



Epidemiologia molecolare di Salmonella enterica ser. derby isolata da varie fonti nella Regione Marche - Molecular epidemiology of Salmonella enterica ser. derby isolated from different sources in Marche Region (Italy)

Fisichella S., Staffolani M., Medici L., Dionisi A. M., Luzzi I.

Abstract. Salmonella spp. is an important cause of human food borne disease. Salmonella enterica serovar Derby is one of the ten more frequently serovars isolated from humans. This serovar is isolated from animals, mostly pig farms, from food of animal origin and environment, like surface water. In this study we have analyzed a collection of S. Derby strains isolated in Marche region from different sources between 2000 and 2008 for the evaluation of their genetic relatedness. .

Riassunto. Le Salmonelle sono una importante causa di malattie legate al cibo. Fra di esse, la sierovarietà Derby è una delle dieci che sono più frequentemente isolate in ambito umano. Questa sierovarietà è isolata da animali, prevalentemente da suinicolture, da alimenti di origine animale e dall'ambiente, ad esempio da acque di superficie. In questo studio abbiamo analizzato una collezione di ceppi di S. Derby isolati nella Regione Marche da differenti sorgenti tra il 2000 e il 2008, per valutare quanto queste siano geneticamente correlate.

Introduzione

Nei paesi occidentali la salmonellosi rappresenta una delle più comuni patologie gastroenteriche infettive dell'uomo e costituisce ancora un rilevante problema di sanità pubblica. La salmonella è un patogeno zoonotico la cui principale riserva è rappresentata dagli allevamenti di animali da reddito, di conseguenza, la trasmissione all'uomo avviene soprattutto tramite il consumo di alimenti di origine animale. Tra i sierotipi maggiormente isolati nel mondo nell'uomo, emergono S. Enteritidis e S. Typhimurium che rappresentano circa il 70-80% di tutti i ceppi isolati nei paesi industrializzati (1). Tuttavia, tra i primi 5 o 10 sierotipi isolati in ordine di frequenza in Europa e in Italia da fonti cliniche e veterinarie, sono presenti altri sierotipi meno noti e variamente diffusi, tra cui Salmonella enterica sierotipo Derby (S. Derby). Uno stato membro UE in cui tale sierotipo sembra essere molto diffuso è la Spagna in cui, nel 2002, S. Derby è stato rispettivamente il secondo ed il sesto sierotipo più comunemente isolato da fonti cliniche e veterinarie, rappresentando il 24% e il 3.7% (2). Gli ultimi dati riportati dall'EFSA relativi al 2007 (3), mostrano una frequenza percentuale di S. Derby nell'uomo in Europa nel biennio 2002-2007, pari allo 0.4% (ottavo posto tra i primi 10 sierotipi). I dati nazionali più recenti relativi al 2006, pubblicati dall'ISS che coordina la rete Enter-Net (4), riportano il sierotipo Derby al 5° posto con una frequenza nell'uomo pari al 3%. Dai dati nazionali in campo veterinario, elaborati dall'IZS delle Venezie Centro coordinatore della rete Enter-Vet, pubblicati sull'ultimo report del 2006 (5), si evince che in ambito veterinario S. Derby occupa il 3° posto in frequenza con un valore percentuale del 7.38%, dopo i sierotipi Typhimurium (18.96%) e Livingstone (9.75%). Tra i sierotipi di salmonella, come noto, ne esistono alcuni piuttosto ubiquitari e isolabili da varie specie animali e fonti ambientali, mentre altri risultano essere più o meno adattati, e quindi più frequenti, in alcune specie animali: il sierotipo Derby risulta, di fatto, particolarmente diffuso nella specie del suino. A tal proposito basti ricordare, oltre ai dati nazionali Enter-Vet, che riportano una frequenza percentuale di S. Derby nel suino molto più elevata rispetto alle altre specie animali, i dati europei dell'EFSA relativi al "Vaseline Survey 2006-2007" (3) relativo al Piano di Sorveglianza realizzato in Europa allo scopo di ottenere dati di prevalenza omogenei dei vari sierotipi di Salmonella nel suino (decisioni della Commissione 2006/668/CE e 2007/219/CE). Da tale rapporto si può dedurre che il sierotipo Derby risulta essere il secondo sierotipo più diffuso nel serbatoio suino dopo Typhimurium con una frequenza pari a circa

il 23%, considerando sia i ceppi isolati al macello che nelle carni suine vendute al dettaglio. Come noto, la normativa comunitaria sulle zoonosi (Dir. 99/2003/EC e Reg. 2160/2003/EC), identifica le salmonelle quali agenti di zoonosi di maggiore interesse sanitario ed economico verso le quali rivolgere prioritariamente gli sforzi di sorveglianza e controllo. In tali norme si sottolinea anche l'importanza di caratterizzare gli isolati, al fine di individuare le fonti di infezione e i cloni clinicamente rilevanti. Con lo scopo di approfondire l'epidemiologia di S. Derby nella regione Marche, il Centro di Riferimento Regionale per gli enterobatteri patogeni (CRRe) per l'anno 2009 si era proposto di effettuare uno studio retrospettivo di caratterizzazione genotipica dei ceppi collezionati presso il CRRe dal 2002 al 2008. Più in dettaglio, il progetto, partendo dall'individuazione di eventuali cluster genotipici dominanti, si proponeva di raccogliere dati più approfonditi sull'epidemiologia di S. Derby nelle Marche. Lo scopo ultimo consiste nell'implementare le conoscenze sulle caratteristiche patogenetiche con l'obiettivo di sviluppare strategie di intervento di sanità pubblica utili a ridurre l'incidenza delle malattie a trasmissione alimentare.

Materiali e metodi

Nella regione Marche, nell'ambito delle reti nazionali Enter-Net ed Enter-Vet, dal 2002 al 2008 sono stati raccolti 90 ceppi di S. Derby di cui, 48 di origine umana e 42 di origine non umana. Questi ultimi sono stati isolati in maggioranza da fonti di provenienza regionale, mentre una piccola parte proviene dalla province di Modena e Forlì-Cesena. I ceppi di origine veterinaria derivano da fonti animali (2 ceppi isolati da feci suine), da fonti alimentari (31 ceppi) e da fonti ambientali (9 ceppi), costituite da acque superficiali fluviali o marine. Gli stipiti sono stati inviati dalle strutture periferiche della rete regionale (laboratori di microbiologia ospedalieri, laboratori privati di analisi alimentari, sezioni provinciali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche e laboratorio del Servizio Acque dei Dipartimenti Provinciali ARPAM di Pesaro ed Ascoli Piceno) al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri (CRRe - Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche, Sezione di Macerata) dove sono stati conservati in MicrobankTM (Pro-Lab, Weston, Florida) a -20°C. La sierotipizzazione è stata eseguita secondo lo schema di White-Kauffman-Le Minor (6) mediante l'uso di sieri commerciali (Statens Serum Institut-Biogenetics, Danimarca). E' stato anche eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con il metodo di diffusione in agar (7). 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, Trimetoprim-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 (8) (<http://www.pulsenet-europe.org/>). La digestione è stata effettuata con l'enzima di restrizione XbaI e il ceppo di Salmonella enterica sierotipo Braenderup H9812 è stato usato come marcatore di peso molecolare (9). Le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchio a campi pulsati Chef Mapper XA (Bio-Rad). La cluster analysis è stata eseguita presso l'Istituto Superiore di Sanità 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 ceppi con un coefficiente di similarità >80% sono stati considerati strettamente correlati dal punto di vista genetico. Risultati e discussione Nelle figure 1 e 2 sono riportate le frequenze assolute di isolamento dei principali sierotipi isolati rispettivamente da casi clinici e provenienti da fonti non umane. Si evidenzia che il sierotipo Derby nel corso del periodo esaminato ha occupato sempre la quarta posizione in ordine di frequenza. Inoltre la frequenza relativa media nel periodo considerato,

con un valore simile nei due ambiti (umano e non umano) è risultata pari a 3,53% oscillando da un minimo di 0,78% ad un massimo di 6,02%.

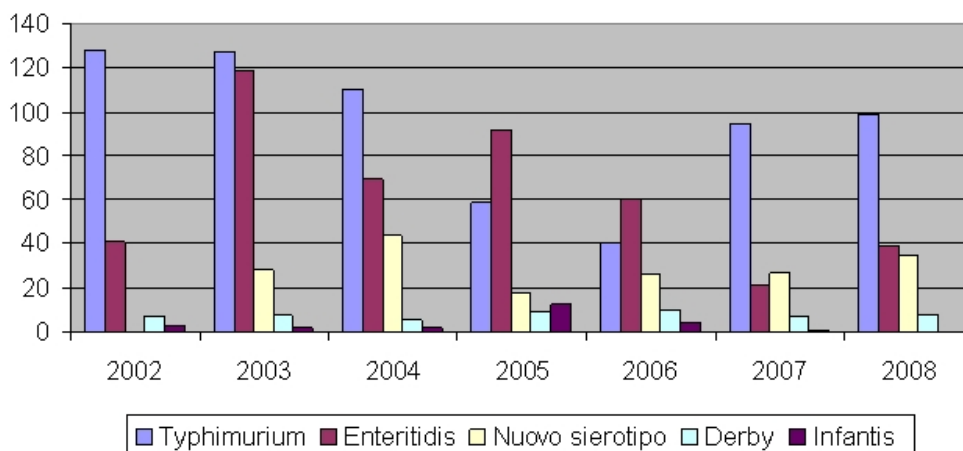


Figura 1. Frequenza assoluta dei principali sierotipi di salmonella nelle infezioni umane nelle Marche dal 2002 al 2008

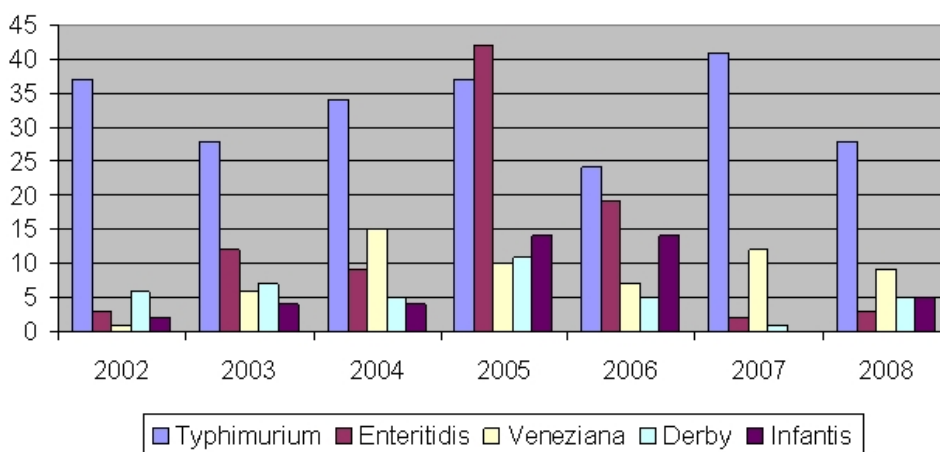


Figura 2. Frequenza assoluta dei principali sierotipi di salmonella in ambito veterinario nelle Marche Marche dal 2002 al 2008

Sensibilità agli antibiotici

L'antibiogramma è stato eseguito sul totale dei 90 ceppi raccolti nel periodo considerato. La percentuale di ceppi resistenti ad almeno un antibiotico nelle due categorie di ceppi di S. Derby, di origine clinica e non, risulta simile in quanto uguale rispettivamente al 66% e al 70%. Un valore di resistenza superiore al 50% si è registrato in entrambi i gruppi per le molecole Streptomina, Sulfonamidi e Tetraciclina. Si sono rilevate percentuali di resistenza simili anche per Trimethoprim-Sulfametossazolo (20%), Kanamicina (14%), Ampicillina (9%) e Gentamicina (4%). Tuttavia, tra i ceppi di origine veterinaria, ma non tra quelli di origine umana, si rileva resistenza ai chinoloni (Acido Nalidixico 8,7%) e, viceversa, tra i ceppi di origine umana, ma non tra quelli di origine veterinaria, si rileva resistenza al Cloramfenicolo (10,4%). Riguardo i profili di resistenza in entrambi i gruppi di salmonelle si evidenzia la prevalenza del profilo "SSuT" (Streptomina, Sulfonamidi e Tetraciclina) con valori percentuali pari al 26,1% per i ceppi di origine veterinaria e 18,8% per i ceppi di origine clinica. Questo nucleo di 3 antibiotici è comunque spesso accompagnato da resistenze accessorie (Fig.3), relative ad Ampicillina, Trimethoprim-Sulfametossazolo o, più raramente a Kanamicina, Gentamicina e Cefalotina. È interessante notare che le resistenze trovate tra i ceppi isolati nella regione Marche non differiscono molto da quelle rilevate nei ceppi isolati in Spagna (2).

Analisi molecolare mediante PFGE

Dei 90 ceppi isolati, 69 sono stati analizzati tramite PFGE e, di questi, 66 (27 di origine umana e 39 di origine non umana) sono risultati tipizzabili. La correlazione genetica tra i ceppi è mostrata nella figura 3. L'analisi evidenzia due cluster maggiori: A (23 ceppi) con coefficiente di similitudine superiore al 90% e B (17 ceppi) con coefficiente di similitudine superiore all' 80%. Complessivamente questi due gruppi costituiscono il cluster principale che comprende il 60% dei ceppi con un coefficiente di similitudine superiore all' 80%. Inoltre si nota la presenza di altri due cluster minori con omologia superiore all'80% (C con 10 ceppi e D con 8 ceppi), mentre i rimanenti 8 stipiti di *S. Derby* sono totalmente non correlati. E' interessante notare che nel cluster A sono presenti anche 4 stipiti di *S. Derby* isolati nella regione Emilia Romagna in provincia di Modena, fra il 2005 e il 2006 da carne lavorata suina, ed inviati al CRRe da un laboratorio privato modenese. Per concludere, dai risultati ottenuti dal dendrogramma si evince che:

- È presente una certa variabilità tra i ceppi, ma un clone principale (cluster A+B) sembra circolare nella regione Marche (omologia >80%)
- Ad esso appartengono ceppi umani, animali, alimentari ed ambientali isolati in tutti gli anni dal 2002 al 2007
- All'interno del cluster A esiste una correlazione ancora più stretta (omologia >90%) ed una omogeneità a livello di antibiotico resistenza, dato che suggerisce la possibile acquisizione di un plasmide, o l'acquisizione di un elemento cromosomale con geni di resistenza, che ha conferito il profilo "SSuT" ai ceppi del cluster A, differenziandoli da quelli del cluster B.

Dall'analisi delle frequenze dei cluster ottenuti in campo umano e veterinario, stratificati per provincia di origine, non è emerso un cluster prevalente, così come nell'analisi dei cluster ottenuti per i ceppi di origine umana stratificati per fascia di età. Tuttavia un dato degno di nota è emerso analizzando le frequenze dei ceppi dei 39 stipiti di *S. Derby* di origine non umana. Nella tabella n°1 appare chiaro che la carne suina risulta essere la fonte di isolamento prevalente e che il contributo maggiore è dato dalla provincia di Ascoli Piceno.

Tabella 1. distribuzione per provincia delle matrici di origine dei ceppi di <i>S. Derby</i> 2002-2008 da fonte non umana							
Matrice di origine	AN	AP	MC	PU	FC	MO	Totale
acqua superficiale	0	1	1	4	0	0	6
carne bovino	1	1	1	1	0	0	4
carne bovino-suino-tacchino	0	0	2	0	0	0	2
carne di specie non nota	0	0	1	0	0	0	1
Mangime polli	0	0	1	0	0	0	1
molluschi	0	1	0	0	0	0	1
carne suino	2	11	4	2	1	4	24
Totale	3	14	10	7	1	4	39

Concludendo, sarebbero necessarie ulteriori indagini per capire meglio l'epidemiologia di questo sierotipo ed identificare le fonti di origine prevalentemente suina a livello di laboratori di sezionamento, salumifici, mattatoi ed allevamenti

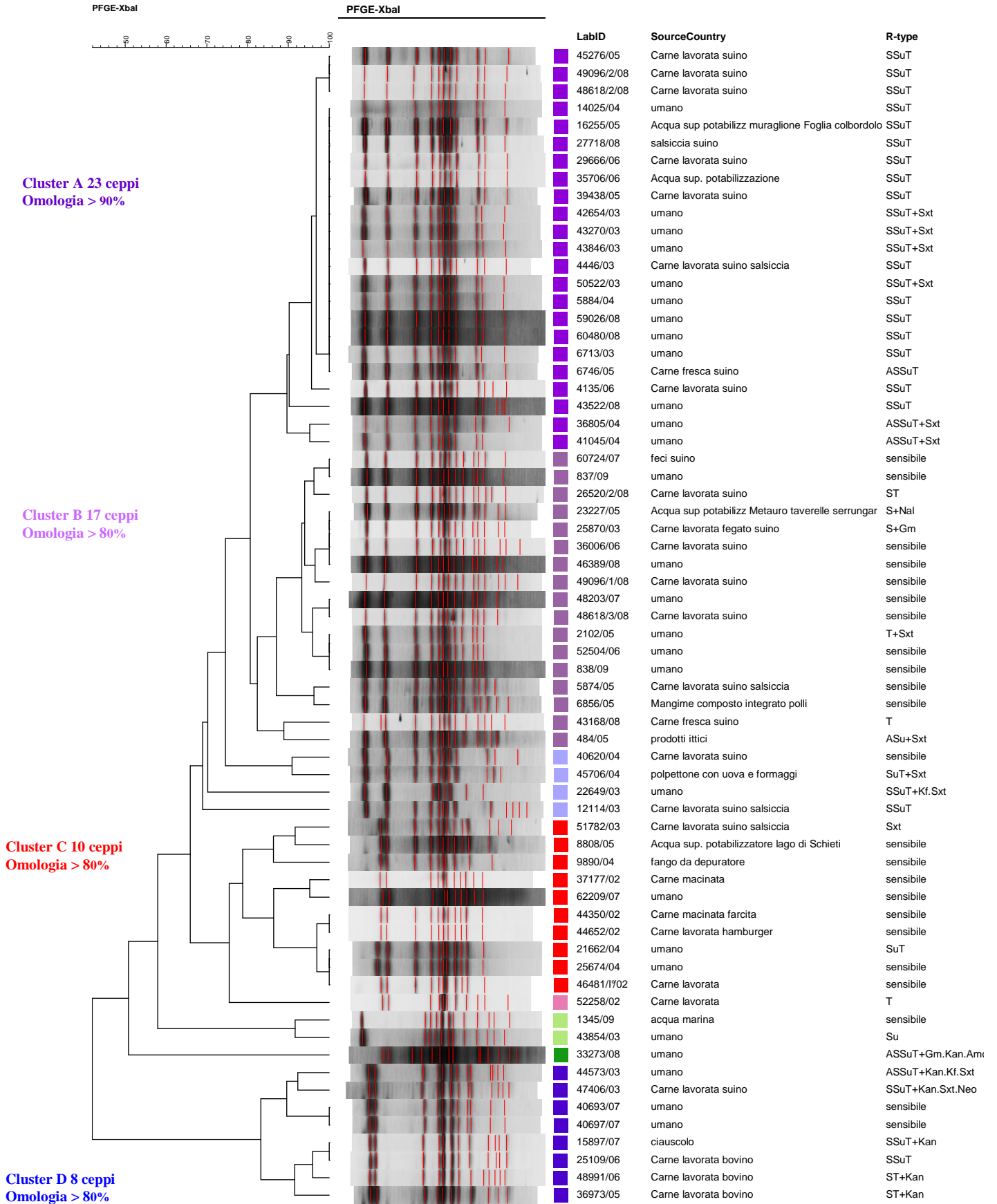


Figura 3. Dendrogramma - correlazione genetica tra i ceppi di S. Derby

Bibliografia

- 1) EFSA, 2007; www.ecdc.europa.eu/pdf/ECDC_epi_report_2007.pdf
- 2) S. Valdezate et al.; *Emerging Infectious Diseases*, 2005, Vol 11, N° 5, pag 694-698.
- 3) The European Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. January 2009. 4) *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2008 - Volume 21 n. 5; Enter-net: Sorveglianza delle infezioni da patogeni enterici nel 2006.
- 5) Enter-Vet: Rapporto annuale. Antonia Ricci, Marzia Mancin, Veronica Cibirin. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.
- 6) Grimont PAD, F. X. Weill. 2007. Antigenic formulae for the Salmonella serovars, 9th Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Paris, France.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duynne, 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.



Epidemiologia molecolare di Salmonella enterica ser. derby isolata da varie fonti nella Regione Marche - Molecular epidemiology of Salmonella enterica ser. derby isolated from different sources in Marche Region (Italy) by Fisichella S., et al. is licensed under a Creative Commons Attribution 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	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 ; redazione-spvet@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