



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea magistrale in Biologia molecolare e applicata

**Valutazione di saggi molecolari e antigenici per la
diagnosi di diarrea correlata a *Clostridioides difficile*
e definizione dei ribotipi**

Tesi di Laurea di:
Matteo D'Alessandro

Relatore:
Prof.ssa Carla Vignaroli

Correlatore:
Prof.ssa Monica Cricca

A.A. 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 *Clostridioides difficile*
- 1.2 Patogenesi di *Clostridium difficile*
- 1.3 Virulenza di *Clostridium difficile*
- 1.4 Meccanismo d'azione delle tossine TcdA e TcdB e della tossina binaria CDT
- 1.5 Epidemiologia dei ribotipi di *Clostridium difficile*
- 1.6 Trasmissione di *Clostridium difficile* e fattori di rischio
- 1.7 Diagnosi di *Clostridium difficile*
- 1.8 Tipizzazione di *Clostridium difficile*
- 1.9 Terapie delle infezioni da *Clostridium difficile*

2. SCOPO DEL LAVORO

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Raccolta dei campioni fecali
- 3.2 Saggio *Xpert C. difficile/Epi* PCR
- 3.3 Citotossicità su cellule VERO
 - 3.3.1 Preparazione delle cellule VERO
 - 3.3.2 Isolamento di *Clostridium difficile*
 - 3.3.3 Verifica dell'effetto citotossico
 - 3.3.4 Prove di validazione dei filtrati
- 3.4 Next generation sequencing (NGS)

4. RISULTATI

- 4.1 Confronto rilevazioni GDH e tossine sui campioni
- 4.2 Effetto del *Clostridium difficile* su cellule VERO
- 4.3 Definizione e confronto dei ribotipi
- 4.4 Sequenziamento dei campioni ribotipo 027

5. DISCUSSIONE

- 5.1 Rilevazioni GDH e tossine
- 5.2 Effetto citopatico del *Clostridium difficile*
- 5.3 Caratterizzazione dei ribotipi 027

6. CONCLUSIONI

1. Introduzione

1.1 *Clostridioides difficile*

Il *Clostridioides difficile* precedentemente classificato e tuttora comunemente chiamato *Clostridium difficile* (1) è un bacillo anaerobio Gram-positivo e sporigeno. Può essere un patogeno intestinale, tanto da essere la principale causa di diarrea infettiva acquisita in ospedale, responsabile di ampia gamma di manifestazioni cliniche, dall'infezione asintomatica alla lieve diarrea, (2,3), fino alla grave colite pseudomembranosa con significativa morbilità e mortalità. Nello specifico il microrganismo è responsabile del 15-25% dei casi di diarrea nosocomiali associata all'assunzione di antibiotici (AAD) e di tutti i casi di colite pseudomembranosa (4,5).

1.2 Patogenesi di *Clostridium difficile*

Le spore del *Clostridium difficile* sono cellule dormienti altamente resistenti agli agenti ambientali, alcuni disinfettanti e molti antimicrobici. Si ritiene che le spore siano il veicolo infettivo dato che le cellule vegetative (metabolicamente attive) dei batteri anaerobi obbligati difficilmente riescono a sopravvivere nell'ambiente ossigenato al di fuori dell'ospite o all'ambiente acido dello stomaco. Infatti, la cellula vegetativa di *C. difficile* non è in grado di persistere nell'ambiente o di trasmettere

l'infezione tra ospiti. La germinazione delle spore dipende dalla percezione degli acidi biliari primari (come il taurocolato) prodotti dal fegato. In particolare, la germinazione dipende dal recettore CspC che avverte la presenza di germinanti ed è inibito dagli acidi biliari secondari nel colon (6,7,8). Una cascata proteolitica porta poi alla degradazione del peptidoglicano delle spore, al rilascio di dipicolinato di calcio e alla reidratazione della spora con conseguente ripresa della crescita delle cellule (6,8). La propensione delle spore a crescere e a colonizzare l'intestino è fortemente influenzata dal microbiota dell'ospite e dal suo metaboloma associato (7,9). Per esempio, in seguito a cambiamenti nel microbiota dovuto all'uso di antibiotici si crea un ambiente favorevole per l'infezione da *C. difficile* (10). Enzimi mucolitici, come la proteina di superficie cellulare Cwp84 (11), vengono secreti dal batterio degradando la mucosa del colon. Le proteine associate alla superficie delle cellule batteriche hanno dimostrato la capacità di influenzare l'adesione del batterio alle cellule epiteliali del colon *in vitro* (12-15); pertanto mutazioni nei geni che codificano queste proteine di adesione, o nei geni che codificano proteine coinvolte nella loro maturazione, generalmente attenuano la virulenza del batterio (16,17). L'espressione di diversi fattori di colonizzazione di *C. difficile*, tra cui la proteina Cwp84 e la proteina A dell'S-layer superficiale A (SlpA), viene stimolata dalla presenza di antibiotici, quali la ampicillina e la clindamicina. Anche prima della germinazione in cellule vegetative, le spore sono in grado di aderire alle cellule del colon (18). La prima linea di difesa dell'ospite contro *C. difficile* è la produzione di composti antimicrobici come il lisozima e i peptidi antimicrobici cationici (19,20).

In particolare, le α -defensine battericide, ma non la β -defensina 1, un peptide antimicrobico (conosciuto anche come catelicidina o LL-37), possono inibire l'attività della tossina TcdB attraverso un meccanismo che coinvolge il legame diretto con la tossina (19). La germinazione delle spore avviene nel duodeno quindi le cellule vegetative colonizzano le cellule del colon formando anche biofilm. La colonizzazione e l'espressione dei fattori di virulenza sono regolati da sistemi di *quorum sensing* e molti stimoli locali (presenza di acidi grassi a corta catena, antimicrobici, aminoacidi, glucosio, ecc) contribuiscono a regolare la produzione delle due tossine TcdA e TcdB. Sebbene diversi fattori di virulenza permettano a *C. difficile* di persistere nel tratto gastrointestinale i responsabili dei sintomi della CDI sembrano correlare con la presenza di PaLoc nel genoma batterico. Anche la sporulazione si verifica nel cieco e nel colon e durante l'infezione il paziente elimina sia le cellule vegetative che le spore con le feci, ma la forma infettante più importante è rappresentata dalle spore essendo *C. difficile* un anaerobio stretto (Smits et al 2016).

1.3 Virulenza di *C. difficile*

I principali fattori di virulenza di *C. difficile* sono rappresentati da due tossine: la enterotossina TcdA (tossina A) e la citotossina TcdB (tossina B), codificate dai geni *tcdA* e *tcdB* localizzati nel Locus di patogenicità di *C. difficile* (PaLoc), una regione genomica di 19.6-kb che contiene 5 geni: *tcdR*, *tcdB*, *tcdE*, *tcdA* e *tcdC* (Figura 1). I geni *tcdD* e *tcdC* codificano rispettivamente un regolatore trascrizionale positivo e uno negativo per il controllo della produzione delle due tossine principali. Il gene *tcdE* codifica una proteina “holin-like”, simile alle endolisine fagiche capaci di formare un canale transmembrana, che probabilmente facilita l'esocitosi delle due tossine stesse (21). Le tossine A e B rilasciate dal batterio penetrano nella cellula eucariotica bersaglio mediante un meccanismo di endocitosi, colpiscono il citoscheletro di actina e sono responsabili della morte della cellula. Esse inoltre inducono la produzione del fattore di necrosi tumorale (TNF) e di interleuchina pro infiammatoria, che contribuiscono alla risposta immune e alla formazione della pseudomembrana (21).

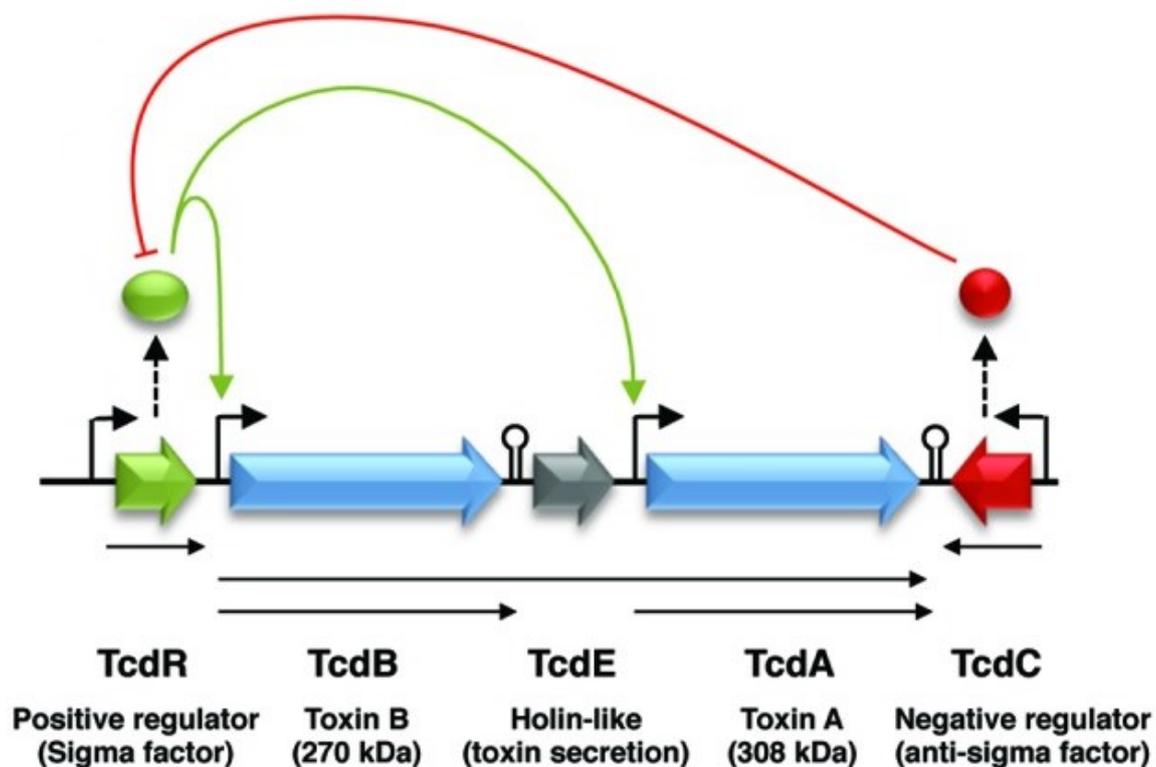


Figura 1. Organizzazione schematica di PaLoc, la regione genomica che codifica e controlla la produzione delle tossine del *Clostridioides difficile*. (Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens - Louis-Charles Fortier and Ognjen Sekulovic)

Alcuni ceppi di *C. difficile* producono delle varianti delle tossine A e B in seguito a delezioni e/o mutazioni nella sequenza dei geni codificanti (*tcdA* e *tcdB*). Ad oggi sono stati identificati 34 tipi di varianti indicate da I a XXXIV (22). Questi ceppi mutati producono entrambe le tossine principali in gran quantità a causa di una mutazione (delezione) del gene regolatore *tdcC*. Una terza tossina chiamata tossina binaria (CDT), composta da due diversi domini: una componente enzimatica denominata CDTa ed una componente di legame denominata CDTb, viene anche

prodotta da alcuni ceppi patogeni. Questa tossina ha dimostrato di incrementare la virulenza di *C. difficile* attraverso un'attività adenosina-difosfato-ribosilante dell'actina, che induce la formazione di protrusioni di microtubuli nelle cellule facilitando l'adesione del batterio alla superficie cellulare (23). Il ruolo della tossina binaria nella patogenicità di *C. difficile*, tuttavia, è ancora poco chiara. Essa è sintetizzata a partire da due diversi geni, *cdtA* e *cdtB*, che sono localizzati fuori dal PaLoc. I ceppi varianti di *C. difficile* possono produrre tutte le combinazioni delle tre tossine conosciute (A, B e CDT). La maggior parte dei tossinotipi varianti producono entrambe le tossine A e B e tipicamente producono anche, o almeno contengono, i geni funzionali per la tossina binaria (24). Esistono, inoltre, ceppi che producono quantità massive di tossine, cioè i ceppi "ipervirulenti", comparsi sin dal 2000 (25). In particolare, *C. difficile* ribotipo 027 (BI/NAP1/027) è stato associato ad un aumento della gravità dei casi, delle infezioni ricorrenti e della mortalità (25).

1.4 Meccanismo d'azione delle tossine TcdA e TcdB e della tossina binaria CDT

Studi strutturali e funzionali hanno fornito approfondimenti sui meccanismi d'azione di tutte le tossine di *C. difficile*, in particolare TcdA e TcdB. Una volta secrete, TcdA e TcdB penetrano nell'epitelio del colon attraverso un processo di endocitosi mediato da recettori, causando la produzione di chemochine infiammatorie e citochine, un afflusso di neutrofili, la distruzione delle giunzioni strette, la secrezione di liquidi e

la morte delle cellule epiteliali (26). Le due tossine presentano 4 domini funzionali e si ritiene che il dominio CROPS, all'estremità carbossi terminale di TcdA e TcdB, possa mediare l'attacco della rispettiva tossina alla superficie cellulare tramite interazioni di legame con una varietà di carboidrati. Una volta legate e internalizzate le tossine subiscono cambiamenti strutturali, a causa dell'acidificazione dell'endosoma. Queste modificazioni inducono la tossina a formare un poro canale sulla membrana endosomiale che consente la traslocazione del dominio aminoterminale (*Glucosyl-transferase Domain* o GTD) della tossina nel citoplasma della cellula epiteliale. A questo punto il dominio GTD della tossina catalizza il trasferimento di residui di glucosio a proteine della famiglia Rho delle GTPasi. La modificazione di queste GTPasi provocano effetti citopatici che portano a cambiamenti nella struttura del citoscheletro di actina, alla secrezione di citochine, all'arresto del ciclo cellulare e, eventualmente, alla morte cellulare (27). La perdita della struttura citoscheletrica e la distruzione delle adesioni focali e delle giunzioni strette nelle cellule epiteliali contribuiscono a una riduzione della funzione di barriera e alla causa della diarrea nel colon (28-31). La secrezione di chemochine e citochine pro-infiammatorie provoca un afflusso acuto di cellule immunitarie di derivazione mieloide nel sito dell'infezione. Queste cellule sono anche sensibili alle tossine, e la loro intossicazione amplifica ulteriormente il danno intestinale associato alla CDI. L'inattivazione delle GTPasi è associata all'arresto del ciclo cellulare, che impedisce la proliferazione cellulare. Alla fine, l'intossicazione porta alla morte cellulare, che può contribuire alla formazione di pseudomembrane, danni alle cripte

e/o lesioni necrotiche nel colon (32-36). Nonostante l'omologia tra le due proteine, è da notare che TcdA e TcdB hanno funzioni marcatamente diverse nei modelli di tossicità animale. Storicamente, TcdA è stata considerata la enterotossina più potente, poiché la somministrazione di TcdA purificata nell'intestino di conigli e roditori causa necrosi tissutale e un'intensa infiltrazione di cellule immunitarie (37, 38, 39). Mentre alti livelli di TcdB negli stessi esperimenti non sono riusciti a indurre questi effetti, sebbene sia importante sottolineare che la maggior parte di questi studi è stata condotta con un modello di ansa ileale e, di conseguenza, considerando solo la risposta dell'intestino tenue. Negli studi che coinvolgono tessuto colico umano, TcdB sembra essere una tossina infiammatoria potente (40,41), mentre TcdA è più debole (40). Alte concentrazioni di TcdB stimola inoltre l'attività della NADPH ossidasi nell'endosoma, aumentando il danno ossidativo nella cellula intossicata. Questi dati suggeriscono che le risposte differenziali alle tossine potrebbero derivare in parte dalle differenze nel tropismo dei recettori e sottolineano l'importanza di condurre studi meccanicistici all'interno del colon, che è il sito di proliferazione batterica nell'ospite.

Tra il 17 e il 23% dei ceppi di *C. difficile* produce una terza tossina, la CDT, che appartiene alla famiglia delle tossine ADP-ribosilanti dei clostridi. Il ruolo della CDT nell'infezione non è chiaro, sebbene la sua prevalenza in Sequence Type epidemici (come ST1 e ST11) suggerisca che possa contribuire alla gravità della CDI (Kordus et al 2022). La tossina CDT è codificata da una regione di 6.2 kb

chiamata CDT locus ed è formata da due subunità proteiche: CDTa di 43 kDa e CDTb di 99 kDa. La CDTa è la componente che ha attività enzimatica, mentre CDTb è la componente responsabile del legame della tossina alla cellula ospite e della traslocazione di CDTa nel citoplasma. Dopo la secrezione, la subunità CDTb subisce un taglio proteolitico che permette alla proteina di oligomerizzare e formare un eptamero che costituisce, sulla membrana della cellula ospite, un poro canale a cui si lega anche la subunità CDTa. Il complesso viene internalizzato per endocitosi quindi la CDTb permette la traslocazione nel citoplasma di CDTa che catalizza il trasferimento di un gruppo ADP-ribosio a molecole di actina globulare, impedendo pertanto la polimerizzazione dell'actina (Figura 2). La ADP-ribosilazione determina così alterazioni della morfologia cellulare dell'epitelio intestinale che includono: danneggiamento delle giunzioni strette, perdita di forma e distacco delle cellule epiteliali. L'ADP-ribosilazione dell'actina porta anche alla formazione di microtubuli aberranti che protrudono sulla superficie della cellula epiteliale aumentando significativamente la capacità di *C. difficile* di aderire all'epitelio del colon. Inoltre, anche la tossina CDT stimola la risposta infiammatoria e contribuisce al rilascio di citochine da parte dell'ospite (Kordus et al 2022).

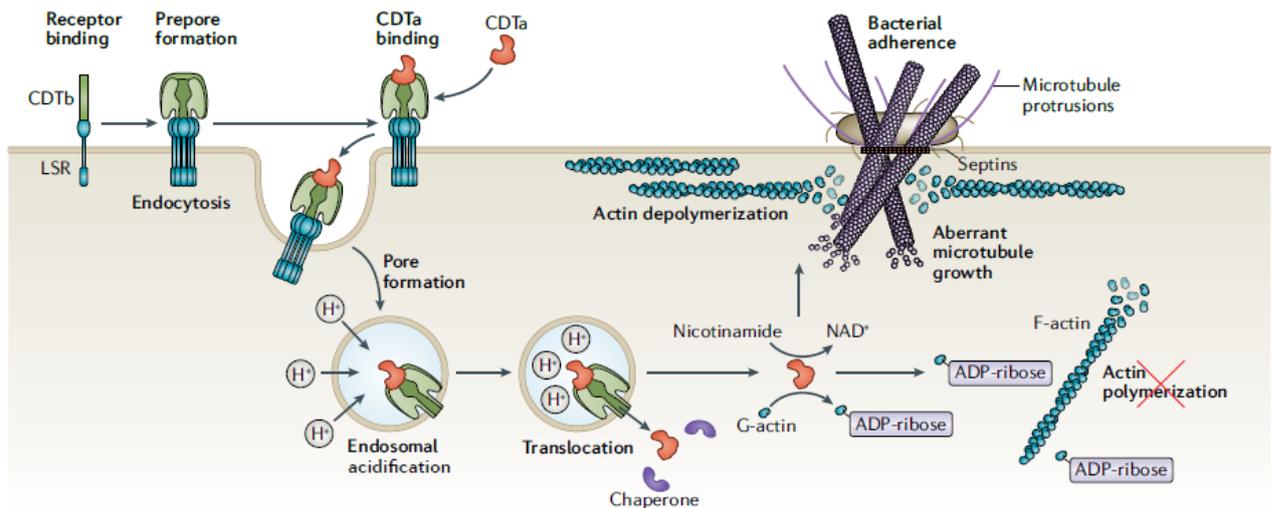


Figura 2. Meccanismo d'azione della tossina CDT di *C. difficile* (Kordus et al. 2022)

1.5 Epidemiologia dei ribotipi di *Clostridium difficile*

La diffusione di ceppi ipervirulenti negli ospedali e nelle strutture sanitarie hanno portato ad un aumento non solo dei tassi di morbilità e mortalità ma anche della spesa sanitaria in tutto il mondo. Dalla comparsa del *C. difficile* ipervirulento BI/NAP1/027 (ribotipo RT 027) nel 2000, la situazione epidemiologica delle infezioni di *Clostridioides difficile* (CDI) è cambiata fino a diventare una delle più comuni infezioni acquisite in ospedale (42). Le prime segnalazioni sull'ulteriore diffusione del ribotipo 027 nel continente europeo sono arrivate dalla Gran Bretagna nel 2005 (43) e successivamente dai Paesi Bassi (44). Nel corso del tempo, numerosi paesi europei, inclusa la Svizzera (45), hanno segnalato epidemie (46). Le prove della diffusione mondiale del ribotipo 027 derivano dalle numerose segnalazioni provenienti non solo dall'Europa ma anche da paesi asiatici (47,48,49), Australia

(50) e Sud America (51). Oltre al ribotipo 027 sono emersi anche altri ribotipi epidemici, alcuni a diffusione internazionale, come lo 078, anch'esso ipervirulento (52), altri a circolazione nazionale, come lo 018 in Italia (53). Nel 2008 è stata condotta un'indagine completa sulla distribuzione dei diversi ribotipi di *C. difficile* in 34 diversi paesi europei (54). L'incidenza della CDI è stata di 4,1 per 10.000 giorni di ricovero, variando da 0,0 a 36,3 e variando tra gli ospedali. È interessante notare che il ribotipo 027 rappresentava solo il 5% di tutti i ceppi, mentre altri ribotipi, più comunemente 014/020, 001 e 078, erano predominanti negli ospedali europei (54). I pazienti affetti da CDI causata dal ribotipo 078 presentavano una gravità della malattia simile a quella dei pazienti in cui la CDI era associata al ribotipo 027, tuttavia il ribotipo 078 era più frequente in individui più giovani e più comunemente causavano CDI di tipo comunitario, piuttosto che nosocomiali (55). Inoltre, il ribotipo 078 è stato isolato sia dall'uomo che da diverse specie animali (bovini, maiali e cavalli) e sebbene ceppi umani siano stati trovati strettamente correlati ai ceppi suini (Goorhuis et al., 2008), ad oggi non ci sono stati casi provati di trasmissione dagli animali all'uomo e nessuna prova definitiva che associ una qualsiasi fonte di cibo all'infezione umana da *C. difficile*. Sono state registrate epidemie ospedaliere gravi di CDI dovute ad un altro ceppo variante per le tossine di *C. difficile*, il ribotipo 017, che produce la tossina B, ma non la A (A-, B+), e privo anche della CDT. Questo ribotipo inizialmente descritto in Asia (Cina, Corea del Sud e Giappone) è ormai diffuso anche in Europa e in altri continenti e una caratteristica comune riscontrata nei ceppi 017 è la resistenza alla clindamicina,

mediata dal gene *erm(B)* (Cairns et al., 2017). È probabile che altri ceppi epidemici di *C. difficile* emergeranno in futuro (57) a causa del genoma altamente mutabile di questo patogeno, che consente la sua elevata adattabilità ai cambiamenti ambientali. Pertanto, una caratterizzazione molecolare più profonda dei ceppi di *C. difficile* isolati è necessaria per identificare un eventuale cluster di ribotipi in una sospetta epidemia di *C. difficile* o per monitorare l'emergere di nuovi ribotipi.

1.6 Trasmissione di *C. difficile* e fattori di rischio

La trasmissione di *C. difficile* avviene per via oro-fecale tramite spore che sono resistenti al calore, alle radiazioni, essiccamento e ai comuni disinfettanti e che possono persistere nell'ambiente per molti mesi. Le spore sono resistenti alla barriera acida dello stomaco e germinano nel colon trasformandosi nella forma vegetativa che produce le tossine. Il principale serbatoio di *C. difficile* è costituito dall'ambiente contaminato da spore (oggetti, dispositivi, superfici) e dai soggetti con infezione intestinale sintomatica o, in minor misura, dai portatori asintomatici. I pazienti e/o operatori sanitari possono trasmettere e/o acquisire *C. difficile* tramite il contatto con superfici e oggetti contaminati (termometri, fonendoscopi, telefoni cellulari ecc.), mediante contaminazione con le cellule vegetative e spore (58). Le principali condizioni predisponenti alle CDI sono:

- Utilizzo di antibiotici. La causa più comune di diarrea associata agli antibiotici è l'infezione da *C. difficile* (CDI). L'infezione ricorrente da *C. difficile* (rCDI) si

verifica spesso dopo il successo del trattamento della CDI. Le rCDI, a causa della loro maggiore incidenza e della difficoltà nel trattarle, stanno diventando un importante problema clinico. L'uso di antibiotici altera il microbiota intestinale e successivamente produce un ambiente in cui la CDI può insorgere più facilmente nei pazienti (59). Il microbiota intestinale alterato dagli antibiotici influenza anche la composizione degli acidi biliari nel colon, promuovendo così la crescita di *C. difficile* (59).

- Età. Il fattore di rischio per rCDI riportato più frequentemente è l'età avanzata (60,61). In una meta-analisi di 33 studi (n=18.530) per identificare i fattori di rischio per rCDI, è stato dimostrato che l'età superiore a 65 anni rappresentava un elevato fattore di rischio indipendente (60). Sebbene la ragione della recidiva negli anziani non sia ancora ben chiara, è probabile che la diminuita risposta immunitaria e la copresenza di patologie svolgano un ruolo nella ricorrenza di CDI (62).

- Malattie croniche, immunodepressione e lungodegenza. Pazienti affetti da malattie croniche (insufficienza renale cronica, fibrosi cistica, neoplasie ematologiche, malattia infiammatoria cronica intestinale, ecc.) e/o immunodepressi, così come la degenza in strutture per patologie acute o lungodegenze rappresentano dei fattori di rischio. Anche interventi chirurgici gastrointestinali, l'alimentazione con sondino naso-gastrico e l'assunzione di farmaci che riducono la produzione degli acidi gastrici, come quelli che agiscono da inibitori di pompa protonica, costituiscono dei fattori di rischio (63).

1.7 Diagnosi di *C. difficile*

Il sospetto clinico insieme ad una diagnosi di laboratorio adeguata e tempestiva è fondamentale per il trattamento e la prevenzione delle infezioni da *C. difficile*. Per evitare l'identificazione di portatori asintomatici, devono essere processate solo feci liquide o non formate, cioè campioni che assumono la forma del contenitore (64). La “scala di Bristol delle feci” è una scala visiva graduata utilizzata per classificare forma e consistenza delle feci (Figura 2), convalidata come indicatore dei tempi di transito gastrointestinale. Questa scala viene indicata dalla *Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive* come uno degli strumenti da adoperare per la diagnosi da *Clostridium difficile* e per determinare quando è idoneo prelevare un campione di feci per la ricerca dell'antigene e delle tossine specifiche del microrganismo. Per un recupero ottimale, i campioni di feci devono essere messi in coltura entro 2 ore dalla raccolta e conservati in un contenitore a tenuta stagna; oltre questo tempo, anche se alcune spore possono sopravvivere a 4°C, il numero di cellule vegetative vitali di *C. difficile* sembra diminuire significativamente (64). Per il test delle tossine, le feci possono essere conservate a 4°C per un massimo di 3 giorni. Se il test viene posticipato, i campioni devono essere congelati a -80°C (65, 66).

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage, but with cracks on the surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces (entirely liquid)

Figura 3: *Rappresentazione grafica della “scala di Bristol” attualmente utilizzata per la classificazione delle feci, parametro utile nella diagnosi di CDI (The Bristol Stool Form Scale. Reproduced by kind permission of the late Dr K W Heaton, Reader in Medicine at the University of Bristol. © 2000 Norgine Pharmaceuticals Ltd.)*

Attualmente sono disponibili diversi test di laboratorio, che rilevano bersagli diversi, per diagnosticare la CDI (Figura 3):

- Test immunoenzimatici (EIA)
- Test di citotossicità delle feci (CTA)
- Coltura tossigenica (TC)
- Test di amplificazione dell’acido nucleico (NAAT)

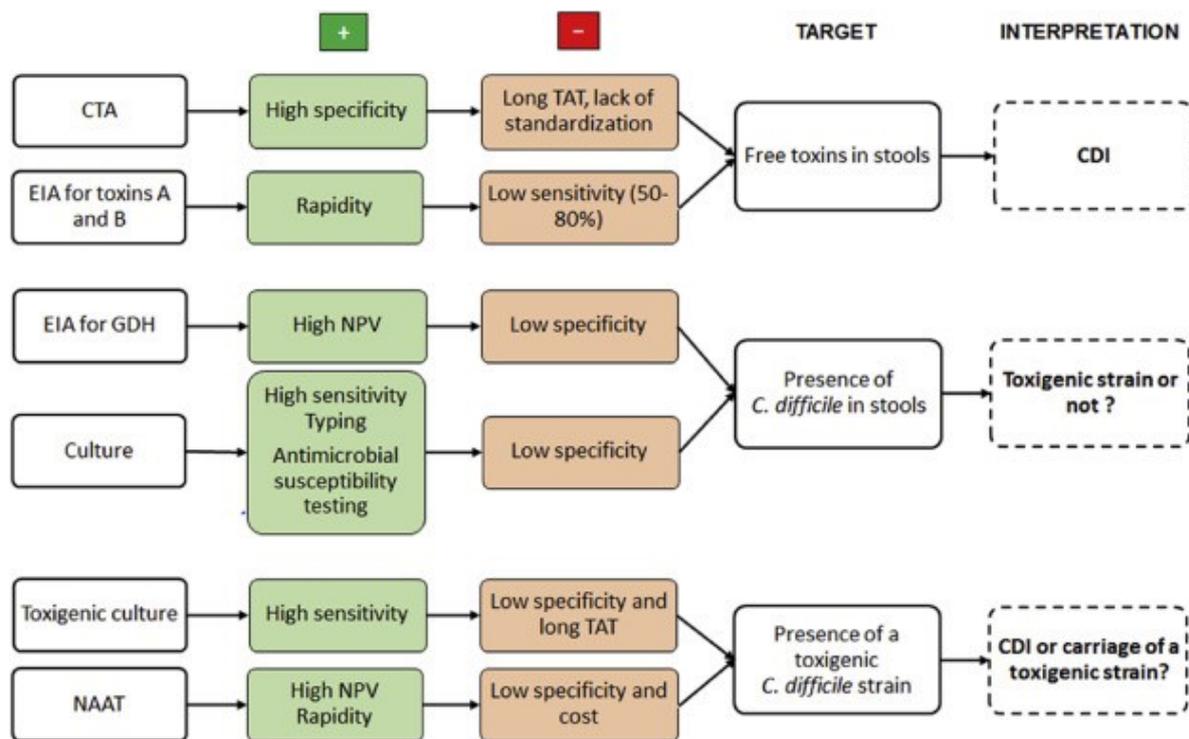


Figura 4: Rappresentazione grafica dei test utili alla diagnosi di CDI (Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. How to: diagnose infection caused by Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect. 2018 May;24(5):463-468. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.005. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29269092.)

Il CTA e il TC sono considerati metodi standard di riferimento per il rilevamento rispettivamente delle tossine o di un ceppo tossigenico. Paradossalmente, nessuno dei due metodi viene utilizzato abitualmente a causa di problemi tecnici e tempi di refertazione lunghi (64). I test immunoenzimatici si basano invece sulla ricerca delle tossine libere nelle feci insieme al rilevamento della glutammato deidrogenasi (GDH); quest'ultimo è un enzima metabolico espresso da tutti i ceppi di *C. difficile*, e la sua assenza generalmente esclude l'infezione (64). Quando il test

immunoenzimatico rileva l'antigene GDH ma non le tossine, i risultati vengono confermati con i test NAAT per rilevare i geni della tossina A e/o della tossina B da campioni di feci (67).

1.8 Tipizzazione di *Clostridium difficile*

Per caratterizzare e confrontare i ceppi circolanti e identificare i ceppi emergenti e quelli responsabili di focolai a livello mondiale, sono stati applicati diversi metodi di tipizzazione. L'elettroforesi su gel d'agarosio in campo pulsato (PFGE) e l'analisi con enzimi di restrizione (REA) sono ampiamente utilizzate negli Stati Uniti e in Canada. La PFGE è stato uno dei primi metodi molecolari utilizzati per *C. difficile* e altri patogeni di origine alimentare in Nord America (68). Il metodo utilizza enzimi di restrizione che tagliano raramente (come SmaI o SacII) il DNA batterico producendo un numero limitato di frammenti di restrizione. In Nord America, gli isolati sono designati con NAP e un numero (ad esempio, NAP1: North America Pulsotype 1) (69). La tecnica separa i grandi frammenti di DNA generati in base alla dimensione utilizzando un gel d'agarosio in elettroforesi a campo pulsato generando dei profili genetici che sono altamente discriminanti. Tuttavia, grandi quantità di DNA ad alto peso molecolare devono essere analizzate, rendendo il processo laborioso. La tipizzazione di *C. difficile* basata su REA viene eseguita utilizzando il DNA totale, che viene digerito con un enzima di restrizione che taglia frequentemente (HindIII), e i frammenti risultanti vengono risolti tramite

elettroforesi classica su agarosio. Questo metodo si è dimostrato riproducibile, altamente discriminante e universalmente applicabile. Tuttavia, l'interpretazione dei profili di restrizione in un singolo gel può essere difficile e potrebbe essere alterata dalla presenza di DNA extracromosomico (68). In Europa, il PCR-ribotyping di *C. difficile* è riconosciuto come il metodo di tipizzazione dominante. Il PCR-ribotyping si basa sulla amplificazione delle regioni spaziatrici intergeniche del rDNA 16S e 23S che variano in numero e dimensione in ceppi diversi. Un PCR-ribotipo è definito come un gruppo di ceppi che producono un profilo di bande identico. Pertanto, una singola differenza di banda giustifica un diverso ribotipo (69). Stubbs et al. (1999) hanno costruito una libreria di riferimento del PCR-ribotipo di *C. difficile* composta da 2030 isolati, con un totale di 116 tipi distinti identificati da ceppi isolati da campioni ambientali, ospedalieri, comunitari veterinari e da ceppi di collezione (70).

Principali caratteristiche delle tecniche di laboratorio per il *C.*

difficile

METODO	Ricerca dei batteri		Ricerca delle tossine			Ricerca dei geni della tossina
	GDH	Coltura	EIA	CTA	Coltura tossinogenica	NAAT
Uso	Ricerca dell'enzima GDH	Isolamento del ceppo Antibiogramma Tipizzazione	Ricerca delle tossine A e B	Ricerca della tossina B	Isolamento del ceppo Ricerca delle tossine	Ricerca del gene della tossina B Tipizzazione
Durata Esame	15 min - 2 ore	2-4 giorni	15 min - 2 ore	1-2 giorni	1-2 giorni	< 2 ore
Principali caratteristiche	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibile • Manuale o Automatizzato • Rapido 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibile • Manuale • Basso costo • Eccellente NPV* 	<ul style="list-style-type: none"> • Specifico • Standardizzato • Manuale o Automatizzato • Rapido 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibile • Non standardizzato • Di lunga durata • Richiede competenza tecnica 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibile • Gold standard • Di lunga durata 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibile • Rapido • Costoso

Adattato da Eckert et al., Journal des anti-infectieux, 2011 *NPV: Valore predittivo negativo

Figura 5: Tabella comparativa dei metodi diagnostici per la ricerca di batteri e tossine, evidenziando uso, durata e caratteristiche principali dei test GDH, coltura, CLIA, CTA, coltura tossinogenica e NAAT.

1.9 Terapie delle infezioni da *Clostridium difficile*

Le linee guida del 2018 (Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children) (71) raccomandano l'utilizzo della vancomicina o della fidaxomicina o del metronidazolo nelle infezioni non gravi. Sebbene la vancomicina sia meno costosa, i tassi di recidiva più bassi della fidaxomicina implicano un rapporto costo-efficacia complessivamente simile per entrambi gli agenti (72,73,74). Una recente soluzione per il trattamento delle infezioni gravi e fulminanti è il trapianto del microbiota fecale (FMT). Un singolo trapianto di microbiota fecale porta alla guarigione nel 66%-91% dei pazienti nei casi segnalati (75,76) per molti pazienti con presentazione grave e fulminante, mentre più FMT in breve successione si sono rivelati necessari per una cura duratura. Oltre al miglioramento dei tassi di guarigione, FMT può comportare una diminuzione dei tassi di colectomia e sepsi correlate a CDI e può offrire un beneficio in termini di sopravvivenza nei pazienti critici. Attualmente vi sono ampi dati che dimostrano la sicurezza e l'efficacia della FMT nei pazienti con CDI grave o fulminante.

2. Scopo del lavoro

Il *Clostridioides difficile* è un batterio che causa circa mezzo milione di infezioni ogni anno negli Stati Uniti (CDC). Tra i pazienti che contraggono l'infezione, circa 1 su 6 rischia recidive nelle successive 2-8 settimane (CDC), rendendo evidente la difficoltà nella gestione nosocomiale di questa infezione. Inoltre, 1 persona su 11 di età superiore ai 65 anni, muore entro un mese dall'infezione (CDC). Questo tasso di mortalità significativo sottolinea la vulnerabilità dei pazienti anziani e l'urgenza di strategie terapeutiche efficaci. Per garantire una diagnosi accurata, è fondamentale seguire un algoritmo diagnostico che integri saggi sierologici e molecolari, come riportato dalle società ESGCD and ESCMID. Un altro aspetto cruciale nella diagnosi di infezione è la corretta conservazione del campione per evitare di incorrere in falsi negativi. Inoltre, la diagnosi è ulteriormente complicata dalla diffusione in Comunità Europea di ribotipi "ipervirulenti", come il ribotipo 027, individuabili solo con tecniche molecolari o di sequenziamento. In Comunità europea sono stati segnalati 45 casi di ribotipo 027 nel triennio 2018-2020.

Lo scopo di questo lavoro mira ad approfondire diversi aspetti dell'infezione da *C. difficile*, che vanno dalla corretta conservazione del campione e dall'analisi della produzione di tossine con metodi tradizionali e colturali, fino alla definizione dei ribotipi virulenti con tecniche di *whole genome sequencing*. I campioni sono stati, analizzati a distanza di tempo variabile dal prelievo e dopo conservazione a temperature diverse, proprio al fine di evidenziare le criticità legate al trasporto e

alla conservazione del campione che, da letteratura, impattano soprattutto sulla performance dei saggi sierologici deputati alla ricerca delle tossine. Per valutare l'espressione delle tossine è stato standardizzato un saggio di tossicità in vitro basato sull'esposizione di cellule VERO al surnatante di ceppi tossinogenici e non, coltivati in vitro. Infine, la presenza di ribotipi ipervirulenti, rilevati al test molecolare sulla base di una delezione a livello del nucleotide 117 del regolatore negativo dell'espressione della tossina B, sono stati ulteriormente studiati mediante sequenziamento genomico.

3. Materiali e Metodi

3.1 Raccolta dei campioni fecali

Sono stati analizzati 20 campioni di feci diarroiche secondo la scala di Bristol (Figura 3), raccolti nel periodo che va da giugno 2023 a giugno 2024 nel laboratorio di Microbiologia dell'AUSL Romagna, tutti provenienti da pazienti ospedalizzati. Aliquote (circa 0,5 ml) di ciascun campione sono stati conservati a diverse temperature: temperatura ambiente (RT), 4°C, -20°C e -80°C; e sono state analizzate in tempi successivi, a distanza dal prelievo: lo stesso giorno (T=0), dopo 2 giorni (T=2), 1 settimana (T=7), 2 settimane (T=14) e 1 mese (T=30); e sono stati analizzati con test CLIA e NAAT.

Nella comune routine di laboratorio dell'AUSL Romagna per la ricerca del *Clostridium difficile* in un campione fecale viene utilizzato l'algoritmo di identificazione rappresentato in Figura 6. Questo consiste inizialmente nel dosaggio del GDH e delle tossine con un test di immunochemioluminescenza (CLIA) Liaison XL (DiaSorin S.p.A) automatizzato. I campioni di feci negativi per la presenza di GDH vengono considerati negativi per la ricerca del *C. difficile*, i campioni positivi a GDH vengono invece considerati positivi per *C. difficile* tossinogenico solo se vengono rilevate anche le tossine principali; quindi, se mediante il test CLIA le tossine non vengono rilevate la presenza del ceppo tossinogenico deve essere confermata utilizzando un ulteriore test: il test NAAT che si basa sulla ricerca dei geni codificanti le tossine A e B.

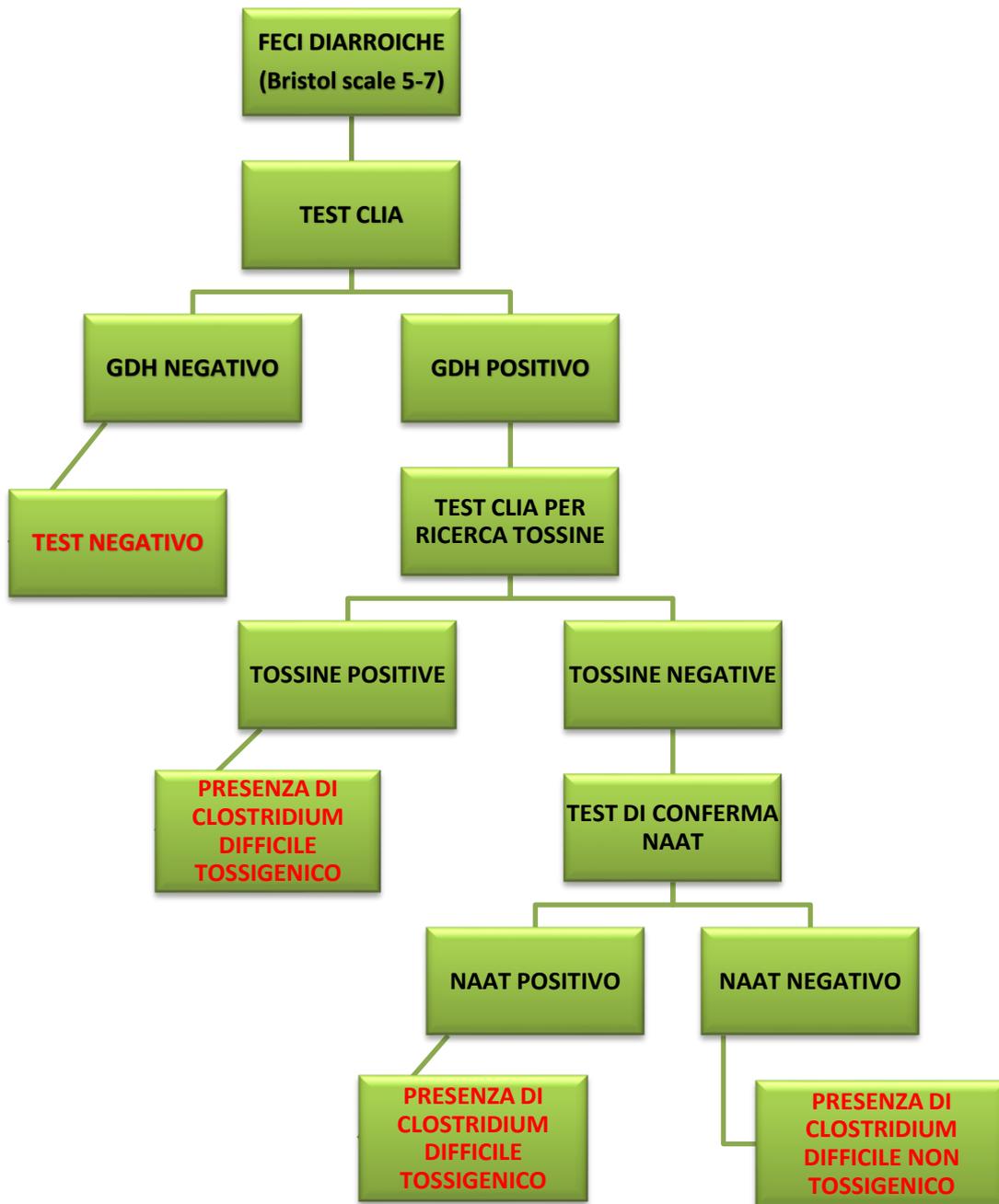


Figura 6: Workflow applicato di routine nella ricerca di *C. difficile* in campioni fecali

3.2. Saggio *Xpert C.difficile/Epi* PCR

I campioni fecali sono stati testati con test molecolari per la ricerca delle tossine A, B e tossina binaria tramite test Gene Xpert (Cepheid S.R.L.). Il test *Xpert C. difficile/Epi* è un test di PCR multipla che permette di rilevare nella stessa reazione di PCR il gene *tcdB*, il gene della tossina binaria (*cdt*) e la delezione del gene *tcdC* al nucleotide 117; quest'ultima è caratteristica dei ribotipi 027. Il kit si compone di:

- Cartucce Gene Xpert; cartucce individuali sigillate, ciascuna contenente i reagenti necessari per un singolo test. La cartuccia è divisa in più camere e canali interni che contengono i reagenti necessari per l'estrazione del DNA, l'amplificazione tramite PCR e la rilevazione del target.
- Una fiala di plastica monouso contenente una soluzione tampone con agenti di lisi, stabilizzanti e conservanti necessari per il caricamento del campione all'interno della cartuccia. Sono inclusi generalmente detergenti per rompere le pareti cellulari e altri agenti che preservano il DNA o l'RNA del patogeno. I componenti chimici variano a seconda del tipo di test.
- CD o Manuale di Istruzioni
- Attraverso l'utilizzo di un tampone sterile viene prelevata una quantità approssimativa di circa 1 mg di feci e trasferito nella fiala del reagente campione. La fiala viene agitata nel vortex per 10 secondi e la soluzione viene trasferita nella camera "S" (Camera di immissione del campione) della cartuccia utilizzando una pipetta Pasteur. La cartuccia viene quindi

posizionata sullo strumento Gene Xpert (Figura 7) e il test viene eseguito utilizzando il programma di analisi GeneXpert *C. difficile*.



Figura 7: Rappresentazione dello strumento GeneXpert di Cepheid

3.3 Citotossicità su cellule VERO

Dei 20 campioni analizzati precedentemente con le tecniche CLIA sono stati presi in esame 5 campioni, i campioni #1, #2, #3 che risultavano essere positivi per il GDH e la TOX e i campioni #4 e #5 che erano positivi per il GDH, negativi per la TOX e positivi all'analisi molecolare con Gene Xpert (Cepheid S.R.L.). Insieme a questi 5 campioni abbiamo testato anche i campioni che risultavano essere rappresentativi del ribotipo 027, analizzati con le tecniche NAAT precedentemente

viste per caratterizzare in maniera più specifica il loro comportamento su cellule VERO. In particolare, nell'arco di tempo che va da giugno 2023 a giugno 2024, sono stati trovati e selezionati 3 campioni rappresentativi della classe dei *Clostridium difficile* 027 (campioni #6, #7, #8).

3.3.1 Preparazione delle cellule VERO

Le cellule, mantenute nel mezzo di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Euroclone S.p.A) addizionato con 2 mM di L-glutammina (L-Gln), 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomicina (P/S) (mezzo di coltura "completo") e 10% di siero bovino fetale inattivato al calore (FBS) (Euroclone S.p.A), sono state incubate in termostato a 37 °C in atmosfera umidificata arricchita al 5% di CO₂. Per la determinazione della citotossicità della tossina del *Clostridium difficile*, cellule VERO sono state seminate in microtiter a 12 pozzetti ad una densità di circa 20.000 cellule per pozzetto (2.000.000 cellule per piastra) utilizzando il terreno di coltura completo addizionato al 5% di FBS per rallentare la crescita cellulare ed evitare che la coltura raggiungesse l'iperconfluenza prima del suo utilizzo.

3.3.2 Isolamento di *Clostridium difficile*

I campioni da #1 a #8 sono stati seminati su terreno selettivo CHROMID® *C. difficile* Agar (CDIF Agar) (BioMérieux S.P.A.) incubati per 48 ore in condizione di anaerobiosi tramite Genbox CO₂ (BioMérieux S.P.A.). Le colonie cresciute sul terreno sono state identificate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix

Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) con lo strumento Vitek MS Prime (BioMérieux S.P.A.); sono stati presi in considerazione solo i ceppi che davano risultati con una attendibilità pari al 99.9%.



Figura 8: Immagine del tipico aspetto delle colonie di *Clostridium difficile* su CDIF Agar



Figura 9: Vitek MS Prime

3.3.3 Verifica dell'effetto citotossico

Le colonie di *Clostridium difficile* identificate attraverso il MALDI-TOF sono state prelevate per preparare una sospensione 0.5 McFarland in soluzione fisiologica. Quindi sono stati prelevati 0.5 mL di sospensione e sono stati aggiunti al brodo di arricchimento Thyoglycollate Medium USP con Resazurina (THIO) e in parallelo ad un altro brodo di arricchimento, il Brain Heart Infusion Broth (BHI); questo per facilitare la proliferazione di *Clostridium difficile* e stimolare la produzione delle tossine. I brodi di arricchimento sono stati incubati per 48 ore (h) a 37°C. Al termine delle 48h i brodi di coltura sono stati centrifugati per 10 min a 1500xg, il surnatante è stato prelevato e successivamente filtrato con filtri MICRON FILTER (Multimedical, medical device S.R.L.) con porosità di 0,22 µm. Il filtrato è stato diluito tramite diluizioni scalari base 5 con fisiologica (figura 10). Le varie diluizioni sono state dispensate (100 µl) nei pozzetti contenenti le cellule VERO. Le cellule sono state poi incubate per 24 e 48 ore a 37°C, 5% CO₂. Il monostrato di cellule è stato poi osservato al microscopio ottico a 40X.

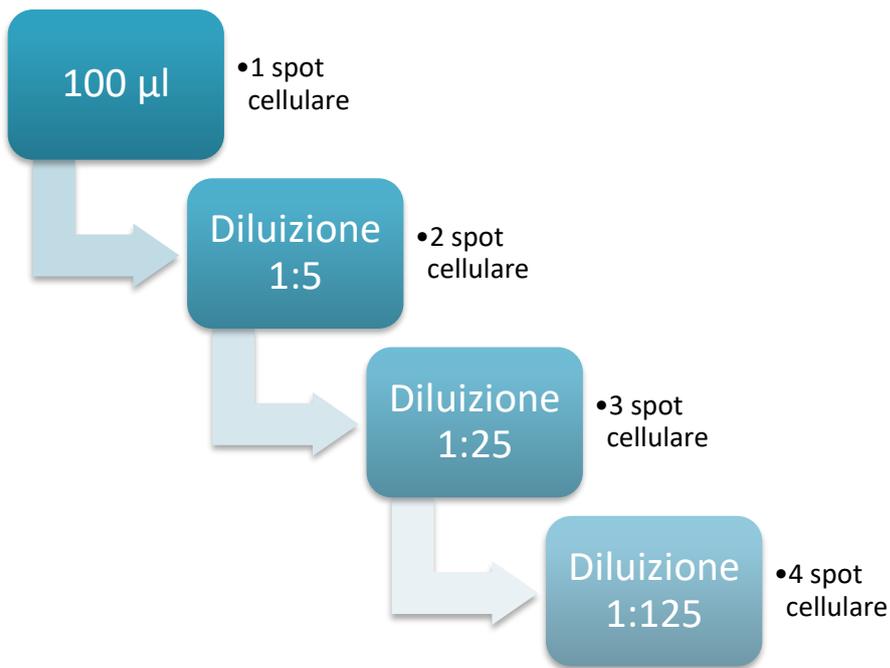


Figura 10: schema delle diluizioni usate.

3.3.4 Prove di validazione dei filtrati

Per garantire che i filtrati ottenuti dai brodi di arricchimento non fossero contaminati da altri batteri, aliquote dei filtrati sono state seminate su piastre di agar sangue (COS, BioMérieux S.P.A.). Per la semina, abbiamo utilizzato un'ansa sterile monouso da 10 microlitri per ogni filtrato. Le piastre sono state poi incubate a 37°C per 24-48 ore. Trascorso questo tempo, abbiamo esaminato le piastre per la presenza di colonie batteriche. Successivamente, abbiamo eseguito un ulteriore test di conferma sui filtrati utilizzando lo strumento Liaison XL (Diasorin S.P.A.). Abbiamo ripetuto i test del GDH (Glutammato Deidrogenasi) e della TOX (tossina) su tutti i filtrati per confermare la presenza o l'assenza del GDH e della tossina nei diversi campioni.

3.4 Next generation sequencing (NGS)

Il flusso di lavoro per la preparazione delle librerie di DNA utilizzando il protocollo DNA prep (Illumina, San Diego, California) prevede diverse fasi fondamentali per organizzare una libreria pronta per il sequenziamento.

Library Prep Workflow

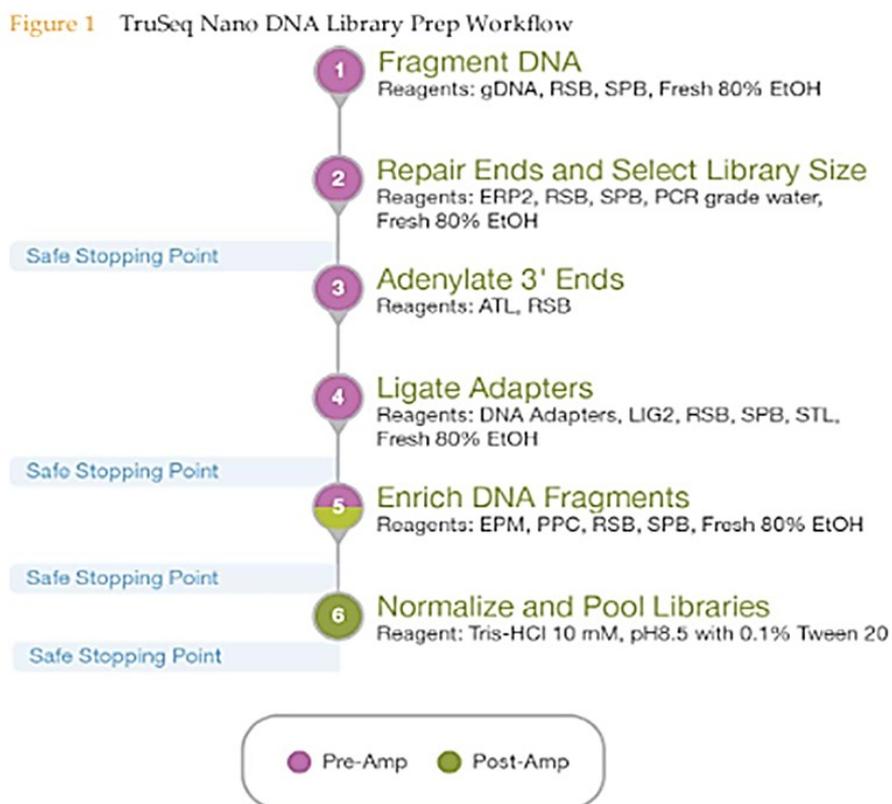


Figura 11: workflow per la preparazione delle librerie di DNA (TruSeq®NanoDNALibraryPrep ReferenceGuide)

L'estrazione del DNA totale è stata eseguita prelevando dalla coltura su CDIF Agar circa 1-2 colonie pure e isolate di *Clostridium difficile* mediante il protocollo di estrazione Maxwell® CSC Pathogen Total Nucleic Acid Kit (Maxwell® CSC Instruments, Promega Italia Srl). Dalla quantità di eluato ottenuta (100 microlitri circa) si procede con la frammentazione del DNA genomico in frammenti più piccoli, utilizzando metodi meccanici o enzimatici. Una volta ottenuti i frammenti di DNA, le estremità vengono riparate per creare estremità "lisce", eliminando eventuali basi sporgenti o mancanti. Questo passaggio è seguito dalla selezione dei frammenti di dimensione appropriata, garantendo che tutti i frammenti abbiano una lunghezza uniforme, adatta per la costruzione della libreria. Successivamente, si aggiungono code di adenina (A) alle estremità 3' dei frammenti di DNA. Questo passaggio, chiamato adenilazione, è essenziale per la ligazione degli adattatori, poiché questi contengono code di timina (T) che si legano in maniera complementare alle code di adenina. Gli adattatori di DNA, che contengono sequenze necessarie per l'amplificazione e il sequenziamento, vengono poi legati alle estremità dei frammenti di DNA mediante una ligasi. Questi adattatori facilitano l'aggancio dei frammenti di DNA a sequenze complementari presenti sulla superficie della *flow cell*, i quali si ibridano ai frammenti di DNA permettendo l'avvio del sequenziamento. Prima del sequenziamento le librerie di DNA vengono normalizzate per ottenere concentrazioni uniformi dei singoli frammenti, assicurando che ogni frammento (campione) sia ugualmente rappresentato e che contribuisca in modo equo al sequenziamento. Successivamente, le librerie normalizzate vengono aggregate

(*pooling*) in un'unica soluzione per il sequenziamento. Infatti, poiché più frammenti di uno stesso campione o di campioni diversi verranno sequenziati in un'unica cella a flusso, i campioni devono essere raggruppati in un'unica provetta. Il sequenziatore sarà ancora in grado di distinguere i frammenti che derivano da diversi campioni grazie a sequenze “tag” aggiunte ai frammenti durante l’iniziale preparazione della libreria. Il *pooling* è un passaggio importante per ottenere una copertura uniforme dei campioni durante il sequenziamento. Dopo la ligazione degli adattatori, i frammenti di DNA vengono amplificati tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) per arricchire la libreria. Questo passaggio aumenta la quantità di DNA disponibile per il sequenziamento e garantisce che solo i frammenti con gli adattatori vengano amplificati. L'intero processo include punti di arresto sicuri, dove è possibile interrompere temporaneamente il lavoro senza compromettere la qualità della libreria.

4. RISULTATI

4.1 Confronto rilevazioni GDH e tossina sui campioni

Sono stati raccolti 20 campioni di feci fresche per poter valutare nel tempo e attraverso le varie temperature di conservazione la ricerca del GDH e delle tossine presenti all'interno del campione. I campioni presi in esame sono stati analizzati con lo strumento Liaison XL (DiaSorin S.p.A.) (CLIA) e con test NAAT a diverse scadenze: giorno 0 (tabella 1), giorno 2, 1 settimana, 2 settimane e 1 mese. Le temperature di conservazione dei campioni presi in esame sono state le seguenti: temperatura ambiente (TA), +4°, -20° e -80°. Tutti i campioni sono stati aliquotati e conservati dunque alle varie temperature e analizzati in tempi successivi. I risultati ottenuti sono sovrapponibili per tutte le temperature e per tutto il periodo preso in considerazione dallo studio.

Tabella 1. Risultati ottenuti dall'analisi dei 20 campioni testati (T=0 e RT) con i test CLIA e NAAT

CAMPIONI TESTATI	CLIA		NAAT
	GDH	TOX	
CAMPIONE 1	✓	✓	✓
CAMPIONE 2	✓	✓	✓
CAMPIONE 3	✓	✓	✓
CAMPIONE 4	✓	Neg	✓
CAMPIONE 5	✓	Neg	✓
CAMPIONE 6	✓	✓	✓
CAMPIONE 7	✓	✓	✓
CAMPIONE 8	✓	Neg	✓
CAMPIONE 9	✓	✓	✓
CAMPIONE 10	✓	✓	✓
CAMPIONE 11	✓	✓	✓
CAMPIONE 12	✓	✓	✓
CAMPIONE 13	✓	✓	✓
CAMPIONE 14	✓	✓	✓
CAMPIONE 15	✓	✓	✓
CAMPIONE 16	✓	✓	✓
CAMPIONE 17	✓	✓	✓
CAMPIONE 18	✓	✓	✓
CAMPIONE 19	✓	✓	✓
CAMPIONE 20	✓	✓	✓

4.2 Effetto del *Clostridium difficile* su cellule VERO

Sono stati selezionati i campioni #1, #2, #3, #4, #5 che sono stati testati per verificare l'effetto citotossico su cellule VERO. Come controllo negativo è stato utilizzato il ceppo *E.coli* ATCC 8739.

TEST DI CITOTOSSICITÀ SU CELLULE VERO (FILTRATO DA THIO)	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Controllo negativo <i>E. coli</i> ATCC 8739
	GDH+, TOX+	GDH+, TOX+	GDH+, TOX+	GDH+, TOX- NAAT+	GDH+, TOX- NAAT+	
1 test: nessuna diluizione (intero)	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2 test: diluizione 1:5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
3 test: diluizione 1:25	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
4 test diluizione 1:125	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

I risultati mostrano come per tutti i campioni presi in considerazione, l'effetto citopatico risulta evidente in tutte le diluizioni eseguite. I risultati ottenuti attraverso il metodo in coltura con BHI invece hanno mostrato l'assenza di effetto citopatico per ogni campione preso in esame.

TEST DI CITOTOSSICITÀ SU CELLULE VERO (FILTRATO DA BHI)	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Controllo negativo <i>E. coli</i> ATCC 8739
	GDH+, TOX+	GDH+, TOX+	GDH+, TOX+	GDH+, TOX- NAAT+	GDH+, TOX- NAAT+	
1 test: nessuna diluizione	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2 test: diluizione 1:5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3 test: diluizione 1:25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4 test diluizione 1:125	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Sono state eseguite successivamente le analisi su Liaison XL (Diasorin S.P.A.) sul filtrato di entrambi i brodi di coltura utilizzati.

TEST SU FILTRATO THIO	CAMPIONE 1	CAMPIONE 2	CAMPIONE 3	CAMPIONE 4	CAMPIONE 5	CONTROLLO NEGATIVO
GDH	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
TOX	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

I risultati delle analisi sul filtrato THIO confermano la presenza di GDH e della TOX su tutti i filtrati che hanno causato l'effetto citopatico. Viceversa, i risultati ottenuti dall'analisi del filtrato del BHI mostrano l'assenza di GDH e della TOX.

TEST SU	CAMPIONE 1	CAMPIONE 2	CAMPIONE 3	CAMPIONE 4	CAMPIONE 5	CONTROLLO
FILTRATO BHI						NEGATIVO
GDH	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOX	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

4.3 Definizione e confronto dei ribotipi

Dei 20 campioni analizzati precedentemente i campioni 6,7,8 sono risultati essere rappresentativi del ribotipo 027 all'analisi NAAT con Gene Xpert *C.Difficile* (Cepheid S.R.L.). L'analisi dell'effetto citopatico dei 3 *Clostridium difficile* ribotipo 027 su cellule VERO è stata eseguita successivamente alla verifica dell'effetto citopatico dei 5 campioni visti in precedenza. Attraverso l'analisi colturale su CDIF Agar (BioMérieux S.P.A.) abbiamo isolato e identificato le colonie di *Clostridium difficile*. Successivamente abbiamo definito il suo effetto citopatico su cellule VERO attraverso il passaggio in coltura su THIO e BHI per poter estrarre la tossina espressa dal nostro campione. Le cellule VERO sono state incubate con 100 microlitri di filtrato proveniente dal THIO e dal BHI del nostro campione seguendo le diluizioni scalari in base 5. Sono stati utilizzati un controllo positivo, ovvero un campione con un *Clostridium difficile* tossigenico e un controllo negativo rappresentato da un campione ove non era presente il *Clostridium difficile*.

TEST	DI	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Controllo	Controllo
CITOTOSSICITA' SU CELLULE VERO (FILTRATO DA THIO)		presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX+	presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	positivo GDH+, TOX+	negativo GDH- TOX -
1 test: nessuna diluizione		NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2 test: diluizione 1:5		NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
3 test: diluizione 1:25		NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
4 test diluizione 1:125		NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

Dopo le 24/48 ore di incubazione le cellule VERO alle quali avevamo somministrato i 100 microlitri del filtrato proveniente dal THIO del nostro campione di interesse non mostravano alcun effetto citopatico degno di nota, il controllo positivo ha mostrato effetto citopatico sulle cellule mentre il controllo negativo non ha evidenziato alcun effetto. Il filtrato ottenuto dal brodo di arricchimento del BHI invece, non ha mostrato alcun effetto citopatico in tutte le situazioni del test.

TEST	DI	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Controllo	Controllo
CITOTOSSICITA' SU CELLULE VERO (FILTRATO DA BHI)		presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX+	presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	positivo GDH+, TOX+	negativo
1 test:	nessuna diluizione	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2 test:	diluizione 1:5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3 test:	diluizione 1:25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4 test:	diluizione 1:125	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

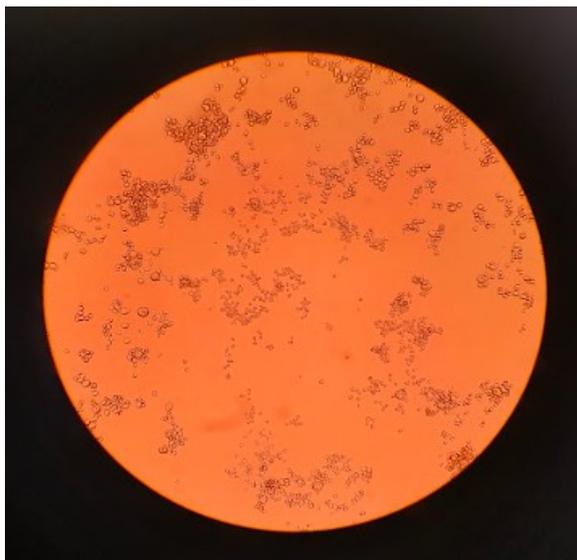


Figura 12 Controllo positivo

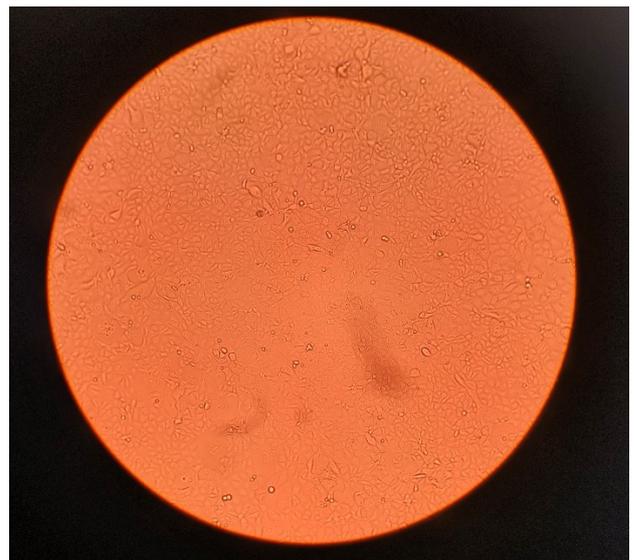


Figura 13 Controllo negativo



Figura 14 Campione 6 Ribotipo 027

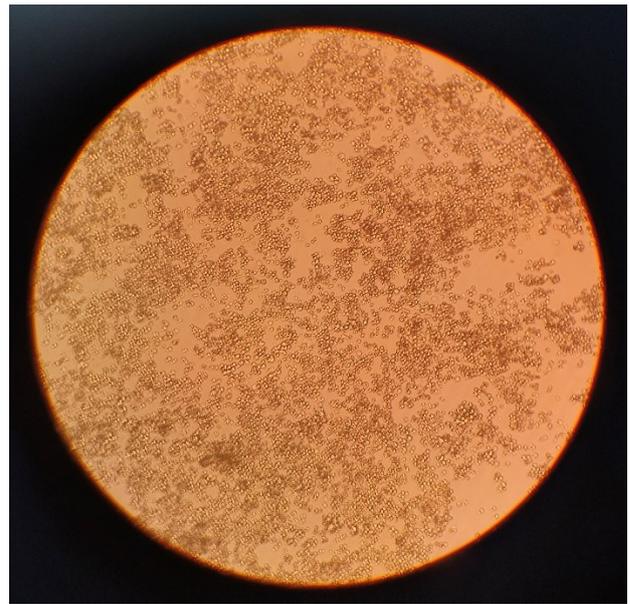


Figura 15 Campione 7 Ribotipo 027

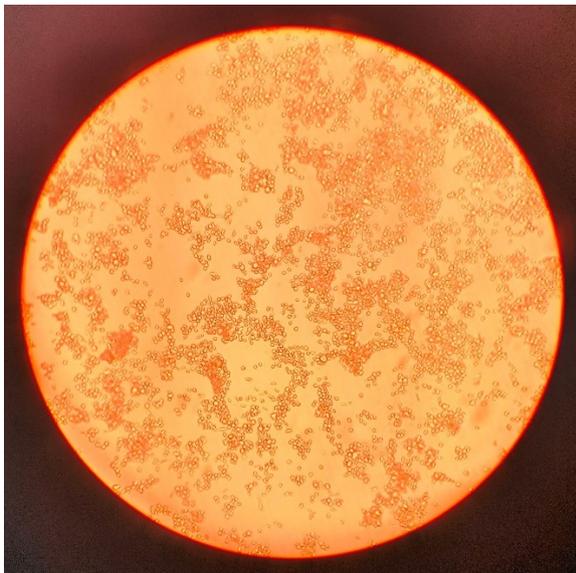


Figura 16 Campione 8 Ribotipo 027

Tutti i filtrati sono stati messi in coltura su agar sangue (COS) e successivamente testati su Liaison XI. Dopo 24/48 ore, i test culturali non hanno mostrato la presenza di batteri in nessuno dei casi presi in considerazione. I test su Liaison XL sul filtrato del THIO hanno mostrato la presenza della tossina per i campioni 7 e 8, mentre per il campione 6 la tossina non è stata evidenziata.

TEST SU	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE	CONTROLLO	CONTROLLO
FILTRATO THIO	6 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	7 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX+	8 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	POSITIVO	NEGATIVO
GDH	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
TOX	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

I test su Liaison XL sul filtrato del BHI invece non ha mostrato la presenza di GDH e TOX in tutti i campioni presi in esame.

TEST SU	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE	CONTROLLO	CONTROLLO
FILTRATO BHI	6 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	7 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX+	8 presumptive RIBOTIPO 027 GDH+, TOX- NAAT+	POSITIVO	NEGATIVO
GDH	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOX	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

4.4 Sequenziamento dei campioni ribotipo 027

I campioni #6, #7, #8 che risultavano presunti ribotipi 027 dall'analisi NAAT, sono stati ulteriormente studiati e caratterizzati attraverso il sequenziamento genomico con il sistema Illumina NextSeq 2000. I genomi sono stati ricostruiti seguendo un approccio "de novo", ovvero, nel contesto del sequenziamento genomico, questo, si riferisce al processo di assemblaggio di un genoma senza l'uso di una sequenza di riferimento preesistente. Successivamente è stato definito il profilo del *multi locus sequence type* (MLST) e il profilo del ribosomal sequence type (rST), utili per la caratterizzazione genotipica di batteri attraverso l'analisi delle sequenze di diversi loci (geni). Questa tecnica consente di determinare il profilo di sequenza di più loci, per identificare e classificare i ceppi batterici. Nel nostro studio, è stato definito il profilo MLST analizzando le isoforme di 7 geni specifici di *Clostridium difficile* comunemente utilizzati per la classificazione e la tipizzazione dei suoi ceppi, l'analisi ha rivelato che i campioni #6 #7 e #8 erano riconducibili al ribotipo 027. Per quanto riguarda il profilo ribosomiale invece sono stati analizzati 53 subunità proteiche ribosomiali e i risultati mostrano come per il campione #6 non vi sia una associazione specifica ad un profilo ribosomiale noto. (Figura 17).

	Avg. Coverage	Approximated Genome Size (Mbases)	ST(C. difficile MLST)	CC(C. difficile MLST)	adk(C. difficile MLST)	atpA(C. difficile MLST)
Campione 6	104	4.2	41	2	1	1
Campione 7	101	4.1	1	2	1	1
Campione 8	107	4.3	6	1	2	1

dxr(C. difficile MLST)	glyA(C. difficile MLST)	recA(C. difficile MLST)	sodA(C. difficile MLST)	tpi(C. difficile MLST)	rST	Associated rST profile
9	9	1	3	2	43151	unknown
1	10	1	3	5	24667	027
6	1	1	5	1	24733	027

Figura 17 Rappresentazione grafica dei geni utilizzati per classificazione e tipizzazione di *Clostridium difficile*.

Inoltre, siamo andati a verificare anche la presenza della delezione presente al nt117 nel gene *tcdC* per confermare l'analisi effettuata con Gene Xpert *C. difficile*/Epi e i campioni analizzati hanno mostrato tutti la delezione al nt117. Il ribotipo 027 è caratterizzato da una delezione di 18 paia di basi (bp) nel gene *tcdC*, e da una delezione in posizione 117 dello stesso gene. Poiché *tcdC* codifica un regolatore per l'espressione dei geni per la tossina A e B queste delezioni comportano una maggiore espressione delle tossine e quindi l'ipervirulenza del ceppo.

5. DISCUSSIONE

5.1 Rilevazioni GDH e tossine

In questo studio abbiamo analizzato 20 campioni di feci diarroiche, classificati secondo la scala di Bristol (Figura 3) come idonei, per valutare l'effetto della conservazione del campione a temperatura e tempi variabili, sulla rilevazione della presenza di *Clostridium difficile*.

Seong Won et al. hanno messo in evidenza le criticità legate alle condizioni di trasporto e conservazione dei campioni per la diagnosi di *Clostridium difficile* mettendo in risalto la necessità di garantire una corretta conservazione del campione (figura 17). In particolare, la conservazione a TR riduce la sensibilità del saggio EIA per la rilevazione delle tossine di *C. difficile* già dopo 24 ore dalla raccolta del campione, mentre la sensibilità per la ricerca del GDH si riduce dal 4° giorno. I test NAAT non presentano riduzioni della sensibilità a qualsiasi temperatura venga mantenuto il campione, anche a distanza di tempo dal prelievo.

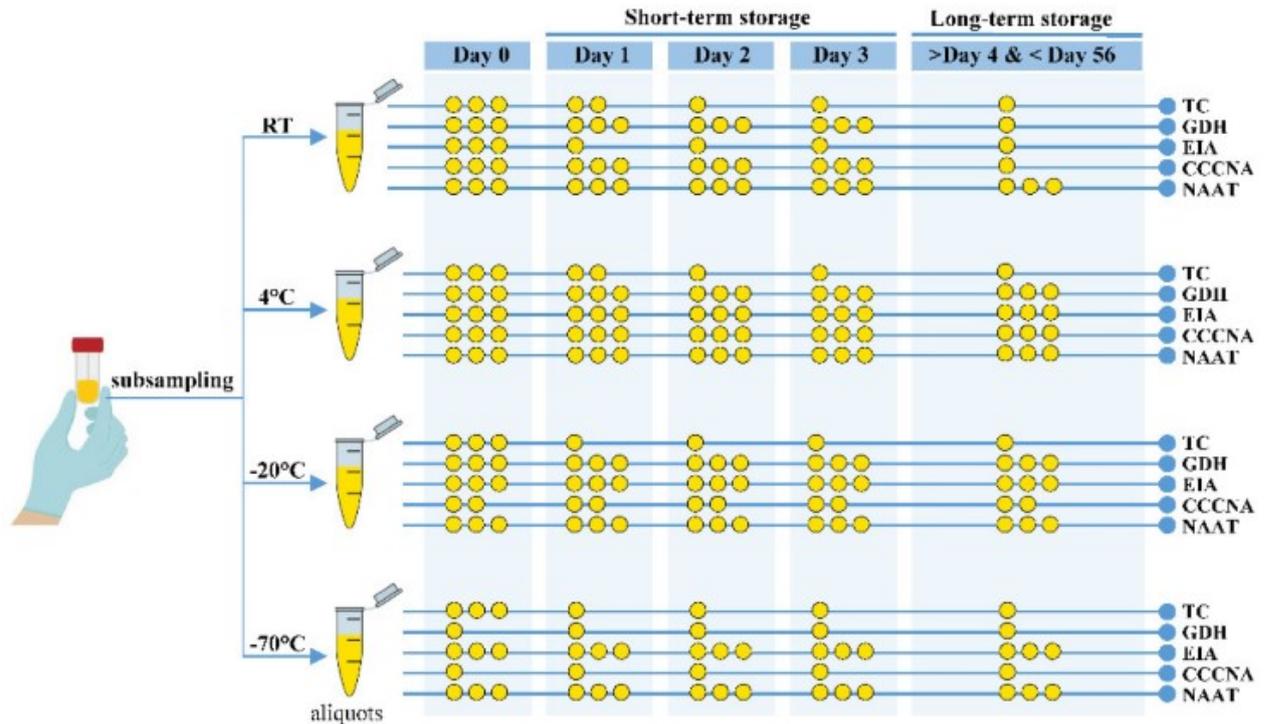


Figura 17

Pragmatic Strategy for Fecal Specimen Storage and the Corresponding Test Methods for *Clostridioides difficile* Diagnosis (Seong Won, et al. 2021). "Pragmatic Strategy for Fecal Specimen Storage and the Corresponding Test Methods for *Clostridioides difficile* Diagnosis" *Pathogens* 10, no.8:1049.

Alla luce di questi dati, i 20 campioni di materiale fecale analizzati in questa tesi sono stati conservati a diverse temperature: temperatura ambiente (TR), 4°C, -20°C e -80°C, e per differenti periodi di tempo: giorno 0, giorno 2, 1 settimana, 2 settimane e 1 mese. Gli stessi campioni sono stati poi analizzati utilizzando il test CLIA ed il NAAT (test di amplificazione degli acidi nucleici).

Per quanto visto nel nostro studio, il GDH e le tossine di *C. difficile* dei 20 campioni presi in considerazione, si sono dimostrati rilevabili fino a 30 giorni di conservazione con il metodo CLIA-Liaison XL, Diasorin. Inoltre, non sembrerebbe necessario il

mantenimento di una temperatura di almeno 4°C per la rilevazione della tossina e del GDH. Il test Xpert *C. difficile*/Epi, si è dimostrato efficace in tutte le condizioni analitiche considerate. I nostri dati confermano che diverse temperature e lunghi periodi di conservazione non riducono la sensibilità del test NAAT; il nostro studio inoltre ha evidenziato come con il test CLIA non vi sia stata una riduzione della sensibilità del test poiché gli antigeni, GDH e le Tossine, erano ancora rilevabili anche conservando i campioni a TR fino ad un mese.

5.2 Effetto citopatico del *Clostridium difficile*

Dal nostro lavoro è emerso come isolati tossinogenici di *Clostridium difficile*, positivi al solo test NAAT o al test CLIA e NAAT, se coltivati in brodo di arricchimento THIO, riescano ad esprimere le tossine il cui effetto citopatico era evidenziabile su cellule VERO. Quindi anche i ceppi tossinogenici non produttori di tossina *in vivo*, se opportunamente coltivati, riescono ad esprimerla *in vitro*.

Contrariamente a quanto riportato da *Elnaze Zare Mirzaei et al.*, che propongono il BHI come mezzo idoneo per la coltura del *Clostridium difficile*, abbiamo evidenziato delle criticità nel supportare la crescita ponendo il terreno in ambiente anaerobio. Infatti, a differenza del THIO, il BHI non si è mostrato essere un mezzo di coltura adeguato a mettere in evidenza la produzione di tossine da parte di *Clostridium difficile*, tanto che l'effetto citopatico non era più visibile dopo crescita dei ceppi in BHI.

5.3 Caratterizzazione ribotipi 027

L'analisi genomica e la tipizzazione batterica sono strumenti essenziali per comprendere la diversità e la distribuzione dei patogeni, nonché per identificare ceppi specifici associati a focolai di infezione. Nel nostro studio, abbiamo sequenziato e caratterizzato 3 campioni di *Clostridium difficile* (campioni #6, #7 e #8) che inizialmente erano stati identificati come presunti ribotipi 027 tramite l'analisi NAAT. Utilizzando il sistema di sequenziamento Illumina NextSeq 2000, abbiamo ricostruito i genomi de novo e definito il sequence type di appartenenza dei tre ceppi mediante MultiLocus Sequence Typing (MLST).

Il campione #8 non ha evidenziato la presenza delle tossine attraverso analisi CLIA ma ha mostrato la sua citotossicità su cellule. Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che il *Clostridium difficile* tossinogenico quando messo nelle condizioni di crescita ideali (come visto precedentemente) riesce ad esprimere le tossine nel mezzo di coltura.

I risultati dell'analisi NAAT avevano suggerito che tutti e 3 i campioni fossero ribotipi 027, tuttavia, il sequenziamento genomico ci ha permesso di definire sia il Sequence Type (mediante MLST) che il ribosomal Sequence Type (rST) dei tre ceppi e solo i campioni #7 e #8 appartenevano effettivamente al ribotipo 027. Per il campione #6 l'analisi MLST ha mostrato l'appartenenza del ceppo al sequence type ST41 che è stato associato spesso al ribotipo 027 tuttavia l'analisi del profilo

ribosomiale dimostrava un rST sconosciuto, diverso da quello tipico di 027. Questo evidenzia la maggiore specificità e accuratezza dell'approccio basato sul sequenziamento rispetto all'analisi NAAT. Il campione #6, avendo un rST non associabile al ribotipo 027, potrebbe rappresentare una diversa linea evolutiva di *C. difficile*, potenzialmente con differente patogenicità e risposta ai trattamenti. Questo indica la necessità di ulteriori studi per comprendere le caratteristiche specifiche di questo ceppo e considerando che il campione #6 è l'unico a non avere effetto citopatico su cellule Vero, è in corso un'analisi sui geni **tcdB** per chiarire questo importante aspetto.

L'utilizzo del sequenziamento attraverso analisi MLST si è rivelato uno strumento utile per la caratterizzazione dei ceppi batterici. Questo approccio non solo conferma o smentisce i risultati ottenuti con metodi diagnostici più rapidi ma meno specifici, come la NAAT, ma fornisce anche informazioni dettagliate sul profilo genotipico dei batteri. Il nostro studio ha sequenziato solo 3 campioni, perciò, sono necessari studi futuri con un numero maggiore di campioni per confermare queste osservazioni.

6.CONCLUSIONI

Il *Clostridium difficile* rappresenta un patogeno di notevole rilevanza clinica, responsabile di infezioni gravi e spesso ricorrenti, specialmente tra le popolazioni vulnerabili. La nostra indagine ha dimostrato come l'uso dello strumento Liaison XL, attraverso il test CLIA, sia in grado di quantificare in modo preciso e affidabile l'antigene GDH e le tossine di *Clostridium difficile* nei campioni di feci, anche quando questi vengono conservati a temperatura ambiente e per differenti periodi di tempo. La possibilità di conservare il campione a TR in una area vasta come quella dell'AUSL Romagna e l'utilizzo di un test in chemiluminescenza, più sensibile rispetto ai test EIA (A. Makristathis et al. *Comprehensive evaluation of chemiluminescent immunoassays for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection*) per la rilevazione degli antigeni e delle tossine, sono fattori determinanti per una diagnosi tempestiva e corretta, riducendo il rischio di trattamenti inappropriati e migliorando gli esiti clinici per i pazienti.

Inoltre, il nostro studio ha permesso l'identificazione di presunti ribotipi 027 mediante l'utilizzo del test molecolare di Cepheid. L'effettiva appartenenza al ribotipo 027 è stata ulteriormente approfondita mediante whole genome sequencing, considerando anche il fatto rilevante che uno dei presunti ribotipi 027 non fosse produttore di tossine, come rilevato sia dal Liaison XL che dal test di tossicità *in vitro* su cellule Vero. Tale campione non si è infatti confermato essere un ribotipo 027. La circolazione di ceppi ipervirulenti necessita di un monitoraggio continuo e

rigoroso per l'individuazione di nuovi ribotipi emergenti, che potrebbero avere implicazioni significative per la salute pubblica.

In conclusione, il nostro studio rivela come l'utilizzo di un saggio sensibile come il test CLIA sul Liaison XL consente di rilevare la presenza degli antigeni delle tossine anche se il campione fecale viene conservato per diversi giorni a temperatura ambiente. Una diagnosi accurata delle infezioni da *Clostridium difficile* è importante per una gestione più efficace e mirata di questo patogeno complesso e mutevole, ma anche per la sorveglianza epidemiologica. Al momento i risultati sono stati desunti dall'analisi di 20 materiali fecali conservati a diverse temperature e per diversi intervalli temporali, la validazione di questi risultati necessita di ulteriori ricerche e analisi longitudinali per garantire la riproducibilità e la robustezza dei dati. La standardizzazione di un saggio di riferimento, per testare la tossicità *in vitro* su cellule Vero di isolati di *C. difficile*, si è dimostrato cruciale per confermare la produzione di tossine o meno da parte di ceppi ipervirulenti. In particolare, abbiamo confermato la mancata rilevazione di antigeni delle tossine di un presunto ceppo ipervirulento 027, attraverso la mancata rilevazione dell'effetto citotossico *in vitro*. I dati ottenuti sono stati confermati anche mediante sequenziamento.

La nostra esperienza ci insegna come l'ausilio di nuove tecnologie come l'NGS e di saggi tradizionali come il saggio di tossicità *in vitro* siano cruciali nell'affiancare il normale percorso diagnostico per *C. difficile* al fine di approfondire le conoscenze su ceppi con comportamenti anomali o per studiare l'epidemiologia dei ribotipi circolanti.

Le prospettive future di questo lavoro vertono sul consolidamento dei dati relativi alla conservazione del campione e sul sequenziamento di ceppi ipervirulenti per studiarne le caratteristiche epidemiologiche e di virulenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. 2016 Aug; 40:95-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008.
2. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2011; 144:561-564.
3. Dubberke ER, Wertheimer AI. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:57-66.
4. Landelle C, Verachten M, Legrand P, Girou E, Barbut F, Buisson CB. Contamination of healthcare workers' hands with *Clostridium difficile* spores after caring for patients with *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35:10-15.
5. Bowman KA, Broussard EK, Surawicz CM. Fecal microbiota transplantation: current clinical efficacy and prospects. *Clin Exp Gastroenterol* 2015; 8:285- 291.
6. Paredes-Sabja, D., Shen, A. & Sorg, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.* 22, 406–416 (2014).

7. Theriot, C. M. & Young, V. B. Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile*. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 445–461 (2015).
8. Bhattacharjee, D. et al. Reexamining the germination phenotypes of several *Clostridium difficile* strains suggests another role for the CspC germinant receptor. *J. Bacteriol.* 198, 777–786 (2015).
9. Buffie, C. G. et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205–208 (2015).
10. Theriot, C. M., Bowman, A. A. & Young, V. B. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth
11. Janoir, C., Pechine, S., Grosdidier, C. & Collignon, A. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J. Bacteriol.* 189,
12. Merrigan, M. M. et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS ONE* 8, e78404 (2013).
13. Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H. & Karjalainen, T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* 69, 7937–7940 (2001).

14. Spigaglia, P. et al. Surface-layer (S-layer) of human and animal *Clostridium difficile* strains and their behaviour in adherence to epithelial cells and intestinal colonization. *J. Med. Microbiol.* 62, 1386–1393 (2013).
15. Lin, Y. P., Kuo, C. J., Koleci, X., McDonough, S. P. & Chang, Y. F. Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. *J. Biol. Chem.* 286, 3957–3969 (2011).
16. Kovacs-Simon, A. et al. Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 210, 274–284 (2014).
17. Tulli, L. et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen. *Cell. Microbiol.* 15, 1674–1687 (2013).
18. Paredes-Sabja, D. & Sarker, M. R. Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J. Med. Microbiol.* 61, 1208–1218 (2012).
19. Gieseemann, T., Guttenberg, G. & Aktories, K. Human α -defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B. *Gastroenterology* 134, 2049–2058 (2008).
20. Hing, T. C. et al. The antimicrobial peptide cathelicidin modulates *Clostridium difficile*-associated colitis and toxin A-mediated enteritis in mice. *Gut* 62, 1295–1305 (2013).
21. Pothoulakis C., Castagliuolo I., LaMont J.T. (1988) Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins. *New Physiol. Sci.* 13: 58-63.

22. Rupnik M, Janezic S. An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *J Clin Microbiol.* 2016 Jan;54(1):13-8. doi: 10.1128/JCM.02083-15.
23. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis* 2014;14:1208-1219.
24. Stare BG, Delmée M, Rupnik M. 2007. Variant forms of the binary toxin CDT locus and *tcdC* gene in *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol* 56:329–335. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46931-0>.
25. Kristin E. Burke and J. Thomas Lamont. *Clostridium difficile* Infection: A Worldwide Disease. *Gut and Liver*, Vol. 8, No. 1, January 2014, pp. 1-6.
26. Shen, A. *Clostridium difficile* toxins: mediators of inflammation. *J. Innate. Immun.* 4, 149–158 (2012).
27. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635 (2002).
28. Hecht, G., Pothoulakis, C., LaMont, J. T. & Madara, J. L. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 82, 1516–1524 (1988).

29. Hecht, G., Koutsouris, A., Pothoulakis, C., LaMont, J. T. & Madara, J. L. Clostridium difficile toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* 102, 416–423 (1992).
30. Moore, R., Pothoulakis, C., LaMont, J. T., Carlson, S. & Madara, J. L. C. difficile toxin A increases intestinal permeability and induces Cl-secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.2.G165> (1990).
31. Riegler, M. et al. Clostridium difficile toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 95, 2004–2011 (1995).
32. Welsh, C. F. et al. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat. Cell Biol.* 3, 950–957 (2001).
33. Fiorentini, C. et al. Clostridium difficile toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* 66, 2660–2665 (1998).
34. Qa'Dan, M. et al. Clostridium difficile toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cell Microbiol.* 4, 425–434 (2002).
35. Brito, G. A. et al. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1271–1278 (2005).

36. Chumbler, N. M., Farrow, M. A., Lapierre, L. A., Franklin, J. L. & Lacy, D. B. Clostridium difficile toxins TcdA and TcdB cause colonic tissue damage by distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 84, 2871–2877 (2016).
37. Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K. & Wilkins, T. D. Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* 47, 349–352 (1985).
38. Mitchell, T. J. et al. Effect of toxin A and B of Clostridium difficile on rabbit ileum and colon. *Gut* 27, 78–85 (1986).
39. Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. J. & LaMont, J. T. Differential effects of Clostridium difficile toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology* 93, 273–279 (1987).
40. Riegler, M. et al. Clostridium difficile toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 95, 2004–2011 (1995).
41. Savidge, T. C. et al. Clostridium difficile toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 125, 413–420 (2003).
42. Czepiel, J.; Drózdź, M.; Pituch, H.; Kuijper, E.J.; Perucki, W.; Mielimonka, A.; Goldman, S.; Wultanska, D.; Garlicki, A.; Biesiada, G. Clostridium difficile infection: Review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019, 38, 1211–1221.

43. Smith A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill.* 2005;10:E050630 2.
44. Goorhuis A, Van der Kooi T, Vaessen N, et al. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:695–703.
45. Fenner L, Frei R, Gregory M, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease at University Hospital Basel including molecular characterisation of the isolates 2006–2007. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27:1201–7.
46. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, et al. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* 2007; 12: E1–2.
47. Cheng VC, Yam WC, Chan JF, To KK, Ho PL, Yuen KY. *Clostridium difficile* ribotype 027 arrives in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34:492–493.
48. Kato H, Ito Y, van den Berg RJ, Kuijper EJ, Arakawa Y. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill.* 2007 Jan 11; 12(1):E070111.3. doi: 10.2807/esw.12.02.03110-en.

49. Kim H, Lee Y, Moon HW, Lim CS, Lee K, Chong Y. Emergence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in Korea. *Korean J Lab Med*. 2011 Jul; 31(3):191-6. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.3.191..
50. Riley TV, Thean S, Hool G, Golledge CL. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med J Aust*. 2009;190:706–8.
51. Quesada-Gomez C, Rodriguez C, Gamboa-Coronado Mdel M, et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol*. 2010;48:669–70.
52. Cartman ST, Heap JT, Kuehne, SA, et al. The emergence of “hypervirulence” in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6):387-95.
53. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008; 47(9):1162-70.
54. Bauer MP, Notermans DW, vanBenthem BH,etal. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 2011;377:63–73.
55. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1162–70.
56. Cairns MD, Preston MD, Hall CL, Gerding DN, Hawkey PM, Kato H, Kim H, Kuijper EJ, Lawley TD, Pituch H, Reid S, Kullin B, Riley TV, Solomon K, Tsai PJ, Weese JS, Stabler RA, Wren BW. Comparative Genome Analysis and Global

Phylogeny of the Toxin Variant *Clostridium difficile* PCR Ribotype 017 Reveals the Evolution of Two Independent Sublineages. *J Clin Microbiol*. 2017 Mar;55(3):865-876. doi: 10.1128/JCM.01296-16. Epub 2016 Dec 28. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1971.

57. Lessa FC, Gould CV, McDonald LC. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2012;55(Suppl 2):S65–70.

58. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, et al. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR ribotype 018. *J Clin Microbiol* 2010; 48(8):2892-6.

59. Britton RA, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*. 2014; 146:1547–1553. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.059.

60. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, et al. Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015; 36:452–460. doi: 10.1017/ice.2014.88.

61. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect*. 2008; 70:298–304. doi: 10.1016/j.jhin.2008.08.012.

62. Song JH, Kim YS. Recurrent *Clostridium difficile* Infection: Risk Factors, Treatment, and Prevention. *Gut Liver*. 2019 Jan 15; 13(1):16-24. doi: 10.5009/gnl18071.
63. Vestreinsdottir I, Gudlaugsdottir S, Einarsdottir R, et al. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(10):2601
64. Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*. 2018 May; 24(5):463-468. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.005.
65. Freeman J, Wilcox M.H. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 126-128
66. Barbut F, Beaugerie L, Delas N, Fossati-Marchal S, Aygaleq P, Petit J, et al. Comparative value of colonic biopsy and intraluminal fluid culture for diagnosis of bacterial acute colitis in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 356-360
67. Russello G, Russo A, Sisto F, Scaltrito MM, Farina C. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhea and molecular characterization of clinical isolates. *New Microbiol* 2012;35:307-316.

68. C.A. Huber, N.F. Foster, T.V. Riley, D.L. Paterson, Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 2810e2814.
69. I. Filippis, M.L. McKee, *Molecular Typing in Bacterial Infections*, Springer Science & Business Media, New York, 2012.
70. S.L. Stubbs, J.S. Brazier, G.L. O'Neill, B.I. Duerden, PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 461e463.
71. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 2018;66:e1–48.
72. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 2011;364:422–31.
73. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, et al. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: Fidaxomicin versus vancomycin. *Clin Infect Dis* 2012; 55(Suppl 2): S154–61.
74. Cornely OA, Vehreschild M, Adomakoh N, et al. Extended-pulsed fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: EXTEND study subgroup analyses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38:1187–94.
75. Zainah H, Hassan M, Shiekh-Sroujeh L, et al. Intestinal microbiota transplantation, a simple and effective treatment for severe and refractory *Clostridium difficile* infection. *Dig Dis Sci* 2015; 60:181–5.

76. Agrawal M, Aroniadis OC, Brandt LJ, et al. The long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplant for recurrent, severe, and complicated *Clostridium difficile* infection in 146 elderly individuals. *J Clin Gastroenterol* 2016; 50:403–7.