

**ATTI DEL CONVEGNO NAZIONALE SU:
LE SALMONELLOSI IN ITALIA**

Roma, Istituto Superiore di Sanità, 29-30 aprile 1976

a cura di:

A. ZAMPIERI

Relazione introduttiva

F. POCCHIARI

Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel darvi il mio più caloroso benvenuto desidero ricordare l'incontro che esattamente due anni fa ho avuto con tutti voi per trarre un bilancio generale dell'infezione colerica e per analizzare, in base all'indagine compiuta insieme con voi, le possibilità di una eventuale epidemia o di ricomparsa estiva del colera, sulle nostre coste. Le conclusioni di allora — pur tenendo conto di un rischio calcolato che ci ha posto in uno stato di preallarme — furono cautamente ottimistiche e, a distanza di più di un anno, gli eventi successivi ci diedero pienamente ragione.

Oggi affrontiamo — di nuovo insieme — il problema delle salmonellosi, che in Italia propone gli stessi problemi dei Paesi ad alta industrializzazione e cioè un incremento sempre più rapido di tossinfezioni alimentari dovute all'organizzazione industriale delle catene alimentari, al moltiplicarsi degli allevamenti intensivi, al sempre più esteso impiego di mense per collettività; tutte queste tecnologie consumistiche aumentano i fattori di rischio per tali eventi morbosi. Non vorrei che questo problema venisse trattato da una «epidemiologia emotiva», ma mi auguro che, dopo una corretta valutazione dei dati, si decidano in questa sede i provvedimenti necessari ed urgenti anche per ridimensionare il problema,

Devo però aggiungere che l'alta prevalenza della febbre tifoide, che nel 1974 aveva avuto proprio nelle regioni a più alta epidemia una drastica riduzione e faceva presumere un declino costante, nel 1975 ha avuto una ripresa consistente e i primi dati del 1976 lo confermano. Questi dati preoccupanti rivelano situazioni ambientali e carenze di intervento che dobbiamo chiarire, anche perché il costo della salute è molto più alto dei costi apparenti della malattia.

Scopo di questo Convegno è pertanto quello di studiare una metodologia adeguata per affrontare con consapevole responsabilità i problemi connessi con questa patologia infettiva e proporre modelli di intervento fattibili e concreti. L'Istituto, nell'ambito delle sue possibilità, sta adeguando le sue strutture per fornire un servizio di collegamento con gli enti regionali,

trasmettere con tempestività i dati epidemiologici ricevuti dagli enti locali, elaborare ipotesi di intervento immediato nei casi di emergenza o per particolari indagini mirate.

È ovvio che in questa prospettiva è necessaria una stretta collaborazione tra noi e le regioni e tra le regioni e gli enti locali. I centri attivi di una epidemiologia concepita in senso scientifico e attuale si stanno muovendo oggi in Italia in un ambito non ancora sistematizzato e razionalmente correlato; la nostra funzione è quella di facilitare questa correlazione multipla attraverso una efficiente organizzazione di informazioni reciproche, ridimensionando anche le tendenze troppo individualistiche che sono la contraddizione di una corretta metodologia epidemiologica.

L'invito agli esperti ed ai rappresentanti regionali che l'Istituto rivolge ormai sistematicamente in questi ultimi anni ha proprio questo scopo: esaminare insieme, anche in senso dialettico e sotto visuali diverse, i problemi per proporre, insieme soluzioni valide.

Quadro delle salmonellosi nel mondo

R. VANNUGLI

Ministero della Sanità, Roma

Come noto, le salmonelle sono diffuse in tutto il mondo: nessun Paese può dirsi immune. Esse contaminano l'ambiente nel più vasto senso del termine, si ritrovano nei mangimi degli animali e negli alimenti dell'uomo, provocando in questi uno stato di infezione, vengono quindi riversate nei liquami donde si diffondono nell'ambiente contaminando le acque e gli alimenti, in un ciclo continuo che è estremamente difficile interrompere.

Un quadro della diffusione delle salmonelle nel mondo può ricavarsi dai dati che vengono segnalati dai diversi Paesi all'Organizzazione Mondiale della Sanità, che li raccoglie e li pubblica periodicamente sul « *Relevé épidémiologique hebdomadaire* », sia sotto forma di notizie su particolari epidemie e reperti, sia in quadri riassuntivi, come quello che viene riportato in Tab. 1. Come si vede, ritrovamenti di salmonelle vengono segnalati dai Paesi più diversi, sia per condizioni climatiche, sia per situazione socio-economica e quindi di livello sanitario raggiunto. Figurano infatti nella tabella una serie di Paesi che vanno dal Senegal alla Finlandia. È evidente che questi dati, sul piano quantitativo, non riflettono la situazione reale, ma comprendono soltanto quei casi che vengono alla conoscenza dell'autorità sanitaria di ciascun Paese: essi non sono quindi comparabili ma possono dare soltanto delle indicazioni sulla portata del fenomeno.

Dall'esame di questi dati si possono però ricavare degli aspetti di grande interesse: a parte la frequenza relativa dei diversi sierotipi nei diversi Paesi e la loro tendenza all'aumento o alla diminuzione, si è constatata la grande mobilità delle salmonelle, veicolata dall'enorme scambio internazionale di persone e di alimenti, destinati sia all'uomo che agli animali. Sierotipi dapprima sconosciuti in un determinato Paese vengono sempre più frequentemente riscontrati, sia per l'importazione di carni, di animali da macello, di mangimi, di alimenti, sia introdotti da persone infettatesi durante un soggiorno all'estero.

Numero di ceppi di *S. typhi*, *S. paratyphi B* ed altri sierotipi di partecipanti al « Programma di sorveglianza »

CENTRES		<i>S. typhi</i>					
		1973		1972	1971	1970	1969
		Rank Rang	Freq. quocient Fré- quencer				
Centres that have participated for at least three years Centres ayant participé au moins trois ans	Austria — Autriche	7	25	170	21	36	51
	Belgium — Belgique	10	38	30	42	24	36
	Bulgaria — Bulgarie		9	19	19	23	25
	Denmark — Danemark	4	13	16	3
	Finland — Finlande	9	12	..	9	8	12
	France	7	143	57	82	87	141
	Greece — Grèce	2	45	34	22	4	39
	Israel — Israël	7	97	126	104
	Italy — Italie	2	576	281	380	278	294
	Luxembourg	6	1	1	4	1	..
	Malaysia — Malaisie	2	148	261	221
	Netherlands — Pays Bas	13	43	40	41	30	35
	Norway — Norvège	11	2	1	..	4	3
	Romania — Roumanie	11	305	249	260	262	341
	Spain — Espagne	2	18	5	18
Sweden — Suède		9	..	8	
Yugoslavia — Yougoslavie (e) (Belgrade)	10	22	78	81	124	145	
(Novi Sad)	4	23	9	16	
(Zagreb)	5	(f) 81	74	..	176	292	
Centres that have participated for less than three years Centres ayant participé moins de trois ans	Burma — Birmanie	1	92	66
	Lebanon — Liban	1	90	131
	New Zealand — Nouvelle- Zélande	7	10	10
	Senegal — Sénégal	2	113	126
	Thailand — Thaïlande	1	213	132
	United Kingdom — Royaume- Uni						
	(Scotland — Ecosse)	13	7	9
	Upper Volta — Haute Volta	1	61	55
	USA — États-Unis d'Amérique	8	680	535

(a) The annual number of isolations for one or other of these serotypes may not always reflect the true total for show only the first 15 main serotypes isolated and it could be that a serotype, although present, does not appear among indicated ne reflète pas le total exact des isolements effectués pendant l'année. Ceci est dû au fait que les totaux de serotypes isolés; il se peut donc qu'un serotype, bien que présent, n'apparaissent pas dans une ou plusieurs de ces

(b) Including *S. paratyphi A*: Two isolations in Austria, five in Belgium, one in Denmark, 17 in France, five in America, unspecified number in Vojvodina (Novi Sad Centre), and one in Croatia (Zagreb Centre). — Y compris en Malaisie, trois aux Pays-Bas, un en Norvège, 63 en Thaïlande, 20 aux États-Unis d'Amérique, nombre non précisé

(c) Not included one *S. paratyphi B* (case diagnosed on epidemiological ground only). — Non compris un *S. para-*

(d) Including *S. paratyphi C*: Four isolations in Senegal, one in Spain, and five in Upper Volta. — Y compris

(e) Belgrade Centre covers Serbia, Novi Sad Centre covers Vojvodina Province, and Zagreb Centre covers Croatia, Vinca de Vojvodine, et celui de Zagreb la Croatie, la Bosnie-Herzégovine, le Monténégro et la Slovénie

(f) Not included five *S. typhi* (cases diagnosed on epidemiological ground only). — Non compris cinq *S. typhi*

(g) Not included two *S. paratyphi B* (cases diagnosed on epidemiological ground only). — Non compris deux

— Zero. — Zéro.

... Figure not specified under the WHO Salmonella Surveillance

TABELLA I

salmonelle isolati dall'uomo (a). Notificazioni da 27 Centri Nazionali
internazionale sulle salmonelle » dell' O M S.

1973		<i>S. paratyphi B</i>				Other Serotypes - Autres sérotypes				
Rank	Fre- quency	1973	1971	1970	1969	1973	1972	1971	1970	1969
Rank	Fré- quence									
4	82	86	112	122	623	(b) 892	1.546	636	766	555
	5	—	16	13	18	(b) 4.743	4.106	4.674	4.017	3.966
	1	3	—	4	6	1.776	2.213	2.862	1.785	2.096
7	10	16	17	(b) 404	268	340
5	38	62	54	54	89	1.469	2.267	1.598	2.410	1.413
9	115	101	106	64	118	(b) 5.500	3.923	3.489	2.765	2.642
3	9	148	25	—	71	225	127	104	82	104
13	32	29	16	2.499	2.701	2.117
10	95	52	101	129	60	3.887	1.536	1.544	1.614	546
	—	1	—	2	..	50	41	39	53	..
5	35	37	41	(b) 730	724	208
15	35	46	27	50	34	(b) 7.396	7.652	9.629	8.182	7.117
4	(c) 9	11	5	3	4	(b) 154	102	134	107	73
	..	—	—	—	21	7.449	7.799	7.819	7.212	5.265
3	16	5	3	(d) 57	52	87
11	22	55	40	1.919	1.756	2.019
13	9	8	28	39	46	1.413	1.015	1.397	1.004	494
	..	—	—	(b) 225	408	191
11	(d) 31	25	..	26	63	(b) 964	1.203	..	1.662	1.160
3	3	4	33	63
2	29	—	(b) 18	33
	..	2	435	355
	..	—	(d) 249	244
	3	1	(b) 439	641
5	19	20	919	855
	—	4	(d) 33	17
	160	208	(b) 25.853	25.367

the year. This is because the totals for some countries have been established on the basis of quarterly lists which usually these 15 in one or more quarters. — Il peut arriver que, pour l'un des sérotypes, le nombre annuel des isolements certains pays ont été établis sur la base de listes trimestrielles qui ne montrent habituellement que les 15 principaux listes trimestrielles.

Lebanon, three in Malaysia, three in the Netherlands, one in Norway, 63 in Thailand, 20 in the United States of *S. paratyphi A*: Deux isolements en Autriche, cinq en Belgique, un au Danemark, 17 en France, cinq au Liban, trois en Voïvodina (Centre de Novi Sad), et un en Croatie (Centre de Zagreb).

typhi B: (Diagnostic épidémiologique seulement).

S. paratyphi C: (Quatre isolements au Sénégal, un en Espagne, et cinq en Haute-Volta.

Bosnia-Herzegovina, Montenegro and Slovenia. — Le Centre de Belgrade couvre la Serbie, celui de Novi Sad la Pro-

(diagnostic épidémiologique seulement).

S. paratyphi B (diagnostic épidémiologique seulement).

Programme. — Chiffre non précisé dans le cadre du Programme OMS de Surveillance des Salmonelles.

(da: *Relevé Epidém. Hebd.* N. 9. 27 fév. 1976)

Quest'ultimo aspetto assume un'importanza sempre maggiore: basti pensare che nel corso di un anno (dall'aprile '73 al marzo '74) sono passati dall'aeroporto di Heathrow a Londra più di 20 milioni di passeggeri e che la Spagna ha ricevuto nel 1973 34 milioni e mezzo di visitatori, mentre i circuiti turistici toccano sempre nuovi e remoti Paesi, quali lo Zambia, la Nigeria, l'Afghanistan, le isole Mauritius e le Seychelles, il Madagascar, Ceylon, le Maldive. Le possibilità di trasporto di una salmonella da tali Paesi divengono quindi più frequenti.

Passiamo ora a vedere in dettaglio quali sono i dati che l'OMS raccoglie: essi comprendono:

- isolamenti di salmonelle nell'uomo, negli alimenti, negli animali, nei mangimi per animali, nell'acqua e nell'ambiente in genere;
- numero degli episodi epidemici nell'uomo e nelle epizoozie accertate e localizzate;
- casi individuali;
- numero dei casi mortali;
- ripartizione stagionale dei casi;
- ripartizione dei casi a seconda dei diversi generi di salmonelle;
- primi isolamenti sul piano nazionale o regionale;
- nuove fonti di infezione.

Si tratta, come si vede, di una massa importante di dati, senza dei quali non sarebbe possibile mettere in atto il « Programma di sorveglianza internazionale » che l'OMS sta ora svolgendo.

Questo programma ebbe inizio nel 1967 nella regione europea ed ora è esteso a tutte le regioni del mondo, con la partecipazione di più di 30 laboratori nazionali. Il suo fine ultimo è quello di assistere le amministrazioni nazionali, nella loro azione e sorveglianza epidemiologica e di controllo della diffusione delle salmonelle.

Un nuovo impulso a questa attività si è avuto con il programma misto FAO/OMS di sorveglianza delle epidemie di origine alimentare. All'inizio questo programma comprendeva tutti i tipi di infezione e di avvelenamento alimentare di origine biologica. In seguito apparve più pratico concentrare la sorveglianza sulle salmonelle, raccogliendo sistematicamente i dati sul loro rilevamento e la loro tipizzazione, secondo metodi standardizzati, raccomandati dall'OMS. È questo della standardizzazione dei metodi uno degli aspetti più positivi dell'attività dell'OMS; infatti la comparazione dei dati non è possibile se essi non sono rilevati con una metodologia uniforme, che sia adottata nei diversi laboratori nazionali che procedono agli isolamenti.

Con la vasta massa di informazioni raccolte dall'OMS sulla associazione di certi ceppi con determinati Paesi e determinate fonti di infezione, umane od animali, è stato possibile in diverse occasioni rintracciare il Paese di origine e la catena di trasmissione dell'infezione, usando come traccia epidemiologica il sierotipo od il tipo fagico della salmonella in questione, ed anche il suo spettro di resistenza agli antibiotici. Per citare alcuni di questi risultati, ricordiamo che si è constatato che i ceppi antibiotico-resistenti della *S. typhi* e di altre salmonelle hanno un elevato potenziale epidemico. È stato così possibile mettere in evidenza come l'importazione di una salmonella non precedentemente presente in un Paese conduce spesso ad una vasta diffusione nell'ambito del Paese stesso; particolarmente pericolosa è la situazione negli ospedali pediatrici, dove trova facile diffusione un'infezione introdotta da bambini ricoverati o da membri del personale ospedaliero che ritornano dalle vacanze passate in altri Paesi, portando con sé salmonelle appartenenti a ceppi resistenti agli antibiotici.

Per quanto riguarda le fonti di infezione, si trovano nei dati raccolti dall'OMS le fonti abituali, soprattutto la carne conservata ed il pollame che rimangono la principale fonte potenziale dell'infezione umana; la contaminazione di essi proviene in genere dagli alimenti per animali nei quali si isolano numerosi sierotipi. Salmonelle vengono inoltre isolate da una grande varietà di prodotti alimentari: vediamo alcuni esempi recenti segnalati in Paesi diversi: si sono avute delle epidemie da insaccati, specialmente da salciccie (Polonia e Stati Uniti), prosciutto (Francia e Nuova Zelanda); dato che si tratta di alimenti sottoposti a salatura, e che questa dovrebbe essere sufficiente a distruggere le salmonelle, si deve concludere che in questi casi essa non era stata fatta correttamente. Per quanto riguarda i polli e le loro carni, al di fuori della *S. gallinarum-pullorum* che non è stata isolata nell'uomo, i sierotipi più diffusi in diversi Paesi sono stati la *S. typhimurium*, la *S. enteritidis*, la *S. infantis*, la *S. montevideo*, la *S. braenderup*, la *S. thompson*, la *S. agona* e la *S. saintpaul*. Inoltre la *S. blockey* è stata isolata frequentemente in Romania, la *S. newport* in Israele, nella Germania Federale e nei Paesi Bassi; la *S. sofia* in Israele. Infine diverse batterie di polli furono contaminate, nel 1973 in Libano, dalla *S. chester*, che è un sierotipo raro, isolato per la prima volta in detto Paese, mentre la *S. indiana* è stata trovata in Danimarca e negli Stati Uniti, la *S. havana* in Nuova Zelanda e la *S. senftenberg* in Francia. Molti di questi sierotipi furono anche isolati dalle uova o da prodotti a base di uova; da ricordarsi gli isolamenti da polvere di uova riportati in Jugoslavia. Una grande varietà di salmonelle si trovano anche in altri animali da cortile o da allevamento, come i tacchini, in diverse parti del mondo, il che conferma l'importanza del pollame e dei volatili in genere nella diffusione delle salmonelle.

Una fonte di infezione che sta destando sempre più interesse è rappresentata dai frutti di mare, crostacei e bivalvi: si segnalano casi in Francia (*S. typhimurium*, *S. panama*, *S. anatum* e *S. heidelberg*), in Danimarca (*S. 4,12* nelle cozze), in Italia (*S. enteritidis*), in Malesia (*S. schwarzengrund*) ed in Tailandia (*S. derby*).

Una grande varietà di altre fonti di contaminazione viene menzionata da diversi Paesi. Così in Olanda sono stati isolati dai cani 18 sierotipi appartenenti a quelli più comuni sia nell'uomo che nei bovini. Analogamente sempre in Olanda diversi degli stessi sierotipi sono stati isolati nelle mosche. Altri animali riflettono la contaminazione dell'ambiente, come i topi, i ratti ed i porcellini d'India. Molte segnalazioni hanno attirato l'attenzione sulla frequenza di infezioni da salmonelle nelle tartarughe e negli uccelli, sia domestici che liberi.

Diversi alimenti da importazione sono risultati infetti: curioso il caso delle cosce di rana, importate in Francia ed in Lussemburgo e risultate contaminate da *S. javiana*, *S. stanley* e *S. newport*, sierotipi originari della Asia sud-orientale. Anche il latte non pastorizzato è stato trovato contaminato causando diversi episodi in Paesi dove viene consumato senza pastorizzazione (7 episodi in Scozia ed 1 negli Stati Uniti nel 1973). Si continuano inoltre a segnalare degli episodi associati al contatto con i bovini o con gli ovini nelle fattorie.

Non soltanto gli alimenti di origine animale sono fonte di contaminazione, ma anche quelli di origine vegetale: troviamo così segnalati riso, funghi, verdura conservata. In un episodio verificatosi in una caserma in Austria, l'alimento responsabile fu individuato nella polvere di piselli; negli Stati Uniti un episodio fu associato al consumo di pane indiano preparato in casa.

Di sempre maggiore importanza si rivela la sorveglianza dei liquami con periodici esami batteriologici. Così in Grecia si sono messi in evidenza dai liquami, accanto a quelli già noti, 24 sierotipi che non erano mai stati riscontrati nel Paese. I liquami rappresentano dunque un indicatore dei sierotipi di salmonelle che contaminano una popolazione.

I dati che sono stati sin qui riportati vogliono essere soltanto un esempio della massa di informazioni che pervengono all'OMS e che questa raccoglie, elabora e mette a disposizione dei Paesi membri. Ma questi esempi bastano a confermare quanto si è detto in apertura, sulla estrema diffusione delle salmonelle e la loro trasportabilità, in funzione del sempre maggiore movimento, tra Paesi anche i più lontani, di persone e di alimenti. La sorveglianza internazionale consente di segnalare le fonti, i nuovi sierotipi che fanno la loro apparizione in una regione, i modi di trasmissione, la possibilità ed i metodi di lotta. È questo un esempio, tra i tanti, dei benefici che possiamo e dobbiamo attenderci dalla cooperazione internazionale in campo sanitario.

Variabilità dell'antigene O e proprietà patogene di *Salmonella*

G. FALCONE e M. C. SERRA

Istituto di Microbiologia dell'Università di Pisa

È cognizione comune che i sierotipi di *Salmonella* a tutt'oggi isolati hanno raggiunto ormai una cifra elevatissima, non solo, ma che nuovi tipi compaiono in natura e che la distribuzione epidemiologica dei vari ceppi varia continuamente nel tempo. Pertanto da tale constatazione e dal fatto che anticorpi anti H non sembrano svolgere alcuna azione protettiva nelle infezioni da *Salmonella* [1 - 3] e che ceppi aflagellati non mostrano modificazioni delle loro proprietà patogene [4], si può ritenere che dal punto di vista dei rapporti con l'ospite, e quindi evolutivo, le variazioni dell'antigene flagellare siano di modesto significato, mentre di fondamentale importanza per la sopravvivenza e la diffusione del germe in natura sembra essere l'antigene O con la sua vasta gamma di variazioni [5]. Nell'ospite, infatti, i microrganismi tendono ad essere rapidamente eliminati dai tessuti e dal circolo, mentre la presenza di antigeni superficiali, come l'antigene O di *Salmonella*, può consentire la loro sopravvivenza e diffusione nell'ospite conferendo una maggiore resistenza alla fagocitosi e all'azione battericida del siero, a meno che non siano presenti anticorpi specifici verso quel determinato antigene superficiale. Si può pertanto ritenere che nel corso dell'evoluzione del genere *Salmonella* la pressione selettiva negli ospiti naturali abbia consentito una continua variabilità dell'antigene O [6].

D'altra parte, il fatto che la perdita per mutazione delle catene O specifiche del lipopolisaccaride renda avirulenta *Salmonella* [4, 7], ci induce a correlare in questo germe la struttura dell'antigene O con la patogenicità e quindi con la sua evoluzione.

Come è noto, la parete degli enterobatteri in genere, e quindi delle salmonelle in particolare, è costituita da un sottile strato di mureina, all'esterno del quale è situato il lipopolisaccaride la cui struttura è schematicamente rappresentata nella Fig. 1; esso consta di una frazione lipidica detta lipide A, alla quale è covalentemente legata una frazione polisaccaridica. Questa a sua volta è distinguibile in due regioni; la regione I che consiste in un polimero di unità oligosaccaridiche dette anche catene O specifiche o *repeating units*, le quali sono legate alla regione II o nucleo del polisaccaride.

La formula dell'antigene O di *S. typhimurium*, secondo lo schema di Kauffmann è (1), 4, (5), 12, essendo 4 e 12 i determinanti antigenici fondamentali che caratterizzano il gruppo, cioè la natura degli zuccheri che costituiscono le O repeating units, mentre 1 e 5 rappresentano fattori antigenici secondari modificanti l'antigene O di gruppo quali il legame glicosidico α 1-6 fra il glucosio e il galattosio [15, 16] ed il gruppo acetilico in posizione 2 dell'abequoso [17]. Un altro fattore secondario dell'antigene O riguarda il tipo di legame fra le varie repeating units come il fattore 15 del gruppo E [18, 19].

La Tab. 1, in cui è riportata la struttura delle O repeating units di alcune specie di *Salmonella*, mostra come nei gruppi B e D, ad esempio, ai quali appartengono i tipi più frequentemente isolati e più spesso associati ad in-

TABELLA 1

Schema della struttura delle O repeating units di sierogruppi di *Salmonella* di interesse medico

Sierogruppo	Specie	Antigene O	Struttura
A	<i>S. paratyphi</i> A	1,2,12	<pre> Par OAc Glc ↓ ↓ ↓ Man→Ram→Gal→ </pre>
B	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12	<pre> OAc-Abe Glc ↓ ↓ ↓ Man →β(1-4)→Ram→Gal→ </pre>
C ₁	<i>S. cholerae-suis</i>	6 ₂ ,7	<pre> ↓ Glc ↓ Man→Man→Man→Man→GlcNac </pre>
C ₂	<i>S. newport</i>	6 ₁ ,8	<pre> Abe Glc ↓ ↓ Ram→Man→Man→Gal→ </pre>
C ₃	<i>S. kentucky</i>	8,20	<pre> Abe Glc ↓ ↓ Ram→Man→Man→Gal </pre>
D ₁	<i>S. typhi</i>	9,12	<pre> Tiv OAc-Glc ↓ ↓ ↓ 2-Man →α(1-4)→Ram→Gal→ </pre>
D ₂	<i>S. stransbourg</i>	(9),46	<pre> Tiv ↓ 6α -Man→Ram→Gal→ </pre>
E ₁	<i>S. anatum</i>	3,10	<pre> OAc ↓ 6α -Man→Ram→Gal→ </pre>

fezioni sistemiche, tali unità contengono lo stesso trisaccaride al cui mannosio è legato un dideossiosio, mentre il gruppo E possiede lo stesso trisaccaride fondamentale ma senza dideossiosio legati lateralmente. È interessante notare che le specie del gruppo E sono meno frequentemente isolate e meno frequentemente associate con malattie sistemiche che non le specie del gruppo B e D. Da una recente rassegna di Kalterborn [20] si rileva infatti che su 550.000 isolamenti colturali il 95,6% delle specie apparteneva a 5 sierogruppi soltanto (B=47,1%; D=23,7%; C₁=13,3%; C₂=7,1%; E₂=4,4%).

Questi dati inducono a ritenere che la presenza di dideossiosio nella *O repeating unit* della parete delle salmonelle sia un elemento importante di patogenicità sebbene i gruppi B e D contengano anche specie di raro reperimento ed il sottogruppo C₁, che non ha dideossiosio nella sua *repeating unit*, includa *S. cholerae-suis* e *S. paratyphi C*. Alcune considerazioni potrebbero spiegarci perché i dideossiosio possono rappresentare un fattore di virulenza in *Salmonella*. Innanzitutto la loro reperibilità è estremamente rara in natura [21, 22] per cui è poco probabile che l'ospite infettato possieda anticorpi « naturali » verso di essi capaci di promuovere l'opsonizzazione del germe.

La presenza di composti chimici rari quali i dideossiosio sulla parete di alcune salmonelle potrebbe inoltre rendere poco probabile una risposta secondaria dell'organismo verso l'agente infettante anche in termini di immunità cellulare. Questa, infatti, potrebbe costituire un efficace meccanismo di controllo dell'infezione solo attraverso una rapida attivazione dei suoi meccanismi cellulari per risposta secondaria, la quale è resa estremamente improbabile da una costituzione antigenica del germe che sia difficilmente reperibile in altre strutture naturali con le quali l'ospite può essere venuto a contatto in precedenza. L'associazione dei dideossiosio con la virulenza delle salmonelle potrebbe inoltre essere attribuita, in via speculativa, anche al loro carattere fortemente lipofilo per cui la fagocitosi ne sarebbe inibita [23].

A conferma dell'ipotesi che la patogenicità di *Salmonella* sia correlata alla presenza e alla struttura dell'antigene O vi è un'ulteriore serie di considerazioni e di fatti:

1) mutazioni S → R comportano maggiore sensibilità di *Salmonella* alla batteriolisi immunitaria [24, 25];

2) salmonelle in fase R sono più facilmente fagocitate di quelle in fase S dai macrofagi di topo *in vitro* [26], e se inoculate *in vivo* vengono più rapidamente eliminate dal circolo [27];

3) anticorpi anti O proteggono il topo dall'infezione sperimentale per via intraperitoneale [28, 29];

4) in esperimenti effettuati *in vitro* con macrofagi di topo è stato visto che in assenza di anticorpi anti O le cellule di *Salmonella* vengono scarsamente fagocitate e laddove ciò avvenga la sopravvivenza intracellulare è molto prolungata [30].

Pur riconoscendo il ruolo determinante svolto dall'antigene O nel conferire patogenicità alle salmonelle non si può attribuire soltanto ad esso tale proprietà. Ad esempio, ceppi avirulenti in fase S possono essere ritrovati in specie patogene [31] od ottenuti sperimentalmente per mutazione [32]; mutazioni auxotrofiche per basi puriniche e per aminoacidi di ceppi virulenti si associano talvolta a perdita di virulenza [33 - 36].

Appare a questo punto interessante esaminare quale sia il controllo genetico della sintesi dell'antigene O per meglio comprendere il ruolo da questo svolto nella patogenicità di *Salmonella* e quindi nell'evoluzione di tale genere. L'aspetto più saliente della genetica di questa struttura è che la specificità antigenica di ciascun sierogruppo segrega, in incroci effettuati a mezzo di

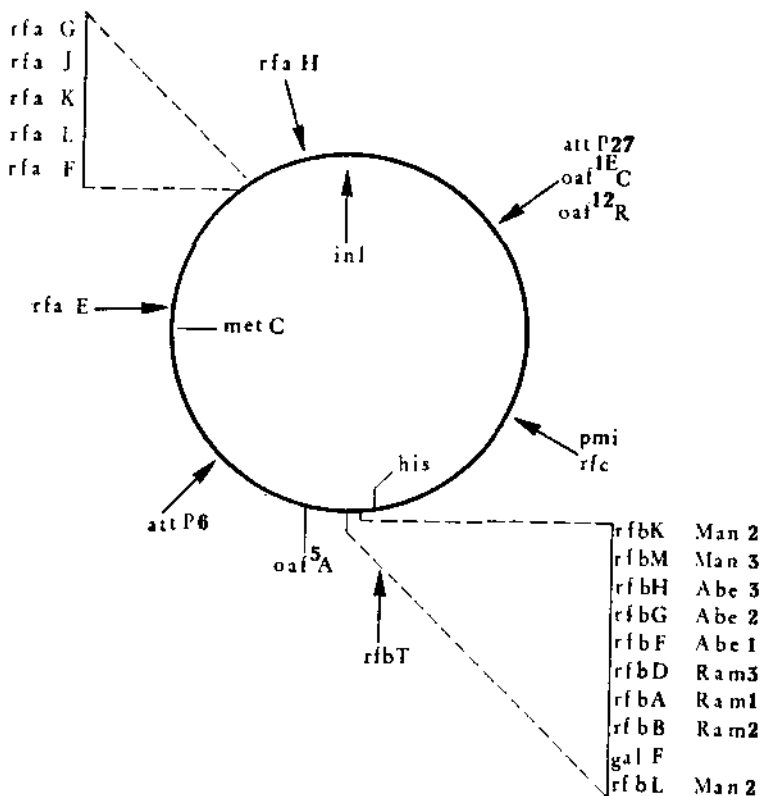


Fig. 3. — Mappa genetica di *Salmonella typhimurium*.

coniugazione o di trasduzione, come carattere unico [37] determinato da una regione cromosomica situata molto vicina all'operone dell'istidina [38, 39]. Ciò indica che i geni necessari per la sintesi della *repeating unit*, caratteristica di un certo gruppo O, sono tutti raggruppati [37]; tali geni, indicati come geni *rfb*, comprendono sia quelli che codificano gli enzimi necessari per la sintesi delle forme attivate degli zuccheri delle *repeating units*, sia quelli che codificano gli enzimi necessari per il montaggio dell'oligosaccaride sul trasportatore lipidico ACL [39, 40] (Fig. 3).

I geni codificanti le modificazioni minori dell'antigene O che non alterano mai la struttura fondamentale dell'oligosaccaride delle *repeating units*, quali la presenza o assenza di gruppi acetilici e di ramificazioni glicosidiche, nonché il tipo di legame tra le *repeating units*, non fanno parte invece del *cluster* dei geni *rfb* e sono indicati come geni *oaf* [6]. La maggior parte di essi fa parte di genomi di fagi temperati, per cui molte delle modificazioni minori dell'antigene O sono conseguenti a fenomeni di conversione fagica [41 - 44].

Volendo ora speculare sulle cause che hanno portato alla associazione dei geni *rfb* si potrebbe ritenere che da un punto di vista generale ciò comporti un vantaggio selettivo in quanto l'associazione di geni con funzioni correlate permette la loro simultanea e quindi più economica regolazione.

L'associazione dei geni *rfb* potrebbe essere giustificata anche dal fatto che enzimi codificati da tali geni sono legati alla membrana cellulare in una sequenza precisa [45], per cui se la loro sintesi venisse diretta da un'unica molecola di RNA messaggero, la loro appropriata disposizione sulla membrana nonché la loro azione coordinata potrebbe essere facilitata [6]. Il fatto che i ricombinanti tra ceppi appartenenti a gruppi O diversi sono per la maggior parte di tipo liscio ed ereditano l'antigene O di uno dei ceppi parentali sta a conferma del vantaggio selettivo derivato dal *clustering* dei geni *rfb*, in quanto se tale raggruppamento non esistesse i ricombinanti sarebbero per la maggior parte rugosi. Di conseguenza in natura i primi ricombinanti sopravviverebbero nel loro ospite mentre i secondi verrebbero rapidamente eliminati [6]. Ma, se l'origine e il mantenimento dei geni *rfb* in un singolo operone è conseguenza di una pressione selettiva che tende a mantenere associati i geni responsabili della sintesi dell'antigene O, la stessa pressione selettiva avrebbe dovuto determinare l'associazione all'operone *rfb* dei geni responsabili delle modificazioni secondarie dell'antigene O. Si può tuttavia a questo punto rilevare che mentre la perdita della funzione di un gene *rfb* per mutazione, lisogenizzazione o ricombinazione, comporta sempre la comparsa di un fenotipo di tipo ruvido, ciò non avviene nel caso in cui siano coinvolti i geni degli enzimi modificanti l'antigene O [6]. Inoltre, poiché i fattori modificanti forniscono variazioni dell'antigene O specifico aggiuntive ma non alternative a quelle fornite dai geni *rfb*, la loro espressione genetica attraverso fenomeni di conversione fagica offre alla cellula la possibilità di

sperimentare continue modifiche del proprio antigene O attraverso l'inserimento nel proprio genoma di nuovi determinanti che, aggiungendosi e non sostituendosi a quelli del cromosoma cellulare, ampliano quasi indefinitamente la possibilità di variazioni della struttura dell'antigene O in natura.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAUN, H. & R. NODAKE. 1924. Über die rolle des ekto- und endoplasmas der bakterien für die serumbaktericide und für die phagocytosis. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **92**: 429-434.
2. SCHÜTZE, H. 1930. Importance of somatic antigen in production of aertrycke and Gärtner immunity in mice. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **11**: 34-42.
3. BIOZZI, G., C. STIFFEL, L. LE MINOR, D. MOUTON, & Y. BOUTHILLIER. 1963. Etude quantitative de l'effet opsonisant des immunserums sur la phagocytose des *Salmonella* par les cellules du système réticulo-endothélial *in vivo*. *Ann. Ist. Pasteur.* **105**: 635-666.
4. ARKWRIGHT, J. A. 1927. Value of different kinds of antigen in prophylactic « enteric » vaccines. *J. Pathol. Bacteriol.* **30**: 345-364.
5. ROANTREE, R. J. 1971. Lipopolysaccharide structure and bacterial virulence in: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. V, pp. 1-37.
6. STOCKER, B. A. D. & P. H. MAKELA. 1971. Genetic aspects of biosynthesis and structure of *Salmonella* lipopolysaccharide. In: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. IV, pp. 369-438.
7. LINGELSHEIM, V. 1913. Zur frage der variation der Typhusbacillen und verwandter gruppen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **68**: 577-580.
8. KAUFFMANN, F., O. LÜDERITZ, H. STIERLIN, & O. WESTPHAL, 1960. Zur immunchemie der O-antigen von *Enterobacteriaceae*. I. Analyse der zuckerbausteine von *Salmonella* - O - antigenen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. I. Orig.* **178**: 442-458.
9. KAUFFMANN, F., L. KRUGER, O. LÜDERITZ, & O. WESTPHAL, 1961. Zur immunchemie der O-antigene von *Enterobacteriaceae*. VI. Vergleich der zuckerbausteine von polysacchariden aus *Salmonella* - S - und R-forme. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **182**: 57-66.
10. NIKAIKO, H. 1970. Lipopolysaccharide in the taxonomy of *Enterobacteriaceae*. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 383-406.
11. LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, A. M. STAUB, & H. NIKAIKO, 1971. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. 4 pp. 145-233.
12. OSBORN, M. J. 1969. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Biochem.* **38**: 501-538.

13. ROBBINS, P. W., D. GRAY, M. DANKERT, & A. WRIGHT 1967. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science*, **158**: 1536-1542.
14. OSBORN, M. J., & I. M. WAINER. 1967. Mechanism of biosynthesis of the typpolysaccharide of *Salmonella*. *Federation Proc.* **26**: 70-76.
15. STÖCKER, B. A. D., A. M. STAUB, R. TINELLI, & B. KOPACKA. 1960. Étude immunochimique sur les *Salmonella*. VI. Étude de l'antigène I présent sur deux *Salmonella* des groupes B et E₄. *Ann. Inst. Pasteur.* **98**: 505-523.
16. TINELLI, R., & A. M. STAUB. 1960. Immunochemical study of *Salmonella*. 7. Study of the products formed by the controlled acid hydrolysis of the polysaccharide extracted from *S. typhi*. Part. 2. Analysis of antigen O 9 in the Kauffmann-White scheme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**: 601-610.
17. HELLERQVIST, C. B., B. LINDERBERG, S. SVANSSON, T. HOLME, & A. A. LINDBERG. 1968. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall typpolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS. *Carbohydrate Res.* **8**: 43-55.
18. ROBBINS, P. W. & T. UCHIDA. 1962. Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-antigens in the E. group *Salmonellae*. *Biochemistry*, **1**: 323-335.
19. BRAY, D. & P. W. ROBBINS. 1967. Mechanism of ϵ^{1b} conversion studies with bacteriophage mutants. *J. Mol. Biol.* **30**: 457-475.
20. KALTERBORN, E. 1967. *Salmonella species*. Junk Publ. The Hague.
21. WESTPHAL, O. & O. LÜDERITZ. 1960. 3, 6-didesoxyhexosen. *Chemie und Biologie. Angew. Chem.* **72**: 881-891.
22. ROANTREE, R. J. 1967. *Salmonella* O antigens and virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**: 443-462.
23. LÜDERITZ, O., A. M. STAUB, & O. WESTPHAL. 1966. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol. Rev.* **30**: 192-255.
24. THJÖTTA, T. & E. WAALER. 1932. Dissociation and sensitiveness to normal serum in dysentery bacilli of type III. *J. Bacteriol.* **24**: 301-316.
25. ROWLEY, D. 1954. The virulence of strains of *Bacterium coli* for mice. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **35**: 528-538.
26. FAUVE, M. R. 1964. Résistance cellulaire à l'infection bactérienne. II. Comportement de macrophages de souris entretenus, *in vitro*, dans un milieu sans sérum en présence de *S. typhimurium* d'inégale virulence. *Ann. Inst. Pasteur.* **107**: 472-483.
27. BIOZZI, G. & C. STIFFEL. 1961. Role of normal and immune opsonins in the phagocytosis of bacteria and erythrocytes by the reticulo-endothelial cells. In: *2nd Intern. Symp Immunopathol.* G. Grabar & P. Miescher (Ed.). Benno Schwabe, Basel. Michigan, 1961, pp. 249-266.
28. BLANDEN, R. V., G. B. MACKANESSE & F. M. COLLINS. 1966. Mechanism of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exptl. Med.* **124**: 585-600.
29. COLLINS, F. M. 1969. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl - alcohol - killed vaccines. *J. Bacteriol.* **97**: 676-683.

30. Mc INTYRE, J., D. ROWLEY & C. R. JENKIN. 1967. The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **45**: 676-680.
31. PIKE, R. M. & G. M. MACKENZIE. 1940. Virulence of *Salmonella typhimurium*. I. Analysis of experimental infection in mice with strains of high and low virulence. *J. Bacteriol.* **40**: 171-214.
32. MAALØE, O. 1948. Pathogenetic - apathogenetic transformation of *Salmonella typhimurium*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **25**: 414-430.
33. BACON, G. A., T. W. BURROWS & M. YATES. 1950. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*. The induction and isolation of mutants. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **31**: 714-724.
34. FURNESS, G. & D. ROWLEY. 1956. Transduction of virulence within the species *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 140-145.
35. HERZEBERG, M. 1962. Living organisms as immunity agents against experimental salmonellosis in mice. I. Virulence of auxotrophic mutants. *J. Infect Dis.* **111**: 192-203.
36. ROANTREE, R. J. 1964. Dati non pubblicati.
37. MÄKELÄ, P. H. 1966. Genetic determination of the O antigens of *Salmonella* groups B (4, 5, 12) and C₁ (6, 7). *J. Bacteriol.* **91**: 1115-1125.
38. SUBBAIAH, T. V. & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *Nature*. **201**: 1298-1299.
39. BECKMANN, I., T. V. SUBBAIAH & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. Serological and chemical investigation. *Nature*. **201**: 1299-1301.
40. NIKAIKO, H., K. NIKAIKO, T. V. SUBBAIAH & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. Enzymatic synthesis of nucleotide sugar compounds. *Nature*. **201**: 1301-1302.
41. KAUFFMANN, F. 1953. On the transduction of serological properties in the *Salmonella* group. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **33**: 409-415.
42. ISEKI, S. & T. SAKAI. 1953. Artificial transformation of O antigen in *Salmonella* group E. II. Antigen transforming factor in bacilli of group E₂. *Proc. Japan Acad.* **29**: 127-132.
43. IZeki, S. & K. KASHIWAGI. 1955. Induction of somatic antigen 1 by bacteriophage in *Salmonella* B group. *Proc. Japan Acad.* **31**: 558-564.
44. STOCKER, B. A. D. 1958. Lysogenic conversion by the A phages of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **18**: ix.
45. PARIZI, E. & M. J. OSBORN. 1969. Localization of O-antigen in membrane fractions of *Salmonella typhimurium*. *Fed. Proc.* **28**: 658-663.

Variabilità dell'antigene O e proprietà patogene di *Salmonella*

G. FALCONE e M. C. SERRA

Istituto di Microbiologia dell'Università di Pisa

È cognizione comune che i sierotipi di *Salmonella* a tutt'oggi isolati hanno raggiunto ormai una cifra elevatissima, non solo, ma che nuovi tipi compaiono in natura e che la distribuzione epidemiologica dei vari ceppi varia continuamente nel tempo. Pertanto da tale constatazione e dal fatto che anticorpi anti H non sembrano svolgere alcuna azione protettiva nelle infezioni da *Salmonella* [1 - 3] e che ceppi aflagellati non mostrano modificazioni delle loro proprietà patogene [4], si può ritenere che dal punto di vista dei rapporti con l'ospite, e quindi evolutivo, le variazioni dell'antigene flagellare siano di modesto significato, mentre di fondamentale importanza per la sopravvivenza e la diffusione del germe in natura sembra essere l'antigene O con la sua vasta gamma di variazioni [5]. Nell'ospite, infatti, i microrganismi tendono ad essere rapidamente eliminati dai tessuti e dal circolo, mentre la presenza di antigeni superficiali, come l'antigene O di *Salmonella*, può consentire la loro sopravvivenza e diffusione nell'ospite conferendo una maggiore resistenza alla fagocitosi e all'azione battericida del siero, a meno che non siano presenti anticorpi specifici verso quel determinato antigene superficiale. Si può pertanto ritenere che nel corso dell'evoluzione del genere *Salmonella* la pressione selettiva negli ospiti naturali abbia consentito una continua variabilità dell'antigene O [6].

D'altra parte, il fatto che la perdita per mutazione delle catene O specifiche del lipopolisaccaride renda avirulenta *Salmonella* [4, 7], ci induce a correlare in questo germe la struttura dell'antigene O con la patogenicità e quindi con la sua evoluzione.

Come è noto, la parete degli enterobatteri in genere, e quindi delle salmonelle in particolare, è costituita da un sottile strato di mureina, all'esterno del quale è situato il lipopolisaccaride la cui struttura è schematicamente rappresentata nella Fig. 1; esso consta di una frazione lipidica detta lipide A, alla quale è covalentemente legata una frazione polisaccaridica. Questa a sua volta è distinguibile in due regioni; la regione I che consiste in un polimero di unità oligosaccaridiche dette anche catene O specifiche o *repeating units*, le quali sono legate alla regione II o nucleo del polisaccaride.

La formula dell'antigene O di *S. typhimurium*, secondo lo schema di Kauffmann è (1), 4, (5), 12, essendo 4 e 12 i determinanti antigenici fondamentali che caratterizzano il gruppo, cioè la natura degli zuccheri che costituiscono le O repeating units, mentre 1 e 5 rappresentano fattori antigenici secondari modificanti l'antigene O di gruppo quali il legame glicosidico α 1-6 fra il glucosio e il galattosio [15, 16] ed il gruppo acetilico in posizione 2 dell'abequoso [17]. Un altro fattore secondario dell'antigene O riguarda il tipo di legame fra le varie repeating units come il fattore 15 del gruppo E [18, 19].

La Tab. 1, in cui è riportata la struttura delle O repeating units di alcune specie di *Salmonella*, mostra come nei gruppi B e D, ad esempio, ai quali appartengono i tipi più frequentemente isolati e più spesso associati ad in-

TABELLA 1

Schema della struttura delle O repeating units di sierogruppi di *Salmonella* di interesse medico

Sierogruppo	Specie	Antigene O	Struttura
A	<i>S. paratyphi</i> A	1,2,12	<pre> Par OAc Glc ↓ ↓ ↓ Man→Ram→Gal→ </pre>
B	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12	<pre> OAc-Abe Glc ↓ ↓ Man β (1-4) → Ram → Gal → </pre>
C ₁	<i>S. cholerae-suis</i>	6 ₂ ,7	<pre> Glc ↓ Man → Man → Man → Man → GlcNac </pre>
C ₂	<i>S. newport</i>	6 ₁ ,8	<pre> Abe Glc ↓ ↓ Ram → Man → Man → Gal → </pre>
C ₃	<i>S. kentucky</i>	8,20	<pre> Abe Glc ↓ ↓ Ram → Man → Man → Gal </pre>
D ₁	<i>S. typhi</i>	9,12	<pre> Tiv OAc-Glc ↓ ↓ 2-Man α (1-4) → Ram → Gal → </pre>
D ₂	<i>S. stransbourg</i>	(9),46	<pre> Tiv ↓ 6α -Man → Ram → Gal → </pre>
E ₁	<i>S. anatum</i>	3,10	<pre> OAc ↓ 6α -Man → Ram → Gal → </pre>

fezioni sistemiche, tali unità contengono lo stesso trisaccaride al cui mannosio è legato un dideossiesoso, mentre il gruppo E possiede lo stesso trisaccaride fondamentale ma senza dideossiesosi legati lateralmente. È interessante notare che le specie del gruppo E sono meno frequentemente isolate e meno frequentemente associate con malattie sistemiche che non le specie del gruppo B e D. Da una recente rassegna di Kalterborn [20] si rileva infatti che su 550.000 isolamenti colturali il 95,6% delle specie apparteneva a 5 sierogruppi soltanto (B=47,1%; D=23,7%; C₁=13,3%; C₂=7,1%; E₂=4,4%).

Questi dati inducono a ritenere che la presenza di dideossiesosi nella *O repeating unit* della parete delle salmonelle sia un elemento importante di patogenicità sebbene i gruppi B e D contengano anche specie di raro reperimento ed il sottogruppo C₁, che non ha dideossiesosi nella sua *repeating unit*, includa *S. cholerae-suis* e *S. paratyphi C*. Alcune considerazioni potrebbero spiegarci perché i dideossiesosi possono rappresentare un fattore di virulenza in *Salmonella*. Innanzitutto la loro reperibilità è estremamente rara in natura [21, 22] per cui è poco probabile che l'ospite infettato possieda anticorpi « naturali » verso di essi capaci di promuovere l'opsonizzazione del germe.

La presenza di composti chimici rari quali i dideossiesosi sulla parete di alcune salmonelle potrebbe inoltre rendere poco probabile una risposta secondaria dell'organismo verso l'agente infettante anche in termini di immunità cellulare. Questa, infatti, potrebbe costituire un efficace meccanismo di controllo dell'infezione solo attraverso una rapida attivazione dei suoi meccanismi cellulari per risposta secondaria, la quale è resa estremamente improbabile da una costituzione antigenica del germe che sia difficilmente reperibile in altre strutture naturali con le quali l'ospite può essere venuto a contatto in precedenza. L'associazione dei dideossiesosi con la virulenza delle salmonelle potrebbe inoltre essere attribuita, in via speculativa, anche al loro carattere fortemente lipofilo per cui la fagocitosi ne sarebbe inibita [23].

A conferma dell'ipotesi che la patogenicità di *Salmonella* sia correlata alla presenza e alla struttura dell'antigene O vi è un'ulteriore serie di considerazioni e di fatti:

1) mutazioni S → R comportano maggiore sensibilità di *Salmonella* alla batteriolisi immunitaria [24, 25];

2) salmonelle in fase R sono più facilmente fagocitate di quelle in fase S dai macrofagi di topo *in vitro* [26], e se inoculate *in vivo* vengono più rapidamente eliminate dal circolo [27];

3) anticorpi anti O proteggono il topo dall'infezione sperimentale per via intraperitoneale [28, 29];

4) in esperimenti effettuati *in vitro* con macrofagi di topo è stato visto che in assenza di anticorpi anti O le cellule di *Salmonella* vengono scarsamente fagocitate e laddove ciò avvenga la sopravvivenza intracellulare è molto prolungata [30].

Pur riconoscendo il ruolo determinante svolto dall'antigene O nel conferire patogenicità alle salmonelle non si può attribuire soltanto ad esso tale proprietà. Ad esempio, ceppi avirulenti in fase S possono essere ritrovati in specie patogene [31] od ottenuti sperimentalmente per mutazione [32]; mutazioni auxotrofiche per basi puriniche e per aminoacidi di ceppi virulenti si associano talvolta a perdita di virulenza [33 - 36].

Appare a questo punto interessante esaminare quale sia il controllo genetico della sintesi dell'antigene O per meglio comprendere il ruolo da questo svolto nella patogenicità di *Salmonella* e quindi nell'evoluzione di tale genere. L'aspetto più saliente della genetica di questa struttura è che la specificità antigenica di ciascun sierogruppo segrega, in incroci effettuati a mezzo di

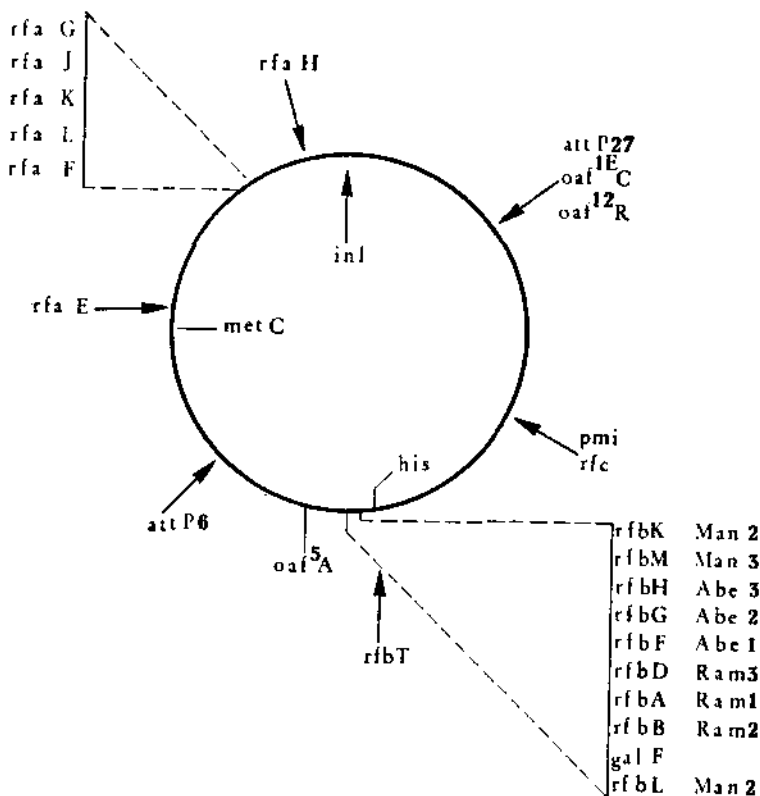


Fig. 3. — Mappa genetica di *Salmonella typhimurium*.

coniugazione o di trasduzione, come carattere unico [37] determinato da una regione cromosomica situata molto vicina all'operone dell'istidina [38, 39]. Ciò indica che i geni necessari per la sintesi della *repeating unit*, caratteristica di un certo gruppo O, sono tutti raggruppati [37]; tali geni, indicati come geni *rfb*, comprendono sia quelli che codificano gli enzimi necessari per la sintesi delle forme attivate degli zuccheri delle *repeating units*, sia quelli che codificano gli enzimi necessari per il montaggio dell'oligosaccaride sul trasportatore lipidico ACL [39, 40] (Fig. 3).

I geni codificanti le modificazioni minori dell'antigene O che non alterano mai la struttura fondamentale dell'oligosaccaride delle *repeating units*, quali la presenza o assenza di gruppi acetilici e di ramificazioni glicosidiche, nonché il tipo di legame tra le *repeating units*, non fanno parte invece del *cluster* dei geni *rfb* e sono indicati come geni *oaf* [6]. La maggior parte di essi fa parte di genomi di fagi temperati, per cui molte delle modificazioni minori dell'antigene O sono conseguenti a fenomeni di conversione fagica [41 - 44].

Volendo ora speculare sulle cause che hanno portato alla associazione dei geni *rfb* si potrebbe ritenere che da un punto di vista generale ciò comporti un vantaggio selettivo in quanto l'associazione di geni con funzioni correlate permette la loro simultanea e quindi più economica regolazione.

L'associazione dei geni *rfb* potrebbe essere giustificata anche dal fatto che enzimi codificati da tali geni sono legati alla membrana cellulare in una sequenza precisa [45], per cui se la loro sintesi venisse diretta da un'unica molecola di RNA messaggero, la loro appropriata disposizione sulla membrana nonché la loro azione coordinata potrebbe essere facilitata [6]. Il fatto che i ricombinanti tra ceppi appartenenti a gruppi O diversi sono per la maggior parte di tipo liscio ed ereditano l'antigene O di uno dei ceppi parentali sta a conferma del vantaggio selettivo derivato dal *clustering* dei geni *rfb*, in quanto se tale raggruppamento non esistesse i ricombinanti sarebbero per la maggior parte rugosi. Di conseguenza in natura i primi ricombinanti sopravviverebbero nel loro ospite mentre i secondi verrebbero rapidamente eliminati [6]. Ma, se l'origine e il mantenimento dei geni *rfb* in un singolo operone è conseguenza di una pressione selettiva che tende a mantenere associati i geni responsabili della sintesi dell'antigene O, la stessa pressione selettiva avrebbe dovuto determinare l'associazione all'operone *rfb* dei geni responsabili delle modificazioni secondarie dell'antigene O. Si può tuttavia a questo punto rilevare che mentre la perdita della funzione di un gene *rfb* per mutazione, lisogenizzazione o ricombinazione, comporta sempre la comparsa di un fenotipo di tipo ruvido, ciò non avviene nel caso in cui siano coinvolti i geni degli enzimi modificanti l'antigene O [6]. Inoltre, poiché i fattori modificanti forniscono variazioni dell'antigene O specifico aggiuntive ma non alternative a quelle fornite dai geni *rfb*, la loro espressione genetica attraverso fenomeni di conversione fagica offre alla cellula la possibilità di

sperimentare continue modifiche del proprio antigene O attraverso l'inserimento nel proprio genoma di nuovi determinanti che, aggiungendosi e non sostituendosi a quelli del cromosoma cellulare, ampliano quasi indefinitamente la possibilità di variazioni della struttura dell'antigene O in natura.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAUN, H. & R. NODAKE. 1924. Über die rolle des ekto- und endoplasmas der bakterien für die serumbaktericide und für die phagocytosis. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **92**: 429-434.
2. SCHÜTZE, H. 1930. Importance of somatic antigen in production of aertrycke and Gärtner immunity in mice. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **11**: 34-42.
3. BIOZZI, G., C. STIFFEL, L. LE MINOR, D. MOUTON, & Y. BOUTHILLIER. 1963. Etude quantitative de l'effet opsonisant des immunserums sur la phagocytose des *Salmonella* par les cellules du système réticulo-endothélial *in vivo*. *Ann. Ist. Pasteur.* **105**: 635-666.
4. ARKWRIGHT, J. A. 1927. Value of different kinds of antigen in prophylactic « enteric » vaccines. *J. Pathol. Bacteriol.* **30**: 345-364.
5. ROANTREE, R. J. 1971. Lipopolysaccharide structure and bacterial virulence in: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. V, pp. 1-37.
6. STOCKER, B. A. D. & P. H. MAKELA. 1971. Genetic aspects of biosynthesis and structure of *Salmonella* lipopolysaccharide. In: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. IV, pp. 369-438.
7. LINGELSHEIM, V. 1913. Zur frage der variation der Typhusbacillen und verwandter gruppen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **68**: 577-580.
8. KAUFFMANN, F., O. LÜDERITZ, H. STIERLIN, & O. WESTPHAL, 1960. Zur immunchemie der O-antigen von *Enterobacteriaceae*. I. Analyse der zuckerbausteine von *Salmonella* - O - antigenen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. I. Orig.* **178**: 442-458.
9. KAUFFMANN, F., L. KRUGER, O. LÜDERITZ, & O. WESTPHAL, 1961. Zur immunchemie der O-antigene von *Enterobacteriaceae*. VI. Vergleich der zuckerbausteine von polysacchariden aus *Salmonella* - S - und R-forme. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* **182**: 57-66.
10. NIKAIKO, H. 1970. Lipopolysaccharide in the taxonomy of *Enterobacteriaceae*. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 383-406.
11. LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, A. M. STAUB, & H. NIKAIKO, 1971. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: *Microbial Toxins*. G. Weinbaum, J. Kadis & S. Ajl (Ed.) Academic Press, New York, vol. 4 pp. 145-233.
12. OSBORN, M. J. 1969. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Biochem.* **38**: 501-538.

13. ROBBINS, P. W., D. GRAY, M. DANKERT, & A. WRIGHT 1967. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science*, **158**: 1536-1542.
14. OSBORN, M. J., & I. M. WAINER. 1967. Mechanism of biosynthesis of the typpolysaccharide of *Salmonella*. *Federation Proc.* **26**: 70-76.
15. STÖCKER, B. A. D., A. M. STAUB, R. TINELLI, & B. KOPACKA. 1960. Étude immunochimique sur les *Salmonella*. VI. Étude de l'antigène I présent sur deux *Salmonella* des groupes B et E₄. *Ann. Inst. Pasteur.* **98**: 505-523.
16. TINELLI, R., & A. M. STAUB. 1960. Immunochemical study of *Salmonella*. 7. Study of the products formed by the controlled acid hydrolysis of the polysaccharide extracted from *S. typhi*. Part. 2. Analysis of antigen O 9 in the Kauffmann-White scheme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**: 601-610.
17. HELLERQVIST, C. B., B. LINDERBERG, S. SVANSSON, T. HOLME, & A. A. LINDBERG. 1968. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall typpolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS. *Carbohydrate Res.* **8**: 43-55.
18. ROBBINS, P. W. & T. UCHIDA. 1962. Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-antigens in the E. group *Salmonellae*. *Biochemistry*, **1**: 323-335.
19. BRAY, D. & P. W. ROBBINS. 1967. Mechanism of ϵ^{1b} conversion studies with bacteriophage mutants. *J. Mol. Biol.* **30**: 457-475.
20. KALTERBORN, E. 1967. *Salmonella species*. Junk Publ. The Hague.
21. WESTPHAL, O. & O. LÜDERITZ. 1960. 3, 6-didesoxyhexosen. *Chemie und Biologie. Angew Chem.* **72**: 881-891.
22. ROANTREE, R. J. 1967. *Salmonella* O antigens and virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**: 443-462.
23. LÜDERITZ, O., A. M. STAUB, & O. WESTPHAL. 1966. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol. Rev.* **30**: 192-255.
24. THJÖTTA, T. & E. WAALER. 1932. Dissociation and sensitiveness to normal serum in dysentery bacilli of type III. *J. Bacteriol.* **24**: 301-316.
25. ROWLEY, D. 1954. The virulence of strains of *Bacterium coli* for mice. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **35**: 528-538.
26. FAUVE, M. R. 1964. Résistance cellulaire à l'infection bactérienne. II. Comportement de macrophages de souris entretenus, *in vitro*, dans un milieu sans sérum en présence de *S. typhimurium* d'inégale virulence. *Ann. Inst. Pasteur.* **107**: 472-483.
27. BIOZZI, G. & C. STIFFEL. 1961. Role of normal and immune opsonins in the phagocytosis of bacteria and erythrocytes by the reticulo-endothelial cells. In: *2nd Intern. Symp Immunopathol.* G. Grabar & P. Miescher (Ed.). Benno Schwabe, Basel. Michigan, 1961, pp. 249-266.
28. BLANDEN, R. V., G. B. MACKANESSE & F. M. COLLINS. 1966. Mechanism of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exptl. Med.* **124**: 585-600.
29. COLLINS, F. M. 1969. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl - alcohol - killed vaccines. *J. Bacteriol.* **97**: 676-683.

30. Mc INTYRE, J., D. ROWLEY & C. R. JENKIN. 1967. The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **45**: 676-680.
31. PIKE, R. M. & G. M. MACKENZIE. 1940. Virulence of *Salmonella typhimurium*. I. Analysis of experimental infection in mice with strains of high and low virulence. *J. Bacteriol.* **40**: 171-214.
32. MAALØE, O. 1948. Pathogenetic - apathogenetic transformation of *Salmonella typhimurium*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **25**: 414-430.
33. BACON, G. A., T. W. BURROWS & M. YATES. 1950. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*. The induction and isolation of mutants. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **31**: 714-724.
34. FURNESS, G. & D. ROWLEY. 1956. Transduction of virulence within the species *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 140-145.
35. HERZEBERG, M. 1962. Living organisms as immunity agents against experimental salmonellosis in mice. I. Virulence of auxotrophic mutants. *J. Infect Dis.* **111**: 192-203.
36. ROANTREE, R. J. 1964. Dati non pubblicati.
37. MÄKELÄ, P. H. 1966. Genetic determination of the O antigens of *Salmonella* groups B (4, 5, 12) and C₁ (6, 7). *J. Bacteriol.* **91**: 1115-1125.
38. SUBBAIAH, T. V. & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *Nature*. **201**: 1298-1299.
39. BECKMANN, I., T. V. SUBBAIAH & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. Serological and chemical investigation. *Nature*. **201**: 1299-1301.
40. NIKAIDO, H., K. NIKAIDO, T. V. SUBBAIAH & B. A. D. STOCKER. 1964. Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. Enzymatic synthesis of nucleotide sugar compounds. *Nature*. **201**: 1301-1302.
41. KAUFFMANN, F. 1953. On the transduction of serological properties in the *Salmonella* group. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **33**: 409-415.
42. ISEKI, S. & T. SAKAI. 1953. Artificial transformation of O antigen in *Salmonella* group E. II. Antigen transforming factor in bacilli of group E₂. *Proc. Japan Acad.* **29**: 127-132.
43. IZeki, S. & K. KASHIWAGI. 1955. Induction of somatic antigen 1 by bacteriophage in *Salmonella* B group. *Proc. Japan Acad.* **31**: 558-564.
44. STOCKER, B. A. D. 1958. Lysogenic conversion by the A phages of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **18**: ix.
45. PARIZI, E. & M. J. OSBORN. 1969. Localization of O-antigen in membrane fractions of *Salmonella typhimurium*. *Fed. Proc.* **28**: 658-663.

Resistenza trasmissibile agli antibiotici e virulenza nelle salmonelle

G. C. SCHITO

Istituto di Microbiologia dell'Università di Parma

L'ampiezza e la complessità del tema assegnato da questo Comitato Organizzatore mi ha indotto, tenendo conto del tempo messo a disposizione, a ridimensionare alquanto il soggetto della mia esposizione. Scartata immediatamente la possibilità di una trattazione enciclopedica sulla natura dello agente eziologico delle salmonellosi e constatato che molti aspetti di microbiologia generale, speciale e di tecnica di diagnostica batteriologica relativi a questo germe verranno estesamente esposti da altri relatori è stata una scelta personale quella di portare un contributo alla conoscenza di due soli aspetti della biologia delle salmonelle. Essi riguardano da una parte la preoccupante evoluzione verso la antibiotico-resistenza di tali germi un tempo estremamente sensibili ai chemioterapici e dall'altra il ruolo che i meccanismi genetici, i quali conferiscono l'antibiotico-resistenza, possono giocare nel modificare il grado di virulenza che le salmonelle dimostrano nei riguardi dell'uomo e degli animali. Questo secondo argomento riveste preminente interesse teorico ed ha basi sperimentali ancora in evoluzione. Al contrario il problema dell'antibiotico-resistenza delle salmonelle mi è stato suggerito dallo scontro quotidiano nei nostri laboratori di microbiologia clinica con un sempre maggior numero di ceppi, specie di provenienza animale, che, a causa di fenomeni genetici complessi, hanno acquisito spettri di refrattarietà ai chemioterapici talora così vasti da mettere in difficoltà il clinico a causa delle limitazioni che il fenomeno pone alla scelta dei farmaci da usare in terapia. Questa situazione ha inoltre determinato un assai più elevato carico di lavoro microbiologico in quanto, proprio per la vasta diffusione di ceppi che dimostrano antibiotico-resistenza assolutamente imprevedibile, l'isolamento del germe infettante e la sua caratterizzazione sono oggi divenuti presupposti imprescindibili per una cura non destinata a fallire.

Voglio qui ricordare che, sebbene nell'era preantibiotica la mortalità legata a salmonellosi fosse alquanto elevata, l'introduzione del cloramfenicolo e, in linea subordinata, dell'ampicillina e del cotrimossazolo ha da tempo ridotto drasticamente le perdite di vite umane nelle infezioni enteriche [1].

Il cloramfenicolo ha rappresentato in verità la pietra miliare della terapia della febbre tifoide sin dalla sua introduzione, nel 1949 [2]. È infatti noto come sebbene la *S. typhi* sia praticamente sensibile a tutti gli antibiotici, inclusa la penicillina, la tetraciclina e i farmaci aminoglicosidici *in vitro*, *in vivo* tutti, salvo il cotrimossazolo, sono meno efficaci del cloramfenicolo [3].

Per circa 20 anni non vi fu necessità di saggiare l'antibiotico-sensibilità delle *S. typhi*: il cloramfenicolo era il farmaco di scelta e l'ampicillina divenne in seguito una valida alternativa. Dal 1962 tuttavia, in corso di tifo, da casi sporadici cominciarono ad essere isolate *S. typhi* cloramfenicolo resistenti [4]. I casi furono descritti in India, Sud Africa, Nigeria in circa 5-10% dei ceppi. Fino al 1972 anche la letteratura italiana con Giammanco e coll. [5], Bianchi e Romero [6], Luppi e coll. [7], Romero e Molina [4], Natoli e coll. [8], confermava la scarsa diffusione delle antibiotico-resistenze in *S. typhi* e *paratyphi* in generale ed al cloramfenicolo in particolare. Improvvisamente, nel 1972 scoppia in Messico una gravissima epidemia di febbre tifoide provocata da un ceppo resistente non solo al cloramfenicolo ma contemporaneamente a sulfamidici, streptomina e tetraciclina [9]. Con i mezzi di comunicazione caratteristici della nostra epoca il ceppo si riscontra, sempre nel 1972, in Inghilterra, quindi negli Stati Uniti [10] e finalmente, con le stesse caratteristiche di resistenza, nel 1973 in Vietnam [11].

Il problema delle antibiotico-resistenze della *S. typhi* è quindi divenuto un fatto a livello mondiale anche se non è nota la frequenza assoluta dei ceppi poliresistenti.

Ancora più rapida è stata l'evoluzione alla antibiotico-resistenza delle cosiddette salmonelle minori, causa solita delle gastro-enteriti senza tendenza invasiva. In Inghilterra *S. typhimurium* lisotipo 29 cominciò a mostrare multiresistenza nel 1962 con refrattarietà ai sulfamidici e alla streptomina. Nel 1963 si aggiungeva la tetraciclina. Nel 1964 l'ampicillina ed il furazolidone e dal 1965 la neomicina e la kanamicina [12]. La stessa specie fu trovata altamente resistente in Germania [13] ed Olanda [14]. I valori percentuali generali salivano da una frequenza del 2% di resistenti nel 1961 al 60% nel 1965. Numerose altre salmonelle (Panama, Oranienburg, Dublin, Wien) hanno seguito la stessa rapida evoluzione alla resistenza verso diversi antibiotici. Identico fenomeno è stato osservato in Italia dagli AA. già citati [4-8] ed hanno confermato la notevole tendenza delle *S. typhimurium* ad evolvere in tal senso con oltre l'80% dei ceppi resistenti a più di un farmaco inclusi cloramfenicolo, ampicillina, kanamicina, neomicina, tetraciclina, sulfamidici, streptomina.

La maggior propensione delle salmonelle sp. ad acquisire antibiotico-resistenza è verosimilmente collegata al fatto che il serbatoio naturale di questi batteri è costituito dagli animali da allevamento che sono solitamente sottoposti, per motivi economici, a trattamento con antibiotici. Agli inizi

degli anni '50, infatti, si accertò che basse dosi di chemioterapici acceleravano la crescita degli animali da allevamento quali maiali, pollame, vitelli [15]. Questo fatto aumentò la possibilità di selezione di batteri che avevano acquisito resistenza.

A quali cause è imputabile la comparsa dell'antibiotico-resistenza nelle salmonelle fin qui descritte?

Assai raramente essa è dovuta alla selezione, da parte dei chemioterapici, di preesistenti cellule in cui sono pervenute mutazioni cromosomiche. Quasi costantemente infatti, a causa della estrema rarità con cui muta il genoma batterico (frequenza calcolata nell'ordine di una modificazione permanente della sequenza delle basi del DNA ogni 10^5 o 10^6 generazioni) le resistenze cromosomiche sono rivolte verso più di un singolo antibiotico [16, 17].

La multiresistenza osservata nel campo delle salmonelle in particolare ed in numerosi altri membri delle *Enterobacteriaceae*, delle pasteurelle, bordetelle, emofili, vibriani, *Pseudomonas*, neisserie, streptococchi e stafilococchi è dovuta non a meccanismi di mutazione del patrimonio genetico cromosomico bensì ad acquisizione, tramite i processi di coniugazione o di trasduzione, di particolari elementi genetici accessori definiti plasmidi o fattori R [18, 19]. Si tratta di replicon autonomi costituiti da molecole di DNA bicatenario circolare di dimensioni e peso variabili ma concentrati intorno a valori di $10-60 \times 10^6$ daltons pari a circa $30 \mu\text{m}$ e ad un contenuto di informazione oscillante intorno ai 100-150 geni.

Che tipo di informazione è veicolato dai plasmidi R?

Una certa quota di cistrons a disposizione è sempre riservata alla elaborazione di prodotti che garantiscono al plasmide la capacità di autoduplicare correttamente il proprio DNA, indipendentemente spesso dal corredo enzimatico dell'ospite momentaneo in cui il plasmidio alberga. Nei fattori R diffusi nelle salmonelle e nelle *Enterobacteriaceae* è quasi costantemente presente un secondo blocco di geni comprendente 10-15 cistrons che conferisce al plasmidio la capacità di promuovere eventi di coniugazione in cellule appartenenti alla stessa o ad altre specie di quelle in cui il fattore è ospite.

Tra i prodotti di questi geni primeggiano costituenti che, in seguito ad opportuno automontaggio, daranno origine al pilo R, il tramite attraverso cui si realizza l'autotrasferimento da cellula a cellula per coniugazione. Questa regione genetica, che è sconosciuta nei plasmidi ospiti dello stafilococco [20], viene definita RTF o Regione della autotrasferibilità e, insieme alla precedente regione dell'automantenimento o di replicazione, può esistere in maniera del tutto autonoma dall'ultimo blocco di geni che usualmente costituiscono un plasmidio R. Questi cistrons, detti *r*, codificano numerose proteine, spesso dotate di attività enzimatica, che sono i veri determinanti dell'antibiotico resistenza. Il numero di geni *r* esistenti nei diversi plasmidi

è estremamente variabile ma comprende uno spettro di resistenza assai ampio e che include in pratica tutti gli antibiotici noti, in varie combinazioni, oltre a funzioni meno chiare che conferiscono ugualmente un vantaggio selettivo alle cellule che albergano R, come la resistenza a certi metalli pesanti, all'irradiazione UV, all'attacco di numerosi batteriofagi virulenti e all'invasione da parte di altri determinanti R geneticamente imparentati [18, 19, 21].

Il meccanismo con cui i determinanti r plasmidici inducono resistenza agli antibiotici è di tipo enzimatico [22]. Così, gli antibiotici β -lattamici quali le penicilline e le cefalosporine vengono inattivati dalle β -lattamasi; il cloramfenicolo viene inattivato per acetilazione da parte di acetil-transferasi; gli antibiotici aminoglicosidici come la streptomicina, kanamicina, neomicina, gentamicina, tobramicina possono essere resi innocui per fosforilazione, adenilazione o acetilazione da fosfotransferasi ATP-dipendenti, da adeniltransferasi o da acetiltransferasi codificate dai determinanti r.

Nei confronti della tetraciclina i fattori R provocano la sintesi di prodotti che inibiscono il trasporto di membrana dell'antibiotico, senza modificazione chimica del chemioterapico ma con alterazione delle strutture di superficie del germe.

Un plasmide R, completo di RTF e di determinanti r, ha la possibilità di trasferirsi ad altre cellule mediante coniugazione [18, 19, 21]. Il contatto tra le cellule in ricombinazione avviene tramite il pilo R e, forse attraverso questa appendice, il DNA plasmidico si trasferisce dalla cellula donatrice a quella ricevente. Poiché la sintesi del pilo R è soggetta a repressione, la fertilità e quindi la diffusione di R sono limitate nel tempo al solo periodo post-coniugazionale. Uno dei motivi di pericolosità dei plasmidi R deriva dal fatto che il trasferimento da cellula a cellula travalica sovente i limiti delle specie talché, nell'ambito degli enterobatteri, è possibile che un fattore R con multiresistenza agli antibiotici passi da germi solitamente non patogeni come *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, a specie francamente patogene come *Salmonella*, *Shigella*, *Pasteurella* e *Vibrio*. Donatori di resistenza si sono dimostrati anche gli *Pseudomonas*, di solito per la via di un accettore intermedio costituito da *Escherichia* o *Klebsiella* [22].

È stato inequivocabilmente stabilito che i plasmidi R preesistevano alla scoperta degli antibiotici: tuttavia la loro terrificante diffusione attuale (oltre il 90 % delle Shigelle in Giappone, oltre l'80 % delle escherichie nel mondo) è dovuta alla enorme pressione selettiva esercitata non solo dall'uso terapeutico e profilattico degli antibiotici in campo umano ma anche dalla applicazione alla zootecnia di queste sostanze. Ciò ha particolare rilevanza proprio nel campo delle salmonelle, specie della *S. typhimurium*, il cui serbatoio è costituito dagli organismi animali.

L'impressione che quanto fin qui delineato sulla pericolosità e diffusione dei fattori R si limiti ad esperienze eseguite *in vitro* da genetisti in cerca di

notorietà deve essere immediatamente fugata. In realtà le approfondite ricerche di Anderson in *S. typhimurium* [23] hanno inequivocabilmente dimostrato che la rapida evoluzione alla poliantibiotico-resistenza osservata in questo microorganismo tra il 1962 e il 1965 è avvenuta nell'intestino dei vitelli, per coniugazione con svariati ceppi batterici che avevano plasmidi R e sotto la pressione selettiva dell'uso zooprofilattico degli antibiotici. La frequenza di coniugazione intra- ed interspecifica osservata *in vivo* dipende da numerosi fattori e principalmente dal tipo di ospite e dalla coesistenza di vigorosi fattori selettivi. Gli esperimenti di Anderson [24] hanno ad esempio dimostrato che un passaggio di plasmidi R può essere frequente nei vitelli e nel pollo mentre non avviene nell'intestino del maiale.

Per ciò che concerne più in particolare l'uomo, osservazioni ripetute su volontari normali [25, 26] hanno stabilito che il passaggio di plasmidi R, intra- od interspecifico, avviene anche nell'intestino della nostra specie. Il fenomeno, in assenza di opportuni fattori di pressione, avviene con frequenza assai bassa ed i ricombinanti hanno usualmente una certa difficoltà a permanere nell'intestino ed a colonizzarlo stabilmente. Se ai volontari vengono somministrati, insieme all'opportuno ceppo batterico, antibiotici appropriati, sotto la spinta selettiva del chemioterapico si assiste ad un notevole incremento della frequenza di ricombinazione ed alla rapida colonizzazione da parte del ceppo resistente del tratto intestinale. Il fenomeno è stato attribuito all'effetto drastico che hanno gli antibiotici sulla flora batterica normale [27]. Dev'essere tenuto presente, infatti, che la flora anaerobia prevale, con un rapporto di circa 1000 ad 1, nell'intestino umano normale. In condizioni fisiologiche, l'affollamento microbico, il basso potenziale di ossidoriduzione, la presenza di cataboliti, deprime enormemente la probabilità di coniugazione dei microrganismi aerobi come le Escherichie e le salmonelle. Se la flora anaerobia viene ridotta si creano condizioni propizie al passaggio di plasmidi ed alla successiva colonizzazione dell'intestino da parte dei ricombinanti. Oltre che nell'intestino, il passaggio tramite coniugazione di elementi plasmidici è stato accertato tra batteri appartenenti alla flora di ferite e ustioni [28] oltre che nell'ambiente (acqua, alimenti) [29].

Che il passaggio di episomi R da microrganismi saprofiti a salmonelle possa avvenire *in vivo* sotto la pressione di opportuni agenti chemioterapici è stato confermato anche da recenti personali osservazioni raccolte nel corso di una modesta epidemia (51 casi) dovuta a *S. panama* propagatasi durante febbraio-aprile 1976 nel Reparto di Puericoltura degli Ospedali Riuniti di Parma. In quell'occasione si ebbe modo di isolare numerose salmonelle a partire dal succo gastrico dei piccoli pazienti assai prima di quanto non fosse possibile reperire il microorganismo nelle feci. Nei primi casi osservati la *S. panama*, sensibile praticamente a tutti gli antibiotici saggiati, manteneva il proprio spettro di sensibilità anche in seguito al transito intestinale.

In altri termini, non furono riscontrate differenze di resistenza ai chemioterapici degli stipti isolati dallo stomaco e successivamente dalle feci. In un caso, tuttavia, la *S. panama* nel corso della migrazione intestinale acquistò caratteri completamente nuovi divenendo contemporaneamente resistente ad ampicillina, aminosidina, kanamicina, cefaloridina e carbenicillina. A causa della immaturità dei piccoli pazienti non era stato possibile introdurre in terapia il cloramfenicolo e tutti i bambini erano stati trattati con ampicillina. All'analisi genetica successivamente condotta le cinque resistenze acquisite dalla *S. panama* si dimostrarono trasferibili in blocco ad opportuni ceppi riceventi di *E. coli*. Una ulteriore caratterizzazione molecolare del plasmidio R albergato nelle *S. panama* ha dimostrato che questo particolare fattore genetico è costituito da una struttura di DNA bicatenario circolare con peso molecolare di 35×10^6 dalton e che i 5 determinanti R costituiscono non più del 25 % del peso totale dell'intero plasmide. Sebbene non possano essere avanzate ipotesi definitive sull'origine del fattore ricevuto da questi ceppi di *S. panama* sembra del tutto fuori dubbio che l'acquisizione del fattore R sia avvenuta *in vivo* nell'intestino dei piccoli pazienti nel corso del transito intestinale.

Deve inoltre far riflettere la considerazione che, una volta emerso il ceppo poliresistente, la successiva diffusione fu estremamente rapida ed in ben pochi casi, nel corso dell'epidemia, fu poi possibile isolare *S. panama* dotata della primitiva sensibilità. L'impressione che si ebbe in questa circostanza fu quindi quella che non solo il ceppo di *S. panama* fosse divenuto, per acquisto del fattore R, poliresistente agli antibiotici ma che, in qualche modo direttamente o indirettamente collegata a questo evento, la patogenicità o meglio la virulenza del ceppo risultasse pericolosamente esaltata.

Che relazione può esistere, se può esistere, tra plasmidi R e virulenza batterica? Per ciò che concerne i fattori R direttamente, ben pochi risultati lasciano supporre che l'acquisizione di questi plasmidi possa modificare qualità così lontanamente correlate alla resistenza agli agenti chemioterapici come la patogenicità e la virulenza. Non deve d'altra parte essere dimenticato che i plasmidi R rappresentano solo uno dei numerosi modelli di plasmidi che hanno notevolissima diffusione nell'ambito delle *Enterobacteriaceae*. Inoltre, poiché i fagi temperati sono il primo e più perfetto esempio di episomi [30], è necessario qui sottolineare che sono proprio geni extracromosomici che, in batteri come il *C. diphtheriae* e *S. pyogenes*, presiedono a ben noti caratteri di virulenza quali la sintesi della tossina difterica e della tossina eritrogenica [31, 32]. Non mancano pertanto autorevoli esempi di fattori genetici accessori direttamente implicati nel modificare il rapporto ospite-parassita. La versatilità degli episomi albergati nelle *Enterobacteriaceae* è d'altra parte meravigliosa. I plasmidi possono veicolare caratteri che conferiscono ai ceppi una loro sessualità, come F; trasportano da specie a specie,

causando grande confusione e sconcerto dei tassonomisti puri, tratti metabolici considerati troppo spesso fissi e talora alla base anche di tests cardinali ai fini classificativi: così esistono episomi che veicolano l'informazione per sintetizzare enzimi che degradano il lattoso [33], il saccarosio [32] e consentono la formazione di H_2S [34]. In tal modo i plasmidi contribuiscono a creare difficoltà nella comune diagnostica batteriologica inquinando schemi ormai affermati. Basti pensare che circa l'8 % delle salmonelle attualmente in circolazione sono lattoso-positive per caratteri plasmidici e che un'ulteriore quota è in grado di scindere il saccarosio sempre per gli stessi motivi per dare un'idea dell'importanza di questi fattori anche negli aspetti pratici dell'epidemiologia delle salmonelle. Altri episomi, pure albergati dagli enterobatteri, hanno funzioni totalmente ignote e sono conosciuti solo per i fenomeni di interferenza che causano, in adatte condizioni genetiche.

Tra tutta questa miriade di elementi plasmidici è fondamentale ritenere che vi sono ampie e facili possibilità di ricombinazione. In altre parole, il modo episomico non è statico, è molto fertile e dà continuamente origine ad ibridi con caratteristiche intermedie tra i vari elementi che prendono parte alla ricombinazione. Alcuni assortimenti possono non condurre a vantaggi effettivi ma altri, date opportune condizioni di selezione, riescono ad emergere diffondendosi rapidamente da specie a specie e nell'ambito della specie. Esistono infine fattori genetici particolarmente legati, almeno in alcuni membri delle *Enterobacteriaceae*, all'espressione di veri e propri caratteri biochimici che conferiscono al germe portatore vantaggi formidabili laddove si considerino la capacità di colonizzazione e l'espressione della virulenza.

Come è noto, non più del 50 % di tutte le diarree è imputabile all'azione di salmonelle, shigelle, virus e protozoi [35]. Il restante 50 % è usualmente sostenuto da particolari ceppi di *E. coli* definiti enterotossici [35, 36]. Tali diarree sono provocate da questi microrganismi vuoi con un meccanismo simil-colerico, con produzione cioè, da parte di germi che si moltiplicano nel lume intestinale, di una enterotossina capace di agire sul sistema adenilico-ciclastasi CAMP, vuoi con modalità simil-dissenteriche riconducibili ad una invasione della mucosa intestinale seguita da estesa infiammazione. Orbene, se paragonati a ceppi non enterotossici, i coli patogeni si diversificano perché albergano pressoché costantemente (90 % ed oltre) una serie numerosissima di plasmidi [35, 36]. Ciascuno di questi ceppi può replicare contemporaneamente fino a 7 elementi genetici accessori. Mentre della più parte di questi episomi si ignora ogni funzione, deve essere qui sottolineata l'elevatissima frequenza con cui queste escherichie contengono tre importanti plasmidi, in varia combinazione, definiti *Hly*, *Ent* e *K 88* o *K 99*. Mentre il possedere uno solo di questi plasmidi può già conferire al ceppo una virulenza più elevata se riferita a cellule che non posseggono alcun plasmide, la coesistenza dei tre nello stesso citoplasma rende il germe francamente virulento nei riguardi

di varie specie animali (suini, bovini) incluso l'uomo. Ecco quindi un chiaro esempio del come fattori episomici possono decidere totalmente il modello di comportamento di un ceppo nei riguardi dell'ospite specifico. Quali prodotti specificano i geni episomici di *Hly*, *Ent* e *K 88* o *K 99* ed in che modo essi influenzano la virulenza?

Lo studio di ceppi di *E. coli* enterotossici per il suino ha dimostrato che *Hly* codifica una emolisina [25], *Ent* domina la sintesi di esotossine [33] e *K 88* produce un particolare antigene di superficie [37]. Nel vitello questo episoma viene definito *K 99*. Nella diarrea provocata da ceppi di *coli* nell'uomo è stata accertata solo la presenza di *Ent* e talora di *Hly* [35, 36].

Hly, *K 88* ed *Ent* hanno caratteristiche molecolari ben definite nel senso che il DNA bicatenario isolato dai *coli* enteropatogeni ha uno spettro di pesi molecolari variabile da 40×10^6 (*K 88*) a 60×10^6 (*Ent*) a 65×10^6 daltons (*Hly*) [35, 36]. Solo una minima parte dei geni di tali elementi codifica quindi per i prodotti noti. La natura chimica ed il meccanismo d'azione della emolisina elaborata da *Hly* sono così poco conosciute che nella successiva discussione la funzione di tale plasmidio verrà solo accennata. Per ciò che concerne *Ent*, viceversa, esso codifica almeno due esotossine diverse. La prima, ST, termostabile, difficilmente dosabile *in vitro*, ha meccanismo d'azione sconosciuto. La seconda, LT, ha natura proteica, è termolabile, influenza negativamente l'equilibrio idrosalino intestinale tramite il sistema adenilico-ciclastasi CAMP ed è dosabile *in vitro* sebbene con tecniche alquanto elaborate. *K 88* od il suo equivalente *K 99* determina la sintesi di una proteina filamentosa che migra alla superficie cellulare e la riveste sotto forma di minuscole e numerosissime appendici.

Le esemplari ricerche di Smith e Linggood [38] hanno chiarito con fini tecniche genetiche applicate *in vitro* ed *in vivo* le relazioni di questi episomi tra di loro ed il meccanismo dell'acquisizione della virulenza. Dopo aver variamente incrociato i ceppi, questi AA. poterono disporre, a partire da un *E. coli* non patogeno, di derivati contenenti i tre plasmidi in tutte le possibili combinazioni dimostrando che l'acquisizione di *K 88* ed *Ent* da parte di un ceppo normale lo rendeva virulento per il suino.

Dei tre plasmidi, il ruolo più importante viene giocato da *K 88*. Ceppi *K 88⁻ Hly⁺* o *K 88⁻ Hly⁺ Ent⁺* causano quadri enterici assai modesti nell'animale così come batteri solamente *K 88⁺*. Ma *coli K 88⁺ Ent⁺* sono in grado di dare diarree spesso letali nell'animale. Il motivo di questo comportamento va cercato nella alta adesività che *K 88* conferisce alle cellule che lo albergano. Il tenue non è infatti normalmente mai colonizzato dai batteri aerobi che vi transitano velocemente e pervengono al colon dove possono proliferare. Quando un ceppo possiede l'antigene *K 88* ha un notevole vantaggio selettivo e può colonizzare l'intestino, poiché le sue barrette adesive lo ancorano all'epitelio. Qui si sviluppa fino al punto di provocare leggerc

diarree. *K 88* facilita la colonizzazione solo a ceppi di coli nel suino, così come *K 99* è specifico per il vitello. Trasferito alla salmonella esso non induce alcun vantaggio selettivo. Un ceppo di coli *K 88⁻ Ent⁺* produce le due tossine ST e LT durante il transito intestinale. Mancando delle opportune modifiche di superficie tuttavia la permanenza di questi ceppi nel tenue è brevissima. Giunti al colon i batteri *K 88⁻ Ent⁺* si moltiplicano adeguatamente ma il quadro che possono causare è modesto in quanto entrambe le tossine sono specifiche per l'epitelio dell'intestino tenue e non del crasso. I ceppi che albergano *K 88*, *Ent* e *Hly* sono virulenti appunto per il sommarsi delle proprietà fisiologiche dei tre episomi. È stato infine dimostrato che non solo *K 88* ma anche *Hly* e *Ent* da soli conferiscono qualche vantaggio nel potere di colonizzazione del microorganismo che li ospita. Mentre infatti un coli *K 12* somministrato al suino o all'uomo viene eliminato del tutto in circa 3 giorni, i ceppi di *E. coli K 12* contenenti *Ent* o *Hly* permangono, senza causare alcuna sintomatologia, per oltre 30 giorni nell'animale. A lungo termine questa influenza positiva sul potere di colonizzazione dell'intestino deve aver portato all'attuale enorme diffusione di ceppi alberganti plasmidi nel tratto enterico degli animali che rappresentano pertanto un pericoloso serbatoio di sorprese genetiche.

Dunque, nel suino, nel vitello e nell'uomo i ceppi di *E. coli* possono provocare malattie in seguito a modificazioni derivanti dall'acquisizione di elementi episomici. Questo modello può essere esteso per interpretare alcuni fenomeni osservati in corso di particolari epidemie di salmonellosi?

Le Minor ha documentato un grave episodio di salmonellosi in Francia dovuto a *S. wien*. Tra il 1956 e il 1970 questo sierotipo aveva fatto apparizioni sporadiche causando quadri clinici di scarsa entità e dimostrando uno spettro di sensibilità completo ai principali antibiotici. Nell'agosto 1970, improvvisamente furono accertati numerosi episodi epidemici sostenuti dalla *S. wien* la quale nel frattempo aveva acquisito un plasmide R che le conferiva resistenza a sulfamidici, streptomina, tetraciclina, kanamicina e cloramfenicolo. Le Minor concludeva le sue osservazioni ipotizzando che, in qualche modo, l'acquisizione del plasmidio R da parte di quel ceppo doveva essere associata con l'improvviso accendersi di epidemie multifocali quali quelle che si erano, di fatto, verificate in Francia. Il sospetto di un aumento di virulenza di un ceppo di salmonelle mediato da geni episomici cominciava ad infiltrarsi nella mente di molti ricercatori. Come già riportato, nel 1972 si propagava in Messico con estrema rapidità una epidemia dovuta a *S. typhi* [9]. La febbre tifoidea ha vastissima estensione, alta morbilità e insolita mortalità, quest'ultima dovuta a scarsa risposta del germe alla terapia antibiotica. Ricerche genetiche dimostrano che il ceppo di *S. typhi* messicano alberga un plasmidio R che conferisce resistenza alla tetraciclina, cloramfenicolo, streptomina e sulfamidici. In retrospettiva si scopre che lo

stesso fattore R è presente in ceppi di *Shigella dysenteriae*, un responsabile di gravi quadri di dissenteria nel 1968 nelle stesse regioni e in *Sh. flexneri* 2 e 6 diffuse nel 1970 anche negli Stati Uniti. Considerando che i plasmidi come *Ent. K 88*, *K 99* e *Hly*, responsabili come si è visto della enteropatogenicità di *E. coli*, possono facilmente ricombinarsi con fattori R dando luogo a ibridi con caratteristiche di sinergismo, Gangarosa [9] è tentato di spiegare l'atipico andamento della salmonellosi messicana supponendo che ciascuno dei ceppi in causa abbia ricevuto, oltre alla resistenza agli antibiotici, fattori capaci di aumentare la virulenza batterica.

Queste ipotesi debbono ancora essere pienamente convalidate su base genetica ma hanno senza dubbio una suggestiva base clinico-epidemiologica.

Nella nostra opinione, il concetto che la semplice acquisizione di un plasmidio R possa modificare i caratteri di patogenicità di un ceppo, ha scarso fondamento. Tuttavia, considerazioni diverse portano a rivalutare un ruolo indiretto di R nel processo ipotizzato di aumento di virulenza. È ben noto che cellule che già albergano episomi sono migliori recettrici di quelle che ne sono prive. Ricordando la grande varietà di elementi plasmidici con funzioni note ed ignote ritrovabili negli enterobatteri si possono supporre nuovi meccanismi che, gradino per gradino, portano, con la partecipazione di plasmidi R, ad un incremento della virulenza batterica. Così, in presenza di selezione antibiotica, condizione del resto oggi prevalente non solo in ambiente nosocomiale, verrebbe in un primo momento favorita la sopravvivenza di ceppi contenenti plasmidi R. Questi potrebbero ricevere da germi saprofiti refrattari quali *Proteus*, *Klebsiella*, etc., elementi genetici accessori tra i più disparati. Episomi a funzione pressoché sconosciuta quali *Hly* danno già, come si è detto, un notevole vantaggio all'ospite nella colonizzazione dell'organismo animale. Ulteriori acquisizioni genetiche del tipo sequenziale già proposto per i coli enteropatogeni potrebbero finalmente far diventare francamente virulenti ceppi fino a poco prima solamente meglio adattati a sopravvivere in certi distretti ecologici ed in certi animali. Il passaggio di salmonelle di questo tipo dal serbatoio animale all'uomo, nella presente situazione ecologica, sarebbe solo questione casuale e di tempo.

Tutto questo quadro ha, come sfondo, il persistere di una grave e profonda pressione selettiva operata dagli antibiotici. Sebbene l'uso di questi farmaci, specie profilattico ma anche terapeutico, sia soggetto a vastissime critiche sulla base di un accertato, generalizzato abuso, sarà bene sottolineare che proprio nel campo delle salmonellosi, dove la pressione selettiva è per i motivi suddetti estremamente pericolosa, sono invalse abitudini profilattiche e terapeutiche alquanto discutibili. Infatti, mentre non è mai in dubbio la necessità di instaurare un appropriato trattamento delle febbri enteriche causate essenzialmente dalle sole salmonelle patogene per l'uomo (*S. typhi*, *paratyphi* A, B) o nel caso di quadri provocati da salmonelle sp.

invasive con quadri clinici gravi e sistemici, assai meno giustificato o addirittura nocivo appare il trattamento chemioterapico effettuato nel corso di gastroenteriti acute da salmonelle non invasive e nella bonifica dei portatori. Svariati ricercatori [39-40] hanno dimostrato come un trattamento con neomicina o cloramfenicolo delle gastroenteriti non abbrevi affatto il periodo di degenza rispetto ai soggetti trattati con placebo mentre il numero di soggetti che divengono portatori (50 % contro 20 %) e la durata del periodo di eliminazione delle salmonelle sono costantemente più elevati. In un caso particolarmente ben documentato riguardante la intossicazione alimentare di oltre 1900 persone che furono erroneamente sottoposte a terapia sia con ampicillina che cloramfenicolo i risultati dello studio dimostrarono che l'escrezione delle salmonelle fu insolitamente prolungata nel tempo e che molti stipiti divennero, da sensibili, poliresistenti per acquisizione di plasmidi R. Ciò si verificò principalmente nel gruppo di soggetti trattati con ampicillina. Il risultato non deve sorprendere se si pensa che la frequenza di *E. coli* che albergano episomi R oscilla oggi intorno all'80 % [41]. Una salmonella che attraversa il tratto enterico specie se in corso di somministrazione di antibiotici, ha una notevole probabilità di ricevere quindi fattori di resistenza. In definitiva questi dati dovrebbero servire a fare desistere dall'abitudine diffusa di trattare con chemioterapici le semplici gastroenteriti da salmonella.

Questa procedura è dannosa poiché non altera l'andamento clinico, espone il paziente a rischi tossici dovuti agli antibiotici, prolunga lo stato di portatore e causa selezione di ceppi che albergano fattori R che rappresentano un reale pericolo a causa della loro potenzialità di diffusione e virulenzazione.

Se l'eccessiva e nociva pressione selettiva esercitata dai farmaci antibiotici usati con scarsa oculatezza non cesserà, potrà forse avverarsi la pessimistica previsione di Smith e Linggood che, non a torto, temono un'emergenza accelerata di nuovi ceppi batterici dotati di maggior virulenza e di armi biochimiche più affilate ottenute in seguito a fenomeni di ricombinazione che avvengono nell'immenso *pool* genetico costituito dagli elementi episomici, tra ceppi sempre più spesso dotati di fattori R. Evento che tutti noi, già oberati dall'attuale peso economico, umano e sociale delle salmonellosi, certamente dobbiamo contribuire ad evitare, specie conoscendone le cause.

BIBLIOGRAFIA

1. EDITORIAL. 1973. Chloramphenicol resistance in typhoid. *Lancet*. ii: 1008-1009.
2. WOODWARD, T.E. & J.E. SMADEL. 1964. Management of typhoid fever and its complications. *Ann. Intern. Med.* 60: 144-147.

3. COLQUHOUN, J. & R.S. WEETCH. 1950. Resistance to chloramphenicol developing during treatment of typhoid fever. *Lancet*. ii: 621-623.
4. ROMERO, E. & A.M. MOLINA. 1967. La multiresistenza infettiva ai farmaci antibatterici. Osservazioni su un campione di 98 stipti di « S. Typhimurium » isolati da casi di gastroenterite. *Atti. XIV Congr. Naz. Microbiol.* Messina, pp. 495-509.
5. GIAMMANCO, G. 1972. Fattori trasmissibili di resistenza agli antibiotici (Fattori R) negli stipti di Salmonella isolati nell'Italia meridionale. *Giorn. Mal. Infett.* **24**: 727-729.
6. BIANCHI, L. & E. ROMERO. 1968. Studio di un fattore R rinvenuto nel primo stipte di « Salmonella Sofia » isolato in Italia (Pavia). *Ig. Mod.* **61**: 260-270.
7. LUPPI, A., G. BUCCI, P. MAINI, R. GAIANI & I. PIVA. 1973. Antibiotico-resistenza trasmissibile in stipti di Salmonella isolati in provincia di Ferrara da feci umane, da liquor e da acque superficiali. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* **52**: 311-320.
8. NATOLI, D., G. GIAMMANCO, G. CASCIO & M. MACCHIAYELLO. 1971. Fattori di resistenza ai chemioterapici in Shigelle e colibacilli enteritogeni isolati da casi di gastroenterite infantile. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* **50**: 41-44.
9. GANGAROSA, E.J., J. OLARTE, P.M. HERNANDEZ & M. BESSUDO. 1972. An epidemic-associated episome. *J. Infect. Dis.* **126**: 215-218.
10. ANDERSON, E.S. 1968. Drug resistance in Salmonella typhimurium and its implications. *Brit. Med. J.* **3**: 333-339.
11. BUTLER T., K. ARNOLD, N.N. LINH & M. POLLOCK. 1973. Chloramphenicol resistant typhoid fever in Vietnam associated with R. factor. *Lancet*. ii: 983-985.
12. ANDERSON, E.J. 1966. Possible importance of transfer factors in bacterial evolution. *Nature.* **209**: 637-638.
13. LEBEK, G. 1963. Uber die Entestehung mehrfachresistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zentralbl. Bakteriol. Parasiten K.* **188**: 494-505.
14. GUINÉE, P.A., R. SCHALTENS & H.M.C. WILLENS. 1967. Influence of resistance-factors on the phage types of « Salmonella Panama ». *Ant. V. Leeuwen.* **33**: 30-40.
15. EDITORIAL. 1974. Antibiotic and Farmers. *Brit. Med. J.* **2**: 235-236.
16. ANDERSON, E.S. 1968. The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**: 131-180.
17. HAYES, W. 1968. The genetics of bacteria and their viruses. Wiley, London.
18. WATANABE, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacterial. Rev.* **27**: 87-115.
19. DAVIES, J.E. & R. ROWND. 1972. Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae. *Science.* **176**: 758-768.
20. SCHLESSINGER, D. (Ed.). 1974. *Microbiology.* ASM, Washington, 1975.
21. CAMPBELL, A.M. 1969. *Episomes.* Harper & Row.
22. FALKOW, S. 1975. *Infectious multiple drug resistance.* Pion, London.
23. ANDERSON, E.S. & H.R. SMITH. 1972. Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *Brit. Med. J.* **3**: 329-331.

24. ANDERSON, J.D., L.C. INGRAM, M.H. RICHMOND & B. WIEDEMANN. 1973. Studies on the nature of plasmids arising from conjugation in the human gastro-intestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 6: 475-486.
25. SMITH, H.W. 1969. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of « *Escherichia coli* » to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *Lancet*. i: 1174-1176.
26. ANDERSON, J.D., W.A. GILLESPIE & M.H. RICHMOND. 1973. Chemotherapy and antibiotic-resistance transfer between enterobacteria in the human gastro-intestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 6: 461-473.
27. ANDERSON, J.D., L.C. INGRAM & M.H. RICHMOND. 1973. Studies on the nature of plasmids arising from conjugation in the human gastro-intestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 6: 475-486.
28. ROE, E. & E.J. LOWBURY. 1971. Transfer of antibiotic resistance between *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and other Gram-negative bacilli in burns. *Lancet*. i: 149-152.
29. LACEY, R.W. 1975. A critical appraisal of the importance of R-factors in the Enterobacteriaceae « in vivo ». *J. Antimicrob. Chemoter.* 1: 25-37.
30. *Ciba Foundation Symp. on Bacterial Episomes and Plasmids*, Little, Boston, 1969.
31. PAPPENHEIMER, A.M. & D.M. GILL. 1973. Diphtheria. Recent studies have clarified the molecular mechanisms involved in its pathogenesis. *Science*. 182: 353-364.
32. DAVIES, B.D., R. DULBECCO, H.N. EISEN & B. WOOD. 1973. *Microbiology*. Harper.
33. DATTA, N. 1974. *Microbiology*. ASM Washington, 1975.
34. CLOWES, R.C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 36: 361-405.
35. SACK, B.R. 1975. Human diarrheal diseases caused by enterotoxigenic « *Escherichia coli* ». *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 333-353.
36. EDITORIAL. 1975. *E. coli enteritis*. 2: 1131-1132.
37. ØRSKOV, I. & F. ØRSKOV. 1966. Episome-carried surface antigen K88 of « *Escherichia coli* ». I. Transmission of the determinant of the K 88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. *J. Bacteriol.* 91: 69-80.
38. SMITH, H.W. & M.A. LINGGOOD. 1971. Observations of the pathogenic properties of the K 88, HLY and ent plasmids of « *Escherichia coli* » with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 4: 467-485.
39. SCHROEDER, S.A., P.M. TERRY & J.V. BENNET. 1968. Antibiotic resistance and transfer factor in *Salmonella*, United States 1967. *J. Amer. Med. Ass.* 205: 903-906.
40. ASERKOFF, B. & J.V. BENNET. 1969. Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of *Salmonellae*. *N. Engl. J. Med.* 281: 636-640.
41. AMBROSOLI, G., M.G. MENOZZI, M. MOLINAS & G.C. SCHITO. 1972. Distribuzione dei fattori R in ceppi di « *Escherichia coli* » isolati da materiali patologici a Parma tra il 1965 e il 1972. *Atti XVI Congresso Nazionale Microbiol.* 1: 361-372.