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 descritta?

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-positivo 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, portino, 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. Über 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.