

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA



DIPARTIMENTO DI CHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

**PROVA FINALE**

*IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE*

*DI BATTERI POLIANTIBIOTICO-RESISTENTI*

*DI ORIGINE ZOOTECNICA*

LAUREANDO

RELATORE

Gianfrancesco RUSSO

Gianluigi CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUZIONE .....</b>  | <b>4</b>  |
| 1.1 DALLA SCOPERTA DEGLI ANTIBIOTICI ALLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA .....        | 4         |
| 1.2 DEFINIZIONE DI POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA .....                               | 5         |
| 1.3 TIPOLOGIE DI RESISTENZA .....   | 8         |
| 1.4 TIPOLOGIE DI TRASFERIMENTO DELLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA .....             | 9         |
| 1.5 I VETTORI MOLECOLARI MAGGIORMENTE IMPLICATI NELLA RESISTENZA .....            | 12        |
| 1.6 TRASMISSIONE DELLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA DAGLI ANIMALI<br>ALL'UOMO ..... | 17        |
| <i>1.6.1 TRASMISSIONE TRAMITE IL CONSUMO DI ALIMENTI INFETTI .....</i>            | <i>17</i> |
| <i>1.6.2 TRASMISSIONE TRAMITE L'AMBIENTE .....</i>                                | <i>18</i> |
| <i>1.6.3 TRASMISSIONE DIRETTA .....</i>   | <i>18</i> |
| 1.7 STRATEGIA "ONE-HEALTH" .....  | 19        |
| 1.8 SITUAZIONE IN ITALIA. IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA AR-ISS .....                 | 20        |
| 1.9 L'IMPORTANZA DEI POLIFENOLI .....   | 24        |
| <b>II. SCOPO DELLA RICERCA .....</b>  | <b>29</b> |
| 2.1 IL PROGETTO .....   | 29        |
| <b>III. MATERIALI E METODI .....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO .....   | 32        |
| 3.2 AMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI MARKER DI SPECIE NEI CAMPIONI ANALIZZATI .....   | 35        |
| 3.3 CORSA ELETTROFORETICA .....   | 38        |
| 3.4 SUPPORTO INFORMATICO .....  | 39        |

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>IV. ANALISI DEI RISULTATI.....</b> | <b>40</b> |
| 4.1 RISULTATI .....                   | 40        |
| 4.2 GENERI OSSERVATI .....            | 42        |
| <b>V. CONCLUSIONI .....</b>           | <b>54</b> |
| <b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>         | <b>56</b> |

# I. INTRODUZIONE

## 1.1 DALLA SCOPERTA DEGLI ANTIBIOTICI ALLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA

La scoperta e la produzione di antibiotici (sintetici) nella prima metà del secolo precedente è stata una delle più grandi conquiste della medicina (Laurence et al,2019). L'uso di agenti antimicrobici ha ridotto la mortalità umana e ha contribuito in modo sostanziale all'aumento della durata della vita (Laurence et al, 2019). Gli antibiotici sono, agenti terapeutici, ampiamente utilizzati oltre che a livello clinico, anche nelle pratiche agricole.

Il primo composto antimicrobico scoperto fu la penicillina (Flemming, 1929), un antibiotico  $\beta$ -lattamico. A seguito di questa importante scoperta, gli antibiotici, furono ampiamente utilizzati per il trattamento di infezioni batteriche; inizialmente vennero utilizzati i sulfamidici, ad essi seguirono la streptomicina e la streptotricina aminoglicosidiche (Jèsman, 2011). Oggi sono note numerose diverse classi di agenti antimicrobici che sono classificate in base ai loro meccanismi di azione (Neu, 1992). Gli antibiotici possono ad esempio inibire la sintesi proteica, come aminoglicoside, cloramfenicolo, streptotricina e tetraciclina o interagire con la sintesi di DNA e RNA, come ad esempio la rifampicina. Altri gruppi inibiscono la sintesi o danneggiano la parete cellulare batterica come fanno il  $\beta$ -lattame e il glicopeptide o modificano, come sulfonamide e trimetoprim, il metabolismo energetico di una cellula microbica. A seguito dell'introduzione degli antibiotici venne ipotizzato che l'evoluzione della resistenza agli antibiotici (AR) sarebbe stata al quanto improbabile. Ciò si basava sul presupposto che la frequenza delle mutazioni che generavano batteri resistenti fosse trascurabile (Davies, 1994). Sfortunatamente, il tempo dimostrò il contrario.

Inizialmente nessuno considerò, la capacità da parte dei batteri di poter sviluppare una farmaco-resistenza nei confronti degli antibiotici somministrati riuscendo ad adattarsi attraverso meccanismi di trasferimento genico, al mutato ambiente. Inoltre, la loro capacità di scambiare geni, che ora è ben nota come trasferimento genico orizzontale (HGT), era particolarmente inaspettata. Successivamente è stato scoperto che

l'emergere della resistenza è effettivamente iniziato prima che fosse caratterizzato il primo antibiotico, la penicillina. La prima  $\beta$ -lattamasi infatti, fu identificata in *Escherichia coli* prima del rilascio di penicillina per l'uso nella pratica medica (Abraham and Chain, 1940). Oltre ai  $\beta$ -lattamici, la famiglia degli aminoglicosidi fu uno dei primi gruppi di antibiotici ad affrontare le sfide della resistenza (Wright, 1999; Bradford, 2001). Nel corso degli anni è stato dimostrato da numerosi studi ecologici che il (crescente) consumo di antibiotici contribuisce alla formazione di antibiotico-resistenze in varie specie batteriche (NethMap, 2008). Alcuni esempi relativi alla correlazione tra consumo scorretto di antibiotici e sviluppo di resistenze a quest'ultimi, sono state riscontrate nello stafilococco aureo resistente alla meticillina (MRSA)(DeLeo et al., 2010) e negli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) (McKinnell JA et al., 2012), entrambi risultati essere in crescita costante.

## **1.2 DEFINIZIONE DI POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA**

La resistenza antimicrobica è la capacità dei microrganismi, come i batteri, di diventare sempre più resistenti ad un antimicrobico a cui erano precedentemente suscettibili (Schwarz S., Chaslus-Dancla E, 2001). La poliantibiotico-resistenza è una conseguenza della selezione naturale e della variabilità genetica. Tale mutazione viene quindi trasmessa, conferendo resistenza. Questo processo di selezione naturale è esacerbato da fattori umani come l'uso inappropriato di antimicrobici nella medicina umana e veterinaria, cattive condizioni igieniche e pratiche in ambito sanitario o nel settore zootecnico che facilitano la trasmissione di microrganismi resistenti (Gilmore et al., 2013). Nel tempo, ciò rende gli antimicrobici meno efficaci e alla fine inutili.

Per definizione la poliantibiotico resistenza (AMR) è la capacità dei microrganismi di resistere a diverse classi di antibiotici (tre o più di tre) che sono strutturalmente differenti e hanno obiettivi molecolari diversi. Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza probabilmente ha avuto origine milioni di anni fa (Guardabassi, Lars B. Jensen, 2008), ma negli ultimi anni c'è stata una progressiva perdita degli effetti degli antibiotici, nei confronti dei batteri che ne erano precedentemente sensibili. I motivi che hanno portato alla multifarmaco-resistenza sono molteplici, uno dei quali è l'uso intensivo e

scorretto di antibiotici. Infatti maggiore è il volume utilizzato, maggiori sono le possibilità d'insorgenza di una resistenza a quest'ultimi (Gelband H et al., 2015). Vi sono prove crescenti che hanno rivelato che la poliantibiotico-resistenza sia stata promossa dall'uso diffuso di antibiotici non terapeutici negli animali (Nhung NT et al., 2017). L'uso improprio di questi farmaci infatti può portare allo sviluppo di resistenze da parte dei batteri, causando l'aumento delle malattie croniche e dei costi relativi ai servizi sanitari. I batteri resistenti vengono trasmessi all'uomo attraverso il contatto diretto con l'animale, l'esposizione al letame, il consumo di carne cruda e il contatto con le superfici della carne che presenta microrganismi MDR (Marshall BM et al., 2011). Un altro fattore che contribuisce allo sviluppo di microrganismi farmacoresistenti è l'uso eccessivo di antimicrobici nella produzione di alimenti per animali. L'entità dell'utilizzo dovrebbe aumentare considerevolmente nei prossimi anni a causa dell'intensificazione delle pratiche agricole in gran parte dei paesi in via di sviluppo (Van Boeckel TP et al., 2015).

L'emergere di batteri poliantibiotico-resistenti è divenuto un importante problema in tutto il mondo, che ha portato un notevole impatto sia sul piano clinico che economico. Alti livelli di batteri MDR (Multidrug-resistance) causano patologie infettive che sono sempre più difficili da trattare e che possono portare sempre più facilmente a decesso; è stato stimato che nell'Unione Europea circa 25.000 pazienti all'anno muoiono a causa di un'infezione causata da batteri poliantibiotico-resistenti (Norrby et al., 2009).

Inizialmente i meccanismi di azione e di resistenza sono stati studiati quasi esclusivamente nei batteri patogeni. È solo negli ultimi anni che la ricerca sulla poliantibiotico-resistenza si è spostata sul piano ambientale ed in particolare a livello dei microrganismi presenti nel suolo (Kevin J. et al., 2012). Il suolo, rappresenta uno dei più grandi e diversi habitat microbici presenti sulla terra, è sempre più riconosciuto come vasto deposito di geni di resistenza agli antibiotici (V.M. D'Costa et al., 2011). Non solo il suolo viene a contatto diretto con antibiotici ampiamente utilizzati nell'allevamento del bestiame (H. Heuer et al., 2011) e nell'agricoltura vegetale (P. S. McManus et al., 2002), ma è anche un habitat naturale per il genere *Actinomyces*

*Streptomyces*, le cui specie sono quelle maggiormente implicate nella produzione naturale di antibiotici (T.Kieser et al.,2000). In natura infatti la resistenza ad alcuni farmaci da parte dei batteri, era già presente prima dell'utilizzo degli antibiotici in campo clinico. Infatti la farmacoresistenza si è evoluta di pari passo con la capacità che possedevano i batteri nel produrre tali molecole per autodifesa. Questa convinzione si basa su studi che hanno identificato geni di resistenza alle beta-lattamasi (*bla*) ed ai chinoloni (*qnr*) presenti in batteri ambientali (Poirel et al., 2012). In questo senso risulta di estrema importanza l'analisi di batteri presenti nel suolo, in quanto proprio il suolo risulta essere un serbatoio di geni di resistenza, che sono già presenti nei patogeni umani o che possono emergere per aumentare l'attuale arsenale di meccanismi di resistenza agli antibiotici nei microrganismi patogeni.

A tale proposito i ricercatori dell'*Antimicrobial Research Centre in Ontario, Canada*, hanno cercato di capire il numero di batteri presenti nel suolo che mostravano poliantibiotico resistenza, ed i meccanismi d'azione in linea generale della resistenza. Sono quindi stati estratti 480 ceppi batterici da campioni di terreno provenienti da diverse località (urbane, agricole e forestali). L'amplificazione e il sequenziamento del DNA ribosomiale 16S da un sottoinsieme di ceppi hanno indicato che appartenevano al genere degli attinomiceti, le cui specie sintetizzano oltre la metà di tutti gli antibiotici noti. A quel punto i 480 ceppi sono stati successivamente sottoposti a screening con 21 antibiotici, inclusi prodotti naturali (come vancomicina ed eritromicina), loro derivati semisintetici (come minociclina e cefalossina) e molecole completamente sintetiche (come ciprofloxacina e linezolid). Gli antibiotici comprendevano tutti i principali bersagli batterici e includevano una vasta gamma di farmaci. Senza alcuna eccezione, ogni ceppo batterico è risultato essere resistente a più farmaci, a sette o otto antibiotici in media, con due ceppi resistenti a 15 farmaci su 21.

### 1.3 TIPOLOGIE DI RESISTENZA

Si definiscono resistenti, i batteri che presentano geni portatori della multifarmaco-resistenza, presenti sia a livello cromosomico che a livello plasmidico (Nikaido, 2009). La resistenza al farmaco può essere di due tipi: resistenza intrinseca o naturale e resistenza acquisita.

La **resistenza intrinseca o naturale** è tipica di quei batteri che non presentano i bersagli cellulari su cui agisce l'antibiotico. Tale assenza può essere legata a numerosi fattori: genetici, ambientali biochimici (Intorre, 2009). Questo tipo di resistenza, è una condizione generale di insensibilità ad un farmaco, ed il fenotipo di resistenza è espresso da tutti gli stipti di una data specie batterica. Ciò va ad evidenziare il meccanismo molecolare di un elemento genetico di resistenza, presente all'interno di un dato ceppo batterico che viene trasferito mediante un trasferimento verticale dalla cellula batterica madre alle cellule figlie (Intorre, 2009). Un classico esempio di resistenza intrinseca è rappresentato dai micoplasmi che, essendo privi di parete cellulare, sono insensibili all'azione delle beta-lattamine (Cécile Bébéar et al., 2011).

La **resistenza acquisita** è un particolare tipo di resistenza che presenta alla base una forte pressione selettiva esercitata da un farmaco nei confronti di una popolazione batterica. In questo secondo caso, i ceppi batterici risultavano essere inizialmente sensibili all'antibiotico. In seguito però hanno acquisito una o più farmaco-resistenze, mediante la modificazione del proprio genoma, attraverso mutazioni e successivo trasferimento di queste nuove caratteristiche alle progenie per via del trasferimento genico verticale; oppure mediante l'acquisizione di geni farmaco-resistenti anche da batteri tra loro diversi (trasferimento orizzontale), sono riusciti a sviluppare una resistenza nei confronti del farmaco e a diventare la popolazione batterica dominante, rispetto ai batteri che mostravano sensibilità a quest'ultimo.

Viene definita **resistenza crociata**, la resistenza espressa da uno stesso gene nei confronti di due o più farmaci. Un tipico esempio di resistenza crociata è data nei confronti di barbiturici e benzodiazepine (Baker-Austin *et al.*, 2006).

La **co-selection o resistenza multipla**, si verifica quando geni che codificano per resistenze a diverse classi antimicrobiche, si trovano insieme su uno stesso elemento genico, come ad esempio: un plasmide, un trasposone o un integrone (Craig Baker-Austin *et al.*, 2006).

Molto importante risulta essere il meccanismo di co-selezione tra antibiotici e metalli. È stata dimostrata una correlazione tra la resistenza al rame e la resistenza a macrolidi e glicopeptidi in *Enterococcus faecium* ottenuti da suini esposti al rame, (Hasman *et al.*, 2002). Infatti si è osservato il co-trasferimento di fenotipi di resistenza a rame e macrolidi in *E. faecium* transconiugante. Ciò evidenzia come il gene che codifica per la resistenza al rame (conferita attraverso il gene *trcB*) sia fisicamente collegato al cluster del gene *vanA* ed al gene *ermB* responsabili della resistenza ai macrolidi, su un singolo plasmide trasferibile (Hasman *et al.*, 2002).

#### **1.4 TIPOLOGIE DI TRASFERIMENTO DELLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA**

La diffusione di geni implicati nella poliantibiotico-resistenza batterica, può avvenire attraverso vari meccanismi genetici, in particolare si distinguono due tipi di trasferimento genico:

Il trasferimento genico orizzontale ed il trasferimento genico verticale (Ambrosoli *et al.*, 2012).

Il trasferimento di DNA è solitamente associato alla divisione cellulare: da una cellula madre si originano due cellule figlie, ognuna delle quali riceve una copia del cromosoma parentale. Questa trasmissione di materiale genetico è detta verticale, poiché procede da una generazione all'altra. In particolare, il batterio che riuscirà ad acquisire una resistenza farmacologica, mediante una mutazione casuale, riuscirà a trasmettere questa caratteristica alle cellule figlie (Ambrosoli *et al.*, 2012).

I batteri, tuttavia, possono trasferire o scambiare informazione genetica senza andare incontro a divisioni cellulari, in un processo detto trasferimento orizzontale. In questo caso i batteri trasferiscono i geni implicati nella farmaco-resistenza attraverso elementi genetici mobili (plasmidi, trasposoni, integroni). Il trasferimento orizzontale può avvenire secondo tre differenti modi: trasformazione, coniugazione e trasduzione.

La **trasformazione** è stato il primo meccanismo di trasferimento genetico orizzontale ad essere scoperto ed è alla base della manipolazione genetica ai fini biotecnologici. Il termine trasformazione deriva dall'osservazione compiuta negli anni trenta del secolo scorso, che l'estratto cellulare di pneumococchi patogeni poteva "trasformare" ceppi innocui in patogeni della stessa specie e che il componente della cellula che consentiva la trasformazione era il DNA (Ambrosoli et al, 2012). Il trasferimento del DNA può avvenire solo in cellule che si trovino in un particolare momento del loro stadio vitale, detto competente o di competenza. Lo stato di competenza può essere indotto da particolari condizioni di stress, come ad esempio la somministrazione di antimicrobici. In questo particolare momento, il batterio è in grado di legare i frammenti genomici e farli entrare al proprio interno. Deve seguire quindi un evento di ricombinazione, per consentire l'incorporazione del DNA esogeno nel proprio genoma e quindi assicurarne la replicazione (Ambrosoli et al., 2012). Occorre notare come, a causa della sua estrema lunghezza, il DNA cromosomico dei batteri tende a frammentarsi e, poiché la lunghezza media di un gene è di circa 1000 nucleotidi, solo una piccola porzione dei geni di un determinato batterio, può essere trasferita da una cellula all'altra durante un singolo evento di trasformazione naturale. Questa tipologia di trasferimento genico, è poco utilizzata dai batteri multifarmaco-resistenti, in quanto il DNA per essere trasferito deve trovarsi libero nell'ambiente, e ciò ne comporta una rapida degradazione. Inoltre i geni della resistenza, possono essere trasferiti solo a batteri facenti parte della stessa specie o comunque strettamente correlate tra loro (Ambrosoli et al.; 2012).

La **coniugazione** avviene se la cellula donatrice contiene plasmidi coniugativi non incompatibili con quelli già presenti nella cellula ricevente (Intorre, 2009). Nei batteri Gram-negativi i plasmidi coniugativi sono responsabili della sintesi di speciali strutture tubulari, chiamate pili sessuali, che si estroflettono dalla cellula donatrice e sono dotati di recettori adesivi sulle loro estremità, in modo da legarsi facilmente ai ligandi delle pareti cellulari delle cellule riceventi (Ambrosoli et al., 2012).

Questo contatto consente il passaggio di DNA da una cellula all'altra. Questo tipo di meccanismo, consente il trasferimento del fattore R, plasmide che presenta geni implicati nella poliantibiotico-resistenza. Come ad esempio la resistenza degli stafilococchi ai beta-lattamici, dello *staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA) e dello *staphylococcus pseudintermedius* meticillino-resistente (MRSP). Il trasferimento mediato dalla coniugazione del fattore R, è estremamente potente in quanto questi geni di resistenza possono essere trasferiti anche tra specie microbiche molto distanti tra loro (Ambrosoli et al, 2012). Ed è proprio in questo contesto che si possono andare a sviluppare microrganismi pan-resistenti.

La **trasduzione** è un fenomeno di trasferimento genico mediato dai batteriofagi, virus che infettano esclusivamente i batteri (Telenti, Tenover, 2002). Esistono principalmente due tipi di trasduzione: generalizzata e specializzata. Nel primo caso qualunque gene batterico può essere impacchettato nel capsido fagico, per cui tutti i geni farmaco-resistenti, possono essere trasferiti.

L'unico svantaggio è che il trasferimento di questi geni, avviene con una frequenza molto bassa. La trasduzione specializzata è fatta solo da alcuni virus temperati: il DNA batterico di una specifica regione cromosomica si integra direttamente sul genoma virale, sostituendone alcuni geni, per cui alcuni geni vengono trasferiti con alta frequenza, altri non verranno mai trasferiti. Generalmente la trasduzione permette il trasferimento di poliantibiotico-resistenze solo tra batteri facenti parte della stessa specie (Intorre, 2009).

## 1.5 I VETTORI MOLECOLARI MAGGIORMENTE IMPLICATI NELLA RESISTENZA

I meccanismi genetici principali che permettono ai batteri di acquisire resistenza agli antibiotici sono le mutazioni cromosomiali (resistenza cromosomica) e l'acquisizione di elementi genetici mobili (resistenza extra-cromosomica).

Nel primo caso si tratta di un accumulo di mutazioni, a livello del gene che codifica per un prodotto bersaglio del farmaco, in modo da alterarne l'affinità (Nikaido, 2009). Nel secondo caso il meccanismo è più complesso e bisogna iniziare dando qualche definizione.

**I plasmidi** sono elementi extra cromosomici in grado di replicarsi in modo autonomo, rispetto al resto del DNA cellulare . Nella grande maggioranza dei casi noti, i plasmidi sono delle molecole circolari di DNA a doppia elica e covalentemente chiuse, come il cromosoma procariotico, ma di dimensioni molto più ridotte, solitamente qualche kilobase (con alcune eccezioni). Sono ereditati dalla cellula insieme al cromosoma e attraverso il processo di coniugazione, i plasmidi possono diffondersi non solo tra batteri della stessa specie ma anche tra procarioti di specie diverse (Robicsek et al., 2006) . I plasmidi vengono definiti come repliconi non essenziali per la vita del microrganismo che li contiene: ciò significa che non contengono geni indispensabili per le funzioni vitali dell'ospite, ma informazioni accessorie spesso utili a conferire un vantaggio selettivo a quest'ultimo. Essi infatti veicolano spesso trasposoni o geni che codificano per la resistenza agli antibiotici (detti plasmidi R). In tal modo sono tra i maggiori responsabili della diffusione della MDR (multidrug resistance) (Ambrosoli et al., 2012). Come ad esempio la resistenza al fluorochinolone, dovuta principalmente (ma non esclusivamente) a mutazioni a livello dei geni plasmidici che codificano per gli enzimi bersaglio; in particolare topoisomerasi del DNA (Hooper DC, 1999). O geni plasmidici come *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTXe* *blaAMPC* presenti in *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Acinetobacter spp.* che codificano  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) (H. Giamarellou, 2011). Inoltre anche in molti batteri Gram-negativi tra cui *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosaeed*, *Acinetobacter spp.*, sono stati trovati numerosi geni a livello plasmidico codificare classi A, B e D di  $\beta$ -lattamasi che

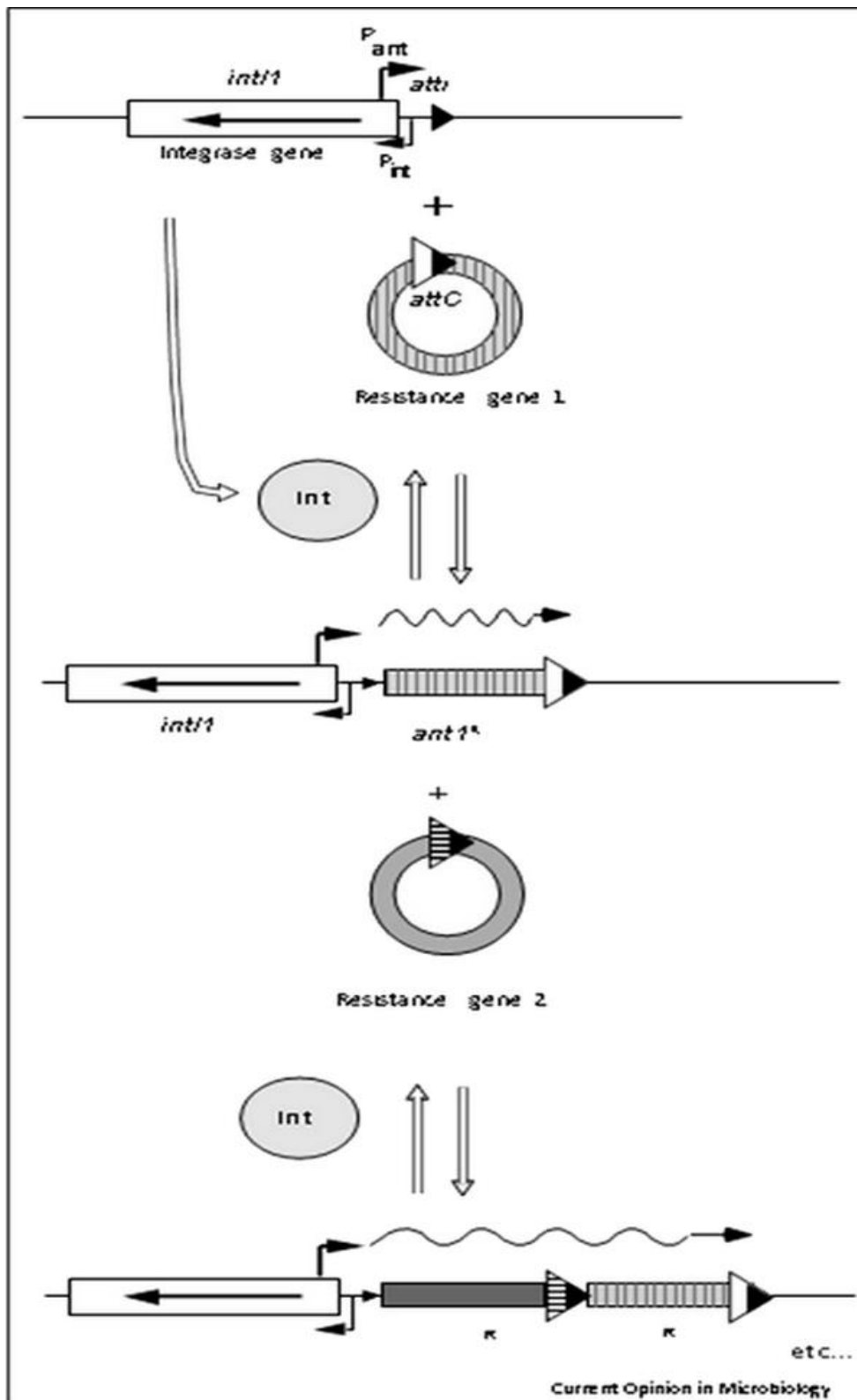
mediano la resistenza a vari antibiotici  $\beta$ -lattamici. Alcuni plasmidi naturali contengono elementi "killer" composti da una proteina killer stabile o mRNA e una proteina inibitrice instabile o un RNA antisense, in modo che la perdita dei plasmidi comporterà la morte della cellula ospite (Smalla et al., 2015). A causa della presenza di queste reti regolatorie, i plasmidi che condividono un simile meccanismo di replica / partizione non possono coesistere stabilmente nella stessa cellula ospite e questo fenomeno è stato utilizzato per la classificazione dei plasmidi in "gruppi di incompatibilità". Nei plasmidi di batteri enterici, questa classificazione include circa due dozzine di tali gruppi (Smalla et al., 2015).

**Gli elementi trasposibili (TE)**, noti anche come "geni saltatori", sono sequenze di DNA in grado di spostarsi all'interno del genoma andando ad inserirsi in un punto diverso dello stesso o di un altro cromosoma. Questo meccanismo consente di spostare alcuni geni all'interno di una singola cellula. In molti casi l'inserimento di questo nuovo materiale genetico, può andare a causare effetti fenotipici nella cellula, in quanto se esso dovesse avvenire a livello di un gene preesistente, potrebbe causarne una conseguente inattivazione. Alcuni trasposoni sono costituiti da sequenze relativamente brevi di 1000-2000 coppie di basi. Gli enzimi necessari per l'inserimento del trasposone, sono codificati da geni situati sul trasposone stesso. Trasposoni di grosse dimensioni possono portare con sé uno o più geni batterici multifarmaco-resistenti. L'elevata mobilità di questi geni, aumenta le probabilità di inserimento di quest'ultimi nelle regioni di DNA che vengono trasferite da parte dei batteri, attraverso meccanismi di trasduzione e coniugazione. (Berkovitz et al., 2002).

**Gli integroni** sono elementi genici che raccolgono e permettono l'espressione di geni trasportati da segmenti mobili di DNA chiamati cassette (Mazel D., 2006). Tutti gli integroni studiati fino al giorno d'oggi sono costituiti da tre elementi chiave necessari per la cattura dei geni esogeni: un gene codificante per un'integrasi appartenente alla famiglia delle tirosina-ricombinasi, il sito di ricombinazione (*attI*), e un promotore. L'integrazione avviene a valle del promotore nel sito attI permettendo in tal modo l'espressione dei geni nella cassetta. A loro volta anche le cassette geniche hanno

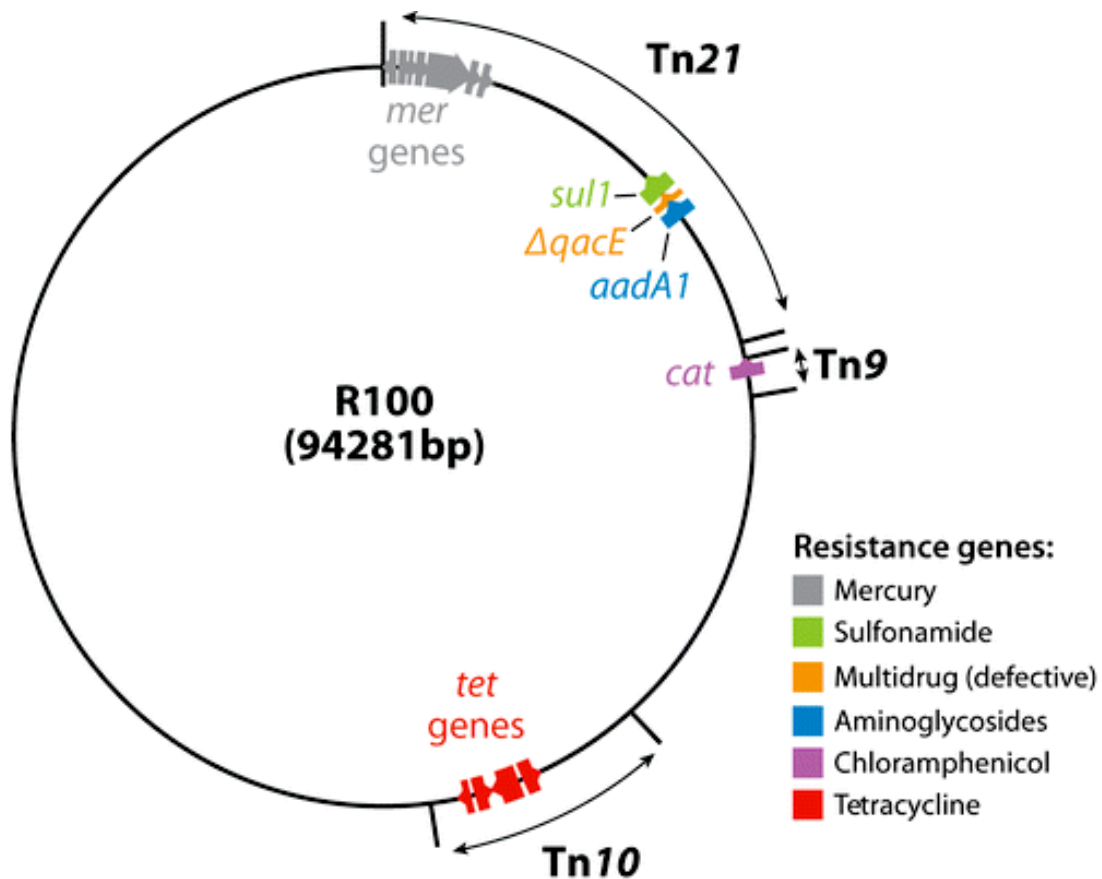
specifiche caratteristiche, possono contenere un singolo gene e una sequenza ripetuta invertita al 3' del gene che viene detta sito *attC* (oppure elemento di 59-basi). I siti *attC* sono diverse famiglie di sequenze nucleotidiche che funzionano come i siti di riconoscimento per le specifiche integrasi. Gli integroni possono trovarsi sui cromosomi, sui plasmidi e sui trasposoni e sono in grado di trasmettere la resistenza agli antibiotici. Oltre 49 differenti geni per la resistenza agli antibiotici sono stati identificati nelle cassette geniche degli integroni (**Figura 1**).

Non si è ancora riuscito a capire l'origine delle cassette geniche poichè esse sono costituite non semplicemente da geni casuali, ma da sequenze di DNA specifiche che sono riconosciute dall'integrasi. Gli integroni sono stati scoperti grazie all'osservazione del fatto che i geni per la resistenza nei batteri gram negativi sono sempre posizionati in siti ben precisi, oltre ad essere sotto controllo di uno stesso promotore e avere lo stesso orientamento. In questo modo gli integroni funzionerebbero come dei vettori d'espressione.



**Figura 1.** Schema del processo di inserimento ed escissione delle cassette geniche circolari, contenenti geni per la resistenza agli antibiotici (*antR*), ad opera di un'integrasi (Rowe-Magnus, Mazel; 1999)

La **Figura 2**, rappresenta il plasmide R100, il quale contiene al suo interno tutti gli elementi genetici che concorrono al trasferimento ed all' inserimento dei geni di resistenza, precedentemente descritti.



**Figura 2.** Schematizzazione di un plasmide (R100), contenente al suo interno tre trasposoni diversi (Tn21, Tn9 e Tn10). Gran parte delle aree vuote all'esterno dei trasposoni sono occupate dai geni di trasferimento (Nikaido Hiroshi et al., 2009).

Tn21 è un esempio particolarmente notevole di trasposone composto, di grandi dimensioni (Liebert CA, Hall RM, Summers AO, 1999). È interessante notare che contiene geni di resistenza al mercurio, sulfonammide e aminoglicosidi.

In particolare l'integrone che contiene già un gene di resistenza al solfonamide *sul1* e una versione troncata di un gene di efflusso multidrug *qacE* ha integrato un gene di resistenza agli aminoglicosidi *aadA1* nello specifico sito di integrazione *attI*.

Un integrone inoltre può contenere fino a otto geni di resistenza (Rowe-Magnus DA, Mazel D. 2002).

## **1.6 TRASMISSIONE DELLA POLIANTIBIOTICO-RESISTENZA DAGLI ANIMALI ALL'UOMO**

I batteri poliantibiotico-resistenti (AMR), possono essere trasmessi dall'animale all'uomo attraverso varie vie: diretta, ambientale o tramite il consumo di carne infetta.

### ***1.6.1 TRASMISSIONE TRAMITE IL CONSUMO DI ALIMENTI INFETTI***

La trasmissione dei batteri multifarmaco resistenti, attraverso il consumo di alimenti contaminati, costituisce una delle principali vie di trasmissione della resistenza dagli animali all'uomo (Jensen et al., 2008). In particolare specie come *Campylobacter* che causano ogni anno nel mondo milioni di infezioni (Smith, Fratamico, 2010), sono largamente presenti negli alimenti di origine animale.

Solitamente i pazienti che presentano un infezione da *Campylobacter*, vengono trattati attraverso la somministrazione di fluorochinoloni (ad es. Ciprofloxacina), questi farmaci vengono ampiamente utilizzati anche in medicina veterinaria (ad es. Enrofloxacin). Le infezioni umane causate da specie *Campylobacter* resistenti al fluorochinolone, sono diventate sempre più comuni e sono spesso associate al consumo di pollame (Ruiz-Palacios, 2007). Questi risultati, insieme ad altri dati, hanno spinto la US Food and Drug Administration a proporre il ritiro dell'uso di fluorochinolone nel trattamento del pollame nel 2000. Una lunga udienza legale si è conclusa con un ordine di ritiro dell'enrofloxacin dall'uso nel campo avicolo (in vigore nel Settembre 2005). Un altro batterio strettamente correlato al consumo di prodotti alimentari di origine bovina, suina ed avicola è la salmonella. Negli ultimi anni è stata evidenziata la presenza nell'uomo di ceppi resistenti a cloramfenicolo, tetracicline e all'acido nalidixico. In seguito alla somministrazione di questi antibiotici al bestiame da allevamento (Mølbak et al., 1999; Ethelberg et al., 2007; Jensen et al., 2008).

### ***1.6.2 TRASMISSIONE TRAMITE L'AMBIENTE***

Un numero crescente di studi, ha evidenziato la possibilità di una trasmissione di batteri MDR, dagli animali all'uomo, grazie all'ambiente circostante. Ciò risulta essere un problema particolarmente serio, soprattutto per coloro che lavorano a stretto contatto con gli animali, come ad esempio avicoltori, macellai ed allevatori di bestiame. L' ambiente contaminato può essere rappresentato dal terreno. Nel settore agricolo il letame viene utilizzato per la concimazione; ed è proprio in questo contesto che può avvenire un'elevata diffusione dei batteri multifarmaco resistenti. Poiché nonostante i batteri fecali trovino un ambiente a loro poco adatto, sono in grado vivere per un tempo relativamente molto lungo fuori dall'ospite, ciò consente loro di trasferire elementi di farmacoresistenza ad altri batteri presenti nel suolo e nelle acque.

### ***1.6.3 TRASMISSIONE DIRETTA***

Il contatto diretto con gli animali, può in determinate circostanze costituire una via di trasmissione della poliantibiotico resistenza all'uomo. Un esempio di trasmissione diretta della resistenza è stata riportata in uno studio che ha identificato *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 resistente alla meticillina sia negli agricoltori che nei loro polli da carne (Mulders et al., 2010). Per determinare il trasferimento di *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente alla meticillina nel personale avicolo, sono stati campionati 40 allevamenti di polli da carne olandesi, in particolare lo studio è stato effettuato su un personale composto da 466 membri. Dei dipendenti, 26 erano positivi (5,6%), indicando un rischio maggiore di esposizione rispetto alla popolazione olandese generale (0,1%). Questo rischio era significativamente più elevato per il personale a contatto con animali vivi (5,2%), in particolare polli da carne sospesi sul macello (20,0%), rispetto a tutto il resto del personale (1,9%) (Mulders et al., 2010).

## 1.7 STRATEGIA “ONE HEALTH”

L'interfaccia tra esseri umani, animali e ambienti che condividiamo può anche essere una fonte di malattie che incidono sulla salute pubblica e sul benessere sociale ed economico della popolazione mondiale. Tali malattie, trasmissibili dagli animali all'uomo attraverso il contatto diretto o attraverso il cibo, l'acqua e l'ambiente, sono comunemente chiamate "zoonosi". Le zoonosi comprendono una grande percentuale di tutte le malattie infettive recentemente identificate e le malattie infettive esistenti. La resistenza antimicrobica nei patogeni umani è un'altra grave minaccia per la salute pubblica che è parzialmente influenzata dall'uso di antibiotici nell'allevamento e nell'agricoltura (WHO,2015).

La collaborazione intersettoriale risulta essere la chiave per comprendere e gestire i rischi per la salute pubblica nell'interfaccia uomo-animale-ambiente e migliorare la sicurezza sanitaria globale. L'OMS collabora con i governi nazionali, il mondo accademico, le organizzazioni non governative e filantropiche e i partner regionali e internazionali, tra cui l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) e l'Organizzazione mondiale per la salute degli animali (OIE), per prevenire e gestire queste minacce e il loro impatto sulla salute pubblica, sociale ed economica:

- I. Promuovendo la collaborazione intersettoriale all'interfaccia uomo-animale-ambiente tra i diversi settori rilevanti a livello internazionale, regionale e nazionale.
- II. Sviluppando strumenti e meccanismi pratici, basati sul riscontro scientifico e utili per la prevenzione, la sorveglianza e l'individuazione delle zoonosi, la comunicazione, le indagini epidemiologiche e di laboratorio, la valutazione e il controllo dei rischi e l'assistenza ai Paesi nella loro attuazione.
- III. Supportando lo sviluppo di politiche, strategie e programmi sostenibili per prevenire, ridurre i rischi e gestire i focolai.

“One Health” in questo senso risulta essere un approccio alla progettazione e all’attuazione di programmi, politiche, legislazioni e ricerca in cui più settori comunicano e lavorano insieme per ottenere migliori risultati in termini di salute pubblica. Le aree di lavoro in cui un approccio One Health è particolarmente rilevante includono la sicurezza alimentare, il controllo delle zoonosi (malattie che possono diffondersi tra animali e umani, come influenza, rabbia e febbre della Rift Valley) e la lotta alla resistenza agli antibiotici. I microrganismi resistenti ai farmaci infatti, possono essere trasmessi tra animali e esseri umani attraverso il contatto diretto o attraverso alimenti contaminati, quindi per contenerli efficacemente è necessario un approccio ben coordinato nell'uomo e negli animali.

Molti professionisti con una vasta gamma di competenze attivi in diversi settori, come la salute pubblica, la salute degli animali, la salute delle piante e l'ambiente, uniscono le forze per supportare gli approcci One Health.

## **1.8 SITUAZIONE IN ITALIA. IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA AR-ISS**

In Italia dal 2001 l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) si occupa del coordinamento del sistema di sorveglianza dell’antibiotico-resistenza AR-ISS, costituito da una rete interconnessa di laboratori di microbiologia clinica, inseriti su base volontaria, con l’obiettivo primario di descrivere frequenze ed andamento dell’antibiotico-resistenza in gruppi di patogeni rilevanti dal punto di vista epidemiologico e clinico (Ministero della Salute, 2018).

La sorveglianza AR-ISS è stata inclusa nel DPCM del 3 Marzo 2017 “identificazione dei sistemi di sorveglianza di rilevanza nazionale istituita a livello centrale presso l’ISS”.

Inoltre nel Gennaio 2019, il Ministero della Salute , ha aggiornato il protocollo della sorveglianza AR-ISS con lo scopo di migliorare l’analisi dei dati, attraverso il coinvolgimento attivo delle Regioni. Tutto ciò consente ha permesso di aumentare la

partecipazione sia a livello regionale che nazionale, passando così dal 21% nel 2017 al 36% nel 2018.

L'Italia, attraverso la struttura AR-ISS prende parte alla sorveglianza europea EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) coordinata dall'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) che raccoglie dati di poliantibiotico resistenza di 30 Paesi europei attraverso la piattaforma informatica Tessy.

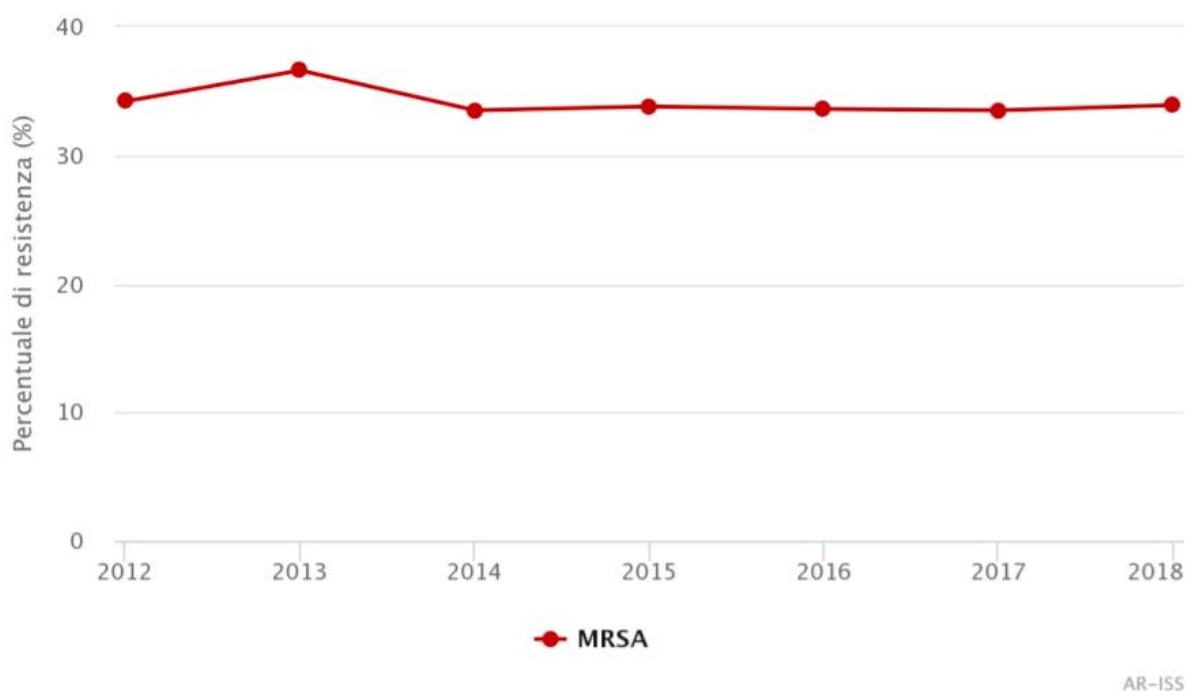
I dati italiani quindi subiscono un processo di analisi, elaborazione e confronto con i vari dati delle altre Nazioni europee, ed in seguito vengono pubblicati annualmente in occasione della Giornata europea sull'uso consapevole degli antibiotici (18 Novembre).

La sorveglianza AR-ISS ha come obiettivo primario l'analisi dell'antibiotico-resistenza in un selezionato numero di patogeni isolati da infezioni invasive, rappresentate sia infezioni acquisite in ambito agricolo e zootecnico che associate all'assistenza sanitari. L'AR-ISS per svolgere il suo lavoro, ha utilizzato le seguenti strutture di supporto:

- I. referenti regionali che hanno individuato i laboratori partecipanti o, nel caso di sistemi di sorveglianza con una copertura regionale, hanno messo a disposizione i dati relativi all'intera rete regionale
- II. laboratori di microbiologia che hanno estratto i dati di antibiotico-resistenza della routine diagnostica
- III. coordinamento centrale epidemiologico e microbiologico da parte del Dipartimento di Malattie Infettive dell'ISS, responsabile della raccolta delle informazioni, del controllo di qualità dei dati inviati dai laboratori, della raccolta e dello studio dei ceppi batterici con particolari fenotipi di resistenza inviati dai laboratori (nell'ambito di studi ad hoc per approfondimenti su tematiche specifiche rilevanti per la sanità pubblica), delle analisi della divulgazione dei dati.

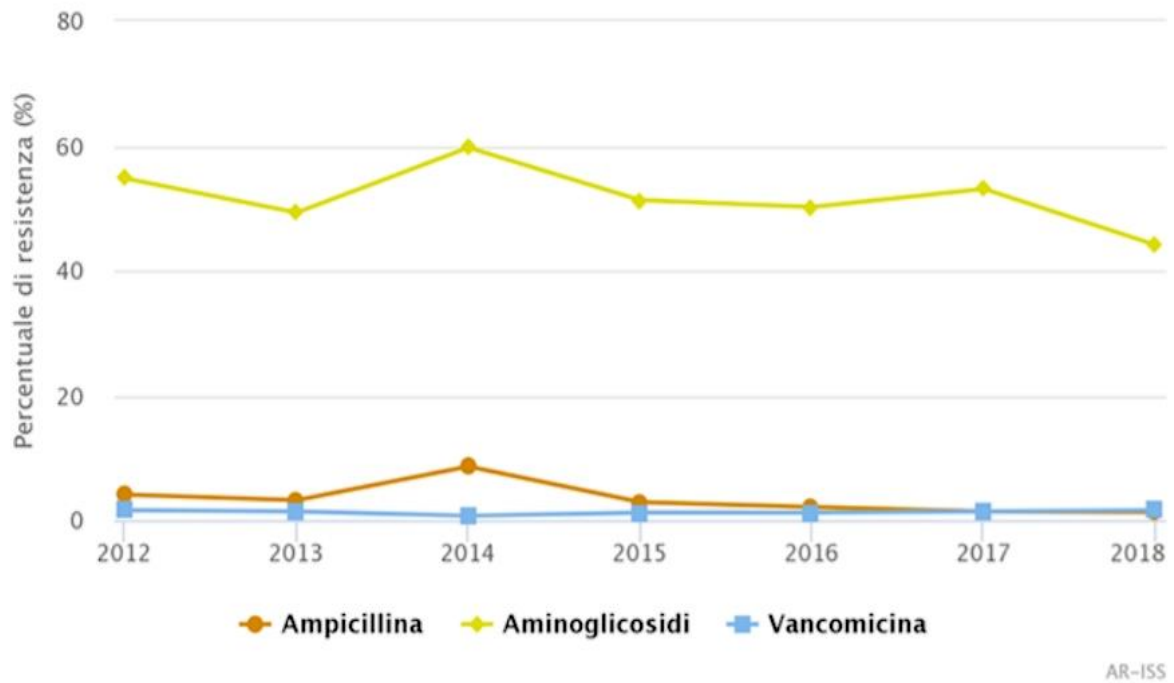
I batteri poliantibiotico-resistenti analizzati dall'AR-ISS, sono stati molteplici. Le analisi sono state effettuate grazie all'ausilio di una fitta rete di laboratori di microbiologia presenti a livello regionale. In particolare i dati elaborati, riflettono un discreto lasso temporale che va dal 2012 al 2018. Alcuni dei batteri poliantibiotico-resistenti analizzati, risultano essere aumentati nel tempo, o comunque essere mediamente maggiori, rispetto alla media europea.

È questo il caso dello *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA). Il quale, in percentuale, continua a mantenersi stabile, intorno al 34% (**Figura 3**). A livello europeo invece, dove si osserva un valore medio pari a circa la metà di quello del nostro Paese, negli ultimi anni si è osservato un lieve calo.



**Figura 3.** *S. aureus*: resistenza alla meticillina, Italia 2012-2018

Per quanto riguarda l'*Enterococcus faecalis*, nel 2018 in Italia si è registrata una percentuale di resistenza di questo batterio agli aminoglicosidi ad alto dosaggio (gentamicina/streptomicina) pari al 44,1% (**Figura 4**). Tuttavia si è osservata una leggera tendenza alla diminuzione, come in molti altri Paesi europei; inoltre, dai dati emerge che la resistenza alla vancomicina si è mantenuta bassa, poco sopra l'1%.



**Figura 4.** *E. faecalis*: resistenza all'ampicillina, agli aminoglicosidi e alla vancomicina Italia 2012-2018

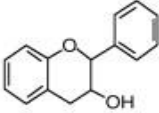
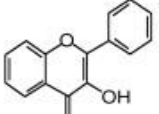
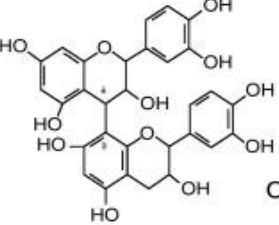
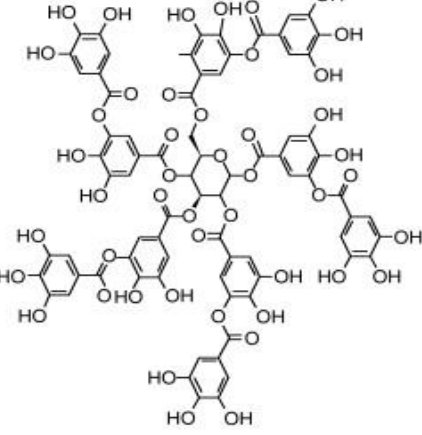
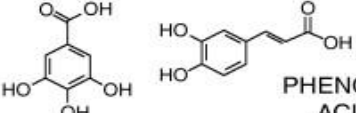
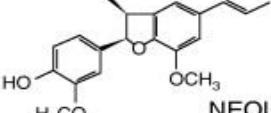
## 1.9 L'IMPORTANZA DEI POLIFENOLI

Negli ultimi anni si è cercato di limitare la quantità di antibiotici all'interno di mangimi destinati ad animali da allevamento, grazie a numerosi divieti e limitazioni legislative da parte dell'UE. Proprio per questo è stata effettuata un'intensa ricerca su additivi per mangimi in grado di mantenere o addirittura migliorare la salute e le prestazioni degli animali. I composti naturali prodotti dalle piante, si sono rivelati dei candidati molto importanti a riguardo. Proprio le piante infatti producono una grande varietà di metaboliti secondari, molti di questi hanno dimostrato di esercitare una vasta gamma di effetti benefici sulla salute umana e sui topi utilizzati come modelli di ricerca. (e.g. Cornwell et al., 2004; Hooper et al., 2008; Lavecchia et al., 2013). In tal senso i polifenoli potrebbero essere il gruppo più promettente, grazie alle loro proprietà regolatorie ed antiossidanti (Chuang e McIntosh, 2011; Aguirre et al., 2014).

I polifenoli sono metaboliti secondari sintetizzati dalle piante per fornire protezione contro agenti patogeni invasivi quali: batteri, virus e funghi. Inoltre prevengono numerosi danni al DNA e all'apparato fotosintetico da parte delle radiazioni ultraviolette. Essi comprendono un grande gruppo di oltre 8000 diversi composti, i quali presentano uno o più anelli fenolici come caratteristica strutturale comune. In base al numero di anelli fenolici e agli elementi strutturali che legano questi anelli tra loro, possono essere suddivisi in polifenoli di tipo flavonoide e di tipo non flavonoide. (Tangney and Rasmussen, 2013). I polifenoli di tipo flavonoide comprendono il più grande gruppo di polifenoli con più di 4000 composti identificati. Essi condividono come struttura comune, due anelli di benzene collegati da tre atomi di carbonio che formano un eterociclo ossigenato. In base al tipo di eterociclo, si possono distinguere le seguenti sottoclassi di flavonoidi: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, flavanoni, antociani e isoflavoni (Beecher, 2003). Gli acidi fenolici che comprendono un gruppo di polifenoli di tipo non flavonoide, sono frequenti nei cereali e possono essere suddivisi in acidi cinnamici, come acido ferulico, caffeico, cumarico e sinapico e gli acidi idrossil benzoici meno abbondanti, come gallico e acido vanillico (Andreasen et al., 2001). Un altro gruppo di polifenoli di tipo non flavonoide comprendono i lignani

e gli stilbenoidi, proprio da quest'ultimi deriva il resveratrolo, uno dei composti polifenolici più famosi per i suoi effetti antiossidanti ed antinfiammatori (Valenzano et al., 2006).

Nel corso degli ultimi 20 anni, i polifenoli sono stati studiati per il loro potenziale coinvolgimento nella prevenzione di malattie croniche, malattie cardiovascolari, cancro, osteoporosi, diabete mellito e malattie neurodegenerative. La loro attività protettiva è stato inizialmente attribuita alla loro capacità di essere buoni antiossidanti nei confronti di radicali liberi ed alle loro proprietà chelanti nei confronti dei metalli, oltre alla capacità di inibire o ridurre diversi enzimi, come telomerasi, ciclossigenasi (O'Leary KA et al.,2004), o lipossigenasi (Sadik CD et al.,2003), e all'interazione con percorsi di trasduzione del segnale e cellula recettori. Inoltre è stata ampiamente studiata l'attività antimicrobica dei polifenoli presente in alimenti vegetali e piante medicinali contro una vasta gamma di microrganismi. Tra i polifenoli, i flavan-3-oli, i flavonoli e i tannini hanno ricevuto la maggior attenzione grazie al loro ampio spettro e maggiore attività antimicrobica rispetto ad altri polifenoli e al fatto che la maggior parte di loro sono in grado di sopprimere un vasto numero di fattori microbici di virulenza come: l'inibizione della formazione di biofilm, riduzione dell'adesione dei ligandi ospiti e la neutralizzazione di tossine batteriche. Le proprietà antimicrobiche di alcune classi di polifenoli sono state proposte sia per sviluppare nuovi conservanti alimentari (Rodriguez Vaquero MJ et al.,2010), a causa della crescente pressione dei consumatori sull'industria alimentare, al fine di evitare conservanti sintetici, o per sviluppare terapie innovative per il trattamento di varie infezioni microbiche (Jayaraman P et al.,2010), considerando l'aumento della resistenza microbica nei confronti delle convenzionali terapie antibiotiche (**Figura 5**).

|   |   |  |
|---|---|--|
|  <p>FLAVAN-3-OL</p>          | <p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> | <p><i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i><br/> <i>C.perfringes</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i><br/> <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i><br/> <i>A.naeslundii</i> - <i>P.oralis</i> - <i>P.gingivalis</i><br/> <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> -<br/> <i>C.pneumonia</i></p> <p>Adenovirus - Enterovirus - Flu virus</p> <p><i>Candida albicans</i><br/> <i>Microsporium gypseum</i><br/> <i>Trichophyton mentagrophytes</i><br/> <i>Trichophyton rubrum</i></p> |
|  <p>FLAVONOL</p>             | <p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> | <p><i>S.mutans</i><br/> <i>E.coli</i><br/> <i>S.aureus</i></p> <p>influenza A virus<br/> type -1 herpes simplex virus (HSV)</p>  |
|  <p>CONDENSED TANNIN</p>     | <p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p>                   | <p><i>S.mutans</i><br/> <i>E.coli</i><br/> <i>S.aureus</i></p> <p>influenza A virus<br/> type -1 herpes simplex virus (HSV)</p>  |
|  <p>HYDROLYSABLE TANNIS</p> | <p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> | <p>Different strains of :<br/> <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i><br/> <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i><br/> <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i><br/> <i>Lysteria</i></p> <p>Epstein-Barr virus<br/> Herpes virus<br/> HSV -1 and HSV -2,</p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p>   |
|  <p>PHENOLIC ACID</p>      | <p>ANTIBACTERIAL</p>                                    | <p><i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i><br/> <i>E.coli</i> - <i>Paeruginosa</i></p>  |
|  <p>NEOLIGNAN</p>          | <p>ANTIBACTERIAL</p>                                    | <p>Different strains of :<br/> <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>   |

Current Opinion in Biotechnology

**Figura 5.** Ruolo dei polifenoli, come agenti antimicrobici, antivirali ed antimicotici (Daglia M et al.,2011).

Per quanto riguarda i flavonoli, possiamo vedere un'notevole attività contro diversi batteri Gram-positivi, come *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces naeslundii* e batteri Gram-negativi, come *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivale* e *Fusobacterium nucleatum*, probabilmente a causa di diversi meccanismi di azione. Tra questi il più identificato e quello che risulta essere il più convincente è l'effetto aggregativo esercitato sulle cellule batteriche. È interessante evidenziare come a causa della loro idrofobicità, i flavonoli sono in grado di penetrare nelle membrane cellulari fosfolipidiche, potendo quindi esercitare la loro attività antibatterica anche all'interno della cellula (Alvesalo J et al., 2006). Per quanto riguarda i tannini, essi sono suddivisi in proantocianidine (tannini condensati), gallotannini e ellagitannini (tannini idrolizzabili). Le proantocianidine si presentano in frutti, corteccia, foglie e semi di molte piante. Sono dimeri, oligomeri e polimeri di catechine che sono legati insieme da collegamenti tra C4 e C8 (o C6) e sono composti da una miriade di prodotti oligomerici che differiscono per struttura e per configurazione stereochimica (Quideau S et al., 2011). Le proantocianidine più studiate sono quelle derivate da bacche che inibiscono la crescita di diversi batteri patogeni, come *E. coli* uropatogeno, *S. mutans* cariogenico e *S. aureus* resistente all'oxacillina (Batovska D et al., 2009). Le proantocianidine derivanti dal mirtillo rosso, sono risultate attive contro batteri patogeni, questi composti molecolari infatti sfruttano diversi meccanismi che portano all'inibizione della crescita batterica. Rendono la membrana cellulare più permeabile, inibiscono gli enzimi microbici, ed hanno un'azione diretta sul metabolismo dei microrganismi. Inoltre riducono la presenza di substrati necessari per la crescita batterica, in particolare micronutrienti minerali essenziali come ferro e zinco, tramite il meccanismo di chelazione da parte dei polifenoli sui metalli, in particolare si instaura un'interazione elettronica tra l'orbitale del polifenolo e l'orbitale del metallo (Cote J et al., 2010).

I non flavonoidi mostrano un'attività antimicrobica più debole rispetto ai flavonoidi; tuttavia, alcune indagini meritano di essere menzionate. Alcuni acidi fenolici (acidi gallico, caffeico e ferulico) hanno mostrato attività antibatterica contro batteri Gram-

positivi (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e batteri Gram-negativi (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Considerando un'altra classe di composti non flavonoidi, i lignani, una recente indagine ha dimostrato che l'esano estratto a partire dalle radici di taliscana di *Aristolochia*, una pianta usata nella medicina tradizionale messicana, conteneva neolignani, tra i quali il Licarin A, il quale è risultato essere il più attivo, con MIC che vanno da 3,12 a 12,5 mg / ml contro quattro varianti mono-resistenti e 12 isolati clinici di ceppi di *M. tuberculosis* (Leon-Díaz R et al.,2010). Questi risultati suggeriscono che questi composti rappresentano un agente potenzialmente attivo per combattere la tubercolosi, una patologia che, negli ultimi anni, ha destato sempre più preoccupazioni a livello mondiale.

## II. SCOPO DELLA RICERCA

### 2.1 IL PROGETTO

Il problema della poliantibiotico-resistenza, risulta essere un tema di grande attualità che desta molte preoccupazioni a livello mondiale, soprattutto in campo agricolo e zootecnico. Si è visto che microrganismi poliantibiotico-resistenti, sono largamente presenti negli ambienti agricoli, nel suolo e soprattutto negli animali da allevamento, con una maggior prevalenza nei polli da carne. La trasmissione dei batteri multifarmaco-resistenti, attraverso il consumo di alimenti contaminati, costituisce una delle principali vie di trasmissione della resistenza dagli animali all'uomo (Jensen et al., 2008).

Il lavoro si colloca all'interno di una ricerca più ampia suddivisa in più fasi. Inizialmente sono state somministrate ai polli d'allevamento quattro diete che presentavano differenti quantità di polifenoli:

- C: gruppo di controllo, alimentato con mangime senza addizioni di polifenoli;
- E: gruppo alimentato con mangime addizionato di una miscela polifenolica commerciale;
- P: gruppo alimentato con mangime addizionato della miscela polifenolica Poli4Liquid
- V: gruppo alimentato con mangime addizionato con Vitamina E.

Successivamente si è proceduto all'isolamento dei microrganismi presenti nelle feci e nella lettiera dei polli, per poi passare alla somministrazione di antibiotici appartenenti a diverse classi tra cui penicilline, macrolidi e chinoloni, comunemente usati nell'allevamento dei polli. I microrganismi isolati sono risultati essere circa 100 in totale; di questi, 32 hanno mostrato poliantibiotico-resistenza. Il mio lavoro di tesi è ha riguardato questi 32 isolati e si è sviluppato in diverse tappe:

- Estrazione del genoma dei microrganismi da identificare, attraverso l'utilizzo dell'apposito kit di estrazione del genoma (Fast DNA)
- Amplificazione delle regioni marker di specie tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) della subunità 16S, gene che codifica per la subunità minore dei ribosomi; tale regione è utilizzata per l'identificazione dei batteri in quanto è un segmento genico altamente conservato e presente in tutti i batteri
- Corsa elettroforetica dei prodotti amplificati. Tecnica utilizzata per separare e visualizzare i frammenti di DNA, in base al loro peso molecolare ed alla loro carica, mediante l'allestimento di una matrice di agarosio
- Trasferimento dei campioni amplificati alla MacroGen Europe, compagnia abilitata all'analisi dei campioni da identificare, mediante sequenziamento Sanger
- Identificazione tassonomica dei campioni, mediante ricerca per similarità delle sequenze della regione marker (16S) con quelle già presenti nei database bioinformatici.

### III. MATERIALI E METODI

L'analisi delle resistenze multiple sugli isolati ottenuti dalle feci dei quattro gruppi di polli alimentati con diete a diverso contenuto di polifenoli ha portato all'identificazione di 32 batteri multiresistenti (**Tabella 1**). Questi 32 isolati sono stati sottoposti ad analisi di sequenziamento Sanger per la determinazione della specie di appartenenza.

| NUMERO DI CAMPIONI | NUMERO DI BATTERI POLIANTIBIOTICO-RESISTENTI |
|--------------------|--|
| CAMPIONE C1        | b1, b5, b6                                   |
| CAMPIONE C2        | b2, b4                                       |
| CAMPIONE C3        | b1, b5                                       |
| CAMPIONE E1        | b2, b4, b6, b10                              |
| CAMPIONE E2        | b4, b6, b7                                   |
| CAMPIONE E3        | b3, b4, b10                                  |
| CAMPIONE P1        | b1   |
| CAMPIONE P2        | b3, b5                                       |
| CAMPIONE P3        | b1, b3                                       |
| CAMPIONE V1        | b1, b2, b8                                   |
| CAMPIONE V2        | b4, b5, b8                                   |
| CAMPIONE V3        | b1, b5, b6, b7                               |

**Tabella 1.** Campioni estratti a partire da feci di polli d'allevamento, risultati essere MDR (Multidrug-resistant)

Il lavoro ha seguito diversi step:

1. estrazione del DNA Genomico
2. amplificazione delle regioni marker per la determinazione della specie
3. corsa elettroforetica
4. sequenziamento Sanger.

### **3.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO**

Le estrazioni del DNA dai campioni analizzati, sono state eseguite mediante l'utilizzo del FastDNA Spin Kit for Soil. Il protocollo presentava al suo interno:

- Lysing Matrix E tube, cioè tubi con una capacità di 2 ml, contenenti al loro interno delle piccole sfere, utilizzate per la rottura meccanica delle membrane cellulari durante la centrifugazione.
- Sodium Phosphate Buffer (SPB), soluzione tampone in grado di mantenere il pH costante, durante i processi di estrazione degli acidi nucleici.
- MT Buffer, una soluzione di lisi sviluppata con cura per proteggere e solubilizzare acidi nucleici e proteine dopo la lisi cellulare.
- Protein Precipitation Solution (PPS), soluzione altamente salina, in grado di ridurre la solubilità delle proteine, facendole precipitare sul fondo.
- Binding Matrix, una sospensione di silice in grado di legare il DNA

Nella prima fase del lavoro, sono stati preparati e fatti crescere i campioni, le colonie batteriche sono state trasferite da un terreno solido ad un terreno liquido. Tutti i procedimenti, sono avvenuti in condizioni di sterilità e per evitare ogni tipo di contaminazione, si è lavorato sotto una cappa aspirante. Per prima cosa, ci si è serviti di bottiglie di vetro da 125 ml, corrispondenti al numero dei campioni, più una utilizzata per il controllo di eventuali contaminazioni presenti nel terreno. Nelle quali è stato inserito il terreno di coltura mediante l'utilizzo del pipettatore automatico, in particolare sono stati inseriti 5 ml di BHI (Brain Heart Infusion Broth) per ciascuna

bottiglia di vetro. A questo punto sono stati prelevati i micro-tubi di polipropilene da 1.7 ml con i relativi campioni dal congelatore e sono stati inseriti attraverso l'utilizzo di un'ansa monouso nelle apposite bottiglie di vetro da 125 ml, contenenti il terreno di coltura (è stata utilizzata un'ansa, per ogni campione). Successivamente le bottigliette inoculate, sono state posizionate all'interno di un incubatore in agitazione a 200 rpm a 37°C (temperatura ideale per la crescita batterica), per 24 ore. In questo lasso di tempo, i batteri presenti all'interno delle bottigliette, si sono moltiplicati in modo esponenziale, grazie alla temperatura presente all'interno dell'incubatore ed ai nutrienti forniti dal terreno di coltura. Una volta passate le 24 ore, si è proceduto seguendo il protocollo FastDNA Spin Kit for Soil, utilizzato per l'estrazione del DNA dei batteri. Per prima cosa, sono stati risospesi i batteri con il relativo terreno di crescita presente nelle bottigliette da 125 ml e sono stati prelevati 500 µl attraverso l'utilizzo della pipetta p1000, inserendo il contenuto all'interno della Lysing Matrix E tube, è stato eseguito lo stesso procedimento per tutti e 32 i campioni. A questo punto si è aggiunto 900 µl di Sodium Phosphate Buffer (BPS) all'interno delle Lysing Matrix E tube. Il ruolo del BPS è stato quello di aiutare a mantenere un pH costante durante i vari processi, essendo una soluzione tampone. Successivamente attraverso la pipetta p200, sono stati prelevati 122 µl di MT Buffer, soluzione di lisi molto importante, sviluppata per proteggere e solubilizzare gli acidi nucleici e le proteine subito dopo la lisi cellulare. In seguito si è proceduto, inserendo le Lysing Matrix E tube all'interno del FastPrep, un omogenizzatore ad alta velocità, per 40 secondi ed impostando il programma della velocità a 6.0. Il FastPrep possiede la funzione di rompere le cellule attraverso i continui movimenti ripetuti. Quello che è accaduto in questa fase, è stato la distruzione meccanica delle pareti cellulari dei microrganismi, con il relativo rilascio degli acidi nucleici all'interno del Buffer protettivo. Successivamente sono stati posizionati i campioni all'interno di una centrifuga, stando attenti a bilanciare in maniera corretta tutte le Lysing Matrix E tube. Si è poi impostata la centrifuga a 14,000 giri per 8 minuti (11.360 RCF). La centrifugazione è stata determinante per la formazione del pellet, contenente i materiali cellulari insolubili. In seguito è stato trasferito 1 ml di surnatante presente all'interno delle Lysing Matrix E tube, all'interno

dei micro-tubi di polipropilene relativi ai vari campioni. A questo punto sono stati aggiunti 250 µl di Protein Precipitation Solution (PPS) e successivamente i micro-tubi di polipropilene contenenti i campioni, sono state invertite per 10 volte. Il PPS è un tampone che riduce la solubilità delle proteine, facendole precipitare sul fondo. In seguito si è passati alla centrifugazione dei campioni, a 14,000 giri per 5 minuti (11.360 RCF), per garantire la formazione del pellet costituito dalle componenti proteiche precipitate sul fondo. Successivamente è stato trasferito 1 ml di sovrnatante, nei tubi di polipropilene da 15 ml corrispondenti ai vari campioni analizzati. A questo punto, la Binding Matrix è stata risospesa (essendo una matrice che sedimenta molto velocemente) ed è stato inserito 1 ml nei tubi di polipropilene da 15 ml contenente il sovrnatante di ciascun campione. A questo punto i tubi di polipropilene da 15 ml, sono stati invertiti per 2 minuti, al fine di far legare la Binding Matrix a tutto il DNA presente a livello del sovrnatante. Successivamente i campioni, sono stati lasciati riposare per 3 minuti, in modo tale da permettere la sedimentazione degli acidi nucleici, operata dalla Binding Matrix. Nella fase successiva, si è proceduto rimuovendo 500 µl di sovrnatante e facendo estremamente attenzione a non rimuovere la Binding Matrix. In seguito, è stata risospesa la Binding Matrix con il sovrnatante rimanente e sono stati trasferiti 600 µl attraverso la pipetta p1000, all'interno delle Spin Filter, micro-tubi di polipropilene da 1.7 ml. Le Spin Filter, sono state centrifugate a 14,000 giri per 1 minuto (11.360 RCF), facendo sempre attenzione a bilanciare tutti i campioni all'interno della centrifuga. A questo punto all'interno delle Spin Filter, si erano andate a formare due fasi: una presente sul fondo, costituita dall'eluato e l'altra presente a livello del filtro, costituita dalla Binding Matrix e dagli acidi nucleici ad essa legati. Successivamente si è proceduto all'eliminazione dell'eluato ed a ripetere l'operazione precedentemente effettuata, con il rimanente composto presente all'interno dei tubi di polipropilene da 15 ml. In seguito, è stata preparata la SEWS-M, soluzione altamente concentrata utilizzata per il lavaggio delle eventuali impurità presenti a livello della matrice legante il DNA, a cui è stato aggiunto etanolo. A questo punto sono stati prelevati 500 µl di SEWS-M, i quali sono stati inseriti nelle varie Spin Filter, il pellet è stato risospeso utilizzando la forza del

liquido presente nella pipetta. In seguito le Spin Filter sono state centrifugate a 14,000 giri per 1 minuto (11.360 RCF), in modo tale da consentire all' etanolo ed ai detergenti presenti nella SEWS-M di rimuovere tutte le impurità, permettendo così la purificazione del DNA legato alla matrice di silice. Successivamente le Spin Filter sono state ulteriormente centrifugate, questa volta senza alcuna aggiunta di liquido, a 14,000 giri per 2 minuti (11.360 RCF). Per permettere di eliminare dalla matrice, i residui di soluzione di lavaggio. L'eluato formatosi, è stato buttato ed i filtri contenenti il DNA sono stati trasferiti all'interno di nuovi micro-tubi di polipropilene da 1.7 ml. Le nuove Spin Filter contenenti i DNA dei vari campioni, sono state posizionate nella camera termica a 37°C per 5 minuti, in modo tale da permettere l'evaporazione dell'etanolo rimanente. In seguito, sono stati aggiunti 100 µl di DES (Dnase/Pyrogen-Free Water) risospesi con i campioni presenti nei vari filtri e successivamente è stata effettuata una centrifugazione a 14,000 giri per 1 minuto (11.360 RCF), in modo tale da permettere alla DES di rompere il legame del DNA con la matrice. Al termine della centrifugazione, il DNA di ogni campione risultava essere presente sul fondo della provetta, mentre la matrice si era sedimentata a livello dei filtri, i quali sono stati successivamente buttati.

### **3.2 AMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI MARKER DI SPECIE NEI CAMPIONI ANALIZZATI**

Successivamente si è proceduto all'amplificazione del gene 16S per ciascun campione. In questo caso sono stati utilizzati:

- ddH<sub>2</sub>O: Acqua bidistillata, priva di impurità;
- dNTPs, desossiribonucleotidi trifosfato, reagenti utilizzati dalla polimerasi durante i cicli di reazione;
- Taq polimerasi, enzima di origine batterica, in grado di lavorare ad elevate temperature andando ad appaiare i nucleotidi una volta aperti i due filamenti;
- Primer 8S per il filamento forward e primer 1492R per il filamento reverse, oligonucleotidi a singolo filamento che si andranno ad appaiare sulla molecola di DNA stampo, in particolare alle due estremità della sequenza che si vuole

amplificare. Essi fungono da inneschi della reazione di polimerasi, in quanto forniscono l'-OH al 3' al quale successivamente la polimerasi andrà ad aggiungere i nucleotidi. I primers sono disegnati in modo tale da appaiarsi in maniera specifica a livello del gene di nostro interesse;

- Buffer, cioè un tampone che permette che la reazione venga condotta ad un pH ideale.

Dopo aver estratto il DNA dai nostri campioni, è stata effettuata l'amplificazione del gene di nostro interesse (16S) per ogni singolo campione, attraverso la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction). Questa tecnica di biologia molecolare, è molto utilizzata nei vari laboratori, permettendo l'amplificazione esponenziale in vitro di una specifica regione di DNA. Per poter applicare questa tecnica, è necessario conoscere la sequenza delle regioni terminali della sequenza bersaglio, ciò permette la sintesi dei due inneschi oligonucleotidici detti "primers", necessari per la reazione. In particolare, nel nostro caso, per l'amplificazione del gene 16S, sono stati utilizzati i primer 8S per il filamento "forward" ed il 1492R per il filamento "reverse". Mentre per quanto riguarda la Taq polimerasi, è stata utilizzata TaKaRa, una Taq polimerasi ricombinante della ditta TaKaRa, ingegnerizzata in modo da permettere amplificazioni ad alta fedeltà di lunghi frammenti di DNA. Tutte le componenti utilizzate per la PCR (Polymerase Chain Reaction), sono state conservate all'interno di un congelatore al fine di evitare la loro perdita di funzione.

Per prima cosa, si è proceduto alla preparazione della "master mix", cioè un micro-tubo di polipropilene da 1.7 ml contenente tutti i componenti necessari all'amplificazione del gene 16S. In particolare per ogni campione sono stati utilizzati (**Tabella 2**):

| <b>COMPONENTI</b>  | <b>CONCENTRAZIONE<br/>NEL MIX</b> | <b>VOLUME (50 µl)</b> |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Acqua bidistillata | -                                 | 35.5 µl               |
| Buffer             | 1X                                | 5 µl                  |
| dNTPs              | 200 µM                            | 5 µl                  |
| Primer F           | 0.2 µM                            | 1 µl                  |
| Primer R           | 0.2 µM                            | 1 µl                  |
| Taq                | 2.5 U                             | 0.5 µl                |
| DNA                | 100/300 ng                        | 2 µl                  |

**Tabella 2.:** Componenti preparatorie, espresse in concentrazione e volume, presenti nella “master mix” d’inizio

Tutte queste componenti sono state moltiplicate per il numero dei campioni, ad eccezione del DNA. Successivamente, sono stati prelevati dalla master mix 48 µl per ogni campione, e sono stati inseriti nei relativi micro-tubi di polipropilene da 0.5 ml, in seguito sono stati aggiunti 2 µl di DNA specifico per ogni campione. A questo punto, i micro-tubi di polipropilene corrispondenti ai relativi campioni analizzati, sono stati posizionati all’interno di un termociclatore, strumento di laboratorio in grado di condurre automaticamente le determinate variazioni cicliche di temperatura necessarie all'amplificazione enzimatica di sequenze di DNA in vitro attraverso la PCR (Polymerase Chain Reaction).

All’ interno del termociclatore, si sono ripetute in modo ciclico tre fasi: la fase di denaturazione, annealing e l’estensione.

Nella fase di denaturazione, il termociclatore ha aumentato la sua temperatura, arrivando a 95°C, temperatura alla quale si rompono i legami ad idrogeno tra le basi azotate della doppia elica del DNA. A questa fase è seguito un abbassamento della temperatura, il quale non è un valore fisso ma dipende dalle basi azotate che compongono i primer. Solitamente viene utilizzata una formula per trovare la temperatura adatta.

Temperatura= $2*(A+T)+4*(C+G)$  dove A,T,C e G rappresentano i nucleotidi di ciascun primer. Durante la fase di estensione la temperatura è stata innalzata di nuovo a circa 72°C, valore ideale per il funzionamento della polimerasi, la quale essendo una polimerasi derivante da un batterio termofilo, lavora bene ad elevate temperature. Dopo un certo lasso di tempo, necessario all'allungamento del nuovo filamento, il quale varia a seconda della lunghezza della regione da amplificare, la temperatura si è innalzata di nuovo a 95°C per ripetere nuovamente il ciclo. Nei cicli successivi, il numero dei prodotti è cresciuto in modo esponenziale (raddoppiando ad ogni ciclo), fino a quando non si sono esauriti i componenti della PCR, cosa che di norma avviene dopo i 30 cicli. Una volta terminata la fase di PCR (Polymerase Chain Reaction) effettuata mediante l'utilizzo del termociclatore, ho proceduto alla visualizzazione degli amplificati, attraverso la corsa elettroforetica.

### **3.3 CORSA ELETTROFORETICA**

Successivamente si è proceduto ad effettuare la corsa elettroforetica, dei campioni amplificati. In questa fase sono stati utilizzati:

- Agarosio, polisaccaride in grado di gelificare e creare delle maglie, entro cui passano gli amplificati;
- Buffer TBE, soluzione tampone utile per la separazione dei frammenti di DNA durante la corsa elettroforetica;
- SafeView™ DNA Stain (Applied Biological Materials Inc. - USA), colorante in grado di legarsi al DNA ed assorbire la luce blu emettendo una luce verde.

L'elettroforesi su gel di agarosio è una delle tecniche maggiormente utilizzate per separare e visualizzare i frammenti di DNA in base alla loro grandezza. Questa tecnica, sfrutta le cariche degli acidi nucleici, per farle migrare mediante l'utilizzo di un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio. Per prima cosa, si è proceduto alla preparazione del gel di agarosio. Nel nostro caso, è stato preparato un gel all'1,0%. Sono stati pesati 0,48 g di agarosio, ai quali è stato aggiunto un volume di TBE pari a 48 ml, il TBE è una soluzione tampone utilizzata per la separazione dei frammenti di

DNA. La bottiglietta di vetro da 125 ml contenente l'agarosio ed il tampone, è stata inserita all'interno di un microonde e riscaldata per circa due minuti. A questo punto il composto, si presentava in uno stato liquido. Successivamente si è proceduto al raffreddamento, mediante l'ausilio di acqua fredda, della bottiglietta di vetro da 125 ml, a cui è stato aggiunto il SYBR Safe, colorante utilizzato per la colorazione degli acidi nucleici; solitamente in passato veniva utilizzato il Bromuro di Etidio, agente intercalante molto pericoloso poiché cancerogeno, proprio per questo si è passati a coloranti più sicuri. Prima del suo raffreddamento, è stato colato il gel all'interno di uno stampo (detto cast), opportunamente chiuso ai lati per evitare la fuoriuscita del gel e su una delle estremità è stato inserito il pettinino, utilizzato per la formazione dei pozzetti nei quali sono stati caricati i campioni. Una volta che il gel si è solidificato, al suo interno i polimeri di agarosio sono andati a formare delle maglie più o meno grandi. A questo punto si è passati alla preparazione dei campioni amplificati. È stato posizionato su un foglio di parafilm 1 µl di loading buffer per ciascun campione, il loading buffer è una soluzione contenente glicerolo che ha il compito di appesantire i campioni tenendoli così sul fondo dei pozzetti. Al loading buffer sono stati aggiunti 5 µl del campione e con l'aiuto della pipetta è stata omogenizzata la soluzione, per poi riprenderla e caricarla sul pozzetto, lo stesso procedimento è stato effettuato per ciascun campione. A questo punto, si è proceduto attivando il campo elettrico mediante i due elettrodi, a 66V per 30 minuti. Il DNA dei vari campioni, essendo carichi negativamente, si sono spostati dal catodo verso l'anodo (elettrodo carico positivamente). Infine mediante il transilluminatore con i raggi UV, siamo riusciti a visualizzare le bande dei singoli campioni. Quello che si è visto per ciascun campione, erano bande ben definite corrispondenti a ciascun amplificato.

### **3.4 SUPPORTO INFORMATICO**

Una volta effettuato il sequenziamento, da parte dell'azienda MacroGen Europe, delle regioni 16S relative a ciascun campione, si è passati all'identificazione dei 32 campioni mediante l'ausilio di banche dati. Per effettuare questo procedimento, è stato utilizzato il database BLAST.

## IV. ANALISI DEI RISULTATI

### 4.1 RISULTATI

Le analisi di identificazione effettuate mediante l'utilizzo del motore di ricerca BLAST per la comparazione delle sequenze dei geni codificanti per la subunità ribosomiale 16S, hanno permesso di ricavare per i 32 campioni, appartenenti ai quattro analizzati (C, E, P e V), le identificazioni riportate in **Tabella 3**.

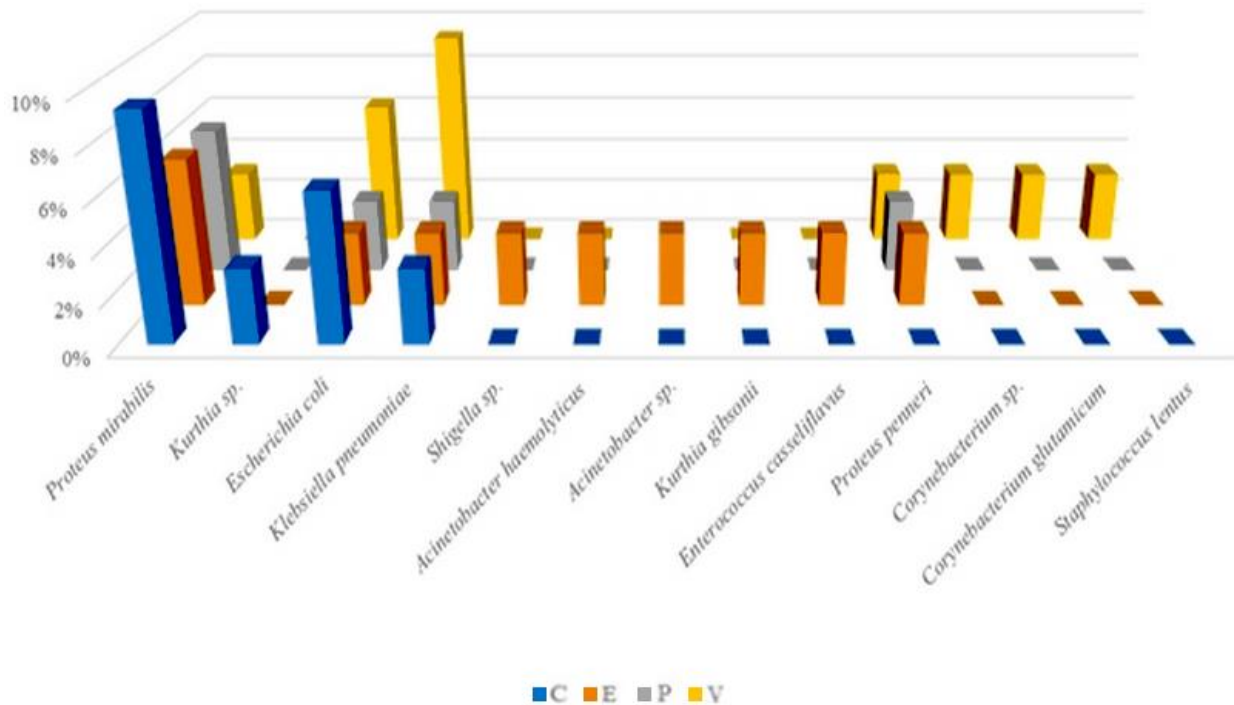
| ID CAMPIONE | SPECIE IDENTIFICATA               | PCT(%) |
|-------------|-----------------------------------|--------|
| C2-b2       | <i>Proteus mirabilis</i>          | 100,0  |
| C3-b5       | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 99,9   |
| V2-b4       | <i>Escherichia coli</i>           | 99,7   |
| P2-b3       | <i>Escherichia coli</i>           | 99,7   |
| V3-b6       | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 99,5   |
| V1-b2       | <i>Corynebacterium sp.</i>        | 99,5   |
| V3-b1       | <i>Escherichia coli</i>           | 99,5   |
| P3-b3       | <i>Proteus mirabilis</i>          | 99,5   |
| C3-b1       | <i>Proteus mirabilis</i>          | 99,5   |
| E1-b6       | <i>Acinetobacter haemolyticus</i> | 99,4   |
| C1-b5       | <i>Kurthia sp.</i>                | 99,4   |
| E1-b4       | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 99,3   |
| P3-b1       | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 99,3   |
| V2-b5       | <i>Staphylococcus lentus</i>      | 99,3   |

|        |                                   |      |
|--------|-----------------------------------|------|
| V3-b5  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 99,3 |
| E1-b2  | <i>Proteus mirabilis</i>          | 99,2 |
| P2-b5  | <i>Proteus mirabilis</i>          | 99,2 |
| V2-b8  | <i>Proteus penneri</i>            | 99,0 |
| V3-b7  | <i>Proteus mirabilis</i>          | 99,0 |
| E1-b10 | <i>Shigella sp.</i>               | 99,0 |
| E3-b4  | <i>Proteus penneri</i>            | 98,9 |
| E2-b7  | <i>Acinetobacter sp.</i>          | 98,8 |
| E2-b4  | <i>Escherichia coli</i>           | 98,7 |
| C1-b6  | <i>Escherichia coli</i>           | 98,7 |
| C1-b1  | <i>Proteus mirabilis</i>          | 98,5 |
| E2-b6  | <i>Proteus mirabilis</i>          | 98,3 |
| C2-b4  | <i>Escherichia coli</i>           | 98,0 |
| E3-b10 | <i>Kurthia gibsonii</i>           | 98,0 |
| E3-b3  | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | 98,0 |
| P1-b1  | <i>Proteus penneri</i>            | 98,0 |
| V1-b1  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 98,0 |
| V1-b8  | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 83,6 |

**Tabella 3.:** Tabella contenente specie identificate corrispondenti ai 32 campioni, rappresentate in percentuali di omologia.

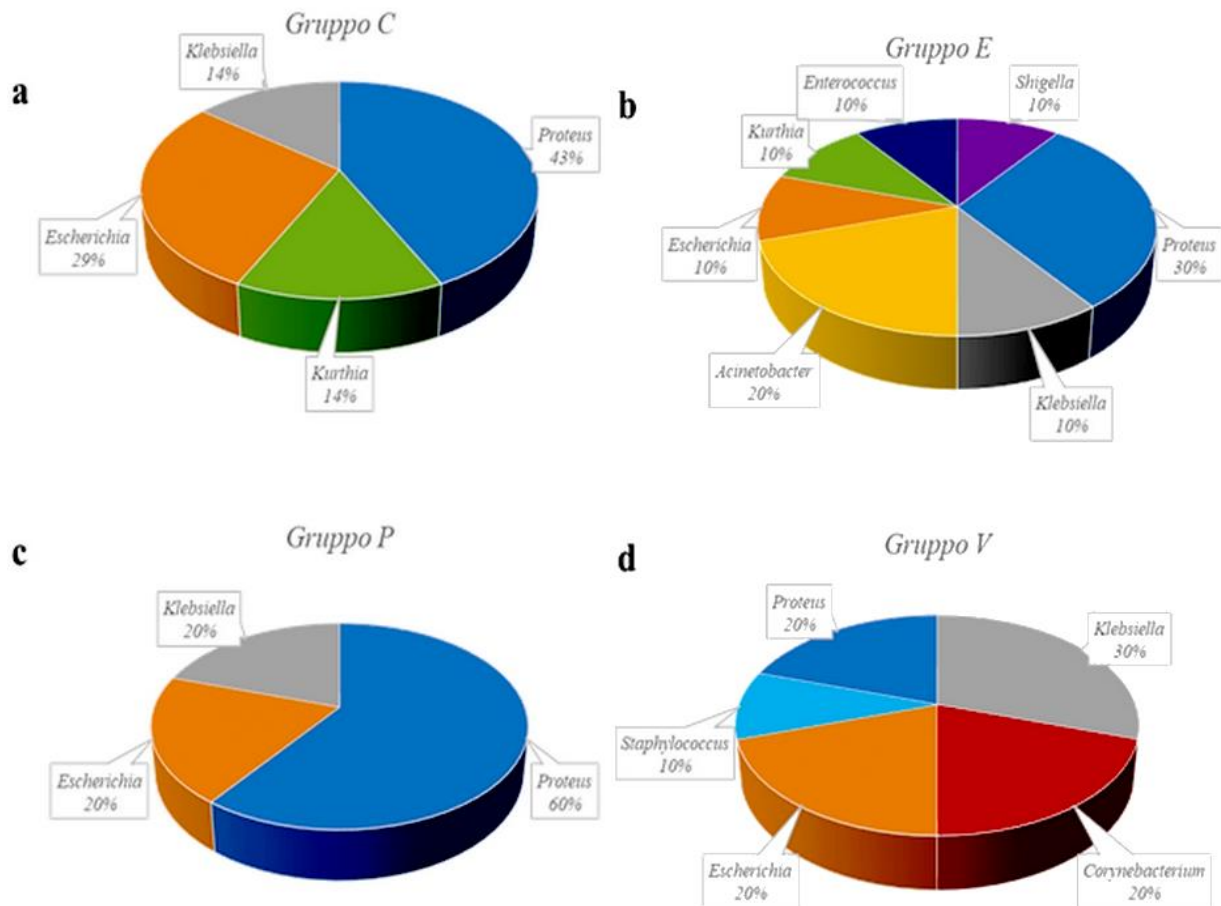
## 4.2 GENERI OSSERVATI

Come si può osservare in **Tabella 3** e in **Figura 6**, gli isolati appartengono ad un numero ristretto di generi batterici, alcuni comuni fra tutti i gruppi o quasi, altri più specifici di una delle diete studiate.



**Figura 6.** Presenza delle diverse specie identificate nei quattro gruppi considerati nello studio

I generi più rappresentati sono sicuramente *Proteus* e *Klebsiella*, presenti in tutti e quattro i gruppi; seguono *Escherichia* e *Khurtia* presenti in due dei quattro gruppi considerati. Da notare è anche la presenza di *Staphylococcus*, *Shigella* e *Corynebacterium* (**Figura 7**).



**Figura 7.** Generi microbici isolati in ciascun gruppo considerato nello studio

Gli appartenenti al genere *Proteus* (famiglia *Enterobacteriaceae*) sono bacilli Gram-negativi che prosperano nel suolo, nell'acqua e nei tratti intestinali di numerosi mammiferi, sono in grado di sciamare o nuotare in modo coordinato, su superfici solide. Diverse specie appartenenti a questo genere sono note per la loro capacità di infettare l'uomo, ma quello più frequentemente associato a seria patogenicità è *Proteus mirabilis* (isolato in tutti e quattro i gruppi considerato in questo studio). Membri di questa specie sono gli agenti causali di una varietà di infezioni nosocomiali opportunistiche tra cui quelle del tratto respiratorio, occhi, orecchie, naso e pelle. Alla presenza di *P. mirabilis* sono comunemente associate per esempio infezioni del tratto urinario in quegli individui con struttura o anomalie funzionali, come le infezioni ascendenti in pazienti sottoposti a cateterizzazione urinaria (Murray et al.,2017). Questi organismi sono in grado di colonizzare l'ospite ed esercitare la loro azione

infettiva grazie alla presenza di numerosi fattori di virulenza, come ad esempio delle fimbrie resistenti al mannosio, che permettono l'adesione alle cellule uroepiteliali. Una volta che *P. mirabilis* entra in contatto con una superficie ospite, inizia il processo di colonizzazione. Dopo la colonizzazione iniziale, *P. mirabilis* forma strutture complesse, note come biofilm, che divengono distintive del processo di patogenesi. Tali strutture permettono a *P. mirabilis* di rimanere nell'organismo e proteggere quest'ultimo dal sistema immunitario dell'ospite e da un eventuale trattamento mediante antibiotici. Nonostante la sua patogenicità nei confronti dell'uomo, *P. mirabilis* è stato utilizzato in campo agricolo dove si è dimostrato particolarmente importante per la crescita di piante in terreni che presentavano un elevato tasso di metalli pesanti ed in particolare di ioni Zn (Faisal Islam et al., 2014). Batteri appartenenti a questa specie si sono dimostrati in grado di ridurre il tasso di ioni Zn presenti nel terreno, migliorando l'assunzione di nutrienti ed aumentando la crescita delle piante coltivate.

Un secondo genere appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolato in tutti e quattro i gruppi è *Klebsiella*. I membri di questo genere sono microrganismi in grado di colonizzare la pelle, la faringe o il tratto gastrointestinale dell'uomo. Formano grandi colonie, grazie alla capsula polisaccaridica mucoide (antigene K) che li protegge dalla fagocitosi, favorisce l'adesione e conferisce resistenza contro molti meccanismi di difesa dell'ospite. La specie più nota è sicuramente *Klebsiella pneumoniae*, un batterio gram-negativo che può provocare polmonite batterica, sebbene sia più comunemente coinvolta in infezioni acquisite in ospedale nel tratto urinario e in ferite, con particolare riferimento a individui immunocompromessi. *Klebsiella pneumoniae* si sta sempre più configurando come un agente infettivo nosocomiale dalla crescente pericolosità, legata alla comparsa sempre più frequente di ceppi antibiotico-resistenti. La poliantibiotico-resistenza presente in questi microrganismi è dovuta principalmente alla presenza di un particolare plasmide, *pKP048*, il quale contiene molte sequenze geniche, come *blaKPC-2*, *blaDHA-1*, *qnrB4* e *armA*, che conferiscono resistenza rispettivamente a carbapenemi, cefalosporine, fluorochinoloni e aminoglicosidi (H. Yigit et al., 2001). L'associazione di molti

importanti geni che conferiscono resistenza agli antibiotici, presenti sullo stesso plasmide, è preoccupante a causa del rischio di diffusione dovuto alla scelta dei vari farmaci. Nonostante ciò, esistono delle specie appartenenti al genere *Klebsiella*, come *Klebsiella oxytoca*, isolata dalle acque reflue industriali contenenti cianuro, che hanno dimostrato di essere in grado di biodegradare tale composto tossico in prodotti innocui, utilizzando proprio tale molecola come unica fonte di azoto (C.M. Kao et al., 2002).

Fra i generi presenti solo in due delle quattro diete considerate troviamo *Kurthia*, appartenente alla famiglia delle *Planococcaceae*. Sono batteri gram-positivi, che non formano spore. Nonostante ceppi appartenenti a questo genere siano stati isolati dai campioni di diarrea, non sono state trovate prove che ne suggeriscano una natura patogena. *Kurthia sp.* è stata selezionata sulla base della sua capacità di degradare rapidamente il colore presente nelle acque reflue della tintura, ed in particolare trifenilmetano (R. KumarSani, U. C. Banerjee, 1999). Un'altra specie del genere *Kurthia* è *Kurthia gibsonii*, esso è un batterio chitinolitico (cioè in grado di distruggere l'esoscheletro chitinoso dei crostacei), gram-positivo. *Kurthia gibsonii* in origine è stato isolato dai campioni di terreno raccolti nei pressi dei locali dove si praticava la pulitura dei gamberi.

*Kurthia gibsonii* è stato testato per la sua proprietà antagonista nei confronti di una grande varietà di fitopatogeni come: *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, *Corynespora cassicola*, *colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *R.solani* e *Rhizopus sp.* Gli studi alla base dei meccanismi del suo antagonismo, hanno rivelato la produzione da parte di questa specie di numerosi enzimi come: chitinasi, proteasi e cellulasi. Inoltre si è visto che *Kurthia gibsonii* determina un aumento della crescita vegetale mediante la promozione della solubilizzazione del fosfato, la produzione di acido acetico ed indolo (Sahadevan N. et al., 2016).

L'altro genere comune a due dei quattro gruppi è *Escherichia*. Sicuramente la specie più nota di tale genere è *Escherichia coli*, il cui ceppo *E. coli K12* è considerato un organismo procariota modello, sul quale sono stati eseguiti numerosi studi fisiologici, biochimici e genetici. *E. coli* opera una fermentazione acido-mista, è positivo ai test di

rosso metile e dell'indolo. A differenza delle specie appartenenti ai generi *Shigella* e *Salmonella*, *E. coli* fermenta il lattosio. La maggior parte dei ceppi *E. coli* è in grado di crescere in un ampio intervallo di temperatura, 15-48°C, essendo 37-42°C l'optimum (Biavati et al,2013). L'intervallo di pH che consente la crescita è 5.5-8.0, con alcuni ceppi che possono tollerare anche pH 2,0. *E. coli* e le altre specie del genere sono comunemente isolate dal tratto gastrointestinale di uomini e animali. *E. coli* può essere secondariamente isolato da suolo ed acqua come conseguenza di una contaminazione fecale. Normalmente non è patogeno ma alcuni ceppi possono determinare patologie gastroenteriche e infezioni delle vie urinarie. Inoltre, molti sierotipi si sono rivelati MDR (Multidrug-resistant), mediante la produzione di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e cefalosporinasi, enzimi capaci di idrolizzare numerose classi di beta-lattamici. In *E. coli* è stata riscontrata anche la presenza di *MdfA*, un gene presente a livello plasmidico che codifica per una proteina trasportatrice di membrana, costituita da 410 residui amminoacidici (R Edgar, E Bibi, 1997). Questa proteina sfrutta l'energia sviluppata dall'idrolisi dell'ATP per trasportare ed espellere all'esterno delle cellule una grande varietà di sostanze, da piccole molecole come cationi organici, amminoacidi, antibiotici, a macromolecole come proteine e polisaccaridi, conferendo così un'elevata resistenza a numerose classi antimicrobiche (R Edgar, E Bibi, 1997). L'infezione da *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC), *Escherichia coli* enteroemorragica O157: H7, è considerata una zoonosi poiché il tratto gastrointestinale dei ruminanti, in particolare dei bovini e bufalini, costituisce il serbatoio naturale di questi batteri. L'*Escherichia coli* enteroemorragica O157: H7 è un importante agente patogeno di origine alimentare che causa gravi malattie nell'uomo in tutto il mondo ( Ji Youn Lim et al., 2010) . Questa specie, si trova prevalentemente nell'intestino dei ruminanti, qui svolgono il ruolo di batteri commensali, nonostante ciò sono in grado di sopravvivere bene anche nell'ambiente. La verotossina (VT) prodotta da *Escherichia coli* O157: H7 è strettamente omologa alla tossina Shiga di *Shigella dysenteriae* di tipo I, e gli organismi sono ancora comunemente indicati in letteratura come produttori di tossina Shiga *E. coli* (STEC). La dimensione del cromosoma di *E. coli* O157: H7 è 5,5 Mb, di questi 4,1 Mb sono conservati in tutti i

ceppi di *E. coli*. I restanti (1,4 Mb) sono specifici per *E. coli O157: H7* e derivano da DNA estranei trasferiti orizzontalmente tramite batteriofagi. Infatti gli studi hanno dimostrato che *E. coli O157: H7* contiene 463 geni associati ai fagi rispetto a *E. coli K-12* che ne contiene solo 29 ( Ji Youn Lim et al., 2010).

Un altro genere sicuramente degno di nota, anche se isolato solo nel gruppo E (Figura 6 b), è *Shigella*. L'habitat naturale di diverse specie di questo genere è limitato al tratto intestinale dell'uomo e di altri primati, nei quali provocano la dissenteria bacillare. Le cellule mature si presentano come esili bacilli gram-negativi; nelle colture giovani si riscontrano anche forme coccobacillari. Sono aerobi facoltativi ma crescono bene anche in aerobiosi. Le colonie sono convesse, circolari, trasparenti, con margini integri. Tutte le specie del genere *Shigella* fermentano il glucosio e, con l'eccezione di *Shigella sonnei*, non fermentano il lattosio. L'incapacità di fermentare il lattosio consente di distinguerle sui terreni differenziali. Le infezioni da *Shigella* sono quasi sempre limitate al tratto gastrointestinale. *S. dysenteriae* ad esempio, produce un'esotossina termolabile che agisce sull'intestino e sul sistema nervoso centrale: si tratta di una proteina con attività antigenica che, agendo come un'enterotossina, provoca diarrea. Nell'uomo inoltre la tossina inibisce l'assorbimento degli zuccheri e degli amminoacidi nell'intestino tenue. Molte specie di questo genere sono gli agenti eziologici delle infezioni intestinali invasive acute manifestate clinicamente da diarrea acquosa o sanguinolenta. La shigellosi è largamente presente soprattutto nei paesi in via di sviluppo, e si stima che colpisca almeno 80 milioni di persone, prevalentemente bambini, ogni anno. La malattia può essere causata da una qualsiasi delle 4 specie di *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. Nei paesi industrializzati, la specie più comune è *S. sonnei*, ma questa specie si sta diffondendo a livello intercontinentale nei paesi in via di sviluppo come predominante ed in rapida evoluzione (M. Nüesch-Inderbinen et al.,2016). Al contrario, nei paesi in via di sviluppo, la specie predominante è la *S. flexneri*, con maggior persistenza nelle zone che presentano condizioni igieniche inadeguate e riserve d'acqua non sicure. Più raramente sono isolate *S. dysenteriae*, responsabile di grandi epidemie in passato e *S. boydii*. Sebbene la shigellosi sia principalmente una malattia auto-limitante, le linee

guida dell'Organizzazione mondiale della sanità raccomandano il trattamento farmacologico antimicrobico come mezzo per ridurre decessi, sintomi della malattia e tempo di escrezione dell'organismo; l'attuale farmaco di scelta è la ciprofloxacina (M. Nüesch-Inderbinnen et al.,2016). Di crescente preoccupazione è la resistenza a più farmaci, in particolare il crescente tasso di resistenza alla ciprofloxacina riportato per gli isolati di *Shigella* dalle regioni asiatiche e africane. Inoltre, sta emergendo la resistenza ai farmaci antimicrobici raccomandati di seconda linea, come la cefalosporina ceftriaxone di terza generazione e il macrolide azitromicina (M. Nüesch-Inderbinnen et al.,2016).

Anche il genere *Staphylococcus*, presente solo nel gruppo V (Figura 6d) comprende specie con il carattere di patogenicità. Sono microrganismi a forma di cocco, disposti singolarmente, a coppie, corte catene (3-4 cellule) o in gruppi di cellule a forma di grappolo. Sono Gram-positivi, anaerobi facoltativi, chemiorganotrofi con metabolismo respiratorio e/o fermentativo. Sono largamente distribuiti in natura e a causa della loro adattabilità sono il gruppo di batteri più frequentemente isolati dalla pelle, dai tessuti epiteliali e dalle mucose dell'uomo, animali ed uccelli. *S. epidermidis* e *S. hominis* (coagulasi-negativi) sono le specie più frequentemente isolate dall'epidermide dell'uomo (Biavati et al.,2013). Sporadicamente, gli stafilococchi possono essere isolati da diverse altre fonti, quali suolo, acqua, piante, carne, pollame e prodotti lattiero-caseari. Alcune specie di questo genere presentano caratteristiche positive. *S. carnosus* è usato come starter per la fermentazione di prodotti carnei insaccati. Durante la maturazione di tali prodotti, *S. carnosus* esplica varie importanti funzioni: riduzione di  $\text{NO}^{-3}$  a  $\text{NO}^{-2}$  che si combina con la mioglobina per formare la nitrosomioglobina, responsabile della colorazione rossastra molto apprezzata nelle carni, e successiva riduzione del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_3$ ; lieve diminuzione dei valori di pH e contributo della genesi di composti responsabili del sapore (Biavati et al.,2013). Le specie coagulasi-positive, come *S. aureus*, sono considerate temibili patogeni per l'uomo e gli animali. *S. aureus* è l'agente di diverse malattie come foruncolosi, osteomieliti, miocarditi, polmoniti e la tossina stafilococcica è responsabile di intossicazioni alimentari. Nello *S. aureus*, il gene *mecA*, che codifica per la proteina di

penicillina legante 78-kDa (PBP) 2a (o PBP2'), provoca resistenza alla meticillina e tutti gli altri antibiotici beta-lattamici. In *S. aureus* sensibile alla meticillina (MSSA), gli antibiotici beta-lattamici si legano ai PBP nativi che sono presente nella parete cellulare di *S. aureus*, ciò provoca l'interruzione della sintesi dello strato peptidoglicano, di conseguenza, *S. aureus* non sopravvive. Tuttavia, nei ceppi meticillina resistenti (MRSA), è presente un gene PBP2 differente a cui gli antibiotici b-lattamici non possono legarsi e la sintesi dello strato peptidoglicano non viene interrotta, determinando la crescita dei ceppi MRSA (S. Börjesson et al.,2009).

Altri due generi spesso associati a patogenicità e resistenza agli antibiotici sono *Corynebacterium* ed *Enterococcus*.

*Corynebacterium* è un genere di microrganismi gram-positivi, anaerobi facoltativi appartenenti alla famiglia delle *Corynebacteriaceae*. I corinebatteri sono parassiti animali che possono essere trasmessi anche all'uomo. La specie più rappresentativa del genere è *C. diphtheriae*, agente eziologico della difterite, una patologia infettiva con tropismo per la faringe e la cute causata principalmente dall'esotossina difterica. La tossina viene assorbita a livello delle mucose provocando la distruzione dell'epitelio ed una risposta infiammatoria superficiale. L'epitelio necrotico viene inglobato in un essudato composto di fibrina, eritrociti e leucociti, con formazione di una pseudomembrana "grigiastra", di solito sulle tonsille, sulla faringe o sulla laringe. Qualsiasi tentativo di asportare la pseudomembrana espone e lacera i capillari con conseguente sanguinamento. Anche *Corynebacterium urealyticum* è una specie patogena per l'uomo che presenta resistenze multiple agli antibiotici, in particolare beta-lattamici (Murray et al.,2017). Questa specie è spesso associata ad infezioni ricoperte da croste, acute e croniche delle vie urinarie, in pazienti con fattori predisponenti, come cateterizzazione prolungata, manipolazioni urologiche, trattamento antimicrobico protratto a largo spettro. Nonostante molte specie appartenenti al gruppo *Corynebacterium* siano patogene per l'uomo, esiste una particolare specie particolarmente utilizzata nella microbiologia industriale: *Corynebacterium glutamicum* (Biavati et al.,2013). Questi microrganismi vengono utilizzati per la produzione di acido glutamico, attraverso mutanti iperproduttori. Si

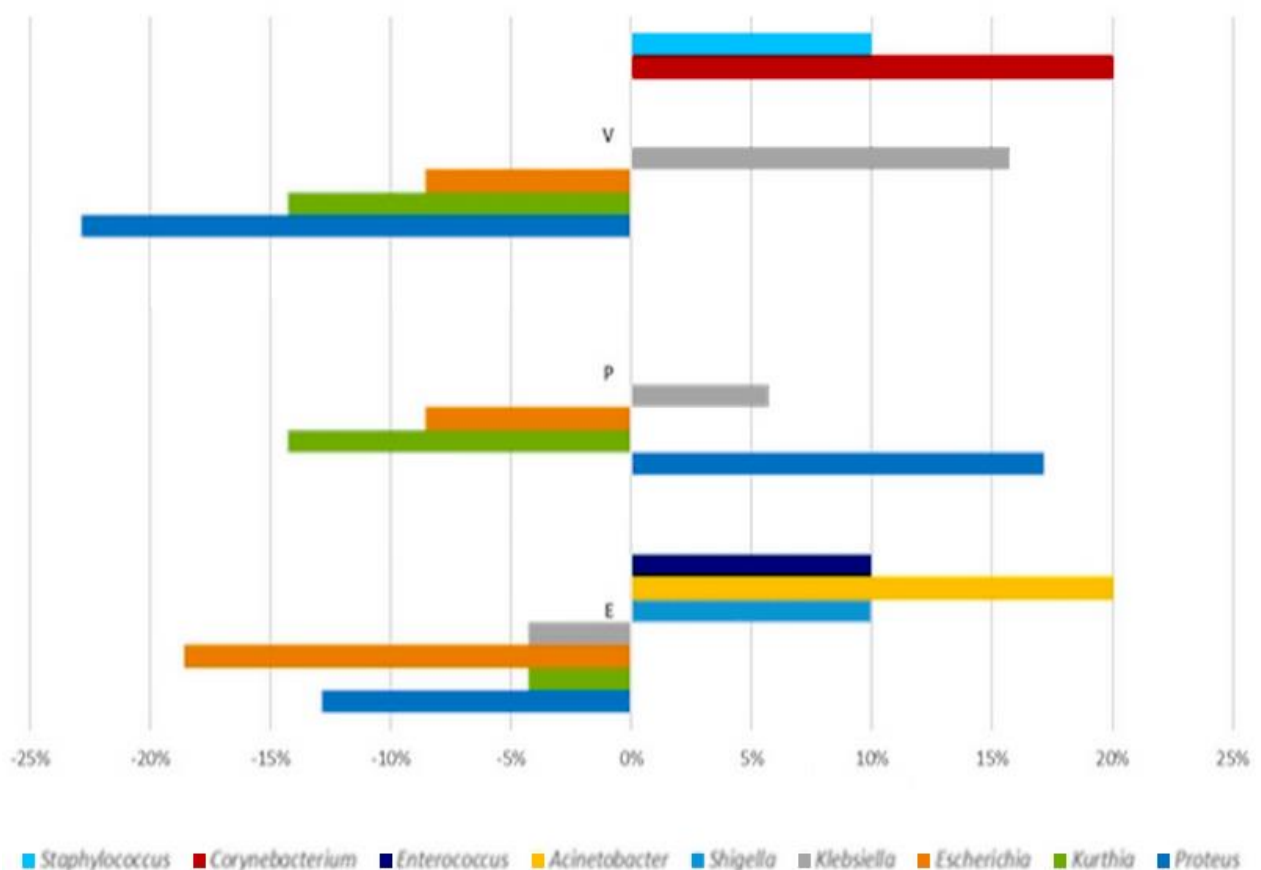
tratta di ceppi mutanti, privi di enzimi che sottraggono i precursori della sintesi dell'acido glutamico (α-chetoglutarato-deidrogenasi). Gli L-aminoacidi hanno un ampio spettro di uso commerciale come additivi alimentari, integratori alimentari, composti per infusione, agenti terapeutici e precursori per la sintesi di peptidi o prodotti agrochimici. Questo batterio, a partire da circa 100 g / L di glucosio, è in grado di produrre 50 g / L di acido glutammico dopo pochi giorni di coltura (Thomas Hermann, 2003).

Il genere *Enterococcus* presenta microrganismi Gram-positivi e catalasi-negativi, di forma tondeggianti che si dispongono sotto forma di diplococchi oppure in corte catene, caratteristica che rende difficile distinguerli al microscopio dagli streptococchi. Sono organismi anaerobi facoltativi (preferiscono consumare ossigeno, ma possono comunque sopravvivere anche in assenza di esso) e sopportano un ampio intervallo di temperature. Esistono almeno 47 specie di enterococchi, ma meno di un terzo di questi sono associati a malattia negli esseri umani. *L'Enterococcus faecalis* è la specie più comune e causa l'85-90% delle infezioni enterococciche, mentre *Enterococcus faecium* è responsabile di un altro 5-10%. Gli enterococchi rappresentano una delle cause più frequenti delle infezioni associate all'assistenza sanitaria, in particolare nelle unità di terapia intensiva e sono soggetti ad una crescente pressione selettiva dovuta alle terapie con cefalosporine ed altri antibiotici verso i quali essi stanno sviluppando sempre maggior resistenza. Le più comuni sedi di infezione sono le vie urinarie, le ferite, le vie biliari ed il sangue. Gli enterococchi possono causare meningite e batteriemia nei neonati, mentre negli adulti, possono provocare enterocardite. Uno dei maggiori problemi presentati dagli enterococchi è costituito dalla loro elevata resistenza verso gli antibiotici. Gli enterococchi sono infatti intrinsecamente resistenti alle cefalosporine, alle penicilline ed ai monobattami. Inoltre, essi presentano una resistenza a bassi livelli di molti aminoglicosidi e presentano sensibilità intermedia o sono resistenti ai fluorochinoloni. Il ripetuto uso di avoparcina (un antibiotico non usato in terapia umana, ma strutturalmente simile alla vancomicina che rappresenta l'antibiotico di elezione nei casi di infezioni urinarie umane da parte di *Enterococcus ssp.*), negli allevamenti ha selezionato ceppi di *Enterococcus ssp.* Vancomicina-

resistenti (ceppi VRE, *Vancomycin resistant Enterococcus*), che si sono diffusi nell'uomo creando seri problemi terapeutici in caso di infezioni (Biavati et al.,2013). Nel 1996 l'uso veterinario dell'avoparcina fu bandito in Germania e dopo tale proibizione l'isolamento di ceppi VRE da carni di pollo e maiale è diminuito dal 100 al 25%, mentre i portatori umani di ceppi VRE sono scesi dal 12 al 9%. Nel 1997 in tutta l'Unione europea l'avoparcina è stata messa al bando e dal 2008 è proibito utilizzare antimicrobici a scopo di crescita negli allevamenti animali (Biavati et al.,2013).

L'ultimo genere presente fra isolati analizzati in questo lavoro di tesi è *Acinetobacter*. Sono batteri aerobi gram-negativi molto diffusi nel suolo e nell'acqua e, talvolta possono essere isolate dalla cute, dalle mucose, dalle secrezioni e in ambiente ospedaliero. *A. baumannii* è la specie di più frequente isolamento, a differenza di *Acinetobacter lwoffii* e di altre specie il cui isolamento risulta essere molto più raro. Di solito tali batteri hanno l'aspetto di cocchi o cocco-bacilli. Si riscontrano anche forme a bastoncino e talvolta i batteri appaiono gram-positivi. Gli *Acinetobacter* crescono bene sui comuni terreni colturali usati per i materiali biologici. Spesso sono organismi commensali, ma talvolta possono causare delle infezioni nosocomiali, che hanno origine dall'acqua degli umidificatori o dei vaporizzatori degli impianti di climatizzazione (Murray et al.,2017). *Acinetobacter baumannii* risulta essere la specie che causa l'80% delle infezioni cliniche. I meccanismi di resistenza antimicrobica in *A. baumannii* rientrano generalmente in tre grandi categorie: enzimi antimicrobici inattivanti, ridotto accesso a bersagli batterici (a causa della ridotta permeabilità della membrana esterna causata dalla perdita o dalla ridotta espressione di porine, sovraespressione delle pompe di efflusso multidrug) e mutazioni che cambiano target o funzioni cellulari (alterazioni delle proteine leganti la penicillina; PBP) ( V. Manchanda et al., 2010). Le specie di *Acinetobacter* possiedono una vasta gamma di beta-lattamasi che idrolizzano e conferiscono resistenza a penicilline, cefalosporine e carbapenemi.

Il gruppo con il maggior numero di generi isolati, pari a 7, è quello corrispondente alla dieta arricchita con la miscela polifenolica commerciale (Figura 6b); segue la dieta arricchita con Vitamina E, con 5 generi presenti (Figura 6d); il gruppo di controllo, con 4 generi (Figura 6a) e il gruppo corrispondente alla dieta arricchita con la miscela polifenolica Poli4Liquid con 3 generi. Per poter valutare meglio come cambiava la diversità microbica presente al variare della dieta, sono state comparate le percentuali di presenza di ciascun genere microbico presente nelle diete arricchite con polifenoli e vitamine (E, P e V) con quelle dei generi presenti nel gruppo di controllo (C). Il risultato di tale valutazione è riportato in **Figura 8**.



**Figura 8.** Variazione della presenza dei generi microbici ottenuta comparando ciascuna dieta arricchita con il campione di controllo

Risulta evidente come la presenza di polifenoli o Vitamina E nel mangime abbia portato ad una riduzione significativa delle specie appartenenti ai generi *Khurtia* ed *Escherichia* e, in due casi su tre, anche di quelle appartenenti al genere *Proteus*, con la sola eccezione del gruppo P. Quest'ultimo gruppo, così come il gruppo V, è contraddistinto da un aumento delle specie del gruppo *Klebsiella*, le quali nel gruppo E risultano invece meno presenti rispetto al controllo. L'aggiunta della miscela polifenolica commerciale è inoltre legata alla presenza di specie appartenenti ai generi *Enterococcus*, *Shigella* e *Acinetobacter*, assenti in tutti gli altri assetti sperimentali considerati. Da segnalare è anche la presenza di *Staphylococcus* e *Corynebacterium* nella dieta arricchita con Vitamina E.

## V. CONCLUSIONI

Il fenomeno della poliantibiotico-resistenza ha determinato un impatto importante sul piano clinico, zootecnico ed economico. I microrganismi stanno diventando sempre più resistenti nei confronti di farmaci verso cui erano precedentemente suscettibili. Tutto ciò viene espletato attraverso numerose vie di trasferimento che riguardano nella maggior parte dei casi strutture geniche che permettono l'espressione di enzimi ed elementi strutturali, i quali determinano fenomeni di resistenza a numerose classi antibiotiche.

Il progetto si è basato sull'identificazione proprio di tali microrganismi MDR (multidrug-resistant), estratti a partire da feci di polli da allevamento a cui sono state somministrate quattro diete differenti (C, E, P e V). Una delle quali è stata utilizzata come controllo positivo (C), non essendo stato addizionato alcun elemento aggiuntivo al mangime dei polli. Nelle altre tre diete sono stati aggiunti diversi elementi; polifenoli commerciali per quanto riguarda la dieta E, polifenoli Poli4Liquid per quanto concerne la dieta P ed infine vitamina E nella dieta V.

Alla luce di quanto sopra riportato, si può concludere che la maggior diversità batterica è stata riscontrata nella dieta a base di polifenoli commerciali (E), con ben 7 generi diversi identificati, rispetto alla dieta a base di mangime senza elementi aggiuntivi, in cui si è riscontrata una diversità ben più ridotta, con 4 generi totali identificati. In tal senso il miglior risultato è stato ottenuto nella dieta P, a base di mangime con aggiunta di polifenoli Poli4Liquid, in cui sono stati riscontrati solo 3 generi batterici poliantibiotico-resistenti.

Andando però ad analizzare la variazione dei generi microbici in relazione al controllo positivo, possiamo concludere che in tutte e tre le diete c'è stato un riscontro positivo, infatti risulta evidente come la presenza di polifenoli e vitamina E, abbiano contribuito a ridurre significativamente specie appartenenti al genere *Kurthia* ed *Escherichia*. Questa riduzione significativa rispetto al controllo positivo, si è riscontrata anche nei confronti del genere *Proteus*, con l'unica eccezione in questo caso della dieta

arricchita con Poli4Liquid (P). Nelle diete arricchite con Poli4Liquid e vitamina E si è registrato un aumento della presenza di specie appartenenti ai generi *Klebsiella*, rispetto al controllo positivo. Degno di nota è il fatto che all'aggiunta di polifenoli commerciali, è strettamente legata la presenza di generi *Enterococcus*, *Shigella* e *Acinetobacter*, assenti in tutti gli altri assetti sperimentali considerati. Ciò ci permette di evidenziare come la presenza di batteri poliantibiotico-resistenti nelle feci e nella lettiera dei polli d'allevamento risulti solo parzialmente influenzata dall'imposizione di diete con specifici additivi, in quanto anche la componente ambientale gioca un suo ruolo nel selezionare tale specie. L'aggiunta di polifenoli in specifiche formulazioni (Poli4Liquid) sembra promettente in termini di riduzione dei generi batterici presenti in feci e lettiera, ma necessitano ulteriori studi e messe a punto sia del composto che dei metodi per poter giungere ad una riduzione ancora maggiore della presenza di microrganismi patogeni e multiresistenti.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Abraham, E. P., and E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* 10:677-678

Ahmed A. M., Amjad I. A. Hussein and Tadashi Shimamoto, 2006. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of Salmonella genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region.

DOI:10.1093/jac/dkl471

Aguirre, L.; Portillo, M. P.; Hijona, E.; Bujanda, L., 2014: Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 7366–7380.

Alvesalo J, Vuorela H, Tammela P, Leinonen M, Saikku P, Vuorela P: Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on Chlamydia pneumoniae in cell cultures. *Biochem Pharmacol* 2006, 71:735-741

Andreasen, M. F.; Kroon, P. A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M. T., 2001: Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **49**, 5679–5684.

Antonelli, G., Clementi, M., Pozzi, G. & Rossolini, G.M. (2008). Farmaci antibatterici. In (G., Clementi, M., Pozzi, G., Rossolini, G.M.), *Principi di microbiologia medica*. Ambrosiana, Milano, 128-142 Baker-Austina ,Meredith S.Wrightab ,Ramunas Stepanauskas , J.V.McArthura, 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>

Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H: Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur J Med Chem* 2009, 44:2211-2218.

Beecher, G. R., 2003: Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition* **133**, 3248S–3254S

Cécile Bébéar, Sabine Pereyre, Olivia Peuchant (2011). *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics.

<https://doi.org/10.2217/fmb.11.18>

Chuang, C. C.; McIntosh, M. K., 2011: Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual Review of Nutrition* **31**, 155–176.

Biavati B., Sorlini C. 2013. Microbiologia generale e agraria II<sup>a</sup> edizione. ISBN 978-88-08-18113-8

C.M. Kao, J.K. Li, H.R. Lou, C.S. Lin, S.C. Chen, 2002. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00624-0)

Cohen M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. (1992) *Science*. 257: 1050-1055.

Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I., 2004: Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **65**, 995–1016.

Cote´ J, Caillet S, Doyon G, Sylvain JF, Lacroix M: Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010, 50:666-679

Craig Baker-Austin, Meredith S. Wright, Ramunas Stepanauskas and J.V. McArthur Savannah, (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>

David C. Hooper, 1999 Mechanisms of fluoroquinolone Resistance

<https://doi.org/10.1054/drup.1998.0068>

Davies, J., 1994, Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes, *Science* 264:375.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2010; 375:1557-68 [PubMed: 20206987]

Faisal Islam, Yasmeen T, Riaz M, Arif MS, Ali S, Raza SH. 2014. *Proteus mirabilis* alleviates zinc toxicity by preventing oxidative stress in maize (*Zea mays*) plants.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.201.08.020>

Gelband H, Molly Miller P, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, White A, Laxminarayan R. The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing South Afr*. 2015;8:30–4

Giamarellou H. , 2005. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs).

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01160.x>

Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W (2013) genomic transition of enterococci from gut commensal to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol* 16, 10-16

Guardabassi, L. & Kruse, H. (2008). Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In (Guardabassi, L., Jensen, L. B., Kruse H.), *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell publishing UK. 1-12 Hasman, H. and Aarestrup, F.M. (2002) tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1410–1416 H. Heuer, H. Schmitt, K. Smalla, Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 236 (2011). doi:10.1016/j.mib.2011.04.009 pmid:21546307 Hooper, L.; Kroon, P. A.; Rimm, E. B.; Cohn, J. S.; Harvey, I.; Le Cornu, K. A.; Ryder, J. J.; Hall, W. L.; Cassidy, A.,

2008: Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition* **88**, 38–50.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>

**H. Yigit, Anne Marie Queenan, Gregory J. Anderson et al., 2001.** Carbapenem-Hydrolyzing b-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*.

DOI: 10.1128/AAC.45.4.1151–1161.2001

**Hooper DC. 2000.** Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 31(Suppl 2):S24–28  
**Intorre, L. (2009)** La resistenza microbica ai chemioterapici. In (Carli, S., Ormas, P., Re, G. & Soldani G). *Farmacologia Veterinaria*. Idelson-Gnocchi, 695-700  
**Jeśman C, Młudzik A, Cybulska M, 2011.**History of antibiotics and sulphonamides discoveries  
**Kornelia Smalla, Sven Jechalke, Eva M. (2015)** Plasmid detection, characterization and ecology.PMID: 26104560  
**J.Michael Janda and Sharon L. Abbott, (2007).** 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls.

DOI:10.1128/JCM.0122807 PMID: 17626177

DOI:10.1128/JCM.03385-12

**Ji Youn Lim, Jang W. Yoon, and Carolyn J. Hovde; 2010.** A Brief Overview of *Escherichia coli O157:H7* and Its Plasmid *O157*. PMID: 20134227

**Kevin J. Forsberg , Alejandro Reyes , Bin Wang , Elizabeth M. Selleck, Morten O. A. Sommer Gautam Dantas** The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens *Science* 31 Aug 2012: Vol. 337, Issue 6098, pp. 1107-1111

DOI: 10.1126/science.1220761

**Kim M. and Chun J., (2014).** Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server.

<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>

Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, Bjorn C. Knollmann (2019). Le basi farmacologiche della terapia.

Lavecchia, T.; Rea, G.; Antonacci, A.; Giardi, M. T., 2013: Healthy and adverse effects of plant-derived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 198–213.

Leo´n-Di´az R, Meckes M, Said-Ferna´ ndez S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jime´ nez-Arellanes A: Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, 105:45-51.

Liebert CA, Hall RM, Summers AO. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:507–22

Magdalena Nüesch-Inderbinen et al.,2016. Shigella Antimicrobial Drug Resistance Mechanisms, 2004–2014.

DOI: 10.3201/eid2206.152088 PMID: 27191035

McKinnell JA, Kunz DF, Chamot (2012). Association between vancomycin-resistant Enterococci bacteremia and ceftriaxone usage. *Infect Control Hosp Epidemiol.*; 33:718-24 [PubMed: 22669234] NETHMAP 2008. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands *Neu (1992) The crisis in antibiotic resistance. Science* 21 Aug 1992:Vol. 257, Issue 5073, pp. 1064-1073,

DOI: 10.1126/science.257.5073.1064 Ministero della Salute (2018).

<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/rapporto-1-dati-2018.pdf>

Mulders MN, Haenen AP, Geenen PL, Vesseur PC, Poldervaart ES, Bosch T, Huijsdens XW, Hengeveld PD, Dam-Deisz WD, Graat EA, Mevius D, Voss A, Van De Giessen AW (2010). Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands.

Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:718–33.

Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:608–20

Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M. & Wegener, H. C. (1999). An outbreak of multi-drug resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *The New England Journal of Medicine.* 341: 1420-1425.

Murray P.R. Rosenthal K.S. Pfaller M.A., 2017. *Microbiologia medica* 8<sup>a</sup> edizione. ISBN: 9788821441448

Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogen: a review. *Front Vet Sci.* 2017; 4:126.

Nikaido Hiroshi, 2009. *Multidrug Resistance in Bacteria.* Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley.

DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923

Norrby R, Powell M, Aronsson B, Monnet DL, Lutsar I, Bocsan IS, Cars O, Giamarrelou H, Gyssens IC (2009) ECDC/EMEA Joint technical report. The bacterial challenge: time to react.

[https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf)

O’Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O’Brien NM, Williamson G: Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 2004, 551:245-254

Poirel Laurent, A.Bonnin Rémy, Nordmann Patrice, 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative rods.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.008>

Rajesh KumarSani, Uttam ChandBanerjee, 1999. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp.

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00159-8)

Robicsek A., Jacoby G.A. e Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmidmediated quinolone Resistance . (2006) *Lancet Infect. Dis.* 6: 629-640.

P. S. McManus, V. O. Stockwell, G. W. Sundin, A. L. Jones, Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 443 (2002).

DOI:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927 pmid:12147767

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L: Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Chem Int Ed* 2011, 50:586-621.

Rice LB. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2006;43:100–5.

Rodríguez Vaquero MJ, Aredes Ferna´ ndez PA, Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM: Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J Agric Food Chem* 2010, 58:6048-6052

Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;274:63–6.

Ruiz-Palacios GM. 2007. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: Playing chicken. *Clin Infect Dis* 44, 701-703

Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant, and T. Popovic. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1117–1123.

Sadik CD, Sies H, Schewe T: Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 2003, 65:773-781.

Sahadevan N. Jyothis Mathew , E.K Radhakrishnan; 2016. Potential of *kurthia gibsonii* mb 126 as a biocontrol agent against fusarium oxysporum wilt disease of tomato plants. ISSN 2348 – 3571

Schwarz S. e Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. (2001) *Vet. Res.* 32: 201-225.

Stefan Börjesson, Matussek A, Melin S, Löfgren S, Lindgren PE, 2009. Antimicrobial Potential of Plant Seed Extracts against Multidrug Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MDR-MRSA).

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.036>

Smalla K, Jechalke S, Top EM. (2015) Plasmid Detection, Characterization, and Ecology.

DOI:10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014

<https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch23>

Smith JL, PM Fratamico. 2010. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *J Food Prot* 73, 1141-1152.

Tangney, C. C.; Rasmussen, H. E., 2013: Polyphenols, inflammation and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports* **15**, 324.

Telenti A. e Tenover C.F. Genetic Methods for Detecting Bacterial Resistance genes. In: *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. Lewis K., Salyers A.A., Taber H.W. e Wax R.G. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York (2002) 161-192

Thomas Hermann, 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00149-4)

T.Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics* (John Innes Foundation, Norwich, UK, ed. 1, 2000).

Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:319–354)

Ueda, K., T. Seki, T. Kudo, T. Yoshida, and M. Kataoka. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.* 181:78–82

Valenzano, D. R.; Terzibasi, E.; Genade, T.; Cattaneo, A.; Domenici, L.; Cellerino, A., 2006: Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology* **16**, 296–300.

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112(18):5649–54.

DOI:10.1073/pnas.1503141112

<https://mbio.asm.org/content/mbio/8/5/e01490-17.full.pdf>

V. M. D’Costa et al., Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457 (2011).

DOI:10.1038/nature10388 pmid:21881561

Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* Vol. 279, Issue 5353, pp. 996-997.

DOI: 10.1126/science.279.5353.996

WHO, (2015). Global action plan for antimicrobial resistance (World Health Assembly document A68/20, 27 March 2015)

## BIBLIOGRAFIA FIGURE

**Figura 1:** Rowe-Magnus D.A., Mazel D. (1999). Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol* 2: 483-488

**Figura 2:** Nikaido Hiroshi, 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley.

<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>

DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923

**Figura 3, Figura 4:**

<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/rapporto-1-dati-2018.pdf>

**Figura 5:** (Daglia M et al.,2011). Polyphenols as antimicrobial agents.

DOI 10.1016/j.copbio.2011.08.007

**Figura 6:** Ahmed A. M., Amjad I. A. Hussein and Tadashi Shimamoto, 2006. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of Salmonella genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region.

DOI:10.1093/jac/dkl471