



MOLECULAR CHARACTERIZATION OF STRAINS OF SALMONELLA NAPOLI ISOLATED IN MARCHE REGION BY PFGE - TIPIZZAZIONE GENOTIPICA MEDIANTE PFGE DI CEPPI DI SALMONELLA NAPOLI ISOLATI NELLA REGIONE MARCHE

Staffolani M¹, Medici L¹, Luzzi I², Dionisi AM.², Reggiani M.C.³, Fisichella S¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Italy;

² Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy;

³ ARPAM – Dipartimento Provinciale di Pesaro

Abstract. In this study strains of Salmonella Napoli of human, food and environmental origin collected from Marche region (Italy) during 2002-2008 have been characterized to value the occurrence of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) DNA profiles in this area.

Riassunto. In questo studio ceppi di Salmonella Napoli di origine umana ambientale e da cibi proveniente dalla Regione Marche dal 2002 al 2008 sono stati caratterizzati per valutare la presenza di profili DNA in elettroforesi in campo pulsato (Pulsed Field Gel Electrophoresis), nell'area studiata.

Introduzione

Le zoonosi a trasmissione alimentare costituiscono attualmente uno dei principali problemi di sanità pubblica.

L'agente zoonotico responsabile della maggior parte delle tossinfezioni alimentari in Europa è ancora oggi rappresentato dalla *Salmonella* (1) e i due sierotipi maggiormente isolati in Italia ed Europa nell'uomo sono Enteritidis e Typhimurium (2).

Salmonella Napoli rappresenta un sierotipo piuttosto raro in Italia. Tuttavia dal 2002 il sistema Enter-Net ha registrato un aumento di questo sierotipo in casi di infezione e da fonti ambientali, mentre sono rimasti rari gli isolamenti da fonti animali o alimentari (3). In particolare, gli isolamenti sono risultati più frequenti nella stagione estiva e in bambini di età inferiore ai 5 anni in cui il sierotipo risultava particolarmente aggressivo ed è stata dimostrata un'associazione con attività in ambienti rurali a contatto con gli animali e bagni in acque di lago (4).

Scopo del lavoro è stato quello di mettere in evidenza eventuali relazioni epidemiologiche tra i ceppi di *S. Napoli* isolati nella regione Marche attraverso la tipizzazione molecolare (<http://www.pulsenet-europe.org/>).

Materiali e metodi

Nella regione Marche dal 2003 al 2008 sono stati raccolti 12 ceppi di *S. Napoli* di origine umana, 1 ceppo di origine alimentare e 28 di origine ambientale nell'ambito delle reti nazionali Enter-Net ed Enter-Vet. Questi ultimi sono stati tutti isolati dalle acque superficiali e sotterranee legate ai processi di potabilizzazione della provincia di Pesaro-Urbino.

Tutti i ceppi sono stati inviati dalle strutture periferiche (laboratori di microbiologia ospedalieri e laboratorio del Servizio Acque del Dipartimento Provinciale ARPAM di Pesaro) al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche, Sezione di Macerata) dove sono stati conservati in Microbank™ (Pro-Lab, Weston, Florida) a -20°C. La sierotipizzazione è stata eseguita secondo lo schema di White- Kauffman-Le Minor (5) mediante l'uso di sieri commerciali (Statens Serum Institut-Biogenetics, Danimarca). È stato anche eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con il metodo di diffusione in agar (6). Ogni ceppo è stato saggiato rispetto ai seguenti antibiotici: Ampicillina (A) 10 µg, Cloramfenicolo (C) 30 µg, Streptomina (S) 10 µg, Sulfonamidi (Su) 300 µg, Tetraciclina (T) 30 µg, Acido nalidixico (Nal)

30 µg, Cefotaxime (Ctx) 30 µg, Ciprofloxacina (Cip) 5 µg, Gentamicina (Gm) 10 µg, Kanamicina (Kan) 30 µg, Amoxicillina-acido clavulanico (Amc) 30 µg, Trimethoprim-Sulfametossazolo (Sxt) 1,25/23,75, Cefalotina (Kf) 30 µg e Ceftazidime (CAZ) 30 µg; i ceppi di origine non umana sono stati saggiati in aggiunta anche nei confronti dei seguenti antibiotici: Colistina (Cl) 10 µg ed Enrofloxacin (Enr) 5 µg.

La tipizzazione molecolare è stata eseguita mediante Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE) in accordo con il protocollo standardizzato Pulse-Net (7) (<http://www.pulsenet-europe.org/>). La digestione è stata effettuata con l'enzima di restrizione XbaI (Fermentas Life Science) e il ceppo di *Salmonella enterica* sierotipo Braenderup H9812 è stato usato come marcatore di peso molecolare (8). Le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchio a campi pulsati Chef Mapper (Bio-Rad).

La cluster analysis è stata eseguita con il software BioNumerics (v. 4.61, Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgio). I valori di similarità sono stati calcolati con il coefficiente di Dice mentre l'algoritmo UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic means), con 1.00% di tolleranza e 1.00% di ottimizzazione, è stato impiegato per ottenere il dendrogramma. I profili di DNA che differivano per una o più bande sono stati considerati profili distinti tuttavia ceppi con un coefficiente di similarità >90% sono stati considerati strettamente correlati dal punto di vista genetico.

Risultati e discussione

Dei 41 ceppi analizzati, 38 sono risultati sensibili agli antibiotici testati, 1 è risultato resistente alla S, 1 ha presentato profilo di resistenza ACSu+Sxt e 1 ha presentato il profilo ASSuT.

Trentasei ceppi sono risultati tipizzabili mediante PFGE. Dall'analisi dei profili di restrizione risulta che i ceppi di *S. Napoli* circolanti nella Regione Marche sono raggruppabili in 2 cluster principali, A e B, aventi omologia superiore al 90% (Fig 1). Il cluster A comprende 6 ceppi di cui 1 umano (n° 59467) che presenta un'omologia superiore al 97% con 1 ceppo di origine ambientale.

Il cluster B è il più rappresentato, comprendendo 17 ceppi isolati dalle acque superficiali e sotterranee di potabilizzazione della provincia di Pesaro-Urbino.

Un ceppo di origine umana, n° 53145, presenta un' omologia del 100% con un ceppo di origine ambientale (fiume Metauro n° 30476/07) (Fig 1)



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
Umbria e Marche



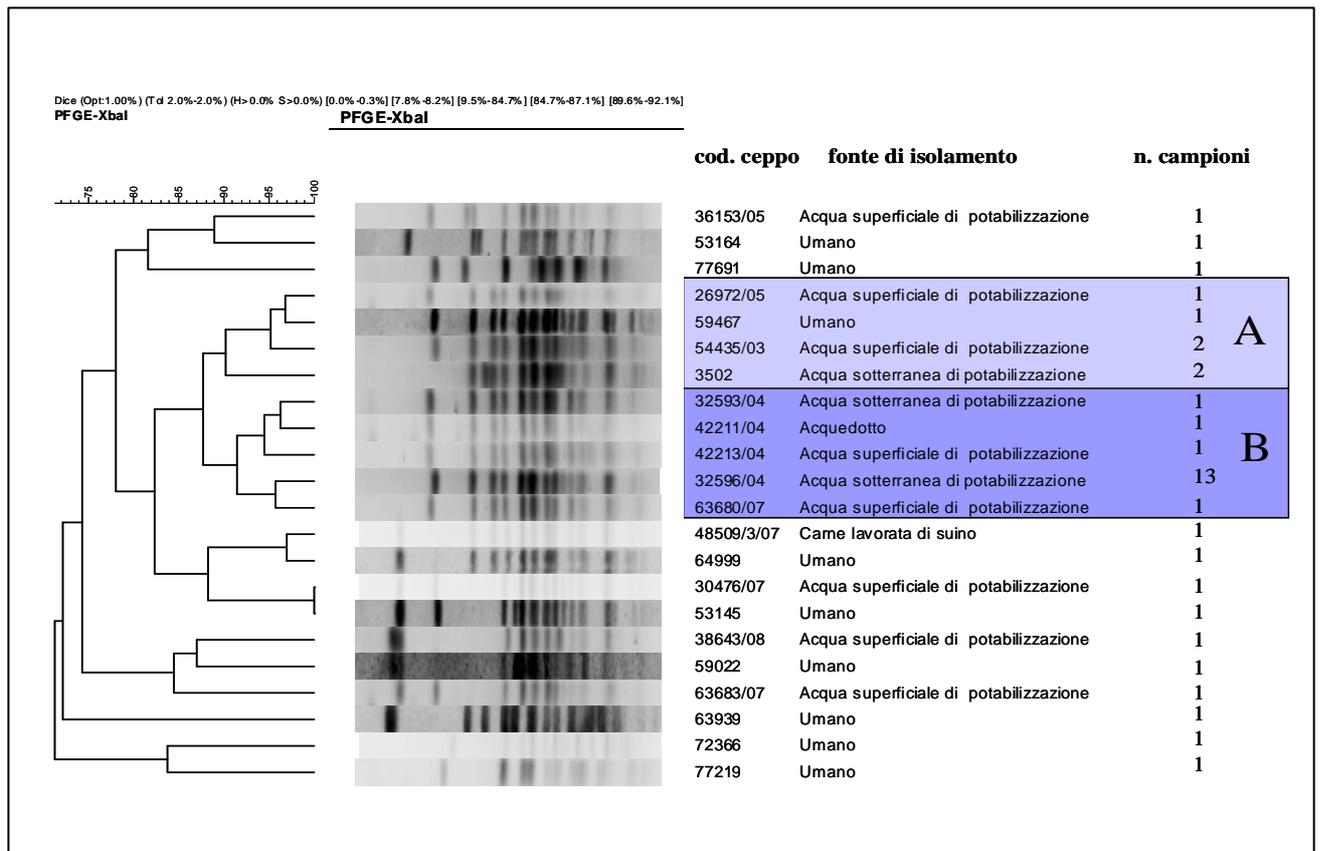


Fig 1: Cluster analysis dei profili rappresentativi di PFGE ottenuti con l'enzima XbaI dagli isolati di S. Napoli.

Malgrado questa omologia non sono disponibili informazioni utili a correlare epidemiologicamente i due ceppi, quello umano isolato nel 2004 e quello ambientale nel 2007. E' tuttavia interessante notare che il fiume sfocia a pochi Km da Fano dove il paziente aveva la residenza.

L'unico campione di origine alimentare è stato isolato da un campione di ciauscolo, un salume tipico marchigiano poco stagionato, prelevato nel 2007 nell'ambito di un piano di autocontrollo HACCP di un laboratorio artigianale della provincia di Macerata. Sebbene il ceppo isolato da alimento presenti un'omologia genetica del 97% con 1 ceppo di origine umana (n°64999), non risulta evidente una loro relazione epidemiologica dal momento che sia il luogo che la data di isolamento sono diversi.

Per quanto riguarda i ceppi di origine umana questi non sono epidemiologicamente correlati e le informazioni disponibili non riportano il coinvolgimento di alimenti o un'associazione con attività in ambienti rurali. In relazione al mese di prelievo e all'età dei pazienti si nota una discreta variabilità, a differenza di quanto notato in altre regioni. (4).

Conclusioni

Dalla letteratura emerge che molte epidemie di salmonellosi causate da fonti idriche contaminate hanno coinvolto intere regioni e ampi territori.

Bibliografia

- (1) Press Release EURO/16/03 Copenhagen, Rome, Berlin, 16 December 2003
- (2) European Food Safety Authority, 2007; http://www.ecdc.europa.eu/pdf/ECDC_epi_report_2007.pdf
- (3) Gill ON et al, 1983, Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars, Lancet mar 12;1 (8324): 574-7
- (4) ISSN 0393-5620 ISTISAN Congressi 05/C12 pag 34 e 42.
- (5) Grimont P.A.D., F. X. Weill. 2007. Antigenic formulae for the *Salmonella* serovars, 9th Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France.
- (6) CLSI (ex NCCLS), 2002. M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. Available from: www.clsi.org; CLSI (ex NCCLS), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Document M2-A7 Approved Standard 7th edition, Wayne, PA, 2000
- (7) Peters, T. M., C. Maguire, E. J. Threlfall, I. S. Fisher, N. Gill, and A. J. Gatto. 2003. The Salm-gene project-a European collaboration for DNA fingerprinting. Euro. Surveill 8:46-50
- (8) Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duyne, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett, and E. Ribot. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. J Clin Microbiol 43:1045-1050
- (9) Bradd J et al. 2009, Distribution, Diversità, and Seasonality of waterborne *Salmonellae* in a rural watershed, Appl and Environmental Microbiology p. 1248-125

Lavoro presentato al XI Congresso nazionale SIDiLV; Parma, 30 Settembre - 2 Ottobre 2009



Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale 2.5 Italia. Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/it/> o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it http://spvet.it / http://indice.spvet.it
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it