



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE
CICLO: XXV

**UNO STUDIO PROSPETTICO SULL'INFEZIONE DA CLOSTRIDIUM DIFFICILE NELLE
MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI: FATTORI DI RISCHIO,
TOSSINO-TIPI, SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI, CAPACITÀ DI ADESIONE E
IMPATTO SUL SUCCESSIVO DECORSO DELLA MALATTIA**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof. Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisore: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Dottorando: Matteo Martinato

INDICE		
1	SOMMARIO	3
1.1	Sommario in lingua italiana	3
1.2	Abstract	5
2	INTRODUZIONE	7
2.1	Clostridium difficile	7
2.1.1	Quadro epidemiologico	8
2.1.2	Ceppo epidemico NAP1/027	8
2.1.3	Fattori di rischio	9
2.1.4	Quadro clinico delle infezioni da C. difficile	11
2.1.5	Diagnosi	12
2.1.6	Tossine	13
2.1.7	Prevenzione	16
2.1.8	Terapia nelle CDAD	17
2.1.9	Nuove prospettive terapeutiche	18
2.1.10	Terapia chirurgica	21
2.2	Resistenza	21
2.2.1	Epidemiologia del gene ErmB	22
2.2.2	Epidemiologia dei geni TetM/W	23
2.3	TcdC Il gene della virulenza	23
2.4	Malattie infiammatorie croniche intestinali – IBD	23
2.4.1	Colite Ulcerosa	24
2.4.2	La malattia di Crohn	26
2.4.3	Flora intestinale e meccanismi di difesa	27
2.4.4	La risposta dell'ospite ai patogeni	29
2.4.5	Il ruolo dei linfociti T	30
2.4.6	Eziologia e patogenesi	31
2.4.7	Trattamento medico	33
2.4.8	Farmaci biologici	34
2.4.9	Probiotici e prebiotici	35
2.5	Il C. difficile nelle malattie infiammatorie croniche intestinali	35
2.5.1	Correlazioni tra terapia farmacologica e CDAD nei pazienti con IBD	37
3	SCOPO	39
4	PAZIENTI, MATERIALI E METODI	41
4.1	Selezione dei pazienti e raccolta dei campioni	41
4.2	Trattamento campioni e colture batteriche	42
4.3	Conta delle colonie	42
4.4	Lisi ed isolamento dei ceppi	43
4.5	Polymerase Chain Reaction – PCR	43
4.6	PCR per l'amplificazione del gene 16S	45
4.7	Elettroforesi su gel di agarosio	47
4.8	PCR specie-specifica	49
4.9	PCR per il tossino-tipo del C. difficile	50
4.10	PCR per la ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici	52
4.11	PCR per l'analisi del gene regolatore tcdC	55
4.12	Antibiogramma	56
4.13	Test di adesione del C. difficile a cellule epiteliali intestinali umane	58
4.14	Dati clinici	60

4.15	Analisi statistica	61
5	RISULTATI	63
5.1	Caratteristiche della campione studiato	63
5.2	Analisi fenotipica e conta delle colonie ottenute dalla coltura su piastra	64
5.3	Frequenza di CDI	64
5.4	Analisi dei fattori di rischio per CDI nei pazienti IBD	65
5.5	Sensibilità agli antibiotici	67
5.6	Adesione all'epitelio intestinale	68
5.7	Presenza del gene Tcd C	69
5.8	Confronto dei risultati dell'esame tramite PCR con quelli della metodica standard (E.I.A.)	69
5.9	Risultati della parte prospettica dello studio	70
6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	73
7	RINGRAZIAMENTI	77
8	ABBREVIAZIONI	79
9	BIBLIOGRAFIA	83

1. SOMMARIO

1.1 Sommario in lingua italiana

Il Clostridium difficile è un batterio Gram positivo raramente presente nella normale flora intestinale umana che in particolari condizioni di disbiosi intestinale, in pazienti trattati con antibiotici ad ampio spettro, in pazienti ospedalizzati, in soggetti immunocompromessi e in persone anziane, può causare patologie di variabile gravità indicate complessivamente come Clostridium difficile Associated Diarrhoea (CDAD). Sebbene in passato il Clostridium difficile sia stato indicato come possibile concausa dello sviluppo delle malattie infiammatorie croniche intestinali (note anche come inflammatory bowel disease, IBD), oggi si è più propensi a ritenere che le IBD possano essere un fattore di rischio per l'infezione da Clostridium difficile (CDI).

La CDI nei pazienti affetti da IBD riveste una sempre maggiore importanza, sia perché la frequenza con cui si presenta stà crescendo nel tempo, sia perché sembra determinare un impatto negativo sugli outcome di salute, ma anche perché la sintomatologia indotta dalla CDI è indistinguibile da quella di una riacutizzazione della IBD: è quindi fondamentale una diagnosi tempestiva per instaurare le terapie più idonee al trattamento del caso.

Lo scopo dello studio è descrivere la frequenza della CDI in soggetti sani, soggetti non affetti da IBD ospedalizzati con sospetto di CDAD e soggetti affetti da IBD, caratterizzare i ceppi di Clostridium difficile isolati da pazienti IBD (sensibilità agli antibiotici, tipologie di tossine prodotte, capacità di adesione all'epitelio intestinale), identificare i fattori di rischio per la CDI nei pazienti IBD (caratteristiche del soggetto, della malattia, della terapia concomitante) e valutare l'impatto della CDI sul decorso della IBD, sia nei portatori sintomatici che in quelli asintomatici.

Da gennaio 2010 sono stati raccolti ed analizzati campioni da pazienti IBD ambulatoriali o degenti presso l'unità operativa complessa di gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova (sia in fase acuta di malattia che in remissione), da pazienti ricoverati presso la medesima unità operativa non affetti da IBD con sintomi e terapia medica suggestivi di CDAD e da un gruppo di controllo di soggetti sani appaiati per età e sesso.

Dalla prima valutazione (e della raccolta del primo campione) i pazienti con IBD sono stati valutati almeno ogni sei mesi o in caso di recidiva o di ricovero ospedaliero per due anni. Su ogni campione è stata eseguita una coltura anaerobica seguita da PCR specifica per identificare eventuali colonie di C. difficile. Ogni ceppo è stato poi caratterizzato in base a:

- tossine prodotte
- sensibilità agli antibiotici

- adesione alle cellule Caco-2
- presenza o assenza del gene tcdC nel DNA batterico

Dati clinici sono stati raccolti dai pazienti con IBD per identificare eventuali fattori di rischio per la CDI.

I pazienti con IBD sembrano presentare una maggiore frequenza di colonizzazione da parte del *Clostridium difficile* rispetto al gruppo di controllo dei soggetti sani: nei controlli la CDI è stata rilevata in 0/55 soggetti. Nei pazienti ricoverati con IBD è stata trovata in 5/55 soggetti (9%). Nei pazienti ambulatoriali è stata rilevata in 9/195 soggetti (4,6%).

Il profilo di produzione delle tossine sembra essere differente nei pazienti IBD e nei pazienti non-IBD con diarrea da antibiotici, confermando l'ipotesi di ceppi acquisiti in comunità e non in ambiente ospedaliero.

L'antibiogramma eseguito su ceppi isolati da pazienti con CDAD e pazienti con IBD attive o in remissione ha mostrato che tutti i ceppi sono sensibili a metronidazolo e vancomicina e marcatamente resistenti alla ciprofloxacina.

Ceppi di *Clostridium difficile* isolati da pazienti con IBD attive, in fase di remissione e da pazienti con CDAD hanno dimostrato una diversa, seppur piccola, capacità di aderire a monostrati di cellule epiteliali intestinali umane (CACO-2), indicando che i ceppi associati ai pazienti con IBD attive hanno maggiore abilità a colonizzare di quelli in remissione.

Il gene tcdC è stato identificato nell'8% dei ceppi tossigenici isolati da pazienti IBD (attivi ed in remissione) e nel 25% di quelli isolati da pazienti con CDAD, ma il genoma presentava delezioni di varia entità, indicando una potenziale aumentata virulenza dei ceppi identificati.

L'analisi statistica non ha individuato fattori di rischio associati con la CDI.

Nella parte prospettica dello studio la CDI non è stata identificata come fattore di rischio per la recidiva clinica o endoscopica o per la necessità di trattamento chirurgico, dimostrando invece, inaspettatamente, di avere un ruolo protettivo nei confronti della riacutizzazione della malattia.

1.2 Abstract

Clostridium difficile is a Gram positive bacterium rarely present in normal human gut flora that under certain conditions of intestinal dysbiosis, in patients treated with broad-spectrum antibiotics, in hospitalized patients, in immunocompromised subjects and elderly, can cause disease of variable severity referred to as *Clostridium Difficile* Associated Diarrhoea (CDAD). Although in the past *Clostridium difficile* has been indicated as a possible causal factor in the development of inflammatory bowel disease (also known as IBD), nowadays it is more likely to believe that the IBD may be a risk factor for *Clostridium difficile* infection (CDI).

CDI in patients with IBD is of increasing importance because the frequency with which it occurs is growing over time, but also because it seems to have a negative impact on health outcomes and because the symptoms induced CDI are indistinguishable from that of an exacerbation of IBD: it is therefore essential to establish an early diagnosis in order to start the most suitable treatment of the case.

The aim of this study was to describe the frequency of the CDI in healthy subjects, subjects not affected by IBD hospitalized with suspected CDAD and patients with IBD, characterize strains of *Clostridium difficile* isolated from IBD patients (sensitivity to antibiotics, types of toxins, adhesion to the intestinal epithelium), to identify risk factors for CDI in IBD patients (characteristics of the subject, illness, concomitant therapy) and to assess the impact of CDI on the course of IBD, both in symptomatic and asymptomatic carriers.

From January 2010, stool samples from IBD outpatients and inpatients were collected and analyzed at the Gastroenterology unit of the University Hospital of Padua (both in the acute phase of disease and in remission), from patients admitted to the same unit without IBD but with symptoms and medical treatment suggestive of CDAD and from a control group of healthy subjects matched for age and sex.

From the first evaluation (and the collection of the first stool sample), patients with IBD were evaluated at least every six months or in case of relapse or hospitalization for two years. On each sample an anaerobic culture was performed, followed by specific PCR to identify any colonies of *Clostridium difficile*. Each strain was then characterized by:

- Toxins production
- Antibiotics sensitivity
- Adhesion to Caco-2 cells

- Presence or absence of the *tcdC* gene in bacterial DNA

Clinical data were collected from patients with IBD to identify any risk factors for CDI.

Patients with IBD have a higher frequency of colonization by *Clostridium difficile* than the control group: in healthy subjects CDI was detected in 0/55 subjects, in hospitalized IBD patients was found in 5/55 patients (9%) and in IBD outpatients was detected in 9/195 subjects (4.6%).

The production profile of the toxins appears to be different in IBD and non-IBD patients with antibiotic-associated diarrhea, confirming the hypothesis of community-acquired strains rather than hospital-acquired.

Antibiotics sensitivity tests performed on strains isolated from patients with CDAD and patients with IBD showed that all strains are sensitive to metronidazole and vancomycin and markedly resistant to ciprofloxacin.

Strains of *Clostridium difficile* isolated from patients with active IBD, in remission and from patients with CDAD have shown a different, albeit small, ability to adhere to monolayers of human intestinal epithelial cells (Caco-2), suggesting that strains from active IBD patients have a greater ability to colonize than those from patients in remission.

The *tcdC* gene was identified in 8% of toxigenic strains isolated from IBD patients (active and in remission) and in 25% of those isolated from patients with CDAD, but the genome had deletions of varying extent, indicating a potential increased virulence of identified strains.

The statistical analysis did not identify any risk factor associated with CDI in IBD.

In the prospective study, CDI has not been identified as a risk factor for clinical or endoscopic relapse or for the need for surgical treatment, demonstrating instead, unexpectedly, to have a protective role against disease flare.

2. INTRODUZIONE

2.1 Clostridium difficile

Il *Clostridium difficile* (dal greco “kloster”(κλωστήρ), “fuso”, e dal latino “difficile”) appartiene alla famiglia delle Clostridiaceae, batteri Gram positivi, anaerobi, sporigeni, tossigenici costituenti la normale flora intestinale di animali e uomini che in situazioni di disbiosi possono causare diarree e coliti. Il *C. difficile* è trasmesso per via oro-fecale e le mani sono il principale veicolo del microbo da superfici infette all'organismo.

Il *C. difficile* fu isolato per la prima volta nel 1935 dalle feci di neonati come componente della normale flora intestinale; il nome “difficile” fu scelto per la difficoltà nell'isolarlo e nel farlo crescere nel normale terreno di coltura. [1]

Negli anni '70 venne identificata la presenza delle tossine, enterotossina A e citotossina B, prodotte da alcuni ceppi di *C. difficile* e successivamente associate ai disturbi intestinali e alla colite pseudomembranosa. Il primo caso di colite pseudomembranosa fu descritto in realtà già negli anni '50, ma erroneamente attribuito a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Nel 1974 uno studio prospettico mise in luce casi di diarrea e colite membranosa in pazienti trattati con l'antibiotico clindamicina, successivamente, nel 1977, questi fenomeni furono attribuiti all'azione di una tossina prodotta dalla specie *Clostridium*. [2] Infine, nel 1978, il *C. difficile* fu finalmente identificato come agente eziologico della colite pseudomembranosa associata all'uso di antibiotici. [3]

Negli anni successivi l'incidenza e la gravità delle infezioni da *Clostridium* hanno subito un sostanziale aumento, soprattutto come infezioni nosocomiali e manifestandosi con discreta frequenza a carattere epidemico. [4]

Le infezioni da *C. difficile* possono causare quella che ad oggi viene definita CDAD (*Clostridium difficile* associated disease) la cui gravità è variabile dalla diarrea lieve alla colite pseudomembranosa, al megacolon tossico e alla perforazione intestinale.

Le manifestazioni cliniche gravi, alle quali si associa un elevato rischio di mortalità, sono più frequenti se l'infezione è sostenuta da nuovi ceppi ipervirulenti, sino ad ora non segnalati in Italia. [5]

L'ulteriore incremento dell'incidenza dell'infezione degli ultimi anni sembra essere determinato da un insieme di fattori quali il ricovero in ospedale, la presenza di comorbidità, l'aumento dell'uso degli antibiotici e la presenza di nuovi ceppi virulenti [5].

2.1.1 Quadro epidemiologico

In passato la diarrea associata a *C. difficile* era considerata una nuisance disease piuttosto che un'importante patologia infettiva. Lo scenario è però cambiato radicalmente a partire dai primi anni 2000. [6]

Tra il 2001 e il 2003 diversi focolai di infezioni da *C. Difficile* (CDI) si sono verificati in 6 diversi stati degli USA, la maggior parte dei quali appartenenti al ceppo BI/NAP1/027, caratterizzato per la prima volta negli anni '80. Negli Stati Uniti il numero di pazienti dimessi dall'ospedale con diagnosi di CDAD passò da 134.361 nel 2000 a 291.303 nel 2005. [7]

Altri focolai furono registrati in alcuni ospedali del Canada, comportando un improvviso aumento dell'incidenza dell'infezione soprattutto tra i pazienti ultrasessantenni, una notevole frequenza di casi gravi e un aumento di oltre tre volte della mortalità associata [8], con uno studio condotto in dodici ospedali del Quebec che registrò un'incidenza di oltre 22 casi su 1000 ricoveri ed una mortalità associata del 6,9%. [7]

Un analogo aumento dell'incidenza venne riportato anche in alcuni paesi europei come in Inghilterra, dove gli esami per la ricerca della tossina del *C. difficile* risultati positivi, passarono da meno di 2000 all'anno nel 1986/1987 a più di 12.000 all'anno nel 2000/2001. [9]

L'incidenza aumentò in particolare nelle persone di età maggiore di 65 anni e ancor di più in quelle di età superiore a 85 anni. [10]

L'aumentata frequenza della CDI può essere attribuita a diversi fattori: cambiamenti nelle procedure sanitarie (ad esempio nuove terapie), aumentata attenzione alla diagnosi, diverso profilo di rischio dei pazienti (popolazione assistita con età media più elevata), incremento della patologia acquisita in comunità, ma, tra le diverse cause, ha sicuramente un ruolo rilevante la diffusione di nuovi ceppi ipervirulenti, in particolare attribuibile a delezioni del gene TcdC, regolatore negativo della produzione di tossine, e di ceppi altamente resistenti ai fluorochinoloni.

2.1.2 Ceppo epidemico NAP1/027

In Canada, in concomitanza dell'epidemia degli anni 2000, venne isolato un nuovo ceppo ipervirulento identificato come NAP1/027 (North American pulsed-field type 1, PCR ribotype 027) e appartenente al tossinotipo III, contrariamente alla maggior parte dei ceppi di *C. difficile* appartenenti al tossinotipo 0. [11] NAP1/027 produce una tossina binaria (correlata alla tossina jota

prodotta del *Clostridium perfringens*) il cui ruolo nella patogenesi della colite da *C. difficile* non è ancora del tutto chiaro. [12]

Il violento impatto clinico di questo ceppo sembra soprattutto essere dovuto alla produzione di quantitativi di tossine A e B di gran lunga superiore a quella degli altri ceppi noti, a causa di una delezione sul gene *tcdC* con conseguente iperproduzione delle due tossine. [13]

Dal Canada, il ceppo si diffuse in numerosi Paesi europei, dove si registrarono sia infezioni a carattere epidemico (Inghilterra, Galles, Scozia, Irlanda, Belgio, Francia, Germania, Olanda, Svizzera, Danimarca) che casi sporadici (Austria, Polonia, Spagna) [14]. Negli USA tra il 2001 e il 2003 diverse epidemie di CDI si sono verificate in 6 diversi stati, la maggior parte dei quali causati dal ceppo NAP1.

Più recentemente nei Paesi Bassi e nel Nord America è stato isolato, sia in soggetti ospedalizzati che nella comunità, un nuovo ceppo ipervirulento, ribotipo 078, che agisce con un meccanismo di iperproduzione delle tossine analogo al NAP1. Pur risultando l'incidenza meno frequente, colpisce individui più giovani e causa disturbi anche negli animali. [15]

2.1.3 Fattori di rischio

I maggiori fattori di rischio per l'infezione da *C. difficile* sono: l'ospedalizzazione, l'età avanzata e il trattamento con farmaci antibiotici.

Il *C. difficile* viene riscontrato nel tratto gastro-intestinale dell'1-3% degli adulti sani e soltanto in meno dell'1% dei casi i ceppi in questione sono patogeni; tale colonizzazione può avere una durata anche di 2-3 anni senza recare disturbo all'ospite. [16]

A possedere immunoglobuline IgG e IgA contro le tossine A e B è invece ben il 60% degli individui adulti sani [17] probabilmente in seguito ad esposizioni avvenute nell'infanzia o ad infezioni sub-cliniche in età adulta [18]. Quest'immunità acquisita è molto importante nell'impedire lo sviluppo di patologie da *C. difficile* o infezioni recidivanti. [19]

A causa di un'alta frequenza di contaminazione ambientale con spore di *C. difficile*, l'infezione è un problema che attualmente riguarda non solo gli ospedali, ma anche tutte le strutture in cui si pratica assistenza sanitaria come reparti riabilitativi, lungodegenze e strutture per anziani.

I pazienti ospedalizzati hanno una prevalenza di colonizzazione da *C. difficile* del 4-10%, significativamente superiore a quella presente in comunità. [20]

I neonati, sino al compimento del primo anno d'età, spesso sono portatori asintomatici anche di ceppi produttori di tossina. La colonizzazione pare favorita dall'immaturità della flora batterica intestinale e la mancata evoluzione verso la malattia sembra dovuta all'incapacità della tossina di legarsi ai recettori degli enterociti, anch'essi ancora immaturi.

L'età superiore a 60 anni è di per sé un fattore di rischio, quella oltre gli 80 anni ancor di più. In controtendenza rispetto a quanto pubblicato in letteratura, più recenti dati del sistema di sorveglianza inglese hanno rilevato un aumento del 20% delle infezioni nella popolazione di età inferiore a 60 anni. [21]

Alcune co-morbidità quali insufficienza renale cronica, fibrosi cistica, chirurgia del tratto intestinale e biliare, neoplasie ematologiche, Morbo di Crohn, colite ulcerosa, possono determinare un maggior rischio di CDI.

La terapia antibiotica, soprattutto se combinata e/o protratta ed effettuata con farmaci ad ampio spettro d'azione, altera la normale flora batterica intestinale riducendo la normale resistenza alla colonizzazione da *C. difficile*. Nel 2000 l'interessante esperienza di un ospedale australiano ha evidenziato che, modificando la politica d'uso degli antibiotici, l'incidenza di CDAD è diminuita da 2,09 a 0,87 casi per 1.000 dimessi.[22]

Virtualmente ogni antibiotico può essere associato alla CDAD, ma nella pratica alcune classi (es. cotrimoxazolo) sono raramente all'origine del problema. Tra gli antibiotici, quelli associati a un maggior rischio di sono la clindamicina, i β -lattamici e le cefalosporine [23], mentre i fluorochinoloni, pur se utilizzati come trattamento antibiotico dal 1988, solo recentemente sono stati individuati come causa di aumentata CDI. [24]

Da ulteriori studi sugli effetti di diverse categorie di farmaci come fattori di rischio per le CDAD è emerso che anche l'utilizzo di farmaci inibitori della pompa protonica può favorirne l'insorgenza. Ciò è dovuto all'abbassamento dell'acidità gastrica, difesa naturale del nostro organismo, che può impedire un'efficace inattivazione delle forme vegetative del batterio, le quali, una volta raggiunto l'intestino tenue, mettono in atto la loro azione patogena. [25]

Oltre a queste principali categorie di farmaci, ne esistono altri che sembrano influire sul decorso delle CDAD, ovvero i chemioterapici ed altri immunosoppressori, alcuni antidepressivi e gli antagonisti dei recettori H₂ dell'istamina in associazione con gli inibitori di pompa.

È stata inoltre studiata un'eventuale correlazione tra l'utilizzo di antibiotici e inibitori di pompa e l'incidenza del *C. difficile* individuando che la combinazione tra fluorochinoloni, cefalosporine, carbapenemi e inibitori di pompa ne aumenta il rischio. [26]

2.1.4 Quadro clinico delle infezioni da *C. difficile*

Il quadro clinico delle infezioni da *C. difficile* può spaziare da una sindrome diarroica lieve (diarrea acquosa accompagnata da dolori addominali solitamente nei quadranti inferiori) o severa (profusa diarrea acquosa, dolori addominali, febbre, nausea, disidratazione) fino alla colite pseudo membranosa (con necrosi epiteliale, ulcerazioni della parete intestinale e formazione di pseudomembrane), alla colite fulminante con megacolon tossico e perforazione intestinale.

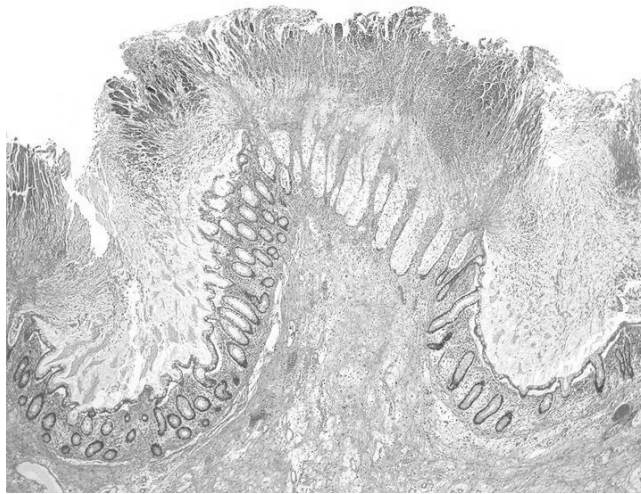


Figura 1 – Aspetto microscopico di colite pseudomembranosa

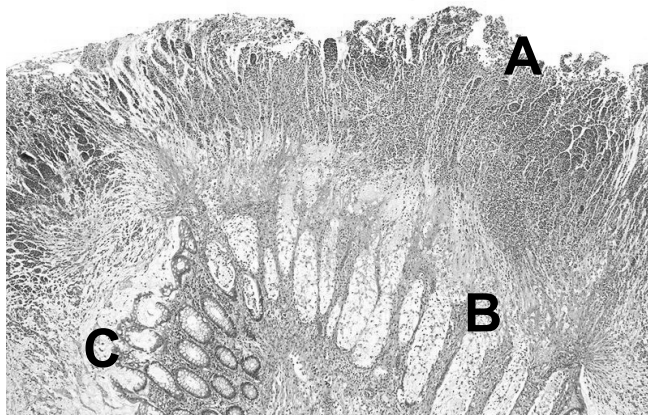


Figura 2 – Dettaglio della figura 1. Nella parte superiore dell'immagine (A) si possono notare residui necrotici costituiti da cellule epiteliali morte e altri componenti, nella parte inferiore destra (B) i contorni delle cripte intestinali non più presenti e nella parte inferiore sinistra (C) cripte intestinali vitali.

La comparsa di febbre, leucocitosi, e dolori addominali in pazienti che hanno seguito di recente una cura antibiotica anche senza la comparsa di diarrea, dovrebbero far sospettare la CDI. Tuttavia nessuna di queste manifestazioni cliniche è specifica per questa infezione e per questo è importante una diagnosi efficace e tempestiva.

2.1.5 Diagnosi

Per limitare la diffusione delle CDI è fondamentale una pronta e precisa diagnosi.

Radiografie, ed endoscopie sono largamente sorpassate dai test di laboratorio per l'individuazione del *C. difficile*, in quanto costose, sgradevoli per i pazienti, relativamente insensibili e poco specifiche. [27]

I test di laboratorio sono raccomandati per tutti gli adulti e i bambini dopo il primo anno d'età con manifestazioni diarroiche comparse durante o entro poche settimane da una terapia con antibiotici.

Attualmente non c'è un singolo test che sia dotato contemporaneamente di elevata sensibilità, specificità e rapidità.

La diagnosi si basa sulla ricerca nelle feci del batterio e/o di suoi antigeni, tossine o acidi nucleici. La ricerca di indici di reazione infiammatoria nelle feci (leucociti, lattoferrina, calprotectina) è spesso positiva, ma non è patognomica della CDI.

I test di prima scelta sono quelli che ricercano la presenza delle tossine biologicamente attive e si basano sull'effetto della citotossina B su colture cellulari. Questi test presentano una specificità del 99-100%, se associata a saggio di neutralizzazione, ed una sensibilità dell'80-90% [28] tuttavia il loro maggior svantaggio è la lunga durata della procedura diagnostica (24-48h) e la necessità di impiego di personale tecnico altamente specializzato. [29]

La ricerca del cosiddetto antigene comune (glutammato deidrogenasi - GDH), indica la presenza di *C. difficile*; il test è dotato di buona sensibilità, ma, in caso di positività, richiede conferma con un test più specifico, in grado di evidenziare la presenza delle tossine A e B. [30]

La coltura prevede la semina del campione fecale, previo arricchimento, su terreni selettivi/differenziali: l'identificazione di specie si avvale di semplici criteri morfologici e organolettici (aspetto delle colonie, odore caratteristico). È attualmente ritenuta il test più sensibile e anche specifico a condizione che venga saggiata la capacità degli isolati di produrre tossine (coltura tossinogenica). A causa del tempo richiesto non è indicata quale test diagnostico di screening. L'esecuzione della coltura può tuttavia permettere di fare diagnosi di CDAD nei casi in cui i test

immunologici o molecolari per la ricerca della tossina siano risultati negativi ed ha comunque una insostituibile valenza epidemiologica.

La ricerca della sola tossina A con metodiche immunoenzimatiche (EIA) è poco sensibile data la presenza di ceppi produttori della sola tossina B, è sempre meno diffuso e se ne sconsiglia l'uso.

Al contrario la ricerca di entrambe le tossine A e B utilizzando metodiche immunoenzimatiche (EIA) è mediamente sensibile (75%), anche in relazione al cut-off utilizzato ed è dotato di buona specificità (90%-100%); per la sua praticità e affidabilità è il test attualmente più diffuso nei laboratori. Rispetto al test antigenico, risente maggiormente delle modalità di conservazione del campione perchè le tossine si degradano piuttosto rapidamente se il campione non viene conservato a 2°- 8°C. Test EIAs in commercio danno risultati in poche ore ma hanno una più bassa sensibilità rispetto alla coltura fecale ed ai saggi di citotossicità cellulare.

Un test di biologia molecolare come la PCR eseguita sul campione fecale ha una sensibilità superiore a quella della metodica EIA [31] pari al 100% e una specificità del 94% rispetto ai test di citotossicità, unitamente ad un breve tempo di esecuzione (meno di 4 ore). Tuttavia la positività per la presenza dei geni non è in grado di evidenziare l'attività biologica del ceppo e delle tossine da esso prodotte.

A causa delle limitazioni di ciascun metodo, sono state proposte numerose combinazioni di test: in genere queste prevedono due metodi in sequenza, di cui il primo più sensibile e il secondo più specifico (two step workup). Esistono saggi di neutralizzazione alla citotossicità delle colture cellulari (CCNAs) e alla tossigenicità comparati a test di amplificazione degli acidi nucleici (NAATs) che risultano essere efficaci ma che richiedono dalle 24 alle 72 ore per la loro esecuzione.

Test di amplificazione degli acidi nucleici mediante PCR real time sono stati realizzati per la diagnosi del C. difficile e approvati dall'FDA come il BD-GeneOhm®, il Prodesse® ProGastro, il Cepheid Xpert® che hanno come target la tcdB e l'Illumigene® che invece ricerca la tcdA e il PathLoc. [32]

2.1.6 Tossine

In particolari condizioni di squilibrio della flora intestinale, come in seguito ad una terapia antibiotica, il C. difficile può diventare pericoloso per l'ospite. In queste condizioni particolari un individuo diventa un facile bersaglio per i batteri, a causa dei deboli meccanismi di difesa, e questo consente alle spore del C. difficile di trovare un ambiente adatto per passare alla forma vegetativa e moltiplicarsi.

Sono numerosi i fattori di virulenza che permettono la colonizzazione e la conseguente azione patogena: proteine flagellari, proteine dello strato di superficie e adesine. [33]

Si suppone che il meccanismo di colonizzazione sia un processo in due fasi: i ceppi batterici di *C. difficile* sono inizialmente in grado di interagire con microvilli apicali delle cellule epiteliali intestinali e di cominciare a produrre le tossine A e B, che interrompono le giunzioni tra le cellule epiteliali alterandone la funzione di barriera. Le cellule basali dell'epitelio intestinale diventano a questo punto accessibili ad una grande quantità di batteri che è quindi in grado di interagire mediante le proprie proteine di superficie con i loro recettori cellulari.

A mediare il legame dei batteri al tessuto ospite possono inoltre intervenire le adesine (strutture specializzate riconosciute negli acidi lipoteicoici dei batteri gram positivi) mentre le strutture flagellari contribuiscono alla virulenza dei batteri attraverso il processo di chemiotassi favorendo il movimento delle cellule batteriche verso la zona danneggiata.

Alcune proteine di superficie del *C. difficile* sono state caratterizzate: le proteine dello strato S, la flagellina FliC, la componente strutturale maggiore del filamento flagellare, la proteina flagellare cap FliD [34] e le proteine di parete cellulare Cwp66 e Cwp84 [35]. La proteina FliD ha dimostrato sia in vitro che in vivo proprietà adesive e in particolare, ha dimostrato un ruolo importante nel legame alla mucosa.

Le tossine A e B sono codificate da geni TcdA e TcdB localizzati in una regione cromosomica di 19,6Kb denominata locus di patogenicità (PathLoc). Questa zona contiene anche tre geni accessori: tcdR, che codifica per un fattore sigma alternativo dell' RNA polimerasi che regola la produzione delle tossine; tcdC, presunto regolatore negativo della produzione di tossine, che interferisce con l'RNA polimerasi; e il tcdE, un gene che codifica per una proteina simil Holin, localizzata a livello di membrana che regola la lisi del batteriofago ospite provocandone lo scoppio. [36] Variazioni nella struttura del Pathloc producono differenti tossinotipi.[37] Le tossine A e B prodotte da *C. difficile* sono comunemente note come enterotossina (tossina A) e citotossina (tossina B).

La tossina A si lega sul lato apicale delle cellule epiteliali e una volta internalizzata ne distrugge il citoscheletro e le giunzioni serrate intercellulari provocando la perdita della funzione di barriera epiteliale. Le cellule morte e i mediatori dell'infiammazione rilasciati dalle cellule epiteliali intossicate attraggono i neutrofili. Grazie alla rottura delle giunzioni serrate le tossine B sono in grado di attraversare l'epitelio; a differenza della tossina A, la B aggredisce le cellule epiteliali preferenzialmente dal lato basolaterale. Entrambe le tossine sono citotossiche e inducono la

produzione di TNF- α e citochine pro-infiammatorie, contribuendo ad innescare e alimentare la risposta infiammatoria e la formazione delle pseudomembrane (figura 3). [38]

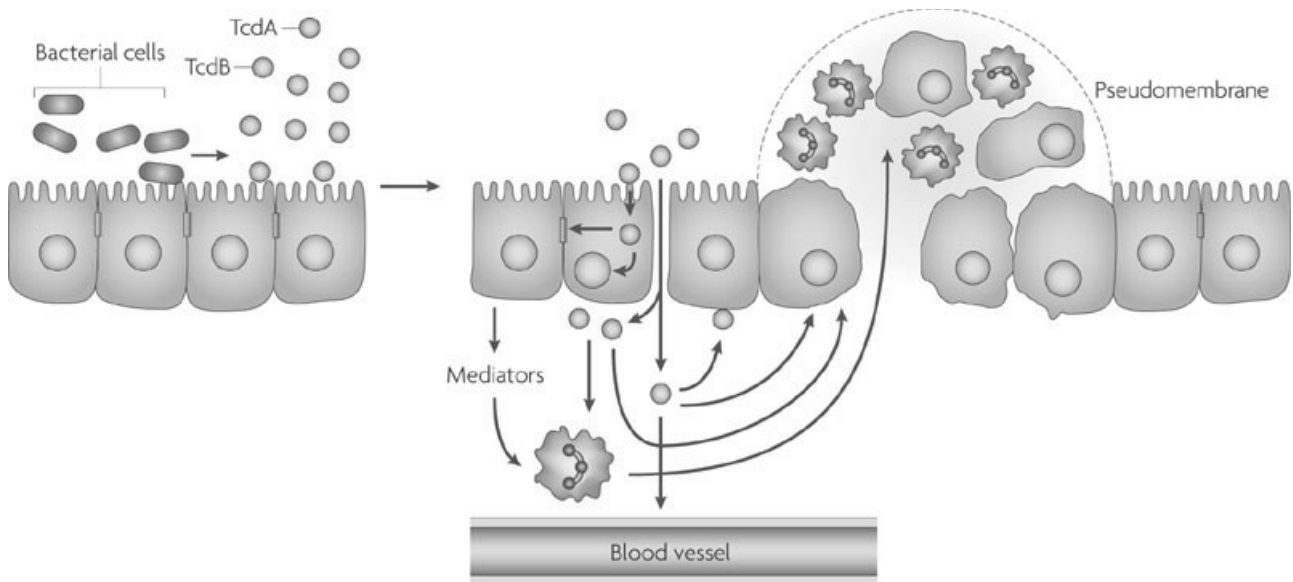


Figura 3 - Meccanismo del danno mediato dalle tossine del C. difficile - Rupnik et al. [39]

Una caratteristica importante di queste due tossine è data dalla loro modularità. Esse sono infatti costituite da tre distinti domini. [40] Il dominio N-terminale, chiamato anche dominio A è di tipo catalitico e possiede piena attività biologica. [41] Il dominio C-terminale è formato da oligopeptidi ripetuti ed è deputato al legame tossina-recettore presente sulla superficie di cellule epiteliali intestinali dell'ospite favorendo l'endocitosi della tossina. [42] Il dominio centrale rappresenta la parte più grande delle due proteine ed è caratterizzata da un piccolo tratto idrofobo che sembrerebbe deputato a mediare l'inserimento nella membrana durante il processo di traslocazione. [43]

I bersagli intracellulari delle glicoltransferasi sono piccole GTPasi della famiglia Rho [44], 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 regolazione del citoscheletro di actina, l'adesione e la migrazione. Esse controllano anche le attività enzimatiche, la trascrizione genica, la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi. [45]

Le tossine A e B catalizzano la mono-O-glicosilazione della GTPasi Rho nel residuo aminoacidico di treonina, che è essenziale per lo svolgimento delle funzioni da parte della GTPasi. [44]

L'inattivazione della proteina determina la perdita della struttura citoscheletrica delle cellule eucariotiche dell'ospite ed, inducendo la produzione del TNF- α e citochine pro infiammatorie, contribuisce ad innescare la risposta infiammatoria [46] che è responsabile dell'imponente danno tissutale conseguente all'infezione batterica, più dell'azione citotossica delle tossine .[47]

Un altro meccanismo patogenico, tipico delle tossine A e B, prevede la rottura delle giunzioni serrate ("tight junctions") tra le cellule della mucosa con conseguente aumento della permeabilità epiteliale e poi vascolare. Infatti entrambe le tossine vengono associate alla comparsa di fenomeni emorragici nella mucosa intestinale. [48]

Recentemente è stata dimostrata per alcuni ceppi di *C. difficile* la produzione di una terza tossina, una tossina binaria, composta da due diverse sub-unità: una sub-unità enzimatica denominata CDTa e una di legame denominata CDTb. [49] 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 PathLoc.

Anche se il meccanismo d'azione della tossina binaria è ben noto, il suo ruolo come fattore di virulenza nell'uomo non è ancora del tutto chiarito. Studi clinici su animali hanno dimostrato che la tossina binaria è in grado di causare secrezione di fluidi ma non particolari danni alle cellule epiteliali. [50]

2.1.7 Prevenzione

In base alle conoscenze acquisite negli anni sulle caratteristiche del *C. difficile*, è consigliabile seguire alcune semplici regole per ridurre il rischio del contagio, soprattutto nell'ambiente ospedaliero, dove questo microorganismo viene riscontrato ogni anno con maggior frequenza:

- usare oculatamente gli antibiotici, soprattutto fluorochinoloni, cefalosporine e antimicrobici ad ampio spettro;
- isolare pazienti infetti o presunti tali;
- porre particolare attenzione all'igiene delle mani da parte dei pazienti e soprattutto del personale medico e infermieristico, prediligendo la detersione con sapone e acqua che è in grado di rimuovere meccanicamente le spore del *C. difficile* contrariamente ai gel alcolici;
- sterilizzare tutti gli strumenti riutilizzabili che sono venuti a contatto con materiale fecale di pazienti infetti.

Uno studio recente ha infatti dimostrato che tra il 16% e l'80% delle spore di *C. difficile* presenti su mani contaminate vengono trasferite durante una stretta di mano nonostante si sia precedentemente usato un gel a base alcolica per l'igiene della cute. [51]

Le spore del *C. difficile*, infatti, non sono uccise da sostanze alcoliche, né dagli acidi o da sostanze a base ammoniacale normalmente usate come disinfettanti; queste ultime in particolare, oltre a non essere sporicide, possono favorire il *C. difficile* a passare dalla forma vegetativa a quella di spora, più resistente e potenzialmente patogena.

Le uniche sostanze che si dimostrano efficaci nell'eliminazione delle spore di *C. difficile* sono i disinfettanti a base di soluzioni al 10% di sodio ipoclorito [52], una concentrazione normalmente non utilizzata nelle procedure di sanificazione standard nelle unità di degenza ospedaliera. È stato dimostrato che le spore di *C. difficile* sopravvivono per anni, venendo continuamente spostate tra le varie superfici presenti nell'ambiente ospedaliero. [53]

Per quanto riguarda la prevenzione è stata prescritta una revisione accurata delle misure di controllo delle infezioni da *C. difficile* da parte del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), un'agenzia UE che ha il compito specifico di identificare, valutare e comunicare le minacce alla salute dell'uomo rappresentate dalle malattie infettive.

Per le procedure di profilassi per le CDAD è fortemente sconsigliato un trattamento farmacologico sui portatori di *C. difficile* asintomatici. [54] Infatti è stato dimostrato che se questi vengono trattati con vancomicina o metronidazolo sviluppano un più alto rischio di reinfezioni e di infezioni clinicamente manifeste rispetto a portatori asintomatici trattati con placebo, senza contare il rischio di incrementare la resistenza del batterio verso gli antibiotici comunemente impiegati per la sua eradicazione con conseguente danno sia sociale che economico.

2.1.8 Terapia nelle CDAD

Per trattare le infezioni da *C. difficile* un rimedio sicuro ed efficace è la sospensione della terapia antibiotica. È stato dimostrato, infatti, che il 25% delle forme lievi di CDAD regredisce spontaneamente nel giro di 72 ore dalla sospensione dell'antimicrobico. [55]

Qualora la semplice sospensione non sia sufficiente è necessario ricorrere a terapie farmacologiche.

Il metronidazolo è un antibiotico usato per trattare infezioni sostenute da microrganismi anaerobi appartenente alla classe dei nitroimidazoli. È considerato il trattamento di prima linea per le patologie associate al *C. difficile* verso le quali ha dimostrato un alto tasso di successo e una

bassa incidenza di recidive, anche in paragone al trattamento con vancomicina per via orale. [56] I vantaggi del metronidazolo sono il basso costo della terapia, il mancato contributo all'emergenza di ceppi di *Enterococcus faecium* resistenti alla vancomicina [57] ed il veloce raggiungimento di una concentrazione efficace con somministrazioni per via endovenosa, evitando effetti collaterali gastrointestinali [58], ma recentemente sono aumentati sia i casi di fallimento del trattamento che quelli di recidive nelle terapie a base di metronidazolo, con una media di fallimenti attorno al 25%, con picchi del 50%. [59]

La vancomicina è un farmaco antibiotico prodotto da *Streptococcus orientalis* che fa parte della classe dei glicopeptidi. Si tratta di molecole ad alto peso molecolare, che agiscono inibendo nei batteri gram positivi la polimerizzazione della parete di peptidoglicano, un polimero contenente amminozuccheri (N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico). La vancomicina si lega al dimero D-Ala-D-Ala necessario a creare i legami crociati fra le catene di peptidoglicano, inibendo la costruzione della parete batterica e uccidendo le cellule in crescita.

È stato il primo farmaco usato nel trattamento delle patologie associate al *C. difficile* e attualmente è l'unico agente approvato dal FDA (Food & Drug administration) a questo scopo.

Viene considerato farmaco di prima scelta nei casi di CDAD ricorrenti e quando è sconsigliabile l'impiego del metronidazolo come nel trattamento di donne in gravidanza o in fase di allattamento e di quei pazienti refrattari alla terapia. [60]

La risposta iniziale al trattamento è favorevole nel 95% dei casi, tuttavia più del 20% presenta recidive a distanza di 1-2 settimane dalla fine del trattamento e tale rischio arriva al 65% dopo la seconda recidiva.

Importanti e significative differenze tra metronidazolo e vancomicina sono emerse in studi clinici con classificazione dei pazienti in base alla severità della loro CDAD. [61] Nei pazienti affetti da patologia di grado moderato i due farmaci hanno dimostrato un'efficacia simile, 90% per il metronidazolo e 98% per la vancomicina, ma nei casi più severi la vancomicina si è rivelata nettamente più efficace (97% contro il 76% del metronidazolo). [62]

2.1.9 Nuove prospettive terapeutiche

Tra le molecole in fase di sviluppo troviamo nuovi antibiotici, sostanze chelanti le tossine e agenti immunomodulatori.

La ramoplanina è un antibiotico lipoglicopeptidico che si è dimostrato attivo verso i batteri gram positivi sia aerobi che anaerobi [63] quali *Enterococcus* e *C. difficile*; esplica la propria attività

antibatterica bloccando la sintesi del peptidoglicano senza interferire con l'attività della vancomicina. È stata sviluppata per la terapia delle infezioni intestinali poiché raggiunge concentrazioni molto elevate a livello fecale. Uno studio di Fase II ha valutato l'efficacia della ramoplanina versus vancomicina [64]. I dati emersi hanno evidenziato un'accettabile efficacia con una scarsa tossicità, ma lo studio sottodimensionato per poter stabilire la non-inferiorità rispetto alla vancomicina.

La rifaximina è un derivato rifamicinico scarsamente assorbito a livello intestinale, attivo contro germi gram positivi e negativi sia aerobi che anaerobi attraverso l'inibizione della sintesi dell'RNA batterico. [65] Attualmente il farmaco è impiegato essenzialmente nella diarrea del viaggiatore e, soprattutto in Italia, per la gestione delle complicanze della cirrosi epatica. Recentemente, sono emersi incoraggianti dati in vivo sulla potenza dell'attività antibatterica della rifaximina contro il *C. difficile* [66]. Purtroppo, però, si sono evidenziati anche tre ceppi che hanno sviluppato resistenza, il che solleva dei dubbi sull'effettiva possibilità d'impiego dato il rischio di diffusione di tale resistenza. Una nota positiva su questo farmaco è che proprio i ceppi NAP1/027 presentavano le MIC più basse nei confronti della rifaximina che potrebbe quindi essere impegnata specificamente per le infezioni più severe sostenute da questo ceppo.

La nitazoxanide è un antibiotico approvato per il trattamento della diarrea da parassiti ed ha dimostrato in vitro di possedere una buona attività contro il *C. difficile*. Agisce interferendo con il meccanismo della reazione di trasferimento di elettroni catalizzato dalla piruvato-ferredoxin-ossireduccasi, indispensabile per il metabolismo anaerobio. L'inibizione di *C. difficile* si osserva già con basse dosi di nitazoxanide. È stato inizialmente confrontato con il metronidazolo in uno studio prospettico, randomizzato e in doppio cieco, ma la risposta antimicrobica sostenuta a 31 giorni non mostrava differenze fra i due trattamenti. [67]

La teicoplanina è strutturalmente simile alla vancomicina, essendo un glicopeptide non assorbibile che ha dimostrato attività contro il *C. difficile* con delle MIC inferiori a quelle della vancomicina stessa. Ha un'applicazione promettente con un tasso di cura del 96% e un tasso di recidive del 7%. [68]

L'acido fusidico è un antibiotico batteriostatico di origine fungina, registrato esclusivamente per la somministrazione topica; alla fine degli anni '90 è stato condotto uno studio prospettico, randomizzato controllato con metronidazolo, vancomicina e teicoplanina [68] dal quale è emerso che l'acido fusidico aveva un alto tasso di successo, ma il più alto tasso di recidive e di eventi avversi rispetto alle altre terapie.

Sono state studiate anche molecole come la colestiramina e il tolevamer per la loro possibilità di chelare le tossine presenti nel lume intestinale. L'associazione colestiramina/colestipolo ha mostrato la capacità di legare in vitro le tossine A e B. [69] Segnalazioni riportano che, dopo numerose recidive trattate con agenti tradizionali, pazienti sia adulti che pediatrici hanno risposto a questo trattamento, tuttavia un trial randomizzato e controllato ha fallito nel dimostrare un effetto sull'eliminazione fecale dei bacilli o delle tossine. [70] Tolevamer è un polimero di stilene sulfonato che ha dimostrato la capacità di legare in modo non covalente le tossine A e B [71] riducendo di oltre 80 volte l'accumulo di fluidi intraluminale e diminuendo di circa 16 volte la permeabilità intestinale rispetto ad un modello murino trattato con colestiramina; tuttavia, non avendo dimostrato un'efficacia superiore agli altri farmaci, gli studi volti ad una sua commercializzazione sono stati sospesi.

L'utilizzo di probiotici è da sempre molto controverso: essi agiscono restaurando la normale flora microbica intestinale e in tal modo, teoricamente, possono prevenire le CDAD. Vengono utilizzati ceppi di batteri *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e del lievito *Saccharomyces boulardis* ma la loro efficacia è discutibile. Esistono diversi studi sulla valutazione dell'efficacia dei lattobacilli nel trattamento delle CDAD, ma i risultati non sono definitivi. Recentemente, uno studio randomizzato in doppio cieco contro placebo, ha valutato l'efficacia della supplementazione con lattobacilli come agente profilattico [72] dimostrando una riduzione del rischio relativo del 17%.

Anche l'immunoterapia è stata studiata per valutare eventuali applicazioni nella gestione delle CDAD. Sulla base di studi su modelli animali, sono stati sviluppati due anticorpi monoclonali: CDA1 diretto contro la tossina A e MDX-1388 diretto contro la tossina B. Sono attualmente in corso trial di fase III per valutare l'efficacia e la sicurezza dell'aggiunta di tali anticorpi ad una terapia antibiotica standard. [73]

Poiché alti livelli di IgG anti-tossina A si associano a protezione verso CDAD [73], è stato sviluppato un vaccino con tossine A del C. difficile inattivate per verificare se sia possibile indurre una risposta immunitaria in pazienti con episodi ricorrenti di CDAD. [74] I risultati di un trial di fase I hanno dimostrato che quattro dosi di vaccino erano ben tollerate ed inducevano una risposta immunitaria in giovani volontari sani [75]; un secondo trial di fase I, condotto in pazienti sopra i 65 anni d'età, ha constatato che il vaccino, a differenti dosi, era ben tollerato e induceva una buona risposta immunitaria. [75]

Il trapianto di feci viene eseguito prelevando un campione fecale da un parente stretto o, se non disponibile, da un altro familiare o da donatore sano. Questa somministrazione si associa comunque a vancomicina 250 mg ogni 8 ore partendo 4 giorni prima e fino alla notte antecedente

alla procedura . [76] Benché eventi avversi seri non siano mai stati segnalati, esiste il rischio di trasmissione di patologie infettive, pertanto i donatori vengono selezionati con cura verificando la negatività per virus HBV, HCV, HIV-1 e 2, Clostridium difficile ed altri batteri e parassiti intestinali. Poiché la disponibilità del paziente ad accettare questo tipo di approccio può, in ogni caso, rappresentare un limite, l'indicazione al trapianto dovrebbe essere valutata nei casi severi refrattari alle terapie convenzionali.

La fidaxomicina è un antibiotico otto volte più potente in vitro rispetto alla vancomicina ed è stato studiato in casi isolati di C. difficile NAP1/B1/027. Ha un minimo assorbimento sistemico, ottiene alte concentrazioni fecali, un lungo effetto post antibiotico e possiede una ristretta attività contro la normale flora intestinale fornendo una terapia selettiva contro le infezioni da C. difficile inibendo l'enzima batterico RNA Polimerasi e causando la morte del batterio. La fidaxomicina è stata approvata per il trattamento della CDI negli USA nel maggio del 2011 e in Europa nel dicembre dello stesso anno. [77]

2.1.10 Terapia chirurgica

Non tutti i pazienti con CDAD possono essere trattati con successo con la terapia medica e in alcuni casi si deve ricorrere all'intervento chirurgico. In particolare la colectomia è l'intervento di prima scelta nei casi di coliti fulminanti refrattarie, perforazione dell'intestino, megacolon tossico, in generale nei casi particolarmente severi con mancata risposta alla terapia nelle 48 ore o nel caso di conclamato danno multi-organo. Alcuni studi hanno dimostrato una maggiore probabilità di sopravvivenza se i pazienti vengono sottoposti ad intervento chirurgico prima di sviluppare sepsi, prima dell'impiego di sostanze vasopressorie e/o prima di raggiungere un livello di leucociti pari a 20,000-50,000/mm³ e di lattato sierico pari a 2,2-5 mmol/L. [78]

Nei casi di sepsi e perforazione intestinale sottoposti a colectomia d'urgenza la mortalità nel periodo postoperatorio raggiunge comunque il 37-57%, soprattutto in caso di ceppi particolarmente virulenti di C. difficile. [79]

2.2. Resistenza

La resistenza è un fenomeno che si riscontra sempre più spesso tra le terapie adottate per la cura del C. difficile. Infatti gli antibiotici giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della CDI, poiché modificano la flora intestinale creando condizioni favorevoli all'acquisizione e proliferazione del batterio. La resistenza a diversi tipi di farmaci può esser generata da diversi meccanismi, come

l'accumulo di geni che codificano per la resistenza a diversi antibiotici o mutazioni genetiche che alterano i siti su cui agisce l'antibiotico. In Europa diversi studi hanno individuato una percentuale di resistenza ai farmaci dal 2,5% al 66%.

Nel *C. difficile* i trasposoni coniugativi sono coinvolti nella resistenza ai macrolidi, lincosammidi, streptogramina B (MLSB) e alle tetracicline. Storicamente, la maggior resistenza sviluppatasi nell'uomo riguarda la clindamicina e l'eritromicina, due antibiotici appartenenti al gruppo MLS B. Uno specifico trasposone coniugativo mobile chiamato Tn5398 è stato identificato in alcuni ceppi. Nel ceppo epidemico BI/NAP1/027 si è verificata una diminuzione della frequenza di resistenza derivante dal gene ErmB del gruppo MLSB. Si è inoltre osservato una resistenza alle tetracicline costante nel tempo. Nel *C. difficile*, la resistenza a questo gruppo, è comunemente attribuita al gene TetM associato al trasposone Tn5397 e al Tn916 che appartengono sia a batteri Gram positivi che negativi. Sempre un maggior numero di casi isolati mostrano che la sostituzione della Treonina in Isoleucina della girasi A e la mutazione dell'aspartato in asparagina e valina della girasi B conferiscono resistenza ai fluorochinoloni, come la Ciprofloxacina. Il trattamento standard corrente per i disturbi da *C. difficile* usa il Metronidazolo o la Vancomicina. Nel primo è stata osservata una resistenza in diversi ceppi, un incremento della MIC e dell'eteroresistenza; nel secondo, invece, solo un ceppo è risultato resistente. In uno studio condotto su ceppi europei si sono analizzati i modelli di suscettibilità e i meccanismi di resistenza a diversi antibiotici: eritromicina, clindamicina, moxifloxacina, tetraciclina, vancomicina, metronidazolo, rifampicina, cloramfenicolo, levofloxacina, gatifloxacina e ciprofloxacina. [80]

2.2.1 Epidemiologia del gene ErmB

La resistenza al gruppo di antibiotici MLSB è meno comune della resistenza ai fluorochinoloni. È stata identificata un'elevata corrispondenza tra i ribotipi individuali e la resistenza agli agenti antimicrobici del gruppo MLSB. La presenza del gene ErmB è stata valutata mediante PCR in tutti i ceppi isolati ed è risultata positiva nel 90% dei casi presentanti un'elevata resistenza. Inoltre si è dimostrata un'associazione tra l'esposizione a questi composti nelle otto settimane precedenti la diagnosi di disturbi da *C. difficile* e la resistenza o la presenza del gene ErmB. Gli antibiotici appartenenti al gruppo MLSB sono stati ampiamente usati nel trattamento delle infezioni da gram positivi e la metilazione dell'adenina del rRNA della subunità 50S che fungerebbe da bersaglio, causato dal gene ErmB, è responsabile del meccanismo di resistenza a questi antibiotici. [81]

2.2.2 Epidemiologia dei geni TetM/W

La resistenza alle tetracicline è spesso dovuta all'acquisizione di nuovi geni associati a plasmidi coniugativi o trasposoni. Le tetracicline appartengono ad una famiglia di antibiotici ad ampio spettro che inibiscono la sintesi delle proteine nei batteri gram positivi e gram negativi prevenendo il legame delle molecole aminoacil-tRNA alla subunità ribosomiale 30S. [82] La resistenza a questa classe di farmaci si verifica attraverso la produzione di enzimi inattivanti o l'alterazione del ribosoma che quindi previene il legame effettivo. Sin dalla loro introduzione nel 1950, le tetracicline sono state ampiamente usate nella medicina umana, ma anche in quella veterinaria, per promuovere la crescita degli animali d'allevamento, e per la profilassi delle piante in agricoltura. Ad oggi la resistenza alle tetracicline si è diffusa in quasi tutte le famiglie di batteri, forse a causa della conseguente sovraesposizione ambientale. Tra i fattori di protezione ribosomiale il Tet M, identificato nel trasposone Tn 5397, è stato descritto all'inizio negli Streptococchi e successivamente nei batteri gram positivi e negativi. [83] Solo da studi recenti si è riscontrata la presenza del gene Tet W nei ruminanti e nella flora intestinale umana e dei maiali, con la sola differenza di una sostituzione nucleotidica nel frammento interno amplificato 1.25kb.[84]

2.3 TcdC Il gene della virulenza

Recentemente un ceppo di *C. difficile* ipervirulento è stato associato ad una epidemia che ha causato un aumento di mortalità e morbilità conseguente la CDI. L'epidemia è stata studiata prendendo in considerazione tre ceppi di riferimento: il ribotipo 027, il ribotipo 078 e il ribotipo 018 presentanti delezioni all'interno del gene tcdC, identificato come possibile regolatore negativo della produzione di tossine. È stata identificata una lieve differenza tra i ribotipi, con una diffusione epidemica maggiore del ribotipo 027, forse conseguente alla presenza sia della delezione in tcdC che della possibilità di produrre tossina binaria. Di per sé la produzione di tossina binaria non sembra essere un fattore di virulenza, ma l'associazione con la delezione nel gene tcdC sembra aver aumentato la frequenza una sintomatologia grave e di ospedalizzazione. [85]

2.4 Malattie infiammatorie croniche intestinali - IBD

Con l'acronimo IBD (Inflammatory Bowel Disease) si identificano le malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale cronico-ricidivanti ad eziologia ignota che alternano periodi di benessere (quiescenza-remissione) a periodi di attività (ricaduta-ricidiva) in cui il passaggio da uno stato

all'altro può verificarsi in qualsiasi momento, con effetti negativi sullo stato di salute e sulla qualità della vita del paziente. Le due maggiormente riscontrate sono la malattia di Crohn (Crohn's disease – CD) e la colite ulcerosa (ulcerative colitis – UC). La distinzione tra CD e UC è di notevole rilevanza sia clinica che terapeutica, ma a volte (circa nel 5% dei casi) risulta difficile: quando non è possibile classificare la malattia si utilizza il termine di IBD-U. [86]

CD e UC, pur condividendo molte caratteristiche, producono manifestazioni cliniche diverse.

La CD può colpire qualsiasi parte del tratto gastrointestinale, dal cavo orale all'ano, ma con maggior frequenza interessa l'ileo terminale in regioni non troppo estese ed il colon, soprattutto prossimale. L'infiammazione coinvolge tutto lo spessore della parete intestinale.

La UC è presente esclusivamente nel colon e nel retto, è in grado di interessare anche la totalità del grosso intestino e coinvolge la sola mucosa intestinale.

Entrambe causano concomitanti manifestazioni infiammatorie extraintestinali.

La mucosa del tratto gastrointestinale è caratterizzata da un perfetto equilibrio del sistema immunitario in cui la tolleranza nei confronti della normale microflora intestinale e degli antigeni presenti negli alimenti non determina infiammazione. [87] Nelle IBD, questa omeostasi risulta invece alterata con il risultato di due anomalie patogeniche fondamentali: una risposta immunitaria contro la normale flora batterica e difetti nella funzione epiteliale di barriera. L'attuale mancanza di informazioni sulla eziopatogenesi, classifica CD e UC tra le malattie idiopatiche. Attualmente si ipotizza che le IBD siano il risultato di un eccesso di risposta immunitaria contro antigeni luminali in soggetti geneticamente predisposti [88]

I dati epidemiologici più recenti [89] indicano un'incidenza delle IBD in Italia attorno a 9-10 casi/100.000 abitanti/anno con una prevalenza che potrebbe raggiungere i 4 milioni in Europa.

2.4.1 Colite Ulcerosa

È una malattia infiammatoria cronica dell'intestino circoscritta al crasso, descritta per la prima volta in letteratura nel 1875 da Wilks e Moxon, che interessa nel 20% dei casi l'intero colon (pancolite o colite totale), nel 30- 40% si estende oltre al sigma (colite estesa), mentre nel 40-50% si sviluppa a livello del retto (proctite) e del retto-sigma e interessa solo mucosa e sottomucosa. Si parla di colite distale se è coinvolta solo la parte sinistra del colon. A differenza della CD, la UC si estende senza soluzione di continuità in senso prossimale a partire dal retto.

Dal punto di vista epidemiologico in Italia l'incidenza (nuovi casi/n°abitanti/anno) è di 5/100.000/anno, con una prevalenza (n°malati/n°abitanti) di 65/100.000; valori che si sono mantenuti abbastanza stabili negli ultimi 25 anni.

I giovani adulti (25-40 anni) sono i soggetti in cui l'incidenza è maggiore, anche se nessuna età sembra essere esente dal rischio; un secondo picco ad esempio è riscontrato negli anziani con più di 70 anni. Come riscontrato nella CD, anche questa patologia sembra presentare una tendenza alla familiarità, anche se in modo meno marcato.

Le caratteristiche fondamentali dell'infiammazione sono la distribuzione continua delle lesioni e il coinvolgimento limitato alla sola mucosa. La mucosa si presenta friabile, iperemica e facilmente sanguinante se toccata; inoltre vi è presenza di ulcerazioni ed emorragie e aree isolate di mucosa in rigenerazione sporgono nel lume (pseudopolipi). Nella fase attiva della malattia vi è infiltrazione di neutrofili nella mucosa con possibile formazione di ascessi nelle cripte, ma non di granulomi come nella CD.

La sintomatologia è sovrapponibile alla CD: dolore addominale, diarrea con sangue, febbre astenia, ma si possono verificare anche stipsi e tenesmo quando il coinvolgimento è prevalentemente rettale.

Le complicazioni intestinali della colite ulcerosa sono il megacolon tossico (il danno infiammatorio alla muscolaris mucosae ed ai plessi nervosi produce la completa cessazione dell'attività neuromuscolare producendo un colon ipotonico e dilatato di oltre 6 cm, contenente gas ed a rischio di perforazione), emorragie, perforazione ed un'elevata incidenza di adenocarcinoma del colon.

Le complicanze extraintestinali sono sostanzialmente comuni alle due malattie e costituiscono situazioni cliniche che possono essere più gravi della stessa patologia intestinale e che possiedono specifiche caratteristiche di tipo infiammatorio cronico ed autoimmunitario. Le più frequenti sono le patologie articolari: artrite enteropatica (colpisce soprattutto anca, ginocchio e gomito ma anche caviglie, polsi e articolazioni della mano) e spondilite anchilosante. Quest'ultima è la più comune malattia infiammatoria dello scheletro assiale: determina dolore lombare e rigidità progressiva della colonna vertebrale. Manifestazioni oculari (irite, uveite) e cutanee (eritema nodoso, pioderma gangrenoso) possono insorgere nel 5% dei pazienti.

2.4.2 La malattia di Crohn

Quando la CD è stata descritta per la prima volta da Crohn, Ginsbug e Oppenheimer nel 1932, pensando che questa malattia fosse limitata all'ileo terminale, è stata adottata la denominazione di ileite terminale. L'osservazione che la malattia può colpire segmenti intestinali nettamente delimitati, intervallati da zone sane, ha portato alla successiva denominazione di enterite regionale. I casi con prevalente interessamento colico hanno dato origine ad una terza denominazione: colite granulomatosa. La consapevolezza che la malattia può insorgere a ogni livello del tratto gastrointestinale e che si possono verificare manifestazioni sistemiche, ha fatto infine preferire la moderna denominazione di malattia di Crohn.

La CD si presenta in Italia con un'incidenza (n° malati/n° abitanti/anno) di 4/100.000/anno ed una prevalenza (n° malati/n° abitanti) di 52/100.000, valori che sono triplicati negli ultimi 25 anni. Può manifestarsi ad ogni età, ma la popolazione più colpita è quella giovanile (15-30 anni). Infatti, nel 75% dei casi i pazienti colpiti hanno un'età inferiore ai 35 anni, l'incidenza aumenta nuovamente nella terza età (65 anni). Non sono rari casi anche nei bambini e negli adolescenti, circa il 20% del totale . [90]

La CD tende a manifestarsi in più membri di una stessa famiglia, in particolare alcuni studi hanno mostrato che il 20-37% dei pazienti possiede un parente stretto affetto da CD o UC [91] anche se non si conosce il meccanismo preciso implicato in questa predisposizione familiare; di conseguenza non si è in grado di prevedere se e quale familiare di un paziente con IBD abbia maggiori probabilità di sviluppare a sua volta la malattia.

La CD può interessare qualsiasi porzione del tratto gastrointestinale, ma si riscontra più frequentemente nell'intestino tenue terminale e nel colon. Vi sono tre principali tipi di presentazione della malattia: coinvolgimento dell'ileo e del cieco (40% dei casi), coinvolgimento del solo ileo terminale (30%), malattia limitata al colon (25%).

Nella CD si riscontra un ispessimento della parete intestinale con congestione della sierosa; sono spesso presenti lesioni segmentarie, definite fessurazioni, consistenti in ulcere che si estendono in profondità interessando lo strato sieroso, fenomeno che può portare a sviluppare aderenze tra anse contigue e formazione di fistole. L'ispessimento della parete, associato alla presenza di fibrosi di origine infiammatoria può causare la comparsa di stenosi intestinale. [92]

Un fenomeno caratteristico della mucosa affetta da CD è il cosiddetto aspetto ad acciottolato ("cobblestone") dove fessurazioni comunicanti circondano aree di mucosa integra.

Le manifestazioni cliniche della CD sono estremamente variabili e sono spesso più subdole di quelle della UC. La malattia esordisce frequentemente con episodi intermittenti di diarrea relativamente lieve, febbre, dolore addominale, intervallati a periodi asintomatici di settimane o anche di molti mesi. Spesso le esacerbazioni della malattia sono scatenati da periodi di stress fisico o emotivo. Nei pazienti con interessamento del colon, le perdite di sangue nelle feci, occulte o meno, possono causare anemia; un'emorragia importante è tuttavia un evento raro. In un quinto circa dei pazienti l'esordio è netto, con dolore acuto nel quadrante inferiore destro, febbre e diarrea, che possono simulare un'appendicite acuta o una perforazione intestinale.

Nel corso della malattia possono insorgere complicanze dovute a stenosi cicatriziali, in particolare all'ileo terminale, e fistole che mettono in comunicazione il viscere colpito con altre anse intestinali, la vescica, la vagina, la cute perianale o un ascesso peritoneale. L'esteso interessamento dell'intestino tenue, incluso l'ileo terminale, può causare una marcata perdita di albumina, malassorbimento generalizzato, malassorbimento specifico della vitamina B12 o malassorbimento dei sali biliari. Nonostante le numerose possibili complicazioni, il tasso di mortalità legato alla CD è relativamente basso (7%).

2.4.3 Flora intestinale e meccanismi di difesa

Il più grande "organo immunitario" del corpo umano è situato proprio nel tratto gastrointestinale: il GALT (gut associated lymphoid tissue), "tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale"; le cellule, distribuite per tutta la lunghezza dell'intestino, producono ben l'80% delle immunoglobuline dell'organismo e rappresentano il 40-50% del tessuto linfoide.

Il tratto gastrointestinale è continuamente esposto ad antigeni introdotti con il cibo dal quale l'organismo si difende con vari meccanismi. La prima linea di difesa è la barriera mucosale mentre la componente immunitaria è costituita appunto dal GALT che comprende: linfociti T, linfociti B e fagociti. Tuttavia, alcuni patogeni specializzati sono in grado di invadere l'epitelio intestinale sottraendosi alla fagocitosi da parte delle cellule del sistema immunitario.

La barriera mucosale intestinale è costituita da un unico strato di cellule colonnari e da tessuto linfoide organizzato. Le cellule epiteliali intestinali hanno sulla propria superficie apicale dei microvilli ricoperti da glicocalice, uno strato amorfo ricco di zuccheri neutri ed aminati: microvilli e glicocalice costituiscono l'orletto a spazzola. L'anatomia delle cellule epiteliali aiuta a prevenire l'ingresso di antigeni, in quanto sono connesse tra loro da giunzioni strette; inoltre, queste cellule, esprimono i recettori MHC-2 per la presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario. Le cellule intestinali producono anche sostanze antimicrobiche, defensine e mucine, che

aumentano le difese nei confronti dei patogeni. I batteri vengono intrappolati nello strato mucoso ed espulsi dall'intestino con i movimenti peristaltici. Altri componenti importanti del muco sono gli enzimi proteolitici che facilitano la digestione dei polipeptidi in peptidi di 8-10 aminoacidi diminuendone l'immunogenicità.

Fin dai primi mesi di vita l'interazione tra GALT e microflora ha un ruolo cruciale per un efficace sviluppo del sistema immunitario sia mucosale che sistemico dell'individuo.

Le strutture del GALT sono ubiquitarie, dalla cavità orale all'ampolla rettale; il tessuto linfoide all'interno del GALT può presentarsi in forma di agglomerati o soprattutto nell'intestino crasso, come noduli isolati. Nell'intestino tenue le strutture linfatiche più frequenti sono le Placche del Peyer, ciascuna costituita da noduli linfatici che occupano la lamina propria e la sottomucosa dell'ileo e vascolarizzate da un'estesa rete di capillari che si dispone attorno ai follicoli.

Il GALT utilizza un sistema di tolleranza e di controllo sull'infiammazione allo scopo di limitare la risposta immunitaria nei confronti di antigeni provenienti dal cibo o da batteri non patogeni presenti nel tratto gastro-intestinale. [93] Tale tolleranza ha inizio durante la vita intrauterina e prosegue nell'infanzia fino alla pubertà, quando il timo comincia il suo processo involutivo. Questo meccanismo prevede la soppressione dei linfociti T autoreattivi e la selezione di linfociti regolatori e dei linfociti B a livello del midollo osseo. [94] Quando tale complesso sistema è sbilanciato da insulti chimici o da microbi patogeni, in individui geneticamente predisposti, si può manifestare l'insorgenza delle IBD. [95]

Nel tratto gastrointestinale umano è presente una popolazione microbica diversificata, comprendente dalle 500 alle 1000 specie diverse, denominato "microbiota gastrointestinale".

Il microbiota è costituito da una comunità di microrganismi vivi distribuiti in diverse nicchie metaboliche del tratto digerente. Considerando che l'intero corpo umano è composto da circa 10^{13} cellule, la flora microbica è 10 volte più numerosa. Il microbiota racchiude sia specie autoctone, acquisite dalla nascita, sia microrganismi transitori di origine ambientale.

Da un punto di vista quantitativo, il colon è il distretto corporeo che ospita il maggior numero di microrganismi con un range tra 10^{10} a 10^{12} CFU/mL di feci. Negli altri distretti del tratto gastrointestinale la quota di batteri costituente la flora risulta di molto inferiore, con $10^4 - 10^5$ CFU/mL nel digiuno e nell'ileo e appena $10^2 - 10^3$ CFU/mL nello stomaco e nel duodeno.

A livello dell'epitelio intestinale la microflora lo colonizza addensandosi in sottili pellicole costituite da un mix di batteri, muco e molecole immunitarie, definite "biofilm", che tappezza la mucosa. [96]

Un ruolo importante nell'equilibrio tra batteri intestinali e ospite è svolto appunto dal muco che riveste l'epitelio del lume. Se per qualche motivo lo strato di muco si assottiglia o peggiora, scompare, i batteri possono dare origine a siti di adesione aggiuntivi sulla superficie delle cellule epiteliali. Variazioni ontogeniche nella composizione del muco possono manifestarsi frequentemente nel decorso delle IBD determinando il fenomeno di “disbiosi”, ossia lo squilibrio a carico della popolazione microbica protettiva con aumento di batteri con potenziale attività patogena. [97]

I batteri, potrebbero esacerbare le reazioni immunitarie, fornendo antigeni e inducendo co-stimolatori e citochine tutti in grado di contribuire all'attivazione dei linfociti T.

2.4.4 La risposta dell'ospite ai patogeni

Qualora un agente estraneo venga a contatto con il GALT, l'organismo è in grado di mettere in atto una potente risposta di tipo infiammatorio attraverso l'azione di effettori sia dell'immunità innata che di quella acquisita. La risposta dell'ospite nei confronti di microrganismi patogeni è scatenata al contatto tra l'antigene e uno dei molteplici recettori di cui sono fornite le cellule del sistema immunitario e dell'epitelio intestinale.

I recettori coinvolti nel primo legame al patogeno sono indicati come “pattern recognition receptors” (PRRs) in quanto riconoscono strutture molecolari conservate dei microbi (PAMPs). Tra questi i recettori Toll like (TLRs) a livello delle membrane cellulari e i recettori intracellulari chiamati NOD (Nuclear binding Oligomerization Domain). Il contributo di questi recettori nella risposta immunitaria innata è mediato dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B che aumenta la trascrizione di geni codificanti citochine e chemochine che promuovono e sostengono il processo infiammatorio. [98]

Un'alterata regolazione di questi recettori è in grado di innescare una risposta infiammatoria nei confronti di antigeni normalmente presenti nel lume intestinale in soggetti predisposti alle IBD. [99]

Le citochine rappresentano un'ampia famiglia di glicoproteine rilasciate, in seguito ad uno stimolo, nei tessuti e nel circolo ematico. Esse svolgono il ruolo di “messaggeri cellulari” permettendo una comunicazione fra gli innumerevoli componenti del sistema immunitario che sono in grado di autoregolarsi con meccanismi autocrini. Tali sostanze vengono prodotte sia da cellule immunocompetenti, come macrofagi, linfociti e neutrofilii polimorfonucleati, sia da cellule epiteliali, endoteliali e da miofibroblasti, spesso in risposta all'attivazione del fattore nucleare NF- κ B. Le azioni di danno alla mucosa intestinale da parte delle citochine sono numerose: IL-6 e IL-8

stimolano la chemiotassi dei neutrofili, INF- γ (interferone γ) porta alla formazione di granulomi, TNF (tumor necrosis factor) e IL-1 infine determinano la lisi delle cellule epiteliali. [100]

Intervenendo nella modulazione di processi complessi e delicati, la loro azione è il risultato di un bilanciamento tra attivazione e inibizione, con fattori che intervengono per interrompere eventuali effetti tossici sull'organismo.

Nel corso delle IBD è stata osservata una produzione sregolata di citochine da parte di linfociti e macrofagi mucosali con incremento di linfociti T CD4+ intraepiteliali, soprattutto nei periodi di riacutizzazione. [101] I linfociti T, in particolare CD4+, sembrano i principali indiziati sia nella patogenesi della CD che in quella della UC e le lesioni osservate sono verosimilmente causate dai linfociti T prodotti.

Anche le chemochine svolgono un ruolo di rilievo nella patogenesi delle IBD, agendo su più fronti; esse infatti promuovono l'attivazione leucocitaria e la chemiotassi, l'esocitosi dei granuli, la produzione di metalloproteinasi volte alla degradazione della matrice e all'incremento del danno ossidativo. [102]

2.4.5 Il ruolo dei linfociti T

La popolazione linfocitaria che partecipa alla risposta immunitaria secernendo citochine è rappresentata dai linfociti T helper classificabili in due sottogruppi con diverso profilo citochinico: Th1 e Th2. [103]

I linfociti Th1 vengono coinvolti soprattutto durante le infezioni da parte di agenti patogeni intracellulari, come i virus, o nelle malattie autoimmuni, e le citochine da loro prodotte possiedono un'attività pro-infiammatoria (INF- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e TNF α) in grado di attivare altri linfociti T ed i macrofagi. La CD sembra essere il risultato di un'ipersensibilità di tipo ritardato causata proprio dai linfociti Th1 responsabili della produzione di IFN- γ . La natura dell'infiltrato infiammatorio, soprattutto per la presenza di granulomi, è compatibile con una risposta di tipo Th1. [104]

I linfociti Th2 invece vengono stimolati da antigeni patogeni extracellulari o da sostanze non patogene nelle reazioni allergiche; le citochine prodotte sono in grado di attivare i linfociti B o hanno attività anti-infiammatoria (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). [105] Ogni individuo possiede una diversa combinazione dei due tipi di linfociti T helper, dovuta a fattori sia genetici che ambientali (es. tipo di nutrizione e differenze sessuali, su base ormonale).

Sebbene modelli animali suggeriscano un ruolo patogenico derivante da un'eccessiva attivazione dei linfociti Th2 nella UC, nelle lesioni della corrispondente malattia umana non è stata riscontrata la presenza di IL-4, citochina caratteristica di questo tipo di reazione [106]

L'oscillazione del circuito Th-1/Th-2 è uno dei meccanismi messi in atto dal sistema immunitario per la propria regolazione, evitando così di danneggiare il self. Partecipano a questi meccanismi di autoregolazione altre famiglie di linfociti T: una è prodotta dal timo (T regolatori), l'altra, costituita dai linfociti T helper 3 (Th3), si forma durante il contatto con l'antigene e svolge un ruolo importante per l'omeostasi immunologica, attraverso la liberazione di grandi quantità di TGF- β (transforming growth factor β), citochina immunoregolatoria.

2.4.6 Eziologia e patogenesi

La patogenesi della UC e della CD è ancora sconosciuta. Risulta tuttavia evidente una predisposizione genetica a queste malattie, ma la combinazione di altri fattori anche ambientali possono giocare un ruolo importante, quali: età, dieta, fumo.

In merito alla predisposizione genetica, va chiarito comunque che le IBD non sono malattie ereditarie nel senso stretto del termine, cioè trasmissibili attraverso i cromosomi; tuttavia esiste una predisposizione familiare nello sviluppo di queste malattie ed un aumentato rischio per la progenie.

Il 15% dei pazienti affetti da IBD ha parenti di primo grado colpiti dalla malattia e il rischio di svilupparla nell'arco della vita in individui con un malato tra i genitori o fratelli è del 9%.

Per la CD sono state, infatti, individuate almeno quattro mutazioni sui cromosomi 16, 3, 7 e 12. Ad oggi la ricerca sulle mutazioni genetiche per la Malattia di Crohn sta focalizzando l'attenzione soprattutto sul cromosoma 16, in particolare sul gene CARD 15 che codifica per il recettore NOD2. Le mutazioni su questo gene sono state associate in modo esclusivo alla CD e riscontrate in circa un terzo dei pazienti affetti da tale patologia. [106]

La proteina NOD2 è espressa in molti tipi di leucociti e nelle cellule epiteliali e si ipotizza che funga da recettore intracellulare per i batteri. In seguito al legame con componenti batteriche, essa può innescare la via del NF- κ B, un fattore di trascrizione che stimola la produzione di citochine e di altre proteine coinvolte nella risposta immunitaria naturale contro agenti patogeni. Le mutazioni della NOD2 associate alla CD possono ridurre l'attività della proteina determinando la persistenza intracellulare dei microbi e una risposta immunitaria incontrollata e prolungata. Per quanto riguarda i recettori TLR, sono stati identificati diversi polimorfi, ad esempio il TLR5 che ha come ligando la

flagellina, espressa sulla superficie cellulare dei gram positivi e negativi, che riduce l'apoptosi epiteliale proteggendo l'integrità della barriera. E' stato dimostrato che questo recettore migliora l'alterazione patologica del cieco e del colon nei topi infettati da C. Difficile e riduce la perdita di cellule epiteliali. [107]

Per quanto riguarda la UC invece, non è stata individuata nessuna mutazione genetica in particolare.

L'ipotesi patogenetica più accreditata e comune per le due patologie è che, in soggetti geneticamente predisposti, un'inadeguata risposta immunitaria nei confronti di antigeni presenti nel lume intestinale come batteri, virus o alimenti, sia determinante nello sviluppo delle lesioni intestinali. [108]

Il fumo è un importante fattore ambientale nelle IBD, anche se con effetti diversi nella UC e nella CD. Un recente studio ha evidenziato che il fumo ha un effetto protettivo verso la prima in quanto, dopo l'insorgenza della malattia, può ridurre la severità del decorso limitando la necessità di intervenire con una colectomia. Tale effetto protettivo sembra dovuto all'azione protettiva sulla barriera intestinale svolta dalla nicotina o dai suoi derivati. [109] Al contrario nella CD il fumo aumenta il rischio di sviluppare tale malattia, peggiorandone il decorso, richiedendo maggior terapia con steroidi e immunosoppressori e le possibilità di un nuovo intervento chirurgico dopo il primo. [110]

Numerosi studiosi sostengono che le IBD possano essere causate dall'interazione del sistema immunitario con un agente esterno, come un batterio o un virus, il quale, danneggiando la parete intestinale, può dare il via al processo o per lo meno accelerarlo. Tra i microbi maggiormente implicati compaiono il *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP), il *Mycobacterium avium* subsp. e il virus del morbillo. [111] In aggiunta a quelli già menzionati, gli agenti patogeni considerati possibili fattori di rischio per l'emergere o il riacutizzarsi delle IBD sono assai numerosi, tra gli agenti di origine batterica troviamo l'*Escherichia coli*, la *Listeria monocytogenes*, la *Chlamidia*, il *Blastocystis hominis* e il *C. difficile*. [112]

I cibi, venendo in diretto contatto con la superficie dell'apparato gastrointestinale, possono interagire in situ, con risultati benefici o dannosi per il decorso di queste patologie. [113] La carenza di alcuni nutrienti, dovuta alla lesa funzionalità dell'epitelio intestinale, potrebbe essere ad esempio causa della mancata riparazione tissutale e inefficienza di altri meccanismi cellulari. [114]

I cibi più spesso accusati di favorire la riacutizzazione dei fenomeni infiammatori sono: cereali, latte, uova, alcune verdure e gli agrumi. [115]

L'evidenza di una maggior incidenza delle malattie infiammatorie croniche intestinali nei Paesi più industrializzati del mondo sembra trovare conferma anche nel tipo di alimentazione caratteristico dei Paesi più evoluti; infatti, una dieta ricca di carboidrati complessi, zuccheri, grassi e carni rosse sembrano rappresentare un fattore di rischio sia nello sviluppo sia nell'aggravamento di tali patologie. [116] Non va inoltre trascurato l'effetto negativo aggiuntivo costituito dall'abuso di sostanze additive, quali coloranti, conservanti, dolcificanti sintetici, aromatizzanti, ormai ubiquitari in qualsiasi categoria alimentare.

D'altra parte ci sono anche categorie di alimenti che si sono dimostrate benefiche nell'alleviare le situazioni flogistiche caratteristiche delle IBD, primi fra tutti gli acidi grassi polinsaturi omega-3, i quali sembrano svolgere un'azione regolatoria su alcuni fattori pro-infiammatori, e le fibre. [117]

2.4.7 Trattamento medico

Essendo le cause delle IBD ancora ignote, non esiste un trattamento medico in grado di ottenere una completa guarigione da queste malattie. I trattamenti farmacologici in uso hanno pertanto l'obiettivo di controllare la riacutizzazione della malattia sopprimendo la risposta infiammatoria, ovvero di ridurre la frequenza delle riaccensioni della malattia.

I corticosteroidi sono utilizzati nella fase di acuzie (dolore addominale e diarrea importante), specie alla prima presentazione a dosi piuttosto elevate e per periodi di diverse settimane. Non possono essere impiegati per mantenere lo stato di remissione delle malattie in quanto sono evidenti numerosi affetti avversi (ipertensione arteriosa, diabete, osteoporosi) soprattutto nel caso di una terapia prolungata. I più utilizzati sono prednisone e metilprednisolone somministrati per via parenterale od orale. Nelle forme lievi-moderate può essere utilizzato un cortisonico topico con azione locale e non sistemica, quale la budesonide o il beclometasone dipropionato.

L'azione dei corticosteroidi agisce sia sulla risposta immunitaria sia su quella infiammatoria; essi, infatti, interferiscono con la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B, impedendo così la sintesi di numerosi mediatori solubili. [118]

Gli amino salicilati sono dei derivati dell'acido salicilico, come salazopirina, mesalazina e sulfasalasina, il cui meccanismo d'azione prevede l'inibizione degli enzimi cicloossigenasi e 5-lipoossigenasi responsabili di metabolizzare l'acido arachidonico.

Questi farmaci sono efficaci nel trattamento degli episodi lievi e moderati di UC e CD e sono somministrati per via orale e/o rettale per prevenire eventuali ricadute. [119] Nei casi lievi-moderati

di UC vengono privilegiate forme farmaceutiche a trattamento locale sotto forma di clismi, supposte e schiume rettali.

Qualora gli attacchi si ripetano e vi sia necessità di un uso molto frequente di cortisone (oppure vi sia una mancata risposta al cortisone) si possono usare alcuni immunosoppressori come azatioprina, 6-mercaptopurina, metotressato e ciclosporina. Gli immunosoppressori agiscono alterando la capacità delle cellule immunitarie di amplificare il processo infiammatorio.

La 6-mercaptopurina e l'azatioprina sono degli antimetaboliti dei ribonucleotidi e agiscono impedendo la proliferazione linfocitaria; il metotressato, come antimetabolita dell'acido folico ha come target la diidrofolato reduttasi, enzima indispensabile per una corretta sintesi del DNA.

La ciclosporina è un immunosoppressore ad azione rapida che ha mostrato efficacia sia somministrato per via endovenosa che per via orale nelle forme severe di Colite ulcerosa che non rispondevano alla terapia con corticosteroidi per via endovenosa.

Tra gli antibiotici, i più comunemente usati sono il metronidazolo e la ciprofloxacina.

Questi farmaci sono solitamente utilizzati in caso di malattia con fistole pregresse, fistole attive o raccolte ascessuali. I trattamenti prevedono cicli di metronidazolo da solo o in combinazione con ciprofloxacina. Gli antibiotici tuttavia non rivestono grande importanza nel trattamento di queste malattie; al contrario, a volte possono rivelarsi addirittura nocivi a causa della loro capacità di alterare la normale flora microbica intestinale.

2.4.8 Farmaci biologici

Con il termine "farmaci biologici" si indicano tutti quei farmaci di nuova generazione studiati per agire soltanto su una singola struttura (proteina, recettore ad esempio) aumentando l'efficacia terapeutica e riducendo gli effetti indesiderati, usando le difese dell'organismo e modificandoli in modo da renderli capaci di riconoscere come aggressori le proteine coinvolte nel processo patologico. Già da diversi anni in Italia è disponibile sia per il trattamento della UC che della CD l'infliximab (Remicade, MSD): si tratta di un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico diretto contro la citochina TNF α .

Negli anticorpi chimerici viene ingegnerizzato il dominio variabile (Fv) di un anticorpo murino anti TNF con le porzioni costanti (Fc) di un immunoglobulina umana in modo che l'anticorpo risultante (chimerico) abbia una percentuale più elevata di sequenze umane e sia riconosciuto e distrutto solo in maniera minima dal sistema immunitario del paziente.

Benchè questo farmaco si debba utilizzare con una certa prudenza per il rischio di infezioni severe e siano necessari degli stretti controlli, la tendenza attuale è di utilizzarlo nelle fasi più precoci di malattia in quanto, in teoria, la malattia risponderà in modo tanto più completo quanto più sono assenti complicanze irreversibili quali stenosi fibrotiche. [120]

Più recentemente è stato autorizzato un nuovo anticorpo monoclonale anti-TNF α , adalimumab (Humira, Abbvie), per il trattamento della CD.

Oltre all'infliximab e all'adalimumab, sono in fase di sperimentazione numerosi altri farmaci biologici, alcuni diretti contro il TNF α , tra cui il Certolizumab, e altri diretti contro altre citochine o contro le integrine.

2.4.9 Probiotici e prebiotici

Sono da tempo utilizzati per ripristinare la flora batterica intestinale dopo episodi di enteriti acute (batteriche o virali), soprattutto in campo pediatrico, o in concomitanza a trattamenti antibiotici.

Il loro utilizzo nelle IBD è legato all'ipotesi che la somministrazione di probiotici e prebiotici possa ripristinare una situazione fisiologica adeguata, con una maggiore capacità di impedire il verificarsi di riacutizzazioni nei pazienti. [121]

2.5 Il C. difficile nelle malattie infiammatorie croniche intestinali

Pazienti trattati recentemente con antibiotici ad ampio spettro, pazienti ospedalizzati, soggetti immunocompromessi, così come persone anziane, sono i soggetti che corrono il più alto rischio di contrarre le patologie associate al C. difficile (CDAD).

Recentemente è emerso che pazienti con CD e UC, hanno gli stessi fattori clinici di rischio per lo sviluppo di CDAD; infatti spesso sono sottoposti a cure farmacologiche a base di immunosoppressori o trattati con antibiotici o ospedalizzati.

In passato il C. difficile era stato additato come possibile concausa delle malattie infiammatorie croniche intestinali, ma oggi si è più propensi a ritenere che siano le IBD ad essere un conclamato fattore di rischio per le CDAD, ma la ragione di questo non è ancora del tutto chiara.

Le possibili motivazioni alla base di questa teoria sono in realtà molteplici. Il fattore che sembra avere un ruolo di primo piano nella suscettibilità dei pazienti con IBD verso l'azione del C. difficile si può identificare nella diminuzione delle difese dell'ospite, dovute sia ai continui insulti subiti dalla mucosa intestinale sia al frequente utilizzo di terapie immunosoppressive.

Una alterata microflora intestinale, anche secondaria all'utilizzo di antibiotici, potrebbe quindi fornire un ambiente favorevole alla colonizzazione del *C. difficile* in questi pazienti.

Un altro fattore di rischio potrebbe essere il ridotto livello di peptidi endogeni ad azione antimicrobica che si riscontra nei pazienti affetti da IBD.

Le α -defensine nell'uomo sono prodotte, oltre che dalle cellule del Paneth, anche dai neutrofili circolanti (Human Neutrophil Defensins) ed entrambe le forme presentano una potente azione antimicrobica sia contro i batteri Gram positivi che negativi.

Le β -defensine sono sintetizzate da diverse cellule epiteliali (cute, tratto respiratorio, tratto gastrointestinale); diversamente dalle α -defensine, sono assenti nei neutrofili circolanti e, contrariamente a quello che accade nelle prime dove tutte le diverse forme sono attive indistintamente sui batteri Gram positivi e negativi, la β -defensina 1 e la β -defensina 2 sono più attive contro i batteri Gram negativi, mentre la β -defensina 3 svolge una potente azione contro i batteri Gram positivi. Questi peptidi mostrano molteplici attività: antimicrobica, antivirale, antineoplastica e immunomodulatoria (entrambe le isoforme presentano azione chemotattica sia per i linfociti T che per le cellule dendritiche). [122]

Numerosi studi hanno evidenziato un legame diretto tra l'attivazione dei recettori dell'immunità innata e l'aumentata produzione di questi peptidi a livello intestinale.

Le defensine contribuiscono a mantenere un equilibrio tra la protezione contro i patogeni e l'integrità della flora intestinale; una diminuzione dell'espressione delle defensine può portare a compromettere l'immunità contro i patogeni e quindi spostare l'equilibrio verso uno stato infiammatorio, assumendo di conseguenza un ruolo importante nell'immunità innata e nella risposta antimicrobica.

Nelle IBD si è riscontrato una diminuzione della produzione di questi peptidi endogeni anche se non è ancora chiarito se questo deficit sia implicato nella patogenesi delle IBD o piuttosto ne sia una conseguenza. [123]

Recentemente è stato scoperto che l' α -defensina svolge un ruolo importante contro gli effetti prodotti dalla tossina B del *C. difficile* e di conseguenza una riduzione dell'espressione di questi peptidi nelle IBD potrebbe predisporre all'infezione. [124]

Riguardo all'ipotesi che l'intestino tenue degli individui sani possa svolgere un ruolo di "reservoir" per il *C. difficile*, tale distretto non sarebbe colpito dal patogeno proprio grazie all'azione delle α -defensine, prodotte dalle cellule del Paneth.

In passato il collegamento tra IBD ed infezioni da *C. difficile* è stato a lungo trascurato, tanto che, osservando gli studi che venivano effettuati durante le scorse due decadi, ne risulta che i pazienti affetti da IBD con concomitante colite, non venivano sottoposti a test specifici per tale agente patogeno. [110] Tuttavia, da circa un decennio, il *C. difficile* è stato identificato come un agente che sembra promuovere la riacutizzazione e l'aggravarsi delle IBD.[125]

Dall'analisi di dati ospedalieri, negli Stati Uniti, durante questi ultimi dieci anni i casi di CDAD nei pazienti con CD sono raddoppiati (da 9,5/1000 a 22,3/1000), mentre sono addirittura triplicati in quelli affetti da UC (da 18,4/1000 a 57,6/1000) [126] con un relativo incremento della severità dei sintomi, dei ricoveri (>50%) e degli interventi chirurgici all'intestino, nonostante i soggetti affetti da IBD siano spesso giovani e senza importanti comorbidità. [127]

Risultati concordanti provengono anche dallo studio più vasto effettuato su più di 350000 pazienti con IBD per un periodo di oltre dieci anni dal quale emerge che le coliti causate da *C. difficile* colpiscono il 2,8% dei pazienti con UC rispetto all'1% dei pazienti con CD. [128]

I pazienti con IBD localizzate a livello del colon si mostrano più suscettibili alle infezioni rispetto a quelli che presentavano malattie ileo-colica o al solo intestino tenue, questo perché la mucosa colica, sottoposta per lungo tempo a ripetuti danni causati dai fenomeni infiammatori, è più vulnerabile all'attacco da parte del *C. difficile*. [112] La minor incidenza osservata nei pazienti con CD potrebbe anche essere dovuta al frequente uso di terapie a base di metronidazolo, soprattutto nei soggetti affetti da patologie perianali e in quelli che hanno subito interventi chirurgici, che potrebbero prevenire eventuali infezioni. [129]

L'infezione da *C. difficile* può presentarsi in qualsiasi momento del decorso della malattia infiammatoria cronica dell'intestino. Alcuni studi hanno dimostrato che solo nel 10% dei casi tale infezione viene riscontrata al momento della diagnosi dell'IBD, [130] mentre la maggioranza delle CDAD si sviluppa in pazienti in fase di remissione, sottoposti a trattamento con analoghi purinici da soli o in combinazione con Infliximab.

Nel trattamento della CDAD in pazienti con IBD è ancora aperto il dibattito su quale sia la migliore terapia tra antibiotici in monoterapia e antibiotici in associazione con immunomodulatori. [131]

2.5.1 Correlazioni tra terapia farmacologica e CDAD nei pazienti con IBD

Nei pazienti affetti da IBD recentemente si è abbandonata l'idea che l'uso di antibiotici sia necessario all'insorgenza delle CDAD [130] poiché molti studi hanno dimostrato che la

maggioranza dei pazienti colpiti non aveva assunto antibiotici nei 60-90 giorni precedenti alla comparsa dei sintomi.

Va però ricordato che nei pazienti affetti da IBD viene notoriamente evidenziata una flora intestinale alterata, [132] la quale può favorire la colonizzazione ad opera del *C. difficile*, indipendentemente dall'utilizzo di antibiotici. La perdita della capacità di metabolizzare i sali biliari primari da parte della microflora colica implica una più agevole proliferazione di eventuali patogeni. [133] Per quanto riguarda le altre categorie di farmaci impiegati nel trattamento delle IBD le correlazioni con le CDAD si dimostrano più o meno consistenti. I fluorochinoloni sono comunemente usati in pazienti affetti da CD localizzato al colon e nel caso di fistole perianali [134] ed un uso non oculato di questo antibiotico probabilmente può promuovere l'insorgenza del nuovo ceppo ipervirulento NAP1/027 resistente proprio ai fluorochinoloni.

In passato l'uso degli amino salicilati è stato collegato all'insorgenza di infezioni da *C. difficile* anche se recentemente non è stata dimostrata nessuna relazione tra questa terapia l'infezione da *C. difficile* o da qualsiasi altro batterio opportunistico ed è stato evidenziato in recenti studi che una terapia a base di amminosalicilati non promuove l'insorgenza di nessun tipo di ceppo ipervirulento. [135]

In merito ai corticosteroidi ci sono pareri discordanti: alcuni studi non dimostrano nessuna correlazione [136], altri invece evidenziano un forte legame, con un rischio di contrarre la CDI tre volte maggiore rispetto ai pazienti trattati con altre categorie di farmaci come Metotressato, Azatioprina e Mercaptopurina. [135]

L'uso di immunosoppressori e farmaci biologici sembra apparire ininfluenza [136] e comunque i dati in merito sono ancora insufficienti per una valutazione adeguata.

Opinioni contrastanti riguardano anche il ruolo degli inibitori della pompa protonica nell'aumentare il rischio di CDAD, il quale sembra inoltre collegato solo ai casi di recidive e non al primo fenomeno. [25]

Anche un periodo di ricovero in ospedale durante i tre mesi precedenti l'infezione sembra poter influire negativamente, con il verificarsi di CDAD più severe, che richiedono l'uso di due diversi tipi di antibiotici. [131]

Infine anche la colectomia si è dimostrata un fattore di rischio per la CDAD localizzata soprattutto all'intestino tenue. [137]

3.SCOPO

Lo studio si articola in una fase trasversale ed in una prospettica.

La prima ha come obiettivo descrivere la relazione tra CDI e IBD, individuando tra le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti con IBD eventuali fattori di rischio per la CDI, descrivendo la frequenza dell'infezione in questi soggetti (sia attivi che in remissione) rispetto a controlli sani e controlli malati ricoverati nella medesima unità di degenza e alcune caratteristiche dei ceppi isolati: tossinotipo, farmaco resistenza, adesività e presenza o meno del gene tcdC

La seconda ha come obiettivo confrontare il decorso della malattia infiammatoria nei pazienti con CDI e senza CDI.

4. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

4.1 Selezione dei pazienti e raccolta dei campioni

Per questo studio sono stati raccolti e processati campioni di feci provenienti da quattro diverse tipologie d'individui:

1. Pazienti ricoverati presso l'unità operativa complessa gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali.
2. Pazienti ambulatoriali in follow-up presso l'unità operativa semplice "ambulatorio malattie infiammatorie croniche intestinali" dell'Azienda Ospedaliera di Padova affetti da IBD in fase di remissione, reclutati in occasione dei normali controlli, o in fase di attività lieve-moderata, reclutati in occasione della visita ambulatoriale urgente o inviati dal dipartimento di emergenza e accettazione.
3. Pazienti ricoverati presso l'unità operativa complessa gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova non affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali, con terapia pregressa o concomitante e sintomatologia ascrivibili a CDAD.
4. Soggetti sani non ospedalizzati e non impiegati presso ospedali, volontari, utilizzati come gruppo di controllo.

L'attività di malattia è stata misurata per mezzo di indici validati e standardizzati: per la UC è stato utilizzato il Modified Truelove & Witts Severity Index che valuta il numero di scariche liquide o soffici in 24 ore, gli episodi di interruzione del sonno, la presenza di sangue nelle feci negli ultimi tre giorni, gli episodi di incontinenza fecale, il dolore addominale, il benessere generale, l'uso di antidiarroeici e l'obiettività addominale, mentre per la malattia di Crohn è stato scelto l'Harvey Bradshaw Index, che considera lo stato generale di salute, il numero di scariche liquide al giorno, il dolore addominale, le complicazioni extraintestinali e la presenza di masse addominali.

Nel caso dei pazienti ospedalizzati, inclusi quelli affetti da IBD in fase di attività severa, i campioni di feci sono stati raccolti direttamente presso il servizio diagnostico di Microbiologia e Virologia del medesimo ospedale al quale è inviato di routine un campione fecale per la ricerca di patogeni entro le prime 48 ore dal ricovero mentre i dosaggi di PCR, VES e lattoferrina fecale sono eseguiti di routine entro 24 ore dal ricovero. Dai campioni appena raccolti è stata prelevata una parte utilizzata per le indagini e la parte rimanente conservata a -80°C in locali controllati ed identificata con un codice numerico. I pazienti ambulatoriali sono stati contattati telefonicamente 48 ore prima della visita ed invitati a raccogliere in un contenitore idoneo un campione di feci, conservandolo a 4°C fino al momento della consegna al personale dell'ambulatorio. Durante la visita ambulatoriale

sono stati registrati i valori di PCR, VES e lattoferrina fecale eseguiti di routine per il “follow up” dei pazienti.

Gli individui appartenenti al gruppo di controllo sono stati selezionati coinvolgendo i conoscenti e i familiari del personale dell'unità operativa complessa gastroenterologia. I campioni relativi a questo gruppo sono stati raccolti con le medesime modalità utilizzate nei pazienti ambulatoriali.

Al momento della raccolta a ciascun campione è stato assegnato un codice numerico. Il codice numerico ed i dati demografici sono stati inseriti in un registro elettronico il quale è stato custodito protetto da password nei sistemi informativi dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Per i successivi esperimenti, come per la conservazione del materiale, sono stati utilizzati esclusivamente tali codici.

4.2 Trattamento campioni e colture batteriche

I campioni sono stati trattati seguendo il protocollo di coltura dalle feci per *C. difficile*. [138] La manipolazione dei campioni fecali è avvenuta in cappe biologiche a flusso laminare di classe II. Un campione di feci, pari a circa 40 mg, è stato prelevato dal suo contenitore con un'ansa sterile e posto in una provetta Falcon contenente 1ml di etanolo al 50% per eliminare tutti i batteri in forma non sporigena. Si è posta particolare attenzione nel dissolvere agglomerati di feci in modo da evitare che microbi in stato vegetativo non venissero a contatto con l'etanolo. Il campione è stato posto in vortex per 10 secondi e lasciato riposare per 10 minuti. Successivamente una quantità omogenea di campione pari a 10 µL è stata seminata e dispersa per mezzo di ansa sterile sulla superficie di piastre agar-sangue COL-S (Columbia agar base con 5% di sangue di montone) per la successiva individuazione e conta delle colonie.

Le piastre sono state poste in incubatore (Pbi International Dw Scientific Modular Atmosphere Controlled System) in condizioni di anaerobiosi (H₂ 10%, CO₂ 10%, N₂ 80%), alla temperatura di 37°C, per 48 ore.

4.3 Conta delle colonie

Al termine del periodo di incubazione, le piastre sono state osservate, descrivendo le differenti tipologie di colonie. Dopo aver annotato le caratteristiche fenotipiche, ad ogni tipologia di colonia è stato assegnato un codice identificativo. Queste operazioni sono state svolte all'interno del cono di sterilità della fiamma di un bunsen per evitare la formazione di muffe e contaminazioni esterne. Per ogni piastra, è stato annotato anche il numero di colonie appartenenti a ciascuna tipologia.

Dal punto di vista fenotipico, le colonie di *C. difficile* si presentano più o meno circolari, in rilievo, ruvide, traslucide, con una colorazione più bianca nel centro mentre ai bordi presentano un alone grigio scuro. Anche l'odore che si sprigiona dalle piastre contenenti colonie di *Clostridium difficile* è caratteristico: sgradevole ed intenso.

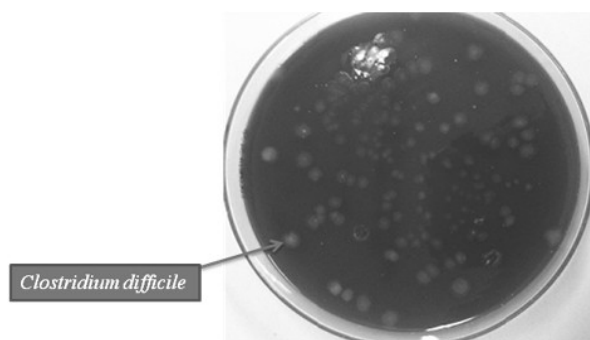


Figura 4: coltura ottenuta su piastra agar sangue Columbia-S con 5% di sangue di montone (COL-S 5% sheep blood). La colonia indicata dalla freccia appartiene al *C. difficile*.

4.4 Lisi ed isolamento dei ceppi

Due colonie per ogni tipologia individuata sono state prelevate con un'ansa sterile ed inoculate in circa 2 ml di terreno BHI in modo da ottenere una coltura liquida pura. Successivamente il tubo cryovial è stato posto in una camera calda a temperatura controllata di 37°C per permettere la crescita dei batteri; dopo aver accertato la crescita (dopo 2-3 giorni) si è prelevato 1ml di coltura che addizionato a 500µl di glicerolo 100% è stato messo in congelatore a -80°C per eventuali studi successivi.

Allo stesso modo due colonie per tipologia sono state prelevate con un puntale sterile e stemperate in provette da 50µl di acqua sterile. Il campione è stato sottoposto a lisi in un termociclatore (Eppendorf® Mastercycler personal) a 95°C per 15 minuti. I lisati così ottenuti, contenenti il materiale genetico dei batteri, sono stati conservati a -80°C ed utilizzati per le analisi successive.

4.5 Polymerase Chain Reaction - PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR), è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della riproduzione cellulare: la

ricostituzione (sintesi) di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica.

Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi (dNTP) che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato. Gli estremi del frammento di DNA da amplificare vengono determinati dal legame di appositi primer, corte sequenze oligonucleotidiche, che permettono l'attacco della Taq polimerasi e la successiva reazione di allungamento dell'oligonucleotide.

La scelta della Taq polimerasi proveniente dal batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*, viene attuata per ovviare al problema dell'inattivazione ad alte temperature cosa che avviene per le DNA polimerasi umane.

Le fasi che compongono una PCR sono:

1. Denaturazione (heat denaturation)
2. Appaiamento (primer annealing)
3. Allungamento (primer extension)

Nella fase di denaturazione la sequenza bersaglio di DNA contenuta nella miscela assieme alla TAQ polimerasi termostabile, i deossinucleotidi trifosfati (dNTP), gli ioni Mg^{+2} e i primer specifici, è scaldata alla temperatura di 94-99° C per denaturare i filamenti stampo e rendere il DNA a singolo filamento. La fase di appaiamento avviene quando il DNA è raffreddato in modo da permettergli il legame con il filamento complementare appropriato. La temperatura da osservare durante questo stadio è orientativamente di 5°C inferiore alla temperatura di fusione (T_m) caratteristica dei primer stessi. La TAQ polimerasi estende ciascun primer da 5' a 3' generando filamenti di nuova sintesi in entrambe le direzioni, che si estendono fino alla fine dei filamenti stampo. Infine la temperatura viene alzata fino a 72 °C al fine di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che, in presenza di Mg^{+2} , agisce allungando il filamento di DNA a partire dai due primer situati sulle due diverse catene complementari. Il risultato sarà la sintesi di due nuove molecole di DNA a doppia elica, copie della regione delimitata dai due primer.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente da 28 a 40 volte. In ciascun ciclo vengono generati sempre più frammenti che contengono soltanto la regione tra i primer amplificati, i quali si accumulano esponenzialmente (figura 5).

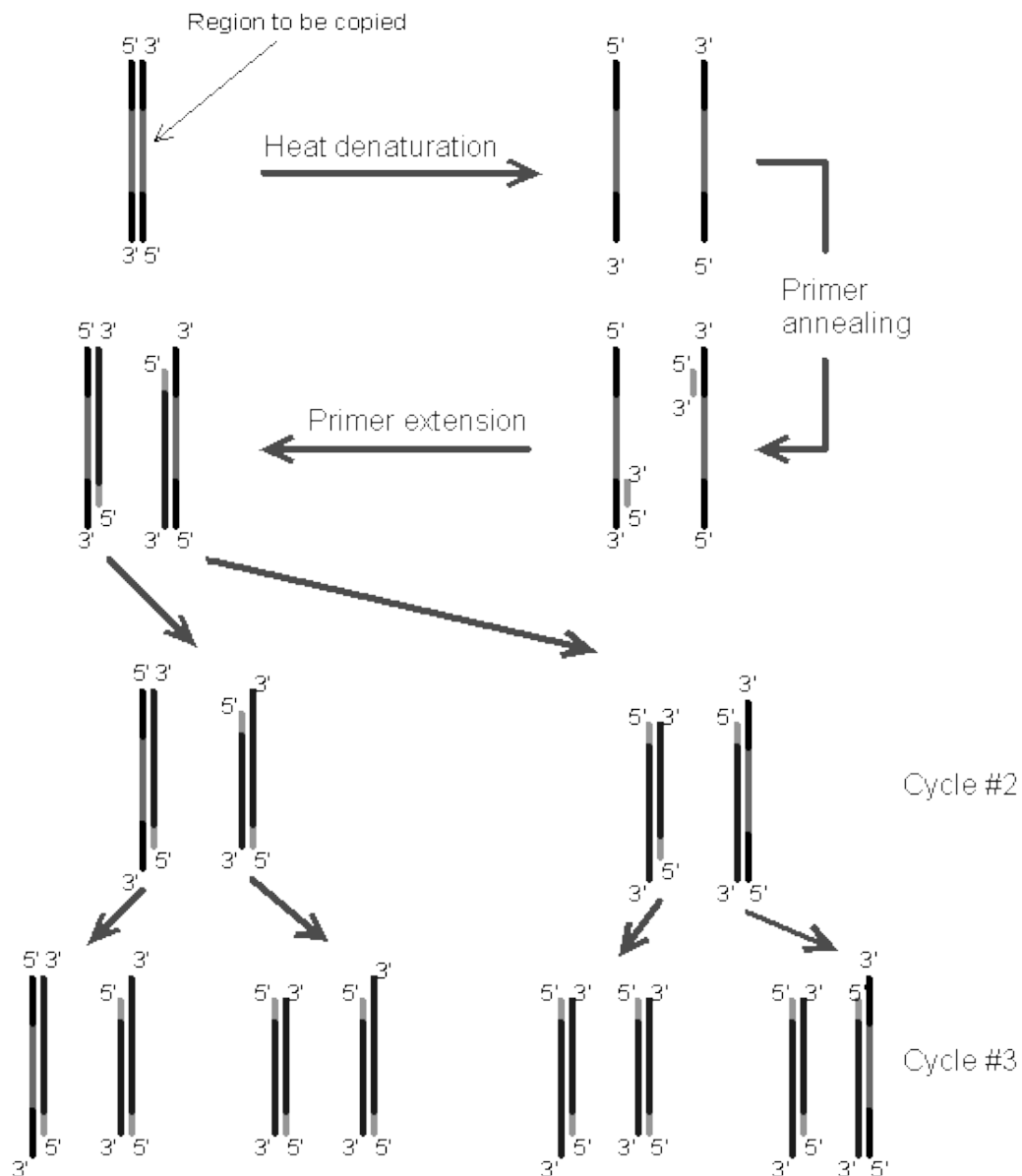


Figura 5: Rappresentazione grafica delle fasi di una reazione a catena della polimerasi.

4.6 PCR per l'amplificazione del gene 16S

Per confermare la presenza di DNA batterico e quindi per evitare la presenza di falsi positivi è stata effettuata per ogni campione una PCR che amplifica il gene del 16S, ovvero una regione all'interno del gene 16S rDNA, lungo 1542 nucleotidi, che codifica per il 16S rRNA, elemento della subunità minore 30S del ribosoma batterico. L' rRNA 16S è la molecola conservata più comunemente usata per studiare la filogenesi dei microrganismi per molteplici motivi: il ribosoma, essendo una struttura altamente complessa e svolgendo un ruolo molto importante ha subito nel

corso evolutivo minime variazioni della sua struttura, per questo anche le minime differenze tra un organismo e l'altro vengono utilizzate per la costruzione di alberi filogenetici.

Un ulteriore vantaggio nell'utilizzo dei ribosomi nella filogenesi consiste nel fatto che tutti gli organismi hanno i ribosomi. Inoltre l'rRNA del ribosoma 16S batterico è altamente conservato alle estremità della sequenza genica per cui esistono dei primers considerati universali per tutte le specie batteriche.

La reazione di PCR sul gene 16S è stata condotta in 50µL di una miscela contenente: Tris-HCl (20 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5 mM) dNTPs (250 µM) (Applied Biosystem), primer senso 355 (0.24 µM), primer antisenso 1492 (0.24 µM) Taq polimerasi (0,625 U) acqua MilliQ e 2 µl di DNA stampo ottenuto dalla lisi batterica. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore (Eppendorf® Mastercycler personal) con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevede 45 secondi a 95°C, 45 secondi a 54°C ed 1 minuto a 72°C.

In tabella 1 sono descritti i primer utilizzati per amplificare un frammento di 1137 pb del gene 16S

Primer senso	T melting (C°)	Length (bases)
5'-CCTACGGGAGGCAGCAG	54	355
Primer antisenso		
5'-GGTTACCTTGTTACGACTT	54	1492

Tabella 1: primer utilizzati per amplificare un frammento di 1137 pb del gene 16S

Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione sono stati prelevati 10 µL, addizionati a 2 µL di buffer di caricamento e frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,2% (p/v) (figura 6).

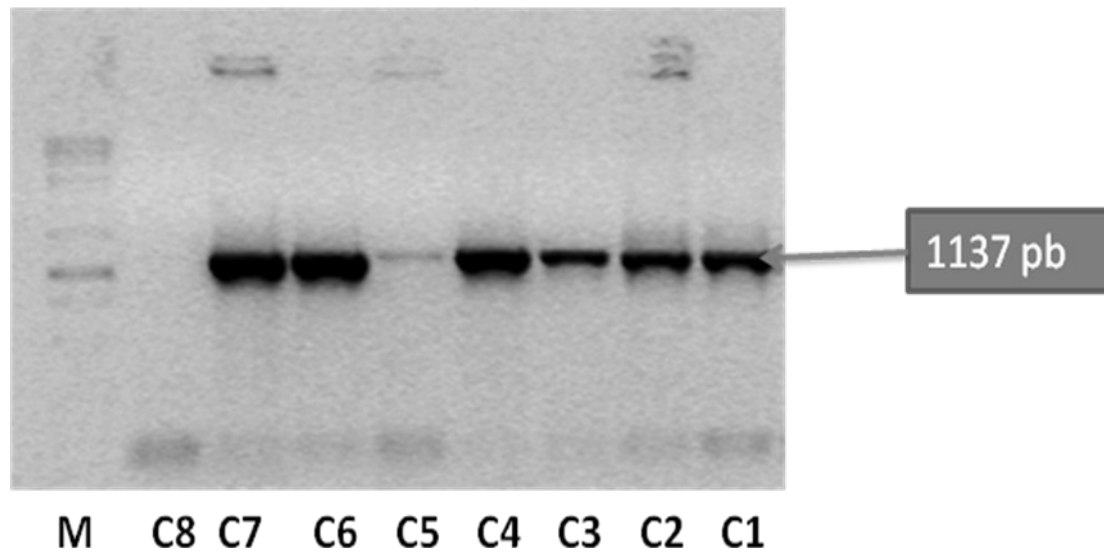


Figura 6: immagine di corsa elettroforetica di campioni sottoposti a PCR per amplificazione del gene 16S. M:marker. C1-C8: campioni in esame

4.7 Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi in gel è il metodo standard utilizzato per analizzare, identificare e purificare frammenti di DNA che differiscono per dimensioni, carica o conformazione.

Il principio su cui si basa l'elettroforesi è che gli acidi nucleici, carichi sempre negativamente per la presenza di gruppi fosfato, sottoposti ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo (rosso). La migrazione avviene su un supporto neutro, costituito da un gel di agarosio, il quale permette di separare le molecole di DNA in base alla loro lunghezza.

Le maglie del reticolo formato dal gel trattengono in modo diverso le varie molecole, quelle più piccole si trasferiscono più velocemente perché riescono ad attraversare agevolmente i pori, al contrario le più grandi a causa del loro maggior ingombro, compiono il tragitto più lentamente.

Variando la concentrazione di agarosio si possono separare frammenti di DNA da 100 a 50000 pb.

La concentrazione di agarosio utilizzata in questo caso è di 1,2% in buffer TBE. Il TBE è una soluzione tamponata che consente al DNA di muoversi uniformemente lungo il gel; è composta da: Tris, che consente il mantenimento di un valore costante di PH della soluzione, Acido Borico, che fornisce l'appropriata forza ionica al tampone ed EDTA, che chela i cationi bivalenti come il magnesio.

Per potere visualizzare il campione di DNA è stato addizionato al gel di agarosio il GelRed, un agente che si intercala tra le basi del DNA e quando è legato al DNA ha uno spettro di eccitazione della fluorescenza con un massimo di 302 nm, in questo modo permette di evidenziare il DNA se sottoposto a raggi UV.

Per ogni campione sono stati prelevati 10 μL di materiale genetico amplificato dalla reazione di PCR cui sono stati aggiunti 2 μL di buffer di caricamento 6X (0.25% peso/volume di blu di bromo fenolo, 30% v/v di glicerolo in acqua). Il buffer è un tampone di caricamento che, contenendo glicerolo, permette la permanenza dei campioni nel pozzetto e contemporaneamente fornisce un marcatore visivo del progredire della corsa elettroforetica.

Insieme ai campioni contenenti il materiale genetico e addizionati del buffer, viene caricato nei pozzetti anche un marker, il quale consiste di una miscela di frammenti di DNA di lunghezza diversa e nota; poiché esiste una relazione di linearità fra il logaritmo delle dimensioni del frammento e la distanza percorsa nel gel, esso permetterà, tramite il confronto, di risalire alla lunghezza del materiale genetico caricato.

Una volta caricati i campioni, la camera di elettforesi viene chiusa da un coperchio collegato a due elettrodi ed avviata (figura 7).

La visualizzazione del gel a migrazione avvenuta avviene mediante transilluminatore a raggi UV. L'immagine viene raccolta con una telecamera collegata ad un computer e grazie ad un opportuno programma (Quantity-one) è quindi possibile analizzare i prodotti della reazione di PCR.

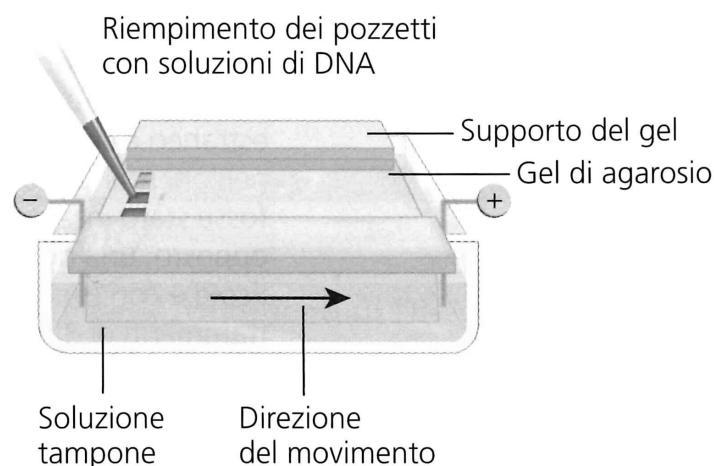


Figura 7: Elettforesi su gel di agarosio

4.8 PCR specie-specifica

Per facilitare l'identificazione del *C. difficile* è stata progettata una PCR specifica allo scopo di amplificare esclusivamente il DNA della specie d'interesse. Gli estremi del frammento da amplificare sono stati scelti in zone della sequenza del 16S dove la corrispondenza fra le specie simili al *C. difficile* era minore, così da assicurare la più alta specificità. La reazione è stata condotta in 20 µL di una miscela costituita da Taq PCR Master Mix (QUIAGEN) 12µL, primer senso e antisenso di ciascuna specie ricercata (0,3 µM), DNA campione (2µL) e acqua (RNase free QUIAGEN) a volume. La PCR è stata eseguita in un termociclatore (Eppendorf® Mastercycler personal) con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 30 secondi a 95°C, 45 secondi a 54°C e 45 secondi a 72°C. Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio. La lunghezza dell'amplicone corrispondente al *C. difficile* è di 274 pb (tabella 2).

Primer senso	T melting (C°)	Length (bases)
5'-TGACATCTCCTTAATGGAGAG	54°C	966
Primer antisenso		
5'-TCCACCTTACGGCTTGGCAA	54°C	1220

Tabella 2: primer utilizzati per amplificare un frammento di 274 pb del gene 16S

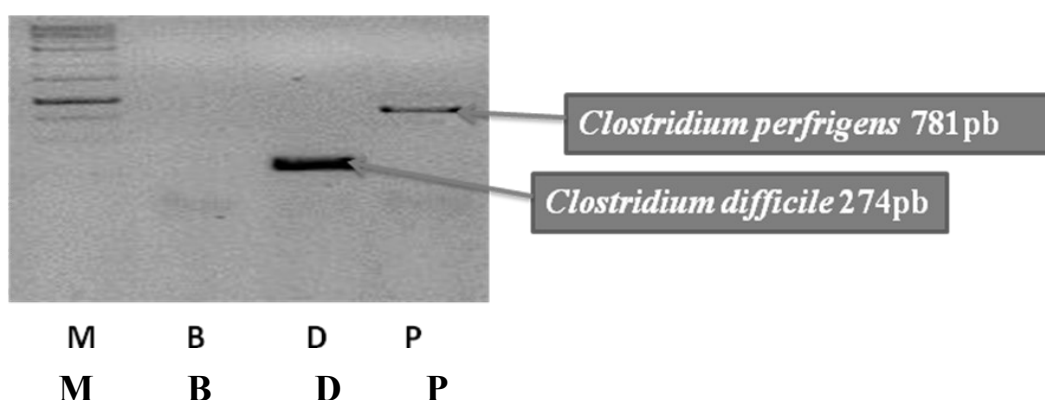


Figura 8: controlli negativo (B), positivo per *C. difficile* (D) e per *C. perfringens* (P) studiati per mezzo di PCR utilizzando primer specifici per *C. difficile* e *C. perfringens*; M:marker.

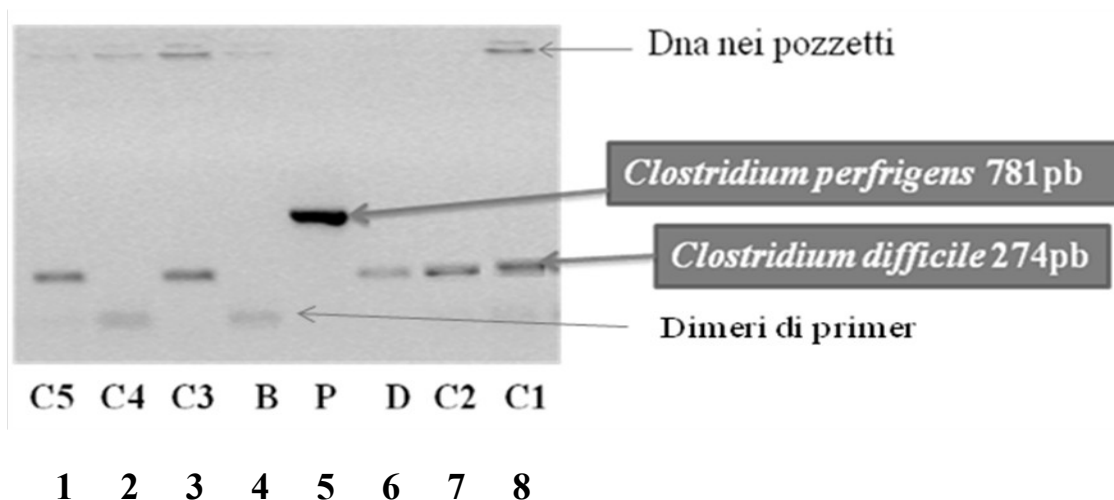


Figura 9: 4: controllo negativo; 5: controllo positivo per *C. perfringens*; 1: controllo positivo per *C. difficile*; 2,3,6,7,8: campioni in esame

4.9 PCR per il tossino-tipo del *C. difficile*

Per verificare la tipologia di tossine prodotte dai ceppi di *C. difficile* isolati dai diversi gruppi di pazienti studiati, è stata allestita una PCR multiplex al fine di amplificare i diversi geni codificanti per le tossine. Con il termine multiplex sono indicate le reazioni di PCR che prevedono l'impiego simultaneo di più coppie di primer specifici e il seguente ottenimento di amplificati di lunghezza diversa, distinguibili mediante semplice elettroforesi. Nel caso del *C. difficile* abbiamo ricercato i geni codificanti per la tossina A, la tossina B e la tossina binaria CDT; nelle tabelle 3, 4 e 5 vengono descritti i primers utilizzati per ricoprire tutti i tipi di variazioni genetiche del *C. difficile* presenti nella GenBank.

Primer senso tcd A	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GCATGATAAGGCAACTTCAGTGTA-3'	54	3345
Primer antisenso tcd A		
5'-AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG-3'	54	3969

Tabella 3: Primer specifici per l'individuazione della tossina A - lunghezza dell'amplicone: 629 pb

Primer senso tcd B	T melting (C°)	Length (bases)
5'-CCAAAGTGGAGTGTTACAAACAGGTG-3'	54	5670
Primer antisenso tcd B 1		
5'-GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA-3' 54	54	6079
Primer antisenso tcd B 2		
5'-GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA-3' 54	54	6079

Tabella 4: Primer specifici per l'individuazione della tossina B - lunghezza dell'amplicone: 410 pb

Primer senso cdt 1	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC-3'	54	739
Primer senso cdt 2	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC-3'	54	739
Primer antisenso cdt	T melting (C°)	Length (bases)
5'-CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA-3'	54	958
Primer senso cdt	T melting (C°)	Length (bases)
5'-TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG-3'	54	617
Primer antisenso cdt	T melting (C°)	Length (bases)
5'-CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG-3'	54	878

Tabella 5: Primer specifici per l'individuazione della tossina binaria - lunghezze degli ampliconi:
221 pb e 262 pb

La reazione è stata condotta in 50µL di miscela costituita da Taq polimerasi (0,4µL), Buffer (5µL), mix di primers composto da: primer tcd A senso (0,75 µM), primer tcdA antisenso (0,75 µM), primer tcdB senso (0,5 µM), primer tcd B antisenso 1 (0,25 µM), primer tcd B antisenso 2 (0,25µM), primer cdtA senso 1 (0,0625 µM), primer cdt A senso 2 (0,0625 µM), primer cdt A

antisenso (0,125 μ M), primer cdt A senso (0,125 μ M), primer cdtA antisenso (0,125 μ M), dNTPs (1,7 μ L) infine DNA campione da amplificare (2 μ L) e acqua (RNase free QUIAGEN) a volume.

La PCR è stata eseguita in un termociclatore (Eppendorf® Mastercycler personal) con 35 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevede 50 secondi a 94°C, 40 secondi a 54°C e 50 secondi a 72°C.

Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,2% (p/v) (Seakem® LE Agarose), addizionato di GelRED (0,5 μ g/mL) e visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV.

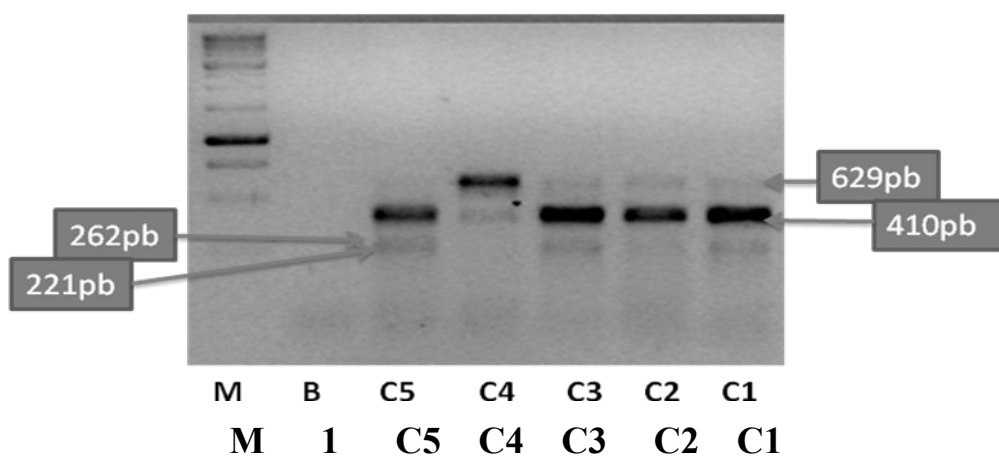


Figura 10: corsa elettroforetica di campioni positivi al *C. difficile* sottoposti a PCR multiplex per la ricerca delle tossine; M: marker; 1: controllo negativo. C1-C5 campioni in esame

4.10 PCR per la ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici

Per verificare la resistenza a determinate famiglie di antibiotici sono state effettuate PCR multiplex al fine di amplificare i geni codificanti per le differenti resistenze con primer specifici.

ERM B: gene responsabile della resistenza ai macrolidi/lincosamidi/streptograminaB (MLSB) viene ricercato mediante l'utilizzo di primer specifici descritti in tabella 6.

Primer senso	T melting (C°)	Length (bases)
5'-TTGGATATTCACCGAACACTAGGG-3'	59	24
Primer antisenso		
5'-ATAGACAATACTTGCTCATAAGTA-3'	59	28

Tabella 6: Primer specifici per l'individuazione di ERM B - lunghezza dell'amplicone:299pb

La reazione è stata condotta in 25µL di miscela costituita da: 1X di buffer PCR, 2,5mM di MgCl₂, 200µM di dNTPs, 0,4 µM di primers, 0,05 U/µL di TAQ polimerasi e 5 µL di DNA stampo ottenuto dalla lisi batterica. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 35 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 30sec a 95°C, 30 sec a 55°C e 45sec a 72°C. Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione sono stati prelevati 10µL, addizionati a 2 µL di buffer di caricamento e frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,2% (p/v).

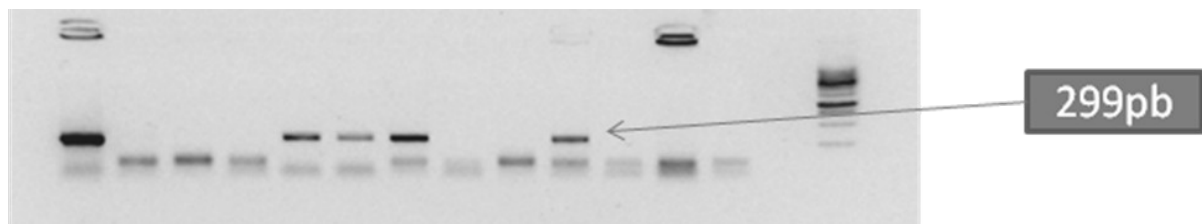


Figura 11: corsa elettroforetica di lisati di *C. difficile* sottoposti a PCR per il gene ErmB.

TET M e TET W: geni responsabili della resistenza alle tetracicline vengono ricercati mediante l'utilizzo di primer specifici descritti in tabella 7.

Primer senso tet M	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GTGGACAAAGGTACAACGAG-3'	55	128
Primer antisenso tet M	T melting (C°)	Length (bases)
5'-CGGTAAAGTTCGTCACACAC-3'	55	277
Primer senso tet W	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GAGAGCCTGGCTATATGCCAGC-3'	64	61
Primer antisenso tet W	T melting (C°)	Length (bases)
5'-GGGCGTATCCACAATGTTAAC-3'	64	228

Tabella 7: primer specifici per l'individuazione di TET M e TET W - lunghezza dell'amplicone: 406pb e 168pb

La reazione è stata condotta in 25µL di miscela costituita da: 1X di buffer PCR, 1,5mM di MgCl₂, 200µM di dNTPs, 0,2 µM di primers, 0,05 U/µL di TAQ polimerasi e 5 µL di DNA stampo ottenuto dalla lisi batterica. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 35 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 30sec a 95°C, 30 sec a 55°C o 60°C e 30sec a 72°C. Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione sono stati prelevati 10µL, addizionati a 2 µL di buffer di caricamento e frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,2% (p/v).

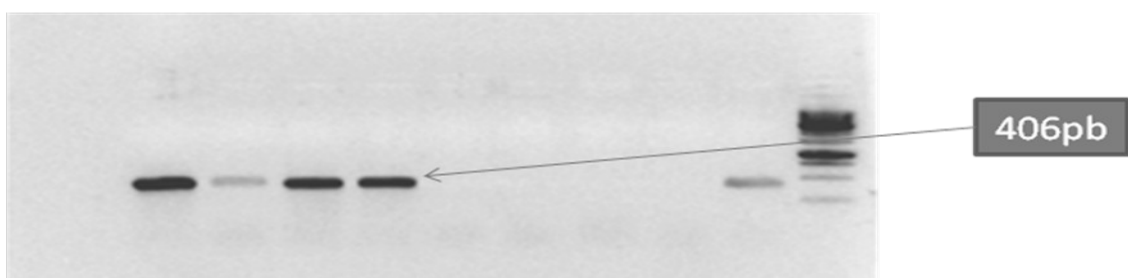


Figura 12: corsa elettroforetica di lisati di *C. difficile* sottoposti a PCR per il gene TetM.

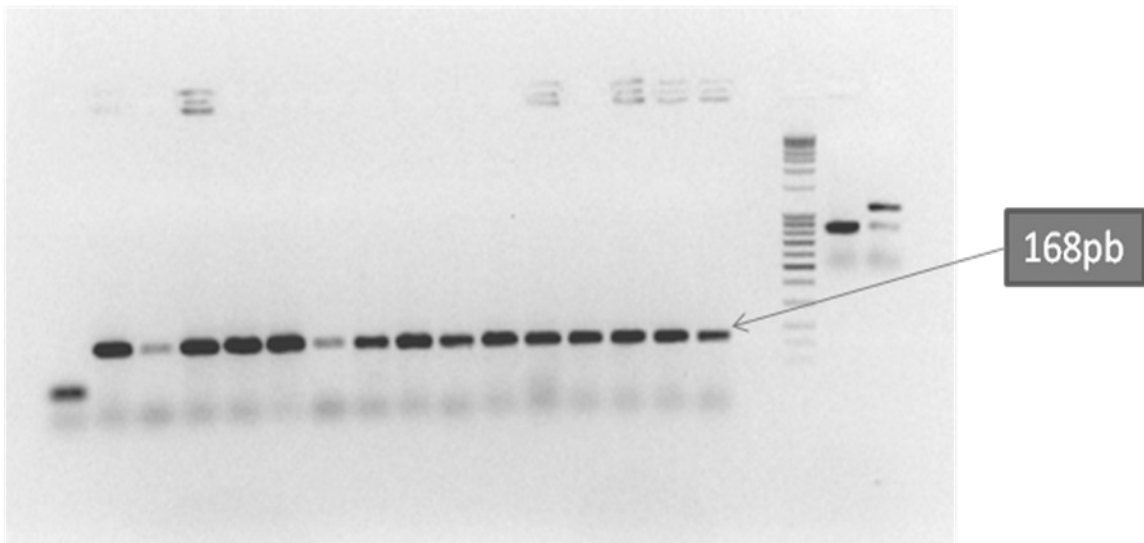


Figura 13: corsa elettroforetica di lisati di *C. difficile* sottoposti a PCR per il gene TetW.

4.11 PCR per l'analisi del gene regolatore tcdC

Il gene regolatore tcdC è responsabile della virulenza del *C. difficile*, è stata evidenziata una correlazione tra la presenza della tossina binaria e la mutazione a questo gene che sembrerebbe aumentarne l'aggressività. In tabella 8 sono descritti i primer utilizzati per l'identificazione del gene.

Primer senso	T melting (C°)	Length (bases)
5'-AAGCTATTGAAGCTGAAAATC-3'	52	284
Primer antisenso		
5'-GCTAATTGGTCATAGTAATACC-3'	52	422

Tabella 8: primer specifici per l'individuazione di tcdC - lunghezza dell'amplicone: 139pb

La reazione è stata condotta in 25µL di miscela costituita da: 1X di buffer PCR, 1,5mM di MgCl₂, 200µM di dNTPs, 0,2µM di primers, 0,05 U/µL di TAQ polimerasi e 5 µL di DNA stampo ottenuto dalla lisi batterica. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 30 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 45sec a 95°C, 1min a 52°C e 1min a 72°C. Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione sono stati prelevati 10µL, addizionati a 2 µL di buffer di caricamento e frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,2% (p/v).

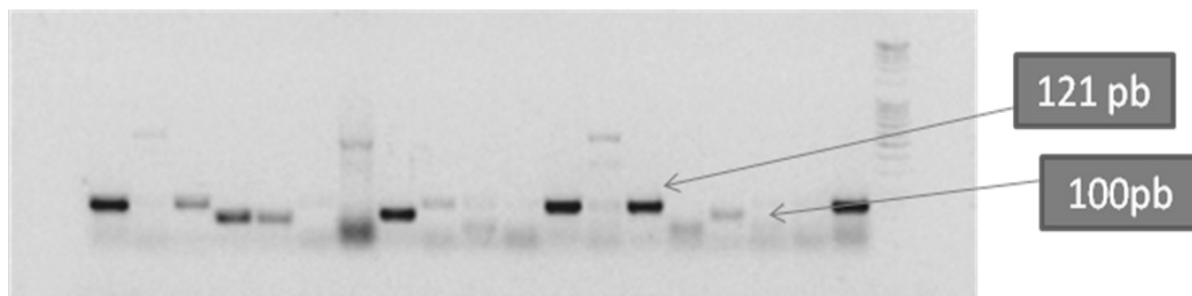


Figura 14: corsa elettroforetica di lisati di *C. difficile* sottoposti a PCR per il gene *tcdC*.

4.12 Antibiogramma

I ceppi di *C. difficile* isolati dai gruppi di pazienti sono stati sottoposti ad antibiogramma con la metodica dell'E-test per quantificare la resistenza del microorganismo a specifici antimicrobici. In particolare abbiamo selezionato il metronidazolo e la ciprofloxacina in quanto generalmente utilizzati nei pazienti con IBD e la vancomicina. Questa tecnica è basata sulla diffusione in agar di sostanze antimicrobiche disidratate poste in striscette di plastica a diverse concentrazioni scalari. Per determinare la sensibilità dei ceppi verso l'antibiotico, deve essere misurato sulla piastra, dopo le 48 ore di incubazione, il diametro di inibizione nel quale il batterio non è cresciuto: tanto minore sarà il diametro, tanto maggiore sarà la resistenza del batterio verso l'antimicrobico.

Per ottenere dati attendibili è stato necessario preparare delle piastre fresche (48 ore d'incubazione) con culture pure dei ceppi da testare. Da tali piastre è stata prelevata un'aliquota di colonie per mezzo di un tampone sterile, ed è stata preparata una sospensione batterica la cui concentrazione è stata determinata con un nefelometro, che è in grado di stabilire la concentrazione microbica di una sospensione in base al grado di torbidità. Questo valore è quantificato da una specifica unità di misura denominata Mac Farland. Per allestire le colture sono state preparate sospensioni microbiche con valore di 1, equivalente a 3×10^6 batteri/ml.

Dopo aver ottenuto una sospensione di torbidità adeguata, questa è stata prelevata, sempre per mezzo di tampone sterile, e distribuita uniformemente su piastre Mueller Hilton, terreno di prima scelta per questa tipologia di antibiogramma sugli anaerobi, (Mueller Hilton Agar 5% sheep blood).

Una volta preparata la piastra sono state prelevate e depositate le strisce delle sostanze antimicrobiche prescelte a gradiente scalare. Le piastre poi sono state poste in incubatore anaerobico ad una temperatura di $35^\circ\text{C} \pm 2$ per 48-72 ore.

Una volta estratte dall'incubatore, le piastre sono state sottoposte ad attenta analisi visiva, per determinare la MIC (concentrazione minima inibente) per ciascun antibiotico. La crescita batterica attorno alle strisce dell'E-test assume una caratteristica forma "a goccia" rovesciata la cui estremità inferiore va ad indicare il valore, espresso in mg/L, che costituisce la minore concentrazione di sostanza antimicrobica in grado di inibire la crescita del batterio. Infine tali valori sono stati confrontati con i range standard che permettono di classificare la resistenza del microorganismo.

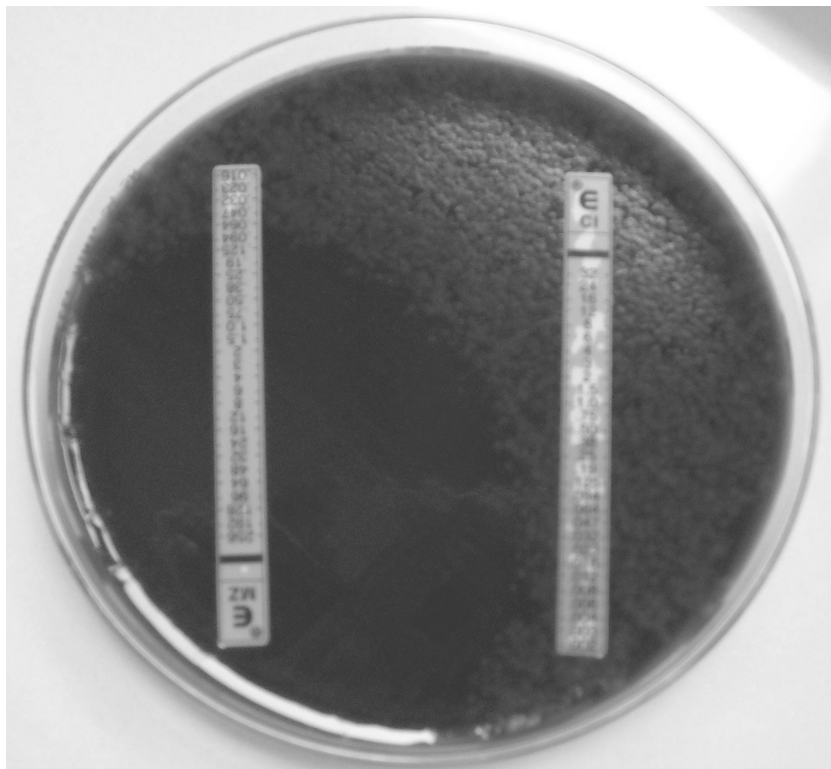


Figura 15: piastra per E-test Mueller Hilton ottenuta dopo 48 ore di incubazione in anaerobiosi dopo applicazione di una striscia con concentrazione scalare di ciprofloxacina e di metronidazolo.

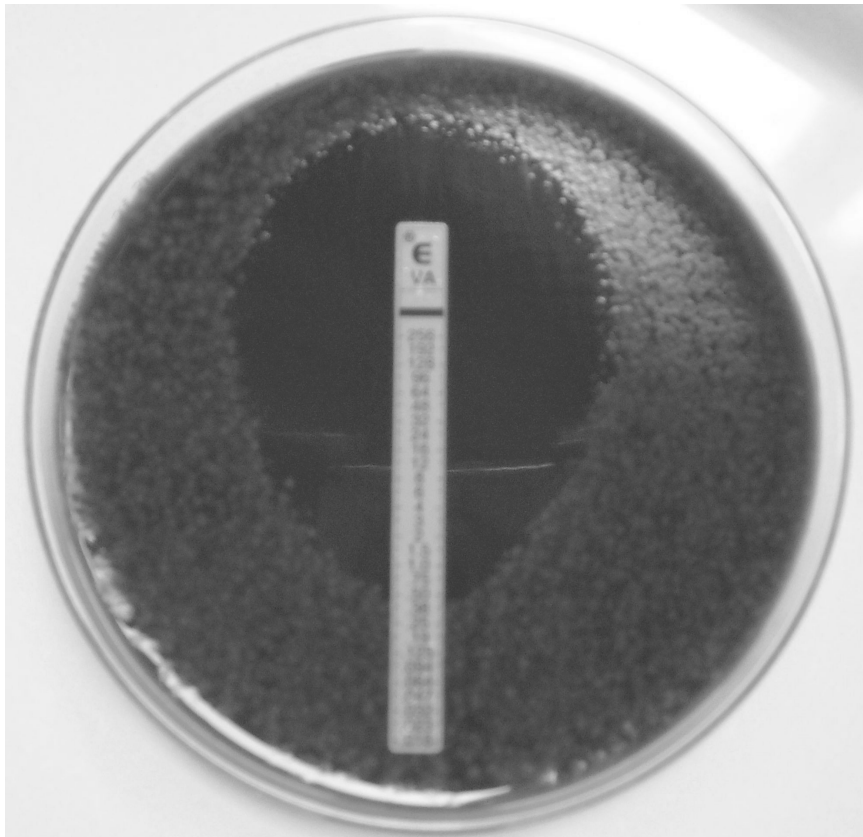


Figura 16: piastra per E-test Mueller Hilton ottenuta dopo 48 ore di incubazione in anaerobiosi dopo applicazione di una striscia con concentrazione scalare di metronidazolo.

4.13 Test di adesione del *C. difficile* a cellule epiteliali intestinali umane

L'obiettivo di questo test è caratterizzare ulteriormente i ceppi isolati di *C. difficile* valutandone la capacità di adesione ad una linea cellulare epiteliale di colon retto (CACO-2) per studiarne la capacità di colonizzazione a livello intestinale.

Le CACO-2 sono state poste in coltura in fiasche da 75 cm² (Cellstar ®) in terreno DMEM addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10% e aminoacidi non essenziali all'1% ed incubate a 37°C, 5% CO₂. Il terreno è stato sostituito ogni tre giorni e quando le cellule hanno raggiunto la confluenza sono state rimosse mediante incubazione con tripsina, raccolte e quindi seminate in piastre da 12 pozzetti ciascuna. Le cellule sono state coltivate per 72 ore sino al raggiungimento della confluenza del monostrato e quindi utilizzate per eseguire i test di adesione.[139]

I ceppi sono stati mantenuti in terreno solido e posti in coltura liquida in terreno BHI (brain heart infusion) 48h prima dell' esecuzione del saggio. La concentrazione microbica è stata determinata

misurando la torbidità della soluzione alla lunghezza d'onda di 600nm per mezzo di uno spettrofotometro (Eppendorf spectrophotometer). Tenendo conto dell'equazione $0,1OD=108$ batteri in 1 ml di terreno (ricavata dalla formula $0,1OD:108=$ valore ottenuto allo spettrofotometro: X) si è ottenuta la quantità in mL necessaria ad ottenere il medesimo numero di batteri in ogni campione. È stato utilizzato il valore 108 in quanto questo è valido per *Escherichia coli*, batterio di dimensioni simili al *C. difficile*.

Tutti i campioni sono stati portati allo stesso volume con PBS sterile (Phosphate Buffer Saline: 3.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl pH 7.4), risospesi in RPMI e aggiunti alle CACO in rapporto 1:20 e lasciati incubare per 90 minuti in ambiente anaerobico a 37°C. Al termine dell'incubazione il monostrato cellulare viene lavato per eliminare i batteri non adesi e le cellule con i batteri adesi vengono staccate dal fondo dei pozzetti con l'ausilio di scraper e addizionati a DMEM; la soluzione viene raccolta in tubi di cui si effettueranno le successive diluizioni con BHI che verranno piastrate su piastre Columbia blood agar.

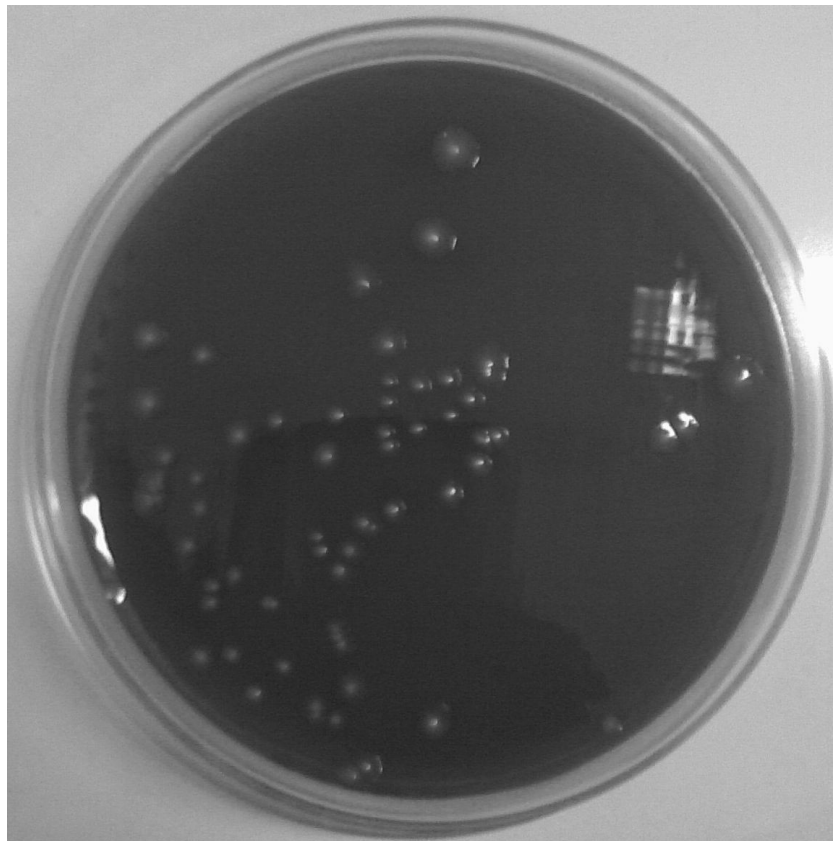


Figura 17: adesione dei ceppi isolati, conta delle colonie adese sulle cellule CACO-2.

L'adesione del C. difficile alle CACO viene successivamente determinata dalle conte sulle piastre e dalle diverse diluizioni.

4.14 Dati clinici

Dati clinici relativi ai soggetti appartenenti ai gruppi 3 e 4 di cui al paragrafo 4.1 (pazienti ricoverati presso l'unità operativa complessa gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova non affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali e soggetti sani) sono stati raccolti unicamente per la verifica dei criteri di inclusione ed esclusione previsti dal protocollo e successivamente distrutti. Sono stati registrati in maniera anonima come precedentemente descritto unicamente i dati relativi ad età e genere del soggetto per il successivo appaiamento ai fini di analisi statistica.

Se eseguito routinariamente, il risultato del test immuno-enzimatico per identificare la presenza delle tossine A e B (E.I.A.) eseguito presso la microbiologia diagnostica è stato registrato.

I seguenti dati sono stati raccolti relativamente ai soggetti appartenenti al gruppo 1 e 2 (pazienti affetti da IBD) al momento della raccolta del campione:

- Uso di antibiotici nei 30 gg precedenti
- Età e genere
- Diagnosi, durata di malattia (dalla data della diagnosi) e pregressi interventi chirurgici
- Attività di malattia, localizzazione ed estensione della malattia e terapia concomitante
- Terapia pregressa
- Ospedalizzazioni ed esami endoscopici del tratto digestivo inferiore nei 6 mesi precedenti

Dalla prima valutazione (e della raccolta del primo campione) i pazienti con IBD sono stati valutati almeno ogni sei mesi o in caso di recidiva o di ricovero ospedaliero per due anni. In questi pazienti, nel corso del follow-up, sono stati raccolti dati relativamente a:

- Attività di malattia, terapia concomitante e pregressa
- Ospedalizzazioni, esami endoscopici, interventi chirurgici

4.15 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando SPSS versione 13.0 (IBM Corporation, New York, USA). Le variabili distribuite normalmente sono state riportate come medie, quelle distribuite non normalmente sono state riportate come mediane e quelle categoriali come frequenze assolute o relative.

Le variabili sono state confrontate tramite l'analisi della varianza (ANOVA) o il Chi-square test o il Fisher's exact test in base alle caratteristiche delle variabili. I rischi sono stati espressi come rapporti dei tassi di incidenza (RR) e riportati con intervalli di confidenza al 95% (IC).

I fattori risultati significativi per la CDI all'analisi bivariata sono stati inseriti in un modello di regressione logistica per identificare i fattori di rischio per la CDI. I risultati del modello sono stati riportati come rischio relativo con intervallo di confidenza al 95%.

Un p value inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo per tutti i confronti.

5. RISULTATI

5.1 Caratteristiche della campione studiato

Nello studio sono stati arruolati:

³⁵/₁₇ 55 soggetti sani

³⁵/₁₇ 18 pazienti non affetti da IBD con CDAD ricoverati presso la medesima unità di degenza dei pazienti con IBD

³⁵/₁₇ 250 pazienti con IBD

- 115 femmine e 135 maschi*
- Età media 44aa*
- Durata di malattia media 110 mesi
- 62 con pregressi interventi chirurgici per IBD*
- 139 in remissione
- 55 in regime di ricovero
- 124 UC (79 pancolica)*
- 126 CD (25 colica, 23 ileale, 74 ileocolica)*
- Terapie:
 - 213 5ASA*
 - 53 anti-TNF*
 - 41 azatioprina*
 - 41 steroidi sistemici*
 - 21 steroidi "topici"*
 - 5 altri farmaci biologici (in sperimentazione)*

I dati identificati da * sono stati confrontati con un database di 2607 pazienti con IBD in follow-up presso l'unità operativa semplice "ambulatorio malattie infiammatorie croniche intestinali" dell'Azienda Ospedaliera di Padova (aggiornato al 8/10/2010 – dati non presentati) non rilevando per alcuna variabile differenze significative tra il campione esaminato e la popolazione di riferimento.

5.2 Analisi fenotipica e conta delle colonie ottenute dalla coltura su piastra

La tabella 9 descrive i risultati relativi all'analisi del fenotipo delle colonie identificate al termine della coltura in anaerobiosi come descritto in 4.2 e 4.3.

	Pazienti IBD ricoverati	Pazienti IBD ambulatoriali	Pazienti non IBD ricoverati	Volontari sani
N° di colonie	30 (0-8500)	145 (0-8000)	164 (0-8000)	468 (5-9302)
N° di tipologia colonie	2 (0-8)	3 (0-9)	2 (0-6)	5 (2-9)

Tabella 9: Numerosità e caratteristiche delle colonie isolate (mediana e intervallo).

5.3 Frequenza di CDI

Nei volontari sani ceppi di *C. difficile* sono stati identificati in 4/55 soggetti (7%), ma nessuno di questi ha dimostrato possibilità di produrre tossine non presentando nel proprio genoma i geni codificanti per le tossine A, B o binaria (0%).

Nei pazienti IBD ricoverati sono stati identificati in 5/55 soggetti (9%) e tutti i ceppi erano tossigenici per almeno una delle tre tossine studiate.

Nei pazienti IBD ambulatoriali 19/195 soggetti erano portatori di ceppi di *C. difficile* (9.7%) di cui 10 non tossigenici e 9 tossigenici (4.6%).

La tabella 10 descrive dettagliatamente i tossinotipi identificati nei diversi gruppi, inclusi i pazienti non IBD ricoverati.

Tossina	Pazienti IBD ambulatoriali	Pazienti IBD ricoverati	Pazienti non-IBD ricoverati
A-B-BIN	33% n=3	0% n=0	39% n=7
A-B	56% n=5	80% n=4	39% n=7
B-BIN	0% n=0	0% n=0	22% n=4
B	11% n=1	0% n=0	0% n=0
A	0% n=0	20% n=1	0% n=0

Tabella 10: Tossinotipi identificati nei gruppi di pazienti.

5.4 Analisi dei fattori di rischio per CDI nei pazienti IBD

Nella tabella 11 sono riassunte le variabili considerate potenziale fattore di rischio per CDI, le relative frequenze nei pazienti positivi e negativi per CDI ed il risultato dell'analisi bivariata. Nessuna fra le variabili considerate viene identificata come fattore di rischio per l'infezione.

Fattore di rischio	CDI + *	CDI - *	P-value**
Ospedalizz. recente	4 vs 10	28 vs 198	0.1857
Endoscopia recente	7 vs 7	66 vs 161	0.1757
Fumo	4 vs 10	40 vs 184	0.5176
Pregresso intervento chirurgico per IBD	3 vs 59	9 vs 163	0.8296
UC vs CD	6 vs 8	117 vs 124	0.8893
IBD colica	9 vs 5	139 vs 102	0.8347
CD colico vs ileale/ileocolico	3 vs 5	22 vs 92	0.4355
Pancolite (UC)	2 vs 4	39 vs 75	0.6911
Attività di malattia vs remissione	5 vs 9	134 vs 100	0.1933
Durata di malattia	107	110	0.898
PPI	3 vs 9	49 vs 176	0.9242
Probiotici	2 vs 12	9 vs 224	0.1786
5-ASA	1 vs 13	33 vs 200	0.7330
Metronidazolo	3 vs 11	20 vs 212	0.2602
Metotressato	0 vs 14	4 vs 229	0.5513
Ciprofloxacina	4 vs 10	24 vs 208	0.0985
Altri antibiotici	1 vs 13	17 vs 215	0.6152
Anti-TNF	3 vs 11	50 vs 183	0.7396
Azatioprina	1 vs 13	40 vs 193	0.5998
Steroidi	4 vs 10	37 vs 196	0.3844
Steroidi topici	3 vs 11	18 vs 215	0.1963

Tabella 11: Analisi dei potenziali fattori di rischio per CDI nei pazienti IBD - *Frequenze e medie -
**Test Chi-quadro o Fisher's exact test o ANOVA

5.5 Sensibilità agli antibiotici

La tabella 12 presenta i dati delle sensibilità agli antibiotici saggiata mediante E-test nei confronti di metronidazolo, vancomicina e ciprofloxacina nei pazienti IBD e non IBD.

Pazienti	metronidazolo	vancomicina	ciprofloxacina
IBD	0.75 mg/l	1.50 mg/L	>32 mg/L
Non IBD	0.39 mg/L	0.23 mg/L	>32 mg/L
ANOVA	p=ns	p<0.001	p=ns

Tabella 12: E-test per la sensibilità agli antibiotici nei pazienti IBD e non IBD

Le figure 18, 19 e 20 presentano invece i risultati relativi alle PCR eseguite per la ricerca dei geni Erm B, Tet W e Tet M nei ceppi isolati da pazienti IBD. I risultati dei medesimi esperimenti eseguiti sui ceppi isolati da pazienti non IBD non si discostano significativamente (dati non presentati).

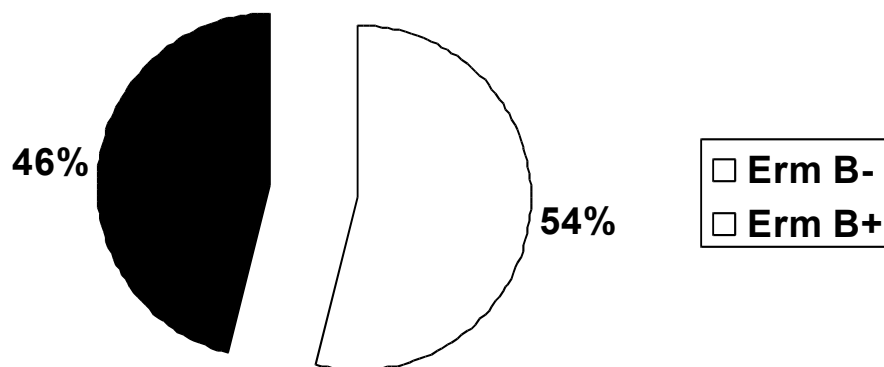


Figura 18 – PCR per il gene Erm B nei ceppi isolati da pazienti IBD.

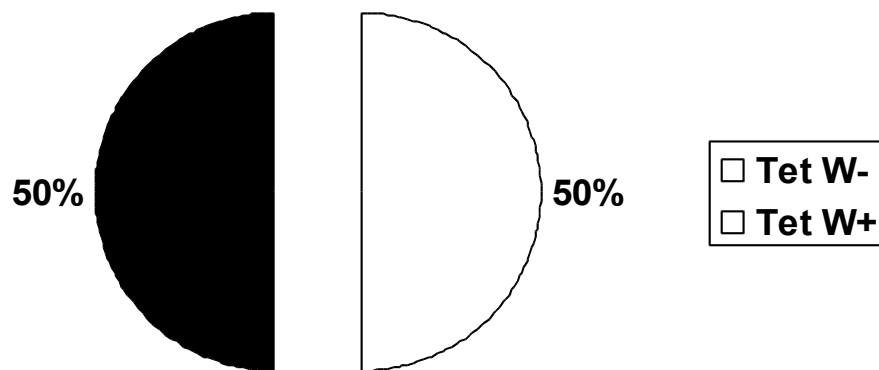


Figura 19 – PCR per il gene Tet W nei ceppi isolati da pazienti IBD.

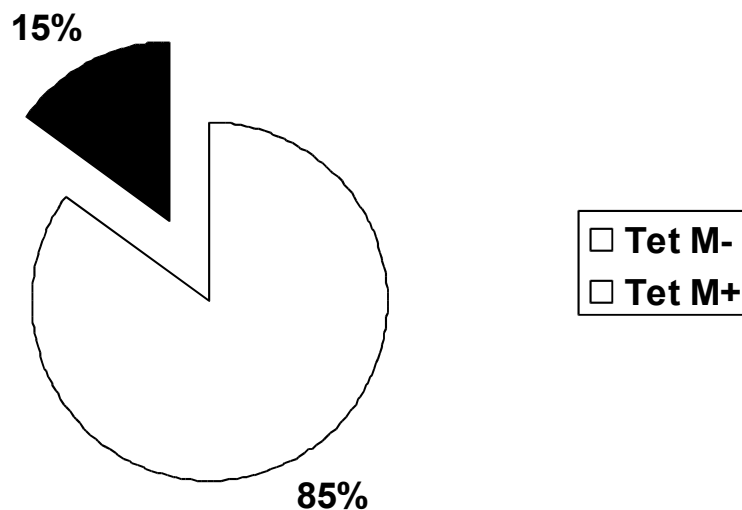


Figura 20 – PCR per il gene Tet M nei ceppi isolati da pazienti IBD.

5.6 Adesione all'epitelio intestinale

I risultati dell'esperimento per misurare l'abilità dei ceppi di *C. difficile* ad aderire ad un modello di epitelio intestinale (CACO-2) non ha evidenziato differenze significative tra quelli isolati da pazienti IBD e non IBD. La sottoanalisi effettuata mettendo a confronto quelli isolati da pazienti IBD in remissione e quelli isolati da pazienti con attività di malattia al momento della raccolta del campione (figura 21) ha invece evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p=0.038$).

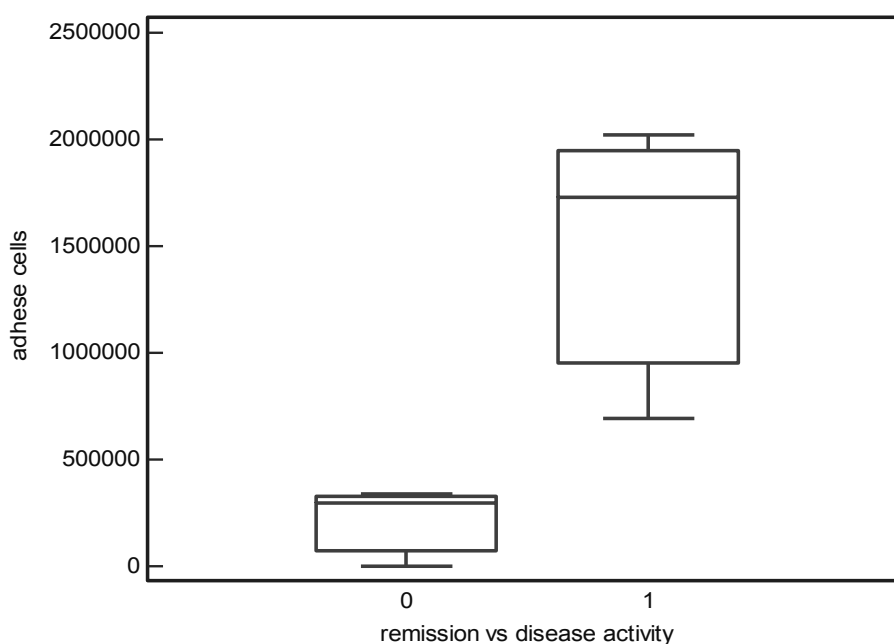


Figura 21 – Confronto tra numero di cellule adese fra ceppi isolati da pazienti IBD in remissione (0) e in attività di malattia (1).

5.7 Presenza del gene Tcd C

La PCR effettuata per la ricerca del gene Tcd C ha dimostrato l'assenza del gene nella larga maggioranza dei campioni esaminati (92%) e la presenza di delezioni parziali nei rimanenti identificando alla corsa elettroforetica segmenti di 100 e 121 bp, senza differenze significative tra pazienti IBD e non IBD o tra pazienti in remissione o attività di malattia.

5.8 Confronto dei risultati dell'esame tramite PCR con quelli della metodica standard (E.I.A.)

I risultati delle analisi effettuate per identificare la CDI tramite PCR sono stati confrontati con i risultati delle analisi eseguite routinariamente nei pazienti, un test immuno-enzimatico per l'identificazione delle tossine A e B.

Dei 65 campioni esaminati, 5 sono risultati positivi alla PCR e solo 1 al test E.I.A. effettuato con metodica standard presso la microbiologia diagnostica.

5.9 Risultati della parte prospettica dello studio

I pazienti affetti da IBD hanno effettuato una rivalutazione clinica ambulatoriale con cadenza almeno semestrale e sono stati valutati in occasione di ogni eventuale ricovero o accesso presso il DEA. Il follow-up medio si è assestato a 57 settimane con un range da 0 a 139. In questo periodo sono state osservate:

- 59 riacutizzazioni cliniche di malattia
- 29 riacutizzazioni di malattia valutate per mezzo dell'endoscopia (anche se in assenza di riacutizzazione clinica)
- 5 interventi chirurgici per resezione intestinale o colectomia
- 101 modifiche del trattamento medico concomitante resesi necessarie per migliorare lo stato clinico del paziente

Nel corso del follow-up non si sono verificate CDI, ne sono state osservate nei pazienti ricoverati al momento dell'arruolamento nello studio o ricoverati nel corso del follow-up.

Ulteriori campioni fecali raccolti dai pazienti risultati positivi all'arruolamento, sono risultati negativi nel corso del follow-up

In merito al tasso di eventi sopra menzionati nei pazienti con CDI e senza CDI i dati sono presentati nelle figure 22, 23 e 24 come rischio relativo rispettivamente per le riacutizzazioni cliniche, le riacutizzazioni endoscopiche e le modifiche del trattamento medico, mentre i dati relativi agli interventi chirurgici non sono stati analizzati a causa della loro ridotta numerosità.

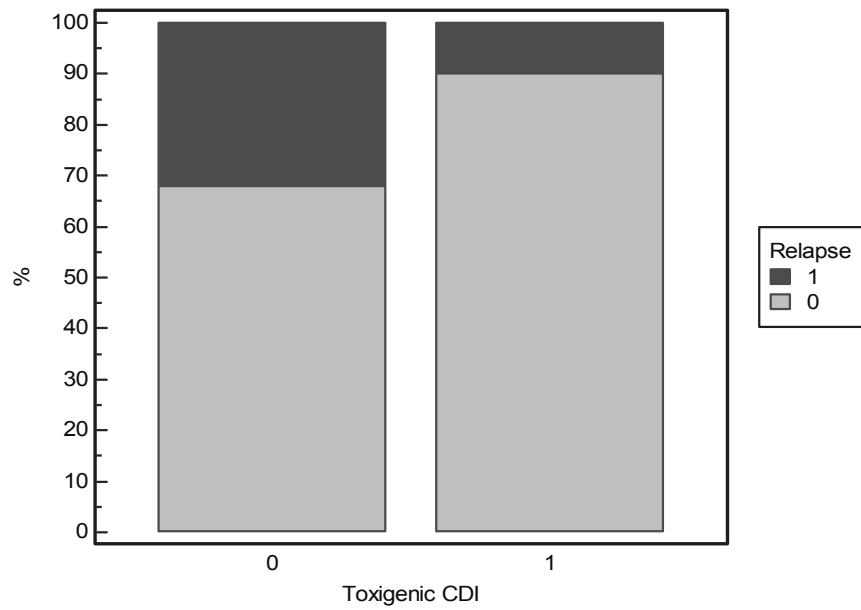


Figura 22: confronto tra i tassi di riacutizzazione clinica nei soggetti con CDI (1) e senza CDI (0) - $p=ns$, Relative risk = 0,7551, 95 % CI = 0,6002 to 0,9499.

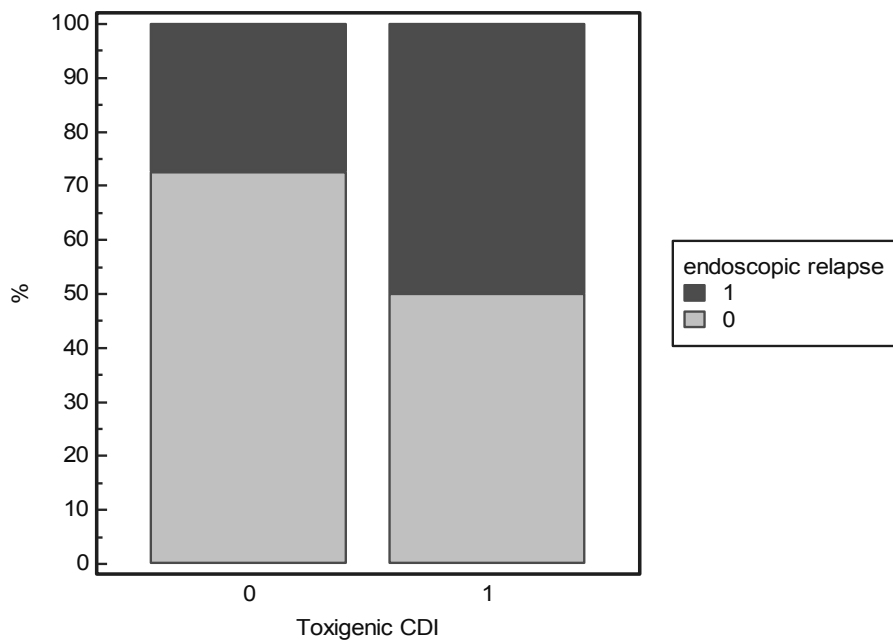


Figura 23: confronto tra i tassi di riacutizzazione endoscopica nei soggetti con CDI (1) e senza CDI (0) - $p=ns$, Relative risk = 0,5474, 95 % CI = 0,2306 to 1,2995.

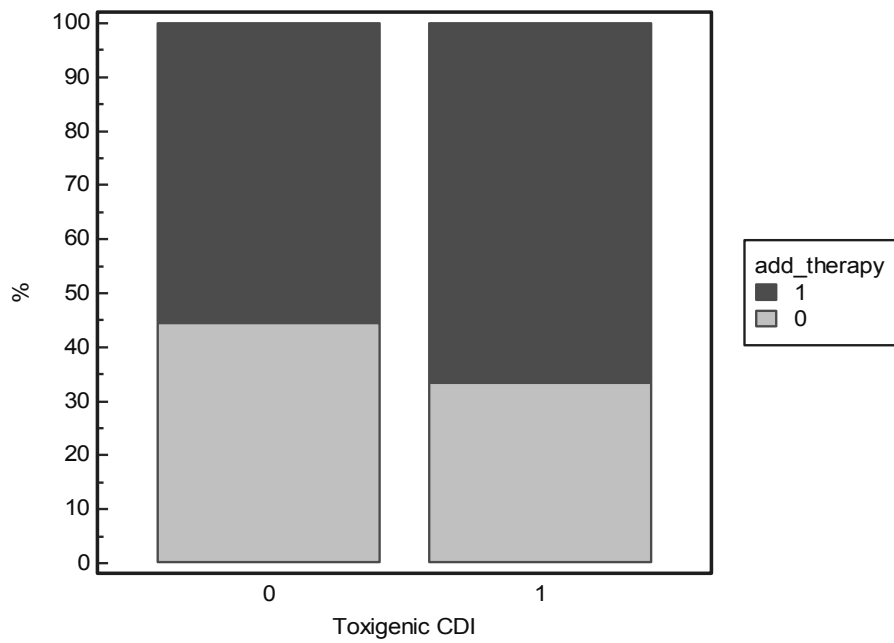


Figura 24: confronto tra i tassi di necessità di modificare il trattamento medico nei soggetti con CDI (1) e senza CDI (0) - p=ns, Relative risk = 0,8333, 95 % CI = 0,5151 to 1,3481.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come già accennato, il *C. difficile* è un batterio che in situazioni di disbiosi può colonizzare il microambiente colico e diventare patogeno mediante la produzione di potenti tossine [5]. Alcuni ceppi esprimono fino a tre diverse tossine, A (enterotossina), B (citotossina) e Binaria responsabili del danno cellulare all'epitelio intestinale (CDAD) [11].

Le IBD, a causa della flogosi cronica che le caratterizzano, causano una disbiosi della flora intestinale e quindi una situazione potenzialmente favorevole alla colonizzazione del *C. difficile* [5]. Recentemente diversi studi hanno evidenziato una frequenza elevata di CDI nei pazienti con IBD, identificando la malattia infiammatoria come fattore di rischio assoluto per la CDI, dato confermato dai risultati di questo studio.

In linea con la ridotta complessità del microbiota nei pazienti con IBD, l'analisi fenotipica delle colonie dei batteri sporigeni ha dimostrato una maggiore varietà di microflora intestinale nei volontari sani rispetto ai pazienti con IBD sia in attività che in fase di remissione - tabella 9 - confermando i dati della letteratura e fornendo una possibile spiegazione alla aumentata predisposizione alla CDI in questa categoria di pazienti.

In merito alla frequenza di CDI, il gruppo associato ad una più elevata frequenza è quello dei pazienti IBD in fase di severa attività di malattia (9%); nei volontari sani non sono stati riscontrati ceppi di *C. difficile* tossigenici; nei pazienti IBD in remissione o in fase di attività di malattia lieve-moderata la CDI è presente (4,6%), seppur in misura minore che nei pazienti ricoverati. Questi dati sono in linea con precedenti studi che riportano una frequenza nella popolazione sana di portatori del *C. difficile* che oscilla tra lo 0 ed il 3% [20] e del 9% nei pazienti con IBD [14]. Rimane comunque aperta la questione relativa all'interpretazione del dato: l'attività di malattia deve può essere identificata come causa o conseguenza dell'aumentata frequenza di CDI?

L'analisi dei tossino tipi dei ceppi isolati in ambiente ospedaliero e in soggetti non ospedalizzati, anche per mezzo del confronto con i ceppi isolati da pazienti ospedalizzati non affetti da IBD, sembra confermare l'ipotesi che nei soggetti con IBD la CDI sia più un fenomeno acquisito in comunità che un'infezione ospedaliera. A suffragio di questa ipotesi deve essere considerato anche il dato che sia un recente ricovero ospedaliero, sia una recente endoscopia del tratto digestivo inferiore, non si sono dimostrati fattori di rischio per la CDI nel campione di pazienti studiato.

L'analisi delle resistenze agli antibiotici, pur confermano i dati della letteratura relativi alla relativamente alta frequenza di ceppi dotati di geni responsabili della insensibilità a tetraciline,

macrolidi, lincosamidi, streptograminaB, conforta i clinici nel rilevare che la sensibilità a metronidazolo e vancomicina appare conservata, pur rilevando una differenza statisticamente significativa tra ceppi isolati da pazienti IBD e non IBD in merito alla MIC di quest'ultimo antibiotico.

Un altro dato da sottolineare, soprattutto per orientare correttamente l'assistenza dei pazienti con IBD, è la completa resistenza alla ciprofloxacina, a differenza di quanto riportato in letteratura, di tutti i ceppi esaminati. Questa è largamente usata come ionoterapia o in associazione al metronidazolo nel trattamento delle IBD e articolare attenzione dovrebbe essere usata nel suo utilizzo in monoterapia nel trattamento delle infezioni di questi soggetti per il potenziale rischio di selezionare positivamente ceppi di C difficile tossigenici, frequenti nel microbioma dei soggetti con IBD.

Il confronto tra la metodica standard e la metodica diagnostica utilizzata in questo studio, ha inoltre evidenziato il limite di un singolo test (E.I.A.) nella corretta diagnosi della CDI. Per il potenziale impatto negativo che una diagnosi falsamente negativa per CDI comporterebbe nella gestione clinica di un paziente IBD, dovrebbe essere presa in considerazione la possibilità di utilizzare algoritmi diagnostici o test di laboratorio diversi per questa tipologia di pazienti.

Dai risultati dello studio emergono anche dati dissonanti rispetto a quanto ad oggi riportato dalla letteratura, tenendo comunque conto del fatto che molti studi pubblicati sono di natura retrospettiva o si limitano a considerare pazienti IBD ospedalizzati: uno di questi è che il rischio per un paziente IBD di contrarre una CDI è simile nella UC e nella CD, contrariamente ad una maggiore frequenza nella UC precedentemente rilevata.

In questo studio, finalizzato a verificare questo dato utilizzando la metodica più sensibile e specifica per l'individuazione di questo patogeno in campioni fecali, la coltura su piastra [28], si è cercato di studiare se nella popolazione di pazienti IBD fosse possibile identificare fattori di rischio specifici per la CDI, esplorando non solo le variabili fino ad ora identificate o sospettate (antibiotici e inibitori di pompa protonica), ma anche i trattamenti medici più recentemente introdotti (anti-TNF). I risultati dello studio non hanno permesso di identificarne alcuno, riportando l'importante informazione per i clinici che la pregressa diagnosi di IBD è di per se un fattore di rischio per la CDI, anche nei casi in cui la malattia non coinvolga il colon. La CDI deve quindi sempre essere sospettata in casi di sintomatologia compatibile e correttamente esclusa prima di iniziare una terapia finalizzata al controllo dei sintomi della IBD. Sia gli inibitori di pompa protonica, che i farmaci immunosoppressori (inclusi gli steroidi sistemici ad alto dosaggio e i farmaci anti-TNF) non aumentano il rischio di CDI in questa tipologia di pazienti.

Il trattamento antibiotico finalizzato ad eradicare il *C. difficile* in quei soggetti che dimostrassero una positività per l'infezione, ma asintomatici, non è invece consigliato: lo studio ha dimostrato che il tasso di eventi clinicamente importanti come la riacutizzazione di malattia (endoscopica o clinica) o la necessità di incrementare la terapia medica nel corso del tempo, non sono significativamente diversi tra i pazienti con CDI o senza CDI, anzi ha rilevato un potenziale effetto benefico nel ridurre la frequenza di riacutizzazioni cliniche nei pazienti che albergavano il *C. difficile*. Questo dato in particolare ha sorpreso i ricercatori e meriterebbe in futuro un approfondimento mirato nell'ipotesi che la CDI possa innescare processi immunitari innati o acquisiti con la potenzialità di interferire con quelli messi in atto dalla IBD, producendo un complessivo effetto benefico sul decorso della malattia infiammatoria.

Nel corso dello studio è stato possibile rivalutare a distanza di oltre un anno pazienti che avevano già eseguito la ricerca del *C. difficile* nel medesimo protocollo di ricerca rilevando un dato interessante: la scomparsa del *C. difficile* dalle feci di tutti i pazienti risultati in precedenza positivi. Questo conferma l'ipotesi che la colonizzazione di questi pazienti avvenga prevalentemente a livello della comunità e che questa sia un evento transitorio. Nonostante la flora microbica [97] ed i meccanismi di difesa mucosali [96] siano alterati nei pazienti con IBD questo non sembra quindi determinare una persistenza del *C. difficile* che li esporrebbe ad un decorso della malattia.

Dai risultati del saggio di adesione emerge una potenziale correlazione tra la capacità adesiva dei ceppi e l'attività di malattia suffragando l'ipotesi che per poter esplicare la loro azione nociva i batteri devono poter rimanere a stretto contatto con la mucosa. Tra i ceppi esaminati, quello maggiore capacità di adesione era portatore della tossina binaria che in diversi studi è stata identificata come responsabile della formazione di protuberanze causate dalla ADP-ribosilazione dell'actina che potrebbe essere responsabile della maggiore adesione epiteliale.[140]

Non è risultata, invece, alcuna correlazione, tra l'infezione da CDI e l'utilizzo di probiotici, [72]. Dato questo che sembra confermare l'inefficacia di queste supplementazioni dietetiche nella prevenzione delle infezioni da *C. difficile*.

Infine, non è stato rilevato un aumentato rischio di infezione nei soggetti sottoposti a terapia con farmaci biologici [120] che potenzialmente potrebbero causare una riduzione delle difese immunitarie locali e sistemiche favorendo la colonizzazione da parte del *C. difficile* [135].

In conclusione, i pazienti con IBD sembrano presentare una maggiore frequenza di colonizzazione da parte del *C. difficile* anche se questa non correla con il grado di attività della malattia e comunque appare transitoria e non modifica negativamente il decorso della malattia infiammatoria. L'elevata frequenza di antibiotico resistenze nei ceppi di *C. difficile* isolati da pazienti IBD deve

indurre ad un utilizzo oculato di antibiotici a largo spettro in questi pazienti considerata l'elevata frequenza di colonizzazione rispetto alla popolazione generale.

7. RINGRAZIAMENTI

Ignazio Castagliuolo ha collaborato alla stesura del progetto ed ha supervisionato la ricerca

Alessia Rosaria Grillo ha supervisionato ed eseguito parte delle analisi di laboratorio

Roberta Caccaro ha collaborato al reclutamento dei soggetti

Renata D'Incà ha collaborato al reclutamento dei soggetti

Roberta Raimondi ha eseguito parte delle analisi di laboratorio

Giulia Schirato ha eseguito parte delle analisi di laboratorio

Marco Scarpa ha eseguito e supervisionato parte dell'analisi dei dati

A.M.I.C.I. onlus ha finanziato parte del progetto per mezzo di una borsa di studio biennale

8. ABBREVIAZIONI

ADP Adenosine DiPhosphate (adenosina difosfato)

AIFA Agenzia Italiana sul Farmaco

ASCA Anticorpi Anti-Saccaromices Cerevisiae

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CARD 15 Caspase Recruitment Domain 15

CD4+ Cluster of Differentiation 4

CDAD Clostridium difficile Associated Disease

CDT Clostridium Difficile Transferase

CFU Unità Formanti Colonie

CT scan Computed Tomography scan

DNA Acido Desossiribo Nucleico

dNTPs DesossiNucleotidiTrifosfati

e.v. endovena

ECDC European Centre for Disease prevention and Control

ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EIA Enzyme Immunoassay

EMA European Medicine Evaluation Agency

E-test test Epsilometrico

FDA Food & Drug Administration

GALT Gut Associated Lymphoid Tissue

GTP Glucose TriPhosphate (glucosio trifosfsto)

HIV Human Immunodeficiency Virus

HT29 Human colon adenocarcinoma grade II

IBD Inflammatory Bowel Disease (malattie infiammatorie croniche dell'intestino)

IC50 Concentrazione Inibente 50

ICAM IntraCellular Adesion molecole (molecole intracellulari di adesione)

Ig ImmunoGlobuline

IL InterLeuchine

INF- γ interferon γ

kb kilo base

kDa kiloDalton

MAP Mycobacterium paratuberculosis

MC Morbo di Crohn

MIC Concentrazioni Minima Inibente

mRNA Acido Ribonucleico messaggero

MTWSI Modified Truelove & Witts Severity Index

NAP1/027 North American Pulsed-field type 1, pcr ribotype 027

NCD NosoComial Diarrhoea

NF- κ B Nuclear Factor- κ B

NOD2 Nuclear binding Oligomerization Domain containing 2

Nt nucleotidi

p/v peso su volume

PaLoc Pathogenicity Locus

PAMPs Pathogen-Associated Molecular Patterns

p-ANCA Anticorpi Citoplasmatici AntiNeutrofil perinucleari atipici

pb paia di basi

PCR Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)

PCR Protein C Reactive (proteina C reattiva)

PMC Colite PseudoMembranosa

PRRs Pattern Reconition Receptors

RCU Rettocolite Ulcerosa

rDNA DNA ribosomiale

rRNA Acido Ribonucleico ribosomiale

TBE Tris-Borate-EDTA

TGF- β Transforming Growth Factor β

Th T helper

TLRs Toll Like Receptor (recettori Toll like)

Tm Temperatura di melting

TNF Tumor Necrosis Factor

Tox tossina

UE Unione Europea

UV UltraVioletti

v/v volume su volume

VES Velocità di Eritro-Sedimentazione

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a newpathogenic anerobe: *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child*.1935;48:390–402.
- 2 Bartlett JG, et al. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis*. 1977;136:701–705.
- 3 Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978;1:1063-6.
- 4 Mc Farland L., Mulligan et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Eng J MED* 1989, 320:204-10
- 5 Sinh P, Barrett TA, Yun L. *Clostridium difficile* Infection and Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:136064.
- 6 Bartlett JG. Narrative Review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.
- 7 Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, Unites States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (6):929-931.
- 8 Redelings MD et al. *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999 2004. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (9):1417-1419.
- 9 Loo VG et al. Predominal clonal multi-istitutional outbreak of *clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality.*N Eng J Med* 2005; 353:2442-2449.
- 10 McGowan AP et al. Thirty-day mortality of *Clostridium difficile* infection in a UK National Health Service Foundation Trust between 2002 and 2008 *J Hosp Infect*. 2011 Jan;77(1):11-5.
- 11 Rupnik M. *Clostridium difficile* toxinotypes. University of Ljubljana, Ljubljana, 2006
- 12 McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW. Zheng L. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clin Infects Dis* 2005;40:265-272.
- 13 McDonald LC et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2005;353:2433–2441.
- 14 Kuijper EJ et al. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 6):2-18.

- 15 Goorhuis A et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1162-1170.
- 16 Kelly CP and Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. *Annu. Rev. Med.* 49 (1998), pp. 375–390.
- 17 Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder R et al. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 148 (1983), pp. 93–100.
- 18 Samore MH et al. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin. Infect. Dis.* 18 (1994), pp. 181–187.
- 19 Warny M, Vaerman JP, Avesani V and Delmée M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect. Immun.* 62 (1994), pp. 384–389.
- 20 Simor AE, Bradley SF, Strausbaugh LJ, Crossley K, Nicolle LE. *Clostridium difficile* in long-term-care facilities for elderly. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:696-703.
- 21 Department of Health and Health Protection Agency, January 2009. *Clostridium difficile* infection: how to deal with the problem, December 2008
- 22 Thomas C et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: epidemiological data from western Australia associated with a modified antibiotic policy. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1457-1462.
- 23 Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 1998;40:1-5.
- 24 Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from established pathogen. *Cleve Clin J Med* 2006;73:187-97.
- 25 Dial S, Delaney J, Barkun A, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *clostridium difficile* associated disease. *Jama* 2005;294 (23): 2989–95.
- 26 King RN and Lager SL. Incidence of *Clostridium difficile* infections in patients receiving antimicrobial and acid-suppression therapy. *Pharmacotherapy* 2011; 31(7): 642-648.
- 27 Bartlett JG. Clinical practice: antibiotic-associated diarrhea. *N Eng J Med* 2002;346:334-9
- 28 Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:411-6.
- 29 Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, Borek AP. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including test for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2006;44:1145-9

- 30 Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. Clostridium difficile-associated diarrhea: a review. Arch Intern Med. 2001;161:525–533.
- 31 Petersen LR, Manson RU, Paule SM et al. Detection of toxigenic Clostridium difficile in stool samples by real-time chain reaction for the diagnosis of C.dif associated diarrhea. Clin Infect Dis 2007;45:1152-1160
- 32 Carroll KC. Tests for the diagnosis of Clostridium difficile infection: the next generation. Anaerobe 2011; 1-5
- 33 Calabi E, Calabi F, Phillips AD and Fairweather NF. Binding of Clostridium difficile surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect. Immun. 70 (2002), pp. 5770–5778.
- 34 Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Bourau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of clostridium difficile in adherence and gut colonization. Infect Immun 2001;69:7937-7940
- 35 Poilane I, Karjalainen T, Barc MC, Bourlioux P, Collignon A. Protease activity of clostridium difficile strains. Can J Microbiol 1998;44:157-61
- 36 Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Transcription analysis of the genes tcdA-E of pathogenicity locus of Clostridium difficile. Eur. J. Biochem(1997) 244:735-742
- 37 Rupnik M, Avesani V, Janc M, Delmè M.A. Novel toxinotyping scheme correlation of toxinotypes with serogroups of Clostridium difficile isolates. (1998) J.Clin.Microbiol. 36:2240-2247
- 38 Pothoulakis C, Castagliuolo I, LaMont JT. Nerves and intestinal mast cells modulate response to enterotoxins. (1988)New Physiol.Sci.13:58-63
- 39 Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009 Jul;7(7):526-36
- 40 Jank T, Gieseemann T and Aktories K. Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insight into structure and function. (2007) Glycobiology 17:15R-22R.
- 41 Faust C, Ye B and Song KP. The enzymatic domain of Clostridium Difficile toxin A is located within it's N-terminal region.(1998)Biochem Biophys Res Commun.251:100-105
- 42 von Eichel-Streiber C, Warfolomeow I, Knautz D, Sauerborn M and Hadding U. Morphological changes in adherent cells induced by Clostridium difficile toxins. Biochem. Soc. Trans. 19 (1991), pp. 1154–1160.

- 43 Qa'Dan M, Spyres LM and Ballard JD. pH-induced conformational changes in Clostridium difficile toxin B. *Infect. Immun.* 68 (2000), pp. 2470–2474.
- 44 Just I, Selzer J, Wilm M, von Nichel-Streiber C, Mann M and Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* (1995)375:500-5003
- 45 Etienne-Manneville S. and Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* (2002) 420:629-635.
- 46 Poxton IR, McCoubrey JM, Blair G. The pathogenicity of Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:421-7.
- 47 Bartlett JG. Clinical practice: Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334 9
- 48 Borriello SP. Pathogenesis of Clostridium difficile infection. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl C):13-9.
- 49 Alonso R. et al. Toxigenic status of clostridium difficile in a large Spanish teaching hospital. *J. Med. Microbiol* 2005;54:159-162
- 50 Bongaerts GP, Lysterly DM. Role of toxins A and B in the pathogenesis of Clostridium difficile disease. *Microb Pathog.* 1994;17:1–12.
- 51 Jabbar U, Leischner J, Kasper D, Gerber R, Sambol SP, Parada JP, Johnson S, Gerding DN Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of Clostridium difficile spores from hands. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 Jun;31(6):565-70.
- 52 Wilcox MH, et al. Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of Clostridium difficile infection. *J Hosp Infect.* 2003;54:109 –114.
- 53 Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J et al. Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* 143 (1981), pp. 42–50.
- 54 Chang TW, Gorbach SL, Bartlett, JG. Inhibition of binding of Clostridium difficile toxin by steroids. *J Infect Dis* 2008;142:113.
- 55 Teasley DG, et al. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for Clostridium-difficile-associated diarrhoea and colitis. *Lancet.* 1983;2:1043–1046.
- 56 Manabe YC, et al. Clostridium difficile colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med.* 1995;123:835– 840.

- 57 Fujitani MD, et al. Implications for vancomycin-resistant Enterococcus colonization associated with Clostridium difficile infections. Am J Gastroenterol. 2011; 39:188-93.
- 58 Bolton RP, Culshaw MA. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to Clostridium difficile. Gut. 1986;27:1169 –1172.
- 59 Musher DM, et al. Relatively poor outcome after treatment of Clostridium difficile colitis with metronidazole. Clin Infect Dis. 2005;40: 1586–1590.
- 60 Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Am J Infect Control. 1995;23:87–94.
- 61 Zar FA, et al. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis. 2007;45:302–307.
- 62 Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile- associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol. 1997; 92:739 –750.
- 63 Yanai MD, et al. Practice of gastroenterologist in Treating Flaring Inflammatory Bowel Disease patients with Clostridium difficile: antibiotics alone or combined antibiotics/immunomodulators? Inflamm Bowel dis. 2011; vol 17, number 17.
- 64 Pullman J, Prieto J, Leach TS. Ramoplanin vs vancomycin in the treatment of Clostridium difficile diarrhea: a phase II study. 44th ICAAC Washington DC 2004, Abs B-1181.
- 65 Marchese A, Salerno A, Pesce A et al. In vitro activity of rifaximin, metronidazol and vancomycin against Clostridium difficile and rate of selection spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. Chemotherapy. 2000 Jul-Aug;46(4):253-66.
- 66 Hect DW, Galang MA, Sambol SP et al. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic Clostridium difficile clinical isolates collected from 1983-2004. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 2716-2719.
- 67 Musher DM, Logan N, Mehendiratta V et al. Clostridium difficile colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 705-710.
- 68 Wenisch C, et al. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole and fusidic acid for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis .1996;22: 813.818.

- 69 Taylor NS, Bartlett JG. Binding of *Clostridium difficile* cytotoxin and vancomycin by anion-exchange resins. *J Infect Dis* 1980; 141: 92-97
- 70 Mogg GA, George RH, Youngs D et al. Randomized controlled trial of colestipol in antibiotic-associated colitis. *Br J Surg* 1982; 69: 137-139.
- 71 Braunlin W, Xu Q, Hook P et al. Toxin binding of tolevamer, a polyanionic drug that protects against antibiotic-associated diarrhea. *Biophys* 2004; 87: 534-539
- 72 Hickson M, D'Souza AL, Muthu N et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007; 335: 80-83
- 73 Aboudola S, Kotloff KL, Kyn, Kelly EC, Kelly CP et al. *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect Immun* 2003; 71: 1608-1610.
- 74 Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D et al. *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *Cl. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 2005; 128: 764-770.
- 75 Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA, Thomas W, Nichols R, Edelman R et al. Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infect. Immun.* 69 (2001), pp. 988–995.
- 76 Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 580-585.
- 77 Cornely, Crook et al. Fidaxomicin versus Vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non inferiority, randomized controlled trial *Lancet Infect Dis.* 2012 Apr;12(4):281-9.
- 78 Dallal RM, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg.* 2002;235: 363–372.
- 79 Trudel JL, et al. Toxic megacolon complicating pseudomembranous enterocolitis. *Dis Colon Rectum.* 1995; 38:1033–1038.
- 80 Spiraglia P, Barbanti F and Mastraantonio P. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J. Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2227-2234
- 81 Solomon K, Fanning S et al. PCR ribotype prevalence and molecular basis of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) and fluoroquinolone resistance in Irish clinical *Clostridium difficile* isolates. *J. Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1976-1982

- 82 Aminov I, Garrigues-Jeanjean N and Mackie I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and environmental microbiology* 2011; 22-32
- 83 Martin I, Alfa M and Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. *Molecular and Cellular Probes* 2001; 15: 209-215
- 84 Costa MC, Stampfli HR et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* on a veal farm: prevalence, molecular characterization and tetracycline resistance.
- 85 Goldergerg S, French G. Lack of association of *tcdC* type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *Journal of infection* 2011; 62: 355-362
- 86 Biancone L, Pallone F. Le malattie infiammatorie croniche intestinali. *Manuale di Gastroenterologia Edizione. 2007-2009*; 445-469.
- 87 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347:417,2002.
- 88 Boumag Strober W. The immunological and genetic basis of IBD. *Nat Rev Immunol* 3:521,2003
- 89 Burisch J, Cukovic-Cavka S et al. Construction and validation of a web-based epidemiological database for inflammatory bowel diseases in Europe An EpiCom study. *J Crohns Colitis*. 2011 Aug;5(4):342-9.
- 90 Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influence. *Gastroenterology* 2004; 126:1504-17.
- 91 Orholm M, Munkholm P. et al. Familiar occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84-88
- 92 Sleisenger MH, Fordtran JS et al. *Gastrointestinal disease. Pathophysiology, diagnosis, management. Fourth edition, W.B. Saunders Company. 1989*
- 93 Kraus TA, Mayer L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005;21:692–696
- 94 Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc* 2005;78:319-24
- 95 Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:5S–11S.
- 96 Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. *Mucosal immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:387-404]

- 97 Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:286–299]
- 98 Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:446–458
- 99 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med.*1996;2:998–1004.
- 100 Rogler G, Andus T. Cytokine in inflammatory bowel disease. *Ad World J. Surg* 1998; 22:382-389.
- 101 Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:837–846
- 102 Danese S, Gasbarrini A. Chemokines in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 2005;58:1025–1027.
- 103 Macpherson AJ, et al. The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:2088-96.
- 104 Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:390–407.
- 105 Nancy E. Street, Tim R. Mosmann. Functional diversity of T lymphocytes due secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991; 5:171-177.
- 106 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:390–400.
- 107 Jarchum I, Liu M et al. Toll-Like Receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infection and Immunity* (2011); 1498-1503
- 108 Gentschew L, Ferguson L. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases *Molecular Nutrition & Food Research.* volume 56, 524-545
- 109 Sandborn WJ. Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results. *Am J Gastroenterol.*1999;94:1161–1171.

- 110 Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 2007; 13(46): 6134-6139
- 111 Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:607–613.
- 112 Lidar M, Langevitz P and Shoenfeld Y. The Role of Infection in Inflammatory Bowel Disease: Initiation, Exacerbation and Protection *Isr Med Assoc J.* 2009 Sep;11(9):558-63.
- 113 Cashman KD, Shanahan F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15:607-613.
- 114 Gassull MA. Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 4: 79-83.
- 115 Ballegaard M, Bjergstrøm A, Brøndum S, Hylander E, Jensen L, Ladefoged K. Self-reported food intolerance in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 569-571.
- 116 Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1997;40:754–760.
- 117 MacLean CH, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz J, Garland RH, Tu W, Hilton LG, Gralnek IM, Rhodes S, Khanna P, Morton SC. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 611-619.
- 118 Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118:S68-S82.
- 119 Sandborn WJ, Feagan BG. Mild to moderate Crohn's disease-defining the basis for a new treatment algorithm [Review]. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:263–277.]
- 120 Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Infliximab therapy for inflammatory bowel disease - seven years on. *Aliment Pharmacol Ther.*2006;23:451– 463.
- 121 Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1539–1546.
- 122 Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 2004;22:181-215

- 123 Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Days AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:202-208
- 124 Giesemann T, Guttemberg G, Aktories K. Human alphadefensins inhibit Clostridium difficile toxin B. *Gastroenterology* 2008;134:2049-58.
- 125 Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG. Excess hospitalisation burden associated with Clostridium difficile in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008;57:205–210.
- 126 Nguyen GC, Kaplan GG, Harris ML, Brant SR. A national survey of the prevalence and impact of Clostridium difficile infection among hospitalized inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1443–50.
- 127 Rodemann JF, et al. Incidence of Clostridium difficile infection in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:339–344.
- 128 Ricciardi R, Ogilvie Jr JW, Roberts PL, Marcello PW, Concannon TW, Baxter NN. Epidemiology of Clostridium difficile colitis in hospitalized patients with inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum* 2009;52:40–5.
- 129 Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006;55 Suppl 1:36–58.
- 130 Issa M, et al. Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:345–351.
- 131 Ben-Horin S, Margalit M, Bossuyt P, Maul J, Shapira Y, Bojic D, et al. European Crohn's and Colitis Organization (ECCO). Combination immunomodulator and antibiotic treatment in patients with inflammatory bowel disease and clostridium difficile infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:981–7.
- 132 Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:685–93
- 133 Sorg JA, Sonenshein AL. Bile salts and glycine as cogerminants for Clostridium difficile spores. *J Bacteriol* 2008;190:2505–12.
- 134 Meyer AM, Ramzan NN, Loftus EV, Heigh RI, Leighton JA. The diagnostic yield of stool pathogen studies during relapses of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:772–5.

- 135 Schneeweiss S, Korzenik J, Solomon DH, Canning C, Lee J, Bressler B. Infliximab and other immunomodulating drugs in patients with inflammatory bowel disease and the risk of serious bacterial infections. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:253–64.
- 136 McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile* associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:40–8.
- 137 Navaneethan U, Giannella RA. Thinking beyond the colon– small bowel involvement in *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathog* 2009;1:7.
- 138 Health Protection Agency/NHS. BSOP 10. Procedura sulle Feci per *Clostridium difficile*. Revisione 21/12/2007.
- 139 Cerquetti M, Serafino A, Sebastianelli A, Mastrantonio P. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Feb 18;32(3):211-8
- 140 Schwan C, Stecher B et al. *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000626