

Caratterizzazione molecolare e resistenza antimicrobica di *Salmonella* ser. Typhimurium da allevamenti cunicoli dell'Italia meridionale

Camarda A.¹, Pugliese N.¹, Pupillo A.², Circella E.¹, Ricci M.³, Pazzani C.²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia. ²Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Italy. ³Agenzia Regionale Per l'Ambiente, U.O. Microbiologia degli Alimenti e Bevande, Brindisi, Italy

Corresponding Author: Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università di Bari, Strada provinciale per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano-Bari, Italy - Tel./Fax: +39 080 4679910 - Email: a.camarda@veterinaria.uniba.it

ABSTRACT: Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium from rabbit farms in Southern Italy. *Salmonella enterica* infection is quite uncommon in rabbits, but it may raise serious concerns in terms of economic losses and public health impact. Furthermore, the insurgence and diffusion of multidrug resistant strains complicate the management of both human and rabbit infection. In this study four *S. Typhimurium* strains were characterized for antimicrobial susceptibility, resistance genes, class 1 integrons and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). The results showed the circulation of a group of strain which is indistinguishable from human isolates for PFGE and multidrug resistance patterns. Our data suggest that molecular characterization is an useful tool to promptly recognize *Salmonella* strains which are potentially harmful to rabbits or humans.

Key words: *S. Typhimurium*, PFGE, Multidrug resistance, Resistance genes.

INTRODUZIONE – Le salmonellosi non rappresentano nel settore cunicolo un problema patologico rilevante. I report sulla diffusione della malattia evidenziano, infatti, una prevalenza ridotta di questa forma morbosa negli allevamenti. Tuttavia, spesso la presenza di *Salmonella* si traduce in perdite economiche rilevanti sia per gli effetti diretti sulla salute degli animali, sia per le implicazioni di polizia veterinaria e sanità pubblica. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*) è il sierotipo più temuto, sia per la gravità della sintomatologia cunicola, sia perché causa di tossinfezioni alimentari umane (Dionisi *et al.*, 2009). L'ampia diffusione di ceppi multiresistenti desta grande preoccupazione, perché complicano l'eradicazione negli allevamenti e il trattamento terapeutico nell'uomo. Scarsi sono al momento i dati sulle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi di *S. Typhimurium* isolati nel coniglio, probabilmente proprio a causa di una sottovalutazione del problema in questo settore. In questo lavoro alcuni ceppi di *S. Typhimurium* isolati da allevamenti di coniglio nel corso di focolai di malattia sono stati genotipizzati. I risultati ottenuti hanno offerto lo spunto per riflessioni circa le connessioni possibili tra i ceppi circolanti negli allevamenti cunicoli e quelli responsabili di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

MATERIALI E METODI – Le ricerche sono state condotte su n. 4 stipiti di *S. Typhimurium* isolati da altrettanti allevamenti industriali di coniglio in Puglia e Basilicata tra il 1999 e il 2003 durante focolai epidemici di malattia. I ceppi sono stati fagotipizzati, la suscettibilità agli antibiotici AMP, CHL, ENR, GEN, KAN, NAL, STR, SMX, TET, TMP è stata determinata mediante diffusione su disco secondo le prescrizioni del CLSI (2006) e sono stati allestiti incroci di coniugazione. Le PCR sono state eseguite con

oligonucleotidi specifici per l'isola genomica SGI-1, gli integroni di classe 1 ed i geni di resistenza. I prodotti sono stati clonati in pGEM-T Easy Vector (Promega, Milano). I plasmidi ricombinanti sono stati purificati e l'inserito è stato sequenziato. Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate mediante le applicazioni BLAST. La caratterizzazione mediante PFGE è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Ribot *et al.* (2006). I profili ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati di PulseNet Europa e denominati secondo la nomenclatura standard.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Le caratteristiche dei ceppi di *S. Typhimurium* studiati sono riportati in tabella 1. La fagotipizzazione ha evidenziato una certa eterogeneità tra gli isolati, due dei quali risultavano appartenere al fagotipo DT12, e gli altri due invece rispettivamente a DT104 e DT208. Tuttavia, i due ceppi DT12 e il DT104 esibivano lo stesso profilo di PFGE, denominato STYMXB.0061. I tre ceppi erano accomunati anche da un punto di vista geografico, considerato che provenivano tutti da allevamenti lucani. Diversamente, il ceppo DT208, isolato nella provincia di Lecce, era caratterizzato dal profilo PFGE STYMXB.0110. L'analisi della suscettibilità agli agenti antimicrobici evidenziava che tutti i ceppi erano sensibili ad ENR e GEN, ma, mentre il ceppo DT208 era resistente a STR, SMX e TET, i ceppi DT12 e DT104 erano resistenti a AMP, CHL, STR, SMX e TET. Questi ultimi tre possedevano l'isola genomica SGI-1, che, a sua volta, recava l'informazione genetica necessaria per la multiresistenza. Su di essa erano infatti localizzati i geni *floR*; *sul1*; *tetA(G)*, *aadA2*; *bla_{PSE-1}*, che determinavano, rispettivamente, la resistenza a CHL, SMX, TET, STR e AMP. Inoltre è stato possibile stabilire che i geni *aadA2* e *bla_{PSE-1}* rappresentavano cassette geniche inserite in un integrone di classe 1. Anche il genoma del ceppo DT208 ospitava un integrone di classe 1, in cui era inserita una cassetta genica *aadA1*, che determina, come *aadA2*, l'inattivazione della STR. Il ceppo DT208 inoltre, era resistente al SMX in quanto dotato di 2 geni, *sul1*, riscontrati anche negli altri tre ceppi esaminati, e *sul2*. Questo ceppo, inoltre, differiva dagli altri anche perché portatore del gene *tetA(C)* (invece di *tetA(G)*) il quale era fiancheggiato, a monte e a valle, da due trasposoni semplici IS26. La ricerca di elementi coniugativi nei ceppi in esame ha dato esito negativo nei ceppi DT12 e DT104. Al contrario, nel genoma del ceppo DT208 sono stati individuati due plasmidi. È attualmente in fase di accertamento l'eventuale associazione tra questi e i geni di resistenza.

Il presente studio descrive retrospettivamente 4 ceppi di *S. Typhimurium* isolati da allevamenti cunicoli di Puglia e Basilicata, osservandone una stretta correlazione con isolati di origine umana. Infatti, il pulsotipo STYMXB.0061, caratterizzante i due ceppi DT12 e il DT104 qui esaminati, coincide con un profilo che era predominante in Europa tra il 2000 e il 2004, ma che in Italia era stato riportato assai sporadicamente (Gatto *et al.*, 2006). Tuttavia, pochi anni più tardi lo stesso profilo caratterizzava il 30% degli isolati italiani responsabili di salmonellosi nell'uomo (Dionisi *et al.*, 2009). Inoltre, i tre ceppi STYMXB.0061 esaminati nel presente studio erano caratterizzati da un profilo di multiresistenza AMP-CHL-STR-SMX-TET, dalla presenza dell'isola genomica SGI-1 e dei geni di resistenza *floR*; *sul1*; *tetA(G)*, *aadA2*; *bla_{PSE-1}*. Inoltre, questi ultimi due facevano parte di un integrone di classe 1. Tutte queste caratteristiche coincidono pienamente con quelle del gruppo clonale, costituito perlopiù da ceppi DT104, che nell'ultimo decennio ha avuto una larga diffusione in tutto il mondo. Nel loro insieme, questi dati, sia pure nella loro parzialità, indicano che, tra la fine degli anni '90 e i primi anni 2000, in alcuni allevamenti cunicoli lucani era presente una popolazione di ceppi clonalmente correlati tra loro che costituivano il sottoinsieme di un più ampio gruppo

pandemico. In quegli anni la diffusione di tale sottogruppo era ancora molto limitata in Italia, ma nel corso di pochi anni avrebbe aumentato la sua prevalenza fino a divenire uno dei pulsotipi più rilevanti come causa di salmonellosi nell'uomo (Dionisi *et al.*, 2009). Inoltre, non è da trascurare il fatto che i ceppi di origine cunicola qui esaminati siano resistenti ad antibiotici poco utilizzati nel coniglio, mentre sono suscettibili ad antibiotici quali la gentamicina e l'enrofloxacin che invece sono tra i pochi ad essere impiegati in coniglicoltura. Questo dato, oltre a rimarcare la stretta correlazione esistente tra i ceppi diffusi negli allevamenti cunicoli e quelli di interesse clinico umano, lascia ipotizzare la possibilità di una trasmissione del patogeno in entrambi i sensi, sia dall'uomo al coniglio sia viceversa. Anche se tale ipotesi necessita il suffragio di ulteriori dati, non è illogico supporre che l'infezione del coniglio potrebbe essere provocata anche da ceppi che abbiano infettato l'uomo e che siano stati trasmessi all'ospite cunicolo per via diretta o indiretta, mediata, in quest'ultimo caso, da vettori o veicoli umani o ambientali. Del resto il quadro complessivo è altamente dinamico, in quanto è frequente l'insorgenza di nuovi cloni, anche se poi non tutti hanno capacità di penetrazione tale da renderli epidemici. È il caso del ceppo DT208, isolato in Puglia nel 2000 e descritto nel presente studio. Esso presenta profili peculiari sia in termini di multiresistenza (STR-SMX-TET), sia di PFGE (STYMXB.0110). Le resistenze antimicrobiche da esso esibite scaturiscono da geni differenti rispetto a quelli dei ceppi DT12 e DT104 esaminati e manca della SGI-1. Tuttavia, anche in questo caso i geni di resistenza sono associati ad elementi genetici, quali integroni e trasposoni, implicati nell'insorgenza e nella diffusione di ceppi multiresistenti, e nell'evoluzione batterica. Essi sono implicati anche nel trasferimento genico orizzontale sia interspecie, sia intraspecie. Pertanto, sono fondamentali misure atte a prevenire questo fenomeno, a cominciare dall'uso prudente degli agenti antimicrobici o all'individuazione di strategie alternative rispetto alla metafilassi antibiotica. Resta comunque l'esigenza di caratterizzare approfonditamente i ceppi responsabili di salmonellosi anche nel coniglio, per individuare in tempi utili l'insorgenza di ceppi potenzialmente più rischiosi per l'uomo e per il coniglio.

Tabella 1 – Dati riepilogativi dei ceppi di *S. typhimurium* descritti nel presente lavoro.

Regione/anno di isolamento	Profili di resistenza	Fagotipi	Pulsotipo secondo PulseNet	Pres. della SGI-1	Integr. di classe 1	Cassette geniche	Altri geni di resistenza
Basilicata/1999	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT104	STYMXB.0061	+	+	<i>aadA2; bla_{PSE-1} sul1; floR; tetA(G)</i>	
Puglia/2000	STR-SMX-TET	DT208	STYMXB.0110	-	+	<i>aadA1 sul1; sul2; tetA(C)</i>	
Basilicata/2003	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT12	STYMXB.0061	+	+	<i>aadA2; bla_{PSE-1} sul1; floR; tetA(G)</i>	
Basilicata/2003	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT12	STYMXB.0061	+	+	<i>aadA2; bla_{PSE-1} sul1; floR; tetA(G)</i>	

BIBLIOGRAFIA – CLSI, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards. 9th Eds. CLSI. M2-A9. **Dionisi**, A.M., Graziani C., *et al.*, 2009. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (*S.* 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. Foodborne Pathog. Dis. 6:711-717. **Gatto**, A.J., Peters, T.M., *et al.*, 2006. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage 4 and *S.* Typhimurium definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. Epidemiol. Infect. 134:729-736. **Ribot**, E.F., Fair M.A. *et al.*, 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog. Dis. 3:59-67.