



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

Monica Staffolani, Laura Medici, Maira Napoleoni, Anna Maria Dionisi, Stefano Fisichella

Abstract. *Salmonella* spp. is an important cause of human food borne disease. *Salmonella enterica* serovar Thompson is one of the less frequently serovars isolated from animals and humans. This serovar is isolated from animals, mostly poultry, from food of animal origin and environment, like surface water. In this study we have analyzed a collection of *S. Thompson* strains isolated in Marche Region from different sources between 2002 and 2013 for the evaluation of their genetic relatedness

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 di salmonella, come noto, ne esistono alcuni ubiquitari e isolabili da varie specie animali e fonti ambientali, mentre altri sono più o meno adattati, e quindi più frequenti, in alcune specie animali: il sierotipo Thompson risulta, di fatto, particolarmente diffuso nel pollo.

In letteratura le pubblicazioni che trattano questo raro sierotipo sono scarse e, in particolare, si riferiscono a focolai epidemici in ambito umano o animale che spesso coinvolgono alimenti non derivati dal pollo (Campbell, 2001; Nygard, 2008). In campo umano i sierotipi maggiormente isolati in Europa sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante monofasica, che rappresentano circa il 70-80% di tutti i ceppi isolati nei paesi industrializzati (EFSA e ECDC, 2014), mentre il sierotipo Thompson non è un sierotipo molto frequente in Europa. Consultando i dati dell'ultimo report dell'EFSA che risale al 2012 (EFSA e ECDC, 2014), esso rappresenta il 6° sierotipo isolato nell'uomo (1,3%), mentre non risulta tra i primi 10 sierotipi isolati dalle principali categorie di animali da reddito, incluso il pollo e gli alimenti derivati.

Tuttavia, i dati pubblicati negli ultimi Report nazionali della rete Enter-Vet, mostrano che la frequenza di *S. Thompson* in Italia risulta più elevata che in Europa. Questa è aumentata costantemente dal 2007 al 2009 è poi scesa nel 2010, per poi risalire raggiungendo il massimo valore nel 2011. In dettaglio, la frequenza di *S. Thompson* tra tutti i sierotipi isolati in campo veterinario è risultata pari al 4,20% (2009), 1,25% (2010), 4,42% (2011), 3,11% (2012) mentre, riguardo l'origine, la fonte principale è rappresentata dal pollo (80%) seguita dal cinghiale (8%). In ambito umano, in Italia, dai dati degli ultimi report Enter-Net (2014), emerge che dal 2007 *S. Thompson* non ha fatto più parte dei primi 10 sierotipi isolati dall'uomo, ma nel 2011 è ricomparsa e si è attestata al 7° posto con una frequenza pari a 1,6%.

Nella regione Marche l'andamento della frequenza del sierotipo Thompson, non è stata affatto costante ed è rimasta piuttosto bassa nel corso degli anni, fino a scomparire sia in ambito umano che veterinario e la principale fonte di salmonelle appartenenti al sierotipo Thompson, anche nella regione è rappresentata dal pollo. Tuttavia, nel 2011 c'è stato un aumento evidente e significativo da

varie fonti (uomo, animali, alimenti, acque superficiali) accompagnato da un focolaio epidemico che ha interessato alcune persone in cui è stato possibile identificare il veicolo alimentare (tacchino in porchetta). 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 l'obiettivo di approfondire l'epidemiologia di *S. Thompson* nella regione Marche, il Centro di Riferimento Regionale per gli enterobatteri patogeni (CRRep) ha effettuato uno studio retrospettivo di caratterizzazione genotipica dei ceppi collezionati dal 2002 al 2013, allo scopo di approfondire gli aspetti epidemiologici relativi a questo sierotipo.

Materiali e Metodi

Stipiti: 92 ceppi di *S. Thompson*, sono stati sierotipizzati utilizzando sieri disponibili in commercio (Staten Serum Institute, Denmark) secondo lo schema di Kauffman-White (Grimont et al, 2007). I ceppi sono stati isolati tra il 2002 e il 2013, e, tra questi, 34 sono di origine umana e 58 di origine non umana. Questi ultimi derivano da fonti animali (42 ceppi isolati in allevamenti di galline ovaiole e in minoranza da polli e tacchini da carne), alimentari (4 stipiti da carne lavorata di diversa specie) ed ambientali (10 ceppi da acqua superficiale di fiume o marina). Tra gli stipiti di origine umana si segnalano 6 stipiti associabili ad un focolaio epidemico causato da "tacchino in porchetta" da cui sono stati isolati ceppi con il medesimo pulsotipo.

Antibiogramma: il test di sensibilità agli antibiotici (CLSI, 2010) è stato eseguito su tutti i ceppi utilizzando dischetti del commercio (Oxoid): Ampicillina (A) 10 mg, Cloramfenicolo (C) 30 mg, Cefotaxime (CAZ) 30 mg, Streptomina (S) 10 mg, Sulfonamidi (Su) 300 mg, Tetraciclina (T) 30 mg, Acido nalidixico (Nal) 30 mg, Cefotaxime (Ctx) 30 mg, Ciprofloxacina (Cip) 5 mg, Gentamicina (Gm) 10 mg, Kanamicina (Kan) 30 mg, Amoxicillina-acido clavulanico (Amc) 30 mg, Trimetoprim-Sulfametossazolo (Sxt) 1.25/23.75 mg, Cefalotina (Kf) 30 mg e Colistina (Cl) 10 mg.

PFGE: l'omologia genetica è stata determinata tramite elettroforesi in campo pulsato (PFGE) utilizzando l'enzima di restrizione XbaI (Fermentas Life Science) in accordo con il protocollo standardizzato PulsNet (Peters, 2003). *Salmonella enterica* sierotipo Braenderup H9812 è stata usata come marcatore di peso molecolare (Hunter et al, 2005).

Il dendrogramma e la cluster analysis sono stati eseguiti usando il software BioNumerics (v. 6.1, 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 e i ceppi con un coefficiente di similarità $\geq 95\%$ sono stati considerati strettamente correlati dal punto di vista genetico.

Risultati e Discussione

Come è noto il sierotipo Thompson rappresenta uno dei meno diffusi sia in Italia che in Europa ed è soprattutto riscontrabile nel settore avicolo. In particolare, nella regione Marche, nel 2011, tale sierotipo è stato riscontrato con una frequenza superiore alla media negli allevamenti di galline ovaiole e polli da carne.

Il test di sensibilità agli antibiotici ha rivelato una percentuale molto bassa di resistenza antibiotica in quanto la grande maggioranza dei ceppi è risultata sensibile a tutte le molecole saggiate.

Si segnala tuttavia un caso particolare relativo ad un ceppo di origine umana isolato più volte dalle

feci di una bambina di 4 anni, che al primo prelievo risultava sensibile (n° 29614/11, cluster B), mentre in uno dei prelievi successivi (n° 32723/11 cluster B) lo stesso ceppo di *S. Thompson* presentava resistenza a 6 molecole tra quelle saggiate. La paziente era stata sottoposta a trattamento antibiotico e tra le resistenze compariva anche il cefotaxime, nonché la presenza del fenotipo ESBL (Extended Spectrum β -Lactamase).

In letteratura, accanto a pubblicazioni in cui sono stati usati altri enzimi ve ne sono altre in cui è stato usato solo l'enzima *XbaI*. La PFGE eseguita in questo studio con *XbaI* ha presentato un potere discriminante relativamente basso, ma sufficiente per svolgere l'analisi dei genotipi in quanto sono stati individuate da 1 a 7 differenze di banda e 9 profili diversi. Dei 92 ceppi isolati, 76 sono stati analizzati tramite PFGE. La correlazione genetica tra i ceppi è mostrata nella figura 1: l'analisi evidenzia tre cluster principali tutti con un coefficiente di similitudine superiore al 95%: A (10 ceppi), B (39 ceppi) e C (20 ceppi). Dai risultati ottenuti tramite il dendrogramma si evince che:

- è presente una certa omologia tra i ceppi, ma un clone principale (cluster B) sembra essere prevalso nel 2011, mentre ha circolato in misura minore negli altri anni nella regione Marche
- ad esso appartengono la maggior parte dei ceppi umani ed ambientali isolati dalle acque di fiume nonché ceppi isolati da pollo
- all'interno del cluster C esiste una netta prevalenza dei ceppi di origine avicola
- il cluster minore (A) sembra comprendere ceppi di origine mista (uomo, pollo, acque superficiali).

È opportuno soffermarsi in breve su una pubblicazione (5) in cui si esamina un focolaio risalente al 2004 che ha coinvolto più nazioni europee ed il cui veicolo alimentare responsabile è stato prodotto in Italia. Più in dettaglio, ci sono forti evidenze che una partita di rucola (*Eruca vesicaria* L.) proveniente da uno stesso produttore italiano ed esportata in Nord Europa abbia infettato molte persone causando un aumento significativo della frequenza del sierotipo Thompson provocando un' allerta alimentare partita dalla Norvegia. La PFGE ha avuto un ruolo importante nell'indagine epidemiologica ed è stato ipotizzato che l'acqua di irrigazione contaminata abbia infettato la rucola. Uno dei pulsotipi ottenuti in questo studio risulta strettamente correlato al pulsotipo implicato nell'episodio internazionale appena descritto. Si tratta del pulsotipo caratteristico del cluster B dominante, lo stesso che ha provocato il piccolo focolaio epidemico nel 2011 causato da "tacchino in porchetta" contaminato.

Si può avanzare l'ipotesi che nel 2011 questo clone di *S. Thompson* abbia subito un incremento della frequenza a partire dal serbatoio animale naturale (allevamenti di galline ovaiole e polli da carne) e che, in qualche modo, si sia poi diffuso anche nei fiumi, negli alimenti e nell'uomo. Dal 2012 ad oggi la frequenza del sierotipo Thompson nella regione è ritornata ai consueti bassi livelli sia in ambito umano che non umano.

Conclusioni

La circolazione di cloni di salmonella, geneticamente stabili nel tempo, nell'ambiente, nell'uomo, negli animali e negli alimenti di origine animale, è un concetto noto per la maggior parte dei sierotipi di salmonella. In merito al sierotipo Thompson sono disponibili pochi dati in letteratura, tuttavia i dati regionali relativi a questo sierotipo sembrano dimostrare l'ipotesi di partenza. Il fatto che nel cluster maggiore siano raggruppati la maggior parte degli stipiti di origine umana ed ambientale depone a favore dell'ipotesi che esista un pulsotipo particolarmente adattato all'uomo e/o all'ambiente acquatico diffusosi nel 2011 nella regione Marche. Anche nell' episodio internazionale sopra descritto si ipotizzava un ruolo determinante dell'acqua usata per annaffiare la rucola poi esportata in nord Europa.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione tecnica Anna Maria Dionisi e Ida Luzzi (Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-mediate Istituto Superiore di Sanità Roma)

Bibliografia

Campbell, J. V., Mohle-Boetani J., Reporter R., Abbott S., Farrar J., Brandl M., Mandrell R., Werner S.B. (2001). An outbreak of Salmonella Serotype Thompson associated with fresh cilantro. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 984-987

CLSI (ex NCCLS). January 2010, M100-S20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement

Database EnterNet Salmonella. Dati storici 1980 - 2011. <http://www.iss.it/salm/index.php?lang=1&anno=2014&tipo=4>

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden (2012). Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>

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

Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duyn, 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

Kimura, A. C., Palumbo M. S., Meyers H., Abbott S., Rodriguez R., Werner S. B. A multi-state outbreak of Salmonella Serotype Thompson infection from commercially distributed bread contaminated by an ill food handler. *Epidemiology and Infection*, 133: 823-828

Nygaard, K Lassen J, Vold L, Andersson Y, Fisher I, Löfdahl S, Threlfall J, Luzzi I, Peters T, Hampton M, Torpdahl M, Kapperud G, Aavitsland P. (2008). Outbreak of Salmonella Thompson infections linked to imported rucola lettuce. *Foodborne Pathology Disease*. Apr;5(2):165-73.

Ricci A., Mancin M., Cibir V. (ANNO?). Enter-Vet: Rapporto annuale. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Sandt C. H., Krouse D. A., Cook C. R., Hackman A. L., Chmielecki W.A., Warren N.G. (2006). The key role of PFGE in investigation of large multiserotype and multistate food-borne outbreak of Salmonella infections centered in Pennsylvania. *Journal of clinical microbiology*: 3208-3212

Stenberg, S., Johnsson A., Aspan A., Bergström K., Kallay T. B., Szanto E. (2008). Outbreak of Salmonella Thompson infection in a Swedish dairy herd. *Veterinary Record*, 163: 596-599



Epidemiologia molecolare di Salmonella enterica ser. Thompson isolata da varie fonti nella Regione Marche by Staffolani M. et al., 2014 is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International 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	