

Indagine su un focolaio di tossinfezione da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar nella regione Abruzzo

Elisabetta Di Giannatale⁽¹⁾, Vincenza Prencipe⁽¹⁾, Vicdalia Aniela Acciarri⁽¹⁾, Maria Maddalena Marconi⁽²⁾, Primula Semprini⁽¹⁾ & Cristina Marfoglio⁽¹⁾

Riassunto

E' stato eseguito uno studio comparativo tra 22 ceppi di *Salmonella* Hadar isolati da soggetti coinvolti in un focolaio di tossinfezione alimentare in Abruzzo nel 2000 e 21 ceppi dello stesso sierotipo isolati da carni avicole e da feci umane in Abruzzo e Molise nel periodo 2000 e 2001. L'indagine aveva come obiettivo di fornire una interpretazione epidemiologica del focolaio di tossinfezione alimentare determinando il grado di similarità tra i ceppi di *Salmonella* Hadar isolati dai soggetti coinvolti nel focolaio, quelli isolati da carne avicola, identificata ma non confermata come possibile fonte di infezione, e da altri campioni umani pervenuti in laboratorio. A tal fine sono state impiegate tecniche di caratterizzazione genotipica come *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e sono stati determinati i pattern di resistenza agli antimicrobici. Dall'analisi in PFGE dei profili di restrizione ottenuti con *XbaI* e *BlnI* sono stati identificati 12 pulsotipi suddivisi in 3 gruppi. La RAPD non ha fornito indicazioni non riuscendo a discriminare i ceppi isolati dai soggetti con gastroenterite appartenenti al focolaio tossinfettivo. Il test di resistenza agli antimicrobici ha evidenziato pattern di resistenza multipla ma non sono stati identificati ceppi resistenti al Ciprofloxacina o altri Chinoloni testati. I ceppi

avari sono risultati resistenti all'acido nalidixico mentre solo il 31,8% di quelli umani ha presentato tale profilo. Da un'analisi combinata dei pattern di resistenza e dei pulsotipi sono stati identificati 4 profili di cui quello associato al focolaio è risultato non correlato agli altri presenti nello stesso periodo. E' stata confermata la necessità di applicare un set di metodi di analisi differenti per garantire una migliore caratterizzazione e una maggiore capacità discriminante nell'identificazione delle possibili origini della contaminazione e stabilire correlazioni fra gli isolati.

Keywords

Alimenti, Animale, Antibiogramma, Hadar, Pollame, Pulsed-field gel electrophoresis, Random amplified polymorphic DNA, *Salmonella*, Tossinfezione, Uomo, Zoonosi.

Introduzione

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Hadar (*Salmonella* Hadar) è stata isolata per la prima volta all'inizio degli anni '50 da un campione di feci di una persona affetta da gastroenterite con febbre (11). Ai primi isolamenti registrati in Europa nel 1970 ha fatto seguito nel periodo dal 1993 al 2003 un incremento negli isolamenti di *S. Hadar* da campioni clinici umani collocando questo sierotipo tra i primi cinque con maggior

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

(2) Azienda Unità Sanitaria Teramo-Servizio di Igiene di Alimenti e Nutrizione-Unità operativa di Giulianova, Via Gramsci, 64021 Giulianova, Italia

frequenza di isolamento (4, 6, 24).

Il principale veicolo di infezione da *S. Hadar* è rappresentato dalla carne di specie avicole (pollo, tacchino, anatra, quaglia). In Europa, nel biennio 2000 e 2001, è risultato l'alimento maggiormente contaminato dal sierotipo Hadar con una percentuale variabile dal 12,5% al 14,5%, con una prevalenza del 1,77% nel 2000 e del 1,62% nel 2001 (7). Carni di altre specie, come quella bovina e suina, raramente sono risultate contaminate da questo sierotipo mentre altri alimenti di origine animale non sono stati identificati come fonte di infezione da *S. Hadar* (7).

Da segnalare, comunque, un'indagine condotta in Spagna nel 2002-2003 in cui questo sierotipo è stato identificato come causa di tossinfezione alimentare nel 3% dei focolai associati al consumo di uova e ovoprodotti (5).

La presenza di questo sierotipo in un focolaio tossinfettivo è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1994 in una mensa aziendale in cui sono stati identificati 448 casi e la cui origine è stata attribuita ad un'insalata di carne (8); successivamente nel 1997 è stato identificato un secondo focolaio da *S. Hadar* che ha interessato 29 avventori di un ristorante che avevano consumato dell'arrosto di coniglio (3).

Nel 2005 in Spagna un focolaio tossinfettivo causato da *S. Hadar* ha coinvolto 2759 casi ed è stato registrato un decesso. Il collegamento tra il consumo di carne di pollo precotta e l'infezione è stato confermato dall'isolamento microbiologico del patogeno dall'alimento (17).

Nel 2000 quando, sulla base dei dati nazionali, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* rappresentavano il 79,5% degli stipiti umani notificati, nella regione Abruzzo si è osservato un picco di isolamento di *S. Hadar* pari al 46,6%. Questo dato è da attribuirsi ad un focolaio tossinfettivo verificatosi tra luglio e agosto in provincia di Teramo (9). Sulla base dell'indagine epidemiologica è emerso che un piatto a base di carne di pollo consumato da parte dei soggetti colpiti fosse all'origine del focolaio tossinfettivo. La mancanza delle materie prime o di avanzi della preparazione

ha reso impossibile esaminare il prodotto e quindi confermare le ipotesi.

Con questo lavoro si è inteso studiare il focolaio di tossinfezione alimentare da *S. Hadar* attraverso l'analisi comparativa dei ceppi isolati dai soggetti colpiti con altri dello stesso sierotipo, isolati in Abruzzo e Molise nel periodo 2000 e 2001 nell'ambito delle attività diagnostiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZS A&M). I profili di resistenza agli antimicrobici e quelli di restrizione identificati mediante PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) ottenuti sono stati elaborati congiuntamente per determinare il grado di similarità dei ceppi isolati dai soggetti colpiti dalla tossinfezione alimentare con quelli che hanno circolato nelle due regioni nello stesso periodo e fornire un'interpretazione epidemiologica del focolaio verificatosi.

Materiali e metodi

Dati sul focolaio

Ad agosto del 2000, nel corso di una sagra in un piccolo paese in provincia di Teramo, al confine fra Abruzzo e Marche, si è verificato un episodio di tossinfezione alimentare che ha coinvolto circa 80 persone che avevano consumato pietanze preparate dai ristoranti del posto e servite nel corso della sagra. Il numero di persone esposte è stato sicuramente maggiore, poiché l'evento si è verificato in piena estate, periodo in cui il paese è meta di turisti anche giornalieri, provenienti da paesi e regioni limitrofe. Il quadro clinico è stato caratterizzato principalmente da gastroenterite di diversa entità, spesso accompagnate da vomito e febbre. Per alcuni i casi è stato necessario il ricovero ospedaliero presso strutture del territorio. Tutti i soggetti ospedalizzati hanno presentato coprocultura positiva per *Salmonella* sp. e i ceppi isolati sono stati successivamente identificati come *S. Hadar*.

Il "menù" consumato era rappresentato da un primo piatto, preparato con pasta fresca lavorata a mano e condita con ragù di carne di agnello e di pollo, e un secondo piatto sempre

a base di carne di pollo e agnello sottoposti a brevissima cottura. La carne, tagliata in piccoli pezzi, è saltata in olio di oliva rapidamente, in modo da creare uno strato esterno croccante. Sono stati eseguiti sopralluoghi nei ristoranti dove sono state preparate le pietanze ma non erano più presenti né gli ingredienti utilizzati e delle preparazioni è stato prelevato il resto del condimento (ragù) avanzato che sottoposto a esame microbiologico è risultato negativo per *Salmonella* sp.

Raccolta dei ceppi

Sono stati esaminati complessivamente 43 ceppi di *S. Hadar* isolati nel periodo 2000-2001 da campioni umani e da pollo, quest'ultimi sia da campioni di feci sia di carne (Tabella I).

Per quanto riguarda il focolaio tossinfettivo sono stati esaminati i 22 ceppi di *S. Hadar* isolati dalle feci dei 22 soggetti che hanno presentato gastroenterite.

Tabella I
Ceppi di *Salmonella* Hadar identificati nel 2000-2001 dai vari campioni

Anni	N° di ceppi			Totale
	Feci umane	Carne di pollo	Feci di pollo	
2000	22*	7	0	29
2001	6	7	1	14
Totale	28	14	1	43

* ceppi isolate da persone coinvolte nel focolaio tossinfettivo da *Salmonella* Hadar

Sono stati, inoltre, selezionati 21 ceppi di *S. Hadar* isolati da campioni umani, animali e alimentari nel periodo 2000-2001 ed esaminati nell'ambito delle attività di sorveglianza come Centro di Referenza Regionale per gli enterobatteri patogeni.

Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad identificazione biochimica, utilizzando sistemi miniaturizzati del commercio e sierologica con antisieri del commercio per la ricerca di antigeni somatici ed antigeni ciliari, secondo lo schema di White-Kauffman (19). I ceppi sono stati conservati in Microbank™ (Pro-Lab, Weston, Florida) a -80°C fino al momento in cui sono stati sottoposti a caratterizzazione biomolecolari.

Random amplified polymorphic DNA

Gli isolati sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) sulla base del protocollo del laboratorio Comunitario di Riferimento per le Zoonosi di Berlino. I ceppi batterici sono stati inoculati in brodo Circle-Grow® (BIO 101, Vista, California) e incubati overnight a 37°C. Ogni brodocoltura ottenuta è stata sottoposta a centrifugazione (14000 rpm per 6 minuti a 4°C) e il pellet è stato sospeso in Tris-EDTA 1X (50mM tris HCl pH 8,0-1mM EDTA pH 8,0) e sottoposto a lisi cellulare mediante riscaldamento a 100°C per 10'. Dopo un rapido raffreddamento in ghiaccio la sospensione è stata sottoposta a centrifugazione a 14.000 rpm per 5'. Il surnatante è stato prelevato e ne è stata verificata la concentrazione e il grado di purezza del DNA estratto mediante misurazione con biofotometro.

La reazione di PCR è stata eseguita su un volume totale di 25 µl contenente:

- GeneAmp10X PCR buffer (Tris 9,36 mM pH 8,3, KCl 46,7 mM)
- MgCl₂ 2,8 mM, GeneAmp dNTPs 200 mM
- BSA 0,12 µg/µl
- 2,4 pmol del primer 1254 (CCG CAG CCA A) o 1283 (GCG ATC CCC A)
- 1,6 U di AmpliTaq Gold DNA polymerase
- 100-175 ng di DNA estratto.

L'amplificazione è avvenuta in un Termocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California) con le seguenti condizioni:

- un ciclo a 94°C per 1'
- sei cicli a 94°C per 30", a 20°C per 40" e a 72°C per 1'
- quaranta cicli a 94°C per 30", a 30°C per 40" e a 72°C per 2'
- un ciclo finale di 72°C per 4'.

Il prodotto di amplificazione è stato separato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% e colorato con bromuro di etidio 0,5 µg/ml, per la visualizzazione dell'immagine è stato utilizzato un transilluminatore a raggi UV. Il DNA *molecular weight marker X* (Roche, Basel) è stato impiegato come marker di pesi molecolari.

La valutazione è stata effettuata considerando il numero di bande che differiscono tra i ceppi. Le bande con eccessiva luminosità sono state considerate come frammenti doppi (20). I ceppi risultati differenti per 2 o più bande maggiori sono stati considerati appartenenti a tipi differenti. I ceppi con profili risultati differenti solo per una banda maggiore o per una o due bande minori sono stati considerati sottotipi di un unico ceppo (2).

Pulsed-field gel electrophoresis e analisi dei profile di macrorestrizione

La metodica utilizzata per la PFGE è quella in uso e standardizzata dal *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) in ambito del progetto *Pulse-Net* (www.cdc.gov/pulsenet/) utilizzando gli enzimi di restrizione *XbaI* e *BlnI*. Come standard di pesi molecolari è stato utilizzato il ceppo di *Salmonella* Braenderup H9812, digerito con *XbaI* (12). I campioni sono stati successivamente sottoposti a digestione enzimatica del DNA utilizzando *XbaI* (Promega, Madison, Wisconsin) e *BlnI* (Roche). I blocchetti sono stati inclusi in agarosio 1% (p/v) ed i frammenti generati sono stati separati mediante elettroforesi pulsata in TBE (0,5X, Sigma, St Louis, Missouri) come buffer di corsa costantemente mantenuto a 14°C utilizzando il Chef Mapper XA (BioRad Inc, Hercules, California) secondo le seguenti condizioni:

- durata di 18 ore
- con un tempo di pulso iniziale di 2.16"
- un tempo di pulso finale di 63.8"

Il gel è stato colorato con bromuro di etidio (1 µg/ml) per 30', visualizzato al transilluminatore a raggi UV. I profili di PFGE sono stati successivamente normalizzati e analizzati utilizzando il software Bionumerics versione 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem) che calcola automaticamente la percentuale di similarità tra i diversi ceppi secondo il coefficiente di Dice (10, 15, 16). Una volta analizzati i profili, sono stati costruiti i dendrogrammi secondo il metodo d'appaiamento UPGAMA (*upweighted pair-group method using arithmetic averages*) con una tolleranza e ottimizzazione dell'1,5%. È stata costruita poi una matrice combinata risultante

dalla media aritmetica dei risultati ottenuti dalla macrorestrizione ottenuta con l'enzima *XbaI* e *BlnI*.

Test di sensibilità agli antimicrobici

I ceppi isolati sono stati sottoposti al test mediante il metodo di Kirby-Bauer (14) e gli aloni di inibizione sono stati interpretati (sensibile, intermedio e resistente) secondo gli standard stabiliti dal *National Committee Clinical Laboratory Standard* (18). Il panel di antimicrobici (Beckton-Dickinson, UK) utilizzati e le relative concentrazioni, sono riportate in Tabella II.

Per i controlli qualità sono stati utilizzati *Escherichia coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218 (per beta lattamici)

Risultati

Random amplified polymorphic DNA

Con la RAPD sono stati identificati complessivamente due profili:

- il primo ottenuto con il primer 1254, composto da 11 frammenti di peso molecolare compreso tra 320 Kb e 1.914 kb
- l'altro con il primer 1283, formato da 10 frammenti di peso molecolare compreso da 370 kb a 1.990 kb.

Non è stata, quindi, rilevata nessuna variazione nel profilo nei ceppi isolati né per tipo di matrice né per periodo di isolamento.

Pulsed-field gel electrophoresis e analisi dei profili di macrorestrizione

I profili di restrizione individuati con l'enzima *XbaI*, *BlnI* e l'analisi associata delle due serie di profili (*XbaI+BlnI*) sono riportati in Figura 1, 2 e 3 mentre i risultati della valutazione della similarità tra i ceppi esaminati rispetto alla matrice di isolamento sono sintetizzati nella Tabella III.

Con la PFGE sono stati identificati, dopo digestione con *XbaI*, 5 profili di restrizione caratterizzati dalla presenza di un numero di frammenti variabile tra 12 a 14, di peso molecolare compreso fra 60 Kb e 1180 Kb. Dal momento che differendo per meno di tre bande sono da considerarsi altamente correlati (21, 22), i pulsotipi sono stati considerati

subtipi nell'ambito di due gruppi con un indice di similarità (IS) del 93,5%.

Il gruppo I include 4 subtipi (1a, 1b, 1c e 1d). Il profilo 1a raggruppa 22 dei 43 ceppi isolati di

cui 21 da campioni umani e 1 da pollo. I profili 1b e 1c sono scarsamente rappresentati (3 ceppi) mentre il pulsotipo 1d include 17 ceppi di cui 12 da pollo e 3 di origine umana. Un unico

Tabella II

Percentuale (%) di resistenza dei ceppi di *Salmonella* Hadar isolate da feci umane e da carne di pollo

Antimicrobici	Sigle antimicrobici	Ceppi da uomo	Ceppi da pollo
Acido nalidixico (30 µg)	NA	31,8	100,0
Ampicillina (10 µg)	AM	31,8	100,0
Amoxicillina-acido clavulanico (20 µg/10 µg)	AMC	31,8	86,7
Cefazolina (30 µg)	CFZ	31,8	73,3
Gentamicina (10 µg)	GM	0,0	0,0
Kanamycina (30 µg)	K	75,0	0,0
Enrofloxacin (5 µg)	ENO	0,0	0,0
Trimethoprin-sulfametoxazolo (1,25 µg /23,75 µg)	SXT	0,0	0,0
Tetracycline (30 µg)	TE	100,0	93,3
Cefotaxime (30 µg)	CTX	0,1	0,0
Sulfisoxazole (250 µg -300 µg)	G	0,0	0,0
Colistina (10 µg)	CL	0,0	0,0
Streptomycina (10 µg)	S	100,0	93,3
Chloramphenicolo (30 µg)	C	0,0	0,0
Cephalothina (30 µg)	CF	0,0	86,7
Ciprofloxacina (5 µg)	CP	0,0	0,0

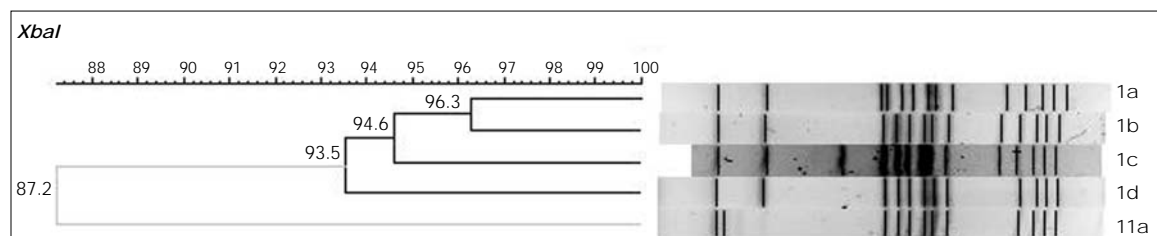


Figura 1
Pattern di macrorestrizione ottenuti con l'enzima *XbaI*

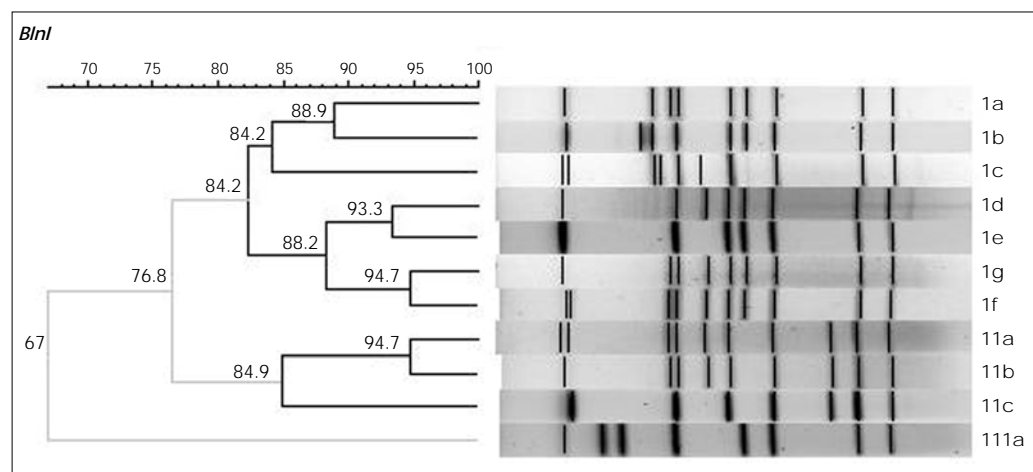


Figura 2
Patterns di macrorestrizione ottenuti con l'enzima *BlnI*

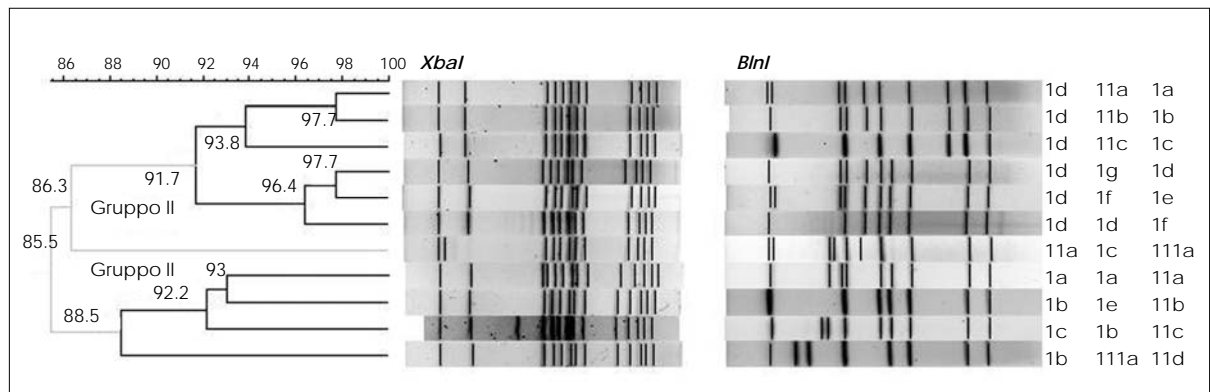


Figura 3
Patterns di macrorestrizione ottenuti utilizzando entrambi gli enzimi *XbaI* e *BlnI*

Tabella III
Profili di restrizione rilevati dopo digestione con *XbaI* e *BlnI* di *Salmonella* Hadar* isolati da campioni umani e di pollo nel periodod 200-2001

Enzima di restrizione	Pattern di restrizione	No. ceppi da pollo		No. ceppi da uomo			
		2000	2001	2000	2001		
<i>XbaI</i>	Gruppo 1	1a	1	-	21*	-	
		1b	2	-	-	-	
		1c	-	-	1*	-	
		1d	4	8	-	5	
<i>BlnI</i>	Gruppo 2	2a	-	-	-	1	
		Gruppo 1	1a	1	-	21*	-
			1b	-	-	1*	-
			1c	-	-	-	1
			1d	-	-	-	1
			1e	1	-	-	-
			1f	-	-	-	2
1g	-	-	-	2			
<i>XbaI+BlnI</i>	Gruppo 2	2a	2	7	-	-	
		2b	1	1	-	-	
		2c	1	-	-	-	
<i>XbaI+BlnI</i>	Gruppo 3	3a	1	-	-	-	
		Gruppo 1	1a	1	-	21*	-
			1b	1	-	-	-
			1c	-	-	1*	-
			1d	1	-	-	-
			1e	-	-	-	-
	1f		-	1	-	-	
	Gruppo 2	2a	2	7	-	-	
		2b	1	1	-	-	
		2c	1	-	-	-	
2d		-	-	-	2		
Gruppo 3	2e	-	-	-	1		
	2f	-	-	-	1		
Gruppo 3	3a	-	-	-	1		

* ceppi di *Salmonella* Hadar isolati da persone coinvolte nel focolaio tossinfettivo e campioni di pollo (2000-2001)

ceppo umano isolato da un caso sporadico nel 2001 appartiene al gruppo 2 (subtipo 2a) (Figura 1; Tabella III).

Dei ceppi umani isolati nel 2000, correlati al focolaio, 21 su 22 rientrano nel subtipo 1a e 1 al subtipo 1c anche se tutti appartengono al gruppo 1 (indice di similarità del 95%). Dei casi sporadici identificati nel 2001, 5 mostrano un profilo subtipo 1d mentre uno si differenzia marcatamente appartenendo al subtipo 2a.

I 7 ceppi di *S. Hadar* isolati nel 2000 da campioni di pollo appartengono tutti al gruppo 1 di cui 1 presenta profilo subtipo 1a, 2 appartengono al profilo subtipo 1b e 4 al profilo subtipo 1d. A quest'ultimo appartengono anche gli 8 ceppi isolati nel 2001 (carne e feci).

Con l'enzima *BlnI* sono stati ottenuti 11 pulsotipi caratterizzati da 7-10 frammenti di peso molecolare compreso tra 98,82 kb e 1.136 kb. Sono stati individuati 3 gruppi con IS del 78%. Il gruppo 1 si suddivide in 7 sottotipi con IS del 78,6% a cui appartengono tutti i ceppi del focolaio: 21 con profilo subtipo 1a e 1 al subtipo 1b. Allo stesso gruppo appartengono i 6 ceppi umani isolati da casi sporadici nel 2001 di cui 1 con profilo subtipo 1c, 1 subtipo 1d, 2 subtipo 1f e 2 subtipo 1g. Dei 7 ceppi isolati da carne di pollo nell'anno 2000 soltanto 2 ceppi appartengono al gruppo 1 (1 al subtipo 1a e 1 al 1e). Il gruppo 2, con indice di similarità del 87,5%, raggruppa 3 sottotipi di cui fanno parte 8 ceppi isolati da carne di pollo nel 2001, 7 appartenenti al profilo subtipo 2a e 1 al profilo subtipo 2b, e 4 nel 2000 di cui 2 con profilo subtipo 2a, 1 al 2b e 1 al 2c. Al gruppo 3 appartiene un unico ceppo isolato da carne di pollo nel 2000 (subtipo 3a) (Figura 2; Tabella III).

Dall'elaborazione combinata delle matrici degli IS dei risultati ottenuti per ogni ceppo con i due enzimi, sono stati identificati 11 pulsotipi riconducibili a tre gruppi, con un IS del 88,5%. Il gruppo 1, con IS del 88%, include 4 profili: 21 dei ceppi del focolaio e un ceppo isolato da carne di pollo nell'anno 2000 presentano un profilo 1a; al pulsotipi 1b e 1c appartengono rispettivamente 1 ceppo isolato da carne di pollo nell'anno 2000 e 1 umano

appartenente al focolaio. In ultimo 1 solo ceppo di *S. Hadar* isolato da carne di pollo è riconducibile al profilo 1f.

Il gruppo 2, con IS del 92,2%, include 6 profili di restrizione: al tipo 1a appartengono 2 ceppi di carne di pollo isolati nell'anno 2000 e 7 isolati nell'anno 2001; al profilo 1b appartengono 2 ceppi di carne di pollo isolati 1 nell'anno 2000 e l'altro nel 2001; al tipo 2c appartiene 1 ceppo isolato da carne di pollo nell'anno 2000; al profilo 2d e 2e appartengono a ciascuno 2 ceppi isolati dalle feci umane nell'anno 2001; infine al profilo 2f appartiene un ceppo isolato nell'uomo nell'anno 2001. In ultimo al gruppo III appartiene un unico ceppo di un caso sporadico isolato nel 2001 (3a) (Figura 3; Tabella III).

Test di sensibilità agli antimicrobici

I risultati delle percentuali di resistenza ai singoli antimicrobici ottenuti sono riportati in Tabella II. Le resistenze più comunemente riscontrate nei ceppi di *S. Hadar* isolate da campioni umani sono state per Tetracicline, streptomina (nel 100% dei ceppi), kanamicina (75%) e acido nalidixico, ampicillina, ampicillina-acido clavulanico e cefazolina (31,8%). Per i ceppi isolati da pollo questi sono risultati resistenti a acido nalidixico, ampicillina (100%), tetracicline, streptomina (93,3%), ampicillina-acido clavulanico e cefalotina (86,7%) e cefazolina (73,3%). Tutti i ceppi testati hanno presentato resistenze multiple (da tre a sette antimicrobici) riconducibili a quattro pattern di resistenza (Tabella IV). Da un'analisi della composizione dei pattern appare evidente una differenza marcata tra le matrici esaminate e all'interno dello stesso gruppo rispetto all'anno di isolamento. Il pattern KTeS è stato rilevato solo e in tutti i ceppi umani esaminati nell'ambito del focolaio; un secondo profilo caratterizzato da resistenza multipla a 5 antimicrobici (NaAmCefTeS) presentato solo dai ceppi isolati da carne di pollo nel 2000 e nel 100% di questi, un terzo caratterizzato da resistenza multipla a 6 antimicrobici (NaAmCefTeSAmc) presente nel 50% dei ceppi isolati da pollo e nel 40% di quelli umani rilevato solo nel 2001. Un quarto pattern caratterizzato da resistenza

Tabella IV

Ceppi di *Salmonella* Hadar isolate nel 2000-2001 suddivisi per anno,specie e tipo di campione, pattern di restrizione e pattern di resistenza

ID	Anni	Specie	Tipo di campione	Pattern di restrizione <i>XbaI</i> + <i>BlnI</i>	Pattern di resistenza*	Pattern tipo
7	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
8	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
9	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
10	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
11	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
12	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
13	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
14	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
15	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
16	2000	Uomo	Feci	1a	KSTe	A
17	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
18	2000	Uomo**	Feci	1c	KSTe	A
19	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
20	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
21	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
22	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
23	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
24	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
25	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
26	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
27	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
28	2000	Uomo**	Feci	1a	KSTe	A
2	2000	Pollo	Carne	1a	NaAmCefTeS	B
3	2000	Pollo	Carne	2c	NaAmCefTeS	B
4	2000	Pollo	Carne	2b	NaAmCefTeS	B
29	2000	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeS	B
1	2000	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmcCfz	D
5	2000	Pollo	Carne	1d	NaAmCefTeSAmcCfz	D
6	2000	Pollo	Carne	1b	NaAmCefTeSAmcCfz	D
31	2001	Uomo	Feci	2d	NaAmCefTeSAmc	C
32	2001	Uomo	Feci	2f	NaAmCefTeSAmc	C
37	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmc	C
38	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmc	C
39	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmc	C
40	2001	Pollo	Carne	2e	NaAmCefTeSAmc	C
43	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmc	C
30	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmcCfz	D
33	2001	Uomo	Feci	2e	NaAmCefTeSAmcCfz	D
34	2001	Uomo	Feci	2d	NaAmCefTeSAmcCfz	D
35	2001	Pollo	Carne	2a	NaAmCefTeSAmcCfz	D
36	2001	Pollo	Carne	2b	NaAmCefTeSAmcCfz	D
41	2001	Uomo	Feci	3a	NaAmCefTeSAmcCfz	D
42	2001	Pollo	Feci	2a	NaAmCefTeSAmcCfz	D

* codici per antimicrobici sono riportati in Tabella III

** ceppi isolati da persone coinvolte nella tossinfezione da *Salmonella* Hadar

multipla a 7 antimicrobici (NAAmCefTeSCfz) è stato rilevato in ceppi isolati da feci umane (60%) solo nel 2001 e per quanto riguarda i ceppi da pollo nel 42,8 e 35,5% degli isolati da carne rispettivamente nel 2000 e nel 2001 mentre nel 100% da feci nel 2001 (Tabella III).

Per facilitare il confronto tra i pattern individuati e successivamente l'analisi combinata tra i risultati del test di sensibilità agli antimicrobici e della PFGE sono i diversi pattern di resistenza sono stati identificati con una lettera maiuscola (Tabella IV).

Sono state riscontrate differenti distribuzioni temporali dei pattern di resistenza rilevati. Nel periodo considerato il tipo D è risultato ugualmente rappresentato nella popolazione di *S. Hadar* isolata da campioni avicoli (carne e feci) (42,9% nel 2000 e 44,4% nel 2001). Il tipo B, invece, ha caratterizzato il 57,1% dei ceppi (solo avicoli) isolati mentre non è stato rilevato in nessuno dei ceppi isolati nel 2001. Nello stesso anno il tipo C è risultato presente nel 55,6% delle *S. Hadar* isolate da campioni avicoli (carne e feci) mentre non è stato mai segnalato nei ceppi isolati nell'anno precedente.

Per quanto riguarda i ceppi umani isolati nel 2000 dal focolaio tossinfettivo, hanno presentato solo il profilo di resistenza riferibile al tipo A che non ha trovato riscontro né nei ceppi umani nel 2001 né in tutti quelli avicoli isolati nel periodo di studio. I tipi C e D rilevati nel 2001 trovano corrispondenza con quanto rilevato nei ceppi avicoli.

Valutazione dei profili di restrizione e dei pattern di resistenza

I profili di restrizione ottenuti con la PFGE sono stati analizzati in combinazione con i pattern di resistenza agli antimicrobici ed i risultati sono riportati in Tabella IV. Fatta eccezione per i ceppi isolati nell'ambito del focolaio che presentano una corrispondenza stretta tra profilo di restrizione e pattern di resistenza (1a-A), i tipi C e D, che differiscono solo per la resistenza a Cfz, sono rappresentati per il 38,1% nel profilo IIa che raccoglie il 42,9% delle *S. Hadar* isolate nel periodo di studio; al contrario 3 dei tipi di resistenza individuati contengono tutti i ceppi isolati

suddivisi tra gli 11 profili di restrizione individuati.

Discussione

Sono stati esaminati 43 ceppi di *S. Hadar* per verificare la similarità tra quelli isolati da un focolaio tossinfettivo verificatosi nella regione Abruzzo nell'anno 2000 con quelli rilevati nelle regioni Abruzzo e Molise nel periodo 2000-2001. I risultati del test di sensibilità agli antimicrobici sono stati ottenuti esaminando i ceppi di *S. Hadar* in studio con un pannello di 16 antimicrobici. I ceppi isolati hanno manifestato resistenza multipla (100% ad almeno 3 antimicrobici ed il 32,6% a più di 4 antimicrobici). Non sono stati identificati ceppi resistenti al ciprofloxacina o altri chinoloni testati, contrariamente a quanto segnalato in altri paesi europei (21) ma in accordo con i dati nazionali sia per i ceppi isolati da uomo e da pollo (1, 13).

Nei confronti dell'acido nalidixico tutti i ceppi aviari sono risultati resistenti mentre per quelli umani solo il 31,8% dei ceppi ha presentato tale profilo. Anche in questo caso i dati rispecchiano quanto riportato dai dati nazionali (75% ceppi umani e 97% avari) ed europei (57% ceppi umani) (4, 22). La presenza di resistenza verso AN e sensibilità per CP viene interpretata come un primo passo verso la resistenza nei confronti dei fluorochinoloni. L'elevata resistenza ad antimicrobici beta-lattamici (ampicillina, amoxicillina) fa presupporre la presenza di beta lattamasi plasmidiche (24), non verificata in questo studio.

L'applicazione del metodo RAPD non ha permesso di distinguere i ceppi isolati dai soggetti con gastroenterite appartenenti al focolaio tossinfettivo, quelli provenienti da casi sporadici e quelli isolati da carne avicola; tale metodica non è risultata adatta allo scopo del nostro studio.

Risultati di maggior interesse si sono ottenuti con l'utilizzo della PFGE, metodica riconosciuta altamente discriminante (23) che ha evidenziato uno stesso profilo di macrorestrizione con gli enzimi *XbaI* e *BlnI* tra i ceppi isolati nel 2000 da soggetti con

sintomatologia conclamata, confermando l'origine clonale di tali campioni e quindi l'esistenza di un vero e proprio focolaio.

I ceppi isolati da campioni umani nel 2001 hanno presentato una scarsa correlazione con i ceppi isolati nell'anno precedente. I profili identificati sono risultati infatti appartenere a gruppi diversi (gruppo 2 e 3) facendo quindi ritenere la diffusione di un clone diverso.

Per quanto riguarda i pattern di resistenza, i ceppi umani isolati nell'ambito del focolaio hanno presentato un profilo specifico (KSTe) costituito da antimicrobici che da molto tempo sono in uso sia in terapia umana che veterinaria.

S. Hadar multiresistenti (pattern superiore a 4 antimicrobici) sono invece rappresentati sia da ceppi isolati da campioni umani nel 2001 sia da ceppi rilevati nelle carni e feci di pollo nel 2000 e 2001. I profili rilevati concordano con quanto pubblicato nei bollettini epidemiologici nazionali e europei (Enter-vet, Enter-net) dove *S. Hadar* risulta caratterizzata da pattern di resistenza riferibili in particolare a NaAmCefTeS.

Conclusioni

La presenza di uno stesso profilo di restrizione tra i ceppi isolati nel 2000 da soggetti coinvolti nel focolaio tossinfettivo, ha confermato l'origine clonale dei ceppi e quindi l'esistenza di un vero e proprio focolaio, dato che non era emerso chiaramente dall'indagine epidemiologica. L'esistenza del focolaio è stato confermato anche dalla presenza di uno stesso pattern di resistenza agli antimicrobici.

Non risulta, invece, esserci correlazione fra i ceppi isolati nell'ambito del focolaio del 2000 e quelli rilevati in campioni umani nel 2001. Non è stata inoltre evidenziata correlazione fra i profili identificati nei ceppi di origine umana con quelli derivanti da carne avicola. Questi risultati fanno quindi supporre la presenza di cloni di *S. Hadar* differenti nei gruppi considerati. Non è stato quindi possibile confermare il sospetto epidemiologico emerso

durante le indagini condotte nel corso del focolaio tossinfettivo che aveva evidenziato una correlazione tra i soggetti colpiti e l'aver consumato una pietanza contenente carne di pollo. L'assenza di una conferma di laboratorio sulle materie prime o gli avanzi delle pietanze somministrate o su prodotti rintracciati non ha quindi garantito l'individuazione della fonte di infezione anche se i risultati delle indagini molecolari escluderebbero che la carne avicola sia stata la causa del focolaio.

Metodi di analisi come quelli molecolari che permettono un'alta discriminazione dei ceppi in studio sono utili strumenti complementari all'analisi epidemiologica tradizionale, al rintraccio delle fonti di contaminazione di specifici ceppi patogeni e al controllo e prevenzione della diffusione degli agenti infettanti. Tali informazioni trovano un loro valido impiego nella fase di pianificazione delle attività di sorveglianza per orientare le risorse disponibili per ridurre la prevalenza degli agenti tossinfettivi direttamente all'origine della contaminazione della filiera alimentare.

La combinazione e la comparazione di un set di metodi di analisi differenti, permette una migliore caratterizzazione e una maggiore capacità discriminante nell'identificazione delle possibili origini della contaminazione ed infine, stabilire correlazioni fra gli isolati. Nello studio dei focolai tossinfettivi, attività di campo e indagini di laboratorio devono svolgersi di pari passo e in stretto coordinamento. I metodi molecolari vanno applicati ed utilizzati come strumenti complementari e di supporto all'indagine epidemiologica che talvolta risulta carente o comunque insufficiente per l'individuazione dell'origine del focolaio o per correlare definitivamente i casi umani individuati.

Bibliografia

1. Battisti A., Franco A. & Busani L. 2004. Monitoraggio dell'antibiotico resistenza in medicina veterinaria in Italia. Primo report. Centro Nazionale di Riferimento per Antibioticoresistenza, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Lazio e Toscana, Roma, 44 pp (<http://62.123.162.29:800/pdf/itavarm.pdf> ultimo accesso 5 maggio 2008).
2. Bingen E., Bonacorsi S., Rohrllich P., Duval M., Lhopital S., Brahimi N., Vilmer E. & Goering R.V. 1996. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a paediatric hospital. *J Clin Microbiol*, **34** (12), 3226-3229.
3. Bisbini P., Leoni E. & Nanetti A. 2000. An outbreak of *Salmonella* Hadar associated with roast rabbit in a restaurant. *Eur J Epidemiol*, **16** (7), 613-618.
4. Cailhol J., Lailier R., Bouvet P., La Vieille S., Gauchard F., Sanders P. & Brisabois A. 2006. Trends in antimicrobial resistance phenotypes in non-typhoid *Salmonellae* from human and poultry origins in France. *Epidemiol Infect*, **134** (1), 171-178.
5. Crespo Soler P., Hernández G., Echeita A., Torres A., Ordóñez P. & Aladuena A. 2005. Surveillance of foodborne disease outbreaks associated with consumption of eggs and egg products: Spain 2002-2003. *Eurosurveillance*, **10** (24), pii=2726 (www.eurosurveillance.org/ew/2005/050616.asp#2 ultimo accesso 3 April 2008).
6. European Commission (EC) – Enter-net 2004. Annual report 2004 'Surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond'. EC/SANCO, Unit C/3 (health threats), Programme of community action in the field of public health (2003-2008), Decision 1786/2002/EC, Agreement No. 2003203, Brussels, 161 pp (www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947333306 ultimo accesso 20 maggio 2008).
7. European Food Safety Agency (EFSA) 2006. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. EFSA, Parma (www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620772157.htm ultimo accesso 3 maggio 2008).
8. Fantasia M., Paglietti B., Filatici E., Anastasio M.P. & Rubino S. 1997. Conventional and molecular approaches to isolates of *Salmonella* Hadar from sporadic and epidemic cases. *J Appl Microbiol*, **82**, 494-498.
9. Gorietti S., Pichiorri T., Siepi G., Tozzi A.E., Busani L., Caprioli A. & Luzzi I. 2001. La sorveglianza delle infezioni da *Salmonella* nel 2000: il sistema enter-net Italia. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, **14** (11), ii-iv (www.epicentro.iss.it/ben/precedenti/novembre/2.htm ultimo accesso 2 maggio 2008).
10. Grothues D. & Tümmler B. 1991. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Molec Microbiol*, **5** (11), 2763-2776.
11. Hirsch W., Gerichter Ch.B., Bregman E., Lubling P. & Altman G. 1954. A new *Salmonella* type (*Salmonella* Hadar). *Acta Med Orientalia*, **13**, 41.
12. 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 databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*, **43** (3), 1045-1050.
13. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie 2003. Programma Enter-Vet. 2003. Riepilogo annuale. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di referenza nazionale per le Salmonellosi, Legnaro, 25 pp (www.izsvenezie.it/dnn/Portals/0/salmonellosi/Report_2003.pdf ultimo accesso 20 maggio 2008).
14. Kirby J., Bauer A.W., Sherris C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493-496.
15. Laconcha I., López-Molina N., Rementeria N., Audicana A., Perales I. & Garaizar J. 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis strains. *Int J Food Microbiol*, **40**, 27-34.
16. Landeras E., González-Hevia M.A. & Mendoza M.C. 1998. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. *Int J Food Microbiol*, **43**, 81-90.

17. Lenglet A. 2005. Over 2000 cases so far in *Salmonella* Hadar outbreak in Spain associated with consumption of pre-cooked chicken, July-August 2005. *Eurosurveillance*, **10** (8), pii=2770 (www.eurosurveillance.org/ew/2005/050811.asp ultimo accesso 2 maggio 2008).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCLLS) 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. M100-S12. NCLLS, Wayne, Pennsylvania, **22** (1).
19. Popoff M.Y. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th Ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, 150 pp.
20. Struelens M.J., Schwam V., Deplano A. & Baran D. 1993. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **31** (9), 2320-2326.
21. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. & Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33** (9), 2233-2239.
22. Threlfall E.J., Fisher IST., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschape H., Cormican M., Luzzi I., Schnieder F., Wannet W., Machado J. & Edwards G. 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in human in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Eurosurveillance*, **8** (2), 41-45.
23. Torpdahl M., Skov M.N., Sandvang D. & Baggesen D.L. 2005. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods*, **63**, 173-184.
24. Valdezate S., Echeita A., Diez R. & Usera M.A. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterisation of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella* Hadar. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **19**, 275-281.