

Sommario

1	Il genere <i>Lactobacillus</i>	1
1.1	Morfologia cellulare	2
1.2	Metabolismo	4
1.3	Esigenze nutrizionali e caratteristiche colturali	7
1.4	Habitat	9
	Apparato gastro-intestinale	9
	Microbiota vaginale	11
1.5	Effetti benefici dei lattobacilli	13
	Meccanismi generali dell'azione probiotica dei lattobacilli	14
	Inibizione dei patogeni e ripristino dell'omeostasi batterica attraverso interazione microbo-microbo	15
	Interazioni benefiche con l'epitelio del tratto G.I.....	17
	Modulazione della risposte immunitaria.....	19
2	Tassonomia	21
2.1	Classificazione.....	22
	Il caso " <i>Lactobacillus casei</i> "	30

2.2	La genomica nel genere <i>Lactobacillus</i> : la base per comprenderne la diversità	32
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	32
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	33
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	34
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	35
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	36
	Analisi genomica comparativa.....	37
3	Metodi molecolari di identificazione	40
3.1	Macromolecole “ cronometro molecolare” della diversità microbica.....	46
	La scelta del gene <i>16S rRNA</i> come gene da sequenziare....	47
	Altri <i>marker</i> filogenetici	50
	Il fattore di elongazione Tu e la superfamiglia delle GTPasi	51
	Il gene <i>tuf</i>	54
4	Antibiotico resistenza nei batteri acido lattici non enterococcici	61

4.1	LAB, <i>Lactic Acid Bacteria</i>	61
4.2	Il problema dell'antibiotico resistenza	62
	Acquisizione e diffusione dell'antibiotico resistenza	64
	I batteri intestinali come reservoir dell'antibiotico resistenza	66
4.3	Profilo di sensibilità/resistenza nei lattobacilli.....	68
	Determinazione dei profili di antibiotico sensibilità/resistenza nei LAB.....	71
4.4	I chinoloni.....	74
	Struttura e classificazione	74
	Ciprofloxacina.....	81
	Levofloxacina.....	82
4.5	Meccanismo d'azione dei fluorchinoloni	83
	4.5.1 DNA girasi e Topoisomerasi IV	84
	Struttura.....	84
	Funzione.....	84
	Formazione del complesso ternario	86
4.6	Meccanismi di resistenza.....	88

4.6.1	Resistenza ai fluorochinoloni.....	89
	Alterazione del <i>target</i>	89
	Alterazioni nella DNA girasi	91
	Alterazioni nella topoisomerasi IV	95
	Alterazione del <i>target</i> nei lattobacilli chinolone-resistenti?	98
	Diminuito <i>uptake</i>	99
	✓ Diminuita espressione di porine.....	100
	✓ Pompe d'efflusso.....	101
5	Scopo del lavoro.....	104
6	Materiali e metodi	105
6.1	Isolamento e coltivazione	105
6.2	Test di sensibilità.....	106
6.3	Estrazione del DNA.....	109
	Analisi spettrofotometrica.....	110
6.4	PCRs, <i>Polimerase Chain Reactions</i>	112
	Amplificazione <i>16S rDNA/RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism)</i>	112

	<i>Two-steps multiplex PCRs:16S-ITS-23S</i> e regione fiancheggiante la <i>23S rDNA</i>	119
	Amplificazione gene <i>tuf</i>	125
	Amplificazione QRDR in <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	127
	Sequenziamento	129
7	Risultati	130
	Identificazione molecolare delle specie di lattobacilli.....	130
	Determinazione dei profili di sensibilità antibiotica.....	133
	Analisi delle sequenze <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	139
8	Discussione	141
	Bibliografia	146
	Riferimenti testuali.....	146
	Riferimenti immagini	175

1 Il genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* comprende microrganismi Gram positivi, catalasi negativi, pleomorfi, con forma che può variare da bastoncellare a cocco-bacillare o corineforme; sono anaerobi facoltativi o generalmente microaerofili, quasi sempre immobili (1) (2) (3) (figura 1-1).

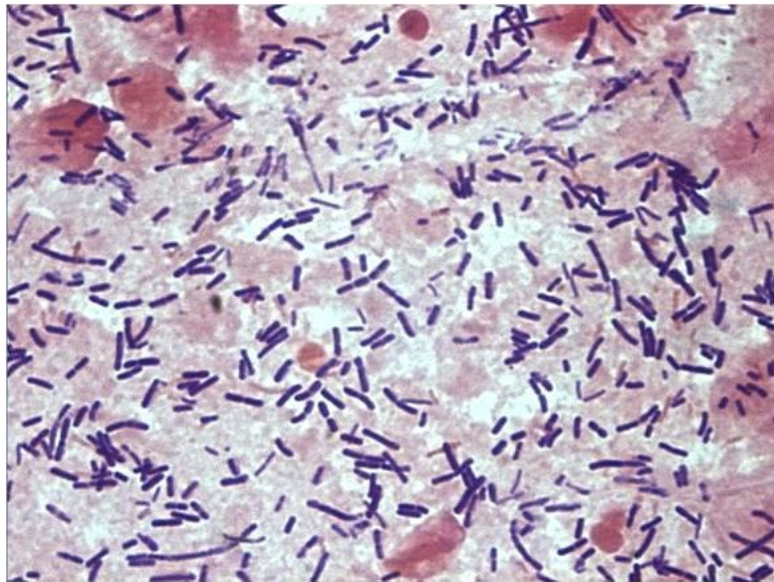


Figura 1-1. Lattobacilli in dopo colorazione Gram

1.1 Morfologia cellulare

Il grado di curvatura e la lunghezza dei bastoncelli dipendono dall'età della coltura, dalla composizione del mezzo (disponibilità degli esteri dell'acido oleico) e dalla tensione d'ossigeno. Alcune specie di lattobacilli gas-produttori (*L. fermentum*, *L. brevis*) si presentano allo stesso tempo come bastoncelli lunghi e corti. Le differenze morfologiche tra le specie rimangono comunque evidenti e discriminanti; nel caso dei lattobacilli di forma cocco-bacillare, questi possono presentarsi tanto corti da essere considerati, erroneamente, appartenenti al genere *Leuconostoc* (ad esempio *L. confusus*, considerato originariamente come specie del genere *Leuconostoc*) o al genere *Streptococcus* (ad esempio *L. xylosus* e *L. hordniae*, inizialmente classificati come lattobacilli e solo recentemente riclassificati come streptococchi).

I lattobacilli tendono a disporsi in catene: tale caratteristica è variabile tra le specie; talvolta da ceppo a ceppo della stessa specie. Essa dipende dalla fase di crescita del batterio e dal pH del mezzo.

Lo sviluppo asimmetrico dei “lattobacilli corineformi” durante la divisione cellulare porta alla formazione di catene corrugate o persino di anelli. Nel caso di crescita simbiotica (nei grani di kefir

o in regime di alte concentrazioni di glicina, amminoacidi o antibiotici attivi sulla parete cellulare), si possono osservare forme avvolte in maniera irregolare (1).

La motilità nei lattobacilli è una caratteristica molto rara e, se presente, dovuta alla presenza di flagelli peritrichi, in stipiti non sporigeni. La sporulazione è un fenomeno osservato solo in alcune specie ed è dipendente da parametri colturali (componenti del mezzo ed età della coltura). Può essere osservata durante l'isolamento, mentre viene persa durante i successivi trapianti nei terreni artificiali.

Alcuni ceppi mostrano corpi bipolari, granulazione interna o appaiono a strisce dopo colorazione di Gram o con blu di metilene, specialmente i bastoncelli di specie omofermentanti. Le larghe strutture bipolari probabilmente contengono polifosfati e appaiono molto elettrondense al microscopio elettronico (1).

1.2 Metabolismo

I lattobacilli sono microrganismi saccarolitici obbligati e almeno la metà del prodotto finale utilizzato del carbonio è lattato; prodotti addizionali possono essere acetato, etanolo, anidride carbonica, formiato o succinato. Non vengono prodotti acidi volatili con più di due atomi di carbonio.

La riduzione del nitrato è inusuale e presente solo quando il pH terminale viene aumentato a circa 6.0. La gelatina non viene liquefatta e la caseina non viene digerita, ma vengono prodotte piccole quantità di azoto solubile dalla maggior parte dei ceppi. Non sono prodotti indolo e acido solfidrico. In generale i lattobacilli sono catalasi negativi e non hanno i citocromi (porfirine assenti); tuttavia, alcuni ceppi possono decomporre il perossido attraverso una pseudo-catalasi; sono negativi alla reazione con benzidina. La produzione di pigmenti è rara e, se presente, si tratta di colorazioni giallo, arancio-ruggine o rosso-mattone.

In base alla presenza o all'assenza degli enzimi responsabili della omofermentazione o eterofermentazione degli zuccheri, cioè la fruttosio-1,6-difosfato aldolasi e la fosfochetolasi, le specie

appartenenti al genere *Lactobacillus* sono divise in tre gruppi metabolici (Kandler e Weiss 1986; Vandamme et al., 1996):

- Lattobacilli omofermentanti obbligati: appartengono a questo gruppo specie che fermentano i carboidrati esosi producendo quasi esclusivamente acido lattico attraverso la via glicolitica di Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e che non sono in grado di fermentare i pentosi e il gluconato. Da un punto di vista morfologico, si presentano generalmente come cellule lunghe, isolate o disposte in catene molto lunghe o spiralizzate. Le specie del gruppo vivono in habitat diversi e sono filogeneticamente poco correlate. Il gruppo inoltre comprende le specie più acidificanti (2,7% di acido lattico) e può essere suddiviso in due sottogruppi: gli omofermentanti psicrofili che crescono a bassa temperatura (~15°C) e gli omofermentanti termofili che crescono ad alta temperatura (~45°C).
- Lattobacilli eterofermentanti facoltativi: le specie del gruppo fermentano gli esosi attraverso la via di EMP e producono quasi esclusivamente acido lattico o, in presenza di scarse quantità di glucosio, lattato, acetato, etanolo o acido formico; sono in grado di fermentare i pentosi a lattato ed acetato per

mezzo di una fosfochetolasi inducibile dalla presenza di pentosi.

I lattobacilli eterofermentanti facoltativi si caratterizzano, ad eccezione di qualche specie, per la loro mesofilia e sono, solitamente, formati da cellule corte, talvolta tozze o curvate, disposte il più delle volte in catene anche molto lunghe. Essi, inoltre, hanno come habitat preferenziale alimenti quali vegetali e carni fermentate.

- Lattobacilli eterofermentanti obbligati: le specie appartenenti a questo gruppo fermentano gli esosi a lattato, acetato (o etanolo) e anidride carbonica attraverso la via metabolica del fosfogluconato, mentre i pentosi sono fermentati, sempre mediante l'intervento dell'enzima fosfochetolasi, a lattato e acetato. I lattobacilli eterofermentanti stretti si contraddistinguono per la loro capacità di produrre sostanze aromatiche volatili e per il loro scarso potere acidificante (0,5% acido lattico). In genere sono formati da cellule molto corte, dritte e generalmente isolate; tendono a svilupparsi in associazione con altre specie di batteri lattici o di altri microrganismi, sia in alimenti fermentati che nel tratto digerente (1) (3) (4) (5).

1.3 Esigenze nutrizionali e caratteristiche colturali

La maggior parte delle specie dei lattobacilli è, da un punto di vista nutrizionale, molto esigente, con peculiari caratteristiche attribuibili alle differenti specie. Essi necessitano, per la crescita, di substrati complessi contenenti fonti di carbonio e azoto; inoltre necessitano di composti fosforati e solforati, fattori di crescita, vitamine, amminoacidi ed oligoelementi. La crescita ottimale avviene su terreni di coltura contenenti carboidrati fermentabili, peptoni, estratto di carne ed estratto di lievito; inoltre, il succo di pomodoro, l'acetato, gli esteri dell'acido oleico ed elementi come il manganese, sono considerati stimolatori della crescita e spesso essenziali per alcune specie. Comunque, tutte queste sostanze sono contenute nei comuni terreni di coltura utilizzati, come il terreno MRS (*De Man, Rogosa, Sharpe*). L'acido pantotenico e l'acido nicotinico sono essenziali per tutte le specie, mentre la tiamina è necessaria per la crescita dei lattobacilli eterofermentanti. Anche la riboflavina è un composto necessario a molte specie, mentre la biotina e la vitamina B12 sono utilizzati solo da alcune.

I lattobacilli crescono bene in terreni debolmente acidi con un pH iniziale di 6.4-4.5; la crescita cessa quando si raggiunge il pH 4.0-3.6, condizione variabile tra le specie e tra i singoli ceppi. Essendo acidofili, il pH ottimale è generalmente 5.5-6.2; la velocità di crescita è spesso ridotta in ambiente neutro o inizialmente alcalino. Molti ceppi sono debolmente aerotolleranti e la crescita ottimale avviene in condizioni di microaerofilia o di anaerobiosi; l'incremento della concentrazione di anidride carbonica (5%) può stimolare la crescita. La temperatura di crescita varia da 2 a 53°C e l'optimum è generalmente compreso tra 30°C-40°C.

Le colonie si presentano molto piccole (diametro di 2-5mm) su terreno solido, con margini ben definiti, convesse, lisce, traslucide od opache, pigmentate in giallo o rosso, in rari casi.

Quando la crescita avviene su agar contenente proteine disperse o grassi, non si osservano zone chiare generate da esoenzimi. Tuttavia, molti ceppi mostrano una debole attività proteolitica, garantita da proteasi e peptidasi rilasciate dalla parete cellulare, e debole attività lipolitica, svolta prevalentemente da lipasi intracellulari.

La crescita in terreno liquido avviene generalmente in sospensione e, una volta terminata, le cellule precipitano; il sedimento risulta

liscio e omogeneo, raramente granulare o gelatinoso. I lattobacilli non sviluppano odori caratteristici quando crescono nei comuni terreni di coltura impiegati (1).

1.4 Habitat

I lattobacilli colonizzano alcuni specifici distretti dell'organismo umano: in queste sedi svolgono delle specifiche funzioni.

Apparato gastro-intestinale

I lattobacilli fanno parte del microbiota normale della bocca e dell'intestino di individui sani e di animali, in quantità variabili a seconda della specie, dell'età dell'ospite e della zona dell'apparato G.I. considerata (6). È difficile distinguere i lattobacilli autoctoni da quelli alloctoni, per esempio quelli provenienti da cibi fermentati o dalla cavità orale, la quale alberga quantità considerevoli di lattobacilli (7).

I lattobacilli formano solo in piccola parte il microbiota fecale dell'individuo adulto (0,01%-0,6% dei batteri totali) (8) (9). *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* ed *L. ruminis* sono considerati i lattobacilli autoctoni prevalenti. *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L.*

brevis, *L. delbrueckii*, *L. curvatus* ed *L. sakei* possono trovarsi nell'apparato G.I. in quantità fluttuanti (7).

In paragone al microbiota dell'adulto, quello presente negli infanti è assai instabile e contiene lattobacilli in quantità variabili. Il numero di cellule di lattobacilli nei neonati varia da 10^5 CFU/g di feci a 10^6 CFU/g, mentre nei nati ad un mese di vita o più, tale intervallo cresce fino ad 10^6 - 10^8 CFU/g di feci (10).

La presenza dei lattobacilli come microbiota indigeno è garantita dalla loro capacità di aderire alle mucose degli organi colonizzati. Nel caso di *L. plantarum*, è un'adesina legante il mannosio a garantire tale colonizzazione (11).

I lattobacilli compaiono nel cavo orale durante il primo anno di vita neonatale. La loro presenza dipende da numerosi fattori tra i quali l'esistenza di nicchie ecologiche, ad esempio le cavità naturali dei denti. In molti casi i lattobacilli possono svolgere un ruolo benefico, inibendo la proliferazione di batteri cariogeni. Ahumada et al. (12) hanno dimostrato che il 36% dei lattobacilli isolati dalla lingua sono in grado di impedire la crescita di *S. mutans*. Gli omofermentanti producono un maggior numero di sostanze inibenti, rispetto a quelli appartenenti al gruppo degli eterofermentanti.

Molti autori hanno studiato il ruolo dei lattobacilli come probiotici per la salute orale. D'accordo con Busscher et al. (13), *L. acidophilus* e *L. casei*, presenti nello yogurt, possono colonizzare la cavità orale in quanto capaci di aderire allo smalto dei denti. L'uso continuato, per almeno una settimana, dello stesso yogurt, comporta la rimozione degli altri lattobacilli dalla placca dentale e dalla saliva (14).

Microbiota vaginale

A differenza del tratto G. I., i lattobacilli costituiscono il microbiota predominante del tratto genitale femminile. Il ruolo dei lattobacilli in questo distretto è importante a causa dell'azione amensalistica nei confronti dei microrganismi patogeni (15) (16).

Il microbiota di una donna in salute è generalmente costituito da microrganismi aerobi ed anaerobi. I lattobacilli rappresentano la maggior componente del microbiota vaginale nelle donne sane non ancora in menopausa. I loro prodotti metabolici, come il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'acido lattico, le batteriocine, giocano un ruolo importante nel mantenimento del microbiota normale vaginale inibendo la colonizzazione di batteri patogeni. Le specie predominanti rilevate da studi di biologia molecolare sono *L. crispatus*, *L. jensenii* ed *L. gasseri* (15) (16). In studi recenti, *L.*

iners (L. 1086V) descritto da Antonio e coll. (17), è stato identificato tra le specie colonizzanti la vagina umana (16) (18) (19) (20) (21).

Il basso pH vaginale è uno dei primi meccanismi di controllo della composizione del microbiota.

Gli elevati livelli di estrogeni presenti durante l'età riproduttiva provocano il deposito di grosse quantità di glicogeno sull'epitelio vaginale (22), che può essere perciò metabolizzato dal microbiota vaginale in acidi organici (23). Dal momento che il pH vaginale nella donna in età riproduttiva si aggira intorno a 3.5/4.5, si ritiene che queste peculiari condizioni consentano la sopravvivenza di specie microbiche acidofile, quali i lattobacilli. L'acido lattico e gli altri acidi prodotti dai lattobacilli inibiscono la proliferazione di microrganismi patogeni come *E. coli*, *C. albicans*, *G. vaginalis*.

Il perossido di idrogeno è tossico per batteri, funghi, virus, etc. (24).

1.5 Effetti benefici dei lattobacilli

È stato dimostrato che i lattobacilli esercitano effetti benefici per la salute dell'ospite. I migliori risultati sono stati ottenuti nel trattamento e nella prevenzione di infezioni enteriche e nelle sindromi post-antibiotiche. Alcuni lattobacilli sono capaci di ridurre la diarrea associata a *Clostridium difficile* (25) e prevenire le enterocoliti necrotizzanti nei nati pretermine (26).

Il tratto G.I. è sicuramente il distretto dove si ritiene che i lattobacilli esercitino i maggiori effetti benefici sulla salute dell'ospite; cionondimeno, applicazioni probiotiche di alcune specie, in altri distretti, sembrano essere promettenti, ad esempio, nella prevenzione e nel trattamento di infezioni urogenitali e della vaginosi batterica (27), nella prevenzione di malattie atopiche, nelle ipersensibilità alimentari (28) e nella prevenzione della carie dentale (29). I lattobacilli probiotici posseggono lo *status* di microrganismi GRAS (*Generally Regarded as Safe*) e generalmente sono ben tollerati. Raramente sono stati registrati casi di infezioni causate da probiotici, presumibilmente in individui immunocompromessi o in pazienti affetti da gravi malattie (30) (31).

Meccanismi generali dell'azione probiotica dei lattobacilli

I meccanismi attraverso cui i probiotici espletano gli effetti benefici sull'ospite sono di seguito elencati (figura 1-2) (32) (33):

- i. inibizione dei patogeni e ripristino dell'omeostasi batterica attraverso interazione microbo-microbo;
- ii. interazioni benefiche con l'epitelio del tratto G.I.;
- iii. modulazione della risposte immunitaria.

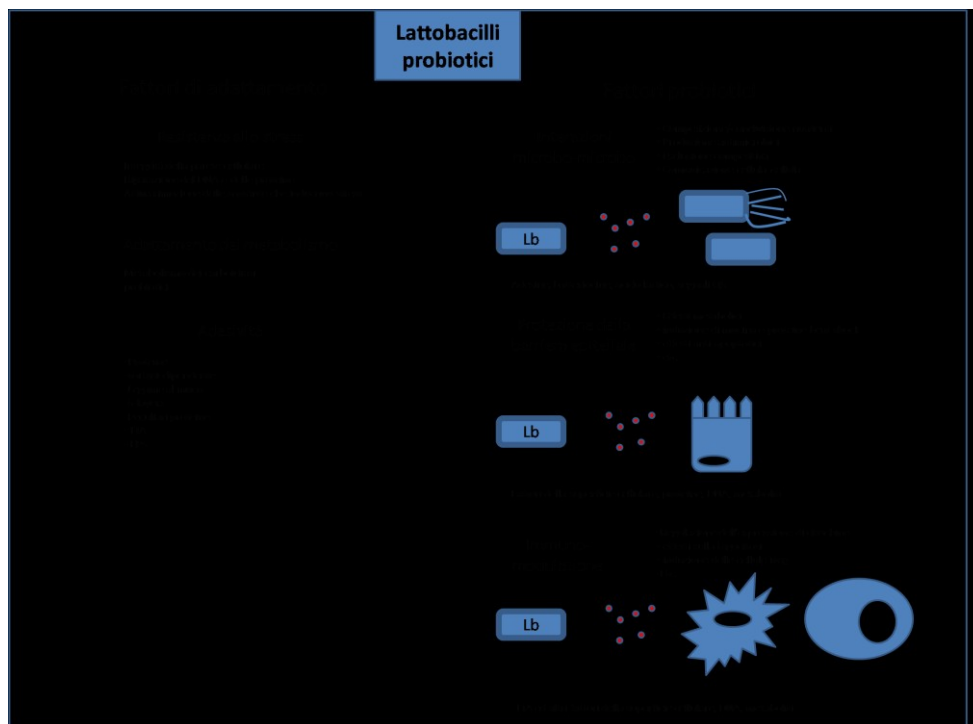


Figura 1-2. Visione meccanicistica dell'azione probiotica dei lattobacilli Studi molecolari sui probiotici sono stati focalizzati sui lattobacilli allo scopo di identificare i fattori che promuovono la sopravvivenza, come conseguenza dell'adattamento, e la colonizzazione dell'ospite (fattori di adattamento) e i fattori che promuovono direttamente i benefici per la salute (fattori probiotici)

Inibizione dei patogeni e ripristino dell'omeostasi batterica attraverso interazione microbo-microbo

La capacità dei lattobacilli di inibire microrganismi patogeni è ben conosciuta da tempo, dato che essi sono stati nei secoli utilizzati per la preservazione degli alimenti. I lattobacilli probiotici, infatti, competono per i nutrienti e producono composti ad attività antimicrobica (acido lattico, batteriocine e perossido d'idrogeno).

Per esempio, l'attività antimicrobica di *L. rhamnosus* GG contro *S. enterica* sierotipo *typhimurium* è dovuta principalmente all'accumulo di acido lattico che ne influenza la crescita e l'espressione dei fattori di virulenza. Inoltre, esso aumenta la permeabilità della membrana esterna dei batteri Gram negativi e complessa elementi inorganici come il ferro, essenziale per la crescita (6).

Le batteriocine sono peptidi antimicrobici generalmente attivi nei confronti di batteri strettamente correlati, che colonizzano la stessa nicchia ecologica. La maggior parte di esse ha piccole dimensioni, è resistente al calore e presenta un punto isoelettrico elevato (batteriocine di classe II); le batteriocine agiscono inducendo la permeabilità di membrana con la conseguente perdita di molecole dai batteri *target* (34).

Recentemente, Pridmore e coll. (35) hanno descritto il ruolo del perossido d'idrogeno nell'attività *in vitro* anti-*Salmonella* di *L. johnsonii* NCC533. Questo ceppo produce H₂O₂ (a concentrazione millimolare) quando cresce presenza di ossigeno. I meccanismi genetici non sono chiari.

Ci sono evidenze sperimentali sull'esclusione competitiva nei confronti di patogeni intestinali, come *E. coli* (6). Sembra infatti che i probiotici utilizzino lo stesso sito recettoriale oligosaccaridico di *E. coli* (con fimbrie di tipo 1) sulla mucosa del tratto G.I. dell'ospite (36).

Dato il numero elevato di specie e il livello di diversità microbica presente nel tratto G.I., è stato ipotizzato che i membri di questa comunità microbica debbano, in qualche modo, comunicare tra loro, per coordinare i processi di adattamento all'ospite che includono la competizione e la condivisione dei nutrienti, e l'adesione ai siti di legame (37). Il QS (*Quorum sensing*) è un meccanismo di "signaling" cellula-cellula attraverso cui i batteri producono e/o rispondono a segnali chimici chiamati autoinduttori. Il QS è stato ben studiato nei lattobacilli a proposito della produzione di batteriocine (6).

Interazioni benefiche con l'epitelio del tratto G.I.

Le cellule dell'epitelio intestinale sono il *target* più importante dell'azione benefica dei probiotici.

Le interazioni metaboliche tra i lattobacilli e l'ospite possono modulare la funzione nutritiva dell'epitelio. Martin e coll. (38) hanno osservato che l'esposizione a *L. paracasei* NCC2461 o a *L. rhamnosus* NCC4007, in un microbioma umanizzato di topo, ha modificato il microbiota residente, e alterato il metabolismo lipidico epatico, abbassando la concentrazione delle lipoproteine plasmatiche, aumentando i trigliceridi, e stimolando apparentemente la glicolisi. Inoltre sono stati osservati cambiamenti nelle vie metaboliche che riguardano il metabolismo degli amminoacidi, delle metilammine, e degli acidi grassi a corta catena come il butirrato. Il butirrato è una fonte di energia per le cellule epiteliali della mucosa del colon; esso sembra, inoltre, importante nel mantenimento della sua integrità. È stato ipotizzato che parte di questi effetti siano dovuti alla capacità dei lattobacilli di metabolizzare gli acidi biliari, la cui funzione primaria è quella di emulsionare i grassi; per tale ragione, i probiotici sembrano influenzare l'assorbimento corporeo dei grassi (6).

I lattobacilli preservano la funzione-barriera dell'epitelio mediante una serie di meccanismi quali l'induzione della secrezione di mucina, l'*up-regulation* di proteine citoprotettive e la prevenzione dell'apoptosi delle cellule epiteliali (6).

Molti studi hanno dimostrato che il contatto diretto tra i lattobacilli e le cellule epiteliali è necessario affinché gli effetti benefici possano verificarsi nell'ospite, identificando importanti componenti della superficie cellulare dei lattobacilli come responsabili dell'interazione batterio-epitelio. Tra questi: l'acido lipoteicoico, componente idrofobico principale della parete cellulare, gli esopolisaccaridi (EPS, *extracellular polysaccharide substances*), altre proteine di superficie, come le SDPs (*Small Disulphide-rich Proteins*).

Gli esopolisaccaridi, allo stesso modo dell'acido lipoteicoico, hanno un ruolo importante nelle interazioni non specifiche dei lattobacilli sulle superfici biotiche o abiotiche, determinando le proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare. In *L. johnsonii* NCC533, la delezione del cluster genico che codifica EPS, prolunga lievemente la persistenza nel tratto G.I. del mutante *knockout*, se comparato al tempo di persistenza del ceppo parentale di controllo. Anche in *L. acidophilus* CRL639, gli esopolisaccaridi mediano

negativamente il legame alle matrici extracellulari (39). Gli esopolisaccaridi sembrano svolgere un ruolo più specifico nella formazione di microcolonie e del biofilm, sia in *L. plantarum* WCFS1, sia in *L. rhamnosus* GG (6).

Molte specifiche interazioni tra i lattobacilli e le cellule ospiti, sono mediate dalle SDPs, le quali presentano una tipica struttura modulare, che comprende un peptide segnale N-terminale ed un motivo LPXTG C-terminale. Inoltre, altre proteine di superficie sono coinvolte in specifici meccanismi di adesione alle cellule ospiti, come ad esempio un'adesina legante il mannosio in *L. plantarum* WCFS1, una proteina legante il muco (codificata dal gene *mub*) in *L. reuteri* ATCC 53608, etc. (6).

Modulazione della risposte immunitaria

Le cellule dell'epitelio intestinale partecipano attivamente alla risposta immunitaria mucosale, assieme alle cellule dendritiche e ai macrofagi. Le difese innate comprendono la produzione di composti antimicrobici (defensine, ossido nitrico), e la secrezione di chemochine come IL-8. La modulazione della risposta immunitaria mediata dalle cellule dendritiche e l'induzione delle cellule T sono i possibili meccanismi dell'azione immunomodulante dei probiotici.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi probiotici è estremamente importante e si pone due obiettivi principali:

- a. definire le migliori condizioni che determinano le “performance” ottimali dei ceppi probiotici;
- b. selezionare nuovi ceppi probiotici mediante criteri molecolari ben definiti.

Ci sono due principali categorie di fattori che contribuiscono ad ottimizzare l'attività probiotica dei lattobacilli: fattori che favoriscono l'adattamento ottimale alle nicchie ecologiche che il batterio incontra temporaneamente nell'ospite (*adaptation factors*) e fattori che contribuiscono direttamente alla promozione degli effetti benefici (fattori probiotici) (figura 1-2). I fattori probiotici includono i tre principali meccanismi dell'attività probiotica: il mantenimento dell'equilibrio microbico, la protezione epiteliale e l'immunomodulazione. I fattori di adattamento includono la resistenza allo stress, l'adattamento del metabolismo all'ambiente ospite e l'adesione alla mucosa intestinale (6).

2 Tassonomia

La tassonomia può essere definita come il processo capace di “classificare” la biodiversità, lo studio scientifico che ha come obiettivo finale la caratterizzazione ordinata dei microrganismi, e degli organismi in genere (40). Poiché i microrganismi hanno strutture cellulari semplici e un patrimonio genetico piuttosto ristretto se comparato a quello degli organismi più evoluti, i progressi nella tassonomia batterica sono stati sempre dipendenti da quelli tecnologici: la moderna tassonomia è costruita principalmente su dati molecolari. Lo studio completo sull'identificazione di un microrganismo è imprescindibile dalle metodiche d'analisi utilizzate. Per tale ragione, la corretta collocazione tassonomica può essere estrapolata solo dallo studio comparato di un vasto numero di tecniche, molecolari e non: l'approccio polifasico.

L'approccio filogenetico ha rivoluzionato gli studi sistematici sui batteri. Le relazioni filogenetiche tra i microrganismi possono essere efficacemente stimate mediante la comparazione di sequenze molecolari, quali quelle dei geni codificanti per la 16S rRNA. Ciò è basato su diverse asserzioni: i geni *16S rRNA* sono altamente

conservati, poichè i ribosomi rivestono un ruolo fondamentale nella biosintesi proteica fin dagli stadi più antichi dell'evoluzione dei microrganismi; fenomeni di trasferimento genico orizzontale tra i microrganismi non hanno mai interessato tali geni; nonostante rappresentino molecole ancestrali, sono abbastanza variabili da differenziare i microrganismi, rappresentando la loro varianza genomica. In generale l'analisi molecolare della 16S rRNA ha permesso di disegnare lo scenario evuzionistico dei batteri, anche se altri *target* molecolari, quali RecA e fattore di elongazione Tu, possono essere utilizzati in parallelo negli studi di tassonomia e filogenia batterici (41).

2.1 Classificazione

In accordo alla *Taxonomy outline of Prokaryotes*, il genere *Lactobacillus* appartiene al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordine *Lactobacillales*, famiglia *Lactobacillaceae*.

NCBI taxonomy database riconosce oggi 148 specie appartenenti al genere *Lactobacillus* che rappresenta, pertanto, il più numeroso dell'ordine *Lactobacillales* (42).

Recentemente è stata descritta una nuova specie, *Lactobacillus tuceti* (43) e di ultima introduzione nella classificazione sono le

specie *L. composti*, *L. farraginis*, *L. parafarraginis* (44) (45) e *L. secaliphilus* (46), che si aggiungono alle specie descritte da Dellaglio e collaboratori (41).

Solo sette specie del genere *Lactobacillus* descritte da Dellaglio e coll. comprendono due o più sottospecie: *Lactobacillus aviarius* (*L. aviarius* subsp. *aviarius* e *L. aviarius* subsp. *araffinosus*), *Lactobacillus coryniformis* (*L. coryniformis* subsp. *coryniformis* e *L. coryniformis* subsp. *torquens*), *Lactobacillus delbrueckii* (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *indicus*, e *L. delbrueckii* subsp. *lactis*), *Lactobacillus kefiranofaciens* (*L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* e *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*), *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. paracasei* subsp. *tolerans*), *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum* subsp. *plantarum* e *L. plantarum* subsp. *argenteratensis*), e *Lactobacillus sakei* (*L. sakei* subsp. *sakei* e *L. sakei* subsp. *carnosus*).

La struttura filogenetica della famiglia *Lactobacillaceae* considera *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* come gruppi limite.

La prima analisi filogenetica dei lattobacilli è stata effettuata da Collins e coll. nel 1991, su un piccolo numero di specie conosciute a quel tempo: essi proposero di dividere il genere *Lactobacillus* in 3 gruppi: il gruppo *L. delbrueckii*, il gruppo *L. casei-Pediococcus* e il gruppo *Leuconostoc*, che conteneva qualche lattobacillo.

Nel 1995 Schleifer e Ludwig confermarono le scoperte dei loro predecessori ed al gruppo *L. delbrueckii* attribuirono il nome di gruppo *L. acidophilus*. Inoltre, questi autori notarono che il gruppo *L. casei-Pediococcus* poteva essere suddiviso in quattro subcluster.

Nel primo gruppo la percentuale di omologia della 16S rDNA varia dal 90,8% al 99,3%. Esso comprende *L. delbrueckii* (G+C=50%) con le tre sottospecie (*L. delbrueckii subsp. lactis*, che include le due vecchie specie *L. lactis* e *L. leichmannii*; *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* e *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) e le specie del gruppo individuato da Collins, quali *L. acidophilus* (G+C=34-37%), *L. amylovorus* (G+C=40-41%), *L. crispatus* (G+C=33-35%), *L. gallinarum* (G+C=36-37%), *L. gasseri* (G+C=33-35%) e *L. johnsonii* (G+C=35-38%) (47).

La descrizione recente di un largo numero di specie e la conseguente revisione filogenetica del genere ha permesso la riorganizzazione di questi gruppi in altri più piccoli e flessibili.

Questa strategia del “gruppaggio” è stata adottata da Hammes ed Hertel (2003) e da Dellaglio e Felis nel 2005 (tabella 2-1).

Tabella 2-1. Raggruppamento filogenetico (41)

Gruppi (abbreviazioni)	<i>Hammes and Hertel (2003)</i>	<i>Dellaglio and Felis (2005)</i>	<i>Felis and Dellaglio (45)</i>
<i>L. delbrueckii</i> group (delb)	<i>L. acetotolerans, L. acidophilus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. amylovorus, L. crispatus, L. delbrueckii, L. formicalis, L. gallinarum, L. gasseri, L. hamsteri, L. helveticus, L. iners, L. intestinalis, L. jensenii, L. johnsonii, L. kefiranofaciens, L. kefirgranum, L. psittaci</i>	<i>L. acetotolerans, L. acidophilus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. amylovorus, L. crispatus, L. delbrueckii, L. formicalis, L. gallinarum, L. gasseri, L. hamsteri, L. helveticus, L. iners, L. intestinalis, L. jensenii, L. johnsonii, L. kalixensis, L. kefiranofaciens, L. kefirgranum, L. kitasatonis, L. psittaci, L. suntoryeus, L. ultunensis</i>	<i>L. acetotolerans, L. acidophilus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. amylovorus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. amylovorus, L. crispatus, L. delbrueckii, L. formicalis, L. gallinarum, L. gasseri, L. hamsteri, L. helveticus, L. iners, L. intestinalis, L. jensenii, L. johnsonii, L. kalixensis, L. kefiranofaciens, L. kefirgranum, L. kitasatonis, L. psittaci, L. sobrius, L. ultunensis</i>
<i>L. salivarius</i> group	<i>L. acidipiscis, L. agilis, L. algidus, L. animalis, L. aviarius, L. cypricasei, L. equi, L. mali, L. murinus, L. nagelii, L. ruminis, L. salivarius</i>	<i>L. acidipiscis, L. agilis, L. algidus, L. animalis, L. aviarius, L. cypricasei, L. equi, L. mali, L. murinus, L. nagelii, L. ruminis, L. saerimneri, L. salivarius, L. satsumensis</i>	<i>L. acidipiscis, L. agilis, L. algidus*, L. animalis, L. apodemi, L. aviarius, L. equi, L. mali, L. murinus, L. nageli, L. ruminis, L. saerimneri, L. salivarius, L. satsumensis, L. vini</i>
<i>L. reuteri</i> group (reu)	<i>L. coleohominis, L. durianis, L. fermentum, L. frumenti, L. ingluviei, L. mucosae, L. oris, L. panis, L. pontis, L. reuteri, L. suebicus, L. thermotolerans, L. vaccinoferus, L. vaginalis</i>	<i>L. antri, L. coleohominis, L. fermentum, L. frumenti, L. gastricus, L. ingluviei, L. mucosae, L. oris, L. panis, L. pontis, L. reuteri, L. thermotolerans, L. vaginalis (L. reuteri group-a) associated with L. durianis, L. vaccinoferus, L. suebicus, L. rossii (L. reuteri group-b)</i>	<i>L. antri, L. coleohominis, L. fermentum, L. frumenti, L. gastricus, L. ingluviei, L. mucosae, L. oris, L. panis, L. pontis, L. reuteri, L. secaliphilus, L. vaginalis</i>
<i>L. buchneri</i> group (buch)	<i>L. buchneri, L. diolivorans, L. ferintoshensis, L. fructivorans, L. hilgardii, L. homohiochii, L. kefiri, L. kunkei, L. lindneri, L. parabuchneri, L. parakefiri, L. sanfranciscensis</i>	<i>L. buchneri, L. diolivorans, L. ferintoshensis, L. hilgardii, L. kefiri, L. parabuchneri, L. parakefiri (L. buchneri group-a) associated with L. fructivorans, L. homohiochii, L. lindneri, L. sanfranciscensis (L. buchneri group-b)</i>	<i>L. buchneri, L. diolivorans, L. farraginis, L. hilgardii, L. kefiri, L. parabuchneri, L. parafarraginis, L. parakefiri associated with L. acidifarinae, L. namurensis, L. spicheri, and L. zymae (which form a robust group)</i>
<i>L. alimentarius-L. farciminis</i> group (al-far)	/	/	<i>L. alimentarius, L. farciminis, L. kimchii, L. mindensis, L. nantensis, L. paralimentarius, L. tuceti, L. versmoldensis</i>

<i>L. casei</i> group (cas)	<i>L. casei</i> , <i>L. manihotivorans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>L. zeae</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. zeae</i> (<i>L. casei</i> group-a) <i>L. manihotivorans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. sharpeae</i> (<i>L. casei</i> group-b) appear as distinct clusters, not robustly associated with each other	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. Zeae</i>
<i>L. sakei</i> group (sakei)	<i>L. curvatus</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. Sakei</i>
<i>L. fructivorans</i> group (fru)	/	/	<i>L. fructivorans</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. lindneri</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>
<i>L. coryniformis</i> group (cor)	/	/	<i>L. bifermentans</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. rennini</i> , not robustly associated with <i>L. composti</i>
<i>L. plantarum</i> group (plan)	<i>L. alimentarius</i> , <i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. versmoldensis</i>	<i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> (<i>L. plantarum</i> group-a) associated with <i>L. kimchii</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. versmoldensis</i> (<i>L. plantarum</i> group-b) the affiliation of <i>L. collinoides</i> was poorly supported	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i>
<i>L. perolens</i> group (per)	/	/	<i>L. perolens</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. paracollinoides</i>
<i>L. brevis</i> group (bre)	/	<i>L. acidifarinae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. zymae</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. parabrevis</i>
<i>Pediococcus dextrinicus</i> group (Pdex)			<i>P. dextrinicus</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. oligofermentans</i> (the latter sometimes poorly supported)
<i>Pediococcus</i>	Not reported	1 single cluster (not including <i>P. dextrinicus</i>)	2 clusters, not associated: the first comprises <i>P. cellicola</i> , <i>P. damnosus</i> <i>P. parvulus</i> , <i>P. inopinatus</i> , while the second includes <i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. pentosaceus</i> and <i>P. stilesii</i>
Couples (couple)			<i>L. rossiae</i> - <i>L. siliginis</i> (1) <i>L. vaccinostercus</i> - <i>L. suebicus</i> (2) <i>L. manihotivorans</i> - <i>L. collinoides</i> (3)
Single species (ss)	<i>L. bifermentans</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. coryniformis</i> and <i>L. perolens</i>	<i>L. algidus</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. perolens</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i>	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i>

Tabella2-1. Continua

La maggiore discrepanza nella tassonomia del genere *Lactobacillus* è la mancata possibilità di una correlazione tra la posizione filogenetica e le proprietà metaboliche delle specie (tabella 2-2). La suddivisione storica del genere *Lactobacillus* basata sul tipo di fermentazione è stata eccellentemente rivisitata da Pot e coll. (1994), i quali hanno sottolineato che i termini “omofermentante”, “eterofermentante”, “omofermentante obbligato”, “eterofermentante facoltativo” ed “eterofermentante obbligato” potessero assumere diversi significati a secondo degli autori, generando dei fraintendimenti. La definizione più recente accettata è quella data da Hammes e Vogel (1995) come descritta in precedenza (cfr. 1.2) (41).

Tabella 2-2. Alcune caratteristiche tassonomiche delle specie appartenenti al genere *Lactobacillus* (41)

Specie	Metabolismo	Gruppo filogenetico	contenuto GC (%)
<i>L. fuchuensis</i> (Sakala et al. 2002)	B	sakei	41-42
<i>L. gallinarum</i> (Fujisawa et al. 1992)	A	delb	36-37
<i>L. gasseri</i> (Lauer and Kandler 1980)	A	delb	33-35
<i>L. gastricus</i> (Roos et al., 2005)	C	reu	41-42
<i>L. graminis</i> (Beck et al. 1989)	B	sakei	41-43
<i>L. hammesii</i> (Valcheva et al. 2005)	B	bre	nd
<i>L. hamsteri</i> (Mitsuoka and Fujisawa 1988)	B	delb	33-35
<i>L. harbinensis</i> (Miyamoto et al. 2006)	B	per	53-54
<i>L. helveticus</i> (Orla-Jensen 1919) (Bergey et al. 1925)	A	delb	38-40
<i>L. hilgardii</i> (Douglas and Cruess 1936)	C	buch	39-41
<i>L. homohiochii</i> (Kitahara et al. 1957)	B	fru	35-38
<i>L. iners</i> (Falsen et al. 1999)	A	delb	34-35
<i>L. ingluviei</i> (Baele et al. 2003)	C	reu	49-50
<i>L. intestinalis</i> (ex Hemme 1974) (Fujisawa et al. 1990)	B	delb	33-35
<i>L. jensenii</i> (Gasser et al. 1970)	B	delb	35-37
<i>L. johnsonii</i> (Fujisawa et al. 1992)	A	delb	33-35
<i>L. kalixensis</i> (Roos et al., 2005)	A	delb	35-36
<i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (Fujisawa et al. 1988)	A	delb	34-38
<i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> (Takizawa et al. 1994) (Vancanneyt et al. 2004)	A	delb	34-38
<i>L. kefiri</i> (Kandler and Kunath 1983)	C	buch	41-42
<i>L. kimchii</i> (Yoon et al. 2000)	B	al-far	35
<i>L. kitasatonis</i> (Mukai et al. 2003)	B	delb	37-40
<i>L. kunkeei</i> (Edwards et al. 1998)	C	ss	nd
<i>L. lindneri</i> (Back et al. 1997)	C	fru	35
<i>L. malefermentans</i> (Farrow et al. 1989)	C	ss	41-42
<i>L. mali</i> (Carr and Davies 1970, emend. Kaneuchi et al., 1998)	A	sal	32-34
<i>L. manihotivorans</i> (Morlon-Guyot et al. 1998)	A	coppia3	48-49
<i>L. mindensis</i> (Ehrmann et al. 2003)	A	al-far	37-38
<i>L. mucosae</i> (Roos et al. 2000)	C	reu	46-47
<i>L. murinus</i> (Hemme et al. 1982)	B	sal	43-44
<i>L. nagelii</i> (Edwards et al. 2000)	A	sal	nd
<i>L. namurensis</i> (Scheirlinck et al. 2007)	C	buch	52
<i>L. nantensis</i> (Valcheva et al. 2006)	B	al-far	38,6
<i>L. oligofermentans</i> (Koort et al. 2005)	C	Pdex	35,3-39,9
<i>L. oris</i> (Farrow and Collins 1988)	C	reu	49-51
<i>L. panis</i> (Wiese et al. 1996)	C	reu	49-51
<i>L. pantheris</i> (Liu and Dong 2002)	A	ss	52-53
<i>L. parabrevis</i> (Vancanneyt et al. 2006)	C	bre	49
<i>L. parabuchneri</i> (Farrow et al. 1989)	C	buch	44
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (Collins et al. 1989)	B	cas	45-47
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> (Collins et al. 1989)	B	cas	45-47
<i>L. paracollinoides</i> (Suzuki et al. 2004)	C	per	44-45
<i>L. parafarraginis</i> (Endo and Okada 2007)	B	buch	40
<i>L. parakefiri</i> (Takizawa et al. 1994)	C	buch	41-42
<i>L. paralimentarius</i> (Cai et al. 1999)	B	al-far	37-38

A: Omofermentante obbligato; B: eterofermentante facoltativo; C: eterofermentante obbligato; nd: non determinato; na: non attribuito

Specie	Metabolismo	Gruppo filogenetico	contenuto GC (%)
<i>L. paraplantarum</i> (Curk et al. 1996)	B	Plan	44-45
<i>L. pentosus</i> (Zanoni et al. 1987)	B	Plan	46-47
<i>L. perolens</i> (Back et al. 2000)	B	Per	49-53
<i>L. plantarum</i> (Orla-Jensen 1919) (Bergey et al. 1923)	B	Plan	44-46
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i> (Bringel et al. 2005)	B	Plan	44-46
<i>L. pontis</i> (Vogel et al. 1994)	C	Reu	53-56
<i>L. psittaci</i> (Lawson et al. 2001)	C	Delb	nd
<i>L. rennini</i> (Chenoll et al. 2006)	B	Cor	nd
<i>L. reuteri</i> (Kandler et al. 1982)	C	Reu	40-42
<i>L. rhamnosus</i> (Hansen 1968) (Collins et al. 1989)	B	Cas	45-47
<i>L. rogosae</i> (Holdeman and Moore 1974)	na	Na	na
<i>L. rossiae</i> (Corsetti et al. 2005)	C	coppia1	44-45
<i>L. ruminis</i> (Sharpe et al. 1973)	A	Sal	44-47
<i>L. saerimneri</i> (Pedersen and Roos, 2004)	A	Sal	42-43
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> (Torriani et al. 1996)	B	Sakei	42-44
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> (Katagiri et al. 1934 emend. Klein et al. 1996)	B	Sakei	42-44
<i>L. salivarius</i> (Rogosa et al. 1953 emend. Li et al. 2006)	A	Sal	34-36
<i>L. sanfranciscensis</i> (Weiss and Schillinger 1984)	C	Fru	36-38
<i>L. satsumensis</i> (Endo and Okada, 2005)	A	Sal	39-41
<i>L. secaliphilus</i> (Ehrmann et al. 2007)	B	Reu	48
<i>L. sharpeae</i> (Weiss et al. 1982)	A	Ss	53
<i>L. siliginis</i> (Aslam et al. 2006)	C	coppia1	44,5
<i>L. sobrius</i> (Konstantinov et al. 2006)	B	Delb	35-36
<i>L. spicheri</i> (Meroth et al. 2004)	B	Buch	55
<i>L. suebicus</i> (Kleynmans et al. 1989)	C	coppia2	40-41
<i>L. tuccei</i>	A	al-far	ND
<i>L. ultunensis</i> (Roos et al., 2005)	A	Delb	35-36
<i>L. vaccinostercus</i> (Kozaki and Okada 1983)	C	coppia2	36-37
<i>L. vaginalis</i> (Embley et al. 1989)	C	Reu	38-41
<i>L. versmoldensis</i> (Kröckel et al. 2003)	A	al-far	40-41
<i>L. vini</i> (Rodas et al. 2006)	B	Sal	39,4
<i>L. vitulinus</i> (Sharpe et al. 1973)	A		34-37
<i>L. zaeae</i> (Dicks et al. 1996)	B	Cas	48-49
<i>L. zymae</i> (Vancanneyt et al. 2005)	C	Buch	53-54

Tabella. 2-2. Continua

La struttura filogenetica dei lattobacilli è estremamente complicata e, dai dati registrati in letteratura, è evidente come la tassonomia del genere sia ancora ambigua per certe specie e, per tale ragione, sottoposta a rivisitazioni periodiche.

Il caso esemplare è rappresentato dalla specie *L. casei*, la cui nomenclatura è ancora dibattuta.

Il caso “*Lactobacillus casei*”

La corretta descrizione di *L. casei* (Orla-Jensen 1919) comb. nov. da Hansen e Lessel (1971) (48), designava il ceppo ATCC 393 come *L. casei* subsp. *casei*, sulla base di tratti fenotipici. Poco tempo dopo, sulla base di esperimenti di ibridazione DNA-DNA (49) (50), fu dimostrato che il ceppo ATCC 393 non era assimilabile alla subspecie *casei*, mostrando invece un’alta analogia genomica (84%) con il *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 15820 (51). Nel 1980, durante la preparazione della *Approved list of Bacterial names*, questi dati furono negati da Collins et al. (1989) che, sulla base degli stessi esperimenti, proposero la creazione della specie *L. paracasei* (ATCC 334) per i ceppi non correlati ad *L. casei* ATCC 393. Tuttavia la specie ATCC 334 non venne inclusa nella riclassificazione e mantenne il nome di *L. casei* (52) (53). Successivamente vennero comunque pubblicati

degli studi in cui sia ATCC 393 che ATCC 334 erano indicati come ceppi tipo per *L. casei* (52).

In considerazione delle nuove procedure di isolamento ed identificazione, sono stati scelti come ceppi tipo di *L. casei* ed *L. paracasei subsp. paracasei*, rispettivamente i ceppi ATCC 334 e NCDO 151. Le due specie in questione sono assai correlate tra loro, ma differiscono da *L. casei* ATCC 393.

Poiché le corrette procedure tassonomiche prevedono l'attribuzione dei nomi sulla base di confronti tra ceppi tipo; una specie verrà chiamata *L. casei* se maggiormente somigliante al ceppo ATCC 393 rispetto all'NCDO 151, e la correlazione con l'ATCC 334 non ha significato formale (52).

Dai dati riportati, è chiaro che ad oggi, la tassonomia dei lattobacilli non è stata definita in maniera soddisfacente (41); l'applicazione di tecniche molecolari per l'analisi di grandi collezioni di ceppi, ha rivelato delle complesse relazioni tra differenti specie (54). Risvolti importanti sono stati raggiunti in campo commerciale, dove è stata evidenziata la mancata corrispondenza tra le specie appartenenti al gruppo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) riportate in etichetta e quelle identificate con tecniche molecolari (41).

2.2 La genomica nel genere *Lactobacillus*: la base per comprenderne la diversità

Ad oggi, molti genomi completi di *Lactobacillus spp.* sono stati sequenziati e pubblicati, ed almeno 50 progetti di sequenziamento sono in corso (55). Tali studi sono necessari per migliorare la comprensione dei processi metabolici, delle capacità biosintetiche e del potenziale ruolo che i lattobacilli potrebbero espletare per la salute dell'uomo (56).

Lactobacillus plantarum

Il primo genoma di *Lactobacillus* sequenziato è stato quello di *L. plantarum* WCFS1 (57). La sua natura eterofermentativa può essere spiegata attraverso l'identificazione di geni responsabili per la fermentazione degli zuccheri, attraverso la via glicolitica di EMP o la via della fosfochetolasi. Ha un complesso sistema proteolitico per la degradazione dei peptidi ed ha la capacità di sintetizzare gli aminoacidi *de novo*.

Lactobacillus plantarum si trova in molti habitat ricchi di nutrienti, quali i prodotti caseari, i vegetali e le piante (58), nella cavità orale umana e nel tratto gastrointestinale (59). La capacità di adattarsi a diverse condizioni ambientali deriva dall'ampiezza del suo genoma

e dall'abbondante e ridondante patrimonio genico. Una regione di circa 600kb, sita vicino l'origine di replicazione, ha la più alta densità di geni per il trasporto degli zuccheri, per il metabolismo e per le funzioni extracellulari. Il fatto che questa regione abbia un ricco ed anomalo contenuto di G+C, indicativo di un'acquisizione orizzontale, suggerisce che ciò è relativo allo "stile di vita", alla capacità di adattamento ai vari ambienti, che ne giustifica la flessibilità ambientale posseduta dal microrganismo in questione.

Lactobacillus johnsonii

Il secondo genoma di lattobacillo sequenziato è stato quello di *L. johnsonii* ceppo NCC533 (60). Isolato nell'uomo, il ceppo è un anaerobio stretto ed un omofermentante obbligato. *L. johnsonii* non ha i geni per la sintesi de novo degli aminoacidi, delle purine e di molti cofattori; tale deficit è compensato dalla presenza di un insolito ed elevato numero di geni codificanti permeasi, peptidasi e trasportatori PTS. Tali limiti biosintetici spiegano probabilmente perché *L. johnsonii* si trova esclusivamente nel tratto gastrointestinale superiore, dove ci sono livelli sufficienti di aminoacidi e proteine, necessari per la sua crescita.

Il genoma di *L. johnsonii* ha due profagi completi ma non inducibili, correlati a quelli presenti nei genomi di *Lactococcus*

lactis e di *Streptococcus thermophilus* (61). Nel suo genoma sono stati trovati geni i cui prodotti contribuiscono alle sue proprietà come probiotico. Tra i meccanismi coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del tratto gastrointestinale sono stati individuati fattori di elongazione della superficie cellulare (62) e proteine *heat shock* (63), con i quali il microrganismo si attacca alla mucosa intestinale o alle cellule epiteliali; ciò probabilmente contribuisce all'interazione con l'ospite ed agli effetti probiotici.

Lactobacillus acidophilus

Il ceppo di *L. acidophilus* NCFM è stato sequenziato da Klaenhammer e coll. (64). Isolato dalle feci di bambini più di cento anni fa, il ceppo è stato usato come agente probiotico nel cibo. È un microrganismo omofermentante obbligato ed è tra i lattobacilli meno tolleranti all'ossigeno (65). *L. acidophilus* non ha la capacità di sintetizzare molti aminoacidi, cofattori e vitamine, ma tale deficit è compensato dalla presenza di geni codificanti per un elevato numero di peptidasi, proteasi e trasportatori di aminoacidi. È stato precedentemente dimostrato che questo ceppo produce peptidi antibatterici (66). Grazie alla disponibilità dell'intera sequenza genomica depositata, è stato possibile stabilire l'esatta posizione e composizione di questa batteriocina di classe II, lactacina B. Inoltre

non sono stati individuati profagi completi nel genoma di *L. acidophilus*; tre unità potenzialmente autonome (PAUs, *potentially autonomus units*) mostrano caratteristiche simili a quelle dei plasmidi e dei profagi. Ciò ha fatto supporre che esse rappresentino sistemi di difesa contro i fagi.

La capacità di deconiugare i sali biliari è considerata essenziale per il passaggio intestinale, e l'adesione all'epitelio intestinale può promuoverne la colonizzazione o la ritenzione nel tratto GI. I geni codificanti per due idrolasi ipotetiche dei sali biliari e molteplici proteine di superficie sono stati identificati nel genoma di *L. acidophilus*, e successivamente identificati sperimentalmente (67) (68). Un'analisi successiva ha rivelato l'utilizzo di un *locus* per il trealosio, che conferisce crioprotezione, importante caratteristica nel caso in cui le colture sono congelate tramite freeze-drying durante la produzione commerciale (69).

Lactobacillus salivarius

L'analisi del genoma di *L. salivarius subsp. salivarius* UCC118 ha rivelato la presenza di un megaplasmide di 242kb, pMP118, in aggiunta al DNA cromosomico. È stata la prima rilevazione della presenza di un megaplasmide tra i *LAB* (70). Isolato dall'ileo nell'uomo, questo ceppo ha proprietà probiotiche (71).

L. salivarius è stato trovato nella mucosa intestinale, nelle feci e nella saliva dell'uomo, nel pollame e nei criceti (59) (72) (73) (74) .

L. salivarius è capace di sintetizzare de novo o per interconversione, nove aminoacidi, abilità che lo rende meno auxotrofico rispetto a *L. acidophilus* e a *L. johnsonii*, ma maggiormente dipendente dai sistemi di *uptake* degli aminoacidi rispetto a *L. plantarum*.

L. salivarius è considerato un omofermentante (72); i geni per l'assimilazione dei pentosi sono stati localizzati sul plasmide pMP118 (70). Precedentemente è stato dimostrato che *L. salivarius* produce una batteriocina di classe IIb, Abp118, che si pensava fosse codificata a livello cromosomico (75); oggi è stato invece dimostrato che è codificata da un gene sito sul megaplasmide. Ventura e coll. (76) hanno individuato 4 regioni profagiche nel genoma di *S. salivarius*, altamente diverse e attentamente distribuite nel genere *Lactobacillus*.

***Lactobacillus bulgaricus* (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)**

La sequenza genomica di *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) mostra numerose e distinte caratteristiche (77). Il contenuto in G+C è significativamente più elevato rispetto a quello

di altre specie di lattobacilli, nonostante il suo genoma sia di simile ampiezza. Ciò è dovuto all'elevato contenuto in G o C nella terza posizione della tripletta codonica.

Originariamente isolato da yogurt bulgaro (Orla-Jensen, 1919), *L. bulgaricus* è anche utilizzato per la produzione industriale di yogurt, assieme a *S. thermophilus*. La stretta cooperazione tra *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* favorisce l'incremento dell'acidificazione nei processi di fermentazione del latte. Mentre *L. salivarius* non ha enzimi per la sintesi di aminoacidi, *L. bulgaricus* possiede una proteasi caseolitica extracellulare.

Analisi genomica comparativa

La distanza filogenetica tra le specie è oggi evidenziata da differenti metodi d'analisi comparativa, che possono aiutare ad esplorare le caratteristiche di specie di lattobacilli il cui genoma è stato sequenziato.

L. plantarum ha un numero relativamente elevato di proteine coinvolte nel metabolismo e nel trasporto degli zuccheri, dei lipidi e degli amminoacidi, se paragonato a *L. johnsonii*, che invece può utilizzare solo una proteinasi extracellulare per degradare i peptidi. Ciò potrebbe spiegare e giustificare le loro differenti nicchie ecologiche; *L. johnsonii*, infatti, si trova solamente nel tratto GI

ricco di proteine. Il più “versatile” *L. plantarum* è in grado di colonizzare altri ambienti, quali le materie vegetali, che richiedono la capacità di fermentare un più ampio range di zuccheri.

Ci sono solo piccole evidenze della correlazione tra i due genomi. Comparazioni mediante Dot-plot e allineamenti genomici mostrano scarsa omologia (56): sono stati trovati solo 28 cluster genici in comune, con 6 geni nello stesso ordine. Inoltre questi cluster sono presenti anche in *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*: ciò ha portato ad affermare che la correlazione filogenetica tra *L. plantarum* ed *L. johnsonii* è solo marginalmente più alta rispetto a quella esibita con altri batteri Gram positivi (56).

Anche i genomi di *L. gasseri* ed *L. acidophilus* sono stati comparati (78). Molte similitudini sono state riscontrate tra i membri del “complesso *L. acidophilus*”, che include *L. acidophilus*, *L. gasseri* e *L. plantarum*. L’ordine dei geni è altamente conservato, soprattutto nei genomi delle due ultime specie menzionate, con l’eccezione di un’inversione cromosomica sul sito di terminazione della replicazione. Studi di sintenia hanno rivelato una regione genica probabilmente relata alla produzione di esopolisaccaridi della superficie cellulare. Questo cluster è conservato tra le tre specie, e

può avere importanti proprietà nei prodotti caseari fermentati attraverso le colture di questi microrganismi.

3 Metodi molecolari di identificazione

Tradizionalmente, i lattobacilli, e in generale tutte le specie appartenenti ai *LAB*, sono stati identificati sulla base di caratteristiche fenotipiche, quali per esempio la morfologia, il tipo di fermentazione degli zuccheri, la differente temperatura per la crescita, il *pattern* proteico della parete cellulare o dell'intera cellula. Sfortunatamente, questi metodi fenotipici/biochimici di tipizzazione non sono molto accurati. I loro limiti sono: la scarsa riproducibilità, l'ambiguità di alcune tecniche (spesso risultante dalla plasticità della crescita batterica), la mancata riproducibilità su larga scala e lo scarso potere discriminatorio. Un altro svantaggio dell'analisi fenotipica è rappresentato dal fatto che l'informazione portata dall'intero genoma non è sempre espressa, per esempio l'espressione di un gene potrebbe essere correlata alle condizioni ambientali (79).

Le tecniche genotipiche sono, invece, di notevole importanza ai fini dell'identificazione. I vantaggi che scaturiscono dal loro uso sono molteplici e riguardano principalmente l'elevato potere discriminatorio e la loro applicabilità universale. Ceppi fortemente correlati con caratteristiche fenotipiche simili, possono essere

efficacemente identificati tramite tecniche molecolari, principalmente basate sulla reazione PCR, quali RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ARDRA (*Amplified Ribosomal Restriction Fragment Analysis*), AFLP (*Amplified restriction length polymorphism*) RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), *Ribotyping*, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e TGGE (*Terminal Gradient Gel Electrophoresis*), etc.

La tecnica RFLP è stata la prima metodica di tipizzazione molecolare ad essere stata utilizzata. I profili in bande che risultano dai tagli enzimatici e la successiva separazione in frammenti di DNA, ottenuti mediante corsa elettroforetica, costituiscono il DNA *fingerprinting*. In ragione della elevata specificità delle endonucleasi e della stabilità del DNA cromosomico, i profili ottenuti dopo completa digestione del DNA, sono riproducibili. Tuttavia, la complessità del profilo di bande rappresenta un limite della metodica; ciononostante, si ritiene che la scelta oculata di particolari enzimi e l'uso di specifiche condizioni, possano rendere la tecnica RFLP relativamente rapida e facilmente realizzabile (80). La tecnica ARDRA (80) (81) è essenzialmente un'analisi dei polimorfismi di restrizione di amplificati genici codificanti rRNA. L'efficacia della metodica nella distinzione tra le specie o tra le

subspecie dipende dalla scelta degli enzimi di restrizione e dalla lunghezza dell'amplicone. Poiché alcune specie batteriche hanno un'elevata omologia di sequenza dei geni *rDNA*, è difficile selezionare endonucleasi in grado di produrre distinti *pattern* di restrizione per specie strettamente relate. La metodica è altamente riproducibile ed i *pattern* di restrizione, ottenuti in diversi laboratori, sono comparabili.

AFLP (81) combina il potere della tecnica RFLP alla flessibilità dei metodi basati sulla PCR. Il DNA genomico è digerito con 2 enzimi di restrizione, uno con scarsa frequenza di taglio, il secondo ad alta frequenza di taglio. Adattatori nucleotidici a doppio filamento sono ligati ai frammenti di DNA utilizzando i siti di binding dei primer per l'amplificazione PCR. L'utilizzo di *primer* complementari agli adattatori e la sequenza dei siti di taglio consentono di ottenere *pattern* di amplificazione ceppo-specifici (82). Ad oggi, la tecnica AFLP è utilizzata soprattutto negli studi clinici; inoltre ha avuto applicazione efficace per la tipizzazione di ceppi appartenenti al gruppo *L. acidophilus* ed *L. johnsonii* (83) (84).

Nella tecnica RAPD, conosciuta anche come AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), oligonucleotidi con sequenze random sono utilizzati in PCR a bassa stringenza e comunemente sono di circa 10bp. I

primer annilano regioni complementari o parzialmente complementari sul DNA (genomico). Il profilo che si ricava consiste di un *array* di ampliconi genici “anonimi”. Generalmente tale metodica è utilizzata per discriminare le specie e talvolta ceppi diversi di una stessa specie. È stata ampiamente sfruttata per la tipizzazione di lattobacilli e bifidobatteri da vari habitat (85) (86). Ad esempio, Tynkkynen e coll. (87), hanno distinto 12 genotipi tra 24 appartenenti al gruppo *L. casei*, molti dei quali di origine umana. La metodica è semplice da effettuare e rapida, ma la riproducibilità dei risultati è scarsa, rendendo necessari l’ottimizzazione e la standardizzazione della tecnica. L’utilizzo di differenti termociclatori, di diverse DNA polimerasi a differenti concentrazioni, i metodi di preparazione ed estrazione del DNA, le concentrazioni dei *primer* e del magnesio cloruro, possono causare variazioni nei *pattern* RAPD e, conseguentemente, quest’ultimi non sono comparabili se effettuati in differenti laboratori.

Il *ribotyping* è una variazione della tecnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), dove certi frammenti sono riconosciuti da sonde (*probe*) per ottenere profili meno complessi più semplici da interpretare. I frammenti ottenuti derivano da operoni di *rDNA* e di regioni adiacenti, che vengono ibridizzati

dalle sonde specifiche. Il potere discriminatorio della tecnica si ha a livello di specie piuttosto che per ceppo; esso dipende dall'ampiezza della sonda e dagli enzimi di restrizione utilizzati (79) (88). In questo contesto, ad esempio Zhong e coll. (89) hanno valutato l'efficacia del *ribotyping* su *Lactobacillus type strains* e su ceppi di riferimento (*L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*).

Le tecniche TGGE e DGGE sono utilizzate nello screening della eterogeneità in rRNA tra le specie batteriche e nel *fingerprinting* delle comunità batteriche (90). In pratica, il DNA o l'RNA è estratto da campioni ambientali, utilizzando *primer* specifici per i batteri o per altri gruppi filogenetici. Gli ampliconi sono poi separati utilizzando specifiche tecniche elettroforetiche.

La PCR-T/DGGE della 16S rRNA è oggi largamente utilizzata per assegnare, in modo coltura-indipendente, la diversità e la dinamicità delle comunità microbiche. In generale, queste tecniche riescono a rilevare solo i membri predominanti delle comunità, che devono rappresentare almeno l'1% dell'intera comunità microbica (90). Il limite di rilevazione per i maggiori gruppi dei batteri intestinali è circa 10^5 cellule/mL di campione fecale; tale carica dipende anche dai metodi di estrazione del DNA utilizzati (91).

La T/DGGE è un *tool* utile per monitorare la complessità della comunità microbica e i cambiamenti che la interessano, mentre i membri possono essere identificati singolarmente dal successivo clonaggio e sequenziamento dei frammenti. Alternativamente, per ottenere informazioni circa le singole specie o i gruppi batterici, i profili T/DGGE possono essere ibridizzati con sonde oligonucleotidiche specie-specifiche (92).

Recentemente, tali metodiche sono state utilizzate per lo studio delle popolazioni microbiche del tratto gastro-intestinale. La composizione della comunità microbica (bifidobatteri e lattobacilli) si è rivelata unica per ogni individuo (microbiota ospite-specifico) e, in generale, la popolazione dei bifidobatteri sembra essere più stabile nel tempo, sia numericamente che in composizione, rispetto ai lattobacilli (74) (93) (94).

Oltre alle metodiche associate alla PCR, precedentemente descritte, vi è anche la PFGE che consente la separazione di ampi frammenti di DNA, in un campo elettrico continuo riorientante. L'intero genoma viene digerito con endonucleasi (che tagliano raramente) e i risultanti macroframmenti vengono separati mediante PFGE. Protocolli PFGE sono stati ideati sia per i lattobacilli che per i bifidobatteri, e la tecnica mostra un maggiore potere discriminante

se comparato a quello di altre metodiche di tipizzazione molecolare, come ad esempio il *ribotyping*. (79) (87). In ragione dell'intenso lavoro che comporta, PFGE non è una tecnica realizzabile su larga scala per la tipizzazione degli isolati.

3.1 Macromolecole “ cronometro molecolare” della diversità microbica

Le macromolecole hanno spesso rappresentato “documenti” della storia dell'evoluzione e per decenni sono state utilizzate per esplorare la diversità filogenetica e le relazioni evolutive tra gli organismi (79) (95).

A partire dagli anni '80, sono state sviluppate nuove metodiche per l'identificazione delle specie batteriche. Woese e coll. (96) dimostrarono che le relazioni filogenetiche tra i batteri, e in generale tra tutte le forme di vita, potevano essere rilevate attraverso la comparazione di porzioni stabili del codice genetico (96). I candidati di questi studi genetici erano rappresentati dai geni che codificavano per la subunità 5S, per la subunità 16S (chiamata anche subunità piccola), per la 23S rRNA e per gli spaziatori tra questi geni. La regione del DNA oggi maggiormente utilizzata per scopi tassonomici è il gene codificante la 16S rRNA (97) (98).

La scelta del gene 16S rRNA come gene da sequenziare

Negli anni '60, Dubnau e coll. (99) osservarono la conservazione del gene *16S rRNA* tra specie filogeneticamente vicine appartenenti al genere *Bacillus*. La diffusione dell'impiego della sequenza genica della *16S rRNA* per gli studi di tassonomia e filogenia batterici, si verificò a seguito di uno studio di Woese e coll. (96), che ne definì importanti caratteristiche. Di notevole importanza è stata la considerazione che la 16S rRNA si comporta da cronometro molecolare (96). Tale assunto deriva dall'importanza della 16S rRNA come componente critica della funzione cellulare. Infatti se si prendono in considerazione i geni che codificano per determinati enzimi, è intuitivo dedurre che mutazioni in questi geni possono essere più facilmente tollerate, poiché essi non influenzano strutture uniche ed essenziali come lo rRNA (se un batterio non ha un gene che codifica un determinato enzima necessario per l'utilizzo del lattosio, potrebbe utilizzare uno zucchero alternativo o una differente proteina per ricavare energia). Inoltre pochi altri geni sono altamente conservati come quelli codificanti la 16S rRNA.

La 16S rRNA è anche *target* di numerosi agenti antimicrobici. Di conseguenza, mutazioni della sua sequenza potrebbero influenzare la sensibilità dei microrganismi verso agenti antibatterici che hanno

come *target* la *16S rRNA*; per tale ragione la sequenza del gene 16S rRNA può distinguere fenotipi di resistenza agli agenti antimicrobici (95). Comunque tali caratteristiche non influiscono negativamente sulla scelta del gene *16S rRNA* per l'identificazione batterica o per l'assegnazione di strette relazioni filogenetiche a livello di genere o specie. Esse potrebbero avere un maggiore impatto nell'assegnazione delle relazioni tra specie meno correlate dal punto di vista filogenetico (100).

Il gene *16S rRNA* ha una sequenza di circa 1.550 bp ed è costituito sia da regioni variabili che da regioni conservate. Il gene è abbastanza ampio, con sufficienti polimorfismi, da consentire rilevazioni distinguibili e statisticamente valide. Coppie di *primer* universali sono progettate in modo tale da essere complementari alle regioni conservate, che si trovano all'inizio del gene e nella regione oltre 540bp o alla fine dell'intera sequenza (circa 1550bp).

La sequenza della regione variabile (500bp o 1500bp), contenuta tra le regioni conservate, è utilizzata negli studi di comparazione tassonomica (101).

Bisogna però fare una considerazione sui costi e sulla pratica di laboratorio: è sicuramente meno dispendioso e più semplice

sequenziare una regione di 500bp piuttosto che una regione ampia 1500 bp o più.

Molte altre regioni genomiche sono state utilizzate per studiare le relazioni filogenetiche tra i batteri. L'analisi dell'intero genoma è stata effettuata, ma risulta particolarmente difficile poiché i genomi hanno diverse ampiezze e sono frequenti i fenomeni di duplicazione, delezione, fusione e di *splitting* genico. Ad oggi, sono disponibili pochi genomi per l'analisi comparativa. Comunque, è stato osservato che gli alberi filogenetici costruiti sull'intero genoma o sul gene *16S rDNA*, sono simili (102).

Altre regioni dei geni codificanti gli rRNA sono stati studiati per le relazioni filogenetiche tra i batteri. Roth e coll. hanno utilizzato le sequenze intergeniche tra i geni *16S e 23S rRNA* per distinguere tra *Mycobacterium* spp., rivelandosi particolarmente vantaggiose nella distinzione tra specie non discriminate dalla sola analisi della sequenza del gene *16S rRNA* (103). Altri studiosi hanno trovato particolarmente utile l'analisi delle sequenze geniche *23S rRNA* per la distinzione di specie appartenenti al genere *Streptococcus* (104).

Per i micobatteri, il gene codificante una proteina *heat shock* di 65 kDa è altamente conservata ed è stato perciò utilizzato per definire le relazioni tassonomiche tra le specie del genere (105).

Song e coll. (106) hanno messo a punto un protocollo per la rapida identificazione di 11 specie di lattobacilli intestinali isolati da feci umane, che sfrutta saggi di *multiplex* PCR per la distinzione in gruppi filogenetici, successivamente distinti a livello di specie, mediante designazione di *primer* specie specifici ottenuti dall'analisi della sequenza *16S-ISR-23S* e della regione fiancheggiante la *23S rRNA*. Quest'ultima, infatti, mostra una maggiore variabilità rispetto alla sequenza della 16S rDNA che ne rende più vantaggioso l'uso, atto a discriminare specie fortemente correlate dal punto di vista filogenetico (107).

Altri *marker* filogenetici

Molti altri geni, diversi da *16S rDNA*, sono studiati per esplorare la diversità microbica. Alcuni di questi sono geni universali, posseduti da tutti i batteri, dove svolgono funzioni simili. Il vantaggio nell'uso di tali geni a scopo identificativo è quello che essi si trovano in copie multiple nelle diverse specie batteriche. Alcuni sono taxa-specifici, e rivelano una più ampia diversità genetica tra specie strettamente relate . Esempi sono: il gene *dsr* per i batteri solfato-reduttori, il gene *pmoA* per i metanotrofici, il gene *nifH* per i cianobatteri (79).

Una proteina altamente conservata come RecA (piccola proteina implicata nella ricombinazione omologa del DNA, nella risposta SOS, nella mutagenesi indotta), è stata proposta come marker filogenetico alternativo, negli studi di analisi filogenetica comparativa del genere *Bifidobacterium* (108) e del gruppo *L. plantarum* (109).

La funzione altamente conservata e la distribuzione ubiquitaria del gene codificante il fattore di elongazione Tu (EF-Tu) ha reso tale gene un altro marker filogenetico disponibile per gli eubacteria; esso inoltre ha dato risultati soddisfacenti per l'identificazione di specie enterococciche (110) (111).

Ventura e coll. (112) hanno studiato brevi sequenze del gene *tuf* di differenti LAB, per effettuare l'analisi filogenetica di molte specie di lattobacilli e bifidobatteri. Inoltre hanno progettato, sulla base di sequenze genomiche disponibili, *primer* specie-specifici per l'identificazione di membri appartenenti al gruppo di *L. casei*, utilizzando un saggio di *multiplex* PCR.

Il fattore di elongazione Tu e la superfamiglia delle GTPasi

Il fattore di elongazione Tu (EF-Tu), la più abbondante proteina della cellula batterica, è una proteina legante il GTP e gioca un

ruolo importante nella sintesi proteica. Essa media il riconoscimento ed il trasporto degli aminoacil-tRNA ed il loro posizionamento al sito A del ribosoma durante la traduzione (111) (112) (113) (114) (115).

EF-Tu appartiene alla superfamiglia delle GTPasi, i cui membri regolano diverse funzioni cellulari (in tutti i domini della vita) come la sintesi proteica, il ciclo cellulare, la differenziazione ed il *signalling* ormonale (116). Nonostante le molteplici funzioni espletate, si ritiene che tutte le GTPasi derivino da un singolo comune precursore: ciò è accettato in virtù delle osservazioni sperimentali circa la conservazione del meccanismo d'azione, della struttura del *core* e delle sequenze di alcuni motivi trovati in tutti i membri della superfamiglia (117).

Le GTPasi sono spesso descritte come proteine che possiedono uno *switch* molecolare a causa del loro particolare meccanismo d'azione. Infatti ogni GTPasi lega specificatamente e idrolizza GTP con un meccanismo ciclico, che attiva ed inattiva la proteina stessa. In questo ciclo, la GTPasi passa attraverso tre stati conformazionali. Inizialmente, la GTPasi è inattiva e non lega nessun nucleotide; dopo il legame al GTP, la proteina diventa attiva (forma “on”) e subisce un cambio conformazionale, tale da variare la sua affinità

per una certa molecola effettrice o per un altro enzima. Il GTP viene simultaneamente idrolizzato (forma “off”), con un effetto generato sul *target* della GTPasi. Conseguentemente, il GDP è rilasciato dalla GTPasi inattiva, e la proteina ritorna al suo stato di non legame (114) (116) (118). Un dominio core, che è in grado di legare sia il GTP che il GDP, conferisce il caratteristico meccanismo di *switch* molecolare delle GTPasi. Le GTPasi possono avere solamente un dominio G o potrebbero avere domini addizionali sull'estremità ammino o carbossi-terminale delle stesse. Nonostante il dominio G sia strutturalmente invariato, la sequenza proteica di questo dominio è estremamente diversa. Tra queste regioni aminoacidiche variabili, sono racchiuse sequenze aminoacidiche altamente conservate. Ci sono 4 elementi altamente conservati che mediano l'interazione con i nucleotidi guaninici e con le proteine effettrici, conosciuti come motivi G1, G2, G3 e G4. I domini G1, G3 e G4 sono responsabili del legame al GTP e dell'interazione con il cofattore Mg^{2+} (119); il motivo G2, altresì definito dominio effettore, subisce un cambio conformazionale essenziale per la funzione della GTPasi (117).

Le GTPasi batteriche sono numericamente e funzionalmente più limitate rispetto a quelle eucariotiche (120). Primo, a differenza

delle cellule eucariote, c'è una rilevante assenza delle GTPasi batteriche nel *signalling* di membrana. Non c'è un analogo subunità α delle proteine eterotrimeriche, essenziale nella trasmissione del segnale ai recettori di membrana delle cellule eucariotiche. Inoltre, le piccole subfamiglie GTPasi (Ras, Rho, ARF, Rab e Ran) sembrano essere assenti (121).

I batteri con genomi più grandi posseggono 20-30 GTPasi, mentre quelli con genomi più piccoli ne contengono solo 11 (122). È interessante sottolineare che queste 11 GTPasi sono universalmente e altamente conservate tra tutti i batteri filogeneticamente vicini. Queste comprendono tre fattori che partecipano al processo di traduzione (EF-G, EF-Tu e IF2), due GTPasi della famiglia FtsY (FtsY e Ffh), Era, ThdF/TrmE, EngA, YchF, Obg e LepA. Da studi di analisi filogenetica è emerso che EF-G, EF-Tu ed IF2 appartengono ad uno stesso cluster, mentre FtsY e Ffh ne formano un altro distinto (116).

Il gene *tuf*

Il fattore di elongazione Tu è codificato dal gene *tuf* negli *eubacteria* ed è presente in varie copie per genoma batterico (111) (112).

Molti batteri Gram-negativi contengono due geni *tuf* (111) (123), come riscontrato in *E. coli*, dove i due geni, pur avendo la stessa sequenza, sono collocati in differenti parti del cromosoma batterico (124) (125). Recentemente, mappe di genomi completi hanno rivelato che c'è una singola copia del gene *tuf* in *Helicobacter pylori* ed in alcuni batteri parassiti obbligati (*Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia prowazekii*, e *Treponema pallidum*) e in qualche cianobatterio (126) (127) (128). Molti batteri Gram-positivi (a basso contenuto G+C) portano una sola copia del gene *tuf* (123) (126) (128). Per tale ragione, il gene *tuf* è un buon candidato per gli studi di filogenia (129). Comunque studi di ibridizzazione con *Southern blot*, hanno mostrato che ci sono due geni in alcuni clostridi, com'anche in *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces lividans* (123).

Il gene *tuf* appartiene ad un'ampia unità trascrizionale, l'operone *str*, che codifica molte proteine ribosomiali e relate proteine regolatorie (130). L'operone *str* di *E. coli* è composto da 4 geni: *rpsL* (codificante la proteina ribosomiale S12), *rpsG* (proteina ribosomiale S7), *fus* (fattore di elongazione G) e *tufA* (EF-Tu). L'ordine di questi geni nell'unità trascrizionale è simile a quello

osservato e descritto per molte specie, come *Enterococcus spp.*, *Bacillus subtilis* e *Neisseria meningitidis* (113).

Ventura e coll. (112) hanno analizzato le sequenze dei geni *tuf* di differenti LAB per studiarne la filogenia. Essi inoltre hanno descritto le posizioni dei geni *tuf* nei genoma di alcune specie di lattobacilli e bifidobatteri, ed i loro *pattern* trascrizionali. Infine hanno disegnato *primer* specie-specifici per l'identificazione dei membri appartenenti al gruppo *L. casei*, inserendoli in un protocollo di *multiplex* PCR. In particolare, essi hanno selezionato sequenze di geni *tuf* di alcune specie batteriche appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, i cui genomi sono pubblicati, allineandole e comparandole. Hanno identificato 4 regioni conservate, sulle quali hanno progettato coppie di *primer* che amplificavano regioni di circa 800bp. Dall'analisi comparativa delle varie sequenze dei geni *tuf* ottenute (ca. 800bp) con quelle depositate in database, è emerso che ci sono regioni conservate in tutti i ceppi della stessa specie, che variano tra specie diverse. L'identità delle sequenze *tuf* tra i lattobacilli studiati variava dal 78% al 98% (raggiungendo il valore 100% per ceppi della stessa specie); e dal 76% al 100% per i prodotti tradotti. Molte differenze

riscontrate tra le specie nelle sequenze nucleotidiche, si sono dimostrate silenti in termini di codifica aminoacidica (112).

Allineamenti delle sequenze aminoacidiche dei geni *tuf* di lattobacilli e di bifidobatteri, con altre sequenze EF-Tu disponibili in database, hanno dimostrato che i prodotti sono altamente conservati e portano residui aminoacidici tipicamente trovati nel fattore di elongazione Tu dei procarioti (110).

Diverse specie di *Lactobacillus* e di *Bifidobacterium* sono state identificate senza ambiguità dall'analisi comparativa delle sequenze parziali del gene *tuf*, ottenendo un albero filogenetico riportato in figura 3. L'albero filogenetico costruito sulle sequenze *16S DNA* depositate in database, ha mostrato un arrangiamento filogenetico molto simile a quello ottenuto dalle sequenze dei geni *tuf*. Una caratteristica importante estrapolata dallo studio filogenetico basato sul gene *tuf* è stata quella che le sequenze *tuf* di *L. delbrueckii* sono strettamente relate con quelle di *L. acidophilus* gruppo A; mentre sono più distanti filogeneticamente da *L. acidophilus* gruppo B. È altresì interessante notare che ceppi fortemente correlati, aventi sequenze *16S rRNA* quasi identiche, come ad esempio il gruppo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, e *L. rhamnosus*) ed il gruppo B *L. acidophilus* (*L. gasseri* e *L. johnsonii*), sono

chiaramente distinti in branche separate nell'albero filogenetico costruito sul gene *tuf* (figura 3-1) (112).

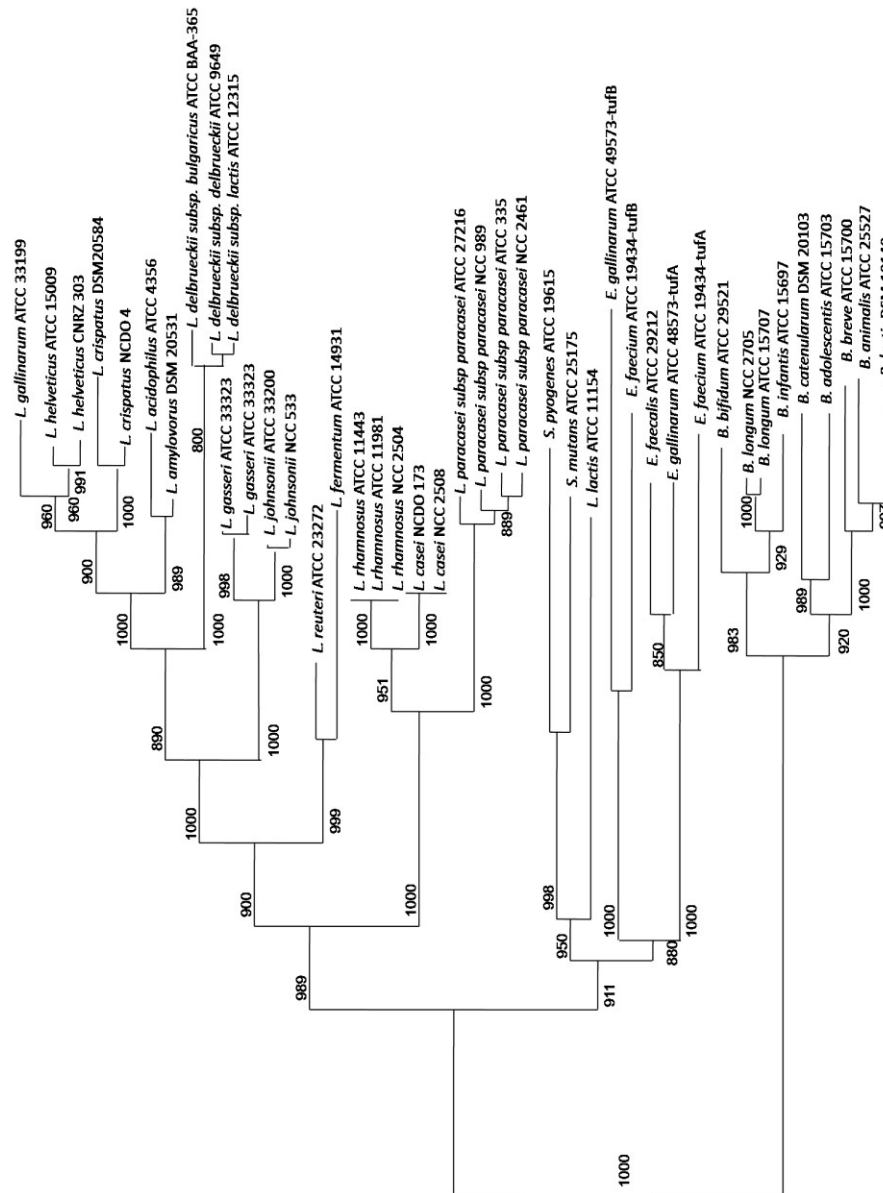


Figura 3-1. Albero filogenetico di *Lactobacillus* EF-Tu e *Bifidobacterium* EF-Tu, basato su sequenze nucleotidiche omologhe

L'arrangiamento del gene *tuf* nei bifidobatteri è simile a quello riscontrato nell'operone *str* di *E. coli* ed è presente in singola copia (131).

Per quanto riguarda la locazione del gene *tuf*, in *L. gasseri* ATCC 33323 ed in *L. johnsonii* NCC533, è stato osservato che esso si trova a valle di un gene codificante per una beta-lattamasi e del gene *rpsO* [proteina ribosomiale (subunità 30S) S20]; mentre direttamente a valle del gene *tuf*, si trova il gene *tig* (*transcription regulator trigger factor*), seguito da un gene codificante per una Clp proteasi (gene *clp*), una proteina legante il GTP ed una proteina fosfatasi (fosfotirosinica). Comunque solo EF-Tu, *trigger factor*, Clp proteasi e la proteina legante il GTP sembrano costituire un modulo altamente conservato, corroborando l'ipotesi che questi geni facciano parte dello stesso operone. Infatti il *trigger factor* è una proteina associata al ribosoma che interagisce con EF-Tu e con un'ampia varietà di polipeptidi nascenti, catalizzandone il loro *folding* (132). Le proteasi Clp ATP-dipendente sono proteine stress-indotte che agiscono sul *refolding* proteico o degradando proteine denaturate (133).

Nonostante il consistente trasferimento genico nel mondo dei procarioti rappresenti uno dei principali fattori responsabili per

l'evoluzione del genoma batterico, i geni codificanti componenti coinvolti nella sintesi proteica, sono altamente conservati e difficilmente vengono trasferiti orizzontalmente a causa delle loro complesse interazioni (134). Comunque studi recenti hanno dimostrato il trasferimento orizzontale nell'evoluzione di alcuni geni come *16S rDNA*, ed alcuni codificanti aminoacil-tRNA sintetasi (135) (136) (137). Studi precedenti hanno affermato che duplici copie del gene *tuf* nei genomi di alcuni batteri sono il risultato di una duplicazione ancestrale del gene (134). Inoltre, uno studio sul gene *tuf* in *R. prowazekii* suggeriva la ricombinazione intracromosomica nello scenario evuzionistico del microrganismo (136).

4 Antibiotico resistenza nei batteri acido lattici non enterococcici

4.1 LAB, Lactic Acid Bacteria

Molte specie di LAB (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*) sono implicate nella produzione e conservazione degli alimenti fermentati e dei cibi crudi (latte, formaggi, verdure e cereali) dove esse rappresentano delle specie contaminanti o sono deliberatamente aggiunte come starter per controllare il processo di fermentazione, rivestendo perciò un'importanza economica notevole. In aggiunta, i batteri lattici determinano le proprietà organolettiche, reologiche e nutrizionali dei cibi fermentati (138) (139). In virtù del loro storico utilizzo nella tradizionale fermentazione dei cibi, ad essi è stato riconosciuto lo *status* di *GRAS*, “*Generally Regarded As Safe*” dall'*American Food and Drug Agency*. Molte specie di LAB sono spesso ritrovate come appartenenti al microbiota del tratto gastro-intestinale e di quello genito-urinario dei vertebrati (139), dove si ritiene che essi svolgano effetti benevoli per la salute (140). In questo contesto, sono definiti probiotici tutti quei microrganismi non patogeni che,

se ingeriti in certe quantità, influenzano positivamente la fisiologia dell'ospite e la salute (140). Un vasto numero di specie viene oggi consumato per mantenere e ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale, per contrastare l'azione di popolazioni microbiche pericolose, etc.. Va però tenuto in forte considerazione il potenziale trasferimento di antibiotico resistenza ai microrganismi patogeni (140) (141).

4.2 Il problema dell'antibiotico resistenza

L'uso clinico degli antibiotici ha portato ad una notevole riduzione della morbilità e della mortalità associate alle malattie infettive, ed ha avuto un notevole impatto sul successo della chirurgia e della terapia neoplastiche (141) (142). Il loro impiego si è esteso alla medicina veterinaria, dove essi sono utilizzati come agenti terapeutici, nella profilassi e come promotori di crescita, e persino all'agricoltura, per il controllo delle malattie delle piante. Questo uso esteso, talvolta smodato, può comportare la selezione di ceppi resistenti. Infatti la correlazione tra l'uso indiscriminato di antibiotici e la comparsa di antibiotico resistenza, è stata più volte riscontrata (143).

Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza nei batteri è principalmente basato su due fattori: la presenza di geni di resistenza e la pressione selettiva generata dall'uso di antibiotici (144).

La resistenza ad un dato antibiotico può essere intrinseca ad una specie batterica o ad un genere (resistenza naturale): è la capacità di un microrganismo di sopravvivere in presenza dell'agente antimicrobico, grazie alla presenza di peculiari caratteristiche del microrganismo in questione. La resistenza intrinseca non è trasferibile orizzontalmente. Al contrario, la resistenza acquisita è presente in alcuni ceppi di una specie che generalmente è sensibile a quel dato antibiotico, e può essere diffusa per trasferimento orizzontale tra i batteri. La resistenza acquisita può derivare da mutazioni nel genoma batterico o per acquisizione di geni codificanti molecole coinvolte nella resistenza. Questi cambiamenti genetici alterano le funzioni difensive dei batteri, traducendosi in differenti meccanismi, quali: alterazione del *target* molecolare del farmaco; alterazione della permeabilità di membrana; inattivazione enzimatica dell'antibiotico (ad opera di β -lattamasi, aminoglicoside acetil-trasferasi, fosforiltrasferasi, etc); trasporto attivo dell'antibiotico (per esempio sistemi di efflusso ATP-dipendenti); modifica del *target* (per esempio la mono-di metilazione della 23S

rRNA o la mutazione della sequenza amminoacidica delle topoisomerasi) (142).

Un singolo gene può selezionare la resistenza ad un particolare farmaco, e contemporaneamente a farmaci strutturalmente correlati della stessa classe; per esempio la resistenza alla tetraciclina mediata dal gene *tet(M)* include la resistenza a ossitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina e minociclina (145). Quando antibiotici di differenti classi agiscono sullo stesso *target*, e quest'ultimo è modificato dal prodotto codificato dal gene di resistenza, è osservata resistenza crociata tra antibiotici strutturalmente non correlati; per esempio la resistenza combinata a macrolidi, lincosamidi e streptogramina B mediata dai geni *erm* (146).

Acquisizione e diffusione dell'antibiotico resistenza

I determinanti di antibiotico resistenza possono essere trasferiti sia verticalmente che orizzontalmente tra le comunità microbiche naturali. La trasmissione verticale è mediata dalla diffusione clonale di un particolare ceppo resistente. Per la trasmissione orizzontale, sono stati individuati tre meccanismi (147): la trasformazione naturale, che comporta l'*uptake* e l'incorporazione di DNA libero dal mezzo extracellulare; la coniugazione, un meccanismo di trasferimento del DNA che comporta il contatto tra due cellule ed è

diffuso in molti generi batterici, e la trasduzione, meccanismo mediato dai batteriofagi. Il relativo contributo di ciascun meccanismo non è noto, ma la coniugazione è ritenuta il meccanismo principale di trasferimento dell'antibiotico resistenza (148). Le ragioni che avvalorano tale asserzione sono diverse. Una di queste risiede nel fatto che molti determinanti di antibiotico resistenza si trovano su elementi mobili come plasmidi e trasposoni coniugativi. La seconda ragione è che con la coniugazione il DNA può muoversi tra specie e generi differenti, mentre la trasformazione e la trasduzione sono generalmente limitate a ceppi della stessa specie.

I plasmidi coniugativi sono comuni nei lattococchi, nei generi *Leuconostoc*, *Pediococcus* ed in alcune specie di lattobacilli; sono piuttosto rari nei bifidobatteri e in altre specie di lattobacilli (149).

Plasmidi R codificanti resistenza per tetraciclina, eritromicina, cloramfenicolo o macrolidi-lincosammidi-streptogramine, sono stati trovati in *L. reuteri* (150) (151) (152) (153), *L. fermentum* (154) (155), *L. acidophilus* (152) e in *L. plantarum* (156) (157), isolati da carne cruda e feci. Molti plasmidi R hanno dimensioni inferiori a 10Kb (5,7-18Kb). *L. fermentum* isolato da feci di maiale porta un plasmide di 5,7Kb con un gene *erm* che conferisce un'elevata

resistenza all'eritromicina ed ha un'omologia del 98,2% con quello ritrovato nel trasposone coniugativo enterococcico Tn1545 (154).

Plasmidi R portanti il gene *tet(M)* sono stati ritrovati in lattobacilli isolati da cibi crudi e fermentati (158). Le due forme alleliche del gene *tet(M)* a collocazione plasmidica mostrano un'alta omologia di sequenza (>99,6%) con il gene *tet(M)* precedentemente descritto in *S. aureus* MRSA101 ed in *Neisseria meningitides*.

Recentemente è stato trovato un plasmide di 19,3Kb, che porta un nuovo determinante di resistenza per eritromicina, *erm(LF)*, in *L. fermentum*. Nello stesso studio, sono stati trovati geni *tet(M)* in 6 differenti ceppi di *Lactobacillus*, non a collocazione plasmidica, probabilmente cromosomica (159).

I batteri intestinali come reservoir dell'antibiotico resistenza

I batteri umani intestinali svolgono svariati ruoli per la salute, dei quali molti benefici per l'ospite. Oggi purtroppo sta emergendo una caratterizzazione sinistra di tali microrganismi, cioè il loro coinvolgimento come “trafficienti” di geni d'antibiotico-resistenza. Sono molteplici le evidenze sperimentali che avvalorano l'ipotesi dello scambio di determinanti di resistenza, non solo tra gli stessi

batteri intestinali, ma anche tra il normale microbiota e i patogeni opportunisti (figura 4-1) (160).

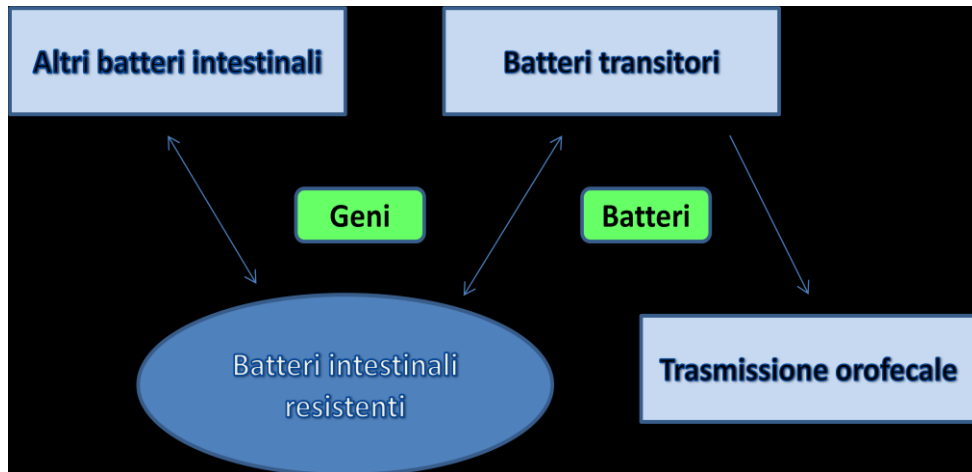


Figura 4-1. Rappresentazione schematica dell'ipotetico scambio di determinanti di resistenza tra batteri del microbiota intestinale e patogeni opportunisti

4.3 Profilo di sensibilità/resistenza nei lattobacilli

I *pattern* di sensibilità dei generi appartenenti ai LAB sono abbastanza differenti (141).

Per quanto riguarda gli inibitori della sintesi della parete cellulare, i lattobacilli sono generalmente sensibili alle penicilline (piperacillina ed ampicillina) ed agli inibitori delle β -lattamasi, sono comunque meno sensibili all'oxacillina e alle cefalosporine (cefoxitina e ceftriaxone) (161) (162). L'impermeabilità della parete cellulare è il meccanismo principale di resistenza (163). Comunque la cooperazione di meccanismi non-specifici, quali trasportatori multi-farmaco (164) e sistemi autolitici difettivi della parete cellulare (165), possono giustificare le differenze tra le specie. Molte specie di lattobacilli hanno un'elevata e naturale resistenza al glicopeptide vancomicina, caratteristica che può essere sfruttata per distinguerli da altri microrganismi Gram-positivi (166) (167). Tale resistenza intrinseca verso vancomicina è dovuta alla presenza di enzimi correlati alla D-alanina/D-alanina ligasi (168). Le specie resistenti hanno il dimero D-alanina/D-lattato, al posto del dimero D-ala-Dala nel loro peptidoglicano (169). La resistenza è intrinseca

in quanto il *target* dell'antibiotico è assente; comunque non è comparabile a quella trasmissibile, a collocazione plasmidica, riscontrata nelle specie enterococciche (170). La sensibilità verso l'antibiotico bacitracina varia notevolmente (162) (171).

I lattobacilli sono generalmente sensibili agli antibiotici che inibiscono la sintesi proteica, come cloramfenicolo, eritromicina, clindamicina e tetraciclina e maggiormente resistenti agli aminoglicosidi (neomicina, kanamicina, streptomicina e gentamicina) (162) (172) (173). Comunque sono stati isolati ceppi resistenti ai sopracitati antibiotici (161) (172) (174) (175) e sono stati studiati molti determinanti di resistenza, come ad esempio: il gene *cat* per la resistenza al cloramfenicolo, trovato in *L. reuteri* (150) ed in *L. plantarum* (156); differenti geni *erm* (*erythromycin resistance methylase*) (151) (154) (176) e geni *tet* (K, M, O, Q, S, W) per la resistenza alla tetraciclina (145) (177) (178) (179), sono stati trovati in molte specie.

I lattobacilli sono usualmente resistenti alla maggior parte degli inibitori della sintesi degli acidi nucleici come enoxacina, pefloxacina, norfloxacina, acido nalidixico, ciprofloxacina, sulfametossazolo, trimetoprim e cotrimazolo (161) (162) (172). La resistenza a tali antibiotici è, nella maggior parte dei casi,

intrinseca. Per un certo numero di lattobacilli è stata riscontrata un'elevata frequenza di mutazioni spontanee verso nitrofurazone, kanamicina e streptomina (180). Da questi dati è chiaro che esistono differenze *intergenus* ed *interspecies*; di conseguenza, l'identificazione a livello di specie è necessaria per l'interpretazione dei dati fenotipici sulla sensibilità. Nello studio di Danielsen e Wind (161) è stato osservato che la sensibilità a differenti agenti chemioterapici può essere considerata specie-dipendente, variando nell'ordine di molte diluizioni, soprattutto per vancomicina, teicoplanina, tetraciclina, norfloxacin, ciprofloxacina, acido fusidico e clindamicina.

In uno studio condotto da Temmerman e coll. (2002), è stata studiata la resistenza antibiotica degli isolati batterici estratti da 55 prodotti probiotici europei. Mediante *disc diffusion test*, è emerso che circa il 79% degli isolati (187 ceppi) era resistente a kanamicina, il 65% a vancomicina; minore resistenza è stata osservata verso tetraciclina (26%), penicillina G (23%), eritromicina (16%) e cloramfenicolo (11%) (181).

Determinazione dei profili di antibiotico sensibilità/resistenza nei LAB

Chiare definizioni di valori *breakpoint*, che discriminano tra specie sensibili e resistenti, sono di vitale importanza negli studi fenotipici sulla sensibilità agli antibiotici. Inoltre è necessario distinguere tra resistenza intrinseca (non trasferibile) e resistenza acquisita, un processo che potrebbe richiedere la comparazione di differenti profili di sensibilità/resistenza agli antibiotici, in molte specie, appartenenti al gruppo dei LAB, provenienti da differenti fonti (182).

In aggiunta ai tradizionali *breakpoint* clinici, che aiutano i medici nella scelta della terapia antibiotica, il concetto di “*breakpoint* microbiologici” è stato introdotto mediante lo studio della distribuzione della minima concentrazione inibente (MIC, *Minimum Inhibitory Concentration*) per un dato antibiotico in una popolazione batterica (183). Ad esempio nella tabella 4-1 sono riportati i valori *breakpoint* microbiologici ($\mu\text{g/ml}$) che classificano alcune specie di LAB come resistenti.

Tabella 4-1. Breakpoint microbiologici ($\mu\text{g/mL}$) che classificano alcune specie di LAB come resistenti (141)

Antibiotico	Specie							
	L. O.O. ^(*)	L. E. ^(*)	L. <i>plantarum</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.	L. <i>lactis</i>	S. <i>termophilus</i>
Ampicillina	4	4	4	8	4	4	4	4
Vancomicina	4	IR ^(a)	IR	8	IR	IR	4	4
Gentamicina ^(**)	8	8	64	512	4	4	8	8
Kanamicina ^(**)	16	16	64	1024	4	8	8	8
Streptomicina ^(**)	16	16	64	1024	4	8	16	16
Neomicina ^(**)	16	16	32	1024	8	8	8	8
Eritromicina	4	4	4	4	4	4	4	4
Clindamicina	4	4	4	4	4	4	4	4
Dalfopristin-quinupristin	4	4	4	4	4	4	4	4
Tetraciclina	8	8	32	16	4	4	4	4
Cloramfenicolo	4	4	8	8	4	4	8	8
Trimetroprim ^(**)	8	8	8	8	8	8	NR ^(b)	NR
Linezolid	4	4	4	4	4	4	4	4

(*) L. O.O.= lattobacilli omofermentanti obbligati; L. E.= lattobacilli eterofermentanti, incluso *L. salivarius*

(**) sono state descritte interferenze per la composizione del mezzo (164) (187)

(a) IR= intrinsecamente resistenti; (b) NR= non riportati

La tabella è stata adattata da FEEDAP Panel Report (Commissione europea, 2005). I ceppi con valori di MIC più alti rispetto ai relativi *breakpoint*, sono considerati resistenti

A causa della molteplicità dei metodi disponibili, c'è un mancato accordo circa i valori *breakpoint* per definire la sensibilità/resistenza dei LAB verso molti antibiotici. I differenti metodi di determinazione *in vitro*, quali E-test®, diluizione in agar, *disc diffusion test*, microdiluizione in brodo, stanno all'origine della confusione, in quanto i risultati prodotti non possono essere direttamente comparati (141). Inoltre alcuni saggi di sensibilità non sono realizzabili per certi antibiotici. Per esempio, il test di diffusione da disco non è utilizzabile per rilevare enterococchi con bassi livelli di resistenza alla vancomicina (valori di MIC da 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$) (185). Inoltre, il mezzo di coltura può influenzare i risultati

dei saggi di sensibilità per certi antibiotici (184). Variazioni nel contenuto cationico o nella concentrazione di composti critici, come la tiamina o l'acido folico, inoculo, temperatura, periodo d'incubazione, etc. possono modificare i risultati ottenuti. Infine, molte specie di LAB crescono male nei comuni terreni utilizzati nei saggi di sensibilità, come Mueller-Hinton o Isosensitest; il terreno MRS può inoltre inattivare alcuni antibiotici, come ad esempio l'imipenem (141).

4.4 I chinoloni

Struttura e classificazione

I chinoloni sono una famiglia di chemioterapici, ovvero antibatterici di sintesi, in continua e progressiva evoluzione. La struttura chimica di base è quella dei 4-chinoloni, ossia degli azachinoloni, con un gruppo carbossilico in posizione 3 (figura 4-2).

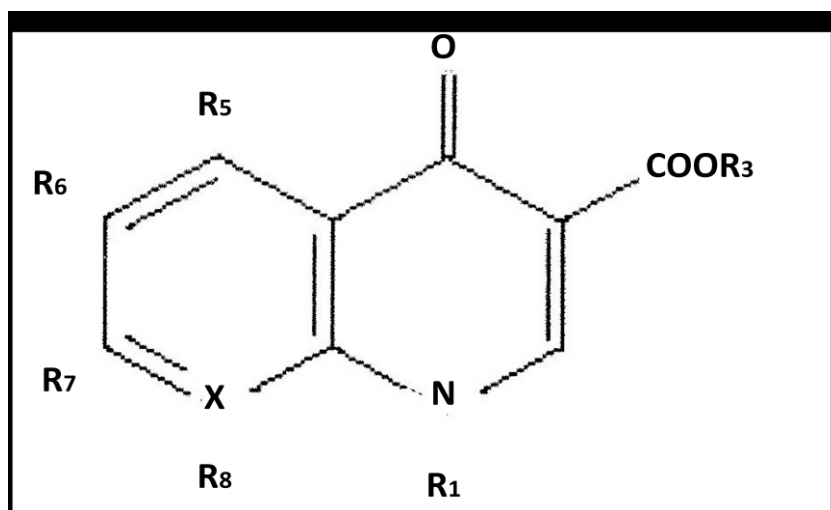


Figura 4-2. Scheletro "4-chinolone" (4-oxo-1,4 diidrochinolone)

La loro scoperta risale alla fine degli anni cinquanta durante il processo di sintesi e purificazione della cloroquina (agente antimalarico). Ripetute modifiche

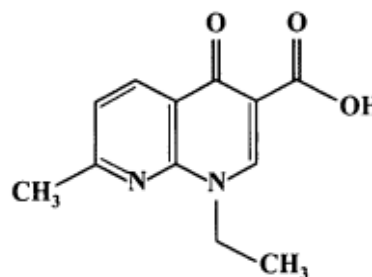


Figura 4-3. Acido nalidissico

chimiche di questo composto *lead* permisero l'ottenimento di

analoghi strutturali che furono saggiati come antibatterici, arrivando così alla scoperta dell'acido nalidissico (Figura 4-3).

Questo composto, a struttura naftiridinica, ha rappresentato il capostipite della famiglia dei chinoloni. Introdotto in terapia nel 1962, il composto mostrava solo una modesta attività sui Gram-negativi e basso assorbimento per via orale, con un picco plasmatico inferiore a 0,5 mg/L. L'uso clinico fu limitato al trattamento delle infezioni del tratto urinario (UTIs) (186).

Modifiche strutturali dei chinoloni di prima generazione sono state mirate all'ampliamento dello spettro d'attività: negli anni sessanta e settanta si ebbe lo sviluppo di una serie di analoghi, i chinoloni di seconda generazione. Modifiche strutturali marginali sono state inizialmente effettuate ottenendo lo sviluppo dei primi composti di seconda generazione, quali l'acido oxolinico (nucleo chinolinico) e la cinoxacina (nucleo cinnolinico). Risultati clinici migliori circa l'ampliamento dell'attività su Gram negativi, includendo l'attività *antipseudomonas*, sono stati raggiunti con la sostituzione di un anello piperazinico in R₇, portando allo sviluppo di composti quali l'acido pipemidico (struttura pirido[2,3-d]pirimidinica) e dell'acido piromidico (struttura pirido[2,3-d]pirimidinica). Nonostante l'ampliamento dello spettro d'azione, l'uso clinico dei

chinoloni di seconda generazione è rimasto limitato a causa della scarsa biodisponibilità sistemica e del rischio di tossicità renale (187) (188).

I chinoloni di terza generazione sono caratterizzati dall'inserimento di un atomo di fluoro in posizione R₆, portando alla classificazione dei successivi composti come fluorochinoloni (189).

L'inserimento di un atomo di fluoro ha provocato un eccezionale potenziamento dell'attività antibatterica, mentre l'aggiunta di un anello piperazinico in posizione 7 ha migliorato la capacità di penetrazione a livello tissutale. L'uso clinico dei fluorochinoloni, in ragione della buona attività, raggiunta con la fluorurazione, contro i Gram positivi, assieme con la buona solubilità osservata nei preparati oftalmici, si è espanso in campo oftalmico.

La norfloxacinina è stata il primo chinolone utilizzato nel *management* delle infezioni oculari, per il trattamento delle congiuntiviti batteriche (186). La norfloxacinina mostra attività *antipseudomonas*, attività verso bacilli Gram negativi e limitata attività verso batteri Gram positivi sensibili (190). La sostituzione di un atomo di carbonio al posto di un azoto (legato alla catena R₈ nella figura 4-2) e le modifiche in R₁ ed R₈ hanno portato allo sviluppo di diversi composti di terza generazione. L'aggiunta di un

anello ciclopropilico alla posizione R₁, ha portato allo sviluppo della ciprofloxacina; l'aggiunta di un anello a sei atomi (piridobenzossazina) tra le posizioni R₁ e R₈ ha portato al composto ofloxacina (189). Entrambi i composti, mostrano buona attività sui Gram negativi sensibili ed attività estesa verso microrganismi Gram positivi frequentemente associati ad infezioni oculari. Ofloxacina ha anche attività verso anaerobi come *Propionibacterium acnes* (191). Levofloxacina, ottenuta dall'isolamento dell'enantiomero attivo di ofloxacina, possiede migliore attività verso i Gram positivi, includendo *S. pneumoniae* ed *S. viridans* (187) (191).

L'esteso spettro d'azione ha selezionato tali composti come agenti antibatterici d'elezione nelle terapie topiche e per il trattamento di infezioni quali le cheratiti batteriche (186).

Lo sviluppo di resistenza ai fluorochinoloni di terza generazione, tra i patogeni associati alle infezioni oculari, soprattutto tra i microrganismi Gram positivi, ha portato alla ricerca e allo sviluppo di nuovi composti (191). L'aggiunta di un gruppo metossilico nella catena laterale in R₈, ha portato allo sviluppo dei fluorochinoloni di quarta generazione, gatifloxacina ed moxifloxacina. La moxifloxacina ha anche un anello biciclico costruito sulla posizione R₇ (187); la gatifloxacina porta invece un gruppo metilico

sull'anello piperazilico. Queste modifiche sembrano essere responsabili del duplice meccanismo d'azione (attività inibitoria sulle topoisomerasi batteriche, DNA girasi e topoisomerasi IV) nei batteri Gram positivi, in aggiunta al ridotto efflusso dalle cellule batteriche, poiché lo spettro d'attività include ceppi di *Streptococcus* e di *Staphylococcus* resistenti ai chinoloni di terza generazione (191). Il gruppo metossile è responsabile dell'attività di questi composti verso i microrganismi anaerobi (figure 4-4 e 4-5) (187).

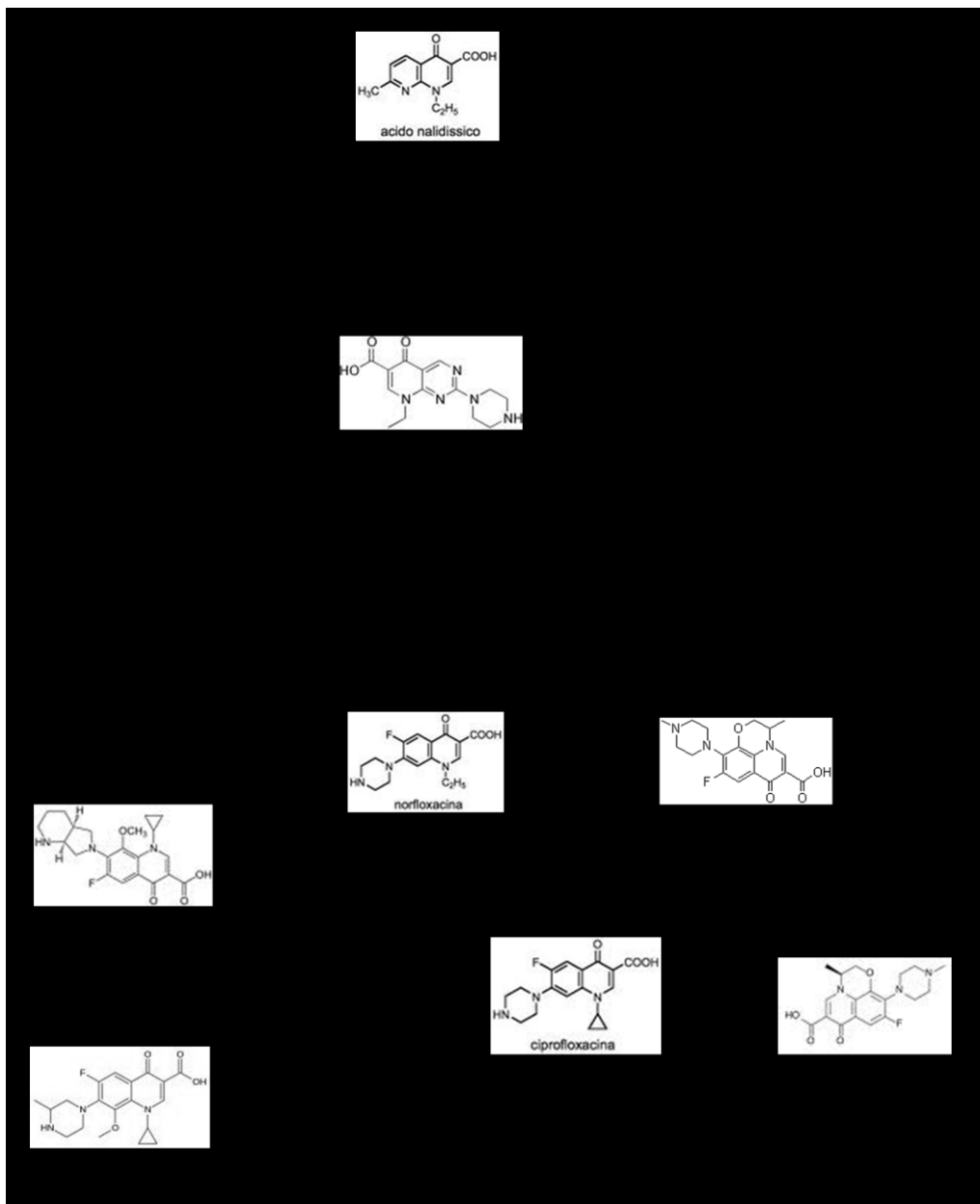


Figura 4-4. Evoluzione strutturale dei chinoloni.

In Italia nel 2004 è stato commercializzato un nuovo fluorochinolone, la prulifloxacin. Rapidamente assorbita dopo somministrazione orale, la prulifloxacin subisce un metabolismo di primo passaggio epatico che la trasforma nel metabolita attivo ulifloxacin. Nel trattamento di infezioni del tratto urinario, il profarmaco è più efficace rispetto a ciprofloxacina, enoxacin, norfloxacina e amoxicillina/acido clavulanico; inoltre non altera la normale composizione del microbiota vaginale delle donne sane (192).

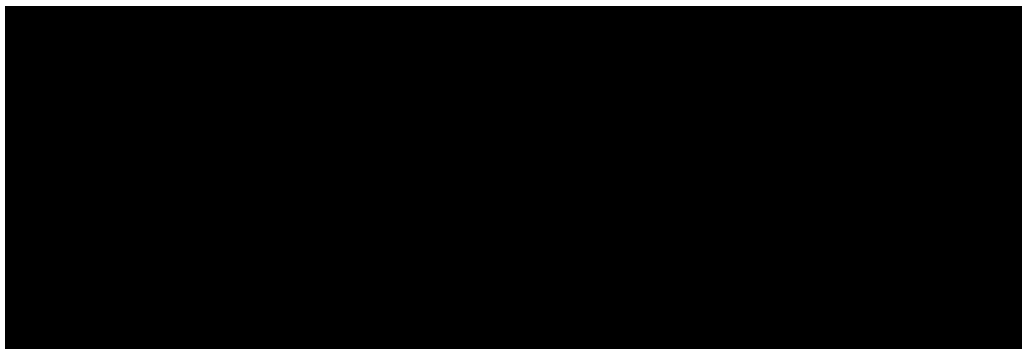


Figura 4-5. Chinoloni: decenni di scoperte .

Ciprofloxacin

La ciprofloxacin [acido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-di-idro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-chinolin-carbossilico] è stata introdotta in terapia alla fine degli anni ottanta. Le modifiche effettuate nella struttura dell'acido nalidissico, riguardano i gruppi farmacoforici, migliorando sia l'attività antibatterica sia le proprietà farmacocinetiche dell'antibiotico. Esse sono:

- la modifica della struttura naftiridinica (riduce il “binding” di legame con le proteine plasmatiche);
- l'introduzione di un atomo di fluoro in posizione 6, (incrementa l'attività della ciprofloxacin verso l'enzima DNA girasi e facilita il suo ingresso all'interno della cellula batterica);
- l'introduzione dell'anello piperazinico in posizione 7 (tempo di emivita più lungo);
- la sostituzione del gruppo etilico in N-1 con un gruppo ciclopropilico (potenziale incremento della potenza verso batteri Gram-positivi e Gram-negativi (193)).

Ciprofloxacin è attiva sui batteri Gram-negativi e su molti cocci Gram positivi; ha attività *antipseudomonas*. È anche attiva su *Acinetobacter* spp.; molto attiva su *H. influenzae*, *Moraxella*

catarrhalis, *Neisseria* spp., incluso ceppi di *N. gonorrhoeae* produttori di beta-lattamasi. Dopo somministrazione orale, viene ampiamente distribuita nei fluidi corporei, con concentrazioni tissutali e nei fagociti, paragonabili a quelle plasmatiche. Reazioni avverse sono rare, e sono rappresentate, qualora manifeste, da disturbi del tratto gastrointestinale (circa 3,4%), e rash (<1%). Disturbi del SNC, tipici dei chinoloni, sono stati registrati approssimativamente nell'1% dei pazienti trattati (194)

Si è dimostrata efficace nel trattamento di un ampio range di infezioni, incluse le UTIs, le osteomieliti causate da *Enterobacteriaceae*, infezioni gonococciche e prostatiti batteriche croniche (194).

Levofloxacin

La levofloxacin è l'isomero L del fluorochinolone ofloxacin. Gli studi *in vitro* hanno dimostrato uno spettro d'attività esteso verso microrganismi Gram positivi, Gram negativi ed anaerobi. Il farmaco è più attivo verso i Gram positivi rispetto a ciprofloxacin, ma meno attivo se confrontato ai fluorochinoloni di quarta generazione come gatifloxacin. La sua attività verso *S. pneumoniae* non è influenzata dalla presenza di penicillino-resistenza esibita da questi microrganismi.

Levofloxacin inibisce entrambi i *target* batterici dei chinoloni, cioè gli enzimi DNA girasi e Topoisomerasi IV. A seconda del tipo di batterio, il *target* primario potrà essere l'uno o l'altro enzima.

Levofloxacin è generalmente ben tollerata nei *trial* clinici. I principali effetti avversi sono, generalmente, transienti e moderatamente severi. I più frequenti sono farmaco-relati e sono stati registrati durante gli studi clinici di fase III. Essi sono: nausea (1,3%), diarrea (1,1%), vaginite (0,7%), prurito (0,5%), flatulenza (0,4%), rash (0,4%), etc (195) (196).

4.5 Meccanismo d'azione dei fluorochinoloni

I fluorochinoloni inibiscono due enzimi coinvolti nella sintesi del DNA batterico; sono entrambi topoisomerasi (di tipo 2) assenti nelle cellule eucariotiche, essenziali nella replicazione del DNA batterico (186) (197). Le DNA topoisomerasi sono responsabili della separazione della doppia elica del DNA batterico, dell'inserimento di un filamento nella rottura e, successivamente, nella ricostituzione dei filamenti originariamente separati (198). Specificatamente, i fluorochinoloni inibiscono la DNA girasi e la topoisomerasi IV.

4.5.1 DNA GIRASI E TOPOISOMERASI IV

Struttura

La DNA girasi è un tetramero costituito da due subunità A (circa 97KDa) e due subunità B (circa 90KDa), codificate dai geni *gyrA* e *gyrB*, rispettivamente. *gyrA* e *gyrB* sono locati a 48 e 83 min, rispettivamente, nel genoma di *E. coli*, ma in alcuni batteri sono adiacenti tra loro e vicini ad *oriA*; questa configurazione è conosciuta come QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) (199) (200).

La topoisomerasi IV è omologa alla DNA girasi, comprende anch'essa 4 subunità, due C e due E, codificate dai geni *parC* e *parE*, rispettivamente. Il *locus* della topoisomerasi IV è stato descritto per la prima volta nel 1990. In *S. aureus*, il *locus flq*, oggi riportato come *grlA*, è equivalente a *parC* di altri batteri come *S. pneumoniae*. In *E. coli*, il *locus nfxD* è oggi riconosciuto *parE*.

In *E. coli*, il gene *gyrA* ha il 36% d'identità ed il 60% di similarità con *parC*, a livello della sequenza aminoacidica; i geni *gyrB* e *parE* hanno invece il 42% d'identità ed il 62% di similarità (193).

Funzione

Topoisomerasi IV e DNA Girasi sono enzimi importanti in funzioni cellulari quali replicazione e riparazione del DNA, ricombinazione

e trascrizione di alcuni operoni, ma soprattutto sono indispensabili nel mantenimento della forma superavvolta del DNA batterico.

La DNA Girasi è un enzima esclusivamente batterico che facilita i cambiamenti conformazionali del DNA durante la replicazione, in particolare rimuove il superavvolgimento (superelica positiva) che si accumula sulla forcella di replicazione o come risultato della trascrizione di qualche gene (201). Introduce il superavvolgimento negativo (superelica negativa, una ogni 15-20 giri dell'elica del DNA) cosicchè il DNA può impaccarsi nella cellula, facilitando l'inizio della replicazione (202) (203). L'energia necessaria per realizzare il superavvolgimento è resa disponibile dall'idrolisi dell'ATP (reazione ATP-dipendente), processo nel quale è coinvolta la subunità B della Girasi. Il dominio di legame per l'ATP è sito sull'estremità N-terminale della subunità B (193). Il legame al DNA, la sua rottura e l'interazione tra le due subunità, avvengono su siti localizzati sulla subunità A. Il residuo tirosinico in 122 nell'estremità N-terminale di GyrA partecipa alla reazione di rottura-riunione del DNA ed è considerato il sito attivo dell'enzima DNA Girasi (203).

La topoisomerasi IV agisce nelle fasi terminali della replicazione, portando alla decatenazione (separazione) dei cromosomi figli nelle

cellule figlie. Essa rimuove le catene create dalla replicazione e quindi rompe i filamenti di DNA prima di completare il giro di replicazione, diversamente dalla Girasi che rompe le due catene di DNA soltanto dopo che il giro di replicazione è terminato.

Formazione del complesso ternario

Si pensa che i fluorochinoloni formino legami, sia con il DNA che con l'enzima, per costituire un complesso ternario chinolone-Girasi/Topoisomerasi IV-DNA (figura 4-6); la formazione di tale complesso sarebbe responsabile dell'inibizione della duplicazione del DNA ostacolando il movimento dell'apparato duplicativo lungo la forcella replicativa, formando un complesso DNA-topoisomerasi irreversibile. Il blocco dell'attività della DNA Girasi porta all'arresto della crescita cellulare e potenziale morte dei batteri sensibili. L'effetto battericida vero e proprio è il risultato dell'alterazione della crescita batterica e successiva lisi cellulare. Ciò potrebbe essere legato alla risposta SOS che rappresenta una reazione di adattamento del DNA al danno molecolare, al quale consegue la derepressione di diverse esonucleasi le quali attivano geni SOS, la cui espressione è responsabile dell'arresto della divisione cellulare. A concentrazioni più alte, la morte cellulare è

legata anche al rilascio di sequenze di DNA interrotte dai complessi intrappolati chinolone-Girasi e/o Topoisomerasi IV (Figura 4-6).

In definitiva, l'interazione della molecola chinolonica con il complesso DNA-Girasi, darebbe l'avvio ad una serie di fenomeni letali per il batterio, che rappresentano una rapida inibizione della duplicazione del DNA, arresto della crescita ed errori nelle reazioni difensive predisposte per eliminare e riparare i danni apportati al genoma (193).

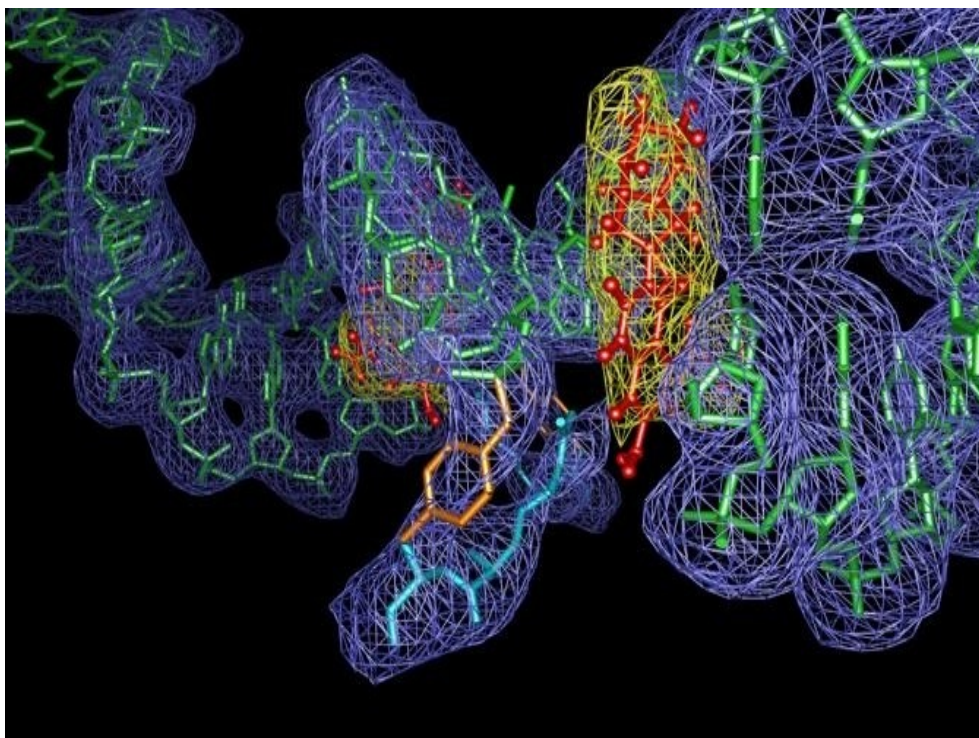


Figura 4-6. Formazione complesso ternario

4.6 Meccanismi di resistenza

Gli agenti antimicrobici devono entrare nelle cellule, trovare il loro *target*, distruggere la funzionalità cellulare ed eliminare il microrganismo infettante per conseguire un successo terapeutico. Ci sono molti meccanismi, a collocazione cromosomica o plasmidica, che contribuiscono a definire dei fenotipi di farmaco-resistenza in certi microrganismi infettanti. I potenziali meccanismi sono:

- il ridotto accumulo del farmaco, per mancato trasporto dello stesso dentro la cellula o per l'attivazione di sistemi pompa d'efflusso che, al contrario, lo espellono fuori dalla cellula;
- alterazione del *target* farmacologico, per mutazione dello stesso o per overespressione del *target* o mediante il superamento del *target* stesso (variando gli enzimi coinvolti nella via enzimatica su cui il farmaco interferisce);
- inattivazione del farmaco mediante enzimi che lo modificano, inattivandolo, o lo degradano.

Un microrganismo resistente ad un dato farmaco presenta almeno uno dei sopracitati meccanismi molecolari (193).

4.6.1 RESISTENZA AI FLUORCHINOLONI

Alterazioni del *target* molecolare mediante alterazione della DNA girasi e/o topoisomerasi IV, ed il ridotto accumulo intracellulare (per ridotta permeabilità e/o aumentata attività d'efflusso), sono i principali meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni (figura 4-7) (186) (194) (197) (199) (204).

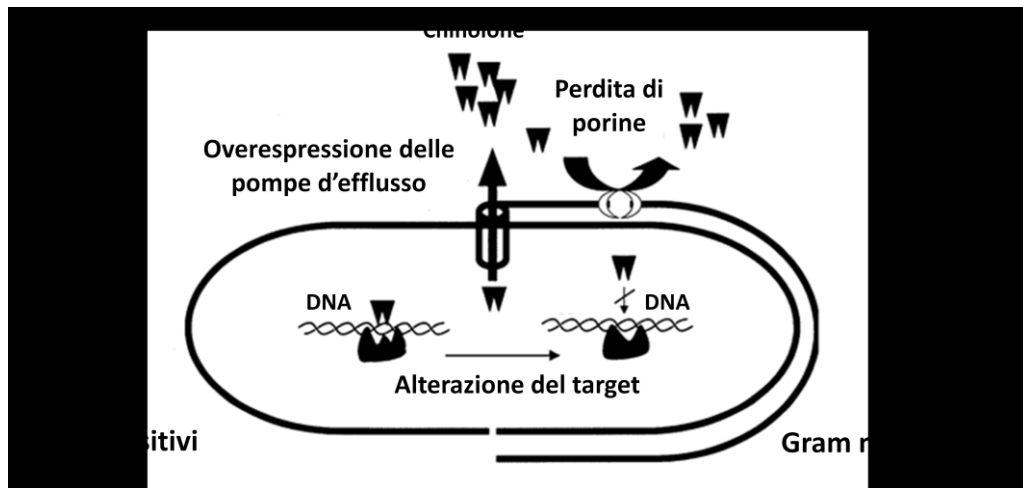


Figura 4-7. Rappresentazione dei meccanismi molecolari di resistenza ai chinoloni

Entrambi i meccanismi sono mediati a livello cromosomico. Ciononostante, sono stati descritti elementi mobili portanti il gene *qnr* che conferisce resistenza ai chinoloni (186).

Alterazione del *target*

Nonostante il fatto che i chinoloni agiscano contro la DNA girasi e la topoisomerasi IV, essi differiscono nelle relative attività contro questi enzimi. In studi recenti su *E. coli*, la DNA girasi si è rivelata

il *target* primario dell'attività chinolonica (205); l'attività sulla topoisomerasi IV sembra essere limitata, rappresentando perciò un *target* secondario (205). Più tardi, studi condotti su *S. aureus* hanno rivelato che la topoisomerasi IV rappresenta il *target* preferito in tali microrganismi Gram positivi (197) (206). Inoltre, studi effettuati su *E. coli* e *S. aureus* hanno dimostrato che si manifestano differenti livelli di resistenza ai chinoloni, a seconda che le alterazioni riguardino il *target* primario o secondario, o entrambi. Mutazioni nel *target* primario precedono quelle del secondario, selezionando la resistenza; mutazioni in entrambi i *target* portano ad elevati livelli di resistenza. Queste relazioni genetiche possono essere comprese sulla base delle relative sensibilità della DNA girasi o della topoisomerasi IV all'interno di un microrganismo. Blanche e coll. (207) hanno studiato le attività inibitorie di molteplici fluorchinoloni (ciprofloxacina, sparfloxacina, ofloxacina e norfloxacina) nei confronti degli enzimi DNA girasi e della topoisomerasi IV purificati, in ceppi di *E. coli* e di *S. aureus*. Per quanto riguarda *E. coli*, la concentrazione di chinolone necessaria ad inibire il 50% dell'attività della DNA girasi (IC50) era compresa tra 0.5 µg/mL e 1.5 µg/mL; al contrario, quella richiesta per inibire la topoisomerasi IV era più alta (da 2 µg/mL a 12 µg/mL). In *S.*

aureus, invece, la topoisomerasi IV è risultata molto più sensibile all'azione dei fluorochinoloni rispetto alla DNA girasi: i valori di IC50 erano compresi tra 4-10 µg/mL e 12-100 µg/mL, per la topoisomerasi IV e la DNA girasi, rispettivamente. Per entrambi i microrganismi, i valori di MIC osservati erano più strettamente relati ai valori di IC50 relativi agli enzimi più sensibili all'attività del farmaco, suggerendo che la MIC è determinata principalmente dall'attività inibitoria sul *target* primario.

Nei batteri Gram negativi, come *E. coli*, la subunità GyrA è il *target* preferenziale; nei Gram positivi come *S. aureus*, è la subunità ParC della topoisomerasi IV.

Alterazioni nella DNA girasi

Molte mutazioni osservate nel gene *gyrA* sono localizzate in una piccola regione amino-terminale della proteina GyrA (residui 67-106 in *E. coli*), chiamata QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) (211), vicino il residuo Tyr122, che lega in maniera transiente, il DNA clivato. Una simile QRDR è stata trovata in *parC*.

Mutazioni nei codoni 67, 81, 82, 83, 84, 87 e 106 di *gyrA* sono state considerate responsabili della resistenza in *E. coli* (tabella 4-2) (208). Recentemente, la posizione 51, una regione al di fuori della

QRDR, è stata proposta come nuova mutazione che causa una diminuita sensibilità ai chinoloni (199).

La presenza di una singola mutazione nelle sopracitate posizioni della QRDR di *gyrA*, generalmente, determina un elevato livello di resistenza all'acido nalidissico; per ottenere livelli di resistenza parimente elevati verso i fluorochinoloni, è necessaria la presenza di mutazioni addizionali in *gyrA* e/o *parC*.

La mutazione più frequentemente osservata in ceppi di *E. coli* chinolone-resistenti, è quella che interessa il codone 83 della *gyrA*. Comunque tale mutazione è stata trovata in isolati chinolone-resistenti appartenenti agli enterobatteri, come *Citrobacter freundii* o *Shigella* spp. o in patogeni quali *Neisseria gonorrhoeae* o *Acinetobacter baumannii* (199).

Negli isolati clinici, la seconda mutazione maggiormente osservata è quella al codone 87 di *gyrA*. Ceppi con una doppia mutazione nei codoni 83 e 87, esibiscono MIC più elevate verso i chinoloni. Ciò è vero per altri microrganismi Gram negativi, come *C. freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* o *N. gonorrhoeae*. Sostituzioni in posizioni equivalenti a quelle sopracitate, sono state frequentemente osservate anche in microrganismi Gram positivi (199).

Le mutazioni (tabella 4-2) osservate in *gyrB* di *E. coli*, riguardano le posizioni 426 e 447. La sostituzione alla posizione 426 sembra conferire resistenza a tutti i chinoloni, mentre quella nella posizione 447 porta ad un aumentato livello di resistenza verso l'acido nalidissico, e ad una più elevata sensibilità nei confronti dei fluorochinoloni. Mutazioni in posizioni equivalenti sono state descritte per altri microrganismi Gram positivi (199).

Tabella 4-2. Mutazioni descritte nelle subunità *gyrA* e *gyrB* di ceppi di *E. coli* chinolone-resistente (199)

	Codone	Aminoacido originario	Mutazione descritta
<i>GyrA</i>	51^b	Ala	Val
	67^b	Ala	Ser
	81	Gly	Cys, Asp
	82^b	Asp	Gly
	83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
	84	Ala	Pro, Val
	87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
	106^b	Gln	Arg, His
<i>GyrB</i>	426	Asp	Asn
	447	Lys	Glu

b: mutazioni descritte esclusivamente in mutanti ottenuti *in vitro*

In tabella 4-3 sono riportate mutazioni osservate in *gyrA* di differenti microrganismi Gram positivi e Gram negativi (204); in tabella 4-4 le mutazioni osservate in *gyrB*.

Tabella 4-3. Mutazioni in *gyrA* osservata in microrganismi Gram positivi e Gram negativi (204)

Microrganismo	Sostituzione aminoacidica ^(*)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gly81→Val Ser83→Leu Glu87→Gly
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Ser83→Ile; Ala67→Gly
<i>Campilobacter fetus</i>	Asp91→Tyr
<i>C. jejuni</i>	Ala70→Thr Thr86→Phe, Lys Asp90→Asn
<i>C. lari</i>	Thr86→Ile Asp90→Ala, Asn Pro104→Ser
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ser83→Leu, Tyr, Phe Asp87→His, Gly, Val, Ala, Asn
<i>E. faecalis</i>	Ser83→Ile, Ang, Asn Glu87→Gly
<i>Haemophilus influenza</i>	Ser84→Leu, Tyr Asp88→Asn, Tyr
<i>Helicobacter pylori</i>	Asn87→Lys Ala88→Val Asp91→Gly, Asn, Tyr, Asn, Val
<i>K. pneumonia</i>	Ser83→Tyr, Phe Asp87→Gly, Asn, Ala
<i>Mycobacterium avium</i>	Ala90→Val
<i>M. smegmatis</i>	Ala90→Val Asp94→Gly
<i>M. tuberculosis</i>	Gly88→Cys Ala90→Pro, Val Ser91→Pro Asp→Asn, His, Gly, Tyr, Ala
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Ser83→Phe; Asp87→asn Ser91→Phe, Tyr, Phe Asp95→Asn, Gly; Ala75→Ser
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thr83→Ile Asp87→Tyr, Asn, Gly, His
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ser83→Leu
<i>Serratia marcescens</i>	Ser83→Arg Asp87→Tyr
<i>Streptococcus pneumonia</i>	Ser84→Tyr, Phe Glu88→Lys
<i>Salmonella enteritidis</i>	Ser83→Phe
<i>S. hadar</i>	Ser83→Phe
<i>S. typhi</i>	Ser83→Phe
<i>S. typhimurium</i>	Ala67→Pro Gly81→Ser Ser83→Phe, Tyr, Ala Asp87→Gly, Tyr, Asn Ala119→Glu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Asp73→Gly Ser84→Leu, Ala, Phe, Val Ser85→Pro Glu88→Gly, Lys
<i>S. epidermidis</i>	Ser84→Phe
<i>S. haemolyticus</i>	Ser84→Leu

La posizione del codone è basata sulla sequenza *gyrA* di *E. coli*

Tabella 4-4. Mutazioni in *gyrB* (204)

Microrganismo	Sostituzione amminoacidica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Asp437→Asn Arg458→Gln Pro456→Ser
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Glu474→Lys
<i>Salmonella typhimurium</i>	Ser464→Tyr

Alterazioni nella topoisomerasi IV

Nel gene *parC* di *E. coli*, le sostituzioni più frequenti si verificano ai codoni 80 e 84 (tabella 4-5) (199).

Tabella 4-5. Mutazioni descritte in *parC* e *parE* in ceppi di *E. coli* chinolone-resistenti (199)

Codone	Amminoacido originale	Mutazione descritta
<i>ParC</i>		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
<i>parE</i>		
445	Leu	His

In *E. coli*, è stata descritta anche un'altra sostituzione (Gly78→Asp) sia in isolati clinici che in ceppi mutanti ottenuti *in vitro* (199). La sostituzione Asp79→Ala nel gene *parC* è stata descritta in ceppi mutanti di *Shigella flexneri*. Altre sostituzioni nel medesimo codone sono state osservate per altri microrganismi sia Gram negativi (come *Haemophilus influenzae*: Asp79→Asn) e Gram positivi (come *Streptococcus pneumoniae*: Asp79→Asn). Comunque, sono

state osservate, contemporaneamente, altre mutazioni in *gyrA* o *parC* (199).

Una mutazione descritta solo in *grlA* di ceppi di *S. aureus*, riguarda il codone 116 (Ala116→Glu o Pro). Altre mutazioni riscontrate in questo microrganismo riguardano i codoni 23 (Lys23→Asp), 69 (Asp69→Tyr), 176 (Ala176→Gly) o 451 (Pro451→Gln). Comunque, quale sia il reale effetto che esse hanno sulla sensibilità ai chinoloni, non è stato ancora determinato.

Il ruolo delle sostituzioni che si verificano in *parE*, nella diffusione della chinolone-resistenza in microrganismi Gram negativi, sembra irrilevante. Infatti, solo la sostituzione Leu445→His è stata descritta in *parE* di un singolo ceppo mutante di *E. coli*. Alterazioni in questa subunità sono state descritte sia in isolati clinici che in ceppi chinolone-resistenti ottenuti in laboratorio. Per esempio, in *S. pneumoniae*, le mutazioni osservate sono Asp435→Asn e His102→Tyr; in *S. aureus* sono Pro25→His, Glu422→Asp, Asp432→Asn o Gly, Pro451→Ser o Gln e Asn470→Asp.

Nelle tabelle 4-6 e 4-7 sono riportate le mutazioni osservate in *parC/grlA* e *parE/grlB*, rispettivamente, per microrganismi diversi da *E. coli* (tabella 4-5).

Tabella 4-6. Mutazioni in *parE/grlB* (199)

Microrganismo	Sostituzione amminoacidica
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Asp435→Asn Pro454→Ser
<i>Staphylococcus aureus</i>	Asp432→Val Asn470→Asp

Tabella 4-7. Mutazioni in *parC/grlA* (199)

Microrganismo	Sostituzione amminoacidica
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ser80→Leu Glu84→Lys
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ser80→Ile Glu84→Gly, Lys
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ser80→Ang, Ile Glu84→Ala
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ser84→Ile Glu88→Lys
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ser80→Ile, Ang Glu84→Gly, Lys
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Asp86→Asn Ser87→Ile Ser88→Pro Gly85→Cys Glu91→Gly Ala116→Leu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ser80→Leu Glu84→Lys
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ser80→Phe, Tyr Ser81→Pro Glu84→Lys Ala116→Pro, Glu
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ser79→Tyr, Phe Asp83→Gly Asp84→His Ser80→Tyr

Alterazione del *target* nei lattobacilli chinolone-resistenti?

Ad oggi, ci sono solo due lavori descritti in letteratura (209) (210) che hanno caratterizzato geneticamente la resistenza alla ciprofloxacina in lattobacilli chinolone resistenti. I ceppi studiati sono probiotici e “ceppi starter” destinati all’industria alimentare; nessuno studio è stato condotto su ceppi isolati dalla cavità orale dell’uomo.

Nello studio di Hummel e coll. (2007) (209) sono state rilevate mutazioni nelle QRDR di *gyrA* e *parC* e più precisamente: la sostituzione Glu87→Leu nella GyrA di un ceppo di *L. acidophilus* BFE 7429 e mutazioni in posizione 74, 84 e 88 nella relativa ParC. Queste sostituzioni non sono però state associate all’aumento di chinolone-resistenza in altri microrganismi.

Nello studio di Fukao e coll. (2009) (210), sono state sequenziate le QRDR di *gyrA* e *parC* di un ceppo probiotico, *L. brevis* KB290, fin dal 1993 utilizzato in Giappone nei cibi fermentati e nelle polveri liofilizzate. Nessuna mutazione è stata osservata. Questi risultati hanno spinto gli studiosi ad affermare che livelli di resistenza moderatamente elevati verso ciprofloxacina, possono derivare da una connotazione intrinseca, come la struttura della parete cellulare, la sua permeabilità o sistemi d’efflusso.

Diminuito *uptake*

Il diminuito *uptake* del chinolone può essere associato a due fattori: un incremento nell'impermeabilità cellulare o un'overespressione di pompe d'efflusso.

Per raggiungere il loro *target* nel citoplasma, i fluorochinoloni devono attraversare la membrana citoplasmatica e, nei batteri Gram negativi, anche la membrana esterna. Essi sono comunque sufficientemente piccoli, tali da potere attraversare tali barriere in due differenti modi: attraverso specifiche porine (proteine che formano canali di diffusione) o per diffusione nel doppio strato fosfolipidico. Una scarsa diffusione del farmaco può essere attribuita al suo livello di idrofobicità: soltanto i chinoloni con elevato indice d'idrofobicità possono agevolmente attraversare, per diffusione passiva, la membrana cellulare; quelli meno idrofobi devono utilizzare il passaggio mediato dalle porine. Quindi, alterazioni nel contenuto di porine o alterata composizione lipopolisaccaridica della membrana, possono alterare il profilo di sensibilità ai chinoloni (199) (206).

✓ **Diminuita espressione di porine**

L'alterazione della permeabilità di membrana è per lo più associata alla diminuita espressione di porine. Ciò è stato ampiamente descritto in *E. coli* ed in altri microrganismi Gram negativi (199).

La membrana esterna di *E. coli* possiede tre porine principali (OmpA, OmpC ed OmpF). La diminuita espressione di OmpF è relata all'aumento della resistenza per alcuni chinoloni, ma non influenza le MIC di altri, come tosufloxacina ed sparfloxacina. Comunque, la sua ridotta espressione porta alla riduzione della sensibilità verso altri agenti antibatterici come i beta-lattamici, le tetraciline ed il cloramfenicolo (199).

Alcuni loci cromosomici come MarRAB (costituito da tre geni: *marR* che codifica una proteina repressore, *marA* che codifica un'attivatore della trascrizione e *marB* che codifica una proteina la cui funzione non è nota) o SoxRS (questo operone codifica due proteine, SoxR, una proteina regolatoria, e SoxS, un'attivatore della trascrizione) regolano sia i livelli di espressione di OmpF sia di alcune pompe d'efflusso in *E. coli* (199).

È stato anche dimostrato che cloramfenicolo, tetraciclina e altri substrati come il salicilato, possono indurre l'espressione di *marA*, con conseguente aumento dell'espressione di un regolatore

antisense, *micF*, che induce una repressione post-trascrizionale nella sintesi di OmpF. L'espressione di *micF* può essere regolato anche dall'operone SoxRS (199).

La composizione della membrana esterna di alcuni microrganismi come *A. baumannii* o *P. aeruginosa*, è stata associata alla loro resistenza intrinseca verso i chinoloni. Ceppi *wild-type* di *A. baumannii* hanno MIC per ciprofloxacina che ricadono nell'intervallo 0.125-1 µg/mL. Al contrario, ceppi *wild-type* di *E. coli* hanno range di MIC più bassi (0.007-0.25 µg/mL). Questo risultato viene interpretato ammettendo che si tratti di resistenza intrinseca o dell'overespressione di pompe d'efflusso. La membrana esterna di *P. aeruginosa* ha una permeabilità non selettiva per piccole molecole idrofobiche: ciò giustifica la resistenza intrinseca di tali microrganismi per i chinoloni (199).

✓ **Pompe d'efflusso**

Sia i microrganismi Gram positivi, che quelli Gram negativi (tabella 4-8) (211), hanno sistemi d'efflusso, non specifici ed energia-dipendenti, alcuni espressi costitutivamente, altri controllati da sistemi regolatori o indotti da mutazioni. In *E. coli*, la pompa d'efflusso AcrAB-TolC gioca un ruolo importante nell'estrusione dei chinoloni dalla cellula e ha controlli multipli. Mutazioni nel

gene *acrR* (repressore di *acrAB*) aumentano l'attività della pompa. Al contrario, mutazioni che inattivano *marR* (un repressore di *marA*) fanno sì che *marA* possa attivare *acrAB*, *tolC* e un gene che diminuisce la traduzione di *ompF*, causando, come risultante dell'azione di tutti questi controlli, la riduzione dell'ingresso del farmaco e aumento della sua estrusione.

In *Pseudomonas aeruginosa* sono stati identificati, sia geneticamente che biochimicamente, diversi operoni per le pompe d'efflusso (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY) che pompano fuori dalla cellula i chinoloni e altri agenti antibatterici (199) (211). Questi operoni sono codificati dai geni *mex* (*Multiple Efflux*). Il più studiato è l'operone *mexA**mexB*-OprM, che media la resistenza a ciprofloxacina, acido nalidissico, tetraciclina e cloramfenicolo. MexB, è la pompa d'efflusso, immersa nella membrana citoplasmatica; MexA è una proteina accessoria che lega MexB alla membrana esterna. OprM è una proteina della membrana esterna (204).

Pompe d'efflusso sono state trovate anche in microrganismi Gram positivi: quella meglio caratterizzata è NorA, presente in *S. aureus* (212).

NorA è una pompa d'efflusso ATP-dipendente capace di estrudere dalla cellula chinoloni idrofilici come enoxacina e norfloxacin, ma non interferisce con l'accumulo di molecole idrofobiche come la sparfloxacin. Inoltre riesce ad espellere altre molecole quali coloranti basici, puromicina e cloramfenicolo. Due pompe d'efflusso relate a NorA, chiamate Bmr e Blt, sono state trovate in *Bacillus subtilis*. Altre pompe simili, sono state trovate in altri microrganismi Gram positivi, come *S. pneumoniae* (PmrA) ed *Streptococcus* gruppo *viridans* (199).

Ad oggi, esistono diverse sostanze capaci di inibire l'azione di alcune pompe d'efflusso quali la reserpina o CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilidrazone).

Tabella 4-8. Pompe d'efflusso nei batteri Gram positivi e Gram negativi (194) (197)

Microrganismo	Sistema d'efflusso
Gram negativi	
<i>A. baumannii</i>	AdeABC
<i>C. jejuni</i>	CmeABC
<i>E. coli</i>	AcrAB
	AcrEF
	EmrAB
	MdfA
	YdhE
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM
	MexCD-OprJ
	MexEF-OprN
	MexXY-OprM
<i>S. maltophilia</i>	SmeDEF
<i>Vibrio colera</i>	VceAB
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM
Gram positivi	
<i>B. subtilis</i>	Blt
	BmrA
	Bmr3
<i>S. aureus</i>	NorA
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA

5 Scopo del lavoro

Lo scopo del presente studio è stato quello di identificare, mediante tecniche molecolari, lattobacilli di origine umana, isolati da tamponi orali. Tale obiettivo si è realizzato attraverso l'uso di metodiche basate sulla PCR. Questa tecnica è stata utilizzata in combinazione con la tecnica ARDRA, sfruttando come *target* molecolare il gene *16S rDNA*. La metodica ha rivelato dei limiti sperimentali circa la discriminazione delle specie appartenenti al gruppo *L. casei* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*), in quanto i profili di restrizione ottenuti dalla digestione con le endonucleasi utilizzate, sono stati indistinguibili. Per tale ragione, sono state utilizzate *multiplex* PCR che, sfruttando altri *target* molecolari (*16S-ITS-23S rDNA* e gene *tuf*), hanno identificato in maniera univoca le specie del gruppo *L. casei*.

In una seconda fase dello studio, sono stati determinati fenotipicamente, mediante test di sensibilità *in vitro*, i profili di sensibilità a diversi agenti antibatterici. In particolare, su una selezione di ceppi chinolone-resistenti, è stato effettuato lo studio molecolare delle QRDR di *gyrA* e *parC*, mediante PCR e sequenziamento.

6 *Materiali e metodi*

6.1 Isolamento e coltivazione

I ceppi di *Lactobacillus* in oggetto sono stati isolati da tamponi orali umani. La semina dei tamponi è avvenuta su piastre di Columbia agar con il 5% di sangue di montone. Successivamente, sono state selezionate differenti tipi di colonie; in particolare, le colonie bianche di piccole o medie dimensioni, non emolitiche, catalasi negative sono state trapiantate su MRS agar e su LSM agar. Ciascuna colonia è stata visualizzata mediante colorazione Gram, prima di esserne allestita una subcoltura.



Figura 6-1. Crescita di *Lactobacillus gasseri* in LSM agar

In particolare, 45 ceppi di lattobacilli sono stati oggetto del presente studio. Per tutti i ceppi isolati, sono state allestite delle subcolture in LSM agar (Isosensitest agar 90%, MRS agar 10%) (217); la crescita è avvenuta a 37°C in microaerofilia, per 24-48 ore. I ceppi sono stati crioconservati in MRS con glicerolo al 20%, a -80°C.

6.2 Test di sensibilità

Sono state utilizzate differenti metodiche per la determinazione dei *pattern* di sensibilità agli agenti antibatterici studiati; basati sulla diffusione in agar (*disc diffusion test*, E-test®) (figura 6-2) e sulla microdiluzione in terreno liquido. Le procedure sperimentali hanno comunque condiviso la modalità di preparazione dell'inoculo e il tipo di terreno utilizzato, sia esso solido o liquido.

In particolare, nel caso del test di diffusione da disco e dell'E-test®, è stata preparata una sospensione batterica con torbidità pari allo 0,5 McFarland (ca. $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) per *direct colony suspension*; questa è stata successivamente strisciata su piastre di LSM agar, lungo le tre direzioni dello spazio, per ottenere una crescita confluyente ed omogenea. Le piastre contenenti i dischi o le strisce sono state incubate a 37°C, in aria per 20-24 ore. I dischi di antibiotico utilizzati sono stati: eritromicina (15µg), clindamicina

(2µg), gentamicina (10µg), amoxicillina (25µg), penicillina (10µg), ciprofloxacina (5µg) e vancomicina (30µg).

Gli E-test® utilizzati sono stati: penicillina (0,015-256µg/mL, Oxoid), amoxicillina/acido clavulanico (0,015-256µg/mL, Oxoid), cefixime (0,016-256µg/mL, Biomerieux), cefuroxime (0,016-256µg/mL, Biomerieux), cefalotina (0,016-256µg/mL, Biomerieux), rifampicina (0,015-256µg/mL, Oxoid), claritromicina (0,016-256µg/mL, Biomerieux), azitromicina (0,016-256µg/mL, Biomerieux), ciprofloxacina (0,002-32µg/mL, Oxoid) e levofloxacina (0,002-32µg/mL, Oxoid).

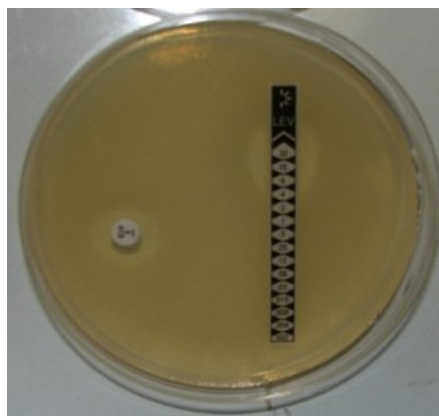


Figura 6-2. Etest su LSM agar

La determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC, *Minimum Inhibitory Concentration*) mediante saggio di microdiluzione in terreno liquido, è stata effettuata in micropiastre in polistirene a 96 pozzetti (Bibby Sterilin). Il terreno utilizzato non è stato il CAMHB (*Cation adjusted Muller Hinton Broth*, con 2,5-

5% di sangue lisato di cavallo), come riportato nel CLSI M45-P (221), bensì LSM brodo (213). La procedura sperimentale è stata così eseguita:

- Preparazione inoculo: per ciascun ceppo, è stata allestita una sospensione batterica pari allo 0,5 McFarland, per *direct colony suspension*; di ciascuna, sono state preparate diluizioni in LSM brodo, allo scopo di ottenere una concentrazione finale (nella micropiastra) di ca. 10^3 - 10^4 CFU/mL.
- Preparazioni diluizioni scalari dell'antibiotico: le *stock solution* degli antibiotici studiati (vancomicina, eritromicina e clindamicina), sono state preparate in accordo a quanto riportato nel CLSI. In particolare, le polveri sono state dissolte in acqua sterile per iniettabili, per quanto riguarda vancomicina e clindamicina, in etanolo al 95% per eritromicina, ottenendo concentrazioni finali di 5120 μ g/mL per ciascuna. Tutte le diluizioni scalari sono state allestite in macrovolumi, seguendo lo schema di diluizioni proposto dal CLSI. Il range di concentrazione studiato per i tre antibiotici è stato 64 μ g/mL-0,125 μ g/mL).

- Riempimento delle micropiastre: sono stati inoculati 100 μ L di ciascuna diluizione dalla colonna 2 alla colonna 11, con ripetibilità otto per ciascun ceppo. Nella colonna 1 è stato inoculato il controllo di sterilità (solo LSM brodo), nella colonna 12 il controllo di crescita (il ceppo inoculato in LSM brodo in assenza di antibiotico). Le micropiastre sono state incubate a 37°C, in aria, per 24-48 ore. La MIC è stata letta come la più bassa concentrazione dell'antibiotico che ha inibito la crescita del microrganismo, ovvero la più alta diluizione.

In accordo al CLSI M45-P, è stata determinata la MIC del ceppo di controllo *S. pneumoniae* ATCC 49619 (221).

6.3 Estrazione del DNA

Ciascun ceppo è stato inoculato in LSM brodo a 37°C overnight; le brodocolture sono state centrifugate a 3000-4000rpm per 30 minuti, a temperatura ambiente. Il sovrantante è stato scartato ed il pellet batterico è stato sospeso in 5ml di PBS pH7 (*phosphate buffered saline*). Sono stati effettuati 3 lavaggi complessivi. In ciascuna provetta è stata addizionata una soluzione di lisozima (ad una concentrazione di 100mg/mL). I campioni sono stati perciò incubati

per 1 ora a 37°C (fino a dissolvenza del pellet). Sono stati aggiunti, quindi, 200µl di soluzione sodiododecilsolfato (SDS), 100µl di soluzione proteinasi K (ad una concentrazione di 10mg/mL). I campioni sono stati incubati a 55°C per tutta la notte. Al mattino seguente è stato aggiunto NaCl saturato (una quantità pari ad 1/3 del volume totale), proseguendo con una nuova incubazione per 20 minuti a 40°C. Sono stati addizionati 3 volumi di tampone TE (Tris/EDTA); i campioni sono stati centrifugati a 3500 rpm a 4°C. Il supernatante ottenuto è stato distribuito in apposite eppendorf da 1,5mL che sono state centrifugate a 13000rpm per 30 minuti a 4°C. Prelevato il supernatante, è stato effettuato un lavaggio del pellet aggiungendo 3 volumi di EtOH al 95%. È stata perciò evidente la reazione di flocculazione del DNA presente nel mezzo. Il DNA recuperato è stato lavato in EtOH al 70%, e asciugato all'aria. Il DNA è stato infine risospeso in 1mL di tampone TE e conservato a 4°C (214).

Analisi spettrofotometrica

I campioni di DNA ottenuti sono stati sottoposti ad un'analisi spettrofotometrica (spettrofotometro Ultrospec 2000). Nell'apposita cuvetta portacampione sono stati versati 100µl di soluzione TE contenente il DNA. Si è perciò effettuata una lettura

dell'assorbanza, relativa ad ogni campione di DNA estratto, a due differenti valori di lunghezza d'onda (λ), 260nm e 280nm. Dal rapporto d'assorbanza è stato dedotto il grado di purezza del campione. I valori sono stati tutti nell'intorno di 1,8.

I campioni di DNA sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1%, colorato con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e osservato su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™).

6.4 PCRs, *Polimerase Chain Reactions*

Amplificazione 16S rDNA/RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Per ciascun campione è stata allestita una *mix* di reazione (100µL), contenente i seguenti reattivi:

- ✓ Tampone (10mM tris HCl, pH 8, 50mM KCl, 1mM EDTA; Biotools™), privo di magnesio cloruro, alla concentrazione 1X;
- ✓ MgCl₂ (Biotools™), 3mM;
- ✓ dNTP (*mix*, TaKaRa™), 0,2mM;
- ✓ universal *primer*, 7Fw (5'-AGAGTTTGATC/TA/CTGGCTCAG-3') e 1510Rev (5'-ACGGC/TTACCTTGTTACGACTT-3'), 0,4mM ciascuno (Invitrogen™);
- ✓ Taq Polimerasi (Biotools™), 1,5U;
- ✓ DNA, 15-20ng;
- ✓ Acqua sterile per iniettabili, q.b. per portare a volume.

Il programma di amplificazione utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti; trenta cicli (denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 52°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 1,5 minuti); allungamento finale a 72°C per 10 minuti (215).

Gli amplificati ottenuti (circa 1500bp) (foto 6-1) sono stati visualizzati tramite corsa elettroforetica (70V) su gel d'agarosio all'1,5% in tampone TAE 1X (Tris, Acido acetico, EDTA), colorati con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e osservati su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™). Il DNA *ladder* utilizzato è stato 1Kb (BioRad™).

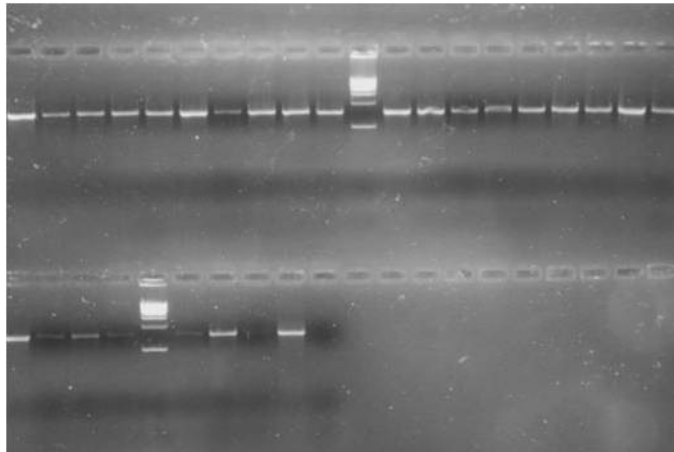


Foto 6-1. Corsa elettroforetica amplificati *16S rDNA*: pozzetti 1-10/11-20 (I fila) campioni; pozzetti 1-4/6-10 (II fila) campioni; pozzetti 11 (I fila)/5 (II fila) DNA *ladder* 1Kb (BioRad™).

Gli amplificati sono stati digeriti a 37°C per 2 ore, con i seguenti enzimi di restrizione: *HaeIII*, *AluI*, *MspI* (Invitrogen™). La *mix* di digestione (20µL) conteneva 10µL di prodotto PCR, 1U di endonucleasi di restrizione con appropriato *buffer* (1X) e acqua ultrapura q.b. per portare a volume. Il prodotto digerito è stato interamente caricato su gel d'agarosio all'1%, colorato con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e visualizzato su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™). I profili di restrizione dei ceppi da identificare sono stati paragonati con quelli ottenuti per i ceppi tipo di *Lactobacillus* appartenenti al catalogo DSMZ (tabella 6-1). Dopo reidratazione mediante apposito protocollo fornito dal DSMZ, i ceppi tipo sono stati sottoposti a tutte le stesse procedure sperimentali (estrazione del DNA, PCR/RFLP, etc) descritte per i lattobacilli oggetto di studio.

I siti di taglio di *HaeIII*, *AluI* ed *MspI* sono rispettivamente: 5'...GC↑CC...3', 5'...AG↑CT...3' e 5'...C↑CGG...3'.

Tabella 6-1. Descrizione ceppi tipo DSMZ

Descrizione ceppo	Numero DSMZ	Altri numeri di collezione
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20079	ATCC 4356
<i>Lactobacillus antri</i>	16041	CCUG 48456
<i>Lactobacillus brevis</i>	20054	ATCC 14869
<i>Lactobacillus casei</i>	20011	ATCC 393
<i>Lactobacillus colohemini</i>	14050	CCUG 44007
<i>Lactobacillus concavus</i>	17758	AS 1.5017
<i>Lactobacillus crispatus</i>	20584	ATCC 33820
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	20081	ATCC 11842
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	20074	ATCC 9649
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus</i>	15996	LMG 22083
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis</i>	20072	ATCC 12315
<i>Lactobacillus fermentum</i>	20052	ATCC 14931
<i>Lactobacillus gasseri</i>	20243	ATCC 33323
<i>Lactobacillus gastricus</i>	16045	CCUG 48454
<i>Lactobacillus intestinali</i>	6629	ATCC 49335
<i>Lactobacillus jensenii</i>	20557	ATCC 25258
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	10533	ATCC 33200
<i>Lactobacillus oris</i>	4854	ATCC 49062
<i>Lactobacillus parabuckneri</i>	5707	ATCC 49374
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	5622	ATCC 25302
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	10667	CIP 104668
<i>Lactobacillus plantarum</i>	20174	ATCC 14917
<i>Lactobacillus reuteri</i>	20016	ATCC 23272
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	20021	ATCC 7469
<i>Lactobacillus salivarius</i>	20555	ATCC 11741
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	5837	ATCC 49540
<i>Lactobacillus zeae</i>	20178	ATCC 15820
<i>Weissella confusa</i>	20196	ATCC 10881

Le foto di seguito riportate raffigurano le corse elettroforetiche di una digestione con *HaeIII* (foto 6-2 e 6-3) e di una con *MspI* (foto 6-4).

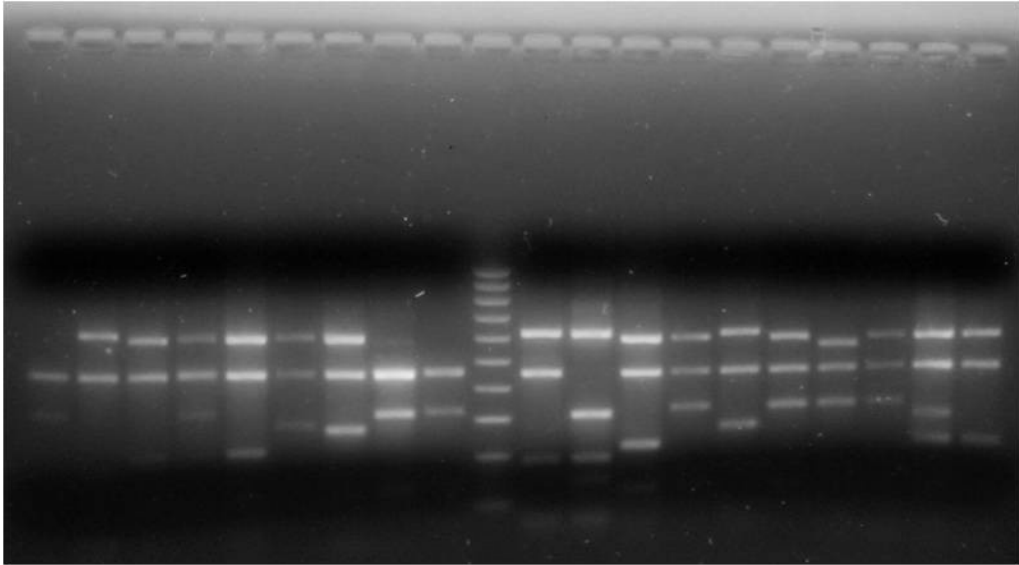


Foto 6-2. Elettroforesi digestione con HaeIII: pozzetti 1-5/18-20 campioni; pozzetto 6 *L. zeae* DSM20178; pozzetto 7 *L. salivarius* DSM20555; pozzetto 8 *L. jensenii* DSM20557; pozzetto 9 *L. intestinalis* DSM6629; pozzetto 10 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetto 11 *L. coleohominis* DSM14050; pozzetto 12 *L. antri* DSM16041; pozzetto 13 *L. gastricus* DSM16045; pozzetto 14 *L. paracasei subsp. paracasei* DSM5622; pozzetto 15 *L. reuteri* DSM20016; pozzetto 16 *L. rhamnosus* DSM20021; pozzetto 17 *L. plantarum subsp. plantarum* DSM 20174

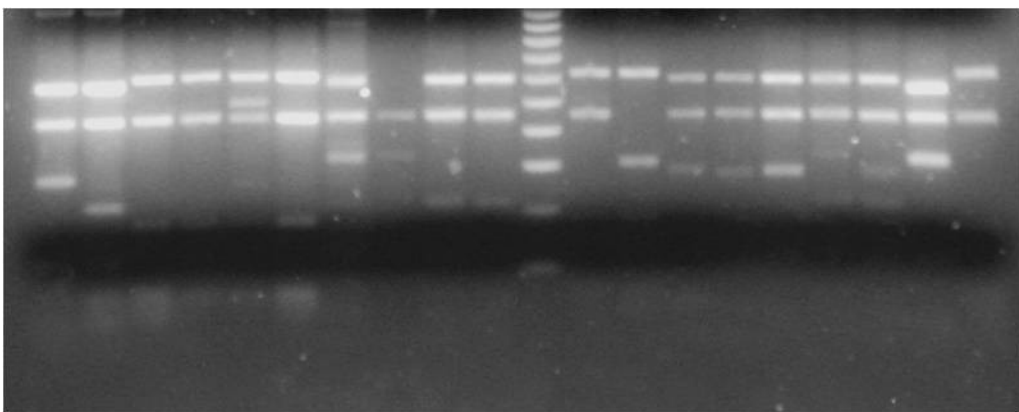


Foto 6-3. Elettroforesi digestione con HaeIII: pozzetti 1-7/ 16-19 campioni; 8 *L. gasseri* DSM20243; pozzetto 9 *L. fermentum* DSM20052; pozzetto 10 *L. gastricus* DSM16045; pozzetto 11 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetto 12 *L. vaginalis* DSM5837; pozzetto 13 *L. antri* DSM16041; pozzetto 14 *L. parabuchneri* DSM5707; pozzetto 15 *L. brevis* DSM20054; pozzetto 20 *L. coleohominis* DSM14060.

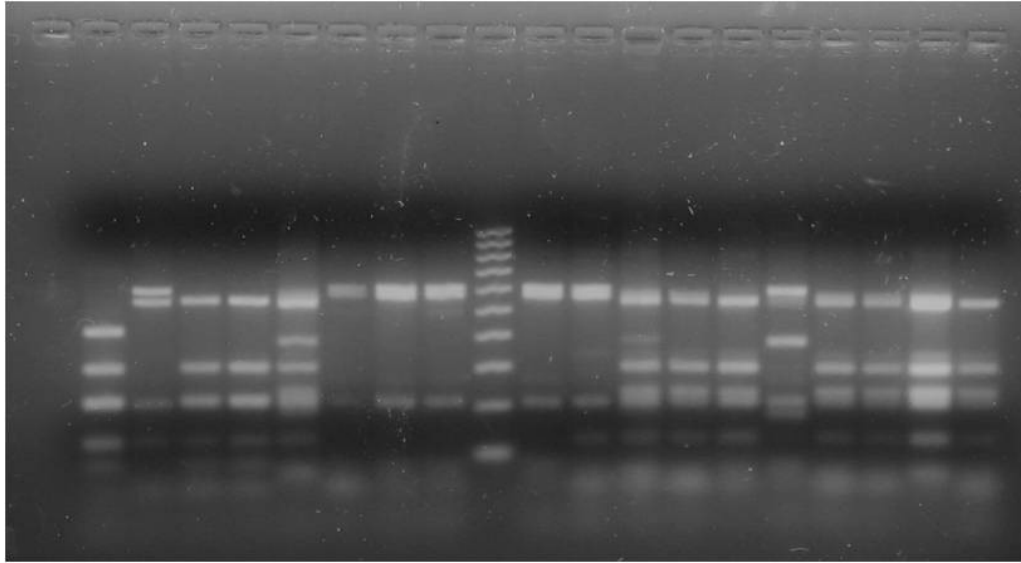


Foto 6-4. Elettroforesi digestione con MspI: pozzetti 3-7/ 13-20 campioni; pozzetto 2 *L. reuteri* DSM 20016; pozzetto 8 *L. rhamnosus* DSM 20021; pozzetto 9 *L. paracasei subsp. paracasei* DSM5622; pozzetto 10 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetto 11 *L. casei* DSM20011 ; pozzetto 12 *L. plantarum subsp. plantarum*.

Le mappe di restrizione virtuali, ottenute sulla base delle sequenze *16S rDNA* trovate in *NCBI* (55), sono riportate in tabella 6-2.

Tabella 6-2. Mappe di restrizione virtuali dei geni *16S rRNA* depositati in NCBI (220)

Specie	gene <i>16S rRNA</i> (bp)	HaeIII (numero tagli) frammenti (bp)	MspI (numero tagli) frammenti (bp)	AluI (numero tagli) frammenti (bp)
<i>L. acidophilus</i>	1553	(8) 242-35-44-22-139-459-457-55-100	(6) 177-389-606-11-211-53-106	(9) 59-146-20-33-186-429-221-44-208
<i>L. antri</i>	1520	(7) 62-191-78-620-312-145-55-57	(8) 24-552-88-518-11-71-48-92-116	(7) 268-186-429-105-102-189-204-37
<i>L. brevis</i>	1430	(5) 227-44-22-618-457-82	(6) 516-68-538-11-211-53-33	(5) 823-105-102-207-193
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	1561	(5) 280-44-22-598-457-160	(6) 180-389-289-317-11-211-164	(7) 64-164-33-186-636-221-44-213
<i>L. casei</i>	1517	(4) 320-22-598-457-120	(5) 565-606-11-211-53-71	(5) 224-33-615-207-207-231
<i>L. colehominis</i>	1564	(7) 65-191-78-23-596-457-55-99	(8) 27-551-68-234-304-11-211-158	(6) 271-494-120-105-102-207-265
<i>L. concavus</i>	1528	(5) 313-22-139-458-457-139	(5) 558-605-11-211-53-90	(7) 217-33-615-206-207-14-169-67
<i>L. confusus</i>	1525	(2) 347-22-1156	(7) 437-155-376-11-211-53-52	(6) 96-188-370-245-207-207-212
<i>L. crispatus</i>	1518	(7) 226-79-22-139-459-457-55-81	(6) 161-389-606-11-211-53-87	(8) 189-20-33-219-615-207-221-233
<i>L. fermentum</i>	1364	(5) 67-225-44-22-598-408	(6) 29-552-68-234-304-11-166	(5) 273-186-429-105-269
<i>L. gasseri</i>	1747	(5) 405-22-139-459-457-261	(7) 266-388-68-538-11-211-53-212	(8) 40-15-85-206-186-429-207-275-314
<i>L. gastricus</i>	1550	(6) 48-224-44-22-598-457-157	(6) 10-551-302-304-11-211-161	(5) 253-186-429-105-102-475
<i>L. iners</i>	1539	(5) 276-44-22-598-457-142	(8) 177-388-68-96-442-11-211-53-93	(6) 257-186-217-212-207-265-195
<i>L. intestinalis</i>	1513	(6) 306-22-139-459-457-55-75	(7) 162-389-59-547-11-211-53-81	(9) 44-134-32-33-186-429-207-221-44-183
<i>L. jensenii</i>	1496	(5) 288-22-139-459-457-131	(5) 144-389-606-11-211-135	(10) 26-40-88-38-32-187-429-207-221-44-184
<i>L. johnsonii</i>	1487	(5) 302-22-139-459-457-108	(7) 159-388-68-538-11-211-53-59	(6) 33-206-186-429-207-265-161
<i>L. oris</i>	1359	(7) 134-78-234-384-311-145-55-18	(9) 457-88-375-140-11-71-48-92-60-17	(4) 149-364-455-186-205
<i>L. parabuchneri</i>	1497	(5) 272-44-22-598-458-103	(6) 561-68-539-11-211-53-54	(4) 253-615-208-207-214
<i>L. paracasei</i>	1558	(4) 153-457-598-22-328	(5) 102-53-211-11-606-575	(5) 264-207-207-615-33-232
<i>L. paraplantarum</i>	1502	(5) 309-22-564-34-457-116	(4) 554-606-11-211-120	(5) 246-615-105-102-207-227
<i>L. plantarum</i>	1555	(5) 327-22-564-34-457-151	(4) 572-606-11-211-155	(6) 213-51-615-105-102-207-262
<i>L. reuteri</i>	1571	(5) 67-269-620-457-55-103	(8) 29-125-427-88-214-304-11-211-162	(7) 273-186-429-105-102-195-14-269
<i>L. rhamnosus</i>	1540	(4) 306-22-597-457-158	(5) 550-606-11-211-53-109	(5) 210-33-614-207-207-269
<i>L. salivarius</i>	1570	(4) 279-44-620-457-170	(7) 568-68-538-11-211-53-117-4	(4) 875-207-207-268-13
<i>L. vaginalis</i>	1541	(6) 42-190-78-621-457-55-98	(6) 555-89-214-304-11-211-157	(7) 247-186-430-105-102-207-231-33
<i>L. zeae</i>	1559	(4) 324-22-598-457-158	(5) 569-606-11-211-53-109	(5) 228-33-615-207-207-269

In rosso i frammenti derivanti dai tagli terminali

Two-steps multiplex PCRs:16S-ITS-23S e regione fiancheggiante la 23S rDNA

Sulla base delle sequenze nucleotidiche della regione *ISR* e *23S rDNA*, sono stati disegnati *primer* in grado di suddividere i lattobacilli in 4 gruppi (*Multiplex PCR-G*) (figura 6-3). Le successive *multiplex PCR* (II-1, II-2, III e IV) sono state effettuate con l'utilizzo di *primer* disegnati sulla base degli allineamenti delle sequenze *16S-ITS-23S rDNA* e della regione fiancheggiante la *23S rDNA* (figura 6-4), in quanto, solo esplorando tale regione, Song e coll. hanno potuto disegnare *primer* specie specifici, che generassero ampliconi di ampiezze significativamente differenti (figura 6-3) (106).

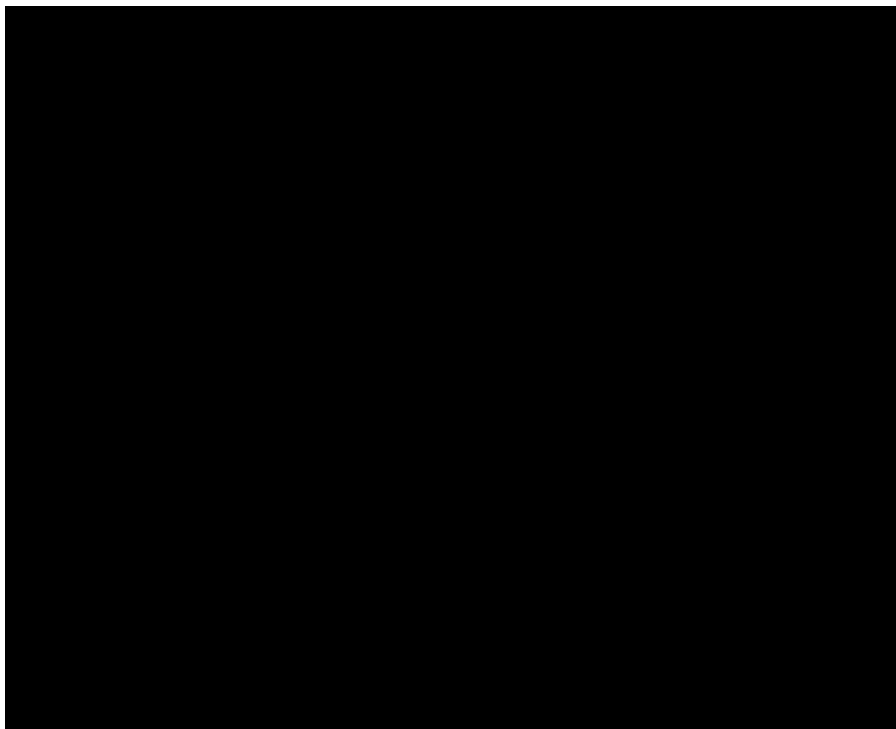


Figura 6-3. Rappresentazione schematica dei saggi di multiplex PCR effettuati da Song e coll. (2002)

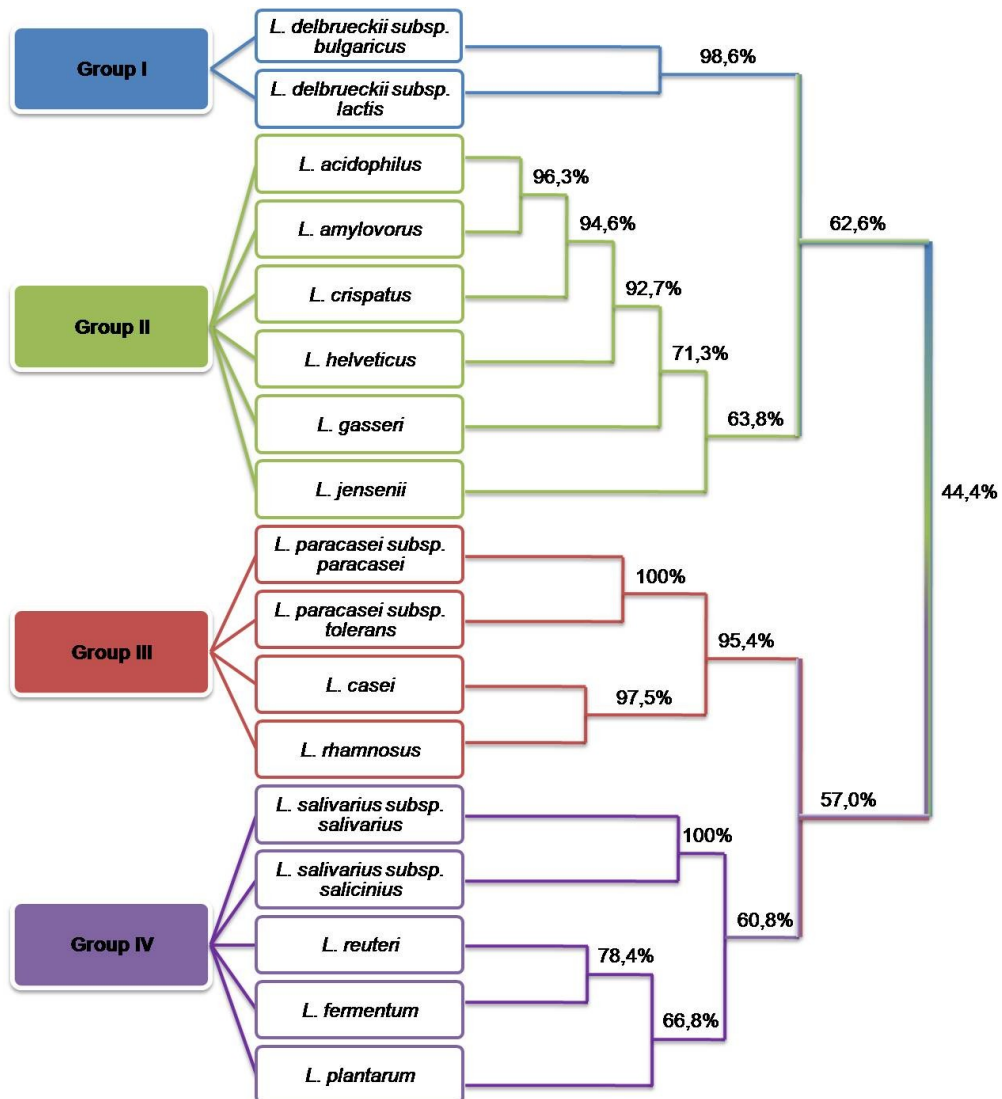


Figura 6-4. Albero filogenetico di 17 ceppi tipo di lattobacilli basato sulle sequenze nucleotidiche di *16S-ISR-23S rDNA* e della regione fiancheggiante la *23S rDNA*.

Le sequenze oligonucleotidiche dei *primer* utilizzati nei saggi di *multiplex* PCR sono riportati in tabella 6-3:

Tabella 6-3. Sequenze *primer multiplex* PCR (106)

Primer	Sequenza (5'→3')		Multiplex
Ldel-7	ACAGATGGATGGAGAGCAGA	FW	G
LU-1'	ATTGTAGAGCGCGACCGAGAAG	FW	G
LU-3'	AAACCGGAGAACACCGCGTT	FW	G
LU-5	CTAGCGGGTGC GACTTTGTT	FW	G; III
Lac-2	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT	REV	G
Laci-1	TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC	FW	IIA
Ljens-3	AAGAAGGCACTGAGTACGGA	FW	IIA
2310-C	CCTTTCCCTCACGGTACTG	REV	IIA
Lcri-1	AGGATATGGAGAGCAGGAT	FW	IIB
Lcri-2	CAACTATCTCTCTTACACTGCC	REV	IIB
L. gas-2	TGCTATCGCTTCAAGTGCTT	FW	IIB
Lgas-3	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA	REV	IIB
Lpar-4	GGCCAGCTATGTATTC ACTGA	REV	III
RhaII	GCGATGCGAATTTCTATTATT	REV	III
Lfer-3	ACTAACTTGACTGATCTACGA	FW	IV
Lfer-4	TTCACTGCTCAAGTAATCATC	REV	IV
L-pla-3	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	FW	IV
Lpla-2	CCTGAACTGAGAGAATTTGA	REV	IV
Lreu-1	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG	FW	IV
Lreu-4	GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC	REV	IV
Lsal-1	AATCGCTAAACTCATAACCT	FW	IV
Lsal-2	CACTCTCTTTGGCTAATCTT	REV	IV

In particolare gli amplificati ottenuti con la *multiplex* PCR-G sono di ca. 450bp, 300bp, 400bp, 350bp, per il gruppo I, II, III e IV, rispettivamente.

Nelle successive *multiplex*-PCR, sono stati utilizzati *primer* specie-specifici, che hanno permesso di identificare 11 specie di lattobacilli. In particolare, per il gruppo I, non è stata allestita nessuna ulteriore *multiplex*, in quanto i membri appartenenti a

questo gruppo sono stati tutti ricondotti alla specie *delbrueckii*; per questa, non è stato possibile discriminare le subspecie.

Per il gruppo II, sono state preparate due *mix* distinte, effettuando due *multiplex*-PCR (II-1 e II-2) e ottenendo la discriminazione delle specie *L. acidophilus* (ca. 210bp) e *L. jensenii* (ca. 700bp) con la *multiplex* II-1; *L. crispatus* (ca. 522bp) ed *L. gasseri* (ca. 360bp) con la *multiplex* II-2. Le specie *L. rhamnosus* (ca. 113bp) e *L. paracasei* (ca. 312) sono state identificate con la *multiplex* III; infine la *multiplex* IV ha identificato 4 specie, *L. fermentum* (ca. 192bp), *L. salivarius* (ca. 411bp), *L. reuteri* (ca. 303bp) ed *L. plantarum* (ca. 248bp).

Le *mix* (50µL ciascuna) preparate per ciascuna *multiplex*-PCR sono riportate in tabella 6-4.

Tabella 6-4.

Reattivi	Concentrazione	<i>Multiplex</i>
Tampone (Biotools™) 1X	1X	G, IIA, IIB, III, IV
MgCl ₂ (Biotools™)	2,5mM	G
	2mM	IIA, IIA, IIB, III, IV
dNTP (TaKaRa™)	1mM	G, IIA, IIB, III, IV
<i>Primer</i> (Invitrogen™)	0,4mM	G
	0,3mM	IIA, IIB, III, IV
Taq polimerasi (Biotools™)	1U	G, IIA, IIB, III, IV
H ₂ O sterile per iniettabili	q.b a volume	G, IIA, IIB, III, IV
DNA	10-15ng	G, IIA, IIB, III, IV

I programmi PCR sono i seguenti (tabella 6-5):

Tabella 6-5

<i>Step</i>	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)	<i>Multiplex-PCR</i>
Denaturazione iniziale	94	5	G, IIa,IIb, III, IV
30 cicli	Denaturazione	95	G, IIa,IIb, III, IV
	Annealing	55	G
		68	IIA
		65	IIB
		62	III
		60	IV
Allungamento	72	0.5	G, IIa,IIb, III, IV
Allungamento finale	72	10	G, IIa,IIb, III, IV

Tutti i prodotti amplificati sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica, su gel d'agarosio al 2%, colorato con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e osservato su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™).

Le foto (6-5 e 6-6) sottostanti illustrano le corse elettroforetiche di una *multiplex* PCR-G e delle *multiplex* PCR, gruppo specifiche.

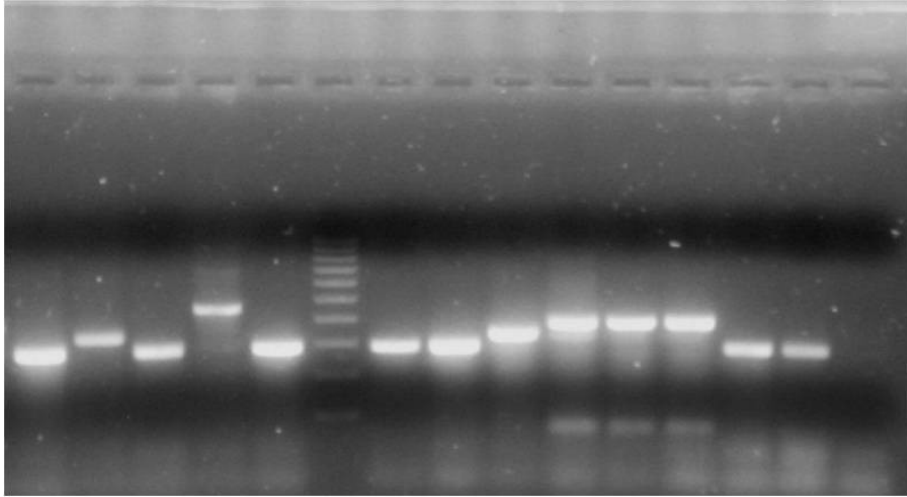


Foto 6-3. Elettroforesi PCR-G: pozzetto 1-3, 5, 7, 11-14 campioni; pozzetto 4 *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074 ; pozzetto 8 *L. rhamnosus* DSM20021; pozzetto 9 *L. L. gasseri* DSM20243; pozzetto 10 *L. salivarius* DSM20555; pozzetto 6 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetto 15 controllo negativo.

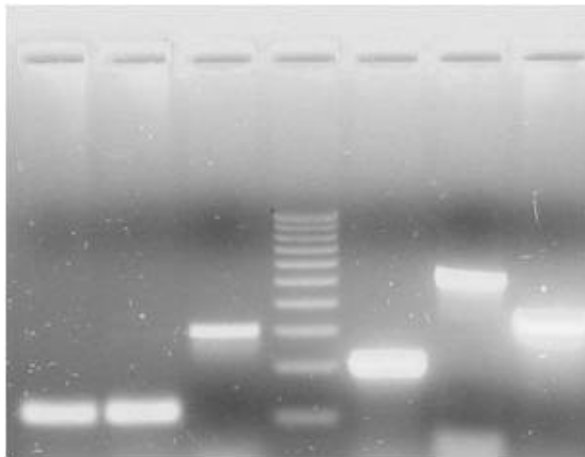


Foto 6-5 Elettroforesi multiplex PCR dopo il gruppaggio: pozzetti 1 e 2 *L. rhamnosus* DSM 20021 (amplificato di circa 110bp); pozzetto 3 *L. reuteri* DSM20016 (amplificato di circa 300bp); pozzetto 5 *L. acidophilus* DSM20079 (amplificato di circa 210bp); pozzetto 7 *L. crispatus* DSM20584 (amplificato di circa 520bp); pozzetti 7 e 8 *L. gasseri* DSM20243 (amplificato di circa 360bp); pozzetto 4 DNA ladder 100bp.

Amplificazione gene *tuf*

La mix di reazione (50 µl) per l'amplificazione di regioni contenute all'interno del gene *tuf* (112), conteneva i seguenti reattivi: tampone (Biotools™) 1X [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glicerolo (v/v)]; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP mix 0,8 mM; 0,2 µM per ciascun *primer* forward (Par Fw, Cas Fw e Rha Fw) (tabella 6-6) e 0,6 µM per il *primer* reverse CPR (Invitrogen™); 1.5 U Taq Polimerasi (Biotools™); 10-15 ng di DNA; acqua sterile per iniettabili quanto basta per portare a volume.

Tabella 6-6. Sequenze 5'→3' *primer* (112)

<i>Primer</i>	Sequenza 5'→3'
CPR (rev)	CAANTGGATNGAACCTGGCTTT
Par (Fw)	GACGGTTAAGATTGGTGAC
Cas (Fw)	ACTGAAGGCGACAAGGA
Rha (Fw)	GCGTCAGGTTGGTGTTG

Il programma PCR impiegato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti; 30 cicli (95°C per 30 secondi; 60°C per 1 minuto; 72°C per 1,5 minuti); allungamento finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti PCR sono stati caricati su gel d'agarosio al 2% colorato con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e visualizzato su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™). Gli amplificati

ottenuti sono stati i seguenti: circa 540 bp per *L. rhamnosus*; circa 200 bp per *L. paracasei*; circa 350 bp per *L. casei* (foto 6-6 e 6-7).

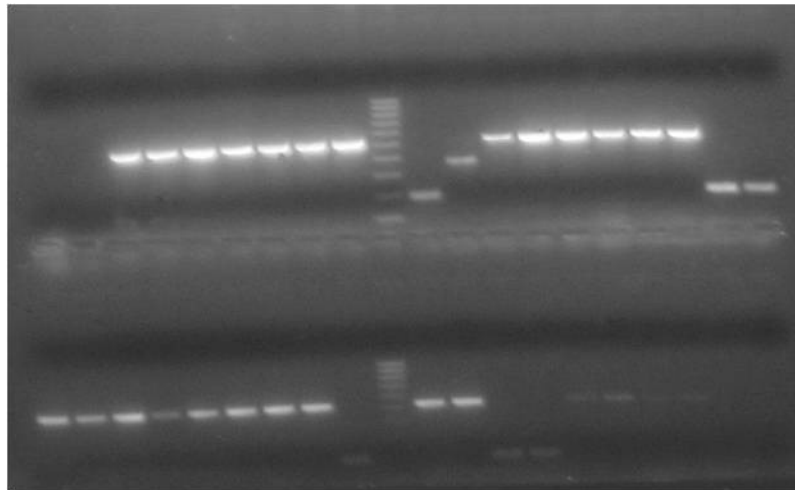


Foto 6-6. Elettroforesi: pozzetti 1-2 controlli negativi interni (*L. plantarum* subsp. *plantarum* 20174 e *L. jensenii* DSM20557); pozzetti 3-8/13-29/31-38 ceppi studiati; pozzetto 9 *Lactobacillus rhamnosus* DSM2021 (ATCC7469); pozzetto 10 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetto 11 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622 (ATCC25302); pozzetto 12: *Lactobacillus casei* (ATCC 393); pozzetto 30 DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetti 31-38 ceppi studiati; pozzetto 39 controllo negativo interno *L. reuteri* DSM20016; pozzetto40 controllo negativo *mix*.

(*) la foto fa riferimento alla corsa elettroforetica di campioni isolati da tamponi orali (oggetto del presente studio) e di ceppi appartenenti alla batterioteca del dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, precedentemente studiati con altre tecniche molecolari.

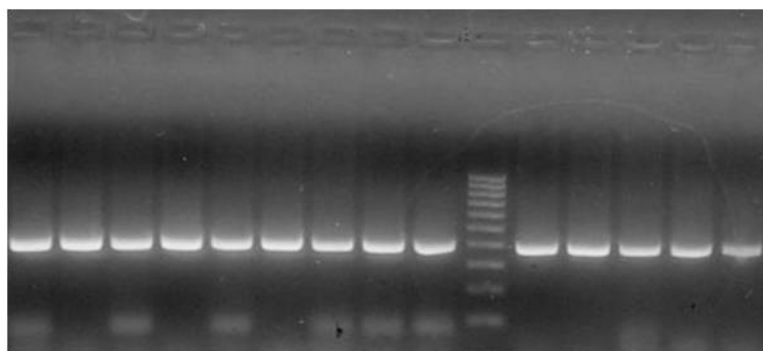


Foto 6-7. Elettroforesi: pozzetti 1-8 ceppi studiati; pozzetto 9 *Lactobacillus rhamnosus* DSM2021 (ATCC 7469); pozzetto 10: DNA ladder 100bp (BioRad™); pozzetti 11-15 ceppi studiati.

(*) la foto fa riferimento alla corsa elettroforetica di campioni isolati da tamponi orali (oggetto del presente studio) e di ceppi appartenenti alla batterioteca del dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, precedentemente studiati con altre tecniche molecolari.

Amplificazione QRDR in *gyrA* e *parC*

Sono state amplificate le QRDR dei geni *gyrA* e *parC* (214), utilizzando la seguente *mix*: tampone (Biotools™) 1X [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glicerolo (v/v)]; MgCl₂ (Biotools™) 5 mM; dNTP *mix* (TaKaRa™) 200 μM; 0,2 μM per ciascun *primer* (Invitrogen™); 1U Taq Polimerasi (Biotools™); 10-15 ng di DNA; acqua sterile per iniettabili quanto basta per portare a volume.

Il programma utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti; 30 cicli (94°C per 1 minuto; 52°C per 1 minuto; 72°C per 30 secondi); allungamento finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti PCR sono stati caricati su gel d'agarosio all'1,5% colorato con Sybr Safe® 1X (Invitrogen™) e visualizzato su transilluminatore Safe Imager (Invitrogen™). Gli amplificati ottenuti sono stati di 286bp, sia per *gyrA* sia per *parC* (209) (foto 6-8 e 6-9).

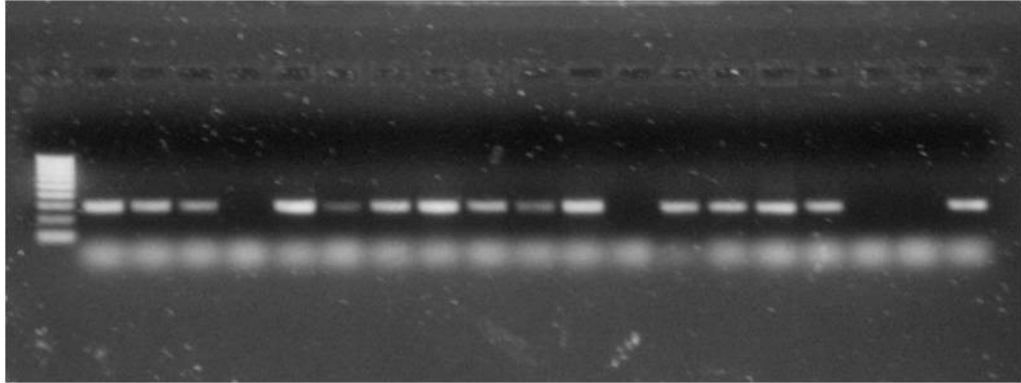


Foto 6-8. Elettroforesi *gyrA* PCR: pozzetto 1 DNA *ladder* 100bp (BioRad™); pozzetti 2-18, 20 campioni; pozzetto19 controllo negativo

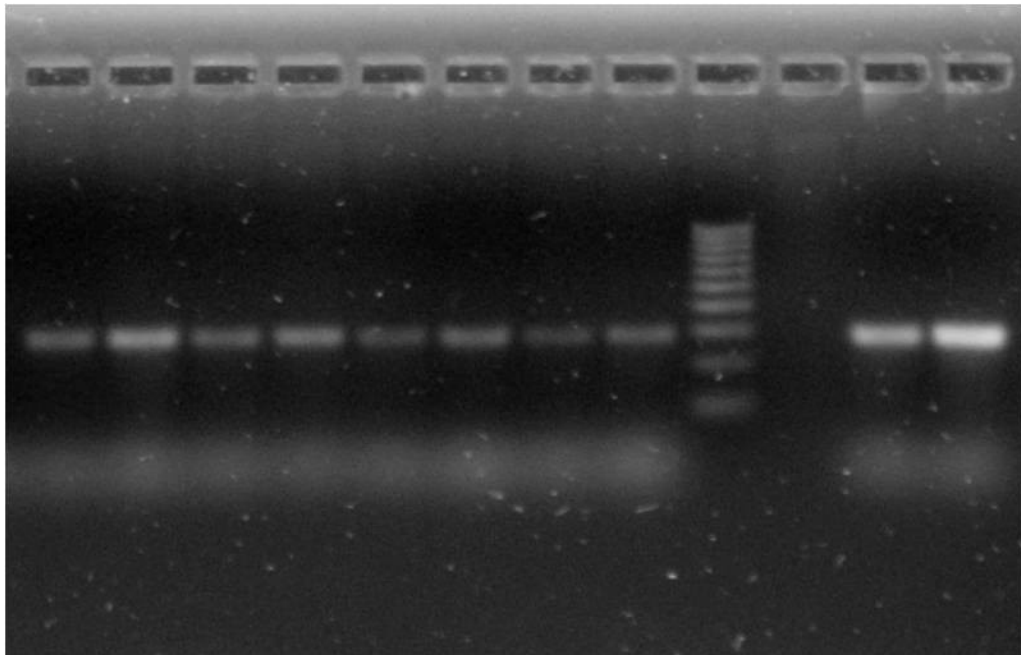


Foto 6-9. Elettroforesi *parC* PCR: pozzetti 1-8/11,12 campioni; pozzetto 9 DNA *ladder* 100bp (BioRad™); pozzetto 10 controllo negativo.

Sequenziamento

Protocollo:

- Purificazione degli amplificati con colonnina QIAquick PCR Purification Kit® - QUIAGEN™;
- Analisi quali/quantitativa allo spettrofotometro ULTROSPEC™ 200 nm. (determinazione della concentrazione di soluzione di DNA in TE, assorbanza 260/280, purezza)
- Sequenziamento del doppio filamento, allineamento delle sequenze con le rispettive *gyrA* e *parC* dei ceppi ATCC di *Lactobacillus* spp. e contig delle sequenze con il programma BioEdit™, versione 7.0.9.

7 Risultati

Identificazione molecolare delle specie di lattobacilli

Tutte le specie di lattobacilli oggetto del presente studio sono state identificate mediante tecniche molecolari. In particolare la distribuzione delle specie (grafico 7-1) è stata la seguente: 10 ceppi (22,2%) *L. gastricus*, 8 ceppi (17,8%) *L. gasseri*, 6 ceppi (8,9%) *L. salivarius*, 5 ceppi (11,1%) *L. fermentum*, 4 ceppi (8,9%) *L. rhamnosus* e *L. paracasei* subsp. *paracasei*, rispettivamente, 3 ceppi (6,7%) *L. plantarum*, 2 ceppi *L. reuteri*, 1 ceppo (2,2%) *L. crispatus*, *L. delbrueckii* ed *L. vaginalis*, rispettivamente.

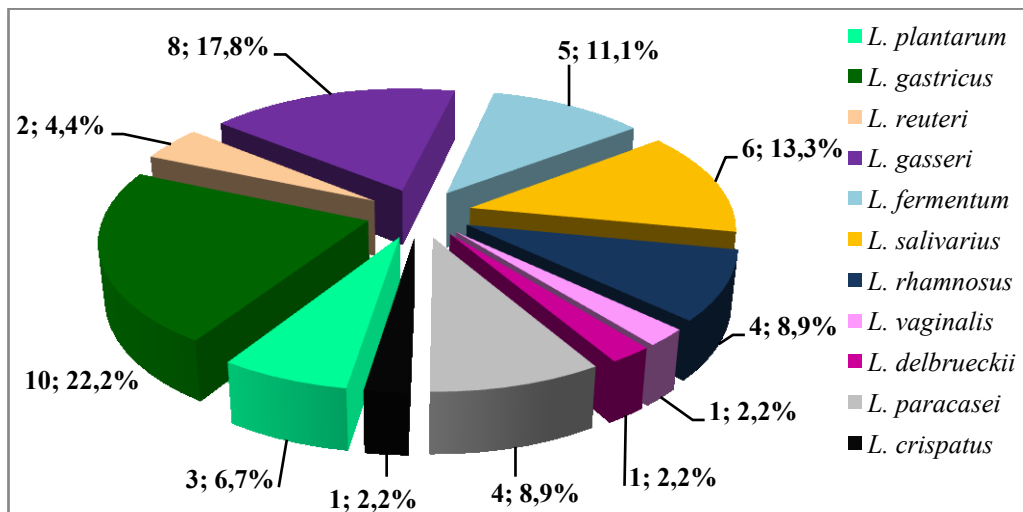


Grafico 7-1. Distribuzione delle specie di lattobacilli identificati

La tecnica *16S rDNA PCR/RFLP* ha identificato in maniera univoca 37/45 ceppi (82,2%), mentre i restanti 8 ceppi (17,8%) sono stati tutti ricondotti al gruppo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*), in quanto i profili di restrizione *HaeIII*, *MspI* ed *AluI*, ottenuti per i rispettivi ceppi tipo (*L. casei* DSM2001, *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622, *L. rhamnosus* DSM20021), sono stati indistinguibili.

In accordo allo studio di Song e coll. (2000) (106), sono state effettuate *multiplex* PCR che amplificano differenti *locus* della regione genica *16S-ITS-23S* e la regione fiancheggiante il gene *23S rDNA*.

Dalla prima *multiplex* PCR (PCR-G), tutti i lattobacilli sono stati classificati in 4 gruppi, in base all'amplificato ottenuto per ciascuno. In particolare, 1 solo ceppo apparteneva al gruppo I, ed è stato perciò identificato come *L. delbrueckii*. Al pari della tecnica *16S rDNA PCR-RFLP*, non è stato possibile discriminare la subspecie. Al gruppo II sono stati assegnati 9 ceppi, 8 ceppi al gruppo III e 27 ceppi al gruppo IV. Bisogna sottolineare che i ceppi identificati come *L. gastricus* (10 ceppi) ed *L. vaginalis* (1 ceppo) mediante *16S rDNA PCR-RFLP*, hanno dato un amplicone di 350bp e per questo sono stati classificati nel gruppo IV. Anche i rispettivi

ceppi tipo (*L. gastricus* DSM16045 ed *L. vaginalis* DSM5837) hanno dato gli stessi risultati.

Sono state perciò effettuate le successive *multiplex*-PCR, in accordo ai risultati ottenuti dalla *multiplex* PCR-G. Per ciascuna *multiplex*, sono stati utilizzati i ceppi tipo identificati dalla relativa *multiplex* come controlli positivi e ceppi tipo non contemplati dalla stessa, come controlli negativi interni. Nessun amplicone è stato ottenuto per ceppi tipo studiati in *multiplex* PCR diverse da quelle riferite.

Come risultato globale, riferito a tutte le *multiplex* PCR effettuate dopo il gruppaggio, è emerso che 34 ceppi su 45 sono stati identificati (75,5%); 11 ceppi non hanno dato amplificati. Questi sono i ceppi che la tecnica RFLP ha identificato *L. gastricus* ed *L. vaginalis*.

La *multiplex* PCR sul gene *tuf* è stata condotta in parallelo alle *multiplex two-step* PCR di Song et coll. In particolare, la tecnica è stata studiata anche su ceppi di lattobacilli vaginali, appartenenti alla batterioteca del Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, precedentemente classificati nel gruppo *L. casei*, mediante studi molecolari. A differenza dei risultati ottenuti nello studio di Ventura (112), abbiamo visualizzato una sola banda relativa a ciascuna specie identificata e in particolare circa 540bp

per *L. rhamnosus*, circa 200bp per *L. paracasei* e circa 350bp per *L. casei*. I risultati sono stati comunque confermati da studi di *Nucleotide Blast*, effettuati con i *primer* riportati nello studio. Inoltre, si è avuta piena coincidenza con i risultati ottenuti dalla *multiplex two-steps PCR* (Song e coll.,2000) (106), ovvero 4 ceppi di lattobacilli orali sono stati identificati *L. rhamnosus* e 4 ceppi *L. paracasei*.

Determinazione dei profili di sensibilità antibiotica

I valori di MIC, determinati mediante microdiluizione in piastra o per diffusione in agar (E-test®), sono riportati in tabella 7-1 come valori di MIC₅₀ e MIC₉₀; per gli antibiotici di cui il CLSI M45-P riporta i valori *breakpoint*, i risultati sono stati interpretati come valore percentuale di ceppi sensibili, intermedi o resistenti. Per alcuni antibiotici, sono stati considerati i *breakpoint* suggeriti da SCAN (*European Scientific Committee of Animal Nutrition*) e FEEDAP (*European Scientific Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed*) o quelli proposti da Danielsen e coll. (161).

Tabella 7-1. Valori di MIC 50 (µg/mL)/MIC90 (µg/mL) e relativi breakpoint

Antibiotico	MIC50 (µg/mL)	MIC90 (µg/mL)	S(%)	I(%)	R(%)	MIC Breakpoint (µg/mL)	Riferimento
Penicillina G	0,5	1	100	/	/	8	CLSI M-45P
Amoxicillina/ acido clavulanico	0,5	1,5	100	/	/	2	Danielsen e coll. (2003)
Cefixime	8	>256					
Cefuroxime	2	6					
Cefalotina	3,5	12					
Rifampicina	0,064	0,125	100 (a;b)	/	/	2 (a);32(b)	(a) Danielsen e coll.(2003); (b) SCAN
Eritromicina	0,5	0,5	95,6	4,4	/	≤0,5 (S); 1-4 (I); ≥8(R)	CLSI M-45P
Claritromicina	0,094	0,25	100(*)			8(*)	CLSI M- 45P(*)
Azitromicina	0,25	1					
Clindamicina	4	16	4,4	66,7	28,9	≤0,5 (S); 1-2 (I); ≥4(R)	CLSI M-45P (a) Danielsen
Ciprofloxacina	2	>32	40(b); 82,2(a)		60(b); 17,8(a)	>32(a); 4(b)	e coll.(2003); (b) SCAN
Levofloxacina	4	>32					
Vancomicina	>64	>64	11,1	2,2	86,7	≤4 (S); 8-16 (I); ≥32(R)	CLSI M-45P

Dai risultati è emerso che quasi il 90% dei ceppi è resistente al glicopeptide vancomicina; verso tale antibiotico si parla di resistenza intrinseca. Tutti i ceppi sono risultati sensibili alle penicilline (penicillina G e amoxicillina/acido clavulanico); molto meno sensibili alle cefalosporine orali e parenterali, mostrando valori di MIC molto elevati, soprattutto verso cefixime. Per quanto riguarda gli inibitori della sintesi proteica, eritromicina, azitromicina e claritromicina, tutti i ceppi hanno mostrato una

spiccata sensibilità verso claritromicina ed eritromicina; valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ più elevati sono stati rilevati nei confronti di azitromicina, pur mantenendosi sotto i valori *breakpoint* previsti per eritromicina, riportati sul CLSI M-45P. Le MIC per clindamicina sono state sensibilmente più elevate; in accordo ai *breakpoint* riportati nel CLSI M45-P, il 66,7% dei ceppi è risultato sensibile, il 28,9% resistente e solo il 4,4% sensibile.

Per quanto riguarda i fluorochinoloni, ciprofloxacina e levofloxacina (tabella 7-1), è evidente che, se si considerano differenti *breakpoint* per l'interpretazione delle MICs, le percentuali di sensibilità/resistenza variano notevolmente, crescendo vertiginosamente se consideriamo quelli suggeriti da SCAN. Comunque, i valori di MIC₉₀ per i due antibiotici sono elevati (>32µg/mL), suggerendo che i lattobacilli sono, in linea generale, poco sensibili a tale classe antibiotica. Infine tutti i ceppi sono risultati sensibili a rifampicina, in accordo ai *breakpoint* proposti da Danielsen (2003) e da SCAN.

Nella tabella 7-2, 7-3 e 7-4 sono riportati i valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ in riferimento alle specie più rappresentate.

Tabella 7-2

Specie	P		AMX		IX		CFX		CEF	
	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90
<i>L. gastricus</i> (10)	0,5	0,75	0,25	1	4	8	1,5	6	1,5	8
<i>L. gasseri</i> (8)	0,12	0,5	0,25	0,5	4	>256	0,25	4	0,125	6
<i>L. salivarius</i> (6)	0,12	0,75	0,25	1	1,5	>256	0,19	6	0,19	6

P: penicillina; AMX: amoxicillina; IX: cefixime; CFX: cefuroxime; CEF: cefalotina

Tabella 7-3

Specie	RIF		E		CL		AZ		DA	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
<i>L. gastricus</i> (10)	0,064	0,152	0,5	0,5	0,19	0,25	0,19	1	2	4
<i>L. gasseri</i> (8)	0,047	0,125	≤0,125	0,5	0,032	0,125	0,25	0,75	2	8
<i>L. salivarius</i> (6)	0,125	0,19	0,5	0,5	0,125	0,19	0,25	0,75	1	8

RIF: Rifampicina; E: Eritromicina; CL: claritromicina; AZ: azitromicina; DA: clindamicina

Tabella 7-4

Specie	Ci		Lev		VA	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
<i>L. gastricus</i> (10)	2	3	4	16	>64	>64
<i>L. gasseri</i> (8)	2	32	8	>32	64	>64
<i>L. salivarius</i> (6)	0,5	0,75	2	8	>64	>64

Ci: ciprofloxacina; Lev: levofloxacina; VA: vancomicina

In tabella 7-5 sono riportati i risultati del *disc diffusion test* (alone di inibizione espresso in mm); in mancanza di *breakpoint standards*, i risultati sono stati utilizzati come screening preliminare dei profili di sensibilità. In uno studio di Temmerman e coll. (181) sono stati utilizzati valori cut-off in accordo a quelli proposti da Charteris e coll. (217). In particolare, i ceppi sono stati considerati resistenti quando esibivano aloni di inibizione di diametro uguale o inferiore a 19mm per penicillina, 14mm per vancomicina e tetraciclina e 13 mm per kanamicina, cloramfenicolo ed eritromicina. Interpretando i risultati in accordo a tali *breakpoint*, emerge che tutti i ceppi sono sensibili alla penicillina G (dato confermato dalla determinazione della MIC) e all'eritromicina (nessun ceppo ha avuto valori di MIC che lo ha classificato come resistente, solo due ceppi sono stati classificati come intermedi). Inoltre 38 ceppi su 45 non hanno mostrato nessun alone di inibizione, confermando la resistenza registrata per 38 ceppi di lattobacilli ($MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$).

Tabella 7-5. Diametro aloni di inibizione (mm)

ID ceppi	Specie	AML(25)	P (10)	E (15)	DA (2)	Ci (5)	Va (30)	GM (10)
lac1	<i>L. plantarum</i>	40	36	42	36	28	0	15
lac2	<i>L. gastricus</i>	34	22	36	16	24	0	16
lac3	<i>L. gastricus</i>	40	40	30	36	12	0	15
lac4	<i>L. gastricus</i>	40	32	32	30	12	0	17
lac5	<i>L. reuteri</i>	29	28	28	36	14	0	21
lac6	<i>L. gastricus</i>	36	28	34	36	10	0	20
lac7	<i>L. gastricus</i>	40	40	35	30	25	0	17
lac8	<i>L. gasseri</i>	40	42	36	40	15	0	16
lac9	<i>L. fermentum</i>	40	28	20	26	27	0	15
lac10	<i>L. salivarius</i>	36	26	32	26	21	0	16
lac11	<i>L. salivarius</i>	40	32	34	28	20	0	14
lac12	<i>L. gastricus</i>	40	30	34	33	14	0	17
lac13	<i>L. gasseri</i>	35	35	40	11	14	0	15
lac14	<i>L. gastricus</i>	38	26	34	32	15	0	19
lac15	<i>L. gastricus</i>	38	28	30	32	0	0	20
lac16	<i>L. gasseri</i>	35	31	29	24	20	0	12
lac17	<i>L. salivarius</i>	36	44	38	28	0	0	14
lac18	<i>L. fermentum</i>	40	36	32	32	13	0	15
lac19	<i>L. gasseri</i>	44	38	42	16	0	25	12
lac20	<i>L. salivarius</i>	40	36	32	26	14	0	17
lac21	<i>L. gasseri</i>	40	41	40	30	0	25	14
lac22	<i>L. gasseri</i>	35	38	40	14	0	23	13
lac23	<i>L. rhamnosus</i>	34	31	42	30	25	0	18
lac24	<i>L. vaginalis</i>	40	40	34	40	15	0	20
lac25	<i>L. fermentum</i>	42	26	34	38	0	0	14
lac26	<i>L. delbrueckii</i>	36	30	34	32	12	28	24
lac27	<i>L. reuteri</i>	36	27	36	32	10	0	20
lac28	<i>L. plantarum</i>	42	24	30	10	0	0	20
lac29	<i>L. salivarius</i>	34	32	35	24	25	0	15
lac30	<i>L. fermentum</i>	32	20	37	34	9	0	17
lac31	<i>L. salivarius</i>	38	34	32	26	21	0	19
lac32	<i>L. fermentum</i>	26	24	38	34	26	0	17
lac33	<i>L. gasseri</i>	38	30	42	33	28	0	20
lac34	<i>L. plantarum</i>	40	40	40	18	25	0	24
lac35	<i>L. rhamnosus</i>	32	30	38	27	30	0	20
lac36	<i>L. gastricus</i>	36	30	30	34	13	0	17
lac37	<i>L. rhamnosus</i>	40	34	38	36	16	0	15
lac38	<i>L. gastricus</i>	40	32	35	36	17	0	18
lac39	<i>L. rhamnosus</i>	32	30	28	28	26	0	14
lac40	<i>L. paracasei</i>	36	30	40	32	22	0	17
lac41	<i>L. gasseri</i>	44	36	40	38	0	25	15
lac42	<i>L. crispatus</i>	40	44	38	30	21	0	18
lac43	<i>L. paracasei</i>	40	38	40	34	23	0	16
lac44	<i>L. paracasei</i>	36	38	36	30	24	0	14
lac45	<i>L. paracasei</i>	40	38	38	34	25	0	13

AML: amoxicillina, P: penicillina; E: eritromicina; DA: clindamicina; Ci: ciprofloxacina; GM: gentamicina; Va: vancomicina. Tra parentesi () il contenuto del disco.

Analisi delle sequenze *gyrA* e *parC*

Sono state amplificate le regioni QRDR dei geni *gyrA* e *parC* dei ceppi con MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ per levofloxacin. In particolare sono stati sequenziati 15 QRDR del gene *gyrA* e 4 del gene *parC*. I risultati del sequenziamento delle QRDR dei geni *gyrA*, hanno rivelato mutazioni nucleotidiche per la maggior parte dei ceppi (tabella 7-6) che comunque si sono dimostrate mutazioni silenti, in quanto non hanno determinato variazione nella sequenza amminoacidica della DNA girasi.

Tabella 7-6.

ID ceppi	Specie	MIC lev	Mutazioni nucleotidiche	Mutazioni AA
lac8	<i>L. gasseri</i>	8	Nessuna mutazione	/
lac21	<i>L. gasseri</i>	>32	A180G; T192C; C270T; T339C; C396T	/
lac22	<i>L. gasseri</i>	>32	A180G; T192C; T237G; C270T; T339C; C396T	/
lac41	<i>L. gasseri</i>	>32	A180G; T192C; C270T; T339C; C396T	/
lac13	<i>L. gasseri</i>	8	A180G; T192C; C270T; T339C; C396T	/
lac19	<i>L. gasseri</i>	>32	Nessuna mutazione	/
lac32	<i>L. fermentum</i>	8	T237G; C270T; T339C; C396T	/
lac25	<i>L. fermentum</i>	16	Nessuna mutazione	/
lac30	<i>L. fermentum</i>	8	Nessuna mutazione	/
lac9	<i>L. fermentum</i>	8	C270T; T339C; C396T	/
lac2	<i>L. gastricus</i>	16	Nessuna mutazione	/
lac38	<i>L. gastricus</i>	8	Nessuna mutazione	/
lac28	<i>L. plantarum</i>	8	Nessuna mutazione	/
lac17	<i>L. salivarius</i>	>32	T231C; A237T; G264A; A279G; T297C; C318T; T345C	/
lac20	<i>L. salivarius</i>	8	T231C; A237T; G264A; A279G; T297C; C318T; T345C	/

Dall'analisi delle sequenze parC, è emerso che tutti e quattro i ceppi avevano una o più mutazioni; in particolare i due ceppi identificati come *L. salivarius* hanno presentato una sola mutazione (T351C); tre mutazioni sono state osservate nel ceppo *L. gasseri*, di cui la T351T è stata di nuovo osservata. Nel ceppo *L. plantarum* sono state osservate mutazioni diverse dalle precedenti, che però al pari di tutte le altre, non hanno determinato variazioni nelle sequenze amminoacidiche della Topoisomerasi IV (tabella 7-7).

Tabella 7-7

ID ceppi	Specie	MIC lev	Mutazioni nucleotidiche	Mutazioni AA
lac21	<i>L. gasseri</i>	>32	C162T; T240A; T351C	/
lac17	<i>L. salivarius</i>	>32	T351C	/
lac20	<i>L. salivarius</i>	8	T351C	/
lac28	<i>L. plantarum</i>	8	C357T; G363T; G369A; G372A;	/

8 *Discussione*

Tradizionalmente gli organismi viventi sono classificati sulla base delle loro somiglianze e delle loro differenze nei tratti fenotipici, sia nel mondo dei procarioti che in quello degli eucarioti, permettendone la suddivisione in regni, phila, classi, ordini, famiglie, generi e specie. Bisogna però tenere in considerazione che l'uso esclusivo di metodiche fenotipiche per la classificazione tassonomica può risultare insufficiente in ragione della variabilità delle caratteristiche fenotipiche di un organismo vivente (218).

I lattobacilli, e in generale tutte le specie appartenenti ai *LAB*, sono stati identificati sulla base di caratteristiche fenotipiche e biochimiche, quali per esempio la morfologia, il tipo di fermentazione degli zuccheri, la differente temperatura per la crescita, il *pattern* proteico della parete cellulare o dell'intera cellula. Le metodiche fenotipiche hanno però grossi limiti, quali: la scarsa riproducibilità, la mancata applicabilità su larga scala, lo scarso potere discriminatorio, etc. (79).

Le tecniche d'identificazione molecolare sono, invece, di notevole importanza ai fini dell'identificazione e, a differenza delle tecniche fenotipiche, hanno numerosi vantaggi quali l'elevato potere

discriminatorio e l'applicabilità universale. Ceppi fortemente correlati con caratteristiche fenotipiche simili, possono essere efficacemente identificati tramite tecniche molecolari, principalmente basate sulla reazione PCR, quali RFLP, ARDRA, AFLP, RAPD, *Ribotyping*, etc (79) (81).

Nel presente studio, si è voluto comparare l'uso di più tecniche molecolari per identificare 45 specie di lattobacilli di origine umana, pur consapevoli che il sequenziamento rappresenta il *gold standard* negli studi d'identificazione molecolare. Il *target* molecolare utilizzato è stato il gene *16S rDNA* (amplificato mediante PCR) associato alla tecnica RFLP. L'associazione di una metodica altamente sensibile come la PCR con l'uso di endonucleasi specifiche, ha permesso di realizzare una pratica di laboratorio semplice e riproducibile. Sicuramente i costi, rispetto a quelli previsti per il sequenziamento, sono stati notevolmente abbattuti. I risultati hanno evidenziato che la tecnica *16S rDNA PCR-RFLP* ha chiaramente identificato tutte le specie riscontrate, fatta eccezione per quelle appartenenti al gruppo *L. casei* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*), che hanno mostrato profili di restrizione molto simili. Mappe di restrizione virtuali effettuate digerendo le sequenze *16S rDNA* dei rispettivi ceppi tipo, depositate

in NCBI, hanno ulteriormente evidenziato tale problema. Le altre metodiche utilizzate sono state reperite in letteratura. In particolare, in accordo allo studio di Song e coll. (106), sono state efficacemente identificate 11 specie di lattobacilli, tra cui *L. paracasei* ed *L. rhamnosus*. La regione considerata è la *16S-ITS-23S rDNA* e la zona fiancheggiante la *23S rDNA* poiché la sola regione *16S rDNA-ITS-23S rDNA* non si è rivelata abbastanza variabile nei lattobacilli per consentire il disegno di *primer* specie specifici. I risultati ottenuti sono stati tutti coincidenti con quelli ottenuti mediante tecnica *16SrDNA PCR-RFLP*. Trattandosi di *multiplex* PCR, la tecnica ha avuto il vantaggio di ridurre i tempi di lavoro. Infatti, pur essendo limitato il numero di specie identificabili, è stata preferita nello studio preliminare d'identificazione di lattobacilli umani, provenienti da campioni clinici non inclusi nel presente studio.

Altro *target* molecolare utilizzato è stato il gene *tuf*, in accordo allo studio di Ventura e coll. (112). L'analisi filogenetica dei lattobacilli e dei bifidobatteri, effettuata mediante l'uso delle sequenze dei geni *tuf*, si è dimostrata altrettanto valida rispetto a quella basata sulle sequenze *16S rRNA*. Nel presente studio, la metodica è stata utilizzata per discriminare le specie appartenenti al gruppo *L. casei*,

superando in tal modo il limite esibito dalla metodica *16S rDNA PCR-RFLP*.

Per quanto concerne i risultati sullo studio epidemiologico delle resistenze, questi hanno pressoché ricalcato il *trend* epidemiologico riscontrato in differenti lavori di letteratura. In particolare, per quanto riguarda i beta-lattamici, le penicilline hanno mostrato una buona attività (MIC₉₀ pari ad 1 µg/mL), mentre per le cefalosporine, si è osservata una minore sensibilità, come registrato in altri studi (161) (162) (219), esibendo valori di MIC₉₀ pari a 6 µg/mL (cefuroxime), a 12 µg/mL (cefalotina) e >256 µg/mL (cefixime).

I macrolidi, soprattutto claritromicina, hanno esibito un'eccelente attività; non è stato registrato nessun ceppo resistente, a differenza di una collezione di lattobacilli vaginali, non inclusa nel presente studio, dove è emersa una piccola percentuale (circa il 10%) di ceppi resistenti all'eritromicina, determinata dalla presenza del gene *ermB*.

Per quanto riguarda vancomicina, quasi il 90% dei ceppi è risultato resistente a tale antibiotico, a dimostrazione della resistenza intrinseca esibita dai lattobacilli nei confronti dei glicopeptidi, dovuta alla presenza del dimero D-Ala-D-lattato al posto del dimero D-Ala-D-Ala, *target* molecolare del farmaco (167).

I ceppi studiati hanno mostrato una scarsa sensibilità nei confronti dei fluorochinoloni ciprofloxacina e levofloxacina, in accordo a diversi studi riportati in letteratura (209) (220). La resistenza ai fluorochinoloni è stata studiata anche a livello genotipico. In particolare, l'amplificazione ed il successivo sequenziamento delle QRDR dei geni *gyrA* e *parC* dei ceppi chinolone-resistenti, ha confermato i dati ottenuti in uno studio di Fukao e coll. (210), ovvero l'assenza di mutazioni nella sequenza amminoacidica delle proteine DNA girasi e topoisomerasi IV. In uno studio di Hummel e coll. (209) sono riportate sostituzioni amminoacidiche nella sequenza *gyrA* (Glu87→Leu) di un ceppo di *L. acidophilus*; le mutazioni osservate nel gene *parC* dello stesso ceppo hanno interessato le posizioni 74, 84 e 88 ma non sono mai state associate alla chinolone-resistenza in altri microrganismi.

Poiché l'alterazione del *target* farmacologico rappresenta solo uno dei possibili meccanismi di resistenza ai chinoloni, le MIC relativamente elevate riscontrate per ciprofloxacina e levofloxacina, possono essere interpretate ipotizzando l'esistenza di altri meccanismi di resistenza, di natura intrinseca, come la struttura della parete cellulare, l'alterata permeabilità o sistemi d'efflusso multi-farmaco.

Bibliografia

Riferimenti testuali

1. **Bergey, D. H., et al.** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. s.l. : Williams & Wilkins, 1986.
2. **La Placa, M. et al.** *Principi di Microbiologia medica*. XII. s.l. : Esculapio, 2010.
3. **Nicoletti, G. e Nicolosi, V. M.** Dizionario di patologia umana normale e patologica. s.l. : Momento medico, 1998, p. 206-209.
4. **Poli, G.** *Microbiologia e immunologia*. s.l. : Utet, 1988.
5. **Mandell, G. L.; Douglas, R. G. e Bennett, J. E.** *Principles and Practice of Infectious disease*. s.l. : Churchill Livingstone, 1990.
6. **Lebeer, S.; Vanderleyden, J. e De Keersmaecker, S. C. J.** *Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action* . 4, 2008, Microbiol and Molecul Biology reviews, Vol. 72, p. 728-764.
7. **Walter, J.** *The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract*. [a cura di] Caister Academic Press. s.l. : G. W. Tannock, 2005, Probiotic and prebiotics: scientific aspects, p. 51-82.
8. **Dal Bello, F., et al.** *Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition*. 45, 2003, Microb Ecol, p. 455-463.

9. **Sghir, A., et al.** *Quantification of bacterial group within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization.* 66, 2000, Appl Environ Microbiol, p. 2263-2266.
10. **Mackie, R. I., Sghir, A. e Gaskins, H. R.** *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.* 69, 1999, Am J Clin Nutr, p. 1035S-1045S.
11. **Ahrnè, S., et al.** *The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa.* 85, 1998, Journal of Applied Microbiology, p. 88-94.
12. **Ahumada, Maria del Carmen, et al.** *Lactobacilli isolation from dental plaque and saliva of a group of patients with caries and characterization of their surface properties.* 2001, Ecology/Environmental microbiology, Vol. 7, p. 71-77.
13. **Busscher, H. J., Mulder, A. F.J.M. e van der Mei, H. C.** *In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by lactobacilli from a bio-yogurt.* 5, 1999, Karger, Vol. 33, p. 403-404.
14. **Badet, C. e Thebaud, N. B.** *Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: a review of literature.* 2, 2008, The open microbiology Journal, p. 38-48.
15. **Wilks, M., et al.** *Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome.* s.l. : J Clin Microbiol, 2004, Vol. 42, p. 713-717.

16. **Vasquez, A., et al.** *Vaginal lactobacilli flora of healthy Swedish women.* s.l. : J Appl Microbiol, 2002, Vol. 40, p. 2746-2749.
17. **Antonio, MAD, Hawes, S. E. e Hillier, S. L.** *The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species.* s.l. : J Infect Dis, 1999, Vol. 180, p. 1950-1956.
18. **Zhou, X., et al.** *Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods.* s.l. : Microbiology, 2005, Vol. 150, p. 2565-2573.
19. **Falsen, E., et al.** *Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel Lactobacillus species from human source: description of Lactobacillus iners sp. nov.* s.l. : Int J Syst Bacteriol, 1999, Vol. 49, p. 217-221.
20. **Burton, J. P., Cadieux, P. A. e Reid, G.** *Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation.* 2003, Appl Environ Microbiol, Vol. 69, p. 97-101.
21. **Antonio, MAD, Rabe, L. K. e Hillier, S. L.** *Colonization of the rectum by Lactobacillus species and decreased risk of bacterial vaginosis.* 2005, J Infect Dis, Vol. 192, p. 394-398.
22. **Paavonen, J.** *Physiology and ecology of the vagina.* 1983, J Infect Dis, Vol. 40, p. 31-35.

23. **Boskey, E. R., et al.** *Acid production by vaginal flora in vitro is inconsistent with the rate and extent of vaginal acidification.* 1999, *Infect Immun*, Vol. 67, p. 5170-5175.
24. **Boris, Soledad e Barbés, Covadonga.** *Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens.* 2, 2000, *Microbes and Infection*, p. 543-546.
25. **Pillai, A. e Nelson, R.** *Probiotics for treatment of Clostridium difficile-associated colitis in adults.* 2008, *Cochrane Database Syst Rev*.
26. **Deshpande, G., Rao, S. e Patole, S.** *Probiotic for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials.* 369, 2007, *Lancet*, p. 1614-1620.
27. **Falagas, M. E., Betsi, G. I. e Athanasiou, S.** *Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis.* 13, 2007, *Clin Microbiol Infect*, p. 657-664.
28. **Boyle, R. J. e Tang, M. L. K.** *The role of probiotics in the management of allergic disease.* 36, 2006, *Clin Exp Allergy*, p. 568-576.
29. **Meurman, R. e Stamatova, I.** *Probiotics: contribution of oral health.* 13, 2007, *Oral Dis*, p. 443-451.
30. **Besselink, M. G. H., et al.** *Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial.* 371, 2008, *Lancet*, p. 651-659.

31. **Liong, M. T.** *Safety of probiotics: translocation and infection* . 66, 2008, Nutr Rev, p. 192-202.
32. **Boirivant, M. e Strober, W.** *The mechanism of action of probiotics*. 23, 2007, Curr Opin Gastroenterol, p. 679-692.
33. **Marco, M. L., Pavan, S. e Kleerebezem, M.** *Curr Opin Biotechnol*. 17, 2006, p. 204-210.
34. **Eijsink, V. G. H., et al.** *Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication*. 81, 2002, Antonie van Leeuwenhoek, p. 639-654.
35. **Pridmore, R. D., et al.** *Hydrogen peroxide production by Lactobacillus johnsonii NCC 533 and its role in anti-Salomonella activity*. 283, 2008, FEMS Microbiol. Lett., p. 210-215.
36. **Le Bouguenec, C.** *Adhesins and invasins of pathogenic Escherichia coli*Int.J. Med. Microbiol. 295, p. 471-478.
37. **Kaper, J. B. e Sperandio, V.***Bacterial cell-to cell-signaling in the gastrointestinal tract*. 73, 2005, Infect. Immun., p. 3197-3209.
38. **Martin, F. P. J., Wang, Y e al., et.** *Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model*. 4, 2008, Mol. Syst. Biol., p. 157.
39. **Lorca, G., et al.** *Lactobacilli express cell surface proteins wich mediate binding of immobilized collagen and fibronectin*. 206, 2002, FEMS Microbiol. Lett. , p. 31-37.

40. **Schleifer, K.-H. e Ludwig, W.** *Molecular taxonomy: classification and identification*. [a cura di] F.G. Priest et al. New York : Plenum Press, Bacterial Diversity and Sistematics.
41. **Felis, Giovanna E. e Dellaglio, Franco.** *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. 8, Curr.Issues Intestinal Microbiol., p. 44-61.
42. **Kleerebezem, Michiel, et al.** *The extracellular biology of the lactobacilli*. 34, 2010, FEMS, p. 199-230.
43. **Chenoll, E., Macian, C. e Aznar, R.** *Lactobacillus tuceti sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from sausage*. Syst Appl Microbiol, Vol. 29, p. 389-395.
44. **Endo, A. e Okada, S.** *Lactobacillus farraginis sp.nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue*. 2007, Int J Syst Evol Microbiol, Vol. 57, p. 870-872.
45. **Endo, A. e Okada, S.** *Lactobacillus composti sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from a compost of distilled shochu residue*. 2007, Int J Syst Evol Microbiol, Vol. 57, p. 870-872.
46. **Ehrmann, M, A., et al.** *Lactobacillus saecaphilus sp. nov., isolated from type II sourdough fermentation*. 2007, Int J Syst Evol Microbiol, Vol. 57, p. 745-750.
47. http://143.225.163.184/_docenti/villani-francesco/doc/villani-7-batteri-lattici.pdf.

48. **Hansen, P. A. e Lessel, Erwin F.** *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) *comb. nov.* 21, 1971, International journal of systematic and evolutionary microbiology, p. 69-71.
49. **Mills, Charles K. e Lessel, Erwin F.** *Lactobacterium zeae* Kuznetsov, a later subjective synonym of *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Hansen and Lessel. 4, 1973, International journal of systematic bacteriology, Vol. 23, p. 430-432.
50. **Dellaglio, F., Bottazzi, V. e Vescovo, Marisa.** *Deoxyribonucleic acid homology among Lactobacillus species of the subgenus Streptobacterium Orla-Jensen.* 2, 1975, International journal of systematic bacteriology, Vol. 25, p. 160-172.
51. **Kuznetsov, V. D.** A new species of lactic acid bacteria. *Mikrobiologiya* 28. 1959, p. 248-251.
52. **Dellaglio, F., et al.** *Designation of ATCC 334 in Place of ATCC 393 (NCDO 161) as the Neotype Strain of Lactobacillus casei subsp. casei and Rejection of the Name Lactobacillus paracasei (Collins et al., 1989) Request for an Opinion.* 2, 1991, International journal of systematic bacteriology, Vol. 41, p. 340-342.
53. **Wayne, L. G.** *Action of the Judicial Commission on the International Committee on Systematic Bacteriology on Requests for Opinions published between 1991 and 1992.* 44, 1994, International journal of systematic bacteriology, p. 177-178.
54. **Vasquez, Alejandra, et al.** *DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of Lactobacillus*

casei/paracasei and related species. 5, 2005, *Systematic and applied microbiology*, Vol. 28, p. 430-441.

55. <http://www.ncbi.nlm.gov/genomes/lproks.cgi>.

56. **Claesson, M. J., Van Sinderen, D. e O'Toole, P.** *The genus Lactobacillus - a genomic basis for understanding its diversity*. 269, 2007, *FEMS Microbiol*, p. 22-28.

57. **Kleerebezem, M., et al.** *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1*. 29, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, p. 393-409.

58. **Cai, Y., et al.** *Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage*. 82, 1999, *J Dairy Sci*, p. 520-526.

59. **Molin, G., et al.** *Numerical taxonomy of lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the intestines*. 74, 1993, *J Appl Bacteriol*, p. 314-323.

60. **Pridmore, R. D., et al.** *The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium Lactobacillus johnsonii NCC 533*. 101, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, p. 2512-2517.

61. **Ventura, M., et al.** *The prophage association of Lactobacillus johnsonii NCC 533: Comparative genomics and trascription analysis*. 320, 2004, *Virology*, p. 229-242.

62. **Granato, D., et al.** *Cell-surface associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1)*

to human intestinal cells and mucins. 72, 2004, Infect Immun, p. 2160-2169.

63. **Bergonzelli, G. E., et al.** *GroEL of Lactobacillus johnsonii La1 (NCC 533) is cell surface associated: Potential role in interactions with the host and the gastric pathogen Helicobacter pylori.* 74, 2006, Infect Immun, p. 425-434.

64. **Altermann, E., et al.** *Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium Lactobacillus acidophilus NCFM.* 102, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, p. 3906-3912.

65. **Archibald, F. S. e Fridovich, I.** *Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria.* 146, 1981, J bacteriol, p. 928-936.

66. **Klaenhammer, T. R.** *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.* 18, 1993, FEMS Microbiol, p. 39-85.

67. **Buck, B. L., et al.** *Functional analysis of putative adhesion factor in Lactobacillus acidophilus NCFM.* 71, 2005, Appl Environ Microbiol, p. 8344-8351.

68. **McAuliffe, O., Cano, R. J. e Klaenhammer, T. R.** *Genetic analysis of two bile salt hydrolase activity in Lactobacillus acidophilus NCFM.* 71, 2005, Appl Environ Microbiol, p. 4925-4929.

69. **Duong, T., et al.** *Characterization of the tre locus and analysis of trehalose cryoprotection in Lactobacillus acidophilus NCFM.* 72, 2006, Appl Environ Microbiol, p. 1218-1225.

70. **Claesson, M. J., Leahy, S. e al., et.** *Multireplicon genome architecture of Lactobacillus salivarius*. 103, 2006, Proc Natl Acad Sci USA, p. 6718-6723.
71. **Dunne, C., et al.** *Probiotics: from myth to reality demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials*. 76, 1999, Antonie Van Leeuwenhoek, p. 279-292.
72. **Rogosa, M., et al.** *Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of Lactobacillus salivarius nov spec.* 65, 1953, J Bacteriol, p. 681-699.
73. **Ahrne, S., et al.** *The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa*. 85, 1998, J Appl Microbiol, p. 88-94.
74. **Heilig, G. H. J., et al.** *Molecular diversity of Lactobacillus spp., and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA*. 68, 2002, Appl Environ Microbiol, p. 114-123.
75. **Flynn, S., et al.** *Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118*. 148, 2002, Microbiology, p. 973-984.
76. **Ventura, M., et al.** *Comparative genomics and trascriptional analysis of prophage identified in the genomes of Lactobacillus gasseri, Lactobacillus salivarius and Lactobacillus casei*. 72, 2006, Appl Environ Microbiol, p. 3130-3146.

77. **van de Gutche, M., et al.** *The complete genome sequence of Lactobacillus bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution.* 103, 2006, Proc Natl Acad Sci USA, p. 4143-4153.
78. **Klaenhammer, T. R., et al.** *Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health.* 29, 2005, FEMS Microbiol, p. 393-409.
79. **Mohania, D., et al.** *Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria.* 9, 2008, Journal of Digestive Disease, p. 190-198.
80. **Satokari, R. M.; et al.** *Molecular approaches for the detection and identification of Bifidobacteria and Lactobacilli in the Human gastrointestinal tract.* 26, 2003, Syst Appl Microbiol, p. 572-584
81. **Amor, K. B., Vaughan, E. E. e de Vos, W. M.** *Advanced molecular tools for the identification of Lactic Acid Bacteria.* 137, 2007, the Journal of nutrition, p. 741S-747S.
82. **Vos, P., et al.** *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.* 23, 1995, Nucleic Acids Res, p. 4407-4414.
83. **Ventura, M. e Zink, R.** *Specific identification and molecular typing of Lactobacillus johnsonii by using PCR-based methods and pulse-field gel electrophoresis.* 217, 2002, FEMS Microbiol Lett, p. 141-154.
84. **Gancheva, A., et al.** *A poliphasic approach towards the identification of strains belonging to Lactobacillus acidophilus and related species.* 22, 1999, p. 573-585.

85. **Du Plessis, E. M. e Dicks, L. M. T.** *Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as method to differentiate Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus gasseri and Lactobacillus johnsonii* . 31, 1995, Curr Microbiol, p. 114-118.
86. **Nigatu, A., Ahrnè, S. e Molin, G.** *Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of Lactobacillus species*. 79, 2001, Antonie van Leeuwenhoek, p. 1-6.
87. **Tynkkyen, S., et al.** *Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulse field gel electrophoresis in typing Lactobacillus rhamnosus and L. casei strains*. 65, 1999, Appl Environ Microbiol.
88. **Moschetti, G., Blaiotta, G., et al.** *Genotyping of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and determination of the number and the forms of rrn operons in L. delbrueckii and its subspecies*. 148, 1997, Res Microbiol, p. 501-510.
89. **Zhong, W., et al.** *Differentiation of Lactobacillus species by molecular typing*. 64, 1998, Appl Environ Microbiol, p. 2418-2423.
90. **Muyzer, G. e Smalla, K.** *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. 73, 1998, Antonie van Leeuwenhoek, p. 127-141.
91. **Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., et al.** *DNA isolation protocols affect detection limit of PCR approaches of bacteria in*

samples from the human gastrointestinal tract. 24, 2001, Syst Appl Microbiol, p. 405-410.

92. **Walter, J., et al.** *Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc and Weissella specie in human feces by using group-specific PCR primer and denaturing gradient gel electrophoresis.* 67, 2001, Appl Environ Microbiol, p. 2578-2585.

93. **Kimura, K., et al.** *Analysis of populations of Bifidobacteria and Lactobacilli and investigation of the immunological response of their human host to the predominant strains.* 63, 1997, Appl Environ Microbiol, p. 3394-3398.

94. **McCartney, A. L., Wang, W. e Tannock, G. W.** *Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans.* 62, 1996, Appl Environ microbiol, p. 4608-4613.

95. **Clarridge, J. E.** *Impact of 16SrRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.* 4, 2004, Clin Microbiol Rev, Vol. 17, p. 840-862.

96. **Woese, C. R.** *Bacterial evolution.* 51, 1987, Microbiol Rev, p. 221-271.

97. **Harmsen, D. e Karch, H.** *16SrDNA for diagnosis pathogens: a living tree.* 70, 2004, ASM news, p. 19-24.

98. **Kolbert, P. e Persing, C. D. H.** *Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens.* 2, 1999, Curr Opin Microbiol, p. 299-305.

99. **Dubnau, D., et al.** *Gene conservation in Bacillus species.* 54, 1965, Proc Natl Acad Sci , p. 491-498.
100. **Garrity, G. M. e Holt, J. G.** The road map to the manual. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* s.l. : G. M. Garrity, 2001, p. 119-166.
101. **Relman, D. A.** *The search for unrecognized pathogens.* 284, 1999, Science, p. 1308-1310.
102. **Bansal, A. K. e Meyer, T. E.** *Evolutionary analysis by whole genome comparisons.* 184, 2002, J Bacteriol, p. 2260-2272.
103. **Roth, A. Fischer, M., et al.** *Differentiation of phylogenetically related slowly growing Mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences.* 36, 1998, J Clin Microbiol, p. 139-147.
104. **RantaKokko-Jalava, K., et al.** *Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections.* 38, 2000, J Clin Microbiol, p. 32-39.
105. **Tortoli, E.** *Impact of genotypic studies on Mycobacterial taxonomy: the new Mycobacteria of the 1990s.* 16, 2003, Clin Microbiol Rev, p. 319-354.
106. **Song, Y-L, et al.** *Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assys using group- and species-specific primer derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and ITS flanking 23S rRNA.* 187, 2000, FEMS Microbiol Lett, p. 167-173.

107. **Barry, T., et al.** *The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify Eubacteria.* 1, 1991, PCR Methods Appl, p. 51-56.
108. **Kullen, M., Brady, L. J. e O'Sullivan, D. J.** *Evaluation of using a short region of the recA gene for the rapid and sensitive speciation of dominant Bifidobacteria in the human large intestine.* 154, 1997, FEMS Microbiol Lett, p. 377-383.
109. **Torriani, S., Felix, G. E. e Dellaglio, F.** *Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. plantarum, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene derived-primer.* 67, 2001, Appl Environ Microbiol, p. 3450-3454.
110. **Ke, D., et al.** *Development of PCR assay for rapid detection of enterococci.* 37, 1999, J Bacteriol, p. 3497-3503.
111. **Ke, D., et al.** *Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci.* 182, 2000, J Bacteriol , p. 6913-6920.
112. **Ventura, M., et al.** *Analysis, characterization and loci of the tuf genes in Lactobacillus and Bifidobacterium species and their direct application for species identification.* 11, 2003, Appl and Environ Microbiol, Vol. 69, p. 6908-6922.
113. **Lathe III, C. W. e BorK, P.** *Evolution of tuf gene: ancient duplication, differential loss and gene conversion.* 502, 2001, FEBS Letters , p. 113-116.

114. **Parmeggiani, A. e P., Nissen.** *Elongation factor Tu-targeted antibiotics: four different structures, two mechanism of action.* 2006, FEBS Letters, Vol. 580, p. 4576-4581.
115. **Krab, I. M. e Parmeggiani, A.** *Mechanism of EF-Tu, a pioneer GTPase.* 71, 2002, Prog Nucl Acids Res Mol Biol, p. 513-551.
116. **Caldon, C. E., Yoong, P. e March, P. E.** *Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPase regulate ribosome function.* 2, 2001, Molecular Microbiol, Vol. 41, p. 289-297.
117. **Bourne, H. R.** *GTPases: a family of molecular switches and clocks.* 349, 1995, Phil Trans R Soc London, p. 283-289.
118. **Nyborg, J., et al.** *Macromolecular mimicry in protein biosyntetis.* 1996, Curr Biol, Vol. 2, p. S7-S11.
119. **Bourne, H. R., Sanders, D. A. e McCormick, F.** *The GTPase superfamily: conderved structure and molecular mechanism.* 349, 1991, Nature, p. 117-127.
120. **March, P. E.** *Membrane-associated GTPases in bacteria.* 6, 1992, Mol Microbiol, p. 1253-1257.
121. **Hamm, H. E.** *The many faces of G protein signalling.* 273, 1998, J Biol Chem, p. 669-672.
122. **Fraser, C. M., et al.** *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium.* 270, 1995, Science, p. 397-343.

123. **Sela, S., et al.** *Duplication of the tuf gene: a new insight into the phylogeny of eubacteria.* 171, 1989, J bacteriol, p. 581-584.
124. **Fleischmann, R. D., et al.** *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae.* 269, 1995, Rd. Science, p. 496-512.
125. **Syvanen, A. C., et al.** *A chimeric disposition of the elongation factor genes in Rickettsia prowazekii.* 1996, J Bacteriol , Vol. 172, p. 6192-6199.
126. **Ludwig, W., M. Weizenegger, D. Betzl, E. Leidel, T. Lenz, A. Ludvigsen, D.Mollenhoff, P. Wenzig, and K. H. Schleifer.** *Complete nucleotidesequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu:functional, structural and phylogenetic evaluations.* 153, 1990, Arch Microbiol, p. 241-247.
127. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D.Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K.Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, et al.** *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori.* 388, 1997, Nature, p. 539-547.
128. **Filer, D., and A. V. Furano.** *Duplication of the tuf gene, which encodes peptide chain elongation factor Tu, is widespread in gram-negative bacteria.* . 1981, J Bacteriol, Vol. 148, p. 1006-1011.
129. **Chavagnat, F., et al.** *Comparison of tuf gene sequences for the identification of lactobacilli.* 217, 2002, FEMS Microbiol Letters, p. 177-183.

130. **Cousineau, B., Cerpa, J. e Lefebvre, J., Cedergren R.** *The sequence of the gene encoding elongation factor Tu from Chlamydia trachomatis compared with those of other organism.* 120, 1992, Gene, p. 33-41.
131. **Hudson, H., Rossi, J. e Landy, A.** *Dual function transcripts specifying tRNA and mRNA.* 294, 1981, Nature, p. 422-427.
132. **Patzelt, H., S. Rudiger, D. Brehmer, G. Kramer, S. Vorderwulbecke, E.Schaffitzel, A. Waitz, T. Hesterkamp, L. Dong, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, and E. Deuerling.** *Binding specificity of Escherichia coli trigger factor.* . 98, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, p. 14244-14249.
133. **Gottesman, S., S. Wickner, and M. R. Maurizi.** *Protein quality control: triage by chaperones and proteases.* 11, 1997, Genes Dev., p. 1338-1347.
134. **Jain, R., M. C. Rivera, and J. A. Lake.** *Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis.* . 96, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, p. 3801-3806.
135. **Brown, J. R., and W. F. Doolittle.** *Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases.* 49, 1999, J. Mol. Biol. , p. 485-495.
136. **Koonin, E. V., and M. Y. Galperin.** *Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology.* 7, 1997, Curr. Opin. Genet. Dev., p. 757-763.

137. **Ueda, K., T. Seki, T. Kudo, T. Yoshida, and M. Kataoka.** *Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA.* 181, 1999, J. Bacteriol. , p. 78-82.
138. **Leroy, F. e L., de Vuyst.** *Lactic Acid Bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.* 15, 2004, Trends Food Sci. Technol, p. 67-78.
139. **Carr, F. J. e Chill, D., Maida. N.** *The lactic acid bacteria: a literature survey.* 28, 2002, Crit Rev Microbiol, p. 281-370.
140. **Ouweland, A. C. e Salminen, S., Isolauri, E.** *Probiotics: an overview of beneficial effects.* 82, 2002, Antonie van Leeuwenhoek, p. 279-289.
141. **Ammor, M. S., Florez, A. B. e Mayo, B.** *Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria.* 24, 2007, Food Microbiol, p. 559-570.
142. **Mathur, S. e Singh, R.** *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review.* 105, 2005, Int J of Food Microbiol, p. 281-295.
143. **Bronzwaer, S. L., et al.** *A european study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance.* 28, 2002, Emerg Infect Dis, p. 278-282.
144. **Levy, S. B.** *The antibiotic paradox: How miracle drugs are destroyng the miracle.* 1992, Plenum Press, New York.

145. **Chopra, I. e Roberts, M.** *Tetracycline antibiotics: mode of action, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.* 65, 2001, *Microbiol Mol Biol Rev*, p. 232-260.
146. **Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., et al.** *Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants.* 43, 1999, *Antimicrobial Agents Chemother* , p. 2823-2830.
147. **Davison, J.** *Genetic exchange between bacteria in the environment.* 42, 1999, *Plasmid*, p. 73-91.
148. **Salyers, A. A., et al.** *Conjugative transposons: and unusual and diverse set of gene transfer elements.* 4, 1995, *Microbiol Rev*, p. 579-590.
149. **Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J.** *Genomic organization of lactic acid bacteria.* [a cura di] G., Huis in't Veld, J.H.J., Hugenholtz, J. (Eds.) Venema. s.l. : Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, , 1996, *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications.*, p. 65–87.
150. **Lin, C.F., Fung, Z.F., Wu, C.L., Chung, T.C.** *Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from Lactobacillus reuteri G4.* 36, 1996, *Plasmid*, p. 116–124.
151. **Tannock, G.W., Luchansky, J.B., Miller, L., Connell, H., Thode-Andersen, S., Mercer, A.A., Klaenhammer, T.R.** *Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633)*

erythromycin resistance determinant (ermGT) from Lactobacillus reuteri 100-63. 31, 1994, Plasmid, p. 60-71.

152. **Vescovo, M., Morelli, L., Bottazzi, V.** *Drug resistance plasmids in Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus reuteri.* 43, 1982, Appl. Environ. Microbiol. , p. 50– 56.

153. **Axelsson, L.T., Ahrne', S., Andersson, M.C., Stahl, S.R.** *Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from Lactobacillus reuteri.* 20, 1988, Plasmid , p. 171– 174. .

154. **Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Raibaud, P., Ducluzeau, R., Maguin, E.** *Isolation and characterization of a plasmid from Lactobacillus fermentum conferring erythromycin resistance.* 37, 1997, Plasmid , p. 199–203.

155. **Ishiwa, H., Iwata, S.** *Drug resistance plasmids in Lactobacillus fermentum.* . 26, 1980, J. Gen. Appl. Microbiol. , p. 71– 74.

156. **Ahn, C., Collins-Thompson, D., Duncan, C., Stiles, M.E.** *Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from Lactobacillus plantarum caTC2R.* . 27, 1992, Plasmid , p. 169–176.

157. **Danielsen, M.** *Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from Lactobacillus plantarum 5057 reveals a composite structure.* 48, 2002, Plasmid , p. 98– 103.

158. **Gevers, D., Danielson, M., Huys, G., Swings, J.** *Molecular characterization of tet (M) genes in Lactobacillus isolates from different types of fermented dry sausage.* 69, 2002, Appl. Environ. Microbiol. , p. 1270– 1275.
159. **Gfeller, K.F.** *Molecular analysis of antimicrobial resistance determinants of commensal lactobacilli.* 2003, PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Switzerland.
160. **Salyers, A. A., Gupta, A. e Wang, Y.** *Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes .* 9, 2004, TRENDS in Microbiology , Vol. 12.
161. **Danielsen, M. e Wind, A.** *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents.* 82, 2003, Int J Food Microbiol, p. 1-11.
162. **Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E.** *Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese.* 2005, Lait, Vol. 85, p. 193-204.
163. **Condon, S.** *Aerobic metabolism of lactic acid bacteria.* 7, 1983, Ir. J. Food Sci. Technol. , p. 15-25.
164. **Putman, M., van Veen, H.W., Degener, J.E., Konings, W.N.** *The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines.* 147, 2001, Microbiology , p. 2873–2880.

165. **Kim, K.S., Morrison, J.O., Bayer, A.S.** *Deficient autolytic enzyme activity in antibiotic-tolerant lactobacilli.* 36, 1982, *Infect. Immun.* , p. 582–585.
166. **Hamilton-Miller, J.M.T. e Shah, S.** *Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli.* . 26, 1998, *Lett. Appl. Microbiol.* , p. 153–154.
167. **Simpson, W.J., Hammond, J.R.M., Miller, R.B.** *Avoparcin and vancomycin—Useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria.* 64, *J. Appl. Bacteriol.* , p. 299–309.
168. **Elisha, B.G., Courvalin, P.** *Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp.* 152, 1995, *Gene* , p. 79–83.
169. **Klein, G., Hallmann, C., Casas, I.A., Abad, J., Louwers, J., Reuter, G.** *Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods.* 89, 2000, *J. Appl. Microbiol.* ., p. 815–824.
170. **DeLisle, S., Perl, T. M.** *Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance.* 123, 2003, *Chest* , p. 504S–518S.
171. **Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H.** *Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products.* . 67, 2001, *Int. J. Food Microbiol.* , p. 147–152.

172. **Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K.** *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species.* 61, 1998b, *J. Food Prot.* , p. 1636–1643.
173. **Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S.** *Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains.* 98, 2005, *Int. J. Food Microbiol.* , p. 211–217.
174. **Delgado, S., Florez, A.B., Mayo, B.** *Antibiotic susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium species from the human gastrointestinal tract.* 50, 2005, *Curr. Microbiol.*, p. 202–207.
175. **Florez, A.B., Delgado, S., Mayo, B.** *Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment.* 51, 2005, *Can. J. Microbiol.* 51, 51–58., p. 51–58.
176. **Cataloluk, O., Gogebakan, B.** *Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey.* 236, 2004, *FEMS Microbiol. Lett.* .
177. **Villedieu, A., Diaz-Torres, M.L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Wilson, M., Mullany, P.** *Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria.* *Antimicrob.* 47, 2003, *Agents Chemother.* , p. 878–882.
178. **Roberts, M.C.** *Update on acquired tetracycline resistance genes.* 245, 2005, *FEMS Microbiol. Lett.* , p. 195–203.
179. **Huys, G., D’Haene, K., Swings, J.** *Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic*

Lactobacillus plantarum strain CCUG 43738. *Antimicrob.* 50, 2006, Agents Chemother. .

180. **Curragh, H.J., Collins, M.A.** *High-levels of spontaneous drug-resistance in Lactobacillus.* . 73, 1992, *J. Appl. Bacteriol.* , p. 31–36.

181. **Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J.** *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.* 81, 2002, *Int. J. Food Microbiol.* , p. 1 – 10.

182. **Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F.** *Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food.* 76, 1999, *Antonie van Leeuwenhoek* , p. 115–137.

183. **Olsson-Liljequist, B., Larsson, P., Walder, M., Miorner, H.** *Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. III. Methodology for susceptibility testing.* 1997, *Scand. J. Infect. Dis.*, p. Suppl. 105, 13–23.

184. **Huys, G., D’Haene, K., Swings, J.** *Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method.* 34, 2002, *Lett. Appl. Microbiol.* , p. 402–406.

185. **Swenson, J.M., Ferraro, M.J., Sahm, D.F., Charache, P., Tenover, F.C.** *New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. The National Committee for Clinical Laboratory Standards Working Group on Enterococci.* 30, 1992, *J. Clin. Microbiol.* , p. 2525–2528.

186. **Blondeau, J. M.** *Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification and development of resistance.* (Suppl 2), 2004, Survey of ophthalmology, Vol. 49, p. S73-S78.
187. **Appelbaum, P. C. e Hunter, P. A.** *The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives.* 16, 2000, Int J Antimicrob Agents, p. 5-15.
188. **King, D. E., R., Malone e H., Lilley S.** *New classification and update on the quinolone antibiotics.* 61, 2000, Am Fam Physician, p. 2741-2748.
189. **Ball, P., Fernald, A. e Tillotson, G. S.** *Therapeutic advances of new fluoroquinolones.* 7, 1998, Exp Opin on Investigational Drugs, p. 761-783.
190. **Ito, K., et al.** *In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog.* 17, 1980, Antimicrob Agents Chemoter, p. 103-108.
191. **Mather, R., et al.** *Fourth generation of fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics.* 133, 2002, Am J Ophthalmol.
192. **Tempera, G., et al.** *The Impact of Prulifloxacin on Vaginal Lactobacillus Microflora: An In Vivo Study.* 6, 2009, Journal of Chemotherapy, Vol. 21, p. 646-650.
193. **Chen, F.-J. e Lo, H.-J.** *Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance.* 36, 2002, p. 1-9.

194. **Emmerson, A. M e Jones, A. M.** *The quinolones: decades of development and use.* Suppl. S1, 2003, J Antimicrob Chemotherapy, Vol. 51, p. 13-20.
195. **Croom, F. K. e Goa, L. K.** *Levofloxacin: A Review of its Use in the Treatment of Bacterial Infections in the United States.* 24, 2003, Drugs, Vol. 63, p. 2769-2802.
196. **Hurst, M., et al.** *Levofloxacin: An Updated Review of Its Use in the Treatment of Bacterial Infections.* 14, 2002, Drugs, Vol. 62, p. 2127-2167.
197. **Hooper, D. C.** *Emerging Mechanism of fluoroquinolone Resistance.* 2, 2001, Emerging Infectious Diseases, Vol. 7, p. 337-341.
198. **Wang, C. J.** *DNA topoisomerases.* 65, 1996, Ann Rev Biochem , p. 635-692.
199. **Ruiz, J.** *Mechanism of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.* 51, 2003, J Antimicrob Chem, p. 1109-1117.
200. **Hawkey, P. M.** *Mechanism of quinolone action and antimicrobial response.* 51, Suppl S1, 2003, p. 29-35.
201. **Holzappel, Wilhelm H., et al.** *Taxonomy and important features of probiotic microorganism in food and nutrition.* 73, 2001, The american journal of clinical nutrition, p. 365S-373S.
202. **Gellert, M.** *DNA topoisomerases.* 50, 1981, Annu Rev Biochem, p. 879-910.

203. **Shen, L. L. e Chu, D. T. W.** *Type II DNA topoisomerase as antibacterial targets.* 2, 1996, *Curr Pharm Des*, p. 195-208.
204. **Piddock, L. J. V.** *Mechanism of fluoroquinolones resistance: An updaten1994-1998.* 58 Suppl 2, 1999, *Drugs*, p. 11-18.
205. **Berger, J. M., et al.** *Structure and mechanism of DNA topoisomerase II.* 379, 1996, *Nature*, p. 225-232.
206. **Hooper, D. C.** *Mechanism of action and resistance of older and newer fluoroquinolones.* 31 Suppl. 2, 2000, *Clin Infect Diseases*, p. S24-28.
207. **Blanch, F., et al.** *Differential behaviors of Staphilococcus aureus and Escherichia coli type II DNA topoisomerases.* 40, 1998, *Antimicrob Agent Chem*, p. 2714-2720.
208. **Yoshida, H., et al.** *Quinolone resistance-determining region in DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli.* 34, 1990, *Antimicrob Agents Chem*, p. 1271-1272.
209. **Hummel, Anja S., et al.** *Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria.* 3, 2007, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, p. 730-739.
210. **Fukao, M., et al.** *Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Strain Lactobacillus brevis KB290.* 72(9), 2009, *Journal of Food Protection*, p. 1923-1929.
211. **Jacoby, G. A.** *Mechanism of resistance to Quinolones.* 41 Suppl., 2005, *Clin Infect Dis*, p. S120-S126.

212. **Putman, M., Van Been, H. W. e Konings, W. L.** *Molecular properties of bacterial multidrug transporters.* 64, 2000, *Microb Molec Biol Rev*, p. 672-693.
213. **Klare, I., et al.** *Susceptibility Testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria* , 12, 2005, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, p. 8982–8986 .
214. **Pruksakorn, S., et al.** *Epidemiological Analysis of Non-M-Typeable Group A Streptococcus Isolates from a Thai Population in Northern Thailand.* 3, 2000, *J. Clin. Microbiol.* , Vol. 38, p. 1250–1254 .
215. **Randazzo, C. L., et al.** *Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives.* 90, 2004, *Int J Food Microbiol*, p. 9-14.
216. **National Center for Biotechnology Information.** nucleotide home. *NCBI*. [Online] www.ncbi.nlm.nih.gov.
217. **Charteris, William P., et al.** *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic lactobacillus species.* 12, December 1998, *Journal of food protection*, Vol. 61, p. 1636-1643.
218. **Woo, P. C. Y, et al.** *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.* 14, 2008, *Clin Microbiol Infect* , p. 908-934.
219. **Ouoba, L. I. I., Lei, V. e B., Jensen L.** *Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and*

European origin to antimicrobials of the resistance genes to other bacteria. 121, 2008, Int J of Food Microbiol, p. 217-224.

220. **Zarazaga, M., et al.** *In vitro activities of ketolide HMR3647, Macrolides, and other antibiotics against Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus isolates.* 12, 1999, Antimicrob Agents and Chemoter, Vol. 43, p. 3039-3041.

221. **Jorgensen J. H. [et al.]** *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria;* Proposed Guideline, Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). - 2005. - 26 : Vol. 25.

Riferimenti immagini

Figura 1-2: Lebeer, S.; Vanderleyden, J. e De Keersmaecker, S. C. J. *Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action .* 4, 2008, Microbiol and Molecul Biology reviews, Vol. 72, p. 728-764.

Figura 4-2 e 4-3: Wikipedia Chinoloni-Wikipedia [Online] // Wikipedia, l'enciclopedia libera. - <http://it.wikipedia.org/wiki/Chinoloni>.

Figura 4-4: Blondeau, J. M. *Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification and development of resistance.* (Suppl 2), 2004, Survey of ophthalmology, Vol. 49, p. S73-S78.

Figura 4-5: Emmerson, A. M e Jones, A. M. *The quinolones: decades of development and use.* Suppl. S1, 2003, J Antimicrob Chemotherapy, Vol. 51, p. 13-20.

Figura 4-6: Damerell, S. Intense X-rays pave the way for better antibacterial drugs. *Diamond* [online] www.diamond.ac.uk

Figura 4-7: Chen, F.-J. e Lo, H.-J. *Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance.* 36, 2002, p. 1-9.

Figura 6-3 e 6-4: Song, Y-L, et al. *Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and ITS flanking 23S rRNA.* 187, 2000, FEMS Microbiol Lett, p. 167-173.