

ipoc

Anno 3 · 2 · 2015

Periodico
di Attualità
sulla Clinica
e Terapia
delle Infezioni
Fungine

Infezioni nel Paziente Critico

a cura di
Francesco G. De Rosa



Anno 3 • Numero 2 • 2015

Editorial Board

Chiara Adembri
Francesco Cristini
Valerio del Bono
Maurizio Sanguinetti

Coordinamento di Redazione

Francesco Giuseppe De Rosa
*Prof. Associato, Malattie Infettive
Vice-Direttore,
Dipartimento di Scienze Mediche
Università di Torino
Ospedale Amedeo di Savoia,
Corso Svizzera, 164 - 10149 Torino
E-mail: francescogiuseppe.derosa@unito.it*

Direttore Responsabile

Paolo E. Zoncada

Autorizzazione Tribunale di Milano
n. 27 del 30/01/2014

Editore

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDIMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali Srl
Divisione EDIMES
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382.526253 - Fax 0382.423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

SOMMARIO

- » **Editoriale** 3
Francesco Giuseppe De Rosa

- » **La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri: un drammatico problema di salute pubblica** 5
Francesco Luzzaro

- » **Clostridium difficile: l'emergenza epidemiologica, la sfida clinica, l'indicatore di performance** 19
Fabio Tumietto, Sara Tedeschi

- » **Candidemia e infezione da Clostridium difficile: esiste una correlazione? La disregolazione del microbiota umano come modello patogenetico di entrambe le affezioni** 39
Spinello Antinori

NORME REDAZIONALI

La rivista pubblica esclusivamente articoli su invito del board editoriale.

Il testo deve essere dattiloscritto e salvato in un file unico come documento .rtf o .doc, in doppio spazio e non deve eccedere il numero di cartelle assegnate, incluse le referenze bibliografiche, tabelle e figure.

La pagina del titolo deve contenere anche il nome dell'/gli autore/i, affiliazione e recapiti (telefono, fax, indirizzo e-mail).

Le voci bibliografiche devono essere citate nel testo con numero arabo progressivo ed ordinate nella bibliografia secondo l'ordine di citazione.

Lo stile delle citazioni deve essere conforme alle norme standard (Vancouver style).

Le abbreviazioni non standard devono essere spiegate in esteso alla prima citazione.

Le tabelle devono essere dattiloscritte ed inserite nel testo dopo la bibliografia, numerate con numeri arabi nell'ordine di citazione. Ogni tabella deve essere munita di relativa legenda esplicativa.

Le illustrazioni devono essere citate nel testo in ordine consecutivo con numeri arabi.

Le legende delle figure devono essere raggruppate ed inserite dopo le tabelle.

Le illustrazioni devono essere inserite nel testo in formato .jpeg o .tif e salvate ad alta risoluzione.

Servizio scientifico offerto alla Classe Medica da MSD Italia S.r.l.

Questa pubblicazione riflette i punti di vista e le esperienze degli autori e non necessariamente quelli della MSD S.r.l.

Ogni prodotto menzionato deve essere usato in accordo con il relativo riassunto delle caratteristiche del prodotto fornito dalla ditta produttrice.



© Copyright 2015

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES
Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo (compresi i microfilm e le copie fotostatiche) senza il permesso scritto dell'editore.

Editoriale

Francesco Giuseppe De Rosa

Professore Associato, Malattie Infettive, Vice-Direttore,
Dipartimento di Scienze Mediche Università di Torino
Dirigente Medico di Primo Livello, Ospedale Amedeo di Savoia

Le infezioni ospedaliere, opportunistiche e dell'immunocompromesso oggi si caratterizzano anche per un nuovo contesto patogenetico "endogeno" che abbiamo identificato con l'acronimo "CCC" (Carbapenemasi, *C. difficile* e *Candida spp.*) per identificare un comune substrato rappresentato dall'alterazione del microbioma intestinale causato da terapie antibiotiche, interventi chirurgici, immunosoppressione e degenza ospedaliera (1). La colonizzazione e le infezioni causate da batteri MDR "enteropatogeni" diventano sempre più frequenti e la diffusione di tali microrganismi è favorita dalla colonizzazione gastroenterica, da procedure di igiene non corrette, dalla contaminazione di superfici e oggetti inanimati e da terapie antibiotiche che agiscono come "danno collaterale" (2, 3).

Oggi siamo di fronte a nuovi aspetti microbiologici, epidemiologici, clinici e di controllo delle infezioni nosocomiali, tanto da richiedere un cambiamento dell'acronimo inizialmente proposto "ESKAPE", dove MDR *Klebsiella pneumoniae* fu inizialmente riconosciuta, ad "ESCAPE" dove tutte le Enterobacteriaceae, tutti gli Enterococchi ed il *C. difficile* hanno trovato giusta collocazione (4).

Il microbioma intestinale regola importanti funzioni fisiologiche e metaboliche e viene profondamente alterato con terapie antibiotiche, favorendo quindi la colonizzazione da parte di enterobatteri, enteropatogeni, *C. difficile* ed anche una crescita eccessiva di *Candida spp.* Ad esempio, nelle coliti da *C. difficile* c'è un chiaro ruolo patogenetico dell'alterazione del microbioma intestinale, suggerendo che simili alterazioni possano essere anche importanti nel favorire la colonizzazione da ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi (KPC-*Kp*) o un'eccessiva proliferazione di *Candida spp.* (1). Dal punto di vista clinico, sono già riportati casi di candidemia dopo infezioni gravi da *C. difficile* (5), casi di infezioni del torrente circolatorio da KPC-*Kp* associate con candidemia (6) ed infezioni del torrente circolatorio precoci o "health-care associate" (7, 8).

Sulla base di queste considerazioni, abbiamo proposto di utilizzare l'acronimo "CCC" per illustrare nuove sindromi enteropatogenetiche opportunistiche (9). Il tratto gastroenterico rappresenta un nodo centrale nel controllo

delle infezioni come espressione di un contenitore fisiopatologico per enterobatteri MDR ed enteropatogeni e *Candida spp.* Nei nostri intenti, il focus di un programma di controllo delle infezioni deve oggi focalizzarsi su una strategia “CCC”, diretta anche alla prevenzione dell’alterazione del microbioma intestinale per ridurre l’incidenza di infezioni da Enterobacteriacee produttrici di carbapenemasi, *C. difficile* e *Candida spp.*, mettendo sotto la filosofia dell’*antimicrobial stewardship* l’evidenza scientifica ottimamente sintetizzata nelle linee guida europee sul controllo delle infezioni da Gram-negativi (10).

In questo numero ci sono contributi significativi di prestigiosi Colleghi che prendono spunto dall’acronimo “CCC” per illustrare l’importanza delle sindromi enteropatogenetiche opportunistiche. La filosofia che ci guida è quella di riconoscere i pazienti a rischio di sindromi enteropatogenetiche opportunistiche sia per le opportune procedure di controllo delle infezioni sia per la condivisione di efficaci programmi di *antimicrobial stewardship*. *Save the tube!*

»» Bibliografia

1. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. *Clin Infect Dis*. 2015; 60: 1289-1290.
2. Weist K, Diaz Hogberg L. ECDC publishes 2013 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Euro Surveill*. 2014; 19 (46).
3. Paterson DL. “Collateral damage” from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*. 2004; 38 (Suppl. 4): 341-345.
4. Ritchie DJ, Alexander BT, Finnegan PM. New antimicrobial agents for use in the intensive care unit. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23: 665-681.
5. Guastalegname M, Russo A, Falcone M, Giuliano S, Venditti M. Candidemia subsequent to severe infection due to *Clostridium difficile*: is there a link? *Clin Infect Dis*. 2013; 57: 772-774.
6. Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Fligou F et al. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-*albicans* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 80: 227-232.
7. Corcione S, Cardellino CS, Calcagno A et al. Healthcare-associated *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing K. pneumoniae bloodstream infection: the time has come. *Clin Infect Dis*. 2014; 59: 321-322.
8. Giacobbe DR, Del Bono V, Marchese A, Viscoli C. Early carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: should we expand the screening? *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O1157-1158.
9. De Rosa FG, Corcione S, Raviolo S, Montrucchio C, Aldieri C, Pagani N, Di Perri G. Candidemia, and infections by *Clostridium difficile* and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: new enteropathogenetic opportunistic syndromes? *Infez Med*. 2015; 23: 105-116.
10. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 (Suppl. 1): 1-55.

La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri: un drammatico problema di salute pubblica

Francesco Luzzaro

Direttore S.C. Microbiologia e Virologia,
Azienda Ospedaliera della Provincia di Lecco

L'emergenza e la rapida diffusione di nuove resistenze batteriche in ospedale ed in comunità rappresentano attualmente un importante problema per la salute pubblica in quanto riducono, talora in maniera drammatica, l'armamentario terapeutico a disposizione del clinico (1). Tale evoluzione ha riguardato negli ultimi anni sia i batteri Gram-positivi che i batteri Gram-negativi, con la differenza che mentre per i primi le aziende farmaceutiche sono state finora in grado di sviluppare nuove molecole attive anche sui ceppi dotati di resistenze multiple, per i secondi gli antibiotici attivi sui ceppi multiresistenti sono attualmente molto pochi e quelli in fase di studio richiederanno ancora alcuni anni prima di essere disponibili per l'uso terapeutico (2).

Un ulteriore elemento di preoccupazione è rappresentato dal fatto che l'aumento della resistenza agli antibiotici nei Gram-negativi ha negli ultimi anni interessato non solo microrganismi classicamente considerati opportunisti quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (comunemente limitati alle aree di terapia intensiva) ma anche gli enterobatteri, la cui larga diffusione è in grado di produrre un impatto decisamente maggiore sia in ospedale che in ambito comunitario (3). Per quanto riguarda gli enterobatteri, in particolare, a partire dagli anni 2000 la situazione epidemiologica ha registrato un marcato aumento della resistenza a fluorochinoloni e cefalosporine a spettro esteso specialmente in *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Questo aumento, dovuto in gran parte alla diffusione epidemica di enzimi plasmidici trasferibili quali le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) (4-6), ha determinato necessariamente, anche se a volte in modo eccessivo ed inappropriato, un notevole aumento nell'uso dei carbapenemi, farmaci a spettro molto ampio ed estremamente maneggevoli verso

cui gli enterobatteri multiresistenti dimostravano allora una resistenza del tutto occasionale (7, 8). Questo diverso e più aggressivo approccio terapeutico è considerato la principale causa dell'aumento della resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri (9). Attualmente gli enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE) rappresentano senza dubbio il problema più rilevante e di maggiore preoccupazione per la salute pubblica in quanto la resistenza è spesso legata alla produzione di carbapenemasi, enzimi idrolizzanti codificati da geni spesso veicolati da plasmidi (come nel caso delle ESBL), e gli enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) sono in genere dotati di resistenze multiple associate che li rendono capaci di sostenere episodi epidemici di difficile trattamento (1).

»» La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende specie batteriche comunemente presenti nell'ambiente e per lo più residenti nell'intestino dell'uomo e della maggior parte degli animali. Attualmente se ne conoscono circa 40 generi e più di 150 specie ma di queste ultime solo una ventina sono importanti dal punto di vista clinico, fra cui più frequentemente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*. Con rare eccezioni (ad es. *Shigella* spp. e *Salmonella typhi*), gli enterobatteri fanno parte della normale popolazione microbica dell'organismo ma possono causare una vasta gamma di infezioni, più frequentemente infezioni delle vie urinarie, ma anche infezioni delle vie respiratorie e del sangue.

Dal punto di vista della resistenza, gli enterobatteri sono naturalmente sensibili ai carbapenemi (anche se le specie del genere *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* mostrano una scarsa sensibilità all'imipenem) ma possono acquisire resistenza essenzialmente mediante due meccanismi:

- la diminuzione della permeabilità della membrana esterna, causata dalla modificazione o dalla perdita dei canali porinici;
- la produzione di carbapenemasi, intendendo con tale termine qualsiasi beta-lattamasi in grado di idrolizzare i carbapenemi, cioè alcuni o tutti i carbapenemi commercialmente disponibili quali l'ertapenem, l'imipenem, il meropenem ed il doripenem.

La modificazione o la perdita dei canali porinici sono eventi di tipo mutazionale, non trasferibile, che possono determinare resistenza a uno o più carbapenemi quando il ceppo mutato produce contemporaneamente enzimi ad attività idrolitica sugli antibiotici beta-lattamici quali le ESBL o le beta-lattamasi di tipo AmpC (che di per sé non sono in grado di idrolizzare i carbapenemi). Particolarmente coinvolti in quest'ultimo meccanismo sono alcune specie microbiche quali *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*,

le cui AmpC cromosomiche sono inducibili e possono essere prodotte da questi microrganismi in grande quantità, mentre nel caso di *Klebsiella pneumoniae* la modificazione o la perdita di porine è in genere associata alla produzione di ESBL.

Per quanto riguarda le carbapenemasi, va ricordato che questi enzimi sono naturalmente presenti (resistenza naturale, intrinseca) in alcuni Gram-negativi non fermentanti di importanza clinica, quali *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes*, *Elizabethkingia meningoseptica*, e che anche *Acinetobacter baumannii* possiede un gene cromosomico (OXA-51) che codifica per una carbapenemasi, anche se questa non conferisce di base resistenza ai carbapenemi (10).

Negli enterobatteri, invece, la produzione di carbapenemasi è sempre acquisita e coinvolge enzimi appartenenti a 3 delle 4 famiglie di beta-lattamasi classificate da Ambler sulla base della loro struttura primaria (11): A, B e D. Le carbapenemasi di classe A includono gli enzimi di tipo SME, IMI, NMC, GES e, soprattutto KPC (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemasi). A differenza degli altri enzimi del gruppo, raramente riscontrati, le carbapenemasi di tipo KPC, riportate per la prima volta nel 2001 in un isolato clinico di *Klebsiella pneumoniae* ottenuto nel 1996 in North Carolina, hanno dimostrato una grande capacità di diffusione e isolati di *Klebsiella pneumoniae* produttori di KPC (KPC-KP) sono ormai presenti in tutti i continenti rappresentando uno dei principali problemi di salute pubblica (12). Ad oggi, si conoscono 20 varianti di KPC (www.lahey.org/studies), trovate anche, per quanto riguarda gli enterobatteri, in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter* spp. Gli enzimi di tipo KPC sono trasferibili e sono in genere in grado di idrolizzare con molta efficienza penicilline, cefalosporine e carbapenemi (anche se in alcuni casi l'efficienza idrolitica dei carbapenemi può essere di basso o moderato livello, cosa che può rendere difficoltosa la loro individuazione). Da un punto di vista terapeutico, gli isolati produttori di KPC risultano di difficile trattamento in quanto sono in genere resistenti anche a molti altri antibiotici, inclusi fluoroquinoloni ed aminoglicosidi, con l'eccezione della gentamicina che resta spesso attiva *in vitro* (questa caratteristica può essere utile per sospettarne la presenza a partire dal fenotipo). L'insieme di queste caratteristiche ha favorito la disseminazione a livello globale degli isolati produttori di KPC, in particolare di alcune linee clonali quali *Klebsiella pneumoniae* ST258.

Le carbapenemasi di classe B, note anche come metallo-beta-lattamasi (MBL) includono gli enzimi di tipo IMP (imipenemasi), VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lattamasi), e NDM (New Dheli metallo-beta-lattamasi). Le MBL idrolizzano quasi tutti i beta-lattamici (ad eccezione dell'aztreonam) con un meccanismo che dipende dalla presenza degli ioni zinco. In presenza di ceppi resistenti ai carbapenemi ma sensibili all'aztre-

onam si può quindi sospettare la presenza di MBL, ma spesso gli isolati produttori di MBL co-producono altri enzimi in grado di determinare resistenza all'aztreonam rendendo questa caratteristica fenotipica scarsamente utilizzabile nella pratica.

Gli enzimi di tipo IMP, identificati per la prima volta nel 1988 in *Pseudomonas aeruginosa* e, a partire dai primi anni '90, anche in diverse specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sono tuttora molto rari negli enterobatteri (9). Più frequente è invece il riscontro di enzimi di tipo VIM, prevalentemente in isolati di *Klebsiella pneumoniae*. Come nel caso delle IMP, VIM è stata identificata per la prima volta in *Pseudomonas aeruginosa* (Verona, 1997), ma la diffusione maggiore di questi enzimi ha poi riguardato gli enterobatteri. Con l'eccezione della Grecia (dove la diffusione è stata epidemica ed ha determinato un aumento della resistenza ai carbapenemi in *Klebsiella pneumoniae* già a partire dai primi anni '90), quasi ovunque gli enterobatteri produttori di enzimi di tipo VIM sono tuttavia rimasti isolamenti sporadici determinando in qualche caso piccoli episodi epidemici (9). Gli enzimi di tipo NDM, infine, sono stati identificati per la prima volta in Svezia nel 2008 in un isolato clinico di *Escherichia coli* (13). Il paziente da cui proveniva l'isolato era di origine indiana ed era stato precedentemente ricoverato in un ospedale di New Delhi (da qui la denominazione, anche perché le successive indagini epidemiologiche hanno poi dimostrato la presenza endemica di isolati produttori di NDM in India e in generale nel subcontinente indiano). Ad oggi, si conoscono 12 varianti dell'enzima (www.lahey.org/studies) che risulta diffuso prevalentemente in *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e si è rapidamente disseminato nelle regioni vicine alle aree endemiche, come la Cina ed il sud-est asiatico. Ceppi produttori di NDM risultano ormai comuni anche in Europa (specie nel Regno Unito e nei Balcani) e in Africa (compatibilmente con le scarse informazioni disponibili). Da un punto di vista epidemiologico, la disseminazione dei ceppi produttori di NDM è da considerare quindi ormai globale (14) e, come per le KPC, si caratterizza per il facile trasferimento tra specie e generi diversi (su base plasmidica) e per la resistenza associata a molti antibiotici (inclusi fluorochinoloni ed aminoglicosidi).

Le carbapenemasi di classe D includono alcuni enzimi di tipo OXA e sono caratterizzate da un più basso livello di efficienza idrolitica dei carbapenemi rispetto alle altre carbapenemasi. Fra gli enzimi di tipo OXA, la carbapenemasi OXA-48, identificata per la prima volta in Turchia nel 2003, ha dimostrato la maggior capacità di disseminazione legata a specifici meccanismi di trasferimento genetico ed alla difficoltà di identificare correttamente i ceppi produttori in rapporto ai bassi livelli di MIC per i carbapenemi. Un significativo aumento della prevalenza di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di OXA-48 è stato registrato in alcuni Paesi europei (Francia,

Spagna, Germania, Olanda) (9) e nei Paesi del Nord Africa (Marocco, Tunisia, Egitto) (15). Una variante dell'enzima OXA-48, la carbapenemasi OXA-181, è stata recentemente descritta in differenti aree geografiche, fra cui l'India (considerata una area endemica per questo enzima), le Americhe, Russia, Cina ed Australia, dimostrando un alto potenziale di diffusione di questa carbapenemasi (16, 17).

»» La diffusione degli enterobatteri produttori di carbapenemi in Italia

L'Italia è stato il primo Paese europeo a segnalare la presenza di carbapenemasi acquisite nei Gram-negativi. A partire dalla fine degli anni '90, in particolare, MBL di tipo VIM e IMP sono state dimostrate in batteri Gram-negativi non fermentanti (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter xylosoxidans*), mentre la prima segnalazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi risale a pochi anni dopo, con la descrizione di casi sporadici di *Klebsiella pneumoniae* e di *Enterobacter cloacae* produttori di VIM-4 (18). Negli anni successivi numerosi autori hanno riportato la presenza di enterobatteri produttori di MBL in Italia ma, a differenza di quanto osservato in Grecia nello stesso periodo, non si è avuta una ampia disseminazione di enterobatteri produttori di questi enzimi e la loro prevalenza complessiva è rimasta bassa (7). Lo stesso andamento si sta verificando più recentemente per gli enzimi di tipo NDM, il cui riscontro risulta limitato a casi sporadici o piccoli episodi epidemici (19, 20). Una evoluzione molto diversa si è invece verificata nel caso delle KPC. Dopo la prima descrizione di un isolato di *Klebsiella pneumoniae* produttore di KPC-2 nel novembre 2008 (probabilmente importato da Israele), gli isolati di KPC-KP sono andati incontro ad una rapida disseminazione a livello nazionale determinando episodi epidemici di grandi dimensioni e di difficile trattamento (21-24).

L'ampia diffusione di ceppi resistenti ai carbapenemi ha determinato una evidente variazione nella epidemiologia delle resistenze batteriche in questi microrganismi. Il sistema di sorveglianza europeo EARSS (denominato EARS-Net a partire dal 2009) ha evidenziato che la resistenza ai carbapenemi degli isolati invasivi di *Klebsiella pneumoniae* è rimasta inferiore al 2% negli anni 2006-2009 per poi aumentare progressivamente negli anni successivi fino ad arrivare al 34,3% nel 2013 (2010, 15,2%; 2011, 26,7%; 2012, 29,1%) (25). Valori simili di resistenza sono stati riportati dal sistema nazionale Micronet con un trend significativo di aumento tra il 2009 ed il 2012 (26).

La sorveglianza effettuata nel 2011 in 25 centri ospedalieri distribuiti a livello nazionale ha dimostrato che il problema della resistenza ai carbapene-

mi negli enterobatteri riguardava principalmente *Klebsiella pneumoniae* di origine nosocomiale (in questo ambito la resistenza ai carbapenemi era pari al 16,3% vs 2,4% nei pazienti ambulatoriali) e che il meccanismo alla base di tale resistenza era rappresentato nella maggior parte dei casi dalla produzione di carbapenemasi di tipo KPC (27). Enzimi di tipo KPC sono stati trovati in 21/25 centri partecipanti dimostrando una diffusione endemica degli isolati produttori. In rari casi sono stati osservati isolati produttori di altre carbapenemasi quali VIM-1 e OXA-48, mentre in nessun caso sono stati riscontrati enzimi di tipo NDM. La maggior parte degli isolati di KPC-KP apparteneva al complesso clonale 258 (che include ST258 e ST512) mentre una minoranza dei casi era rappresentata da ceppi ST101, caratterizzati dalla variante enzimatica KPC-2. La variante KPC-3 è stata invece identificata negli isolati ST512 mentre entrambe le varianti erano presenti negli isolati ST258. Per quanto riguarda la distribuzione ospedaliera, il 42,5% degli isolati di KPC-KP proveniva da unità di terapia intensiva, mentre il 32,4% ed il 21,5% proveniva, rispettivamente, da reparti medici e chirurgici. È da segnalare che il materiale di provenienza era prevalentemente rappresentato dal sangue (22,3%), seguito da campioni del tratto respiratorio (18,3%) e dalle urine (14,4%), a dimostrazione del notevole potenziale invasivo di tali ceppi. I test di sensibilità *in vitro* hanno dimostrato che il 22,4% degli isolati di KPC-KP era resistente alla colistina mentre il 20,9% ed il 15,8% degli isolati non erano sensibili, rispettivamente, alla tigeciclina ed alla gentamicina.

»» La diagnostica degli enterobatteri resistenti ai carbapenemi: sospetto e conferma della produzione di carbapenemasi

La produzione di carbapenemasi andrebbe sospettata, in linea teorica, in tutti gli enterobatteri per i quali le concentrazioni minime inibenti (MIC) dei carbapenemi (ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem) risultano superiori ai rispettivi cut-off epidemiologici della specie corrispondente, quindi dovrebbe essere definite specifiche soglie per ogni specie appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Nella pratica, è attualmente adeguato sospettare la produzione di carbapenemasi in presenza di una ridotta sensibilità al meropenem (MIC $\geq 0,5$ mg/L, diametro dell'alone di inibizione ≤ 25 mm) (28). Qualora il meropenem non venga saggiato, può essere considerato indicativo lo stesso valore di MIC per l'imipenem, con l'eccezione di *Proteus spp.*, *Morganella morganii* e *Providencia spp.* Queste specie batteriche rappresentano un bersaglio "povero" per l'imipenem e sulla base dei criteri europei EUCAST non è raccomandato valutare la loro sensibilità a questa molecola. Qualora si ritenga di utilizzare come indicatore l'erta-

penem si deve tener conto che aumenta la sensibilità del test di screening a scapito della riduzione della specificità.

La conferma della produzione di carbapenemasi negli enterobatteri (e l'identificazione delle principali famiglie di enzimi) può essere condotta nell'attività diagnostica di routine mediante metodi fenotipici, basati su:

- a) test di sinergia con acido boronico;
- b) test di sinergia con EDTA o, preferibilmente, acido dipicolinico;
- c) test di Hodge.

Il test di sinergia con acido boronico si basa sul potenziamento dell'azione dei carbapenemi in presenza di tale inibitore. La presenza di sinergia è indicativa della produzione di KPC o, più raramente, di altre carbapenemasi di classe molecolare A. Un test positivo è molto significativo nel caso di *Klebsiella pneumoniae*, mentre risultati falsamente positivi possono essere osservati con specie che producono beta-lattamasi AmpC cromosomiche (ad es., *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*) o plasmidiche, in quanto l'acido boronico è in grado di inibire anche questi enzimi.

Il test di sinergia con EDTA o, preferibilmente, con acido dipicolinico si basa sul potenziamento dell'azione dei carbapenemi in presenza di tali inibitori. In questo caso la presenza di sinergia indica la produzione di metallo-beta-lattamasi (classe molecolare B di Ambler).

Il test di sinergia va valutato attentamente tenendo presente che sia l'acido dipicolinico che l'EDTA possiedono una certa tossicità intrinseca e possono causare lievi aumenti dell'alone di inibizione anche in assenza di metallo-beta-lattamasi.

Il test di Hodge si basa sulla riduzione dell'attività dei carbapenemi nei confronti di un ceppo indicatore sensibile e, in caso di positività, è indicativo della produzione di carbapenemasi da parte del microrganismo in esame (29). Il test di Hodge mette in evidenza la presenza di attività carbapenemasi ma non permette la distinzione fra carbapenemasi appartenenti alle diverse classi. Il test, inoltre, è difficilmente standardizzabile e richiede un certo grado di esperienza in quanto l'interpretazione dipende fortemente dal giudizio dell'operatore (30). La maggiore utilità del test si ha quando si sospetta la produzione di carbapenemasi ma i test di sinergia con gli inibitori specifici hanno dato un risultato negativo (come ad esempio nel caso di produzione di carbapenemasi di tipo OXA-48).

Complessivamente, i test fenotipici permettono una corretta conferma della produzione di carbapenemasi nella quasi totalità dei casi e possono essere eseguiti nella maggior parte dei laboratori di microbiologia. Attualmente, inoltre, sono disponibili numerosi sistemi in grado di fornire la conferma molecolare della produzione di carbapenemasi distinguendo anche le principali famiglie di enzimi. Una analisi più approfondita che preveda l'iden-

tificazione di geni codificanti per enzimi di raro riscontro o della variante enzimatica in causa va riservata a casi particolari e deve essere eseguita in centri qualificati.

»» Sorveglianza e controllo della diffusione degli enterobatteri resistenti ai carbapenemi

La sorveglianza ed il controllo della diffusione di microrganismi dotati di resistenza multipla agli antibiotici rappresentano elementi essenziali nella gestione delle infezioni in ospedale. Nel caso degli enterobatteri produttori di carbapenemasi, e in particolare degli isolati di KPC-KP, la grande capacità di diffondere rapidamente e di causare episodi epidemici di grandi dimensioni così come la capacità di colonizzare l'intestino per lunghi periodi di tempo hanno reso più stringente la necessità di corrette misure igieniche, richiedendo al contempo la revisione e l'aggiornamento delle modalità di sorveglianza e controllo per adeguarle alla mutata realtà epidemiologica.

Tale discorso riguarda in particolare l'Italia, dove gli enterobatteri produttori di carbapenemasi sono presenti in modo endemico, classificato come livello 5 (cioè il livello più elevato), mentre Francia e Germania si trovano da anni a livello 3 (diffusione regionale) e l'Olanda a livello 2b (epidemie ospedaliere sporadiche) (31).

In questo contesto identificare i pazienti colonizzati è una necessità largamente condivisa e rappresenta un passo importante nel controllo e nella prevenzione della diffusione di questi germi (32). Lo screening dei pazienti può essere efficacemente effettuato mediante esame colturale di un campione prelevato con tampone in sede rettale, pur essendovi la possibilità di colonizzazione anche a livello orale, respiratorio, urinario. A tale riguardo, l'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) ha fornito da tempo specifiche indicazioni per la ricerca dei pazienti colonizzati a livello intestinale, con particolare riguardo alle tecniche disponibili ed alle modalità di lettura e di interpretazione dei test (33). La ricerca di CPE può essere effettuata mediante esame colturale su agar di MacConkey con aggiunta di dischetti di carbapenemi e/o mediante specifici terreni cromogeni. L'uso di tecniche molecolari va invece preso in considerazione quando è necessario un esame più rapido, compatibilmente con i costi e con i limiti intrinseci a tutti i sistemi molecolari, in grado di identificare ciò che è già noto e non eventuali nuovi determinanti di resistenza.

La selezione dei pazienti da sottoporre allo screening così come la frequenza con cui lo screening va eseguito possono variare a seconda del programma di sorveglianza adottato, in funzione dei diversi contesti epidemiologici e organizzativi. In linea generale, all'ingresso in ospedale, vanno sottoposti a test di screening mediante tampone rettale i pazienti già noti come po-

sitivi, quelli considerati ad alto rischio (dializzati, oncologici, trapiantati, ricoverati in terapia intensiva) o provenienti da strutture ad alta prevalenza (residenze sanitarie assistite, istituti riabilitativi, unità di terapia intensiva), e quelli recentemente sottoposti a terapie con antibiotici a largo spettro quali fluorochinoloni e carbapenemi (34).

Qualora si sospetti la presenza di isolati produttori di carbapenemasi (test di screening positivo) l'informazione deve essere rapidamente fornita al reparto (senza attendere l'esito dei test fenotipici e/o molecolari di conferma) al fine di implementare immediatamente le precauzioni da contatto a scopo cautelativo.

Nel caso in cui la produzione di carbapenemasi è confermata, è preferibile provvedere all'isolamento del paziente (colonizzato o infetto) in stanza singola, misura che insieme alle precauzioni da contatto si è dimostrata efficace nel permettere il contenimento della diffusione dei ceppi produttori di carbapenemasi (35).

Se non è possibile mettere in atto l'isolamento strutturale, le precauzioni da contatto vanno affiancate da un isolamento di tipo funzionale individuando un'area delimitata all'interno di una stanza e potenziando l'igiene ambientale per contrastare la contaminazione ambientale. Nel caso fossero presenti più portatori di CPE, questi possono essere raggruppati in un'area delimitata del reparto (isolamento per coorte), utilizzando per questi pazienti, ove possibile, personale dedicato. Accanto a queste procedure, rivolte ad evitare la trasmissione dal paziente colonizzato/infetto, è inoltre raccomandato applicare per tutta la durata della ospedalizzazione un sistema di sorveglianza attiva mediante l'esecuzione settimanale di tamponi rettali per la ricerca di CPE nei pazienti assistiti dalla stessa equipe sanitaria (36).

Nei pazienti colonizzati/infetti occorre proseguire la sorveglianza microbiologica per l'intera durata del ricovero e, in linea generale, le precauzioni da contatto devono essere mantenute per tutta la durata della degenza, anche in presenza di tre colture di sorveglianza (mediante tampone rettale) consecutivamente negative. Gli enterobatteri produttori di carbapenemasi possono persistere a livello intestinale per molti mesi (37, 38) e alcune recenti esperienze hanno messo in evidenza i limiti delle colture seriali di sorveglianza nel predire la fine della colonizzazione intestinale nel paziente portatore di CPE (39).

Un corretto approccio terapeutico è parte integrante delle misure di controllo delle infezioni da CPE e deve essere riservato esclusivamente al trattamento delle infezioni (escludendo quindi la mera colonizzazione che non richiede di norma alcun trattamento antibiotico). I farmaci di riferimento sono rappresentati in generale da colistina, tigeciclina e meropenem. L'uso estensivo della terapia di combinazione è ancora dibattuto così come la scelta ottimale degli antibiotici. Tenendo conto della elevata mortalità correlata alle infe-

zioni da CPE, tuttavia, un trattamento antibiotico di associazione con due o tre farmaci e l'uso di dosaggi elevati appaiono una condizione obbligata, almeno nelle infezioni gravi (40, 41). La scelta dei farmaci può invece variare sulla base del sito di infezione, dell'antibiogramma (inclusa la valutazione delle MIC), delle condizioni generali del paziente e del suo specifico quadro clinico. La colistina rappresenta il componente più frequentemente presente negli schemi di combinazione efficaci presumibilmente in quanto agisce aumentando la permeabilità della parete batterica esterna verso gli altri farmaci (42). Le combinazioni più frequentemente prescritte includono: colistina/tigeciclina, colistina/carbapenemico, colistina/aminoglicoside e carbapenemico/aminoglicoside (43). La fosfomicina può rappresentare una opzione per i ceppi resistenti alla colistina (44), mentre un trattamento con 3 farmaci, basato sull'uso di colistina, meropenem e tigeciclina, è stato proposto sulla base di una elevata percentuale di sopravvivenza (85,7%) riscontrata in pazienti con infezioni del torrente circolatorio (40).

»» Discussione e conclusioni

La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri rappresenta un drammatico problema di salute pubblica a livello globale, in considerazione della grande capacità dimostrata da tali microrganismi di diffondersi causando episodi epidemici di difficile trattamento e caratterizzati da elevata mortalità. In Italia, il problema è particolarmente importante e una recente indagine nazionale ha dimostrato un aumento della prevalenza di CPE anche in ambito comunitario (45). Tale evoluzione risulta molto preoccupante, specie se si considera che questi microrganismi tendono a colonizzare l'intestino umano dove sono in grado di persistere per lunghi periodi di tempo rappresentando un fattore di rischio per successive infezioni (46, 47). A questo riguardo, poco è noto sulle interazioni tra la presenza di CPE a livello intestinale e altre patologie. Uno studio retrospettivo condotto in pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva in Grecia ha mostrato come la colonizzazione intestinale da parte di KPC-KP fosse associata allo sviluppo di candidemia e all'isolamento di *Candida* (in particolare non-*albicans*) (48).

Negli ultimi anni sono state proposte procedure per la decolonizzazione intestinale mediante la somministrazione per via orale di farmaci come gentamicina e colistina, che non vengono assorbiti a livello intestinale (49-51). I risultati di tale approccio sono stati positivi ma questa pratica rimane al momento una opzione controversa per il possibile sviluppo di resistenze, da prendere eventualmente in considerazione per categorie selezionate di pazienti a rischio (trapiantati, soggetti immunocompromessi in attesa di chemioterapia, pazienti che richiedono interventi di chirurgia maggiore a livello intestinale). Positivi sono stati anche i primi risultati ottenuti con il

trapianto di microbiota fecale per decolonizzare l'intestino da enterobatteri ed altri microrganismi multiresistenti (52, 53). Anche in questo caso, tuttavia, la procedura (mutuata da quella utilizzata per il trattamento delle infezioni ricorrenti o severe causate da *Clostridium difficile*), pur essendo molto promettente, rappresenta attualmente una opzione da considerare in casi selezionati.

In questo contesto, una strategia basata sull'adozione di programmi di sorveglianza, controllo delle infezioni e *antimicrobial stewardship*, che si è già dimostrata efficace nel contenere la diffusione epidemica di CPE (54), appare una scelta obbligata per ridurre la pressione selettiva sui pochi antibiotici attivi sugli isolati multiresistenti e per contrastare la diffusione epidemica di cloni ad alto rischio, in grado di resistere a tutti gli antibiotici disponibili in commercio.

» Bibliografia

1. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol.* 2014; 18: 56-60.
2. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin Jr DK, et al. 10 x '20 Progress-development of new drugs active against Gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 1685-1694.
3. Savard P, Perl TM. A call for action: managing the emergence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae in the acute care settings. *Curr Opin Infect Dis.* 2012; 25: 371-377.
4. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, et al. Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1659-1664.
5. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 165-174.
6. Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(Suppl. 1): 144-153.
7. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, et al. First countrywide survey of acquired metallo- β -lactamases in Gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 4023-4029.
8. Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, et al. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 69: 363-369.
9. Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 413-431.
10. Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 258: 72-77.
11. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289: 321-331.
12. De Rosa FG, Corcione S, Cavallo R, et al. Critical issues for Klebsiella pneumoniae KPC-carbapenemase-producing K. pneumoniae infections: a critical agenda. *Future Microbiol.* 2015; 10: 283-294.

13. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 597-602.
14. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 499-513.
15. Manenzhe RI, Zar HJ, Nicol MP, Kaba M. The spread of carbapenemase-producing bacteria in Africa: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 23-40.
16. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm. *Trends Mol Med.* 2012; 18: 263-272.
17. Liu Y, Feng Y, Wu W, et al. First report of OXA-181-producing *Escherichia coli* in China and characterization of the isolate using whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 5022-5025.
18. Luzzaro F, Docquier J-D, Colinson C, et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 648-650.
19. D'Andrea MM, Venturelli C, Giani T, et al. Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2755-2758.
20. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, et al. Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16: pii=20027.
21. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 producing KPC-3 carbapenemase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 47: 3793-3794.
22. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Res Notes.* 2010; 3: 40.
23. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March - 30 September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16(8): pii=19800.
24. Mezzatesta M, Gona F, Caio C, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 1444-1447.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014.
26. Sisto A, D'Ancona F, Meledandri M, et al. Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from Micronet network hospitals, Italy, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17(33): pii=20247.
27. Giani T, Pini B, Arena F, et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill.* 2013; 18(22): pii=20489.
28. Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). Indicazioni per la conferma fenotipica della produzione di carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae. 2012. Scaricabile al sito HYPERLINK "<http://www.amcli.it>" <http://www.amcli.it>.
29. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012; Document M100-S22: 54-62.
30. Carvalhaes CG, Renata CP, Nicoletti AG, et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 249-251.

31. Glasner C, Albiger B, Buist G, et al. The European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Entero-bacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries. *Euro Surveill.* 2013; 18(28): pii=20525.
32. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 102-111.
33. Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). Indicazioni per lo screening dei pazienti colonizzati da Enterobatteri produttori di carbapenemasi. 2012. Scaricabile al sito HYPERLINK “<http://www.amcli.it>” <http://www.amcli.it>.
34. Tumbarello M, Trecarichi EM, Tumietto F, et al. Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 3514-3520.
35. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 848-855.
36. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(Suppl. 1): 1-55.
37. Weintrob AC, Roediger MP, Barber M, et al. Natural history of colonization with Gram-negative multidrug-resistant organisms among hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31: 330-337.
38. Zimmerman FS, Assous MV, Bdolah-Abram T, et al. Duration of carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae following hospital discharge. *Am J Infect Control.* 2013; 41: 190-194.
39. Lewis JD, Enfield KB, Mathers AJ, et al. The limits of serial surveillance cultures in predicting clearance of colonization with carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015; 36: 835-837.
40. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: 943-950.
41. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 2108-2113.
42. Rahal JJ. Antimicrobial resistance among and therapeutic options against gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(Suppl. 1): S4-10.
43. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015; 277: 501-512.
44. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 52-59.
45. Luzzaro F, Mauri C, Giani T, et al. Enterobacteriaceae producing ESBLs, AmpCs, and carbapenemases emerging among outpatients, Italy. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, September 5-9, 2014.
46. Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Am J Infect Control.* 2012; 40: 421-425.

47. Giannella M, Treçarichi EM, De Rosa FG, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 1357-1362.
48. Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Fligou F, et al. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-albicans species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 80: 227-232.
49. Aidel-Odes L, Polachek H, Peled N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012; 33:14-19.
50. Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, et al. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: a prospective controlled trial. *Am J Infect Control.* 2013; 41: 1167-1172.
51. Tascini C, Sbrana F, Flammini S, et al. Oral gentamicin gut decontamination for prevention of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: relevance of concomitant systemic antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 1972-1976.
52. Crum-Cianflone NF, Sullivan E, Ballon-Landa G. Fecal microbiota transplantation and successful resolution of multidrug-resistant-organism colonization. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1986-1989.
53. Lagier J-C, Million M, Fournier P-E, et al. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect.* 2015; 90: 173-174.
54. Schwaber MJ, Carmeli Y. An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis.* 2014; 58: 697-703.

Clostridium difficile: l'emergenza epidemiologica, la sfida clinica, l'indicatore di performance

Fabio Tumietto^{1,2}, Sara Tedeschi¹

¹Clinica Malattie Infettive;

²Responsabile Programma Aziendale "Epidemiologia e Controllo del Rischio Infettivo Correlato alle Organizzazioni Sanitarie", Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna

L'infezione da *Clostridium difficile* (CD) rappresenta una delle più comuni infezioni nosocomiali ed è sempre più frequentemente riconosciuta come causa di aumentate morbilità e mortalità fra i soggetti adulto-anziani ospedalizzati.

L'infezione da CD è presente nel 20-30% dei casi di diarrea, nel 50-75% di quelli di colite, e in oltre il 90% di quelli di colite pseudomembranosa associate ad antibiotici.

Dopo acquisizione esogena, CD è, infatti, in grado di colonizzare il tratto gastrointestinale dei soggetti la cui flora batterica è stata alterata (da terapia antibiotica) e può determinare uno spettro di manifestazioni cliniche che vanno dalla colonizzazione asintomatica a quadri fulminanti di megacolon tossico. Questa è una rassegna focalizzata sui principali cambiamenti epidemiologici, le nuove acquisizioni in ambito terapeutico e la proposta di strategie efficaci per il controllo della diffusione della malattia negli ospedali.

Microbiologia

Clostridium difficile è un bacillo anaerobio Gram positivo, sporigeno, che produce tossine.

La forma vegetativa del batterio è presente nel colon; al di fuori di questo ambiente il batterio sopravvive sotto forma di spore, eliminate con le feci, in grado di resistere al calore, al pH acido e agli antibiotici. Una volta raggiunto il colon le spore germinano nella forma vegetativa, in grado di produrre tossine, di esercitare il potere patogeno e suscettibile agli antibiotici.

CD è stato descritto per la prima volta nel 1935, come componente normale della flora microbica intestinale del neonato. Il suo ruolo patogeno è stato

evidenziato negli anni '70, quando le tossine prodotte sono state identificate nelle feci di soggetti affetti da colite pseudomembranosa associata agli antibiotici (1, 2).

CD non è un batterio enteroinvasivo e l'insorgenza di diarrea e colite sono mediate dalla produzione di due potenti tossine: la tossina A (enterotossina) e la tossina B (citotossina). Le tossine A e B esercitano il loro ruolo patogenetico a livello intracellulare, inducendo apoptosi e determinano inoltre, rottura delle *tight junctions* fra le cellule. La tossina B è circa 10 volte più potente della tossina A nell'indurre danno mucosale ed è fondamentale per il ruolo patogenetico anche se i recettori per la tossina B sulle cellule della mucosa del colon non sono ancora stati identificati. La quantità di tossine a livello delle feci correla, *in vivo*, con la severità delle manifestazioni cliniche. La tossina A causa infiammazione che determina secrezione di fluidi e danno della mucosa e attiva direttamente i neutrofil; entrambe le tossine promuovono la chemiotassi dei neutrofil verso le pseudomembrane e la mucosa sottostante. Una piccola parte dei ceppi di *C. difficile* risulta non tossigeno; può colonizzare il tratto intestinale ma non è patogeno (3). A partire dai primi anni 2000 è stato identificato un ceppo ipervirulento di CD, denominato NAP 1/BI/027, che presenta alcune caratteristiche peculiari:

- 1) produce maggiori quantità di tossine A e B rispetto ad altri ceppi, probabilmente anche a causa di una delezione parziale nella regione del genoma che codifica per *down-regulation* della produzione di tossine;
- 2) produce, oltre alle classiche tossine A e B, anche una tossina binaria;
- 3) è resistente *in vitro* ai fluorochinoloni.

L'infezione sostenuta da tale ceppo si associa a minori percentuali di cura, maggiori percentuali di recidiva, malattia severa con *outcome* peggiore rispetto ai ceppi non 027 (4, 5).

»» Patogenesi

Nella patogenesi dell'infezione da CD è implicato un processo in tre fasi:

- 1) Alterazione della flora microbica intestinale, causato più spesso da terapia antibiotica, più raramente da altri eventi come ad esempio chemioterapia antineoplastica;
- 2) Acquisizione esogena di un ceppo di CD produttore di tossine;
- 3) Sviluppo della malattia.

Le interazioni patogeno-ospite sono molto importanti nella patogenesi dell'infezione da CD. La risposta anticorpale nei confronti delle tossine rappresenta il principale meccanismo dell'ospite per fronteggiare l'infezione da CD.

I portatori asintomatici di CD presentano più alti livelli di anticorpi anti-tossina A di tipo IgG rispetto ai pazienti che presentano diarrea. Inoltre è stato dimostrato che montare una risposta anticorpale durante un episodio di infezione da *C. difficile* si associava ad una relativa protezione nei confronti di recidive.

Livelli elevati di IL-8 sembrano correlati ad una minore risposta anticorpale nei confronti della tossina A ed aumentata suscettibilità a sviluppare diarrea associata a CD.

La mancanza dei recettori intestinali per le tossine di CD, inoltre, può essere protettiva nei confronti dello sviluppo di infezione clinicamente significativa. Tale osservazione deriva da modelli animali, tuttavia potrebbe spiegare il fatto che fra i neonati esista una percentuale molto più elevata che fra gli adulti (fino al 50%) di portatori asintomatici pur in presenza di elevati livelli di tossine nelle feci.

Infine, la colonizzazione con ceppi non tossigeni di CD, offre protezione nei confronti della malattia, suggerendo che il primo ceppo colonizzante iniziale potrebbe occupare una nicchia microbica e diventare così protettivo nei confronti di una superinfezione con un altro ceppo di CD (3, 6).

►► Manifestazioni cliniche

La manifestazione classica dell'infezione da CD è la diarrea acquosa, ma il microorganismo può causare una serie di condizioni variabili dallo stato di portatore asintomatico a quadri fulminanti di megacolon tossico. Alla base di questo spettro di manifestazioni cliniche vi sono probabilmente complessi meccanismi di interazione patogeno-ospite.

Si stima che i portatori asintomatici rappresentino il 20% dei soggetti adulti ospedalizzati, percentuale che sale fino al 50% fra coloro che sono residenti in residenze sanitarie assistenziali. Questi soggetti, rappresentano un importante *reservoir* per la trasmissione dell'infezione in ambito nosocomiale poiché, in quanto asintomatici, non possono essere individuati facilmente (7).

Diarrea con colite

La diarrea con colite è la manifestazione più frequente dell'infezione da CD (*C. difficile* associated diarrhea: CDAD). I segni e sintomi tipici sono diarrea acquosa fino a 10-15 scariche al giorno, dolore addominale crampiforme, febbre e leucocitosi. In genere, la TC >38,5°C è un segno di infezione severa. La leucocitosi è un segno molto comune (nei pazienti con CDAD sono riportati valori di conta leucocitaria mediamente attorno a 15,000 cellule/mm³); una leucocitosi inspiegata in un paziente ospedalizzato, anche in assenza di diarrea, può essere espressione di infezione da CD e in questi casi, generalmente, la diarrea compare entro i due giorni successivi. In uno studio

prospettico condotto su 60 pazienti con leucocitosi inspiegata, la ricerca di tossina di CD su feci è risultata positiva nel 53% dei casi.

Tali segni compaiono generalmente in corso di terapia antibiotica, ma anche 5-10 giorni dopo la sospensione della stessa. I farmaci implicati più frequentemente sono fluorochinoloni, clindamicina, cefalosporine e penicilline; tuttavia qualsiasi tipo di antibiotico può predisporre all'infezione da CD (8).

Colite pseudomembranosa

La colite pseudomembranosa può essere indistinguibile da quanto descritto sopra dal punto di vista delle manifestazioni cliniche. Tuttavia, alla colonscopia, si evidenziano pseudomembrane, reperto che viene ritenuto sufficiente a formulare diagnosi presuntiva di colite da CD anche in assenza di dati microbiologici. Le alterazioni cellulari prodotte dalle tossine di CD producono delle ulcerazioni della mucosa del colon, con conseguente rilascio di proteine, muco e cellule infiammatorie che vanno a costituire le pseudomembrane. Esse appaiono come placche rilevate di colorito giallo-biancastro, di diametro fino a 2 cm, che possono apparire confluenti, fino a ricoprire praticamente tutta la mucosa, oppure separate da tratti di mucosa macroscopicamente normale o che presenta aspetti di edema, eritema, fragilità e infiammazione. Secondo la classificazione istopatologica si riconoscono tre tipi di colite pseudomembranosa:

- Tipo 1: è la forma più lieve, in cui le alterazioni infiammatorie restano confinate a livello dell'epitelio superficiale e della lamina propria; le tipiche pseudomembrane sono presenti insieme ad occasionali ascessi delle cripte;
- Tipo 2: prevede aspetti di infiammazione più severa che coinvolge anche la lamina basale, con abbondante secrezione mucinosa;
- Tipo 3: è la forma più grave, caratterizzata da necrosi a tutto spessore della mucosa con pseudomembrane confluenti.

La colite fulminante è la manifestazione più grave dell'infezione da CD. Si manifesta clinicamente con dolore e distensione addominale, febbre, ipovolemia, acidosi e severa leucocitosi. La diarrea può essere meno importante che nelle forme di colite semplice, per l'instaurarsi di un quadro di ileo paralitico con ristagno delle secrezioni. Ulteriori possibili complicanze di questo quadro sono il megacolon tossico (dilatazione del colon oltre 7 cm di diametro accompagnato da gravi sintomi sistemici) e la perforazione (8).

Infezione ricorrente

Una percentuale variabile fra il 10 e il 25% dei soggetti trattati con successo per un primo episodio di infezione da CD, presenta una ricorrenza dei sin-

tomi dovuta o a una ricaduta dell'infezione iniziale (più frequente) o a una reinfezione. Ogni paziente può presentare uno o più episodi di infezione ricorrente, che possono presentare o meno la stessa gravità clinica dell'episodio iniziale. Le infezioni ricorrenti da CD rappresentano un problema clinico ben definito, che prevede un approccio terapeutico *ad hoc*.

»» Epidemiologia

La diarrea associata alla terapia antibiotica è ben conosciuta fino da quando gli antibiotici sono stati introdotti nella pratica clinica. Solo nel 1978 però, CD è stato identificato come l'agente eziologico della maggior parte dei casi. I primi casi di diarrea associata a CD sono stati descritti in relazione all'utilizzo di clindamicina, ma successivamente anche il ruolo di penicilline e cefalosporine è diventato progressivamente più significativo.

I dati più esaurienti sull'epidemiologia delle infezioni da CD derivano da studi condotti negli Stati Uniti (9, 10).

Si stima che nel 2011, negli Stati Uniti, si siano verificati 453.000 casi di infezione da CD: 83.000 rappresentavano la prima ricorrenza e 29.300 pazienti sono deceduti (mortalità 6,5%). L'incidenza è risultata maggiore nelle donne, nei soggetti caucasici e in quelli di età ≥ 65 anni.

I dati relativi al contesto europeo purtroppo sono meno esaurienti, anche a causa di una grande difformità gestionale nei vari stati per quanto riguarda l'attenzione alla patologia, le metodiche diagnostiche e le modalità di segnalazione e controllo dell'infezione. Secondo una *survey* condotta nel novembre 2008 e pubblicata nel 2011 in Europa, l'incidenza di CDAD è risultata estremamente variabile fra i vari centri partecipanti (media ponderata, 4,1 per 10.000 giorni paziente, *range* 0,0-36,3) e i casi di infezione si sono manifestati soprattutto in soggetti con un profilo di rischio ben definito (anziani, con comorbidità e recente uso di antibiotici) (11).

In termini generali si può affermare che l'epidemiologia dell'infezione da CD ha presentato una importante modifica a partire dai primi anni 2000, quando si sono iniziati ad osservare casi di infezione da CD più frequenti, più severi, che rispondevano peggio ai trattamenti standard e con maggior propensione a recidivare. Questi casi sono stati osservati in Nord America e Europa ed attribuiti ad un nuovo ceppo, identificato come NAP1/BI/027, più virulento di quelli incontrati in precedenza, la cui emergenza si associava all'utilizzo di fluorochinoloni.

I primi casi sono stati descritti in Canada, nella regione del Quebec. Un primo studio retrospettivo ha dimostrato che nel 2003 l'incidenza di CDAD era aumentata di quattro volte rispetto al 1991, di dieci volte nei soggetti di età superiore ai 65 anni. Inoltre, fra i soggetti ospedalizzati, l'incidenza era aumentata da 3 a 12/1.000 persone, da 25 a 43/1.000 persone dal 2003 al

2004 (12). Durante questo *outbreak* la percentuale di pazienti che richiedevano ricovero in terapia intensiva era del 10%; una colectomia d'urgenza era necessaria nel 2,5% dei casi con mortalità complessiva del 16% (13). Contemporaneamente i CDC riportavano, negli Stati Uniti, un aumento dell'incidenza e della gravità clinica di CDAD. Successivamente *outbreaks* sostenuti dallo stesso ceppo sono stati descritti anche in Europa.

A partire dal 2005 in Olanda è stato descritto un ulteriore ribotipo, lo 078, che causa malattia con caratteristiche di gravità clinica simili a quelle del ribotipo 027, ma interessa spesso soggetti più giovani che acquisiscono l'infezione in comunità (14).

L'epidemiologia dell'infezione da CD all'interno delle strutture sanitarie appare variabile e in continua evoluzione. In uno studio longitudinale è stato determinato che la popolazione prevalente nel corso degli *outbreaks* variava, probabilmente a causa dell'introduzione di nuovi ceppi da parte di nuovi pazienti che via via accedevano alle strutture.

L'infezione da CD è classicamente identificata come infezione nosocomiale, tuttavia recentemente è emerso che un numero non trascurabile di casi risulta acquisito in comunità, identificando con questo termine le forme di infezione da CD che insorgono in soggetti che non siano stati ospedalizzati nel corso dell'anno precedente la diagnosi.

Anche per questo tipo di infezione i dati epidemiologici più esaustivi derivano da studi condotti negli Stati Uniti. Dal 1991 al 2005 l'incidenza di questo tipo di infezione è aumentata esponenzialmente, fino ad arrivare al 41% delle forme di CDAD. I pazienti con forma comunitaria sono più giovani, con meno comorbidità, più frequentemente di sesso femminile e, rispetto a quelli che acquisiscono infezione nosocomiale, meno spesso hanno ricevuto terapia antibiotica e inibitori di pompa protonica (15).

Complessivamente le infezioni acquisite in comunità presentano meno spesso un decorso severo (20% vs 31%) ma il rischio di forma ricorrente non è diverso. È stato ipotizzato un ruolo degli animali nella trasmissione di questo tipo di infezioni ma mancano dati definitivi.

Alla luce di questi riscontri, comunque, è importante considerare CD fra le diagnosi differenziali dei pazienti con diarrea, anche se non sono stati ospedalizzati o non hanno ricevuto antibiotici.

Infezione nosocomiale

L'incidenza delle forme nosocomiali di CDAD negli Stati Uniti è aumentata da 31 a 61 casi su 100.000 pazienti fra il 1996 e il 2003, in particolare fra i pazienti di età >65 anni (228/100.000) (16). La mortalità attribuibile è stata stimata, in uno studio canadese, essere passata da 1,5% a 5,7% fra il 1997 e il 2005 (17).

Si stima che il 3% degli adulti sani sia portatore di CD; fra i soggetti ospe-

dalizzati o residenti in strutture assistenziali questa percentuale sale fino al 20-50% e circa il 20% dei soggetti negativi al momento del ricovero acquisiscono il batterio durante una ospedalizzazione. I portatori asintomatici rappresentano un *reservoir* fondamentale per la trasmissione dell'infezione, in quanto determinano contaminazione ambientale. Una nuova esposizione e conseguente colonizzazione determina un rischio più elevato di sviluppare infezione clinicamente significativa (4-5%), mentre i soggetti colonizzati hanno maggiori probabilità di rimanere asintomatici anche durante il ricovero (1,1% ha sviluppato diarrea) (18). I fattori di rischio associati allo sviluppo di CDAD sono numerosi: uso di antibiotici, ospedalizzazione, età avanzata, comorbidità, inibizione della secrezione acida gastrica, chemioterapia anti-neoplastica. Tuttavia l'infezione da CD può verificarsi anche in assenza di tutti questi fattori.

L'utilizzo di antibiotici è il fattore di rischio meglio riconosciuto e modificabile per lo sviluppo di CDAD. Gli antibiotici favoriscono la patologia sia alterando la funzione di barriera della normale flora microbica del colon creando le condizioni in cui CD può moltiplicarsi e produrre tossine, sia determinando la selezione di ceppi più aggressivi (es. ribotipo 027). Clindamicina, fluorochinoloni, penicilline e cefalosporine sono i farmaci meglio riconosciuti come fattore predisponente all'infezione da CD, tuttavia tutti gli antibiotici possono svolgere questo ruolo.

L'età è stata identificata come fattore di rischio sia per l'acquisizione della malattia, sia per lo sviluppo di forme severe. Le motivazioni di questa relazione non sono perfettamente riconosciute: verosimilmente sono implicati sia una ridotta attività del sistema immunitario, sia la maggior frequenza, nella popolazione anziana, di condizioni che aumentano il rischio di acquisire l'infezione (es. necessità di terapie antibiotiche e di ospedalizzazioni anche a causa di patologie croniche).

Fra i farmaci, oltre agli antibiotici, anche gli inibitori della secrezione acida gastrica sono stati correlati all'infezione da CD, ma i meccanismi alla base non sono chiariti.

»» Diagnosi

La diagnosi di infezione da CD richiede sempre il sospetto clinico.

La diagnostica dovrebbe essere garantita a tutti i pazienti ospedalizzati che presentano i sintomi descritti sopra, in particolare se una terapia antibiotica è in corso o è stata recentemente terminata. Essendo stati descritti anche casi acquisiti in comunità, in presenza di sintomi compatibili è comunque indicato eseguire la diagnostica, anche se il paziente non è ospedalizzato.

La diagnosi microbiologica di infezione da CD richiede l'analisi delle feci,

sulle quali è possibile determinare, con varie metodiche, la presenza del batterio e delle sue tossine A e B. Le indagini microbiologiche si eseguono solo su feci non formate. Se il paziente presenta ileo paralitico e quindi non ha diarrea, è accettabile l'esecuzione dei test su tampone.

Le tossine di CD si degradano al di fuori dell'ambiente intestinale e risultano non determinabili sulle feci dopo 2 ore a temperatura ambiente.

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da CD può avvalersi di diverse tecniche.

- Test immunoenzimatico (EIA) per la rilevazione di glutamato-deidrogenasi (GDH). GDH è un enzima prodotto da tutti i ceppi di CD, compresi quelli non tossigeni. La sua rilevazione è un eccellente test di screening, con ottima sensibilità, basso costo e brevi tempi di esecuzione (1 ora). Il test non è però in grado di rilevare la produzione di tossine per cui, sui campioni positivi, è poi necessario applicare un test di secondo livello per la rilevazione delle tossine.
- Test immunoenzimatico per la rilevazione di tossine A e B. Presenta specificità elevatissima (99%), con sensibilità del 75%. Esiste quindi il rischio di falsi negativi in quanto deve essere presente una quantità minima di tossina (100-1000 pg) perché venga rilevata. Il test è poco costoso e la sua esecuzione richiede tempi piuttosto brevi (alcune ore). Il miglior utilizzo clinico è quello integrato in algoritmi diagnostici, ad esempio come test di secondo livello da applicare ai campioni che sono risultati positivi alla determinazione di GDH.
- Reazione polimerasica a catena (real-time PCR) per l'identificazione delle tossine A e B. È una metodica altamente sensibile e specifica che fornisce risultati in tempi brevi (1 ora). Poiché rileva la produzione di tossine sulla base di meccanismi di amplificazione genica, non è in realtà in grado di determinare i livelli di tossine prodotti e potrebbe identificare in maniera non corretta portatori asintomatici;
- Saggio di citotossicità su coltura cellulare. Rappresenta il *gold standard*, con cui vengono confrontate le altre metodiche diagnostiche. Si esegue mettendo a contatto un preparato delle feci del paziente con una coltura cellulare monostrato. Se le tossine di CD sono presenti, si evidenzia un effetto citopatico. Questo test è più sensibile dei test immunoenzimatici tuttavia risulta molto più laborioso, costoso e prevede lunghi tempi di esecuzione, per cui sostanzialmente non trova applicazione nella pratica clinica.
- Coltura selettiva. Rappresenta il metodo diagnostico più sensibile anche se la sola coltura non è in grado di discriminare se il ceppo isolato produce tossine. È una metodica che si utilizza a scopo epidemiologico ma non nella pratica clinica.

Le indagini endoscopiche non sono richieste per formulare diagnosi di infe-

zione da CD ma possono essere utili in determinate situazioni, ad esempio:

- Forte sospetto clinico ma test di laboratorio negativi;
- Necessità di diagnosi immediata, in condizioni in cui i test di laboratorio o i loro risultati non siano prontamente disponibili;
- Fallimento della terapia (anche a scopo di diagnosi differenziale);
- Presentazione atipica con ileo paralitico e assenza di diarrea.

In presenza di sintomatologia compatibile, visualizzare pseudomembrane all'esame endoscopico è patognomonico di infezione da CD. Tuttavia, nel 10-20% dei soggetti con infezione da CD le pseudomembrane non sono evidenti, in particolare in caso di infezione ricorrente.

In caso di colite fulminante l'indagine endoscopica deve essere condotta con attenzione per il rischio di perforazione con insufflazione di aria, vista l'aumentata fragilità della mucosa (8, 19, 20).

L'infezione da CD può entrare in diagnosi differenziale con altre forme di diarrea. Fra le forme infettive, *S. aureus*, *K. oxytoca* e *C. perfringens* sono stati descritti come agenti eziologici di colite pseudomembranosa.

Fra le forme non infettive, in particolare in corso di terapia antibiotica, deve essere tenuta in considerazione anche una diarrea osmotica. In questi casi alcuni elementi clinici possono essere di orientamento per la diagnosi: la risoluzione della diarrea sospendendo l'introduzione di cibi e liquidi per os fa propendere per diarrea osmotica, la presenza di febbre e leucocitosi per diarrea da CD.

Infine, è importante ricordare che in circa il 10% dei pazienti che sono stati trattati con successo per una infezione da CD, può persistere una sindrome da intestino irritabile post-infettiva, difficilmente distinguibile da una forma di infezione ricorrente da CD.

»» Terapia

Elemento fondamentale del corretto approccio terapeutico all'infezione da CD è la sospensione dell'antibioticoterapia in corso, il più rapidamente possibile. Il concomitante trattamento antibiotico durante il trattamento per CD si associa a durata più prolungata della diarrea e aumentato rischio di ricorrenza dell'infezione.

Se la prosecuzione di una terapia antibiotica è fondamentale per il paziente, è preferibile, se possibile, utilizzare antibiotici che sono meno spesso implicati nella patogenesi (es. glicopeptidi o tetracicline).

Fondamentale anche la corretta gestione del caso dal punto di vista delle misure di *infection control*, che tratteremo più avanti.

Nella gestione del paziente con forma severa è fondamentale la terapia di supporto con integrazione delle perdite idro-elettrolitiche.

La terapia farmacologica è indicata nei pazienti con manifestazioni cliniche e test su feci positivo. In attesa della refertazione degli esami di laboratorio il trattamento empirico è giustificato se il sospetto clinico è elevato. Non è raccomandato il trattamento per i portatori asintomatici.

I farmaci cardine per il trattamento dell'infezione da CD sono metronidazolo e vancomicina, da somministrare per via orale.

La posologia raccomandata di metronidazolo per via orale è 500 mg ogni 8 ore. Il farmaco è ben assorbito a livello del tratto digestivo superiore e in corso di CDAD raggiunge elevate concentrazioni nelle feci anche grazie alla secrezione che si verifica attraverso la mucosa del colon infiammata. Il farmaco è poco costoso e generalmente ben tollerato; è controindicato l'uso nel primo trimestre di gravidanza e durante l'allattamento.

La posologia raccomandata di vancomicina per os è 125 mg ogni 6 ore. L'utilizzo di dosi più elevate (500 mg ogni 6 ore) si è dimostrato equivalente per quanto riguarda l'efficacia. Il farmaco può essere somministrato nell'apposita formulazione orale in capsule ma anche come soluzione ricostituita usando i preparati in polvere per l'infusione endovenosa.

Vancomicina per os è sicura in gravidanza e allattamento.

Una ulteriore opzione terapeutica è rappresentata da fidaxomicina, farmaco molto più recente e dai costi elevati. È un macrolide orale che esercita attività battericida nei confronti di CD. La posologia raccomandata è di 200 mg ogni 12 ore per 10 giorni.

Fidaxomicina ha dimostrato efficacia clinica pari a quella di vancomicina nel trattamento sia del primo episodio che della prima recidiva di CDAD, con il vantaggio di ridurre la frequenza delle recidive, in particolare nei pazienti con infezione da ceppi diversi da NAP1/BI/027 (21, 22). Poiché l'introduzione di fidaxomicina è recente, non sono ancora stati stabiliti con precisione parametri per il suo utilizzo più appropriato.

Trattamento dell'infezione non severa

Nelle forme di infezione non severa la terapia di prima linea è rappresentata da metronidazolo o vancomicina per os.

Secondo diversi studi randomizzati l'efficacia clinica dei due farmaci è equivalente nelle forme non severe, anche se l'utilizzo di vancomicina sembra essere protettivo per lo sviluppo di infezione recidivante. Generalmente metronidazolo viene indicato come prima scelta terapeutica per le forme non severe di CDAD per il minor costo.

La durata di terapia è di 10-14 giorni, comunque fino a risoluzione della diarrea. La risoluzione clinica può richiedere tempi più prolungati se la terapia antibiotica sistemica non può essere sospesa. Al termine della terapia non è indicato ripetere test su feci, perché CD continua ad essere eliminato nei soggetti clinicamente guariti (20, 23).

Trattamento dell'infezione severa

Secondo le linee guida, l'infezione da CD si definisce severa in presenza di conta leucocitaria >15.000 cell/mm³, albumina <3 g/d e/o creatinina sierica $\geq 1,5$ volte i valori di base (20, 23). Tuttavia, non esiste una definizione univoca di forma grave e nei trial clinici le forme gravi sono state definite anche in modi diversi.

Per quanto riguarda la scelta del trattamento antibiotico, nelle forme severe è raccomandato l'utilizzo di vancomicina per via orale, che in diversi studi clinici ha ottenuto risultati migliori rispetto a metronidazolo. La posologia raccomandata è sempre di 125 mg ogni 6 ore, anche se spesso le dosi vengono aumentate fino a 500 mg ogni 6 ore nelle forme più gravi, anche i benefici di tale incremento posologico non sono ben documentati.

Nei pazienti che sviluppano ileo paralitico, il passaggio dei farmaci attraverso il tubo digerente può essere significativamente rallentato per cui possono trarre beneficio dalla somministrazione di metronidazolo per via endovenosa, che raggiunge concentrazioni efficaci a livello delle feci grazie all'escrezione biliare ed intestinale. La somministrazione di metronidazolo *ev* però, comunque, deve sempre essere associata a vancomicina per *os*.

Nel caso in cui il paziente non sia in grado di assumere farmaci per *os* né sia possibile una somministrazione tramite sondino naso-gastrico, si può considerare la somministrazione di vancomicina per enema (20, 23). Tuttavia il rischio di perforazione del colon è elevato ed è importante che tale tipo di trattamento sia gestito da personale esperto; la posologia in questi casi non è standardizzata, sono state studiate dosi di 1-2 g/die.

Recentemente sono stati descritti alcuni casi di infezione severa trattati con tigeciclina con successo, tuttavia i dati sono troppo scarsi per supportarne l'impiego nella pratica clinica.

I pazienti che a giudizio clinico del curante presentino un'infezione severa devono essere attentamente monitorati: la comparsa di distensione addominale, associata anche a riduzione della diarrea, deve far sorgere il sospetto clinico di megacolon tossico.

Alcuni dei pazienti con malattia severa richiedono un approccio chirurgico (colectomia) in caso di megacolon, perforazione, colite necrotizzante o malattia refrattaria con sepsi grave/shock settico.

Il *timing* della chirurgia non è ancora ben definito. Prima della comparsa dei ceppi ipervirulenti, si consideravano indicazioni all'intervento chirurgico la perforazione, la MOF e la mancata risposta clinica dopo 48 ore di terapia mirata. Durante gli outbreak causati dal ribotipo 027, tuttavia, alcuni pazienti hanno presentato una evoluzione molto rapida del quadro, con decesso entro 48 ore.

Dal punto di vista della tecnica chirurgica, la procedura più standardizzata è la colectomia subtotale con ileostomia temporanea e ricanalizzazione in un

secondo tempo chirurgico. La presenza di importanti fenomeni infiammatori, e spesso anche le gravi condizioni del paziente, controindicano l'intervento in un unico tempo chirurgico.

Infezione ricorrente

Si definisce infezione ricorrente la condizione in cui, dopo la risoluzione dei sintomi durante il trattamento, questi ricompaiono dopo la sua sospensione. L'infezione ricorrente deve essere distinta dall'infezione refrattaria, che si definisce come la mancata risposta clinica al trattamento, con sintomi che persistono durante la terapia.

Alcuni studi hanno dimostrato, grazie a metodiche di biologia molecolare, che circa la metà degli episodi di infezione ricorrente, sono in realtà reinfezioni piuttosto che ricadute di infezione da parte del ceppo iniziale.

L'infezione ricorrente, con uno o più episodi, interessa circa il 25% dei pazienti che vengono trattati con vancomicina e metronidazolo durante il primo episodio. Di norma si manifesta a 1-3 settimane dalla sospensione della terapia, anche se sono stati descritti casi con ripresa dei sintomi anche dopo 2-3 mesi.

Fra i fattori di rischio per infezione ricorrente sono stati identificati: età >65 anni, presenza di comorbidità, necessità di proseguire la terapia antibiotica sistemica durante il trattamento dell'infezione da CD.

Durante l'episodio ricorrente, i sintomi sono generalmente simili a quelli dell'episodio precedente (24).

Il trattamento del primo episodio di recidiva può essere effettuato sia con metronidazolo sia con vancomicina; se infezione severa si privilegia vancomicina.

Un'alternativa terapeutica per la prima recidiva è rappresentata da fidaxomicina, che è risultata essere di pari efficacia clinica rispetto a vancomicina ma con il vantaggio di ridurre la probabilità di ulteriori recidive (20, 23).

In caso di ulteriori recidive dopo il primo episodio possono essere proposte varie strategie. La principale consiste in un trattamento prolungato con vancomicina, con posologia a scalare (schema *pulse-tapered*) fino a somministrazione intermittente. Il principio su cui si basa questo approccio è che gli episodi successivi al primo possano dipendere dalla persistenza di spore a livello del colon, in grado poi di germinare, produrre tossine e causare la malattia nel momento in cui cessa l'attività dell'antibiotico. La somministrazione di vancomicina secondo questo schema dovrebbe essere in grado di eliminare queste spore quando, progressivamente, assumono la forma vegetativa (20, 23).

Fidaxomicina può trovare applicazione in questo gruppo di pazienti, anche se mancano dati definitivi per stabilire quale sia il miglior ambito di utilizzo del farmaco (prima recidiva/recidive successive alla prima/primo episodio

in pazienti con fattori di rischio per infezione ricorrente) che presenta comunque costi decisamente elevati.

Nell'ambito di studi clinici sono stati valutati anticorpi monoclonali anti tossina A e anti tossina B, associati al trattamento standard (vancomicina o metronidazolo). I pazienti trattati secondo questi protocolli hanno presentato minori recidive, tuttavia gli anticorpi monoclonali non sono ancora disponibili per l'impiego nella pratica clinica.

Il trapianto di microbiota fecale è una tecnica che recentemente ha dimostrato la sua superiorità rispetto ai trattamenti farmacologici nel trattamento delle infezioni ricorrenti da CD (25).

Il tratto gastrointestinale ospita una flora di microorganismi, la cui alterazione è alla base dei meccanismi patogenetici dell'infezione da CD. L'uso di antibiotici ne altera la composizione e può determinare sia la rimozione selettiva di alcuni ceppi che possono fungere da barriera per la colonizzazione da parte di ceppi potenzialmente patogeni, sia modifiche del microambiente che causano alterazioni della funzione di barriera della mucosa intestinale e deficit dell'immunità locale. Queste condizioni diventano predisponenti all'infezione da CD, poiché creano le condizioni affinché le spore, acquisite per via ambientale, possano colonizzare l'intestino e germinare.

A dimostrazione di ciò, nei pazienti che soffrono di infezione ricorrente da CD è stata notata una modifica del microbiota con riduzione di *Bacteroides* e *Firmicutes*, che però tornano normali dopo il trapianto di feci.

Le esperienze cliniche sul trapianto di microbiota fecale sono state condotte in pazienti con infezione ricorrente o severa, che avevano fallito altre opzioni di trattamento. L'efficacia è stata dimostrata nei pazienti con infezione ricorrente, mentre i dati sulle infezioni severe sono più limitati.

Sono stati riportati tempi di risposta al trattamento che variano da 24 ore a 12 giorni, mentre la risoluzione dei tempi si mantiene a lungo nel tempo. Dopo il trattamento la ricerca di CD e delle sue tossine nelle feci dei pazienti è risultata negativa, mentre la composizione del microbioma fecale è risultata rimanere stabile fino a 2 settimane dopo la procedura.

La somministrazione può avvenire mediante sondino naso-gastrico o nasodigiunale, enema o durante colonscopia. Recentemente sono state utilizzate anche preparazioni orali (capsule), con ottimi risultati su un piccolo gruppo di pazienti.

Finora i vari studi che hanno valutato il trapianto di microbiota intestinale hanno utilizzato, oltre che diverse vie di somministrazione, anche diversi protocolli di preparazione della sospensione di feci.

In generale come donatori devono essere scelti soggetti in buona salute, che presentino evacuazioni regolari di feci formate, che non abbiano assunto terapia antibiotica nei 6 mesi precedenti né soffrano di malattie infiammatorie croniche intestinali. I donatori, inoltre devono essere sottoposti a

screening per le principali patologie virali, batteriche e parassitarie potenzialmente trasmissibili, sia mediante indagini sierologiche che mediante esame delle feci.

Razionale e strategie di Infection Control

L'infezione da CD rappresenta una sfida estremamente onerosa per le strutture sanitarie, non solo in termini di costi per la diagnostica e il trattamento ma anche e soprattutto per il controllo della sua diffusione, tenendo in considerazione quanto esposto nella sezione dedicata all'epidemiologia.

Numerosi sono gli elementi di preoccupazione legati a questo fenomeno.

In primo luogo l'aumento dei tassi di infezione da CD, che permettono di considerarlo ormai alla stregua di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) come l'organismo più comune nel provocare infezioni acquisite in ospedale negli Stati Uniti, in particolare nella popolazione anziana, ma con preoccupanti aumenti in tutte le fasce di età.

Deve preoccupare inoltre l'impennata alla quale si assiste dei casi con insorgenza al di fuori dell'ospedale: questi sono sempre più comuni di quanto prima riconosciuto, finanche più del 50% dei casi con esordio in comunità, e questo può aumentare il rischio di infezione per gli altri ricoverati (26, 27).

Sempre più numerose sono le segnalazioni di un aumento della severità della malattia. La maggior parte è stata associata con il ceppo BI/NAP1/027 di *C. difficile*. Alcuni studi hanno dimostrato che questo ceppo produce più tossina A e B *in vitro* rispetto la maggior parte degli altri ceppi di *C. difficile*, producendo anche più spore.

L'infezione da CD è associata ad un aumento della durata del soggiorno in ospedale, dei costi legati anche alla maggiore probabilità che si renda necessario un lungo periodo di tempo per la riabilitazione in ambito ospedaliero o in struttura di riabilitazione estensiva. Aumentano infine sia la morbilità sia la mortalità nei pazienti adulti e pediatrici.

Molti studi hanno posto in relazione con numerosi elementi favorevoli l'infezione da CD e solo su alcuni di essi si può agire in maniera significativa. Certamente la prescrizione più appropriata delle terapie antibiotiche costituisce uno degli elementi cardine d'intervento: non sono pochi i programmi di *stewardship* antibiotica che individuano nella riduzione dei casi di infezione da CD un indicatore molto significativo.

Ridurre il ricorso alla soppressione dell'acidità gastrica può senza dubbio contribuire nella riduzione dei casi, poiché non sono pochi gli studi che in essa hanno individuato un rilevante elemento di rischio. Non può certamente essere ignorato che il ricorso indiscriminato a questa classe di farmaci è spesso posto in relazione anche con la gravità della malattia.

Infine, diversi studi suggeriscono un certo declino nei tassi di risposta al trattamento dell'infezione da CD con metronidazolo, e che nella malattia

grave i tassi di risposta alla vancomicina sono statisticamente superiori, ma non nella malattia lieve.

I piani di controllo della diffusione dell'infezione da CD devono prendere le mosse da accurati sistemi di rilevazione dei casi, e quindi partire da solidi criteri di definizione di caso ad uso dei Sistemi di Sorveglianza.

La più convincente pare essere un caso di diarrea significativa o megacolon tossico senza altre evidenti cause eziologiche che soddisfa uno o più dei seguenti criteri:

- 1) o il campione di feci produce un risultato positivo per un test di laboratorio per tossina A e/o B di *C. difficile*, o viene rilevato *C. difficile* produttore della tossina nel campione di feci mediante coltura o altri mezzi;
- 2) dimostrazione di una colite pseudomembranosa mediante endoscopia o un intervento chirurgico;
- 3) la colite pseudomembranosa è documentata all'esame istopatologico.

La definizione di una diarrea clinicamente significativa non è univoca. I criteri utilizzati vanno da 3 o più scariche diarroiche entro 24 ore o meno, a 6 scariche in 36 ore. I recenti focolai di infezione grave da CD indicano che non sempre è possibile attendere 24-48 ore prima di determinare se un paziente ha una diarrea clinicamente significativa; pertanto, la diarrea con crampi addominali è stata utilizzata per definire una diarrea clinicamente significativa.

La sorveglianza delle infezioni da CD permette di determinare i tassi d'infezione fornendo una misura per stabilire l'impatto dell'infezione sulle strutture sanitarie. Questi dati sono utilizzati anche per valutare efficacia degli interventi per prevenire CD. Il *feedback* costante dei dati ottenuti a tutti gli operatori sanitari e amministratori può essere utilizzato come uno degli strumenti per migliorare l'adesione alle misure di prevenzione della malattia da CD.

Con ogni probabilità il miglior sistema di sorveglianza è basato sul dato di laboratorio prontamente comunicato al reparto di degenza ove risulta ricoverato il malato risultato positivo al test diagnostico di laboratorio. Pur non essendo il sistema più accurato, probabilmente è il miglior metodo per garantire l'adozione in tempi rapidi di tutte quelle procedure aggiuntive nel reparto di ricovero finalizzate ad annullare il rischio di colonizzazione/infezione dei malati e di contaminazione delle superfici, e anche per distinguere prontamente tra un caso esordito in comunità o acquisito durante il ricovero (26, 27).

Spesso, a fronte di una diagnosi di malattia da CD vengono posti in essere numerosi interventi rendendo difficile determinare il reale significato di efficacia di un intervento rispetto agli altri.

CD condivide caratteristiche epidemiologiche con altri germi resistenti agli

antimicrobici, come lo MRSA, gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) o gli enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE). Sia la cute che l'ambiente circostante i pazienti colonizzati si contaminano, e nel corso delle azioni necessarie per l'assistenza sanitaria, sono proprio le mani degli operatori che garantiscono l'ulteriore diffusione nell'ambiente, o la contaminazione delle suppellettili e la colonizzazione di altri pazienti. La principale differenza tra questi quattro microorganismi è che *C. difficile* forma spore, mentre gli altri tre non lo fanno.

È proprio la formazione di spore che pone sfide uniche per l'igiene delle mani e le pratiche di disinfezione ambientale, dal momento che le spore di *C. difficile* sono resistenti agli effetti battericidi dell'alcol e dei disinfettanti ospedalieri più comunemente usati. Sebbene molti prodotti per l'igiene a base di alcol siano inefficaci nel rimuovere le spore di *C. difficile*, nessuno studio clinico ha dimostrato un aumento di infezioni da CD con l'uso di questi prodotti o una diminuzione dell'infezione con l'esclusivo utilizzo di acqua e sapone. Al contrario, molti degli studi hanno dimostrato diminuzioni di MRSA o VRE associato con l'uso di prodotti per l'igiene delle mani a base alcolica.

Inoltre, l'uso di metodologie sporicide per pulire l'ambiente esterno non ha sempre dimostrato una riduzione delle infezioni da CD.

Questi dati indicano che anche se l'ambiente può essere una importante fonte di *C. difficile*, la trasmissione indiretta dagli operatori sanitari può ragionevolmente essere considerata la via principale attraverso la quale i pazienti acquisiscono *C. difficile*.

Le strategie da adottare sono numerose e il loro dettaglio è fondamentale: ridurre il ricorso a dispositivi elettronici per la rilevazione dei parametri vitali del malato, garantisce una loro igienizzazione più rapida, semplice e potenzialmente meno dannosa per ciascun dispositivo. Devono inoltre essere adottati metodi corretti e sistematici di disinfezione e di barriera.

È ineludibile l'adozione delle precauzioni per contatto (camici e guanti) con i pazienti con infezione durante tutte le azioni assistenziali che prevedano contatto con essi o con l'ambiente ove sono collocati, le relative suppellettili e tutti i dispositivi, che risultino o no chiaramente contaminati. È preferibile posizionare i pazienti con CD in camere singole, se disponibili, e isolare preferibilmente i pazienti con incontinenza fecale se la disponibilità delle camere è limitata.

Eseguire l'igiene delle mani in maniera meticolosa, prima e dopo ogni azione assistenziale (all'ingresso e all'uscita dalla stanza di degenza): prima di indossare i guanti è possibile ricorrere al solo gel idroalcolico. Dopo l'azione, devono essere rimossi correttamente i guanti ponendo attenzione a non contaminarsi durante questa fase e successivamente eseguire l'igiene delle mani con acqua e sapone.

È fondamentale la decontaminazione ambientale degli ambienti utilizzati dal malato con CD ricorrendo a soluzioni di ipoclorito di sodio. Tutto il personale medico e quello dedicato all'assistenza deve essere formato per aderire correttamente a queste procedure e anche il personale amministrativo e della dirigenza deve essere informato sulle caratteristiche cliniche, la trasmissione e l'epidemiologia dell'infezione da CD.

Altri principi devono essere conosciuti e applicati (28).

Il test per la ricerca delle tossine deve essere effettuato solo su feci non formate e non deve essere utilizzato per documentare la risposta microbiologica al trattamento, poiché i malati guariti continuano a rappresentare per molte settimane basse quantità di tossine che gli attuali test in commercio individuano risultando positivi: questo elemento rischia di indurre un *overtreatment* ingiustificato.

Non si devono trattare presuntivamente malati ritenuti ad alto rischio di CD, e non bisogna tentare la decolonizzazione di quei pazienti che risultano essere noti come portatori asintomatici di CD.

La diffusione anche epidemica di CD deve portare a profondi cambiamenti nella percezione del problema da parte di tutti gli operatori sanitari, medici compresi.

Deve essere messo in atto immediatamente l'accertamento diagnostico per escludere un'infezione da CD in tutti coloro che presentano diarrea durante un ricovero ospedaliero. La refertazione deve avvenire almeno entro 24 ore e deve essere comunicata prontamente al reparto che ha inviato il campione, possibilmente non solo con lo strumento cartaceo del referto ma anche con contatto diretto o telefonico da parte del laboratorio. Soprattutto in quelle organizzazioni sanitarie con elevate incidenze di infezione, l'adozione delle precauzioni per contatto deve essere assicurata sin dal momento in cui viene riconosciuta una sindrome diarroica nel malato, senza attendere la conferma diagnostica da parte del laboratorio.

Numerose Linee Guida e documenti di posizione suggeriscono la cessazione delle precauzioni che abbiamo elencato dopo 48 ore dalla completa cessazione dei sintomi. Questo provvedimento potrebbe sottostimare il rischio potenziale che costituiscono questi malati. Dopo la risoluzione dei sintomi, i pazienti con malattia da CD continuano a disperdere spore e a contaminare l'ambiente. Non va poi dimenticato che questi pazienti sono ad alto rischio di recidiva dopo il trattamento. In questo momento non sono disponibili dati che supportano l'estensione dell'isolamento oltre le 48 ore come misura per ridurre l'incidenza della diffusione della malattia da CD, che pertanto rimane un approccio da valutare ma ancora da dimostrare come efficace. È verosimile che l'adozione di questo criterio sia auspicabile in quelle realtà con alta endemia.

Non può essere dimenticato infine il pieno coinvolgimento del contesto fa-

miliare, dei visitatori e *caregivers* in genere, al fine di garantire la piena adesione alle procedure dettate indicate dal personale dedicato alla cura e all'assistenza del malato. Deve quindi essere prevista una vera e propria azione di *counselling* nei confronti di questa componente. Garantire la piena comprensione dei tanti provvedimenti intrapresi, aumenta la probabilità di adesione agli stessi, riducendo il rischio di contaminazioni e colonizzazioni nell'ambito del reparto di degenza.

Quando l'incidenza della malattia da CD rimane elevata, il *management* dell'organizzazione sanitaria deve rivalutare con attenzione i rischi, ampliando l'osservazione e le rilevazioni di questi ultimi senza limitarsi alla sola valutazione dell'area interessata dal numero prevalente di malati coinvolti, ma studiando con attenzione l'adeguata *compliance* alle precauzioni per contatto e all'igiene delle mani di tutto il personale, alla pulizia ambientale e dei dispositivi e attrezzature.

Queste complesse attività, sia dal punto di vista organizzativo che esecutivo dovrebbero corrispondere a una precisa volontà che vede il motore principale nella *leadership* dirigenziale ed amministrativa della struttura sanitaria. L'armonizzazione nella messa in atto di tutte le procedure diagnostiche, terapeutiche, assistenziali e preventive ricordate è, infatti, possibile solo con la sussistenza di questo requisito fondamentale.

La colonizzazione e le malattie sostenute da batteri multiresistenti o particolarmente insidiosi come *C. difficile* costituiscono oggi un importante problema nel mondo delle infezioni correlate all'assistenza. Siamo davanti ad un fenomeno relativamente nuovo, considerando che oggi l'attenzione è sì rivolta verso l'epidemia delle enterobatteriacee con ridotta sensibilità ai carbapenemi, ma dimenticando con ogni probabilità che la diffusione di MRSA è consolidata da almeno cinquanta anni e da oltre vent'anni in molti paesi occidentali le enterobatteriacee produttrici di beta-lattamasi a spettro esteso sono una realtà epidemiologica consolidata.

È ormai del tutto evidente che la diffusione di questi batteri è inequivocabilmente legata alla loro sistematica presenza nella flora transitoria prevalentemente rappresentata sulla cute delle mani degli operatori sanitari, nella contaminazione dell'ambiente ospedaliero, dell'intestino, e certamente legata a trattamenti antibiotici spesso inappropriati.

Il sovertimento del microbiota intestinale legato anche a questi trattamenti garantisce la definizione di un serbatoio particolarmente significativo di questi microorganismi, giustificando la formulazione dell'acronimo CCC, che richiama l'attenzione in particolar modo su *C. difficile*, CPE (enterobatteri produttori di carbapenemasi), ed elevata proliferazione di *Candida* (correlata all'aumento di candidemie in numerosi studi) (29). Non sono poche le segnalazioni in letteratura che descrivono chiari rapporti esistenti fra candidemie e gravi infezioni sostenute da *C. difficile*, e batteriemie sostenute da CPE as-

sociate a candidemia. Anche queste osservazioni potrebbero confermare che il tratto gastrointestinale gioca un ruolo chiave come serbatoio principale per i microorganismi responsabili di questa malattia da infezione. Ne consegue che è condivisibile elaborare strategie “CCC” sia in termini di *stewardship* antibiotica che di *infection control* (30).

» Bibliografia

1. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child*. 1935; 49: 390.
2. George RH, Symonds JM, Dimock F, et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J*. 1978; 1: 695.
3. McFarland LV, Elmer GW, Stamm WE, Mulligan ME. Correlation of immunoblot type, enterotoxin production, and cytotoxin production with clinical manifestations of *Clostridium difficile* infection in a cohort of hospitalized patients. *Infect Immun*. 1991; 59: 2456.
4. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med*. 2006; 145: 758.
5. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005; 366: 1079.
6. Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1539.
7. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 1989; 320: 204.
8. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA*. 2015; 313: 398.
9. Reveles KR, Lee GC, Boyd NK, Frei CR. The rise in *Clostridium difficile* infection incidence among hospitalized adults in the United States: 2001-2010. *Am J Infect Control*. 2014; 42: 1028.
10. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med*. 2015; 372: 825.
11. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey; ECDIS Study Group. *Lancet*. 2011; 377: 63.
12. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004; 171: 466.
13. Pépin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*. 2005; 173: 1037.
14. 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.
15. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, et al. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107: 89.
16. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 409.

17. Gravel D, Miller M, Simor A, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 568.
18. Shim JK, Johnson S, Samore MH, et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet*. 1998; 351: 633.
19. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 1053.
20. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31: 431.
21. 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.
22. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 2011; 364: 422.
23. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 (Suppl. 2): 1.
24. Barbut F, Richard A, Hamadi K, et al. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2386.
25. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013; 368: 407.
26. AA.VV. Prevenzione e controllo delle infezioni da *Clostridium difficile*; GIIO. 2009; 16: 2-40.
27. Goglio A, et al. Infezioni da *Clostridium difficile*: risultati di un'indagine negli ospedali italiani; GIMPIOS. 2013; 3: 54-66.
28. ER Dubberke et al. Strategies to Prevent *Clostridium difficile* Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update; *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014; 35: 628-45.
29. De Rosa F, et al. From ESKAPE to ESCAPE, From KPC to CCC; *CID* 2015, 60: 128.
30. De Rosa F, et al. Candidaemia, *Clostridium difficile* infection and carbapenemase producing Enterobacteriaceae: new enteropathogenic opportunistic syndrome?, *Infez Med*. 2015; 2: 105-16.

Candidemia e infezione da *Clostridium difficile*: esiste una correlazione?

La disregolazione del microbiota umano come modello patogenetico di entrambe le affezioni

Spinello Antinori

Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco",
Università degli Studi di Milano

Il microbiota umano indicato in precedenza genericamente come la “flora normale” è rimasto a lungo conosciuto solo in maniera rudimentale per la impossibilità di applicare in maniera appropriata le tecniche di microbiologia tradizionali allo studio delle comunità microbiche densamente popolate (1) (Box 1). Le analisi basate sul DNA e, in particolare, l'applicazione della cosiddetta *next generation sequencing* (NGS) ha aperto la possibilità di sequenziare e analizzare il microbioma umano (2). Tutto ciò ha permesso di generare, grazie a progetti quali l'*Human Microbiome Project* (HMP) e il MetaHIT, una notevole mole di dati relativi sia alla biologia sia al significato medico del microbioma umano e dei suoi geni (il metagenoma) (3-5).

Le nuove acquisizioni costituiscono la base per una migliore comprensione dell'eziologia e patogenesi di patologie complesse o emergenti di natura infettiva, infiammatoria o neoplastica. La composizione del microbioma varia significativamente a seconda della sede anatomica. Inoltre le variazioni interpersonali sono sostanziali e maggiori della variabilità temporale osservata nei diversi siti anatomici di un singolo individuo. La stabilità temporale osservata in un sito anatomico ha suggerito che gli individui possano essere raggruppati a seconda degli enterotipi maggiori presenti nel colon e nella vagina (6, 7).

BOX 1

Disbiosi: È la condizione in cui la popolazione del microbioma normale viene disturbata e alterata spesso come conseguenza di una pressione esterna (farmaci o stato di malattia).

Microbiota: L'insieme dei microrganismi che costituiscono il microbioma. La composizione del microbiota può variare in maniera sostanziale a seconda delle differenti nicchie ecologiche e nel passaggio da una condizione di salute a una di malattia.

Microbioma: Comprende la totalità dei microrganismi, delle loro informazioni genetiche e del *milieu* in cui essi interagiscono.

Metagenoma: L'informazione genetica di una popolazione complessa - generalmente dei microrganismi presenti in un ambiente o in un campione proveniente da una nicchia ecologica - che risulta costituito dai genomi di molti microrganismi. Il metagenoma garantisce informazioni riguardanti le potenziali funzioni genetiche di una popolazione aggregata.

Diversi studi hanno confermato come la composizione filogenetica del microbiota intestinale umano vede nei phyla Firmicutes e Bacteroidetes quelli predominanti e che si possano individuare tre enterotipi con una predominanza di generi costituita da *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) e *Ruminococcus* (enterotipo 3) (6, 8). Le origini delle differenze tra individui sono poco chiare e potrebbero riflettere colonizzazioni distinte nelle fasi precoci della vita e differenti esposizioni ambientali quali l'impiego di antibiotici e la dieta. La resilienza, cioè la capacità di un sistema di assorbire una alterazione e di riorganizzarsi durante il cambiamento in modo da mantenere la stessa funzione, struttura e identità, costituisce un concetto centrale dell'ecologia. Nel caso degli antibiotici la convinzione che il microbioma umano sia completamente resiliente e ritorni alla composizione pretrattamento dopo la perturbazione indotta dagli antibiotici è stata modificata dai risultati di studi condotti su microrganismi come *Helicobacter pylori* che hanno dimostrato come gli individui possano andare incontro all'estinzione di alcune specie batteriche (9).

La selezione a medio o lungo termine di microrganismi resistenti e la destabilizzazione del microbioma con nuove specie possono essere osservate anche in assenza di una ulteriore esposizione agli antibiotici. Pertanto nonostante la resilienza (inerente a un complesso ecosistema), si può verificare l'incapacità a ristabilire la condizione precedente la perturbazione con importanti implicazioni sulla salute (10, 11). Per quanto concerne la dieta l'abbondanza di *Prevotella* è correlata al consumo di carboidrati mentre *Bacteroides* risulta correlato al consumo di grassi, colina e aminoacidi. Tuttavia studi riguardanti interventi dietetici controllati di breve durata hanno dimo-

strato la possibilità di indurre modificazioni del microbiota intestinale senza tuttavia modificazioni della struttura complessiva della comunità batterica supportando pertanto un ruolo della dieta a lungo termine nel determinare la struttura del microbiota intestinale (12, 13).

Cambiamenti del microbioma umano sono stati implicati come responsabili in alcune condizioni patologiche inclusa l'obesità, il diabete e le malattie infiammatorie intestinali (14-16). Nell'ambito delle patologie infettive è ben noto che il microbiota intestinale è essenziale nel prevenire lo sviluppo della malattia da *Clostridium difficile* (MCD). In maniera sorprendente in assenza di terapia antibiotica, *C. difficile* ha scarsa o nulla influenza sulla composizione del microbiota intestinale ma in seguito alla disbiosi antibiotico-indotta *C. difficile* è in grado di ridurre la diversità di specie producendo uno *shift* nella sua composizione (17, 18). La disbiosi facilita l'infezione cronica e la propagazione della malattia e in aggiunta il microbiota intestinale influenza la patogenesi della MCD modificando la composizione dei metaboliti del colon. Le terapie antibiotiche riducono i livelli di acidi grassi a catena breve, dei sali biliari primari e degli aminoacidi aumentando quelli di oligosaccaridi, colina e acidi biliari secondari (19). I sali biliari hanno un ruolo importante nel regolare la germinazione delle spore di *C. difficile* e i segnali indotti da questi agiscono sull'attività delle proteine Rho nelle cellule dell'ospite, che inducono un effetto protettivo nei confronti degli effetti citopatici delle tossine (20). Gli acidi grassi a catena breve (per esempio butirrato e acetato) oltre a essere importanti nutrienti per la mucosa intervengono nell'omeostasi immune (21). Il trapianto di microbiota fecale da donatori sani a pazienti con MCD è in grado di indurre un successo terapeutico nell'85-90% dei pazienti con malattia ricorrente da *C. difficile* (22, 23). Diversi studi che hanno valutato con le tecniche di biologia molecolare il microbiota dei pazienti prima e dopo il trapianto hanno dimostrato come quest'ultimo sia in grado di restaurare il bilancio considerato sano tra i phyla Bacteroidetes e Firmicutes e di eradicare le Enterobacteriaceae e i Proteobacteria non classificati (24-26). I lieviti sono stati identificati in campioni fecali umani almeno a partire dal 1917 (27) e, dalla metà del XX secolo, la loro presenza nell'intestino umano è stata considerata avere un ruolo di tipo saprofitico (28). La presenza di funghi a livello intestinale sembra avere un ruolo patogenetico in alcune patologie e la rilevazione di anticorpi anti-*Saccharomyces* in pazienti con malattia infiammatoria intestinale è stata utilizzata come fattore predittivo di progressione di malattia (29, 30). In uno studio recente condotto su 98 individui 66 generi diversi di funghi furono identificati nel microbiota fecale umano con una presenza reciprocamente esclusiva dei phyla Ascomycota o Basidiomycota (31). La presenza di *Candida* spp correlava con quella di *Prevotella* ed entrambe erano ulteriormente correlate a una dieta a elevato contenuto di carboidrati (31). Uno studio effettuato sul microbiota intestinale

murino dopo un trattamento per oltre 76 giorni con vancomicina, ampicillina, metronidazolo e neomicina ha dimostrato che i batteri si riducevano di 3 ordini di grandezza mentre la comunità fungina aumentava di circa 40 volte sotto terapia antibiotica (32). Entrambe le comunità tendevano a ritornare ai valori pretrattamento fatta eccezione per *Candida* che rimaneva più abbondante rispetto alla densità presente prima della terapia antibiotica. La colonizzazione da parte di *Candida* spp nelle persone sane è segnalata essere variabile da 4 a 88% a seconda del sito del tratto gastroenterico studiato, delle tecniche di isolamento impiegate e del tempo di trasporto dei campioni (33). Questi dati sono in accordo con le affermazioni di Knoke secondo cui l'incidenza di colonizzazione gastroenterica da parte di *Candida* è compresa tra il 23% e il 76% (34) non discostandosi da quanto osservato nell'intestino dei rettili che risulta colonizzato nell'80% dei casi. È interessante notare come in modelli animali sia stato dimostrato come la colonizzazione da parte di *Candida* ritardi la guarigione di lesioni infiammatorie e che l'infiammazione (in una sorta di circolo vizioso) promuova a sua volta la colonizzazione (35). Nei pazienti con malattia infiammatoria intestinale vengono identificati nelle biopsie mucose elevati livelli di interleuchina-17 (IL-17) e di IL-23, una citochina che promuove l'espansione e il mantenimento di cellule Th17 a loro volta responsabili della sintesi di IL-17 (36-39). La colonizzazione da parte di *C. albicans* aumenta i livelli di IL-17 e IL-23 nelle cellule della mucosa gastrica e nei tessuti orali di topo (40).

A parte ciò la colonizzazione intestinale da parte di *Candida* spp è considerato un fattore di rischio per la successiva comparsa di candidemia; a questo proposito nello studio di Miranda *et al.* (41) lo studio biomolecolare dei ceppi di *Candida* isolati dal sangue e dai tamponi rettali o dalla cute ha dimostrato come frequentemente vi fosse una identità per *C. albicans* responsabile di candidemia e i ceppi isolati dal retto dello stesso paziente mentre per *C. parapsilosis* questo evento non si verificava a supporto della differente patogenesi delle due forme di candidemia (42). Le possibili interazioni tra l'infezione da *C. difficile*, i trattamenti antibiotici per quest'ultima e la colonizzazione da parte di *Candida* spp è stato oggetto di uno studio che confrontava l'impiego di fidaxomicina e vancomicina (43).

Nei pazienti non colonizzati prima dell'inizio del trattamento antibiotico la colonizzazione da parte di *Candida* spp era inferiore nel gruppo trattato con fidaxomicina (19%) rispetto a quelli trattati con vancomicina (29%) ($P=,03$) (43). Anche nei pazienti con precedente colonizzazione da *Candida* spp (che erano solo il 16% del totale) il trattamento con fidaxomicina era in grado di ridurre in maniera significativa rispetto a vancomicina la concentrazione di *Candida* presente nelle feci (da 4,1 a 2,1 \log_{10} CFU/g di feci nel primo caso e da 4,3 a 3,2 \log_{10} CFU/g di feci, nel secondo caso). In uno studio retrospettivo condotto in un ospedale del Missouri nell'arco di

3 anni, Manian e Bryant, sulla scorta di quanto osservato nei pazienti con infezione da *C. difficile* rispetto ai non infetti hanno ipotizzato un possibile effetto protettivo della sovracrescita di *Candida* spp sullo sviluppo di colite da *C. difficile* (44). Per converso il gruppo della Sapienza di Roma, in base alle osservazioni effettuate in uno studio prospettico in cui 4 di 23 pazienti con infezione da *C. difficile* svilupparono candidemia, ha rovesciato l'interazione tra i due microrganismi ipotizzando invece un possibile rischio di sviluppare candidemia a seguito di una infezione grave o recidivante da *C. difficile* (45). In studio caso-controllo condotto sempre presso l'Università Sapienza di Roma altri ricercatori hanno evidenziato una correlazione positiva tra la colonizzazione da *Candida* e l'infezione da *C. difficile* (83% dei pazienti vs 67%, $P < .05$) (46). Venditti *et al.* hanno poi effettuato uno studio caso-controllo dimostrando che la gravità dell'infezione da *C. difficile* (sia come presentazione clinica sia come numero di recidive), il ribotipo 027 e il trattamento con una dose elevata di vancomicina (>1 g/die) erano, in un modello di analisi multivariata, associati allo sviluppo di candidemia (47). A ulteriore conferma che la disbiosi intestinale possa costituire il *primum movens* per una serie di condizioni patologiche oltre alla colite da *C. difficile* vi sono i risultati di uno studio retrospettivo condotto in pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva in Grecia che ha mostrato come la colonizzazione intestinale da parte di *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi (KPC-Kp) fosse associata allo sviluppo di candidemia e all'isolamento di *Candida* (in particolare non-*albicans*) (48). Le correlazioni esistenti tra alcune delle problematiche di crescente osservazione in ambito nosocomiale (colite da *C. difficile*, candidemia, colonizzazione, batteriemia e sepsi da parte di Enterobacteriaceae multiresistenti) pur essendo ancora nell'"infanzia" per quel che concerne gli studi, comincia ad essere compiutamente apprezzata e portata all'attenzione della comunità infettivologica, come hanno sottolineato De Rosa *et al.* in una recente segnalazione coniando l'acronimo "CCC" (Carbapenemases-producing Enterobacteriaceae, *C. difficile* e *Candida* spp) per indicare queste condizioni (49).

Come è noto il trapianto di microbiota fecale costituisce la più efficace terapia nei confronti delle infezioni recidivanti da *C. difficile* con percentuali di successo nell'ordine dell'83-90% dei casi (22, 23). Tuttavia resta non completamente compreso quale sia il meccanismo d'azione, quali i metaboliti e i microrganismi che permettono nei pazienti sottoposti a trapianto di microbiota fecale di ritornare a una condizione di resistenza nei confronti di *C. difficile* (25). È evidente come lo studio e la caratterizzazione dei geni di resistenza agli antibiotici presenti nel microbiota intestinale (il cosiddetto "resistoma") costituisca un aspetto intrinsecamente rilevante e correlato alle infezioni di cui si è discusso (50, 51). A questo riguardo appaiono di estremo interesse le prime segnalazioni di impiego del trapianto di microbiota fecale

per decolonizzare l'intestino di individui persistentemente colonizzati con Enterobacteriaceae multiresistenti (52-54). La comprensione sempre più fine (metagenomica) del microbiota fecale umano nelle situazioni fisiologiche e in quelle patologiche appare sempre più la chiave per intervenire con successo nelle sfide dell'infettivologia futura.

» Bibliografia

1. Baumann P, Moran NA. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antoine van Leeuwenhoek*. 1997; 72: 39-48.
2. Tyler AD, Smith MI, Siverberg MS. Analyzing the human microbiome: a "how to" guide for physicians. *Am J Gastroenterol*. 2014; 109: 983-93.
3. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome project. *Nature*. 2007; 449: 804-10.
4. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature*. 2012; 13: 260-70.
5. Erlich SD. *Metagenomics of the human body*. Springer. 2011; 307-16.
6. Arumugam M, Raes J, Pelletier R, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473: 174-80.
7. Ravel J, Gajer P, Abdo Z et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 4680-7.
8. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. 2008; 57: 1605-15.
9. Sjolund M, Wreiber K, Andersson DI, Blaser MJ, Engstrand L. Long-term persistence of resistant *Enterococcus* species after antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med*. 2003; 139: 483-7.
10. Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Rev Microbiol*. 2009; 7: 887-94.
11. Dethieffen L, Relman DA. Incomplete recovery and individual responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 4554-61.
12. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011; 334: 105-8.
13. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in elderly. *Nature*. 2012; 488: 178-84.
14. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *Plos One*. 2010; 5: e9085.
15. Wu GD, Bushman FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe*. 2013; 24: 117-20.
16. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009; 457: 480-4.
17. Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, et al. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect Immun*. 2012; 80: 62-73.
18. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, et al. Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis*. 2008; 197: 435-8.
19. Zhao Y, Wu J, Li JV, et al. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J Proteome Res*. 2013; 12: 2987-99.

20. Brandes V, Schelle I, Brinkmann S, et al. Protection from *Clostridium difficile* toxin B-catalysed Rac1/cDc42 glucosylation by tauroursodeoxycholic acid induced Rac1/Cdc42 phosphorylation. *Biol Chem*. 2012; 393: 77-84.
21. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Cun R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011; 3: 858-76.
22. Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection. A systematic review. *Ann Intern Med*. 2015; 162: 630-8.
23. Surawicz CM. Fecal microbiota transplantation: what we know and what we need to know. *Ann Intern Med*. 2015; 162: 662-3.
24. Shahinas D, Silverman M, Sittler T, et al. Toward an understanding of changes in diversity associated with fecal microbiome transplantation based on 16SrRNA gene deep sequencing. *MBio*. 2012; 3: e00338.
25. Seekatz AM, Aas J, Gessert CE, et al. Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. *MBio*. 2014; 5: e00893.
26. Shankar V, Hamilton MJ, Khoruts A, et al. Species and genus level resolution analysis of gut microbiota in *Clostridium difficile* patients following fecal microbiota transplantation. *Microbiome*. 2014; 2: 13.
27. Anderson HW. Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *J Infect Dis*. 1917; 21: 13.
28. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. *Medicine*. 1999; 78: 220-7.
29. Murdoch TB, Xu W, Stempak JM, et al. Pattern recognition receptor and autophagy gene variants are associated with development of antimicrobial antibodies in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18: 1743-8.
30. Seibold F, Stich O, Hufnagl R, Kamil S, Scheurlem M. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scan J Gastroenterol*. 2001; 36: 196-201.
31. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *Plos One*. 2013; 8: e66019.
32. Dollive S, Chen Y-Y, Grunberg S et al. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. *Plos One*. 2013; 8: e71806.
33. Mueller J. Characteristics of fungus carriers as a source of infection. *Zbl Hyg Umweltmed* 1993; 194: 162-72.
34. Knoke M. Gastrointestinal microecology of humans and *Candida*. *Mycoses*. 1999; 42 (Suppl. 1): 30-4.
35. Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14: 386-91.
36. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patient with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2010; 140: 957-65.
37. Shen W, Durum SK. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines : new light on inflammatory bowel disease. *Neurochem Res*. 2010; 35: 940-5.
38. Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16: 1808-13.
39. Zhang Z, Rosenbaum JT, Zhong W, Lim C, Hinrichs DJ. Costimulation of Th17 cells: adding fuel or putting out the fire in the inflamed gut? *Sem Immunopathol*. 2010; 32: 55-70.
40. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 2695-706.

41. Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect.* 2009; 72: 9-16.
42. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 1959-67.
43. Nerandzic MM, Mullane K, Miller MA, Babakhani F, Donskey CJ. Reduced acquisition and overgrowth of vancomycin-resistant enterococci and *Candida* species in patients treated with fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: S121-26.
44. Menian FA, Bryant A. Does *Candida* species overgrowth protect against *Clostridium difficile* infection? *Clin Infect Dis* 2013; 56: 464-5.
45. Guastalegname M, Russo A, Falcone M, Giuliano S, Venditti M. Candidemia subsequent to severe infection due to *Clostridium difficile*: is there a link? *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 772-74.
46. Raponi G, Visconti V, Brunetti G, Ghezzi MC. *Clostridium difficile* infection and *Candida* colonization of the gut: is there a correlation? *Clin Infect Dis.* 2014; 59: 1648-9.
47. Russo A, Falcone M, Fantoni M, et al. Risk factors and clinical outcomes of candidaemia in patients treated for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2015; ahead of print.
48. Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Fligou F, et al. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumonia* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-albicans species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 80: 227-32.
49. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. *Clin Infect Dis.* 2015; 60: 1289-90.
50. Van Schaik W. The Human gut resistome. *Phil Trans R Soc B.* 2015; 370: 20140087.
51. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PMH, Wolffs PFG. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol.* 2013; 4: 87.
52. Singh R, van Nood E, Nieuwdorp M, et al. Donor feces infusion for eradication of Extended Spectrum Beta-Lactamase producing *Escherichia coli* in a patient with end stage renal disease. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: O977-8.
53. Crum-Cianflone NF, Sullivan E, Ballon-Landa G. Fecal microbiota transplantation and successful resolution of multidrug-resistant-organism colonization. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1986-9.
54. Lagier J-C, Million M, Fournier P-E, Brouqui P, Raoult D. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia*. *J Hosp Infect.* 2015; 90: 173-4.

CancidasTM I.V. caspofungin

*Prima della prescrizione, consultare il riassunto
delle caratteristiche del prodotto fornito dalla ditta produttrice.*

Esemplare fuori commercio. Omaggio ai Sigg. Medici



