficile* abbia rappresentato una concausa del decesso.

Dati clinici relativi a ceppi varianti di raro riscontro.

Il ceppo CD 2869 A+B+CDT+ ribotipo 11 tossinotipo XXIV è stato isolato dalla ferita chirurgica infetta di un paziente di 64 anni, conseguente ad un intervento chirurgico all'addome per ADK del colon; il ceppo CD 2467 A+B+CDT+ ribotipo 16 tossinotipo XXIV è stato isolato dal pus, drenato in corso di intervento chirurgico ginecologico, di una paziente di 45 anni con ascesso addomino-pelvico e perforazione ileale.

Da due pazienti pediatrici di due anni, ricoverati per gastroenterite, sono stati isolati rispettivamente il ceppo CD 2276 A+B+CDT+ ribotipo 14 tossinotipo V ed il ceppo A+B+CDT+ ribotipo 10 tossinotipo IX. Il ceppo CD 2081 A+B+CDT+ ribotipo 4 tossinotipo IV è stato, al contrario, isolato da un paziente pediatrico di 7 anni non diarroico ed, infine, CD 2049 A+B+CDT- ribotipo 2 tossinotipo "nuovo", non ancora riportato in letteratura, è stato ritrovato nelle feci di una paziente di 12 anni, ricoverata in Gastroenterologia pediatrica per epigastralgia, nausea e vertigini.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dei 438 ceppi di *C. difficile* esaminati in questo studio, complessivamente isolati da 334 pazienti ricoverati in diversi reparti dell'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma e conservati in collezione, 390 sono risultati tossinogenici e di questi 125 (32,1%) presentano i geni codificanti la tossina binaria CDT, che caratterizza i ceppi varianti. Questi ceppi rappresentano il 44% dei ceppi tossinogenici isolati negli anni 2001-2003 e solo il 13% dei ceppi isolati negli anni 2004-2006, un dato che appare in controtendenza rispetto a quelli osservati in altri Paesi [107].

Tutti i 438 ceppi isolati sono stati tipizzati a fini epidemiologici mediante "PCR-ribotyping"; sono stati trovati 76 differenti ribotipi denominati arbitrariamente dal numero 1 al numero 76.

In particolare, per quanto riguarda i 125 ceppi *ctdA+* *ctdB+* sono stati trovati 8 differenti ribotipi. Il ribotipo più diffuso tra i ceppi varianti è il ribotipo 1, che caratterizza il 94,4% di questi ceppi (118 su 125 totali); in particolare, 103 ceppi (82,4%) appartengono al sottotipo 1a.

Va sottolineato che, grazie ad una collaborazione con la dott.ssa Limbago del Centers for Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, U.S.A., i nostri ceppi varianti ribotipo 1a sono stati riclassificati mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e rinominati secondo la nomenclatura internazionale mediante PCR-ribotyping come NAP7/ribotipo 078.

Quarantatrè dei 125 ceppi potenzialmente CDT+ sono stati selezionati per le successive fasi di analisi del PaLoc e della sensibilità *in vitro* ai chemioantibiotici. Dei 43 ceppi varianti selezionati in base al ribotipo ed analizzati mediante "toxintyping" l'86% appartiene al tossinotipo V, che caratterizza anche la totalità dei ceppi ribotipo 1.

Quattro dei 125 ceppi potenzialmente CDT+ sono stati tipizzati come tossinotipo XXIV, ma hanno mostrato un ribotipo differente tra loro: 5 (2 ceppi), 11 e 16. Il tossinotipo XXIV è raramente descritto in letteratura; è caratterizzato da un PaLoc analogo al quello del ceppo di riferimento VPI 10463 (tossinotipo "0"), ma possiede i geni codificanti per la tossina binaria *tcdA* e *tcdB* contrariamente a quanto osservabile nel ceppo di riferimento stesso.

Una revisione di ceppi isolati nel recente passato ha messo in evidenza casi di malattia da infezione associata a *Clostridium difficile* causati da ceppi tossinotipo V. Questo tossinotipo è stato segnalato come una delle cause di epidemia in suini neonati e vitelli; inoltre, ceppi tossinotipo V sono considerati una crescente causa di CDAD nell'uomo. In uno

studio condotto da Jhung et al. ceppi isolati da alimenti di origine animale e ceppi isolati dall'uomo hanno mostrato elevato grado di somiglianza fenotipica e genotipica ed in alcuni casi apparivano indistinguibili. Inoltre, tutti i ceppi, sia di origine animale sia di origine umana, presentavano una delezione di 39 pb nel gene *tcdC* ed i geni codificanti la tossina binaria. Sebbene *C. difficile* sia riconosciuto come causa di malattia in diverse specie animali [62, 119, 197] poco ricerche sono state condotte sulla potenziale trasmissione interspecie animale-uomo. Alcuni studi hanno suggerito la possibile trasmissione di *C. difficile* tra uomo e animali domestici [111, 132], ma non sono state documentate trasmissioni interspecie e pochi studi hanno esaminato il possibile legame tra CDAD nell'uomo ed il potenziale veicolo offerto da prodotti alimentari animali. L'identificazione della stessa variante tossinotipica per entrambi i ceppi (umani e animali) in questo studio suggerisce tre possibili cause di trasmissione: 1) l'esposizione di esseri umani e animali ad una comune sorgente ambientale di *C. difficile*, 2) la malattia nell'uomo è causata dalla trasmissione diretta o indiretta da animali vivi infetti, e 3) la malattia umana è legata al consumo di prodotti provenienti da animali. Tuttavia, la somiglianza genetica dei ceppi umani e animali e la crescente importanza del tossinotipo V nelle CDAD umane, dopo la loro comparsa negli animali, suggerisce inequivocabilmente una via di trasmissione da animale a uomo mediante alimenti o altre forme di sottoprodotti di origine animale.

Inoltre ceppi tossinotipo V sembrano essere un'importante causa di CDAD legata alla produzione alimentare suina in alcune parti d'Europa, così come in Nord America [141].

Lo studio epidemiologico condotto da Jhung riporta anche che tutti i ceppi tossinotipo V isolati da cibi animali e da uomo mostrano una iperproduzione delle tossine A e B (264 µg/mL e 62 µg/mL, rispettivamente, dopo 72h) rispetto al ceppo di riferimento tossinotipo "0" VPI 10463 (85 µg/mL e 9 µg/mL, rispettivamente, dopo 72h).

Risulta di conseguenza interessante osservare come, nel nostro studio, i 18 ceppi varianti dei 38 NAP7/ribotipo 078 tossinotipo V sono stati isolati in un arco di tempo di 10 mesi (Dicembre 2002-Settembre 2003) da 15 pazienti ricoverati in 3 diversi reparti geriatrici localizzati nello stesso edificio, aventi in comune il Centro Riabilitativo. Cinque di questi 15 pazienti hanno presentato episodi recidivanti di CDAD in un periodo compreso tra 1 e 3 mesi dal primo episodio, che rappresentano molto probabilmente delle recidive essendo sostenute dallo stesso ceppo ipervirulento come sopradescritto.

Tutti i ceppi appartenenti a questi 15 pazienti sono risultati inoltre resistenti a moxifloxacina ed eritromicina (MIC \geq 32 mg/mL), come riportato in letteratura relativamente a ceppi particolarmente virulenti responsabili di episodi epidemici nosocomiali. Infatti, in

particolare, la letteratura riporta che sia i ceppi ipervirulenti Nap1/Ribotipo 027 sia i ceppi Nap7/Ribotipo 078 sono risultati costantemente resistenti ai fluorochinoloni, fatto che pertanto potrebbe avere offerto loro un vantaggio, venendo selezionati in corso di terapia *in vivo* e conseguentemente nell'ambiente [22, 51, 89, 145].

Nel nostro studio, relativamente all'analisi mediante PCR-ribotyping dei 313 ceppi non varianti è stata riscontrata la presenza di 4 ribotipi predominanti: il ribotipo 13 (45 ceppi, 14,4%), il ribotipo 17 (85 ceppi, 27,3%), il ribotipo 18 (32 ceppi, 10,3%) e il ribotipo 33 (28 ceppi, 9%). Tra questi, un ceppo appartenente al ribotipo 17 è stato responsabile dell'epidemia che ha coinvolto 42 pazienti ricoverati nei Reparti pneumologici (apr.-sett. 2006).

L'analisi del gene regolatore negativo *tcdC* ha mostrato che i ceppi ribotipo 1 tossinotipo V posseggono un allele, già descritto in letteratura [42], denominato A1, che presenta oltre ad una delezione di 39 pb una mutazione non senso con la conseguente produzione di una proteina tronca, composta da soli 61 aminoacidi rispetto ai 232, che compongono la proteina integra e funzionale. All'interno del ribotipo 1 solo i tre ceppi ribotipo 1c tossinotipo V hanno mostrato la presenza di una nuova sequenza allelica denominata "nuovo 1", dotata di 4 mutazioni puntiformi silenti, che pertanto non producono un'alterazione nella sequenza aminoacidica rispetto a quella del ceppo di riferimento VPI 10463.

Una variabilità maggiore si è osservata, al contrario, con i ceppi che presentavano ribotipo diverso da 1. Il ceppo ribotipo 4 tossinotipo IV presenta un allele non ancora descritto in letteratura denominato "nuovo 2". Questo allele oltre a 4 mutazioni puntiformi silenti, due mutazioni puntiformi con cambiamento aminoacidico e una delezione di 54 pb, presenta una mutazione non senso con conseguente produzione di una proteina composta da una nuova sequenza di soli 61 aminoacidi.

Il ceppo ribotipo 10 tossinotipo IX presenta un allele non ancora descritto in letteratura denominato "nuovo 3". In questo allele è presente una delezione puntiforme, che porta allo slittamento di tutte le basi, conducendo ad una mutazione non senso con conseguente produzione di una proteina composta da soli 65 aminoacidi non ancora descritta in letteratura. Inoltre, il ceppo CD 2276 ribotipo 14 tossinotipo V, per il quale sono stati disegnati primers specifici, è dotato di un allele non ancora descritto denominato "nuovo 4". Esso presenta 8 mutazioni puntiformi silenti, 3 mutazioni puntiformi (Serina → Isoleucina; Alanina → Ac. Aspartico; Prolina → Serina), una delezione di 18 pb, ma soprattutto due mutazioni di stop,

che portano alla formazione di una proteina tronca formata da 61 aminoacidi non ancora descritta in letteratura.

Il ceppo ribotipo 16 tossinotipo XXIV presenta 4 mutazioni puntiformi silenti, una mutazione puntiforme (Glicina → Valina) ed una delezione di 18 pb. Questo allele non ancora descritto in letteratura è stato denominato “nuovo 5” e porta ad una sequenza aminoacidica completamente nuova.

Riassumendo, sono state trovate 5 nuove sequenze alleliche e tre proteiche non ancora descritte in letteratura. Per le proteine risultate tronche si può ipotizzare una non funzionalità della proteina stessa. Pertanto per i ceppi ribotipo 1a tossinotipo V, predominanti nel nostro ambiente tra quelli produttori anche della tossina binaria (82,4 %), che posseggono una proteina TcdC di soli 61 aminoacidi e quindi non funzionale, può essere ipotizzata una iperproduzione delle tossine principali A e B. La gravità della CDAD, riscontrata nei 15 pazienti ricoverati in 3 diversi reparti geriatrici e coinvolti nella epidemia ospedaliera sopradescritta (dic. 2002-sett. 2003), è probabilmente correlata a questa alterazione del gene *tcdC* da noi dimostrata nei ceppi ribotipo 1a tossinotipo V isolati da tutti i pazienti indagati. L’ipotesi dovrebbe essere dimostrata verificando l’effettiva produzione delle tossine A e B da parte di questi ceppi, mediante Westen Blot come descritto da Matamouros e collaboratori [120].

Occorre inoltre sottolineare che in uno dei quattro ceppi tossinotipo XXIV sono state riscontrate 5 mutazioni puntiformi (4 silenti) ed una delezione di 18 pb. Mutazioni insolite per questo tossinotipo, che normalmente presenta un PaLoc identico a quello del ceppo VPI 10463. La letteratura attuale riporta che l’unica differenza tra il tossinotipo XXIV e il tossinotipo “0” è la presenza dei geni della tossina binaria nel primo, geni però situati esternamente al PaLoc [158, 161, 164].

Va infine sottolineata la presenza di un nuovo tossinotipo non ancora descritto in letteratura [164]. Questo è un dato molto significativo, ma non deve comunque sorprendere dal momento che solo in questi ultimi anni è stata considerata l’importanza del tossinotipo. Questa nuova consapevolezza ha portato ad indagare il PaLoc di ceppi isolati in tutto il mondo, portando ad un continuo aggiornamento dei tossinotipi trovati [164].

In conclusione, è importante sottolineare che nessun ceppo isolato dai pazienti del nostro ospedale nel periodo considerato è risultato PCR-ribotype 027 toxinotype III, il clone epidemico attualmente circolante in molti Paesi Europei e non, responsabile di gravi epidemie con esito mortale per alcuni pazienti. Analogamente nessuno dei nostri ceppi di *C. difficile* è

risultato A-B+, benché questi ceppi siano ormai considerati responsabili di infezioni ospedaliere ed acquisite in comunità [164].

Tuttavia, il nostro studio sottolinea inequivocabilmente l'importanza dell'analisi molecolare, che va condotta per un attento e costante monitoraggio dei ceppi di *C. difficile* circolanti in ambiente ospedaliero. Queste indagini molecolari si sono rese ormai indispensabili per la sempre più elevata diffusione di ceppi ipervirulenti, come dimostrano i ceppi Nap7/Ribotipo078 tossinotipo V, comparsi nel nostro ospedale nel 2002-2003, responsabili di una grave epidemia ospedaliera.

CLINICAL QUESTIONNAIRE FOR PATIENT WITH A POSITIVE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* STOOL CULTURE

IDENTITY

Hospital
 Country code (letter A,B...): /____/
 Hospital number (I,II,III...): /____/
 Ward: Medical
 Surgical
 ICU
 Obstetrics

Patient
 Birth data: /___/___/___/
 Sex: M F
 Date of admission in hospital: /___/___/___/
 McCabe* score: (A,B,C): /____/

Stool
 Registration number of the case (1,2,3,4...): /____/
 Date of stool culture /___/___/___/
 Aspect of stools: normal
 hemorrhagic
 liquid
 loose

Has *C. Difficile* been specifically requested by physician Y N

Reason for hospitalization:.....

CLINICAL STATUS

Patients with PMC (endoscopically or histologically proven)
 Patients with mild diarrhea
 Patients with severe diarrhea or colitis and no endoscopic examination
 Patients with severe diarrhea or colitis and no PMC
 Asymptomatic carriage

CLINICAL DATA

Clinical diarrhea (>2 unformed stools/day for at least 2 days): Y N
 Nosocomial diarrhea** Y N
 Is diarrhea responsible for hospitalization? Y N
 Length of diarrhea*** less 2 days 2-7 days more than 7 days
 Abdominal pain: Y N
 Fever (>38°C) Y N
 Presence of ascite or ileus or large bowel wall thickening Y N
 Neutrophil polynuclear count: /_____ / mm³
 Albuminemia /_____ / g/l

Other enteropathogens found in stool culture:

<input type="checkbox"/> None	<i>Salmonella</i>	<input type="checkbox"/> Note done	<input type="checkbox"/> Y	<input type="checkbox"/> N
	<i>Campylobacter</i>	<input type="checkbox"/> Note done	<input type="checkbox"/> Y	<input type="checkbox"/> N
	<i>Shigella</i>	<input type="checkbox"/> Note done	<input type="checkbox"/> Y	<input type="checkbox"/> N
	<i>Yersinia</i>	<input type="checkbox"/> Note done	<input type="checkbox"/> Y	<input type="checkbox"/> N
	Other (precise)	<input type="checkbox"/> Note done	<input type="checkbox"/> Y	<input type="checkbox"/> N (/_____/)

To your knowledge, this is the first episode of *C. Difficile* infection: Y N Unknown

*Mac Cabe A: no fatal disease; Mac Cabe B: fatal disease in the following 5 years; Mac Cabe C: fatal disease in the following year 94
 nosocomial diarrhea: diarrhea occurring at least 48 h after admission *length = date of diagnosis – date of onset of diarrhea

RISK FACORS

Antibiotic treatment in the preceding month of positive testing Y N

	Name of Antibiotic (ATB)	Number of ATB-days (date of end – date of beginning)	Administration route (IV, IM, oral...)
ATB1			
ATB2			
ATB3			
ATB4			

Abdominal surgery in the preceding month: Y N Unknown

Previous hospitalization in the preceding month: Y N Unknown

Digestive decontamination in the preceding month: Y N Unknown

Chemiotherapy in the preceding month: Y N Unknown

Abdominal surgery in the preceding month: Y N Unknown

Nasogastric tube in the preceding month: Y N Unknown

AIDS patient (CD4<200mm³): Y N Unknown

ENDOSCOPIC EXAMINATION

Did the patient get an endoscopic examination (+ 7 days around the diagnosis): Y N

If Yes

Date: /___/___/___/ Macroscopic aspect:

Type rectosigmoidoscopy

colonoscopy

other

Pseudomembrans

Superficial or deep ulceations

Erythema

Purpura

Normal

Other (precise:.....)

Has patient have a radiologic examination

Y N

If Yes

Abdominal radiografy

Ultrasound

Computed Tomography (CT)

TREATMENT / OUTCOME

Has the patient been specifically treated for *C. difficile* diseases: Y N

If Yes

Metronidazole

Date of beginning: /___/___/___/ date of end: /___/___/___/ regimen: route:

Vancomycin

Date of beginning: /___/___/___/ date of end: /___/___/___/ regimen: route:

Other (*Saccharomyces boulardii*, Bacitracin, Fusidic acid.....)

Surgery

Outcome in the following 10 days:

Improvement of diarrhea

Persistence of diarrhea

Death

Date of death: /___/___/___/

Related to *C. difficile* disease Y N

Unknown

Relapses in the following 3 months****

Y

N

Unknown

**** Drop temporarily this question, but keep a list of included patients and check relapses 3 months later

BIBLIOGRAFIA

1. Ades S.E. (2004) Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 157–162.
2. Akerlund T., Svenungsson B., Lagergren A., Burman L.G. (2006) Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields *in vitro* of corresponding isolates. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 353–358.
3. Aktories K. and Wegner A. (1992) Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol. Microbiol.* **6**: 2905–2918.
4. Al-Barrak A., Embil J., Dyck B., Olekson K., Nicoll D., Alfa M., Kabani A. (1999) An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can. Commun. Dis. Rep.* **1**: 65–69.
5. Allen S.D., Emery C.L. and Lyerly D.M. (2003) *Clostridium*. In: Murray P., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. (Eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington D.C., 835-856.
6. Alonso R., Martin A., Pelaez T., Marin M., Rodriguez-Creixéms M. and Bouza E. (2005) Toxigenic status of *Clostridium difficile* in a large Spanish teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* **54**: 159-162.
7. Anand A. and Glatt A.E. (1993) *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 109–113.
8. Apisarnthanarak A., Zack J.E., Mayfield J.L., Freeman J., Dunne W.M., Little J.R., Mundy L.M., Fraser V.J. (2004) Effectiveness of environmental and infection control programs to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 601–602.
9. Babudieri S., Borriello S.P., Pantosti A., Luzzi I., Testore G.P., Panichi G. (1986) Diarrhoea associated with toxigenic *Clostridium spiroforme*. *J Infect.***12**: 278–9.
10. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (1991) A handbook on the biology of Bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
11. Barbut F., Petit J.C. (2001) Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 405–410.
12. Barroso L.A., Moncrief J.S., Lyerly D.M. and Wilkins T.D. (1994) Mutagenesis of the *Clostridium difficile* toxin B gene and effect on cytotoxic activity. *Microb. Pathog.* **16**: 297–303.
13. Barth H., Pfeifer G., Hofmann F., Maier E., Benz R., Aktories K. (2001) Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 10670–10676.
14. Barth H., Aktories K., Popoff M.R. and Stiles B.G. (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 373–402.
15. Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L. and Kasper D.L. (1977) Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.* **136**: 701–705.
16. Bartlett J.G., Gorbach S.L. (1979) Pseudomembranous enterocolitis (antibiotic-related colitis). *Adv. Intern. Med.* **22**: 646–656.
17. Bartlett J.G. (1992) Antibiotic-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.***15**: 573–581.

18. Bartlett J.G. (1996) Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **8**: 1054–1061.
19. Bartlett J.G. (2002) Clinical practice antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J. Med.* **346**: 334–339.
20. Bendinelli M., Chezzi C., Dettori G., Manca N., Morace G., Polonelli L., Tufano M.A. (2006) Batteri anaerobi obbligati. In Bendinelli M., Chezzi C., Dettori G., Manca N., Morace G., Polonelli L., Tufano M.A. (Editori), Microbiologia medica, Batteriologia, 1ed, Monduzzi editore Italia, 303-344.
21. Bidet P., Lalande V., Salauze B., Burghoffer B., Avesani V., Delmée M., Rossier A, Barbut F and Petit J.C. (2000) Comparison of PCR-Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2484-2487.
22. Biller P., Shank B., Lind L., Brennan M., Tkatch L., Killgore G., Thompson A., McDonald L.C. (2007) Moxifloxacin therapy as a risk factor for *Clostridium difficile*-associated disease during an outbreak: attempts to control a new epidemic strain. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **28**: 198–201.
23. Boone N., Eagan J.A., Gillern P., Armstrong D., Sepkowitz K.A. (1998) Evaluation of an interdisciplinary re-isolation policy for patients with previous *Clostridium difficile* diarrhea. *Amer. J. Infect. Control.* **26**: 584–587.
24. Borriello S.P. (1979) *Clostridium difficile* and its toxin in the gastrointestinal tract in health and disease. *Research and Clinical Forums* **1**: 33-35.
25. Borriello S.P. and Honour P. (1981) Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *J. Clin. Pathol.* **34**: 1124-1127.
26. Borriello S.P. (1984) *Clostridium difficile* and gut disease. In: Good-win C.S. (ed). Microbes and Infections of the gut. Blackwell Scientific. Melbourne, 327-346.
27. Borriello S.P. Davies H.A., Barclay F.E. (1988) Detection of fimbriae among strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 65-67.
28. Borriello S.P. Welch A.R., Barclay F.E. and Davies H.A. (1988) Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* **25**: 191-196.
29. Borriello S.P., Wren B.W., Hyde S., Seddon S.V., Sibbons P., Krishna M.M., Tabaqchali S., Manek S. and Price A.B. (1992) Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**: 4192–4199.
30. Braun V., Hundsberger T., Leukel P., Sauerborn M. and von Eichel-Streiber C. (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* **181**: 29–38.
31. Braun M., Herholz C., Straub R., Choizat B., Frey J., Nicolet J. and Kuhnert P. (2000) Detection of the ADP-ribosyltransferase toxin gene (*cdtA*) and its activity in *Clostridium difficile* isolates from Equidae. *FEMS Microbiology Letters.* **184**: Issue 1: 29-33.
32. Brazier J.S. (1993) Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **16**, Suppl. 4: S228-33.
33. Brazier J.S. and Borriello S.P. (2000) Microbiology, Epidemiology and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. In: Aktories K. and Wilkins T.D. (Eds) *Clostridium difficile*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-27.
34. Brooks S.E., Veal R.O., Kramer M., Dore L., Schupf N., Adachi M. (1992) Reduction in the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an acute care hospital and a skilled nursing facility following replacement of electronic thermometers with single-use disposables. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **13**: 98–103.

35. Brown K.L. and Hughes K.T. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol.* **16**: 397–404.
36. Busch C., Hofmann F., Selzer J., Munro J., Jeckel D. and Aktories K. (1998) A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J. Biol. Chem.* **273**: 19566–19572.
37. Carman R.J., Perelle S., Popoff MR. (1997) Binary toxins from *Clostridium spiroforme* and *Clostridium perfringens*. In: Rood J.I., cClane B.A., Glenn Songer J., Titball R.W. (editors). The clostridia: molecular biology and pathogenesis, London, Academic Press, 359–67.
38. Carter G.P., Lyras D., Allen D.L., Mackin K.E., Howarth P.M., O'Connor J.R., and Rood J.I. (2007) Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. *J. Bacteriol.* **189**: 7290-301.
39. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005) Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk-four states. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **54**: 1201–1205.
40. Cohen S.H., Tang Y.J., Hansen B. and Silva J. Jr. (1998) Isolation of a toxin B-deficient mutant strain of *Clostridium difficile* in a case of recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.* **26**: 410–412.
41. Coignard B., Barbut F., Blanckaert K., Thiolet J.M., Poujol I., Carbonne A., Petit J.C., Desenclos J.C. (2006) Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France, 2006. *Euro Surveill.* **11**: E060914.1.
42. Curry S.R., Marsh J.W., Muto C.A., O'Leary M.M., Pasculle A.W. and Harrison L.H. (2007) *tcdC* Genotypes Associated with Severe *TcdC* Truncation in an Epidemic Clone and Other Strains of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 215-221.
43. Dailey D.C., Kaiser A. and Schloemer R.H. (1987) Factors influencing the phagocytosis of *Clostridium difficile* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity.* **55**: 1541–6.
44. Davey P., Brown E., Fenelon L., Finch R., Gould I., Hartman G., Holmes A., Ramsay C., Taylor E., Wilcox M., Wiffen P. (2005) Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 4. Art. No.: CD003543.
45. Davies H.A. and Borriello S.P. (1990) Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microbial Pathogenesis.* **9**: 141–6.
46. Delmèe M. (2001) Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 411-416.
47. Delmee M., Ramboer I., Van Broeck J., Suetens C. (2006) Epidemiology of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium, *Euro Surveill* **11**: E060914.2.
48. Depitre C., Delmee M., Avesani V., L'Haridon R., Roels A., Popoff M. and Corthier G. (1993) Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A. *J. Med. Microbiol.* **38**: 434–441.
49. Drudy D., Calabi E., L. Kyne L., Sougioultzis S., Kelly E., Fairweather N., and Kelly C.P. (2004) Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**: 237–242.
50. Drudy D., Fanning S., Kyne L. (2007) Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int. J. Infect. Dis.* **11**: 5–10.
51. Drudy D., Harnedy N., Fanning S., Hannan M., Kyne L. (2007) Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **28**: 932–940.

52. Dupuy B., Mani N., Katayama S. and Sonenshein A.L. (2005) Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel sigma factor. *Mol Microbiol* **55**: 1196–1206.
53. Dupuy B., Govind R., Antunes A. and Matamouros S. (2008) *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J. Med. Microbiol.* **57**: 685-9.
54. Dvorsky R. and Ahmadian M. R. (2004) Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* **5**: 1130–1136.
55. Egerer M., Giesemann T., Jank T., Satchell K.J., Aktories K. (2007) Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on a cysteine protease activity. *J. Biol. Chem.* **282**: 25314–25321.
56. Eichel-Streiber C., Laufenberg-Feldmann R., Saringen S., Shulze J. and Sauerborn M. (1992) Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 260–268.
57. Etienne-Manneville S. and Hall A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* **420**: 629–635.
58. Eveillard M., Fourel V., Barc M.C., Kerneis S., Coconnier M.H., Karjalainen T., Bourlioux P. and Servin A.L. (1993) Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT 29 cells in culture. *Mol. Microbiol.* **7**:371–81.
59. Faust C., Ye B. and Song K.P. (1998) The enzymatic domain of *Clostridium difficile* toxin A is located within its N-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun.* **251**: 100–105.
60. Fekety R., Shah A.B. (1993) Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA.* **6**: 71–75.
61. Florin I. and Thelestam M. (1983) Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **763**: 383–392.
62. Frazier K.S., Herron A.J., Hines M.E. II, Gaskin J.M., Altman N.H. (1993) Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 623–5.
63. Frisch C., Gerhard R., Aktories K., Hofmann F. and Just I. (2003) The complete receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A is required for endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**: 706–711.
64. George W.L. (1996) Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 233-234.
65. Gerding D.N. (1989) Disease associated with *Clostridium difficile* infection. *Ann. Intern. Med.* **110**: 255–257.
66. Gerding D.N., Johnson S., Peterson L.R., Mulligan M.E., Silva J. Jr. (1995) *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **16**: 459–477.
67. Geric B., Rupnik M., Grabnar M., Sambol S., Gerding D., Johnson S. (2001) Frequency of binary toxin genes in toxin B-negative *Clostridium difficile* (CD) strains. Proceedings of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, USA.
68. Geric B., Johnson S., Gerding D.N., Grabnar M. and Rupnik M. (2003) Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5227–5232. ;

69. Geric B., Rupnik M., Gerding D.N., Grabnar M. and Johnson S. (2004) Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. *J. Med. Microbiol.* **53**: 887–894.
70. Geric B., Carman R.J., Rupnik M., Genheimer C.W., Sambol S.P., Lysterly D.M., Gerding D.N. and Johnson S. (2006) Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J. Infect. Dis.* **193**: 1143–1150.
71. Geszvain K. and Landick R. (2005) The structure of bacterial RNA polymerase. <http://www.bact.wisc.edu/landick/>.
72. Geyer M., Wilde C., Selzer J., Aktories K. and Kalbitzer H.R. (2003) Glucosylation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin: consequences for the effector loop conformations observed by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **42**: 11951–11959.
73. Giesemann T., Egerer M., Jank T. and Aktories K. (2008) Processing of *Clostridium difficile* toxins. *J. Med. Microbiol.* **57**: 690–696
74. Goncalves C., Decre D., Barbut F., Burghoffer B., and Petit J.C. (2004) Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1933–1939.
75. Govind R., VEDIYAPPAN G., Rolfe R.D. and Fralick J.A. (2006) Evidence that *Clostridium difficile* TcdC is a membrane-associated protein. *J. Bacteriol.* **188**: 3716–3720.
76. Hafiz S. (1974) *Clostridium difficile* and its toxins. (Thesis, PhD, Department of Microbiology, University of Leeds). In: Brazier J.S. and Borriello S.P. Microbiology, Epidemiology and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. (2000). In: Aktories K. and Wilkins T.D. (Eds) *Clostridium difficile*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-27.
77. Hafiz S. and Oakley C.L. (1976) *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *J. Med. Microbiol.* **9**: 129–36.
78. Hammond G.A. and Johnson J.L. (1995) The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb. Pathog.* **19**: 203–213.
79. Helmann J.D. (1999) Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 135–141.
80. Hirschhorn L.R., Trnka Y., Onderdonk A., Lee M.L., Platt R. (1994) Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Infect. Dis.* **169**: 127–133.
81. Ho J.G., Greco A., Rupnik M. and Ng K.K. (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 18373–18378.
82. Hofmann F., Busch C., Prepens U., Just I. and Aktories K. (1997) Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J. Biol. Chem.* **272**: 11074–11078.
83. Hubert B., Loo V.G., Bourgault A.M., Poirier L., Dascal A., Fortin E., Dionne M., Lorange M. (2007) A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Québec. *Clin. Infect. Dis.* **44**: 238–244.
84. Hundsberger T., Braun V., Weidmann M., Leukel P., Sauerborn M. and von Eichel-Streiber C. (1997) Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem.* **244**: 735–742.
85. Jank T., Giesemann T. and Aktories K. (2007a) *Clostridium difficile* glucosyltransferase toxin B – essential amino acids for substrate binding. *J. Biol. Chem.* **282**: 35222–35331.

86. Jank T., Giesemann T. and Aktories, K. (2007b) Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology* **17**: 15R–22R.
87. Jank T., Reinert D.J., Giesemann T., Schulz G.E. and Aktories K. (2005) Change of the donor substrate specificity of *Clostridium difficile* toxin B by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **280**: 37833–37838.
88. Jernigan J.A., Siegman-Igra Y., Guerrant R.C., Farr B.M. (1998) A randomized crossover study of disposable thermometers for prevention of *Clostridium difficile* and other nosocomial infections. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **19**: 494–499.
89. Jhung M.A., Thompson A.D., Killgore G.E., Zukowski W.E., Songer G., Warny M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald L.C. and Limbago B.M. (2008.) Toxinotype V *Clostridium difficile* in Humans and Food Animals. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 1039-1045.
90. Johnson J.L. and Francis B.S. (1975) Taxonomy of the *Clostridia*: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 229-244.
91. Johnson S., Clabots C.R., Linn F.V., Olson M.M., Peterson L.R., Gerding D.N. (1990) Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet* **336**: 97–100.
92. Johnson S., Gerding D.N., Olson M.M., Weiler M.D., Hughes R.A., Clabots C.R., Peterson L.R. (1990) Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *Am. J. Med.* **88**: 137–140.
93. Johnson S., Sambol S.P., Brazier J.S., Delmee M., Avesani V., Merrigan M.M. and Gerding D.N. (2003) International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1543–1547.
94. Jousimies-Somer H.R., Summanen P., Citron D.M., Baron E.J., Wexler H.M., Finegold S.M. (2002) Wadsworth- KTL, Anaerobic Bacteriology Manual (6Eds), Publishing company, U.S.A.
95. Just I., Selzer J., Wilm M., von Eichel-Streiber C., Mann M. and Aktories K. (1995) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**: 500–503.
96. Just I. and Gerhard R. (2004) Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**: 23–47.
97. Karjalainen T., Barc M.C., Collignon A., Trolle S., Boureau H., Cotte-Laffitte J. and Bourlioux P. (1994) Cloning of a genetic determinant from *Clostridium difficile* involved in adherence to tissue culture cells and mucus. *Infect. Immun.* **62**: 4347–55.
98. Karlinsey J.E., Tanaka S., Bettenworth V., Yamaguchi S., Boos W., Aizawa S.I. and Hughes K.T. (2000) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Mol. Microbiol.* **37**: 1220–1231.
99. Karlsson S., Dupuy B., Mukherjee K., Norin E., Burman L.G. and Akerlund T. (2003) Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect. Immun.* **71**: 1784–1793.
100. Kato H., Ito Y., van den Berg R.J., Kuijper E.J., Arakawa Y. (2007) First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill.* **12**: E070111.3.
101. Kato N., Ou C.Y., Kato H., Bartley S.L., Luo C.C., Killgore G.E., Ueno K. (1993) Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Specimens by the Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.* **167**: 455-158.
102. Kazakova S.V., Ware K., Baughman B., Bilukha O., Paradis A., Sears S., Thompson A., Jensen B., Wiggs L., Bessette J., Martin J., Clukey J., Gensheimer K., Killgore G., McDonald L.C. (2006) A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile*. *Arch. Intern. Med.* **166**: 2518–2524.

103. Kelly C.P., Pothoulakis C., LaMont J.T. (1994) *Clostridium difficile* colitis. *N. Engl. J. Med.* **330**: 257–262.
104. Kim K.H., Fekety R., Batts D.H., Brown D., Cudmore M., Silva J. Jr., Waters D. (1981) Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* **143**: 42–50.
105. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell Jr. V.R., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn Jr. W.C. (1995) I batteri anaerobi. In: Koneman E.W., Allen S.D., Dowell Jr. V.R., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn Jr. W.C. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica, 2^a ed., Antonio Delfino editore *medicina-scienze*, Roma, Italia, 465-547.
106. Kuijper E.J., de Weerd J., Kato H., Kato N., van Dam A.P., van der Vorm E.R., Weel J., van Rheenen C., Dankert J. (2001) Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 528–534.
107. Kuijper E.J., Coignard B., Tüll P.; ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Center for Disease Prevention and Control. (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **12** Suppl 6: 2-18.
108. Kuijper E.J., Barbut F., Brazier J.S., Kleinkauf N., Eckmanns T., Lambert M.L., Drudy D., Fitzpatrick F., Wiuff C., Brown D.J., Coia J.E., Pituch H., Reichert P., Even J., Mossong J., Widmer A.F., Olsen K.E., Allerberger F., Notermans D.W., Delmée M., Coignard B., Wilcox M., Patel B., Frei R., Nagy E., Bouza E., Marin M., Akerlund T., Virolainen-Julkunen A., Lyytikäinen O., Kotila S., Ingebretsen A., Smyth B., Rooney P., Poxton I.R., Monnet D.L. (2007) Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* **12**: E1–E2.
109. Kuijper E.J., van Dissel J.T., Wilcox M.H. (2007) *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**: 376–383.
110. Kyne L., Warny M., Qamar A., and Kelly C.P. (2001) Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* **357**: 189–193.
111. Lefebvre S.L., Arroyo L.G., Weese J.S. (2006) Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1036–7.
112. Levett P.N. (1985) Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Pathol.* **38**: 233-234.
113. Loo V.G., Poirier L., Miller M.A., Oughton M., Libman M.D., Michaud S., Bourgault A.M., Nguyen T., Frenette C., Kelly M., Vibien A., Brassard P., Fenn S., Dewar K., Hudson T.J., Horn R., Rene P., Monczak Y., Dascal A. (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.* **353**: 2442–2449.
114. Lyerly D.M., Barroso L.A., Wilkins T.D., Depitre C. and Corthier G. (1992) Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**: 4633–4639.
115. MacCannell D.R., Louie T.J., Gregson D.B., Laverdiere M. Labbe A.C., Laing A. and Henwick S. (2006b) Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from eastern and western Canada. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2147–2152.
116. Malamou-Ladas H., O’Farrell S., Nash J.Q., Tabaqchali S. (1983) Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards. *J. Clin. Pathol.* **36**: 88–92.
117. Mani N. and Dupuy B. (2001) Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 5844–5849.

118. Mani N., Lyras D., Barroso L., Howarth P., Wilkins T., Rood J.I., Sonenshein A.L. and Dupuy B. (2002) Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J. Bacteriol.* **184**: 5971–5978.
119. Marks S.L., Kather E.J., Kass P.H., Melli A.C. (2002) Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **16**:533–40.
120. Matamouros S., England P. and Dupuy B. (2007) *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol. Microbiol.* **64**: 1274–1288.
121. Mayfield J.L., Leet T., Miller J., Mundy L.M. (2000) Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 995–1000.
122. McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C. Jr., Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S., Gerding D.N. (2005) An epidemic, toxin genevariant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **353**: 2433–2441.
123. McFarland L.V., Mulligan M.E., Kwok R.Y., Stamm W.E. (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* **320**: 204–210.
124. McFarland L.V. Beneda H.W., Clarridge J.E., Raugi G.J. (2007) Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am. J. Infect. Control.* **35**: 237–253.
125. McMullen K.M., Zack J., Coopersmith C.M., Kollef M., Dubberke E., Warren D.K. (2007) Use of hypochlorite solution to decrease rates of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **28**: 205–207.
126. Mehlig M., Moos M., Braun V., Kalt B., Mahony D.E. and Eichel-Streiber C. (2001) Variant toxin B and a functional toxin A produced by *Clostridium difficile* C34. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**: 171–176.
127. Minakhin L. and Severinov K. (2005) Transcription regulation by bacteriophage T4 AsiA. *Protein Expr. Purif.* **41**: 1–8.
128. Moncrief J.S., Barroso L.A. and Wilkins T.D. (1997) Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. *Infect. Immun.* **65**: 1105–1108.
129. Moskowitz M. and Bartlett J.G. (1981) Recurrent pseudomembranous enterocolitis unassociated with pilot antibiotic therapy. *Arch. Intern. Med.* **141**: 663–664.
130. Mulligan M.E., Miller S.D., McFarland L.V., Fung H. C., and Kwok R.Y.Y. (1993) Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 239–244.
131. Musher D.M., Logan N., Mehendiratta V. (2006) Epidemic *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **354**: 199–1203.
132. O'Neill G., Adams J.E., Bowman R.A., Riley T.V. (1993) A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiol. Infect.* **111**: 257–64.
133. Owens R.C. Jr. and Rice L. (2006) Hospital-based strategies for combating resistance. *Clin. Infect. Dis.* **42** (suppl 4): S173–S181.
134. Pechine S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M.C., Delme M. and Collignon A. (2005) Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* **54**:193–196.
135. Péchiné S., Janoir C., and Collignon A. (2005) Variability of *Clostridium difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5018-25.

136. Pepin J., Saheb N., Coulombe M.A., Alary M.E., Corriveau M.P., Authier S., Leblanc M., Rivard G., Bettez M., Primeau V., Nguyen M., Jacob C.E., Lanthier L. (2005) Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 1254–1260.
137. Pepin J., Valiquette L., Alary M.E., Villemure P., Pelletier A., Forget K., Pepin K., Chouinard D. (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ.* **171**: 466–472.
138. Perelle S., Gibert M., Bourlioux P., Corthier G., and Popoff M.R. (1997) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect. Immun.* **65**: 1402–1407.
139. Petit L., Gibert M., Popoff M.R. (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* **7**:104–10.
140. Pfeifer G., Schirmer J., Leemhuis J., Busch C., Meyer D.K., Aktories K. and Barth H. (2003) Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B: translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 44535–44541.
141. Pirs T., Avbersek J., Ocepek M., Rupnik M. (2007) Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. 2nd International *Clostridium difficile* Symposium; 2007 June 6–9; Maribor, Slovenia.
142. Pituch H., van den Braak N., van Leeuwen W., van Belkum A., Martirosian G., Obuch-Woszczatynski P., Luczak M., Meisel-Mikolajczyk F. (2001) Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:442–446.
143. Pituch H., Kreft D., Obuch-Woszczatynski P., Wultańska D., Meisel-Mikolajczyk F., Luczak M., van Belkum A. (2005) Clonal spread of a *Clostridium difficile* strain with a complete set of toxin A, toxin B, and binary toxin genes among Polish patients with *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 472–475.
144. Pituch H., Rupnik M., Obuch-Woszczatyński P., Grubescic A., Meisel-Mikolajczyk F., Luczak M. (2005) Detection of Binary Toxin genes (*cdtA* and *cdtB*) among *Clostridium difficile* strains isolated from patients with *Clostridium difficile* associated diarrhoea (CDAD) in Poland. *J. Med. Microbiol.* **54**: 143–147.
145. Poilane I., Bert F., Cruaud P., Nicolas-Chanoine M.H., Collignon A. (2007) Interest of the disk diffusion method for screening *Clostridium difficile* isolates with decreased susceptibility to antibiotics. *Pathol. Biol.* **55**(8-9): 429–433.
146. Polk R.E., Oinonen M., Pakyz A. (2006) Epidemic *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **354**: 1199–1203.
147. Popoff M.R. and Dodin A. (1985) Survey of neuraminidase production by *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, and *Clostridium difficile* strains from clinical and nonclinical sources. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 873–6.
148. Popoff M.R., Rubin E., Gill D.M., Boquet P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect. Immun.* **56**: 2299–306.
149. Pothoulakis C., Castagliuolo I., LaMont J.T. (1988) Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins. *New Physiol. Sci.* **13**: 58–63.
150. Raffestin S., Dupuy B., Marvaud J.C. and Popoff M.R. (2005) BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Mol. Microbiol.* **55**: 235–249.

151. Reineke J., Tenzer S., Rupnik M., Koschinski A., Hasselmayer O., Schrattenholz A., Schild H., von Eichel-Streiber C. (2007) Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **446**: 415–419.
152. Reinert D.J., Jank T., Aktories K., and Schulz G.E. (2005) Structural basis for the function of *Clostridium difficile* toxin B. *J. Mol. Biol.* **351**: 973–981.
153. Riegler M., Sedivy R., Pothoulakis C., Hamilton G., Zacherl J., Bischof G., Cosentini E., Feil W., Schiessel R., LaMont J.T. (1995) *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J. Clin. Invest.* **95**: 2004–2011.
154. Rifkin G.D., Fekety F.R., Silva J. and Sack R.B. (1977) Antibiotic-induced colitis. Implication of a toxin neutralised by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Lancet* **310**: 1103–1106.
155. Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Duffield T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese J.S. (2006) *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1730–1736.
156. Rupnik M., Braun V., Soehn F., Janc M., Hofstetter M., Laufenberg-Feldmann R. and von Eichel-Streiber C. (1997) Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 197–202.
157. Rupnik M., Avesani V., Janc M., von Eichel-Streiber C. and Delme' M. (1998) A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2240–2247.
158. Rupnik M. (2001) How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 417–420.
159. Rupnik M., Brazier J., Duerden B., Grabnar M., Stubbs S. (2001) Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* **147**: 439–47.
160. Rupnik M., Grabnar M. and Geric B. (2003) Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* **9**: 289–94.
161. Rupnik M., Kato N., Grabnar M., Kato H. (2003) New types of toxin A negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1118–1125.
162. Rupnik M., Dupuy B., Fairweather N.F., Gerding D.N., Johnson S., Just I., Lyerly D.M., Popoff M.R., Rood J.I., Sonenshein A.L., Thelestam M., Wren B.W., Wilkins T.D., von Eichel-Streiber C. (2005) Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J. Med. Microbiol.* **54**: 113–117.
163. Rupnik M., Pabst S., von Eichel-Streiber C., Urlaub H. and Soling H.D. (2005) Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology* **151**: 199–208.
164. Rupnik M. (2008) How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.*, **7**: 417–420.
165. Rupnik M.: www.mf.uni-mb.si/mikro/tox/
166. Savidge T.C., Pan W.H., Newman P., O'brien M., Anton P.M., Pothoulakis C. (2003) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* **125**: 413–420.
167. Seddon S.V., Hemingway I. and Borriello S.P. (1990) Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J. Med. Microbiol.* **31**: 169–74.

168. Sehr P., Joseph G., Genth H., Just I., Pick E. and Aktories K. (1998) Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins – effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. *Biochemistry* **37**: 5296–5304.
169. Sehulster L. and Chinn R.Y. (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm. Rep.* **52**: 1–42.
170. Selzer J., Hofmann F., Rex G., Wilm M., Mann M., Just I. and Aktories K. (1996) *Clostridium novyi* a-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 25173–25177.
171. Sheahan, K-L. Cordero C.L., Satchell K.J. (2007) Autoprocessing of the *Vibrio cholerae* RTX toxin by the cysteine protease domain. *EMBO J.* **26**: 2552–2561.
172. Simpson L.L., Zepeda H. and Ohishi I. (1988) Partial characterization of the enzymatic activity associated with the binary toxin (type C2) produced by *Clostridium botulinum*. *Infect. Immun.* **56**: 24–27.
173. Soehn F., Wagenknecht-Wiesner A., Leukel P., Kohl M., Weidmann M., Eichel-Streiber C. and Braun V. (1998) Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864-implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 222–232.
174. Song K.P., Ow S.E., Chang S.Y. and Bai X.L. (1999) Sequence analysis of a new open reading frame located in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 241–248.
175. Spigaglia P. and Mastrantonio P. (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* **40**: 3470–3475.
176. Spigaglia P., Mastrantonio P. (2004) Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *J. Med. Microbiol.* **53**: 1129-1136.
177. Stare B.G., Delmee M. and Rupnik M. (2007) Variant forms of the binary toxin CDT locus and tcdC gene in *Clostridium difficile* strains. *J. Med. Microbiol.* **56**: 329–335.
178. Steffen E.K. and Hentges D.J. (1981) Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J. Clin. Microbio.* **14**: 153–6.
179. Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., Brazier J., Duerden B. and Popoff M. (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 307–312.
180. Sullivan N.M., Pellett S and Wilkins TD. (1982) Purification and Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **35**: 1032-1040.
181. Sunenshine R.H. and McDonald L.C. (2006) *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleveland Clinic. J. Med.* **73**: 187–197.
182. Tachon M., Cattoen C., Blanckaert K., Poujol I., Carbonne A., Barbut F., Petit J.C., Coignard B. (2006) First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. *Euro Surveill.* **11**: E060504.1.
183. Taha S., Johansson O., Rivera Jonsson S., Heimer D. and Krovacek K. (2007) Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 163–174.

184. Tasteyre A., Barc M.C., Collignon A., Boureau H., arjalainen T. (2001) Role of Fli C and Fli D flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* **69**: 7937–40.
185. Torres J. F. (1991) Purification and characterisation of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A. *J. Med. Microbiol.* **35**: 40–44.
186. Tucker K.D. and Wilkins T.D. (1991) Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* **59**: 73–78.
187. Urban E., Brazier J.S., Soki J., Nagy E. and Duerden B.I. (2001) PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 1082–1086.
188. van den Berg R.J., Claas E.C., Oyib D.H., Klaassen C.H., Dijkshoorn L., Brazier J.S., Kuijper E.J. (2004) Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1035–1041.
189. van Steenberg J., Debast S., van Kregten E., van den Berg R., Notermans D., Kuijper E. (2005) Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro Surveill* **10**: E050714.1.
190. Vetter I. R., Hofmann F., Wohlgemuth S., Herrmann C. and Just I. (2000) Structural consequences of mono-glucosylation of Ha-Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin. *J. Mol. Biol.* **301**: 1091–1095.
191. Viscidi R., Willey S., Bartlett J.G. (1981) Isolation rates and Toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* **81**: 5–9.
192. von Eichel-Streiber C., Boquet P., Sauerborn M. and Thelestam M. (1996) Large clostridial cytotoxins – a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol.* **4**: 375–382.
193. von Eichel-Streiber C., Laufenberg-Feldmann R., Saringen S., Schulze J. and Sauerborn M. (1992) Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 260–268.
194. Voth D.E. and Ballard J.D. (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Reviews.* 247–263.
195. Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A., Karjalainen T. (2001) Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* **69**: 2144–53.
196. Warny M., Pepin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E., McDonald L.C. (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**: 1079–1084.
197. Weese J.S., Staempfli H.R., Prescott J.F. (2001) A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine. Vet. J.* **33**: 403–9.
198. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003) *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 531–534.
199. Wilson K.H. Kennedy M.J., Fekety F.R. (1982) Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 443–446.
200. Wren B.W. (1991) A family of clostridial and streptococcal ligandbinding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.* **5**: 797–803.

Ringraziamenti

Qualcuno una volta scrisse: se sei quello che sei, se sei diventato quello che sei diventato e se nella vita hai fatto quello che hai fatto il merito non è solo tuo, ma di tutte le persone che ti circondano. Nel bene o nel male e se pur infinitesimamente tutti ti cambiano...

Grazie al **prof. Carlo Chezzi** ed al **prof. Giuseppe Dettori** che mi hanno offerto l'opportunità di frequentare il corso di dottorato in Microbiologia e Virologia.

Grazie alla **prof.ssa. Menozzi** che mi ha insegnato, preso per mano e guidato; grazie di cuore.

Grazie alla **dott.ssa Paola Mastrantonio** che mi ha permesso di frequentare l'Istituto Superiore di Sanità di Roma permettendo l'accrescimento del mio bagaglio culturale.

Grazie a **Patrizia** per la sua pazienza e illimitata disponibilità....

Grazie a **Laura Z.** per i suoi insegnamenti e la sua disponibilità.

Grazie agli **"amici del treno"** col quale ho trascorso piacevoli viaggi interminabili e condiviso ritardi incredibili.

Grazie alla **dott.ssa Larini** per la sua cortesia e disponibilità.

Grazie a **Francesca** per le sue magnifiche "dissertazioni utopiche"...

Grazie a **Monica M.** anche se un po' troppo "precisina", è un piacere lavorare con lei...e poi è l'unica che stava ad ascoltare le mie esercitazioni...

Grazie a **Valentina F.** la mia prima e molto probabilmente unica tesista...

Grazie a **Cristina**, impareggiabile giocatrice di tennis.

Grazie a **Laura A.** mia grande compagna di sventure...che brutto essere da soli, meno male che c'eri tu...

Grazie a **Laura Gio.** a parte l'ansia che mi faceva venire ad ogni relazione, grande chiacchierate e un magnifico e spensierato wee-kend a sciare che spero di ripetere...

Grazie a **Diego, Elena, Isabella, Sara, Simona** e **Tecla** (rigorosamente in ordine alfabetico), dottorandi D.O.C. (disperati di origine controllata, per chi non lo sapesse...), a **Chiara, Federica, Valeria** (rigorosamente in ordine alfabetico) facenti parte della categoria "specializzandi da quattro soldi"... a **Sabina B., Sabina R., Silvia** (rigorosamente in ordine alfabetico), strutturata la seconda (beata lei!!!!!!) e Laureate frequentatrici le altre due (ibride insomma...), per la piacevole compagnia... tutti sempre pronte a sorridere e scherzare... ed allietare il susseguirsi delle tette giornate che passano inesorabili... P.S. Grazie alla nonna di Diego per le magnifiche torte...

Grazie a **Monica G.** che prendo sempre in giro per puro divertimento, ma alla quale in fondo in fondo voglio bene.

Grazie a **Marina** e **Zava** due "vecchie" di classe...

Grazie a **Danilo** per le spensierate serate e le magnifiche pause pranzo e caffè.

Grazie a **Portincasa**, il re della tecnologia e non solo..., unico difetto.... è Juventino...

Grazie a **Manu**, ormai la mia mamma adottiva...

Grazie a **Leo**, un amico insostituibile e sempre presente...

Grazie a **Laura G.** che dire di lei...un mortorio la vita in laboratorio senza la sua presenza. Ma non è solo questo...una amica speciale con cui poter parlare di tutto...o quasi... (cosa rara nella "vita moderna"!) E poi credo che insieme ad altre 3 o 4 persone abbiamo formato o stiamo formando un "gruppo" di amici, e questa è una delle cose più belle che questa esperienza mi ha lasciato... ed a **Valentina C.** come dividerla dalla sua "amichetta"...impossibile...una simpatia e una dolcezza smisurate...

Grazie a **Tommaso**, è stato come un fratello per me, ora è e resterà per sempre il mio miglior amico.

Grazie a **Mario e Claudia** per considerarmi come un figlio...

Grazie a **Massimo**, se avessi un fratello maschio lo vorrei esattamente come lui.

Grazie **ai nonni (Carlo, Elisa, Mario e Renata)** e siccome il primo con gradevole rimpianto me lo ricordo poco, grazie al mio quinto nonno, **Aldo** (nessuno se la prenda se lo chiamo così...), che di lui ha preso meravigliosamente le veci...vi voglio bene...

Grazie a **Martina**... la mia piccola sorellina...quando sei nata ero parecchio geloso di te...(avevo solo 11 anni però...) ora farei di tutto per proteggerti...

Grazie a **Mamma e Papà**...qui potrei stare a scrivere per ore...Difficilmente esprimo i miei sentimenti, è il mio carattere! Anzi tendo forse ad enfatizzare i sentimenti opposti, in particolare con te mamma... Le mie reazioni, il mio essere e tornare un po' bambino quando sono a casa, avere sempre bisogno comunque della vostra approvazione e del vostro sostegno... non credo che un semplice grazie sia sufficiente per voi...ma ve lo meritate tutto...

Ancora grazie a tutte le persone che ho citato e a tutte quello di cui mi sono dimenticato per la mia nota "smemoraggine"...per avermi sopportato...

Grazie a **Elisa**... Sempre... e per sempre...