

Indagine preliminare sulla resistenza ai fluorochinoloni in ceppi di *Escherichia coli* resistenti all'acido nalidixico isolati da feci animali

Alessandra Alessiani⁽¹⁾, Elisabetta Di Giannatale⁽¹⁾, Mariagrazia Perilli⁽²⁾, Chiara Forcella⁽²⁾, Gianfranco Amicosante⁽²⁾ & Katuscia Zilli⁽¹⁾

Summary

E' stata valutata la possibile resistenza ai fluorochinoloni in 17 ceppi di *Escherichia coli* resistenti all'acido nalidixico, isolati da feci animali. Sono state impiegate tecniche di PCR, RFLP, ibridazione, e sequenziamento allo scopo di evidenziare la presenza di mutazioni puntiformi nelle subunità A e B della DNA girasi e possibile la presenza del gene *qnr* a testimonianza di eventuale resistenza plasmidica. In 10 dei 17 ceppi di *E. coli* esaminati è stata evidenziata una resistenza di tipo cromosomico con la presenza di integroni di classe I e in nessuno di essi è stata evidenziata la presenza del gene *qnr*. In 6 ceppi è stata osservata la mutazione Ser83-Leu e in un ceppo la mutazione Ser83-Ala. Non sono state evidenziate le mutazioni note ai codoni Asp87 di *gyrA* e Asp426 e Asp477 di *gyrB*. Dal sequenziamento del ceppo di *E. coli* ATCC 25922 sottoposto ad induzione di resistenza è stata rilevata una mutazione in *gyrB* al residuo Lys 447 che è stato sostituito da una Arginina.

Keywords

Acido nalidixico, *Escherichia coli*, Ibridizzazione, Induzione di resistenza, PCR, Resistenza agli antimicrobici, RFLP, Sequenziamento.

Introduzione

L'aumentata resistenza dei microrganismi agli antimicrobici, è considerata a livello mondiale uno dei principali problemi di sanità pubblica, sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Negli animali i farmaci antimicrobici oltre ad essere utilizzati per il trattamento delle malattie infettive o a scopo di prevenzione in momenti di particolare stress, in passato sono stati largamente utilizzati come promotori della crescita (9).

L'esposizione agli antimicrobici ha esercitato sui microrganismi una pressione selettiva che ha determinato un aumento delle resistenze a questi farmaci. La trasmissione delle resistenze tra batteri patogeni è stata ampiamente dimostrata in ambiente ospedaliero, considerando più probabile la trasmissione orizzontale di geni di resistenza tra batteri commensali e batteri patogeni piuttosto che il trasferimento di geni di resistenza fra un patogeno e l'altro (1). L'importanza dei batteri commensali quali mediatori nella trasmissione e diffusione di geni di resistenza è stata ampiamente riportata in letteratura (6, 19), ed è stata evidenziata la correlazione fra l'utilizzo di antibiotici negli animali e l'incremento di geni di resistenza nel microbiota umano (14) e la funzione che questi batteri hanno come serbatoio di geni di resistenza che diffondono

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
e.digiannatale@izs.it

(2) Department of Biomedical Sciences and Technologies, L'Aquila University, Via Vetoio (Coppito 2), 67010 Coppito (AQ), Italia

poi nei diversi ecosistemi (15). Quindi animali e alimenti derivati costituiscono una riserva da cui i batteri resistenti possono essere trasferiti all'uomo, oppure una riserva da cui i determinanti di resistenza possono essere trasferiti a batteri zoonotici (15).

Le *Enterobacteriaceae* e l'*Escherichia coli* in particolare, sono stati fra i batteri più studiati al fine di chiarire i fenomeni alla base dell'antibioticoresistenza, soprattutto in medicina umana. *E. coli* è stato individuato, quale microorganismo indicatore (*alert organism surveillance*) essendo ubiquitario e particolarmente predisposto al trasferimento orizzontale di geni di resistenza (13).

Chinoloni e fluorochinoloni sono antibiotici ad ampio spettro efficaci su un'ampia gamma di microrganismi, utilizzati sia in clinica umana che veterinaria e la resistenza all'acido nalidixico è considerata un indicatore dell'aumento di resistenza ai fluorochinoloni (11).

In Europa nel 2007, i ceppi di *E. coli* isolati da animali, hanno mostrato resistenza soprattutto nei confronti di tetracicline, acido nalidixico e ampicillina. I ceppi isolati da feci di pollo, sono risultati i più resistenti in assoluto sia ad acido nalidixico (17,4%) che alla ciprofloxacina (37,8%) (3). È noto che la resistenza a questa classe di farmaci può essere sia di origine cromosomica che plasmidica (4) ed è legata a mutazioni negli enzimi target di queste molecole che sono la DNA girasi e la topoisomerasi IV. La DNA girasi è un enzima tetramerico che catalizza il superavvolgimento negativo del DNA ed è composto da due subunità A e due subunità B. Anche la topoisomerasi IV è un enzima tetramerico costituito da due subunità C e due subunità E ed è coinvolto nella separazione dei cromosomi figli durante la replicazione del DNA (5). La resistenza dovuta a mutazioni puntiformi nasce spontaneamente e si traduce in sostituzioni di aminoacidi all'interno dei geni della girasi e della topoisomerasi (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), spesso in combinazione con una diminuzione dell'espressione delle porine di membrana e di un over-espressione del sistema delle pompe di efflusso (5).

Studi su isolati clinici hanno dimostrato che la maggior parte delle mutazioni che inducono resistenza ai chinolonici si trovano nella subunità A della girasi (*gyrA*) (10). Le alterazioni descritte in *gyrA* si trovano prevalentemente in una regione chiamata *quinolon resistance-determining region* (QRDR). Una singola mutazione in questa regione si traduce in un alto livello di resistenza all'acido nalidixico, ma non ai fluorochinoloni per cui è necessaria la presenza di mutazioni aggiuntive. Per questo motivo la MIC dell'AN può essere usata come marcatore generico della resistenza dei Gram negativi alla famiglia dei chinolonici (10).

Nella resistenza mediata da plasmide, il gene interessato è il gene *qnr* (4, 5, 16), il quale passa da un batterio all'altro mediante trasferimento orizzontale, aumentando la frequenza mutazionale e quindi la possibilità che si amplifichi la resistenza (18). La resistenza ai chinolonici mediata da plasmide è legata alla presenza di strutture denominate integroni, che sono elementi di DNA mobili, formati da due segmenti conservati che fiancheggiano una regione centrale contenente un frammento ("cassetta") che codifica per la resistenza agli antimicrobici e avrebbero un ruolo importante per l'acquisizione e la diffusione di geni di resistenza agli antimicrobici. Il *qnr* stesso si trova all'interno di un integrone (16). Nei batteri Gram-negativi prevale l'integrone di Classe I (4).

La localizzazione cromosomica del *qnr* è stata recentemente dimostrata da differenti autori; per questo è stato considerato parziale studiare i campioni solo per il plasmide.

Essendo la resistenza ai fluorochinoloni supportata da elementi genetici sia di natura plasmidica che cromosomica la prima fase della ricerca è stato lo screening molecolare. Si è voluto individuare, su ceppi resistenti ai chinolonici, quale fosse la base molecolare di tale fenotipo di resistenza e, dopo aver riscontrato mutazioni nei geni cromosomici *gyrA* e *gyrB*, la ricerca è stata focalizzata non sulla presenza o meno del plasmide, ma anche di geni di resistenza veicolati da plasmidi (*qnr*).

In questo studio è stata valutata la possibile resistenza ai chinoloni ed ai fluorochinoloni in *E. coli* isolati da feci di pollo e bovino, resistenti all'acido nalidixico, attraverso la ricerca di integroni effettuata mediante ibridazione e successiva PCR per evidenziare la presenza del gene *qnr*; inoltre i ceppi sono stati processati con PCR-RFLP e sequenziamento per indagare l'eventuale presenza di mutazioni puntiformi in *gyrA* e in *gyrB*. È stata effettuata anche un'induzione di resistenza *in vitro*, a livelli crescenti di antibiotico, utilizzando *E. coli* ATCC 25922 (Enrofloxacin), per valutare la comparsa di resistenza.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 85 campioni di feci di pollo e 55 di bovino raccolte al mattatoio al momento della macellazione. Le feci sono state seminate su agar Mac Conkey, incubate per 24-48 ore in aerobiosi a 37°C. Dopo incubazione le colonie lattosio positive sono state sottoposte ad identificazione biochimica mediante sistema Vitek (Biomérieux, Firenze, Firenze). I ceppi biochimicamente identificati come *E. coli*, sono stati sottoposti ad antibiogramma mediante il metodo della disco diffusione su agar o Kirby-Bauer (2) secondo le modalità di esecuzione e di interpretazione degli aloni di inibizione descritte dal National Committee Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (9). Le

prove sono state eseguite testando i ceppi con un panel di antibiotici (Beckton-Dickinson, St Louis, Missouri) tra quelli più rappresentativi. Tra le molecole testate sono state utilizzate acido nalidixico 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, enrofloxacin da 5 µg.

In totale sono stati selezionati 17 *E. coli* acido nalidixico resistenti, tutti provenienti da campioni di feci di pollo prelevati in Abruzzo, mentre *E. coli* ATCC 25922 è stato utilizzato come ceppo di riferimento essendo certificato dall'ATCC privo di plasmidi veicolanti resistenza.

L'ibridazione è stata effettuata utilizzando un kit reperibile in commercio (GE Healthcare, Milano) secondo le istruzioni allegate.

I primers utilizzati per la PCR, sono stati designati su Blast (8) (Tabella I). L'estrazione e la purificazione del DNA sono state eseguite utilizzando un kit e Master mix 2× del commercio (Mobio laboratories Inc., Carlsbad, California). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando un *thermal cycler* GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, California) applicando le seguenti condizioni:

- 94°C per 5' come denaturazione iniziale
- 33 cicli da: 94°C per 30", 53°C per 30", 72°C per 30" ; ed estensione finale a 72°C per 7'.

Il prodotto di amplificazione è stato separato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 1% (Eppendorf, Milano,) e colorato con sybr safe DNA gel stain (Promega, Madison, Wisconsin);

Tabella I
Sequenze di primers utilizzati

Target	Primers	Sequenze
qnrS1 <121-538>	<i>QnrS1</i> for <i>QnrS1</i> rev	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA TTA ATT GGC ACC CTG TAG GC
qnrS2 <1-657>	<i>QnrS2</i> for <i>QnrS2</i> rev	ATG GAA ACC TAC CGT CAC CTA GTC AGG AAA AAC AAC
qnrA <1-632>	<i>QnrA</i> for <i>QnrA</i> rev	ATG GAT ATT ATT GAT AAA GTT TTT CAG AAG GGT TCC AGC AGT TGC
qnrB1 <1-681>	<i>QnrB1</i> for <i>QnrB1</i> rev	ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA CTA ACC AAT CAC CGC GAT
QRDR <i>gyrA</i> <25-613>	ENTGYRA_for ENTGYRA_rev	ACA CCG GTC AAC ATT GAG GA TGC TGA TGT CTT CAT CAT CG
QRDR <i>gyrB</i> <795-1485>	ENTGYRB_for ENTGYRB_rev	CAT CTA CTG (CT)AC CAA C GAT GAT GAT GCT GTG (AG)TA

QRDR regione determinante la resistenza ai chinoloni (*quinolon resistance-determining region*)

per la visualizzazione dell'immagine è stato utilizzato un transilluminatore a raggi UV. Per la RFLP è stato utilizzato l'enzima Hinf I (Promega, Madison, Wisconsin). Il prodotto della restrizione è stato analizzato con elettroforesi in gel d'agarosio al 3%.

Il prodotto di PCR è stato purificato per il sequenziamento utilizzando il QIAquick purification Kit (Qiagen, Milano) per la reazione di sequenza è stato utilizzato il Big Dye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California) secondo le istruzioni riportate per l'utilizzo con thermal cycler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California).

La purificazione del prodotto della reazione di sequenza è stata effettuata con il Agencourt CleanSEQ e Dye Terminator Removal (Agencourt Bioscience Corporation, Madison Wisconsin). Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando l'Avant Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California).

Per l'induzione di resistenza è stata preparata una soluzione batterica iniziale, ad una concentrazione di 0,5 MacFarland, di *E. coli* ATCC 25922. La prima semina è stata effettuata con un'ansa calibrata da 10 µl su 50 piastre di *brain infusion broth agar* (Becton Dickinson, St Louis, Missouri) ed incubata a 37°C per 18-24 ore in aerobiosi. Le colonie cresciute sono state a loro volta stemperate in Brain Infusion broth (Becton Dickinson, St Louis, Missouri) e seminate in Brain Infusion agar (Becton Dickinson, St Louis, Missouri) con una concentrazione di iniziale di enrofloxacin di 0.008 µg/ml, che è stata raddoppiata ad ogni passaggio fino ad arrivare a 655.36 µg/ml (undicesimo passaggio, T11) in cui si sono ottenuti i ceppi resistenti.

I ceppi resistenti ad ogni livello di concentrazione, sono stati sottoposti a sequenziamento (usando come target il QRDR di GyrA) e i risultati confrontati con quelli del ceppo di riferimento.

Risultati

Dei ceppi sottoposti a test di sensibilità agli antimicrobici, 17 sono risultati resistenti

all'acido nalidixico e sensibili ad enrofloxacin e ciprofloxacina.

Dall'ibridizzazione e susseguente PCR è stato osservato che solo 10 dei 17 ceppi di *E. coli* presentano integrone di classe I e in nessuno di essi è stata evidenziata la presenza del gene *qnr*, testimoniando che la resistenza riscontrata è solo di tipo cromosomico.

Con la PCR è stato evidenziato, in entrambe i casi, sia per *gyrA* che per *gyrB*, un prodotto di 600 bp (Fig. 1 e 2) che è stato poi digerito con Hinf I e sottoposto a RFLP. Il sito di restrizione di Hinf I è localizzato al codone Ser83 di *gyrA* (11).

Dall'analisi dei prodotti di digestione per *gyrA* sono stati osservati due differenti patterns di restrizione (Fig. 3) in cui 4 ceppi (ceppi 3, 7, 8, 9) non hanno presentato mutazioni mentre i restanti ceppi hanno presentato mutazioni al codone Ser83 e di queste 7 hanno dato luogo a sostituzione mentre le altre erano mutazioni silenti che non hanno prodotto variazioni sostanziali della girasi.

Per *gyrB* non abbiamo ottenuto profili differenti dall'ATCC per nessun campione (Fig. 4).

Sequenziando i prodotti di PCR in sei ceppi si sono evidenziate mutazioni in Ser83-Leu e in un ceppo Ser83-Ala, inoltre numerose mutazioni silenti in *gyrA* e nessuna mutazione in *gyrB*.

La posizione delle mutazioni nel QRDR della DNA girasi può dare luogo a differenti pattern di resistenza, nei confronti soprattutto dei fluorochinoloni.

Molto spesso, le mutazioni in queste regioni però, non sono l'unico meccanismo di resistenza ai chinoloni, per cui è difficile affermare se, ad esempio, una resistenza maggiore ad un antibiotico rispetto ad un altro dipenda dalle mutazioni nelle girasi o invece da un diverso accumulo dell'antibiotico all'interno della cellula (dovuto a variazioni del sistema di efflusso) o da altri meccanismi. In questo caso non si possono apprezzare le differenze non avendo a disposizione i valori di MIC.

Nell'induzione alla resistenza, si è avuta nel corso dei raddoppi di concentrazione

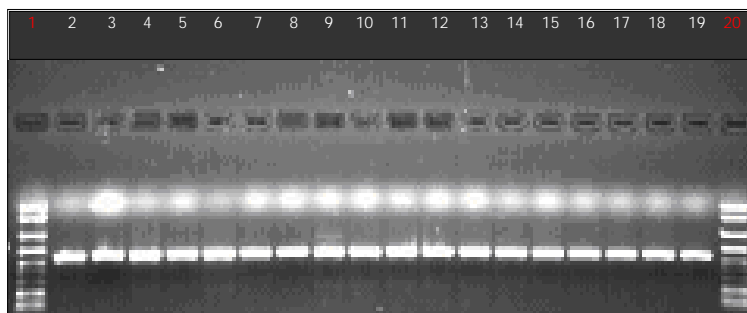


Figura 1
Gel d'agarosio dei prodotti di PCR di *gyrA*
Linea 1 e linea 20 marker
Da linea 2 a linea 18 ceppi di *Escherichia coli* isolati da animali
Linea 19 *E. coli* ATCC 25922

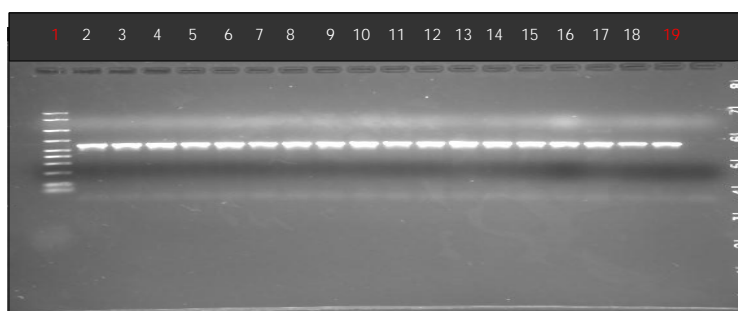


Figura 2
Gel d'agarosio dei prodotti di PCR di *gyrB*
Linea 1 marker
Da linea 2 a linea 18 *Escherichia coli* isolati da animali
Linea 19 *E. coli* ATCC 25922

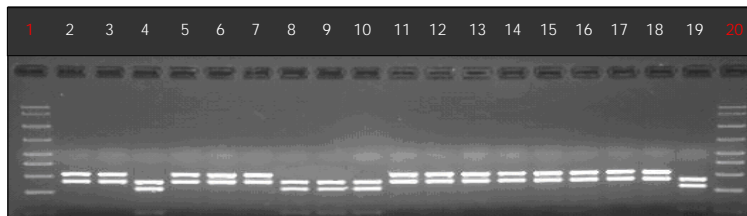


Figura 3
Pattern di restrizione di *gyrA* di 17 ceppi di *Escherichia coli*
Linea 1 e 20 marker
Da linea 2 a 18 *E. coli* isolati da animali
Linea 19 *E. coli* ATCC 25922

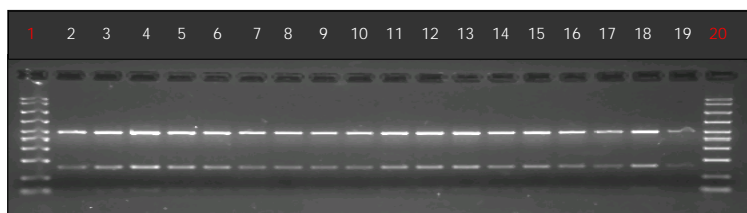


Figure 4
Pattern di restrizione di *gyrB* di 17 ceppi di *Escherichia coli*
Linea 1 e 20 marker
Da linea 2 a 18 *E. coli* isolati da animali
Linea 19 *E. coli* ATCC 25922

dell'enrofloxacin, una diminuzione costante dell'alone di sensibilità e le colonie risultate resistenti ad ogni livello di concentrazione, sono state sottoposte sequenziamento. Dal confronto delle sequenze delle colonie ottenute nei vari passaggi, è emerso che rispetto al ceppo di *E. coli* ATCC 25922 iniziale, con l'induzione di resistenza si è verificata una mutazione in *gyrB* al residuo Lys 447 che è stato sostituito da una Arginina.

Dal sequenziamento dei ceppi di *E. coli* isolati da animali, per *gyrB*, non sono state osservate mutazioni.

Discussione

La relazione tra le mutazioni in *gyrA* e la resistenza a chinoloni e fluorochinoloni è stata ampiamente descritta in vari batteri Gram-negativi. All'interno del QRDR di *gyrA* al livello maggiore di resistenza ai chinoloni è conferito da mutazioni ai codoni Ser83 ed Asp87 (5, 13, 20).

In questo studio, tutti i ceppi testati sono risultati AN resistenti e sensibili al ciprofloxacina e all'enrofloxacin. Questi dati sono in accordo con studi che affermano che non tutte le mutazioni in *gyrA* o *gyrB* conferiscono lo stesso livello di resistenza ai chinoloni (4, 5).

Inoltre, nei 17 campioni resistenti all'acido nalidixico, in *gyrA*, non sono state riscontrate mutazioni al codone Asp87, mentre al codone Ser83-Leu, 6 ceppi hanno presentato mutazione classica Ser83-Leu e un ceppo la mutazione Ser83-Ala; nessuna mutazione è stata osservata ai codoni Asp426 e Lys447 in *gyrB*.

In *gyrB* sono state evidenziate mutazioni ai codoni Asp426 e Lys 447 (21); le mutazioni in Asp426 conferiscono resistenza a tutti i chinoloni testati, mentre la mutazione in Lys447 conferisce resistenza all'acido nalidixico ma i ceppi mostrano ipersensibilità ai chinoloni anfoterici come il ciprofloxacina (4).

In generale le sostituzioni aminoacidiche possono ledere la capacità di formare legami idrogeno e la carica negativa degli aminoacidi in queste posizioni appare importante per

l'interazione tra chinoloni ed il complesso DNA-girasi (12).

Inoltre, alcuni aminoacidi all'interno del QRDR possono essere più importanti per il legame tra le subunità *gyrA* e *gyrB* che per l'attività dell'oloenzima stesso. Insieme questi fattori possono aiutare a spiegare perché alcune sostituzioni hanno un maggiore effetto sulla resistenza ai fluorochinoloni rispetto ad altre (17).

Dal sequenziamento dell'*E. coli* ATCC 25922 dopo induzione di resistenza, è stata evidenziata una mutazione al residuo Lys 447 in *gyrB*, il quale è stato sostituito da arginina, confermando che la pressione antibiotica può indurre mutazione.

Dato l'esiguo numero di ceppi testati e la presenza di mutazioni silenti è necessario estendere lo studio comprendendo isolati veterinari resistenti a chinoloni e fluorochinoloni provenienti sia da animali che da alimenti, al fine di studiare sia il meccanismo che conferisce la resistenza sia qual è la relazione con il meccanismo di resistenza, ampiamente esaminato e descritto in letteratura negli isolati clinici umani.

Conclusioni

L'esposizione agli antimicrobici ha esercitato sui microrganismi una pressione selettiva che ha determinato un aumento delle resistenze a questi farmaci sia negli animali che nell'uomo. Questa capacità si evolve attraverso vari meccanismi e, una volta che uno o più geni di resistenza vengono generati, i batteri possono trasferire l'informazione genetica, mediante trasferimento orizzontale dei geni di resistenza fra batteri commensali e batteri patogeni. Dato l'alto consumo di antibiotici, talvolta usati in maniera impropria, la resistenza a questi farmaci sta diventando un problema comune in molte parti del mondo. Altri fattori che contribuiscono alla diffusione del fenomeno sono una errata diagnosi, prescrizioni inutili, uso improprio di antibiotici da parte dei pazienti, nonché l'uso di antibiotici addizionati agli alimenti per animali come promotori della crescita.

Solo 10 dei 17 ceppi di *E. coli* studiati presentano integrità di classe I e in nessuno di essi è stata evidenziata la presenza del gene *qnr*, testimoniando che la resistenza riscontrata è solo di tipo cromosomico.

In 7 ceppi sono state riscontrate mutazioni al codone Ser83 di *gyrA*, mutazioni già riscontrate in ceppi isolati da uomo, inoltre l'induzione di resistenza ha portato ad una mutazione in *gyrB* al residuo Lys 447 che è stato sostituito da una Arginina, anche questa riscontrata in ceppi umani.

L'aver comunque evidenziato nei ceppi isolati da animali le stesse mutazioni riscontrate nei ceppi umani, e il risultato della comparsa di mutazioni in seguito ad induzione di resistenza in ceppi sensibili suggeriscono la necessità estendere lo studio ad un numero maggiore di isolati allo scopo di contribuire a spiegare il reale peso che l'utilizzo degli antibiotici ha sulla resistenza dei ceppi isolati dagli animali e le connessioni del possibile trasferimento di queste resistenze all'uomo tramite gli alimenti.

Bibliografia

1. Andremont A. 2003. Commensal flora play may key role in spreading antibiotic resistance. *AMS News*, **69**, 601-607.
2. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493-496.
3. European Food Safety Authority (EFSA) 2007. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J*, **130**, 1-25 (www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf?ssbinary=true ultimo assessore il 13 novembre 2009).
4. Herrera G., Aleixandra V., Urios A. & Blanco M. 1993. Quinolone action in *Escherichia coli* cells carrying *gyrA* and *gyrB* mutations. *FEMS Microbiol Lett*, **106**, 187-191.
5. Hopkins K.L., Davies R.H. & Threlfall E.J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents*, **25**, 358-373.
6. Luo H., Wan K. & Wang H.H. 2005. High frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMβ1 transmission in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 2970-2978.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS which changed on 1 January 2005 to: the Clinical and Laboratory Standards Institute) 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards, 7th Ed (M2-A7). NCCLS, Pennsylvania, 54-63.
8. National Library of Medicine (NLM) 2009. Basic local alignment search tool (BLAST). Blast data base. NLM, Washington, DC (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi ultimo assessore il 13 novembre 2009).
9. O'Brien T.F. 2001. Improve and expand surveillance. In Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups, Chapter I. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA) (J.L. Avorn, J.F. Barrett, P.G. Davey, S.A. McEwen, T.F. O'Brien & S.B. Levy, eds). World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10, 15-31 (whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf ultimo assessore il 13 novembre 2009).
10. Paterson D.L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*, **119**, S20-S28.
11. Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*, **51**, 1109-1117.
12. Sáenz Y., Zarazaga M., Briñas L., Ruiz-Larrea F. & Torres C. 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother*, **51**, 1001-1005.
13. San Martín B., Lapierre L., Toro C., Bravo V., Cornejo J., Hormazabal J.C. & Borie C. 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol*, **110**, 239-244.
14. Smith D.L., Harris A.D., Johnson J.A., Silbergeld E.K. & Morris J.G. 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 6434-6439.
15. Smith M.S., Yang R.K., Knapp C.W., Niu Y., Peak N., Hanfelt M., Galland J.C. & Graham D.W. 2004. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 7372-7377.

16. Tran J.H. & Jacoby G.A. 2002. Mechanism of plasmid mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 5638-5642.
17. Truong Q.C., Nguyen V.J., Shlaes D., Gutmann L. & Moreau N.J. 1997. A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 85-90.
18. Wang G.Q., Wu C.M., Du X.D., Shen Z.Q., Song L.H., Chen X. & Shen J.Z. 2008. Characterization of integrons-mediated antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol*, **127**, 73-78.
19. Wang H.H., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Wittum T.E., Yousef A. & Bakaletz L.O. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, **254**, 226-231.
20. Weigel L.M., Stewart C.D. & Tenover F.C. 1998. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 2661-2667.
21. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M. & Nakamura S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**, 1647-1650.