



## ANTIBIOTICO-RESISTENZA

# I meccanismi con cui i batteri resistono agli antimicrobici

VALENTINA CAMBIOTTI<sup>1</sup>, PAOLA ROMAGNOLI<sup>2</sup>, ANTONIO SORICE<sup>2</sup>, PAOLA SECHI<sup>1</sup>, BENIAMINO CENCI GOGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Master Sanità Pubblica Veterinaria e Igiene degli Alimenti

<sup>2</sup>Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva

**F**ino a poco tempo fa l'insorgenza della farmaco-resistenza batterica era attribuita unicamente a meccanismi ben conosciuti di trasferimento intercellulare di materiale genetico di tipo verticale (mutazioni) od orizzontale (trasformazione, traduzione, coniugazione). Poco si sapeva sull'impatto che la molecola chemio-antibiotica aveva sulla fisiologia della cellula batterica, ad eccezione della modalità con cui essa agiva sulla sua riproduzione. Negli ultimi anni, invece è emerso un concetto estremamente interessante: il fenomeno della farmaco-resistenza non può essere spiegato solo con la pressione selettiva esercitata dalla molecola "antibiotica" sulla popolazione batterica, che determinerebbe quindi la selezione degli stipti in possesso di caratteristiche genetiche tali da renderli resistenti all'azione antimicrobica; a ciò si affiancherebbero una serie di fenomeni che vedono la molecola chemio-antibiotica direttamente responsabile di cambiamenti fisiologici della cellula batterica. Ci sono diverse condizioni in cui è possibile riconoscere questo fenomeno le quali sono inquadrabili all'interno di due processi biologici definiti: ridondanza molecolare e infedeltà molecolare [15]. Con questo articolo passeremo in rassegna i meccanismi alla base della resistenza agli antimicrobici, trattando dapprima quelli più comuni e noti e quindi descrivendo le teorie più moderne e suggestive.

### Meccanismi di azione degli antimicrobici

Facilitate dalla loro rapida crescita, le popolazioni batteriche evolvono in tempi brevi, adattandosi a situazioni avverse, quali la presenza di agenti antimicrobici. Tali composti, che possono esercitare un'attività batteriostatica o battericida, agiscono seguendo cinque meccanismi [20]:

- inibizione della sintesi della parete cellulare (agenti battericidi);
- alterazione delle subunità ribosomiali 30s e 50s, che risulta in una sospensione o modificazione della sintesi proteica (agenti batteriostatici);

- legame del farmaco alla subunità 30s e conseguente inibizione o alterazione della sintesi proteica (agenti battericidi);
  - modificazione del metabolismo degli acidi nucleici (agenti battericidi);
  - azione sul metabolismo generale del germe (agenti batteriostatici, ma che possono diventare battericidi in alcune circostanze).
- Inoltre, alcuni nuovi composti interferiscono con il potenziale elettrico della cellula, portando alla sua depolarizzazione e morte [24].

La suddivisione in farmaci batteriostatici e battericidi è in un certo senso artificiale, visto che in determinate situazioni (dosi di principio attivo 4-5 volte superiore alla MIC, minima concentrazione inibente) o per certi patogeni, i composti batteriostatici esercitano un'attività battericida, mentre a basse concentrazioni in relazione alla MIC gli agenti battericidi hanno solo un'azione batteriostatica.

L'intensità dell'effetto inibitorio per alcuni farmaci è soprattutto in relazione alla durata di esposizione del germe allo stesso, per altri è più che altro in funzione della concentrazione di principio attivo a cui il patogeno viene sottoposto, sebbene la maggior parte dei composti agiscano considerando entrambe queste variabili. La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca (naturale) o acquisita. Nel primo caso si parla di mancata suscettibilità ed è una caratteristica di alcune specie batteriche i cui membri sono tutti resistenti a un particolare farmaco, o perché mancano del meccanismo cellulare verso il quale il composto esercita la propria azione o la loro parete cellulare è impermeabile al farmaco stesso. Nel secondo caso invece, la resistenza origina da mutazioni cromosomiche o dall'acquisizione di materiale genetico trasferibile già presente in popolazioni batteriche correlate o meno a quella ricevente.

### Resistenza cromosomica

Questo fenomeno deriva da mutazioni della sequenza nu-



© Fotolia.com

cleotidica del cromosoma batterico risultanti nella sintesi di proteine che differiscono da quelle originali in maniera sufficiente a interferire con l'attività degli antibiotici. Le mutazioni si possono verificare in qualsiasi momento, indipendentemente dalla presenza di agenti antimicrobici, ma generalmente vengono perse o "riparate" da meccanismi cellulari; la loro diffusione avviene durante la moltiplicazione batterica (trasferimento verticale). La resistenza cromosomica risulta utile ai germi solo quando gli antibiotici vengono usati, costituendo un mezzo di selezione naturale nei confronti dei ceppi sensibili e il suo sviluppo è un processo graduale, di solito dovuto a diverse mutazioni successive. I mutanti resistenti emergono con maggior frequenza in vitro piuttosto che in vivo, probabilmente perché le mutazioni di questo tipo sono associate ad altre modificazioni cellulari svantaggiose per i batteri, tanto che generalmente il numero di mutanti diminuisce in seguito alla sospensione del trattamento. Per questo motivo il fenomeno della resistenza cromosomica è ritenuto di minor importanza rispetto a quello della resistenza trasferibile.

## Resistenza trasferibile

Certi geni batterici sono in grado di spostarsi tra DNA cromosomiale ed extra-cromosomiale, tra batteri della stessa specie, o di specie e generi diversi (trasferimento orizzontale). I veicoli più importanti di questo movimento di geni sono: plasmidi, trasposoni e integroni. In virtù della loro mobilità

tali elementi hanno maggiore possibilità di persistere anche in assenza di pressione selettiva da parte degli antibiotici, rispetto alla resistenza cromosomica.

## Plasmidi

I plasmidi sono molecole circolari di DNA extra-cromosomiale che sono in grado di replicare in maniera autonoma, indipendentemente dal cromosoma batterico e trasportano geni importanti per la riproduzione del batterio, il suo metabolismo, la resistenza ad antibiotici e virus batteriofagi, sebbene non siano necessari alla sopravvivenza del germe se non in particolari condizioni. Inoltre, tutti i plasmidi contengono una o più zone di origine della replicazione (*ori*) e in alcuni casi, i geni che consentono il loro trasferimento tra batteri (plasmidi coniugativi), mentre gli elementi che non li possiedono possono soltanto essere co-trasferiti (plasmidi non-coniugativi). Alcuni plasmidi si replicano in una vasta gamma di specie batteriche, mentre altri hanno uno spettro d'ospite ristretto. Gli R-plasmidi contengono i geni di resistenza e uno di questi può codificare per la resistenza a più di dieci antibiotici. Il fattore R conferisce ai batteri dei generi: *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Proteus* e *Shigella* resistenza multipla nei confronti di: sulfamidici, tetraciclina, cloramfenicolo, streptomina, penicillina, kanamicina e altri antimicrobici. Tale fattore è un plasmide che contiene *ori* e i geni di resistenza (elementi R) oltre all'attitu-

dine alla coniugazione (TF, *transfer factor*). Tuttavia, l'elemento citoplasmatico R può sussistere anche senza l'elemento TF, come avviene negli stafilococchi. Diversamente dalle mutazioni cromosomiali gli R-plasmidi conferiscono resistenza a livelli terapeutici di antibiotici in un unico passaggio.

## Trasposoni

I trasposoni (geni saltatori) sono delle corte sequenze di DNA che possono spostarsi da un plasmide a un altro, tra plasmidi e cromosoma batterico o tra plasmidi e batteriofagi (virus batterici), ma non sono in grado di replicarsi in maniera autonoma. Le sequenze IS (*insertion sequences*) costituiscono il modello più semplice di trasposone; tali elementi sono rappresentati da porzioni di DNA della lunghezza massima di 2 kb codificanti l'enzima trasposasi, necessario per lo spostamento da una posizione a un'altra del DNA. Alle estremità delle IS di solito ci sono delle corte sequenze ripetute e invertite di circa venti nucleotidi importanti per la localizzazione e l'inserimento nel DNA target. Durante la trasposizione una porzione target viene duplicata, creando una corta sequenza ripetuta diretta su ciascuna estremità dell'elemento IS di nuovo inserimento. Nel caso in cui sequenze IS siano piuttosto vicine tra di loro si può verificare la trasposizione dell'intera zona interposta tra le due. Il meccanismo di selezione del DNA target non è noto; in alcune circostanze sembrano preferire regioni ricche di A/T, altre volte il processo avviene indiscriminatamente. I veri trasposoni sono più lunghi di 2kb e contengono anche geni che conferiscono resistenza ad antibiotici o metalli pesanti, virulenza, capacità di produrre esotossine. Esiste poi un particolare gruppo di trasposoni (retro-trasposoni) che si integrano mediante un meccanismo analogo a quello dei retrovirus; tale processo richiede la trascrizione di un intermedio a RNA, la retrotrascrizione a DNA e lo spostamento del nuovo elemento nel genoma dell'ospite. I retrotrasposoni sono dotati di sequenze ripetute dirette alle estremità analoghe agli LTR retrovirali. I trasposoni dei batteri Gram- non sono coniugativi, mentre quelli dei Gram+ e *Bacterioides* spp. possono esserlo o meno. Tuttavia, se un trasposone di un batterio Gram- è parte del DNA di plasmidi coniugativi, il trasferimento orizzontale è possibile. I plasmidi acquisiscono facilmente trasposoni e spesso alcuni di questi vengono raggruppati all'interno dello stesso plasmide, conferendo determinanti di resistenza multipla con un singolo processo di coniugazione [1]. Tali spostamenti genetici consentono uno sviluppo rapido di resistenza in diverse popolazioni batteriche. L'espressione dei geni localizzati sui trasposoni può richiedere la presenza dell'antibiotico/i in questione, il quale è anche in grado di promuoverne il trasferimento, in quanto i determinanti di resistenza risultano vantaggiosi per i germi che li possiedono.

## Ricombinazione

Il trasferimento orizzontale di geni (ricombinazione) può av-

venire tra il genoma di due cellule batteriche o tra il genoma di una cellula batterica e un elemento extra-cromosomico. Tra i batteri, i geni si trasmettono da un donatore a un ricevente attraverso lo scambio di porzioni di DNA. I frammenti di DNA nel ricevente si possono allineare con il segmento cromosomico corrispondente e ricombinarsi per rottura del cromosoma dell'ospite, che perde il suo segmento e accetta quello del donatore. Sebbene i due frammenti siano omologhi per funzione, l'acquisizione del nuovo può tradursi nell'espressione di un diverso fenotipo nel ricevente. Tre sono i meccanismi noti di trasferimento: trasformazione, trasduzione e coniugazione.

## Trasformazione

La maggior parte dei batteri non è in grado di utilizzare DNA esogeno proveniente dall'ambiente il quale, una volta internalizzato nel germe, viene prontamente degradato dagli enzimi nucleasi. Tuttavia, alcuni generi come *Streptococcus*, *Bacillus*, *Haemophilus* e *Neisseria* sono disposti ad acquisire frammenti di DNA proveniente da specie correlate attraverso la parete cellulare. Tale competenza risulta inoltre legata a particolari fasi di crescita dei batteri, come la fase *log* o la sporulazione nel genere *Bacillus*. I microrganismi che non sono "naturalmente competenti" per la trasformazione possono diventarlo se sottoposti a trattamenti chimico-fisici che permeabilizzano la parete cellulare, quali: lo shock termico (alternanza di incubazioni a 4 e 42 °C in presenza di ioni calcio ecc.) e lo shock elettrico. La comparsa di porzioni di materiale genetico nell'ambiente può derivare dalla lisi di altri germi; infatti alla morte di una cellula non necessariamente consegue la distruzione del suo DNA, che viene rilasciato nel mezzo circostante. Il ricevente adsorbe frammenti di acidi nucleici liberi, che vengono poi trasportati nel citoplasma, dove ricombinano con un segmento omologo e possono venire incorporati nel genoma dell'ospite. Se il DNA che entra nella cellula non è correlato a quello cromosomico l'assenza di omologia impedisce la ricombinazione e il materiale estraneo viene degradato. Il fenomeno della trasformazione è stato dimostrato grazie a un esperimento [13] che consisteva nell'estrarre il DNA da un ceppo capsulato (virulento) di pneumococco e metterlo a contatto con un ceppo non capsulato (non virulento) dello stesso germe. Il trasferimento dei geni di virulenza ai germi acapsulati, ha conferito loro la capacità di sintetizzare la capsula rendendoli patogeni. Questo esperimento e altri successivi hanno dimostrato l'importanza di tale meccanismo nello scambio di geni tra batteri.

## Trasduzione

La trasduzione è un processo di trasferimento genetico mediato da batteriofagi: virus che infettano i batteri e si dicono virulenti, se si moltiplicano e abbandonano la cellula causandone la lisi

(ciclo litico) e temperati, se si integrano con il genoma dell'ospite senza necessariamente lisare subito il germe (ciclo lisogeno). Alcuni fagi hanno il genoma a DNA, altri a RNA, ma solo quelli a DNA *double strand* sono trasducenti. Durante la replicazione di un fago, tratti di DNA genomico o plasmidico possono venire incorporati nella particella virale e passare così a una cellula ricevente; se il DNA trasdotto è cromosomico, può ricombinarsi con quello dell'ospite e integrarsi, se invece è plasmidico può replicarsi ed essere espresso direttamente. In questi casi si parla di *trasduzione generalizzata* in quanto qualsiasi gene batterico può essere incorporato nel fago e tutti i fagi sono difettivi perché un segmento del loro corredo genetico è stato sostituito da genoma batterico e tale deficit impedisce loro di svolgere un ciclo replicativo completo.

La *trasduzione ristretta* invece è tipica dei fagi temperati, i quali si integrano in un punto preciso del genoma e replicano stabilmente nel cromosoma batterico (profagi), rimanendo in una fase di latenza. In seguito all'escissione dal genoma del germe, il DNA del fago può replicarsi ed entrare nel ciclo litico; nel caso in cui questo processo non si svolga perfettamente vengono asportate parti di DNA batterico e lasciate *in situ* porzioni virali dando vita a fagi difettivi che trasportano geni del donatore a batteri riceventi. In alcune circostanze la presenza di un profago e l'espressione di alcuni geni virali sono alterazioni costanti di determinati ceppi batterici; allora si parla di "conversione fagica"; ad esempio l'infezione di *Clostridium botulinum* tipo C con il fago CE gli conferisce la capacità di produrre la tossina botulinica.

## Coniugazione

La coniugazione consiste nell'unione di due batteri tramite un ponte attraverso il quale il donatore trasferisce materiale genetico direttamente al ricevente. La cellula donatrice deve possedere un plasmide (fattore F) che codifica per la sintesi del *sex pilus*, un'appendice di natura proteica che consente il trasferimento dei geni. Tale plasmide può permanere nel citoplasma come elemento libero, che si replica autonomamente o integrarsi nel cromosoma batterico e replicarsi insieme a quest'ultimo (episoma).

Di conseguenza si creano situazioni diverse:

- I donatori F<sup>+</sup> hanno il plasmide libero nel citoplasma e lo trasmettono ai riceventi F<sup>-</sup>. In uno dei due segmenti di DNA plasmidico si forma un *nick* (rottura dell'elica) e l'estremità libera passa al ricevente, replicandosi durante il trasferimento. Se il plasmide contiene altri geni oltre quelli per la coniugazione li trasferisce facilmente agli altri batteri.

- I donatori Hfr (*High frequency of recombination*) hanno il plasmide integrato nel cromosoma. Quindi, la duplicazione del genoma del donatore inizia da una posizione adiacente al punto d'integrazione del plasmide trasferendo buona parte del genoma al ricevente; il fattore F tuttavia, è sempre l'ultima porzione prevista per il trasferimento e difficilmente riesce a passare al ricevente, dove quindi i geni si integrano nel cromosoma, ma non possono essere passati ad altri germi.

I donatori F in cui il fattore F integrato viene escisso e torna libero nel citoplasma, possono trasportare geni batterici incorporati nel plasmide durante la separazione, i quali si replicano insieme al fattore F e passano al germe ricevente in caso di coniugazione.

Lo scambio di materiale genetico mediante coniugazione sembra essere favorito in particolari condizioni, quali la formazione di biofilm, soprattutto se i germi presenti al suo interno sono sottoposti a dosi non letali di antibiotici [16].

## Altri meccanismi di resistenza

Gli antibiotici agiscono in maniera specifica, tanto da poter preservare alcune attività metaboliche che non costituiscono il bersaglio del farmaco, ma possono essere coinvolte nel trasferimento di geni tra microrganismi. Tali vie in alcuni casi, non solo continuano a funzionare in presenza dell'antimicrobico, ma vengono anche potenziate. Inoltre, i chemioterapici sono in grado di promuovere il trasferimento genetico che avviene con il meccanismo della trasformazione. Alcuni farmaci aumentano il tasso di mutazione, incentivando l'acquisizione di resistenza cromosomica. Rappresentando un elemento di selezione, che induce un cambiamento dello stato fisiologico cellulare, l'antibiotico può facilitare l'insorgenza di resistenza fenotipica verso questo e altri farmaci. I principi attivi attuali quindi, hanno sette effetti sull'evoluzione della resistenza e della virulenza che andrebbero considerati nello sviluppo di nuovi farmaci ed evitati.

Tali fenomeni vengono raggruppati in due categorie: *ridondanza molecolare* e *infedeltà molecolare* in base alla facoltà della molecola di indurre cambiamenti nello stato fisiologico della cellula oppure di influenzarne la frequenza di ricombinazione e mutazione [14; 15].

### Ridondanza molecolare

Gli antibiotici sono dei ligandi per i loro bersagli molecolari e vi si uniscono con la stessa specificità degli ormoni verso i propri recettori, svolgendo anche funzioni simili. Gli ormoni infatti, sono delle molecole segnale che influenzano l'espressione genica o la fisiologia cellulare. Allo stesso modo, i segnali antibiotico-mediati attivano il trasferimento orizzontale di geni o alcuni meccanismi cellulari.

- Trasferimento genetico antibiotico-indotto

La trasmissione di alcuni trasposoni coniugativi è antibiotico-mediata. ad esempio la tetraciclina stimola la trasmissione di un trasposone proprio di *Bacterioides* di 100-1.000 volte; anche il trasposone *Tn925* appartenente ai batteri Gram<sup>+</sup> risponde alla presenza della tetraciclina venendo trasmesso a batteri sensibili da 5 a 100 volte più frequentemente e codifica per la resistenza a quest'ultima. Il trasposone del *Bacterioides* trasporta due geni: *rteA* e *RteB* omologhi a geni regolatori già conosciuti.

- Resistenza multipla farmaco-indotta

Diversi agenti ambientali inducono la trascrizione di geni che



©Fotolia.com

conferiscono fenotipi pleiotropici, inclusa la resistenza agli antimicrobici. Ad esempio il salicilato induce la trascrizione dell'operone *mar* che codifica per la multiresistenza. Il salicilato può elevare la frequenza di resistenza simultanea a: tetraciclina, cloramfenicolo e acido nalidissico di 1 milione di volte grazie alla riduzione della concentrazione intracellulare dei farmaci. Tra i geni controllati dal regulone (*soxRS*) redox-responsivo di *E. coli* ce ne sono alcuni sotto il controllo di *marRAB* e ulteriori meccanismi cellulari si intrecciano sovrapponendosi e aumentando il numero di segnali ambientali che possono mantenere il fenotipo di resistenza.

- Resistenza fenotipica antibiotico-indotta

Gli organismi si adattano a nuovi ambienti in seguito alla ricezione di segnali che inducano una modificazione degli stati fisiologici. Tale processo si verifica quando il nuovo ambiente non è letale, altrimenti i germi muoiono prima di adattarsi; ad esempio l'esposizione di *Pseudomonas aeruginosa* alla gentamicina per brevi periodi induce resistenza in quei pochi batteri che sopravvivono all'esposizione iniziale. Tali cellule esprimono resistenza anche ad altri agenti tossici quali: netilmicina, tobramicina, amikacina, isepamicina, neomicina, kanamicina, streptomina, polimixina ed EDTA. Sebbene il meccanismo di adattamento non sia conosciuto, sembra che abbia a che fare con la via di ingresso del farmaco. La gentamicina

provoca uno stress o un segnale che promuove un cambiamento fisiologico cellulare analogo a quello causato dalla privazione di  $Mg^{2+}$ ; tale fenotipo è ereditabile e persiste per generazioni dopo che l'antibiotico è stato rimosso o il  $Mg^{2+}$  è stato restituito. Il fatto che sia un adattamento fisiologico, piuttosto che mutazionale è dimostrato dalla manifestazione del fenotipo in tutta la popolazione e dal suo passaggio uniforme alla progenie.

- Materiale genetico libero antibiotico-indotto

*In vitro* gli antibiotici aumentano la frequenza del trasferimento genetico riducendo la capacità della parete cellulare di fungere da barriera verso il rilascio e l'acquisizione di DNA o rendendo il microrganismo suscettibile alla fusione con altri batteri e vescicole. I germi senza parete, o protoplasti, si lisano facilmente e rilasciano DNA in seguito a stress osmotico; antibiotici come i  $\beta$ -lattamici e la bleomicina creano protoplasti. Tali forme batteriche sono anche più suscettibili alla fusione con altre cellule o vescicole che si staccano dalla membrana cellulare, le quali vengono naturalmente prodotte nei germi gram- e possono contenere plasmidi e fattori di virulenza. In *Pseudomonas* la sintesi delle vescicole è stimolata dalla presenza di gentamicina. Gli antibiotici possono quindi indebolire la parete microbica e/o ridurre il numero di nucleasi periplasmatiche.

- Vettori antibiotico-indotti

Di norma gli antibiotici inibiscono la divisione cellulare, ma raramente bloccano i processi metabolici necessari all'acquisizione e distribuzione dei geni attraverso i plasmidi. Si parla quindi di "vettori morti", in quanto il farmaco impedisce alla cellula di riprodursi o definitivamente (agenti battericidi) o solo in presenza dell'antimicrobico (agenti batteriostatici), ma rimane attivo il processo di coniugazione e i geni di resistenza possono essere scambiati anche per un lungo periodo dopo la morte del batterio donatore. Sebbene alcuni chemioterapici inibiscano la coniugazione in certe circostanze, altri ne stimolano la frequenza proteggendo il metabolismo specifico che la permette dall'azione di altri antibiotici o riducendo le barriere allo scambio genetico.

### *Infedeltà molecolare*

Vari meccanismi biochimici (ad esempio gli enzimi di restrizione), classificano il DNA come "self" o "non self" e risultano di vitale importanza per prevenire mutazioni durante la replicazione degli acidi nucleici. Gli enzimi di restrizione degradano i segmenti che hanno perduto uno o più dei propri gruppi metilici, che vengono posti su certe basi in un ordine preciso, a seconda della sequenza; inoltre il DNA di nuova sintesi viene comparato con altre sequenze della stessa cellula, per accertarne l'omologia; i frammenti che violano le regole dei legami a idrogeno tra nucleotidi o la geometria elicoidale degli acidi nucleici vengono anch'essi eliminati. Allentare la rigidità di tali processi di controllo può risultare in un'evoluzione più rapida della resistenza.

- Stress continuo e antibiotici

Lo stress può rendere le cellule più recettive verso DNA proveniente dall'ambiente. Ad esempio, *Corynebacterium glutamicum* esposto al calore, etanolo o altri agenti denaturanti le proteine, può ricevere DNA da altri germi in maniera 100-1.000 volte più efficiente e il cloramfenicolo potenzia ulteriormente tale trasferimento. Probabilmente lo stress denatura gli enzimi che degradano il materiale genetico estraneo e l'antibiotico ne previene l'ulteriore sintesi, prolungando la permissività del batterio verso gli acidi nucleici estranei.

- Mutagenesi antibiotico-stimolata

Gli antibiotici che causano danni al DNA elevano in maniera diretta la frequenza di mutazione; tuttavia, anche i farmaci che modificano la fedeltà della traduzione aumentano il tasso di mutazione dei germi. ad esempio, la produzione di mutanti di *E. coli* in colture dove è presente la streptomina è maggiore rispetto ad ambienti che ne sono privi. Una spiegazione plausibile del fenomeno è data dalla produzione, per errori di traduzione, di DNA-polimerasi errate ma funzionanti, inclini a commettere errori durante la replicazione del genoma.

## **La selezione nello sviluppo e nel mantenimento di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti**

Un germe può essere resistente a tre o più classi di antibiotici

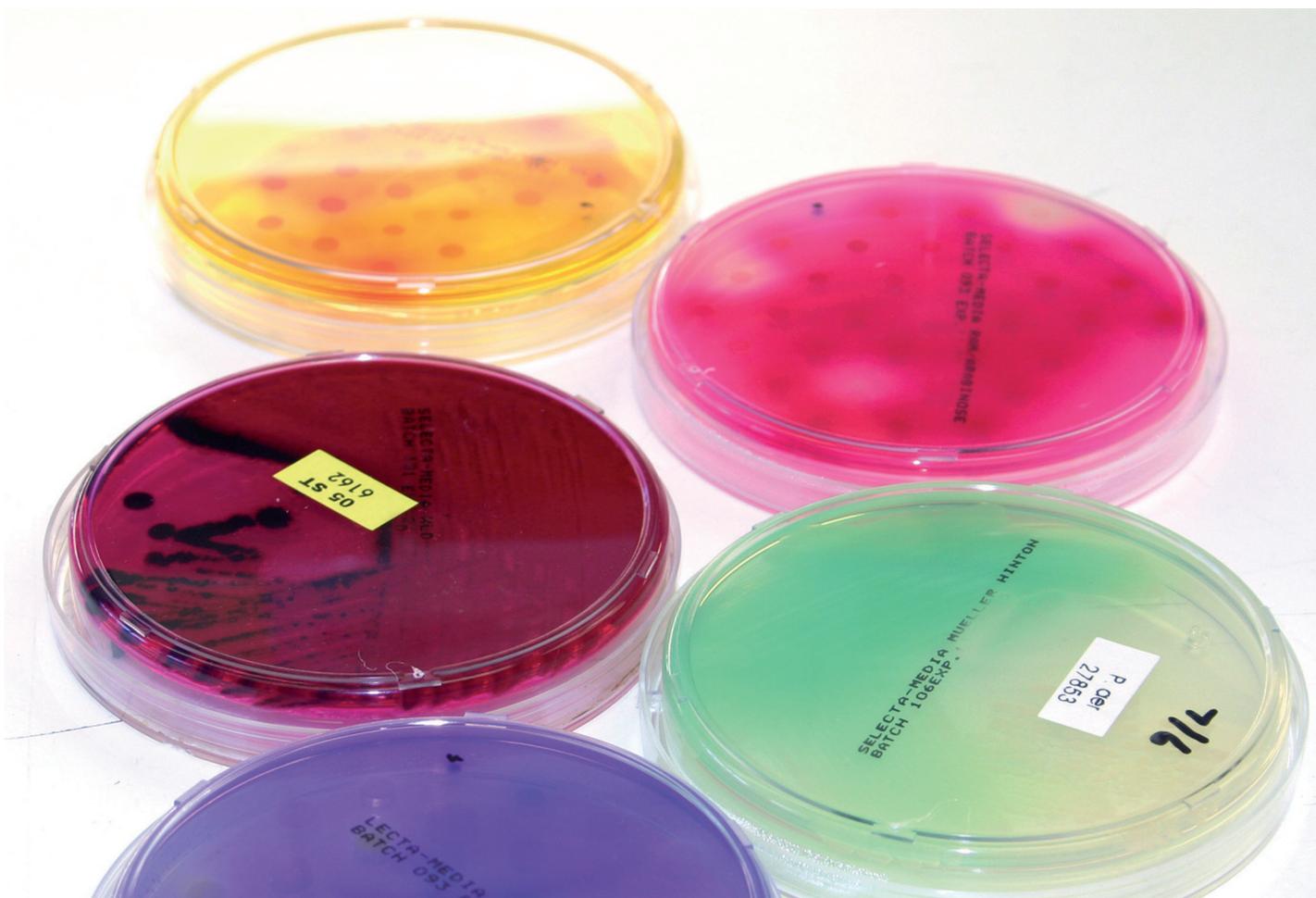
grazie a diversi meccanismi, generalmente codificati da geni differenti e questo fenomeno prende il nome di "multiresistenza". La resistenza a differenti antibiotici mediante lo stesso meccanismo è definita "cross-resistenza" e generalmente tali principi attivi appartengono tutti alla stessa classe di farmaci.

La multiresistenza viene attribuita all'acquisizione di trasposoni, integroni, plasmidi e non viene persa facilmente, nemmeno quando tali antimicrobici non vengono usati per un lungo periodo di tempo. Una ragione di questo fenomeno può essere rappresentata dal fatto che il gene permane in seguito all'uso di altri farmaci a cui il determinante è geneticamente correlato (co-selezione). Un'altra spiegazione potrebbe essere che il gene non sia "contro-selezionato" in assenza dell'antibiotico. Infatti, qualsiasi meccanismo di resistenza è associato a un costo di adattamento e le mutazioni che vengono fissate sono quelle compensatorie che alleggeriscono tale costo, senza compromettere la resistenza verso gli antimicrobici. L'evoluzione di resistenza avviene in maniera rapida quando all'interno della popolazione si verificano diverse mutazioni o comunque, di largo effetto; viceversa l'adattamento procederà lentamente nel caso in cui le mutazioni siano poche o con un effetto poco significativo [17]. Le basi molecolari della resistenza e le dosi di antibiotico a cui i germi vengono sottoposti giocano un ruolo importante nel determinare mutazioni benefiche per i batteri. La selezione verso la resistenza se si utilizzano basse dosi di antibiotico, che inibiscono solo parzialmente la crescita dei batteri sensibili, è debole e solo le mutazioni con un basso costo di adattamento provocano a chi le possiede un vantaggio nei confronti degli altri microrganismi. Se i germi vengono sottoposti a dosi di farmaco tali da inibire la crescita di batteri sensibili invece, qualsiasi mutazione che aumenti la resistenza sarà benefica, al di là del costo che comporta. Un altro parametro importante da valutare è la struttura dell'antibiotico in questione: se la flessibilità conformazionale del farmaco è bassa, ogni mutazione che alteri la struttura del sito di legame nella proteina bersaglio risulterà in un aumento di resistenza considerevole, mentre se tale flessibilità è alta, solo un piccolo gruppo di mutazioni che interferiscono direttamente con il legame farmaco-proteina porterà un beneficio significativo al germe.

Ogni mutazione è associata a un costo: la resistenza cromosomica si acquisisce per alterazione della struttura, della funzione o dell'espressione di enzimi importanti per la fisiologia cellulare che possono quindi assolvere in maniera meno efficiente i propri compiti; mentre il trasporto dei plasmidi aggiunge un carico metabolico alla cellula e può creare un conflitto intragenomico tra i geni cromosomici e quelli degli elementi mobili. Tali costi di adattamento sono responsabili della rigidità di selezione contro le mutanti resistenti in seguito alla sospensione del trattamento. Il costo della resistenza cromosomica comunque, può variare largamente considerando mutazioni diverse che conferiscono resistenza verso un unico farmaco oltre che nei confronti di antibiotici differenti. I bat-

teri inoltre, possono adattarsi al costo della resistenza subendo e fissando delle mutazioni compensatorie che rimediano parzialmente o totalmente ai danni causati dalla prima selezione, senza compromettere la resistenza. I meccanismi di questo fenomeno possono essere diversi: la funzione dell'enzima alterato può essere ristabilita grazie a nuove mutazioni *intra* o *extra*-genetiche; la perdita della funzione enzimatica può venire controbilanciata dall'amplificazione genica, la quale aumenta la concentrazione di enzima nella cellula; la richiesta dell'enzima bersaglio può essere alleviata dall'aumento dell'espressione di proteine associate a vie metaboliche alternative. Il tasso di adattamenti compensatori spesso differisce tra mutazioni che conferiscono resistenza allo stesso antibiotico, questo perché mutazioni differenti hanno accesso a un numero diverso di adattamenti compensatori: ad esempio tutti gli aminoacidi in una proteina danno un certo contributo alla stabilità termodinamica della sua struttura e circa il 20% delle mutazioni portano a un moderato aumento della stabilità, diversamente, solo pochi aminoacidi contribuiscono direttamente al dominio catalitico delle proteine, suggerendo un potenziale di adattamento assai più ristretto quando il costo di resistenza dipende da tali mutazioni. Un'altra soluzione al costo della resistenza è rappresentata dalla

reversione della mutazione, che tuttavia si verifica più raramente rispetto alla compensazione, probabilmente perché ci sono diversi possibili adattamenti compensatori per ogni mutazione di resistenza. Inoltre, una volta insorte le mutazioni di compensazione, la reversione sarebbe svantaggiosa in quanto, i benefici acquisiti sono effettivi solo in presenza della mutazione che compensano. Le condizioni ambientali influenzano sia il tasso di mutazione, sia il costo di resistenza e le mutazioni compensatorie. Ad esempio in caso di trattamento con più di un farmaco, quando si verifica un'interazione di antagonismo tra gli antibiotici (gli antimicrobici mascherano l'uno l'effetto dell'altro), fissare una mutazione che conferisca resistenza a un solo principio attivo porterà uno scarso beneficio, smascherando l'effetto inibitorio del secondo chemioterapico; diversamente in caso di interazione sinergica (gli antibiotici aggravano l'uno l'effetto dell'altro), dove la resistenza verso un principio allevierà l'effetto inibitorio di un farmaco ed eliminerà la sinergia con l'altro. Al contrario, considerando le interazioni tra i costi delle mutazioni: rapporti di antagonismo (le mutazioni alleviano l'una il costo dell'altra) promuovono l'evoluzione di resistenza multipla riducendone i costi e sono le più diffuse, mentre il sinergismo (le mutazioni aggravano l'una il costo dell'altra) contrasta lo sviluppo di tale resistenza.



Tuttavia, se i costi sono sinergici, compensare per il costo di resistenza a un antibiotico comporta anche l'eliminazione del costo addizionale della resistenza multipla e avrà un largo effetto, mentre se sono antagonisti compensare per uno di loro aggraverà l'altro, risultando in un basso tasso di adattamento. Il livello di antibiotici varia nello spazio e la migrazione dei batteri in ambienti diversi può anch'essa influenzare l'evoluzione della resistenza in positivo o in negativo, anche se generalmente la promuove. Naturalmente la resistenza si diffonde in aree in cui ci sia una forte selezione da antibiotici, soprattutto grazie al trasferimento orizzontale di geni; diversamente la migrazione ostacola lo sviluppo di resistenza se porta alla competizione tra batteri sensibili e mutanti resistenti con una crescita stentata in ambienti liberi da antibiotici. La relazione tra migrazione e resistenza comunque, differisce tra antibiotici e lo spostamento ha un effetto minore quando le mutazioni sono prontamente disponibili. Infatti, se l'acquisizione di mutazioni è un fattore limitante per l'evoluzione di resistenza perché ci sono poche mutazioni, con scarso effetto, la migrazione aumenterà l'evoluzione di resistenza; se invece le mutazioni sono facili da ottenere, di largo effetto ma costose, la migrazione in aree con popolazione batterica suscettibile ostacolerà l'evoluzione della resistenza. Inoltre, la migrazione di batteri sensibili può provocare la reversione della resistenza in seguito alla cessazione dell'esposizione all'antibiotico, in dipendenza dal tasso di fissazione delle mutazioni.

In conclusione, maggiore è il tasso di variazione ambientale sperimentato dai batteri, minore è la possibilità della resistenza di evolvere. Riguardo il rapporto tra concentrazione di farmaco e resistenza, c'è un intervallo di dosaggio di antimicrobico all'interno del quale gli organismi con una sensibilità ridotta hanno un vantaggio rispetto agli altri [12]. Drlica and Zhao [10] hanno definito questa MSW (finestra di mutazione selezione) da tre concentrazioni:

- la MIC dello stipite selvaggio;
- la concentrazione superiore alla MIC dello stipite selvaggio dove si riscontra una fase di plateau nell'uccisione del germe dovuta alla sopravvivenza della sottopopolazione microbica meno suscettibile;
- la concentrazione che uccide anche i batteri più resistenti (MPC).

Concentrazioni di antimicrobici poste tra il valore MIC e MPC risiedono nella finestra e favoriscono la selezione di mutanti resistenti e la perdita di efficacia del farmaco nel tempo. Riguardo la durata dell'esposizione agli antibiotici, dovrebbe essere abbastanza limitata da evitare l'eradicazione della popolazione suscettibile di germi, fenomeno che favorirebbe la crescita dei batteri resistenti, privi di qualsiasi tipo di contro-selezione [6]. L'uso degli antibiotici influenza quindi la selezione di meccanismi di resistenza batterica e poiché l'uomo condivide alcuni patogeni con gli animali da reddito (dove possono causare malattia o meno), si è frequentemente affermato che particolari modelli di resistenza rinvenuti nei patogeni umani derivino dall'utilizzo di farmaci in Veterinaria.

## È corretto ricondurre tutto all'uso e abuso degli antibiotici?

A questo proposito, l'impiego di antibiotici come promotori di crescita in zootecnia è stato vietato in Europa [21]. Tuttavia, ci sono autori che non ritengono l'uso di antibiotici negli animali da reddito un pericolo per la salute pubblica perché il suo ruolo nella selezione o diffusione di ceppi resistenti è basso o nullo o che tali situazioni, se esistono, rappresentano un rischio minimo per la salute umana [5; 6; 21], mentre altri hanno una visione differente. Tale aperto dibattito riflette la difficoltà associata all'assegnazione di una relazione di causalità tra la mancata suscettibilità alla terapia di patogeni umani e l'uso di antibiotici negli animali. Scoperte recenti supportano l'ipotesi che certi agenti antimicrobici possano contribuire alla prevalenza di resistenza mediata da plasmidi e cromosomica in batteri che infettano sia gli esseri umani che gli animali [26]. Il problema è che l'uso indiscriminato di farmaci negli animali risulti nel trasferimento di batteri resistenti e geni di resistenza ai patogeni umani. Tuttavia [25] hanno analizzato i cambiamenti nel manifestarsi di resistenza in *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium ottenuta da infezioni umane in Inghilterra e Galles (2000, 2002 e 2004) mostrando che l'incidenza di ceppi di *S. Enteritidis* resistente all'acido nalidixico e alla ciprofloxacina era più che raddoppiata tra il 2000 e il 2004, mentre i livelli complessivi di resistenza di *S. Typhimurium* erano calati del 25%.

Tali dati dimostravano che le variazioni di resistenza non erano legate all'uso di farmaci in veterinaria (come dimostrato dalla valutazione delle vendite di medicinali veterinari nel Regno Unito), ma piuttosto:

- per *S. Enteritidis* l'aumento di resistenza era dovuto ai viaggi all'estero e all'importazione di cibo contaminato con ceppi resistenti.
- per *S. Typhimurium* il fattore più importante era il cambiamento della prevalenza dei sierotipi, con declino del fagotipo multiresistente 104.

Gli autori hanno concluso ritenendo i cambiamenti nell'incidenza di resistenza dei fenomeni multifattoriali. Wassenaar e Silley [27] hanno analizzato i profili di suscettibilità di alcuni patogeni umani, animali e che possono infettare entrambi gli ospiti. Dal loro esame di *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, è risultato che i profili di resistenza di *Salmonella* sembravano essere fortemente correlati alle sierovarianti; inoltre la multiresistenza è un problema maggiore nei patogeni umani piuttosto che in quelli veterinari, sebbene i patogeni isolati da esseri umani e animali sembrano avere una maggiore incidenza di resistenza rispetto a quelli esclusivamente animali.

Nonostante le opinioni differenti, la maggior parte degli studiosi ritiene sia importante minimizzare il rischio potenziale di antibiotico-resistenza attraverso un utilizzo mirato degli antibiotici in medicina umana così come in veterinaria e la riduzione della contaminazione microbica delle derrate alimentari. Infatti, l'utilizzo di antibiotici negli animali da reddito può incentivare il passaggio di batteri antibiotico-resistenti dal bestiame agli alimenti e alla catena di distribuzione.

## Batteri antibiotico-resistenti negli alimenti

L'ipotesi che la diffusione di batteri antibiotico resistenti dagli animali agli alimenti e alla catena di distribuzione sia in rapporto all'utilizzo profilattico degli antibiotici è comunemente accettata [4; 8]. Più recente è l'ipotesi che anche i disinfettanti possano essere alla base del fenomeno dell'antibiotico-resistenza [28]. Esistono segnalazioni relative all'isolamento di stipti di *S. aureus* e *S. epidermidis* resistenti a diversi antibiotici e in possesso di resistenza, mediata da plasmidi, ad agenti cationici quali la clorexedina e i sali quaternari di ammonio [22]. Altri esempi riguardano stipti di *E. coli* resistenti a comuni disinfettanti domestici [18] e il crescente numero di microrganismi resistenti ai trattamenti effettuati nelle industrie alimentari con composti a base di cloro [11]. In ogni caso, l'eventuale presenza di stipti di batteri antibiotico-resistenti negli alimenti di origine animale, a nostro avviso, obbliga a due tipi di considerazioni. In primo luogo va tenuto presente che se batteri responsabili di malattie alimentari acute di tipo infettivo acquisiscono caratteri di antibiotico-resistenza, le difficoltà nel trattamento terapeutico possono rendere molto grave anche una banale tossinfezione. Prendiamo ad esempio l'enterocolite da *Salmonella* spp.. Questa è in genere un'infezione autolimitante [19] e ampicillina, cloramfenicolo e trimetoprim-sulfametoxazolo sono gli antibiotici d'elezione. Tuttavia, la crescente diffusione di stipti resistenti a uno o più di questi prodotti tradizionali ha obbligato i medici a ricorrere ai chinoloni, soprattutto per il trattamento della malattia sistemica [9]. L'impiego, forse eccessivo dei chinoloni, ha portato in breve alla selezione di stipti resistenti. La distribuzione di alimenti di origine animale sempre più a carattere internazionale e intercontinentale ha portato alla diffusione di sierotipi di *Salmonella* in tutto il mondo. È facile concludere che la distribuzione ubiquitaria di *Salmonella* nell'ambiente, la sua presenza nell'intera catena alimentare e la capacità di adattamento mostrata, unitamente all'emergenza di stipti antibiotico-resistenti, obbligano le autorità sanitarie a una continua vigilanza e a controlli sempre più intensi a tutti i livelli della produzione di alimenti [9]. Altro aspetto, non meno importante, anzi più subdolo è la funzione di vettore che l'alimento può svolgere nella diffusione nell'ambiente di batteri antibiotico resistenti. Vi sono infatti microrganismi ampiamente diffusi negli alimenti di origine animale, senza che questo rappresenti un pericolo per il consumatore, sottoforma di malattia alimentare. Ci riferiamo ad esempio agli enterococchi nei salumi o agli stafilococchi nei prodotti lattiero-caseari. Tali germi raggiungono il tratto gastro-enterico umano tramite il consumo di alimenti, potendo trasmettere determinanti genetici di resistenza ai batteri commensali della flora microbica intestinale e a microrganismi patogeni eventualmente presenti a quel livello. Si tratta inoltre, di batteri responsabili di infezioni ospedaliere difficilmente curabili quando sostenute da stipti antibiotico-resistenti, soprattutto alla vancomicina e alla meticillina [2; 23] Tra gli enterococchi non figurano specie responsabili di

malattie alimentari [7] tuttavia l'emergenza di stipti antibiotico resistenti in ambito veterinario, e la diffusione di questi nell'ambiente, attraverso gli alimenti di origine animale, è una possibilità che va tenuta in debita considerazione [5]. L'alimento considerato idoneo per la vendita e il consumo può infatti circolare liberamente rappresentando una potenziale fonte di microrganismi antibiotico-resistenti.

## Strategie per il controllo

I meccanismi per il controllo della diffusione di stipti antibiotico resistenti vanno da provvedimenti ovvi, quali l'adozione di elevati standard igienici negli ospedali e negli allevamenti, a vere e proprie sfide per gli scienziati, quali la messa a punto di nuove molecole antibiotiche. In primo luogo è però necessario limitare l'utilizzo di antibiotici come promotori di crescita nei paesi in cui ne è ancora consentito l'utilizzo. Nel settore della produzione e trasformazione degli alimenti, il controllo della diffusione di batteri resistenti agli antibiotici si attua sia attraverso le note misure per limitare lo sviluppo batterico e prevenire l'adesione batterica sulle superfici, sia con l'adozione della cosiddetta esclusione competitiva [3]. I mezzi per prevenire lo sviluppo di batteri resistenti sulle superfici dovrebbero condurre alla diminuzione dell'impiego di disinfettanti, soprattutto attraverso l'utilizzo di superfici e materiali specifici. Spesso la cosiddetta "microtopografia" di una superficie rende difficoltose le operazioni di pulizia, allorché fessure e altre imperfezioni impediscono la rimozione dei batteri. È per questa ragione che i materiali sono scelti in virtù delle loro capacità di resistere agli urti e alla corrosione. È ovvio che in presenza di materiali scadenti o di apparecchiature dal cattivo design le operazioni di pulizia non sortiscono l'effetto desiderato (rimozione dei batteri) e rendono necessario l'impiego di massicce dosi di disinfettante. Uno strumento ancora in via di perfezionamento, ma che potrebbe rendere l'utilizzo dei disinfettanti sulle superfici obsoleto, è l'utilizzo di un film protettivo sulle superfici. Si tratta di peptidi ad attività antimicrobica, quali la nisina, che una volta adsorbiti dalle superfici diminuiscono l'adesione batterica e quindi la contaminazione [3].

## Conclusioni

L'aumento e la diffusione di resistenza batterica agli antimicrobici è un'espressione naturale dell'evoluzione: maggiore è l'utilizzo di una molecola, maggiori sono le probabilità che i microrganismi acquisiscano resistenza. In generale il fenomeno è più evidente nel caso degli antibiotici, piuttosto che dei comuni disinfettanti. Esiste, tuttavia, la possibilità che l'esposizione dei batteri a concentrazioni soglia di disinfettante conduca alla selezione di specie resistenti, non solo verso quel determinato composto, ma anche verso molecole antibiotiche. La natura e la trasmissibilità del DNA giustificano la preoccupazione che i determinanti della resistenza possano diffondersi nell'ambiente, anche a specie batteriche non correlate a quelle originarie. I livelli di intervento per diminuire

la pressione selettiva esercitata dagli antibiotici in campo veterinario sono stati precisamente codificati negli ultimi anni e prevedono, come visto, sia considerazioni sull'opportunità di determinati impieghi, sia lo studio di nuove molecole. Nel settore dell'industria alimentare, soprattutto di quella di trasformazione degli alimenti di origine animale, il controllo dei batteri causa di malattie alimentari andrebbe associato all'applicazione dei mezzi descritti in questo articolo, allo scopo di prevenire anche lo sviluppo e la diffusione di microrganismi antibiotico-resistenti.

## Bibliografia

1. Alibayov B, Baba-Moussa L, Sina H, Zdenkova K, Demnerova K. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. Mol Biol Rep, 2014.
2. Berman D, Eisner W, Kreiswirth B. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. The New England Journal of Medicine. 1993; 329: 25.
3. Bower C, McGuire J, Daeshel M. Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. J. Ind. Microbiol. 1995; 115: 227-233.
4. Cambiotti V, Cenci Goga B, Sechi P, Parmegiani S. (2011). Confronto tra stipiti di enterococchi resistenti alla tetraciclina isolati da feci di pecore allevate nella zona del parco nazionale dei monti sibillini e formaggi tipici della stessa area geografica. Italian Journal of Food Safety. 2012; 1 (4): 43-45.
5. Cenci Goga B, Crotti S, Costarelli S, Rondini C, Karama M, Bennett P. Detection of tet (M) gene from raw milk by rapid DNA extraction followed by a two-step PCR with nested primers. J Food Prot. 2004; 67 (12): 2833-2838.
6. Cenci Goga B, Sechi P, Catanese B. Resistenza alla tetraciclina in stipiti di enterococchi isolati da feci di cervo (*Cervus elaphus*) in un parco nazionale a confronto con stipiti di enterococchi isolati da feci di pecore allevate: uno studio trasversale. IJFS. 2010; XX: 125-129.
7. Cenci Goga B, Trevisani M. In -Concerted Action CT94-1456, Factors affecting the microbial quality of meat, 4. Microbial methods for the meat industry, University of Bristol Press UK. 1996; (4): 83-87.
8. Cenci-Goga B, Sechi P, Cambiotti V, Parmegiani S, Baldinelli C. (2012) Studio preliminare sulla prevalenza di *Escherichia coli* in linfonodi di carcasse bovine. Atti SISVet. 2013: 382-384.
9. D'Aoust J. Salmonella and the international food trade. Int. J. Food Microbiol. 2014; 24 (1-2): 11-31.
10. Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. Clin Infect Dis. 2007; 44(5): 681-688.
11. Dychdala G. Chlorine and chlorine compounds. In: Block, S. (E.), Disinfection, Sterilization and Preservation (4<sup>th</sup> e. Lea & Febiger, Malvern, PA),. 2000; 1191.
12. Gatto MR, Vaquero M, Comastri G, Possati MV. [Epidemiology of urinary infections. II. Time course of resistance to antibiotic drugs]. Nuovi Ann Ig Microbiol. 1984; 35(2): 87-112.
13. Griffith F. The significance of pneumococcal types. Journal of Hygiene. 1928; 27: 113-159.
14. Heinemann J. Genetic evidence of protein transfer during bacterial conjugation. Plasmid. 1999; 41: 240-247.
15. Heinemann J. How antibiotics cause antibiotic resistance. D.D.T. 1999; 4; 72-79.
16. Ma H, Bryers J. Non invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013; 97 (1): 317-328.
17. Mc Lean R, Hall A, Perron G, Buckling A. The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. Nature reviews genetics. 2010; 11: 405-414.
18. Moken M, McMurry M, Levy L. Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. Antimicrob. Agents Chemoter. 1997; 41: 2770-2772.
19. Mossel D, Corry J, Struijk C, Baird R. Essentials of the microbiology of foods. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Regno Unito. 1995; xx: 699.
20. Nathwani D, Eckmann C, Lawson W, Stephens JM, Macahilig C, Solem CT, Simoneau D, Chambers R, Li JZ, Haider S. Pan-European early switch/early discharge opportunities exist for hospitalised patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* complicated skin and soft-tissue infections. Clin Microbiol Infect, 2014.
21. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy. 2004; 53: 28-52.
22. Russel A. Plasmids and bacterial resistance to biocides. J. Appl. Microbiol. 1997; 83: 155-165.
23. Smith T, Pearson M, Wilcox K, Cruz C, Lancaster M, Robinson-Dunn, B, Tenover F, Zervos M, Band J, White E, Jarvis W. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N. Engl. J. Med. 1999; 340 (7): 493-501.
24. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(3); 283-288.
25. Threffal E, Ward R, Frost J, Willshaw G. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2000; 62: 1-5.
26. Turner MS, Andersson P, Bell JM, Turnidge JD, Harris T, Giffard PM. Plasmid-borne bla<sub>SHV</sub> genes in *Klebsiella pneumoniae* are associated with strong promoters. J Antimicrob Chemother. 2009; 64(5): 960-964.
27. Wassenaar TM, Silley P. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria: lessons learned from host-specific pathogens. Anim Health Res Rev. 2008; 9 (2): 177-186.
28. White D, McDermott P. Biocides, drug resistance and microbial evolution. Current opinion in microbiology. 2001: 313-317.