



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

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

Abstract. To investigate the epidemiology of *S. Hadar* in Marche Region (Italy), a retrospective study by PFGE genotypic characterization of strains collected at the Regional Reference Centre for pathogenic enterobacteria (CRRep) from 2002 to 2010 was performed. In particular, it was evaluated the possibility to clarify the role of river water in the transmission cycle. The regional data relating to this serotype demonstrate the circulation of salmonella clones, genetically stable over time, in environment, humans, animals and food of animal origin, particularly in poultry. Regarding the role of river water in the transmission cycle, on the basis of the data examined, it was not possible to establish with certainty whether it represents a vehicle or a reservoir. Nevertheless in the dominant cluster, there are both strains isolated from river water, both strains from breeding flocks reared in the valley of that river, as well as strains isolated from faeces of laying hens and broiler flocks bred in other districts. Moreover, the same clone was isolated in broiler meat and human feces

Riassunto. Per approfondire l'epidemiologia di *S. Hadar* nella regione Marche, è stato effettuato uno studio retrospettivo di caratterizzazione genotipica tramite PFGE dei ceppi collezionati presso il Centro di Riferimento Regionale per gli enterobatteri patogeni (CRRep) dal 2002 al 2010. In particolare è stata valutata la possibilità di chiarire il ruolo dell'acqua di fiume nel ciclo di trasmissione. I dati regionali relativi a questo sierotipo dimostrano la circolazione di cloni di salmonella, geneticamente stabili nel tempo, nell'ambiente, nell'uomo, negli animali e negli alimenti di origine animale, con particolare diffusione nella specie del pollo. Riguardo al ruolo dell'acqua di fiume nel ciclo di trasmissione, sulla base dei dati esaminati non è stato possibile stabilire con certezza se rappresenti un veicolo o un serbatoio. Ciò nonostante nel cluster dominante sono presenti sia stipiti isolati da acque di fiume, sia ceppi provenienti da allevamenti di polli riproduttori situati nella valle dello stesso fiume, nonché stipiti isolati da feci di galline ovaiole e polli da ingrasso allevati in altre Province. Inoltre, lo stesso clone, è stato isolato nella carne di pollo e in feci umane

Introduzione

Introduzione. Il sierotipo Hadar risulta essere tra i 5 sierotipi rilevanti per la sanità pubblica nell'ambito dei piani di controllo degli avicoli messi in atto in tutti i paesi membri UE a partire dal 2003 (Dir. 99/2003/EC e Reg. 2160/2003/EC), insieme a Typhimurium, Enteritidis, Virchow e Infantis.

Tale sierotipo risulta piuttosto adattato alla specie del pollo in cui è particolarmente diffuso. Gli ultimi dati riportati dall'EFSA relativi al 2009 (The European Union Summary Report, 2009), mostrano che in Europa in ambito umano il sierotipo Hadar è entrato a far parte della top ten TESSy in questo anno occupando il settimo posto con una frequenza percentuale pari allo 0.5%. In campo non umano frequenze elevate si riscontrano nella carne di pollo in cui *S. Hadar* si pone al 4° posto con una frequenza pari al 4.1%, ma rappresenta il sierotipo dominante in Grecia (30.6%) e Italia (16.7%).

A livello nazionale, i dati di prevalenza più recenti nell'uomo del 2007-2009 (ISS: Notiziario, 2011) riportano il sierotipo Hadar al 6°-10° posto con una frequenza pari a 0.8-1.6%. Tra i campioni di origine veterinaria nel 2009 (Enter-Vet: Rapporto annuale, 2009), si evince che *S. Hadar* occupa il 6° posto in frequenza con un valore percentuale del 4.61%. Con lo scopo di approfondire l'epidemiologia di *S. Hadar* nella regione Marche, è stato effettuato uno studio retrospettivo di caratterizzazione genotipica dei ceppi collezionati presso il Centro di Riferimento Regionale per gli

enterobatteri patogeni (CRRep, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche, Sezione di Macerata) dal 2002 al 2010.

Più in dettaglio, si vuole verificare l'ipotesi che nel territorio marchigiano esista una circolazione di uno o più cloni di *Salmonella* Hadar, geneticamente stabili nel tempo, nell'ambiente, nell'uomo, negli animali e negli alimenti di origine animale (pollo in particolare) ed, eventualmente, chiarire il ruolo dell'acqua di fiume nel ciclo di trasmissione.

Materilai e Metodi

Stipiti: 76 ceppi di *S. Hadar*, sierotipizzati secondo lo schema di Kauffman-White (Grimont et al, 2007) e isolati nelle Marche tra il 2002 e il 2010, di cui 17 di origine umana e 59 di origine non umana. I ceppi di origine non umana derivano da fonti animali (38 ceppi da feci di pollo ed uno da feci di tigre), alimentari (12 stipiti da carne lavorata di diversa specie e 2 da vongole) ed ambientali (6 ceppi da acqua superficiale di fiume). Antibiogramma: test di sensibilità agli antibiotici su tutti i ceppi (CLSI, January 2007).

PFGE: Elettroforesi in Campo Pulsato su 60 ceppi rappresentativi con *Xba*I, *Bln*I e *Sma*I e analisi dei profili di restrizione, mediante il software Bionumerics (Hunter et al, 2005; Peters et al, 2003).

Risultati e Discussione

Come è noto il sierotipo Hadar rappresenta uno dei sierotipi con maggiore resistenza antibiotica e si caratterizza per la resistenza ai chinoloni e fluorochinoloni (Enter-Vet: Rapporto annuale, 2009). La percentuale di ceppi resistenti nelle due categorie di origine clinica e non, è molto elevata in quanto il 94% è risultato essere resistente ad almeno 3 antibiotici.

In entrambi i gruppi di salmonelle si evidenzia la prevalenza del profilo "AST+NaI.Kf" (Ampicillina, Streptomicina, Tetraciclina, Acido Nalidixico e Cefalotina) con valori percentuali superiori al 90%.

Questo nucleo di 5 antibiotici è a volte accompagnato da resistenze accessorie (Fig. 1) relative a Amoxicillina-Acido calvulanico e Trimethoprim-Sulfametossazolo.

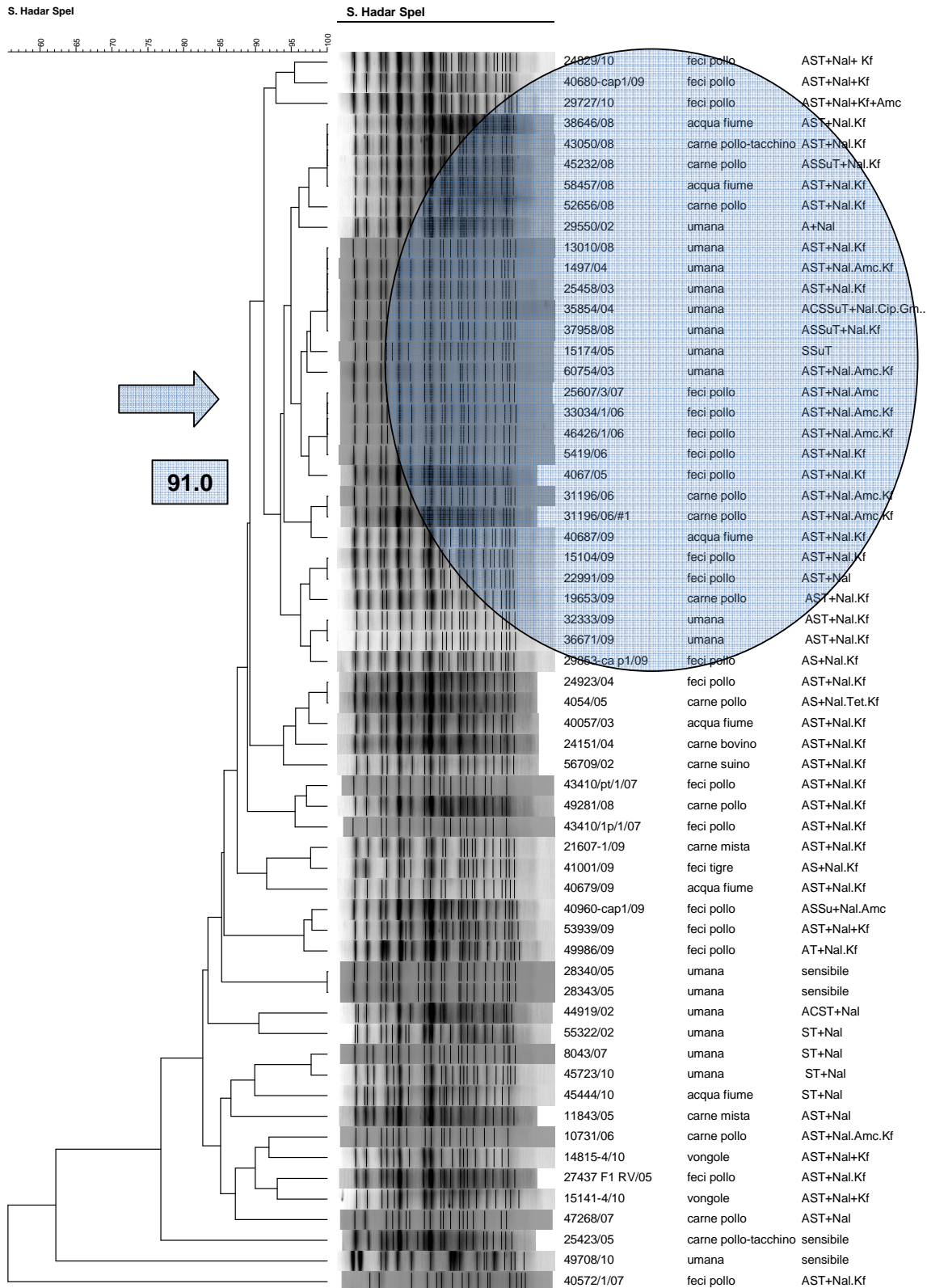


Figura 1: cluster analysis dei 60 ceppi analizzati.

In evidenza il cluster con omologia $\geq 90\%$; digestione eseguita con l'enzima SmaI.

La PFGE eseguita con XbaI ha presentato un basso potere discriminante per cui è stato necessario procedere con altri enzimi di restrizione. Altri autori hanno riscontrato le stesse difficoltà a causa della bassa variabilità genomica del sierotipo Hadar (Di Giannatale et al., 2008; Magistrali et al., 2008; Cardinale et al., 2005; Weide-Botjes et al., 1998).

Tra BlnI e SmaI, il secondo enzima ha mostrato il miglior potere discriminante (Fig.1): si evidenzia un cluster dominante di 30 ceppi con omologia genetica 90% di cui 11 provenienti da feci di pollo, 10 da uomo, 6 da carne di pollo e 3 da acqua di fiume, isolati nel periodo considerato (2002-2010).

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 Hadar sono disponibili pochi dati in letteratura, tuttavia i dati regionali relativi a questo sierotipo sembrano dimostrare l'ipotesi di partenza. Tuttavia, riguardo al ruolo dell'acqua di fiume nel ciclo di trasmissione, sulla base dei dati esaminati non è possibile stabilire con certezza se rappresenti un veicolo o un serbatoio, soprattutto a causa del numero esiguo di ceppi ambientali inclusi nel cluster dominante.

Nondimeno si può notare che in tale cluster sono presenti 2 stipiti isolati dalle acque del fiume Metauro nel 2008 (provincia Pesaro-Urbino, PU) e 4 stipiti provenienti da allevamenti di polli riproduttori situati nella valle dello stesso fiume isolati nel 2006-2007, nonché 7 stipiti isolati dalle feci di galline ovaiole e polli da ingrasso allevati in altre province marchigiane nel 2009-2010. Inoltre, lo stesso clone, è stato isolato in campioni di carne di pollo (2006, 2008 e 2009) e feci umane (2002-2009).

Per concludere una buona caratterizzazione genotipica di ceppi circolanti in una determinata regione è un ottimo supporto per indirizzare ulteriori indagini epidemiologiche sul campo e, lo studio in esame, potrebbe essere proseguito con un piano di sorveglianza attiva negli allevamenti avicoli situati nella valle del Metauro e completato con ulteriori campionamenti di acque di fiume e di balneazione del litorale prossimo alla sua foce.

Bibliografia

Cardinale E., Perrier Gros-Claude J.D., Rivoal K., Rose V., Tall F., Mead G.C., Salvat G. (2005). Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 968-977.

CLSI, January 2007, M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement.

Di Giannatale E., Prencipe V., Acciarri V.A., Marconi M.M., Semprini P., Marfoglia C. (2008). Indagine di tossinfezione da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar nella regione Abruzzo. *Veterinaria Italiana*, 44 (2): 405-416.

Enter-Vet: Rapporto annuale 2009. Antonia Ricci, Marzia Mancin, Veronica Cibin. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Grimont PAD, Weill F. X. (2007). Antigenic formulae for the *Salmonella* serovars, 9th Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France.

Hunter S. B., Vauterin P., Lambert-Fair M. A., Van Duyne M. S., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E., (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.

ISS: Notiziario Vol 24-n°1 gennaio 2011 ISSN 0394-9303; Enter-Vet: Rapporto annuale. Antonia Ricci, Marzia Mancin, Veronica Cibin. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Magistrali C. Dionisi A.M., De Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) Contamination

of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Research in Veterinary Science*, 85: 204-207.

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.

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA journal* (2011);9(3):2090

Weide-Botjes M., Kobe B., Lange C., Schwarz S. (1998). Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods. *Veterinary Microbiology*, 61: 215-227.



Epidemiologia molecolare di ceppi di *Salmonella enterica* ser. Hadar isolati da varie fonti nella Regione Marche by Monica Staffolani et al. 2012 is licensed under a Creative Commons Attribution - Non commerciale 3.0 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