



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE**



---

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE**  
**AGROALIMENTARI**  
**XX CICLO**

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E**  
**STUDIO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN**  
**CEPPI DI SALMONELLA ENTERICA**

Tutor:

Prof. Salvatore Rubino

Tesi della

Dott.ssa Manuela Murgia

Coordinatore:

Prof. Giovanni Antonio Farris

Anno Accademico 2006-2007

## INDICE

RIASSUNTO .....	4
INTRODUZIONE.....	7
Classificazione e caratteristiche antigeniche .....	8
Epidemiologia e trasmissione all'uomo.....	12
Manifestazioni cliniche nell'uomo: gastroenteriti, infezioni extra-intestinali e febbre tifoide .....	15
Manifestazioni cliniche negli animali.....	18
Patogenesi e meccanismo di infezione .....	20
Antibiotico-resistenza .....	22
Plasmidi e integroni .....	26
<i>Salmonella genomic island 1</i> (SGI1).....	28
Resistenza ai fluorochinoloni.....	30
Resistenza ai beta-lattamici .....	36
SCOPO DEL LAVORO .....	39
MATERIALI E METODI.....	41
Raccolta dei ceppi.....	41
Test di sensibilità agli antibiotici .....	42
Analisi del profilo plasmidico.....	45
Esperimenti di coniugazione.....	45
<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	45
Identificazione di sequenze integrone.....	46
Amplificazione dei geni <i>gyrA</i> e <i>parC</i> e <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) .....	46
Ricerca di geni <i>qnr</i> .....	48
Ricerca di geni codificanti per $\beta$ -lattamasi .....	48
Analisi della <i>Salmonella Genomic Island 1</i> .....	49
<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) .....	51
RISULTATI .....	53
Prevalenza di <i>Salmonella</i> nei campioni di cibo analizzati.....	53
Test di sensibilità agli antibiotici .....	55
Analisi del profilo plasmidico.....	60

Esperimenti di coniugazione.....	63
Identificazione di integroni classe I.....	64
Studio dei meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni .....	65
Ricerca di geni codificanti per $\beta$ -lattamasi tramite PCR e sequenziamento.....	69
Analisi della <i>Salmonella Genomic Island 1</i> .....	70
<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> .....	70
DISCUSSIONE.....	77
Prevalenza di <i>Salmonella</i> .....	78
Antibiotico resistenza .....	81
Determinanti di resistenza .....	85
PFGE.....	89
CONCLUSIONI.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	93

## RIASSUNTO

*Salmonella enterica* rappresenta una delle più comuni cause di infezioni batteriche legate al cibo nell'uomo, in particolare nei Paesi in Via di Sviluppo. L'insorgenza di antibiotico-resistenza in ceppi di *Salmonella* isolati dagli alimenti costituisce un grave problema per la salute pubblica a causa della potenziale compromissione del trattamento delle infezioni causate da questo patogeno.

Nel presente lavoro sono stati analizzati ceppi di *Salmonella* isolati da alimenti in Marocco e Libia. La presenza di *Salmonella* è stata riscontrata nell'1% dei campioni analizzati, prevalentemente in quelli provenienti dai mattatoi, dai frutti di mare e da carni avicole.

In totale 134 isolati di *Salmonella* sono stati caratterizzati per quanto riguarda il sierotipo, l'antibiotico-resistenza, il profilo plasmidico. Inoltre sono stati ricercati i determinanti genetici responsabili della resistenza agli antibiotici ed è stata eseguita la

*Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

Sono stati identificati 22 diversi sierotipi di *Salmonella enterica* dei quali *Infantis*,

Bredeney, Braenderup, Blokley, M'Bandaka e Typhimurium erano i più rappresentati.

La PFGE ha rilevato la presenza di 49 differenti pulsotipi. L'analisi dei pulsotipi mediante il software Gel Compar II ha mostrato una stretta correlazione tra sierotipo e pulsotipo, a parte un unico caso in cui due sierotipi diversi, Braenderup e M'Bandaka, hanno mostrato lo stesso profilo. La percentuale di omologia tra i ceppi appartenenti allo stesso sierotipo non era mai inferiore al 69%.

I test di sensibilità nei confronti di 14 antibiotici hanno permesso di stabilire che il 40% dei ceppi era resistente ad uno o più antibiotici e che il 26% era multiresistente (MDR  $\geq$  2 antibiotici). Le resistenze più diffuse sono risultate quelle alla tetraciclina (19%), alla kanamicina (16%), all'acido nalidixico (15%) e all'ampicillina (12%). I ceppi MDR appartenevano ai sierotipi Typhimurium, Manhattan, Braenderup e Hadar.

Lo studio dei determinanti di resistenza ha portato all'identificazione dei geni TEM-1, correlati alla produzione di  $\beta$ -lattamasi, in 6 ceppi appartenenti ai sierotipi Muenchen, Minneapolis, Altendorf e Hadar.

È stato inoltre dimostrato che la resistenza all'acido nalidixico nei ceppi di *S. Braenderup*, *S. Minneapolis*, *S. Altendorf* e *S. Hadar* era associata a mutazioni puntiformi nei geni *gyrA* e *parC* e non alla presenza dei geni *qnr* che codificano per la

resistenza ai chinoloni mediata da plasmide.

La presenza di integroni di classe I è stata rilevata in due ceppi MDR appartenenti ai sierotipi Muenchen e Minneapolis e in 5 ceppi di *S. Typhimurium* con profilo di resistenza Amp, Amc, C, Tet, Str, Su. È stato determinato che nei ceppi di *S. Typhimurium* gli integroni e le relative cassette geniche erano localizzati all'interno di una regione genomica di 43 kb nota come *Salmonella Genomic Island 1*, tipica del ceppo epidemico di *S. Typhimurium* DT104.

Nel 42% dei ceppi è stata riscontrata la presenza di uno o più plasmidi di peso molecolare variabile tra 151 e 1.5 kb. Il 32% dei ceppi possessori di plasmidi era resistente ad uno o più antibiotici, ma ripetuti esperimenti di coniugazione non hanno determinato il trasferimento di alcuna resistenza.

Questo studio conferma il ruolo degli alimenti di origine animale come riserva di ceppi di *Salmonella* resistenti e multiresistenti e sottolinea la necessità di un continuo monitoraggio di tali patogeni che rappresentano una tra le principali cause di tossinfezioni alimentari.

## INTRODUZIONE

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari Gram-negativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Darwin and Miller, 1997), aerobi-anaerobi facoltativi, asporigeni, non fermentanti lattosio e generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi (Zavanella, 2001).

Sono microrganismi patogeni di origine zoonosica, in grado di causare differenti forme di malattia, da colonizzazioni asintomatiche e gastroenteriti a gravi forme extraintestinali come batteriemie, meningiti o osteomieliti (Parry, 2003).

*Salmonella* rappresenta uno dei più comuni agenti eziologici di infezioni gastroenteriche associate al consumo di alimenti.

Le infezioni da *Salmonella* sono presenti con alta prevalenza in tutte le regioni geografiche del mondo, con particolare virulenza nei Paesi in via di Sviluppo (PVS) e costituiscono, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, una delle più gravi minacce alla salute pubblica per l'incremento di incidenza e mortalità degli ultimi anni, per la rilevanza in termini economici nonché per l'emergenza di fenomeni di

antibiotico-resistenza.

Il fenomeno antibiotico-resistenza ha subito una crescente diffusione nel genere *Salmonella*, sia in ceppi isolati dall'uomo che da animali ed alimenti (Rabsch *et al.*, 2001), raggiungendo proporzioni tali da rappresentare un problema globale di sicurezza alimentare. In questo caso, gli effetti sulla salute pubblica sono legati alla trasmissione animale-uomo della malattia (zoonosi), ma anche alle tossinfezioni alimentari associate al consumo di alimenti di origine animale.

Particolarmente preoccupante è l'insorgenza di ceppi resistenti ad antibiotici fondamentali per la terapia umana, quali fluorchinoloni e cefalosporine di terza generazione (Butaye *et al.*, 2006; Rabsch *et al.*, 2001).

Per questo motivo, è importante studiare la diffusione dei fenotipi antibiotico-resistenti di *Salmonella*, sia di origine umana che animale.

### **Classificazione e caratteristiche antigeniche**

La classificazione o nomenclatura del genere *Salmonella* è molto complessa e dai primi isolamenti ad oggi, è stata più volte riformulata. L'attuale classificazione si basa sullo schema di Kauffmann-White e di Le Minor ed è soggetta ad aggiornamenti annuali

curati dal *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* con cui collaborano vari Laboratori di Riferimento Internazionali (Graziani *et al.*, 2005; Brenner *et al.*, 2000).

La classificazione di Kauffmann-White è basata sui caratteri sierologici che differenziano *Salmonella* in circa 2500 sierotipi (serovars) in base alla presenza di antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcoli, antigeni flagellari (H) termolabili e antigene capsulare (Vi), strettamente correlato all'antigene somatico, ma termolabile (Graziani *et al.*, 2005).

Gli antigeni somatici O sono presenti sulla membrana esterna della cellula batterica, associati a molecole di lipopolisaccaride (LPS). Attualmente si conoscono 65 diversi antigeni O, identificati con numeri arabi, e le salmonelle che presentano analogie nella struttura di questo antigene vengono per convenzione riunite in sierogruppi (A, B, C) (Zavanella, 2001).

Gli antigeni H (flagellari o ciliari) sono presenti nelle specie mobili di *Salmonella* (sono eccezioni *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* che non sono mobili) e vengono indicati con lettere minuscole dell'alfabeto o con numeri. Oggi se ne conoscono circa 35, sono di natura proteica, vengono distrutti dal calore e possono presentarsi in due fasi, chiamate

fase 1 e fase 2.

L'antigene Vi (da virulenza) è presente solo in alcuni stipti, che risultano essere più virulenti (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*). Esso ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, inibendo l'agglutinazione con i sieri somatici, per cui è necessario, in questi casi, riscaldare a 100 °C per 1 ora la sospensione batterica per renderla nuovamente agglutinabile. L'antigene Vi delle salmonelle corrisponde agli antigeni K (capsulari) degli altri enterobatteri (Zavanella, 2001).

La classificazione di Le Minor distingue il genere *Salmonella*, in base a prove biochimiche, in due specie: *S. enterica* e *S. bongori*; la specie *enterica* è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: *enterica* (subsp.I), *salamae* (subsp.II), *arizonae* (subsp.IIIa), *diarizonae* (subsp.IIIb), *houtenae* (subsp.IV), *indica* (subsp.VI), come indicato in tabella 1.1 (Brenner *et al.*, 2000; Graziani *et al.*, 2005).

**Tabella 1.1.** Classificazione secondo Le Minor

<b>Specie</b>	<b>Sottospecie</b>	<b>Numero sottospecie</b>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	I
	<i>salamae</i>	II
	<i>arizonae</i>	IIIa
	<i>diarizonae</i>	IIIb
	<i>houtenae</i>	IV
	<i>indica</i>	VI
<i>Salmonella bongori</i>		V

Alla sola sottospecie *enterica* appartengono più di 1400 sierotipi, accomunati dalla caratteristica di infettare animali a sangue caldo, come l'uomo e gli altri mammiferi.

Il grado di adattamento all'ospite di questi sierotipi è molto vario; possono essere strettamente adattati ad un particolare ospite (*host restricted*), essere ubiquitari e ritrovarsi in ospiti diversi (*unrestricted*) oppure, pur essendo associati prevalentemente ad una specie ospite, possono essere in grado di causare malattia anche in altre specie (*host adapted*) (Uzzau *et al.*, 2000).

In genere i sierotipi *host restricted* provocano un'infezione sistemica; ne sono esempio i serovars Typhi, Gallinarum e Abortusovis, associati quasi esclusivamente ad infezioni sistemiche rispettivamente nell'uomo (Edsall *et al.*, 1960), nel pollame (Barrow *et al.*, 1994) e negli ovini (Pardon *et al.*, 1990).

Sierotipi *host adapted*, come Dublin, Choleraesuis e Hadar, sono associati ad infezioni sistemiche rispettivamente in bovini, suini e volatili, ma possono provocare malattia anche in altri mammiferi, incluso l'uomo (Nnalue, 1991; Smith and Jones, 1967; Wray and Sojka, 1977). Infine, esempi comuni di sierotipi *unrestricted* sono Typhimurium ed Enteritidis, responsabili del maggior numero di infezioni ed epidemie in un ampio spettro di ospiti (Graziani *et al.*, 2005).

## **Epidemiologia e trasmissione all'uomo**

Il ciclo biologico di *Salmonella* si presenta di notevole complessità in quanto coinvolge animali serbatoio, alimenti vettore e ambiente (figura 1.1).

La molteplicità dei sierotipi e le caratteristiche peculiari possedute da alcuni di essi, ma soprattutto la grande varietà delle sorgenti di infezione e delle vie di diffusione, rendono notevolmente complesso il quadro epidemiologico delle infezioni da *Salmonella* (Rondanelli *et al.*, 2007).

Dal punto di vista epidemiologico, gli animali da reddito fungono da principali serbatoi di mantenimento e costituiscono la sorgente primaria di infezione. La presenza di *Salmonella* viene riscontrata abitualmente nei bovini (*S. Dublin* e *S. Typhimurium*), nelle specie aviarie (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Blockley*), nei suini (*S. Typhimurium* e *S. Derby*), negli equini (*S. Typhimurium*) e negli ovicaprini (*S. Dublin* e *S. Typhimurium*).

La trasmissione di *Salmonella* all'uomo avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati, anche se possono verificarsi casi di trasmissione interumana o per contatto diretto con gli animali (Tauxe and Pavia, 1998);

gli uomini possono essere infatti portatori sani, e avere un'importanza epidemiologica notevole qualora siano adibiti alla ristorazione collettiva (Rondanelli *et al.*, 2005).

L'ubiquitarietà e la capacità di crescita di *Salmonella* a temperature comprese fra 7°C e 46°C fa sì che qualsiasi alimento manipolato o conservato in modo non corretto possa essere fonte di infezione. Molti episodi di tossinfezione alimentare sono infatti causati dall'ingestione di alimenti per i quali la gestione della catena del freddo tra preparazione/trasformazione e consumo non è corretta, rendendo possibile nel tempo intercorso la moltiplicazione dei batteri presenti; il conseguente aumento della dose infettante può determinare l'aumento del rischio da parte del consumatore di contrarre una tossinfezione alimentare.

Anche il ruolo degli operatori del settore alimentare può essere rilevante, in quanto una non corretta manipolazione di materie prime contaminate (carni, uova) è causa di ricontaminazione e cross-contaminazione di alimenti pronti al consumo (Rondanelli *et al.*, 2005).

Le uova e i prodotti derivati rappresentano i principali veicoli di *Salmonella*, soprattutto *S. Enteritidis*. La contaminazione dell'uovo può avvenire nell'ovaio per trasmissione verticale, nella cloaca e al momento della deposizione, principalmente a causa della

contaminazione fecale dei nastri di trasporto delle uova.

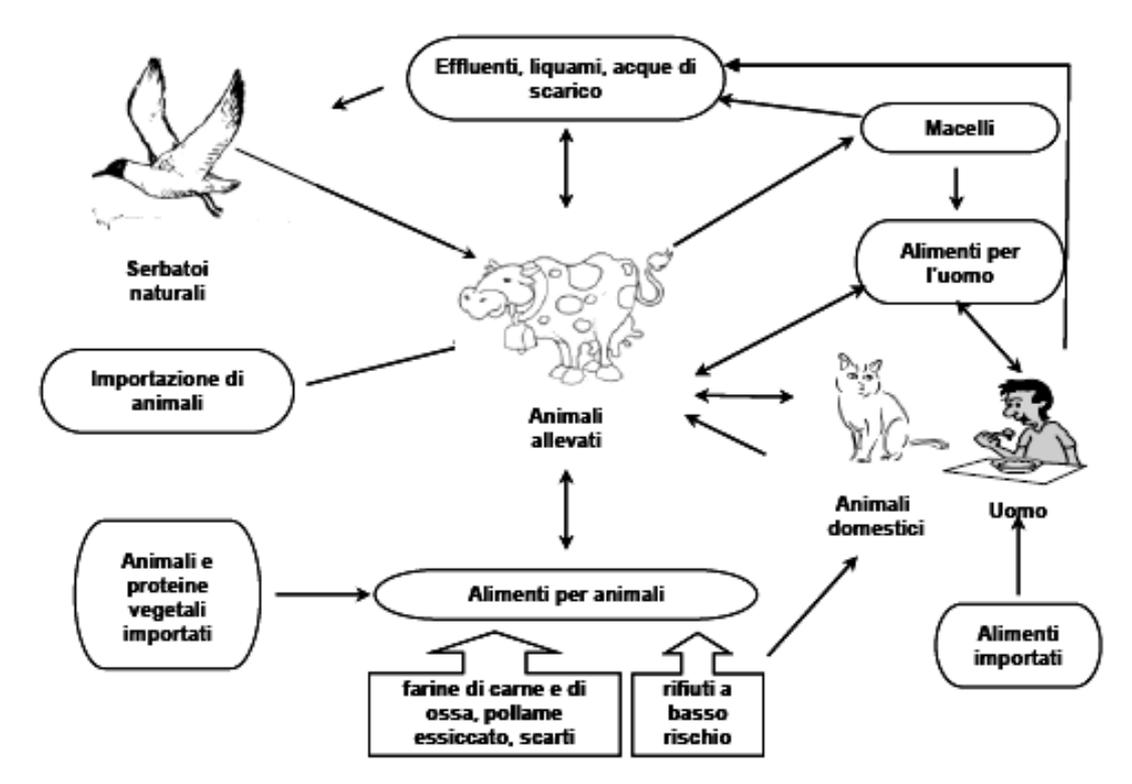
La maggior parte dei casi di tossinfezione alimentare da *S. Enteritidis* sono correlati al consumo di uova o ovoprodotti, quali maionese e dolci preparati con uova crude, in cui la moltiplicazione dei microrganismi presenti avviene in seguito all'inadeguato rispetto della catena del freddo.

Sebbene gli animali e gli alimenti di origine animale costituiscano i principali ospiti di *Salmonella*, l'ambiente rappresenta un ottimo serbatoio per molti sierotipi, anche per quelli non riscontrati abitualmente negli animali da allevamento e nell'uomo.

*Salmonella* è molto comune nelle acque reflue, attraverso le quali può diffondersi in ambienti acquatici come torrenti, fiumi, laghi e rappresentare una fonte di contaminazione del suolo e di conseguenza anche dei vegetali (Lemarchand and Lebaron, 2002). L'utilizzo delle acque reflue per irrigazione rappresenta una fonte diretta di contaminazione (Melloul *et al.*, 2001).

Anche gli animali al pascolo inducono una contaminazione diretta del suolo che, attraverso dilavamento della pioggia può trasportare la contaminazione fino ai bacini idrici (Lemarchand and Lebaron, 2002).

Figura 1.1. Principali vie di trasmissione di *Salmonella*

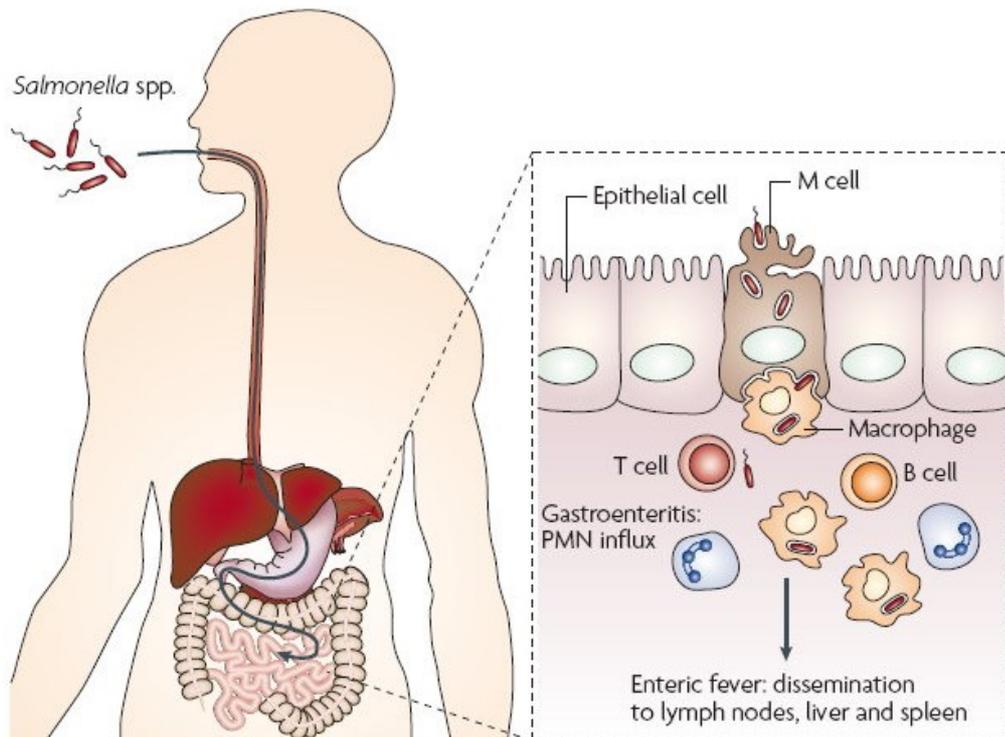


### Manifestazioni cliniche nell'uomo: gastroenteriti, infezioni extra-intestinali e febbre tifoide

*Salmonella* rappresenta uno dei più comuni agenti eziologici di enteriti a trasmissione oro-fecale. Subito dopo l'ingestione i batteri raggiungono il lume intestinale, si replicano, aderiscono agli enterociti e invadono la mucosa intestinale (figura 1.2) (Darwin and Miller, 1999; Wallis and Galyov, 2000). Successivamente penetrano nelle cellule e vengono inglobati nei fagosomi, si localizzano sulla lamina propria e qui si

replicano rapidamente provocando un processo infiammatorio caratterizzato da congestione, edema, afflusso di polimorfonucleati e monocito-macrofagi. In questa prima fase la liberazione di lipopolisaccaride batterico provoca febbre, nausea, vomito e dolori addominali. Dopo circa 10-20 ore insorge la diarrea determinata sia dalla degenerazione e dal distacco degli enterociti che dalla loro sofferenza funzionale (Santos *et al.*, 2001).

**Figura 1.2.** Penetrazione di *Salmonella* nell'organismo umano



La sintomatologia regredisce in 2-4 giorni e nella gran parte dei casi la guarigione è completa, ma il soggetto può rimanere portatore e continuare ad eliminare batteri attraverso le feci (Graziani *et al.*,2005).

Le forme sistemiche, che possono presentarsi come batteriemie, setticemie e infezioni localizzate, si sviluppano soprattutto nei bambini e in pazienti immunodepressi come conseguenza di gastroenteriti acute. A tali patologie sembrano essere associati in particolare alcuni sierotipi, come Choleraesuis e Dublin e in misura minore Enteritidis e Typhimurium (Santos *et al.*, 2001; Darwin and Miller, 1999; Wallis and Galyov, 2000).

Il passaggio da una semplice enterite ad una forma sistemica è dovuto alla resistenza della *Salmonella* al *killing* fagocitario all'interno dei granulociti e dei monocito-macrofagi. I batteri trasportati dai fagociti possono passare ai linfonodi mesenterici e quindi in circolo inducendo batteriemie sintomatiche o manifestazioni settiche. La manifestazione di una forma sistemica dipende sia da fattori intrinseci del microrganismo che dalle capacità difensive dell'ospite (Darwin and Miller, 1999).

La febbre tifoide è un'infezione sistemica caratterizzata da sintomi gravi e spesso con serie conseguenze che, se non trattata in modo adeguato, porta alla morte nel 10% dei casi. Questa patologia è causata nella maggior parte dei casi dal sierotipo Typhi e in

percentuale minore dal sierotipo Paratyphi A, entrambi ristretti all'uomo (Bager and Helmuth, 2001; Bahn *et al.*, 2005).

### **Manifestazioni cliniche negli animali**

Le infezioni da *Salmonella* possono interessare sia gli animali a sangue caldo che a sangue freddo; sono spesso asintomatiche, ma talvolta possono indurre malattia, principalmente a carico dell'apparato digerente. Alcuni sierotipi possono dare forme sistemiche come setticemia, aborto, o localizzarsi in vari organi. Come per l'uomo, la via principale di trasmissione è quella oro-fecale e le fonti più frequenti di contaminazione sono gli alimenti, le acque, l'ambiente. Per alcuni sierotipi, in particolare *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, risulta notevolmente importante la trasmissione verticale che comporta, soprattutto nelle specie avicole, il passaggio dell'infezione dai riproduttori alla progenie. I soggetti asintomatici svolgono un ruolo importante nel mantenere l'infezione in allevamento. La diffusione di *Salmonella* è inoltre agevolata da fattori come le condizioni igieniche, il sovraffollamento, condizioni di stress, il parto e le infezioni virali concomitanti. In genere, gli animali giovani sono più sensibili degli adulti (Graziani *et al.*, 2005).

I sierotipi e le manifestazioni cliniche associate all'infezione variano al variare della specie animale.

I bovini sono spesso colonizzati da *S. Dublin* e *S. Typhimurium*, con infezioni di diversa durata e diverso tipo di manifestazione clinica. *S. Dublin* può persistere nell'ospite molto a lungo, in alcuni casi anche tutta la vita e spesso induce forme gravi di malattia.

L'infezione da *S. Typhimurium* ha una durata generalmente inferiore ed è abitualmente associata ad enterite cronica (Brackelsberg *et al.*, 1997; Allerberger *et al.*, 2002). Nelle specie aviarie sono presenti sierotipi specie-specifici (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), sierotipi ospite-adattati (*S. Enteritidis*) e sierotipi ubiquitari (*S. Typhimurium*, *S. Blockley*). Nei suini è frequente l'infezione da *S. Typhimurium* e *S. Derby*, che ha in genere decorso asintomatico (Wilcock and Schwartz, 1992).

Un ruolo di minore importanza nella diffusione di *Salmonella* è rivestito dagli animali da compagnia. Particolarmente frequente la colonizzazione nelle tartarughe e altri rettili, spesso con sierotipi rari (Reporter, 2003). Anche le specie selvatiche possono fungere da serbatoio, ma le informazioni relative sono piuttosto scarse.

## **Patogenesi e meccanismo di infezione**

La patogenesi delle infezioni da *Salmonella* è un fenomeno complesso e multifattoriale.

Durante le varie fasi dell'infezione intervengono diversi fattori di virulenza (Wallis and Galyov, 2000): il superamento della barriera gastrica avviene grazie a sistemi di difesa che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido (Slauch *et al.*, 1997); l'adesione alle cellule del lume intestinale è mediata da fimbrie di tipo 1 e 3 (Baumler *et al.*, 1997); l'attraversamento dell'epitelio intestinale e la sopravvivenza all'interno dei macrofagi sono determinati da enzimi quali PhoP e PhoQ (Gunn *et al.*, 2000).

La virulenza è dovuta inoltre alla capacità di elaborare una tossina termolabile di natura proteica, un fattore proteico, anch'esso termolabile, prodotto dalla membrana batterica, capace di alterare la morfologia delle cellule epiteliali della mucosa intestinale e un lipopolisaccaride (LPS) costituente la membrana batterica, dotato di proprietà endotossica e di resistenza alla lisi (Zavanella, 2001).

L'azione patogena di *Salmonella* è correlata al suo corredo genetico. Infatti, solo i ceppi che possiedono determinati geni sono in grado di indurre malattia, mentre altri che ne sono privi non sembrano essere patogeni.

Le differenze di patogenicità fra i vari sierotipi sono dovute all'acquisizione orizzontale di specifici loci genici durante il processo evolutivo. L'acquisizione del materiale genetico è avvenuta mediante l'introduzione di sequenze geniche da parte di plasmidi coniugativi e batteriofagi temperati ed ha compreso geni che codificano per fattori di virulenza in grado di migliorare la *fitness* delle salmonelle patogene all'interno dei tessuti dell'ospite o incrementarne la trasmissibilità e la sopravvivenza (Zavanella, 2001).

Finora si conoscono sette principali regioni genomiche, note come *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI), verosimilmente acquisite tramite trasferimento orizzontale (Groisman *et al.*, 1999). Fra queste, SPI-1 e SPI-2 sono quelle maggiormente caratterizzate; entrambe codificano per sistemi di secrezione di tipo III (TTSS) capaci di trasportare nel citoplasma della cellula infetta numerosi fattori di virulenza, sia durante la fase enterica che durante la fase sistemica dell'infezione (Lucas *et al.*, 2000; Ehrbar *et al.*, 2003; Collazo and Galan, 1997).

SPI1 è essenziale per l'invasione della mucosa intestinale, mentre SPI2 influenza la virulenza sistemica, favorendo la crescita intracellulare e la sopravvivenza di *Salmonella* all'interno dei macrofagi (Hueck, 1998). Questi geni risultano essere molto

conservati nel genoma del genere *Salmonella* (Wallis and Galyov, 2000).

Oltre ai geni cromosomali descritti, a livello plasmidico è stata osservata una regione altamente conservata di 8 kb chiamata *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) associata ad una elevata gravità della malattia. I geni *spv* sembrano promuovere la fase macrofagica della malattia, evitando la distruzione del batterio da parte dei neutrofili e facilitando la proliferazione dei ceppi di *Salmonella* extraintestinali presenti nei vari siti di infezione (Graziani *et al.*, 2005).

### **Antibiotico-resistenza**

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è molto diffuso nel genere *Salmonella*, sia in isolati umani che in ceppi di origine animale (Rabsch *et al.*, 2001).

La resistenza agli antibiotici è una conseguenza della pressione selettiva esercitata sulle popolazioni microbiche dall'uso di questi farmaci; nel caso specifico di *Salmonella* l'acquisizione di resistenze è dovuta all'uso di antibiotici non solo in medicina umana, ma anche in medicina veterinaria e in zootecnia. Infatti in zootecnia l'uso di trattamenti di massa per la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche negli allevamenti

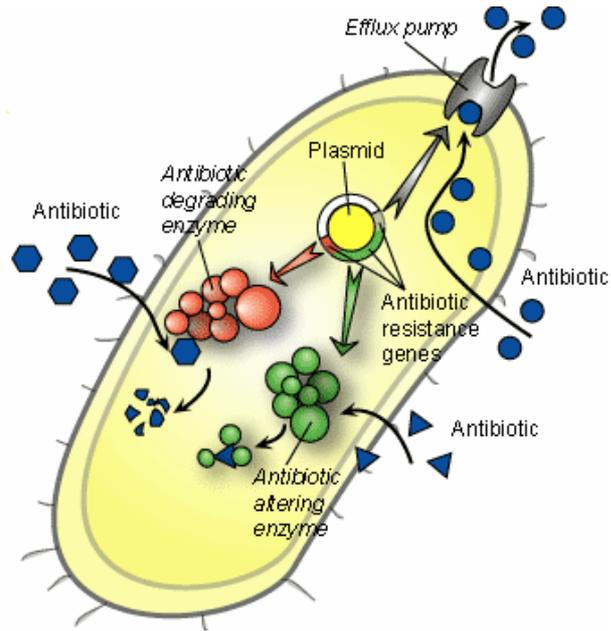
intensivi, dove risulta difficile individuare il singolo animale, rendono difficile il controllo accurato della posologia. Inoltre, l'aggiunta di antibiotici ai mangimi in concentrazioni subterapeutiche, come promotori di crescita (auxinici), favorisce la selezione di ceppi resistenti sia verso le molecole impiegate sia verso quelle strutturalmente e farmacologicamente correlate (resistenza crociata) (Graziani *et al.*, 2005).

La resistenza batterica agli antibiotici può essere dovuta a diversi meccanismi (figura

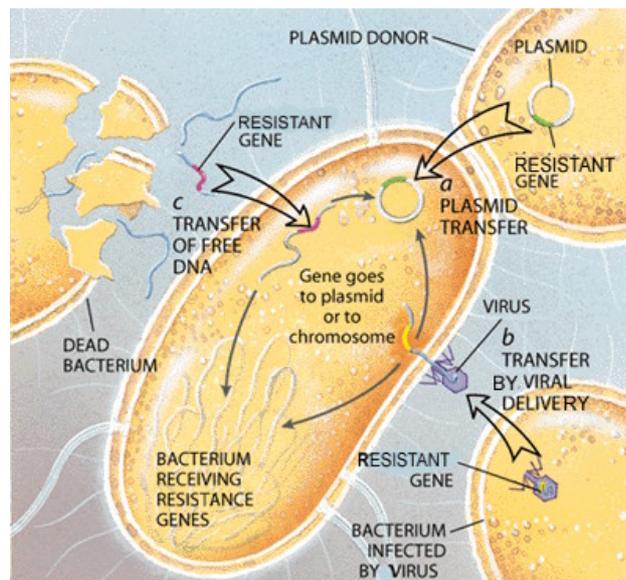
1.3 A):

- alterazioni nel sito bersaglio dell'antibiotico all'interno della cellula batterica;
- degradazione o inattivazione enzimatica dell'antibiotico (idrolisi da parte di beta-lattamasi);
- cambiamenti nella permeabilità della parete cellulare batterica (mutazioni nelle porine) che impediscono l'ingresso dell'antibiotico;
- aumento di espressione di pompe di efflusso nella parete cellulare, che impediscono l'accumulo di antibiotico all'interno della cellula (Normark and Normark, 2002).

**Figura 1.3 A:** Meccanismi di resistenza batterica agli antibiotici.



**Figura 1.3 B:** Acquisizione di resistenza da parte dei batteri mediante trasferimento orizzontale di elementi mobili di DNA



La resistenza può essere intrinseca, nel caso in cui sia determinata da caratteristiche innate del microrganismo (membrana esterna nei Gram-negativi, pompe di efflusso), oppure può essere acquisita dai batteri mediante trasferimento genetico orizzontale (coniugazione, trasformazione, traduzione) da parte di plasmidi, trasposoni e integroni (figura 1.3 B), o mediante mutazioni, selezionate dall'uso di antibiotici e trasferibili solo verticalmente.

Una volta che si verifica l'acquisizione di una resistenza, questo evento viene selezionato e propagato nella popolazione batterica.

In *Salmonella*, l'elevata diffusione di resistenza è dovuta principalmente al trasferimento orizzontale di cassette geniche di resistenza attraverso elementi mobili di DNA, quali plasmidi, trasposoni e integroni (Barnaud *et al.*, 1998; Carattoli, 2003).

L'associazione tra cassetta genica e integrone è stata fondamentale nel determinare la comparsa e la diffusione di resistenze contemporanee a più antibiotici di diversa famiglia (multiresistenza).

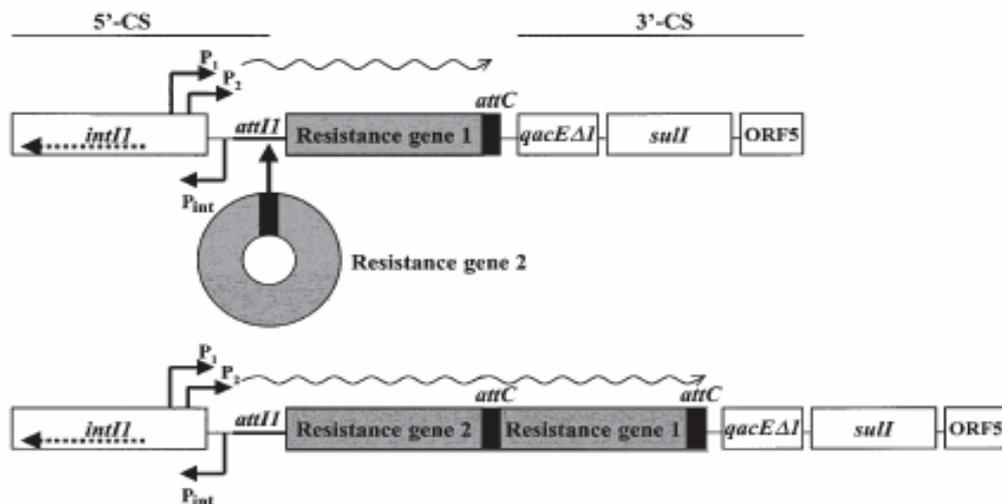
## Plasmidi e integroni

I batteri Gram-negativi che mostrano fenotipo di resistenza multiplo, spesso presentano plasmidi che veicolano geni di resistenza a diversi antibiotici sulla stessa molecola. I plasmidi possono essere trasferiti tra batteri di specie e generi diversi, promuovendo la diffusione della multiresistenza. L'acquisizione di tali geni da parte dei plasmidi avviene grazie agli integroni, elementi genetici mobili che promuovono la cattura dei geni e la loro mobilizzazione verticale tra plasmidi stessi o tra plasmidi e cromosoma batterico e viceversa. Gli integroni continuano ad evolversi mediante l'acquisizione di nuove combinazioni di geni.

Delle cinque classi di integroni descritte, la classe I sembra essere quella più diffusa nel genere *Salmonella* ed è caratterizzata dalla presenza di due segmenti conservati (CS) alle estremità 5' e 3'. Il 5'CS contiene il gene *IntI* codificante l'integrasi, il sito di inserzione *attI* ed uno o più promotori; il segmento 3'CS contiene invece i geni *sulI* e *qacE*  $\Delta I$ , codificanti rispettivamente la resistenza alla sulfonamide ed ai composti dell'ammonio quaternario. Nel sito *att* possono essere inserite una o più cassette geniche, con determinanti per la resistenza a vari antibiotici, o con *open reading frame*

(ORF) a funzione sconosciuta (figura 1.4) (Carattoli, 2001).

**Figura 1.4.** Integrone di classe I



Sono già state descritte almeno 60 differenti cassette codificanti resistenze verso aminoglicosidi,  $\beta$ -lattamici, cloramfenicolo e trimetoprim. Tali cassette possono esistere in forma libera come molecole circolari e sono trascritte solo quando vengono catturate ed inserite all'interno dell'integrone nel sito *attI* (figura 1.4) (Martinez-Freijo *et al.*, 1999). I batteri che possiedono integroni trovano un vantaggio selettivo in ambienti in cui si fa largo uso di antibiotici. Infatti, la presenza di integroni spesso è riscontrata in ceppi isolati da pazienti con infezioni ospedaliere, ma è degna di nota la capacità degli

integroni di mantenersi in ambienti dove la presenza di antibiotici è scarsa o nulla, così come la persistenza al loro interno di cassette codificanti resistenze per antibiotici ormai in disuso, quale la streptomina (Maguire *et al.*, 2001). E' stato inoltre riscontrato che batteri portatori di integroni sono spesso fenotipicamente resistenti ad antibiotici i cui determinanti genici non sono contenuti in cassette veicolate dagli integroni stessi (White *et al.*, 2001).

Esistono chiare prove che i batteri resistenti e i determinanti di resistenza agli antibiotici vengano trasferiti all'uomo dagli animali e dagli alimenti di origine animale. Dal momento che gli antibiotici sono importanti per la salute umana e vengono al tempo stesso usati in campo veterinario, l'emergenza di resistenze in batteri isolati da animali e la loro trasmissione agli uomini ha importanti implicazioni per la salute pubblica.

### ***Salmonella genomic island 1 (SGI1)***

In alcuni sierotipi di *Salmonella*, i geni di resistenza sono raggruppati in una regione cromosomica chiamata *Salmonella genomic island 1* (SGI1), identificata per la prima volta in un ceppo epidemico multiresistente di *S. Typhimurium* DT104 (Doublet *et al.*,

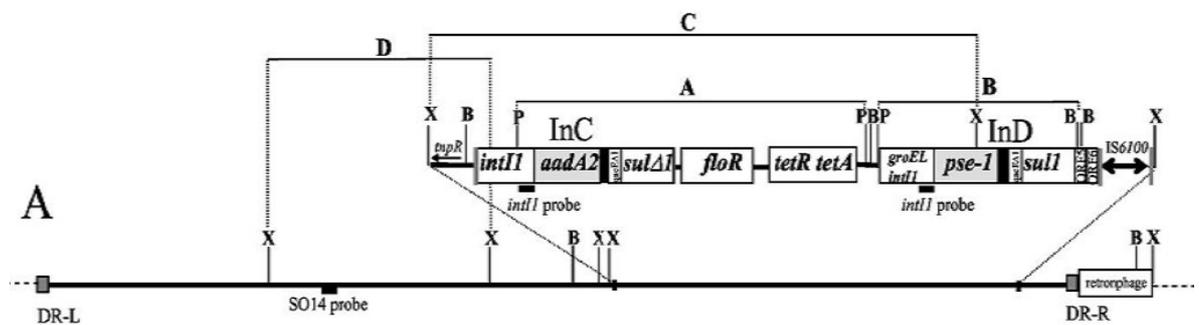
2005).

La SGI1 di *S. Typhimurium* DT104 è un'isola genomica di 43 kb costituita da 44 sequenze codificanti, molte delle quali codificano per ipotetiche proteine. Alle estremità sono presenti due sequenze ripetute di 18 bp, le quali indicano che l'inserzione della SGI1 nel cromosoma di *S. Typhimurium* è avvenuta in seguito ad un evento di ricombinazione sito-specifica (Boyd *et al.*, 2001; Boyd *et al.*, 2000). Geni di resistenza ad ampicillina, cloramfenicolo, streptomina, spectinomina, sulfonamide e tetraciclina sono stati identificati all'interno di una regione di 14 kb della SGI1, contenuti in due integroni di classe 1, InC e InD, codificanti rispettivamente il gene *aadA2* (resistenza agli aminoglicosidi) e il gene per la  $\beta$ -lattamasi *pse-1*. La regione compresa tra i due integroni contiene il gene *floR* (resistenza a cloramfenicolo) e i geni *tetR* e *tetA* (resistenza alla tetraciclina) (Briggs and Fratamico, 1999).

InC e InD hanno una struttura caratteristica rispetto agli altri integroni di classe I (figura 3) (Partridge *et al.*, 2001b; Stokes and Hall, 1989). InC contiene all'estremità 5'CS il gene dell'integrasi *intI1*, seguito dai geni *aadA2*, *qacE1* (resistenza ai disinfettanti) e dal gene non-funzionale *sulI* all'estremità 3'CS. InD contiene all'estremità 5'CS una delezione del gene *intI1* legata al gene *groEL* (Boyd *et al.*, 2001; Briggs and Fratamico,

1999), il gene *pse-1*, i geni *qacE* e *sulI* (resistenza alla sulfonamide) e due *open reading frame* di funzione sconosciuta (ORF5 e ORF6) all'estremità 3'CS, seguite dalla sequenza di inserzione IS6100 (Partridge *et al.*, 2001a).

**Figura 1.5.** *Salmonella* genomic island 1



### Resistenza ai fluorochinoloni

I fluorochinoloni sono i farmaci di prima scelta per il trattamento delle salmonellosi negli adulti (Fey *et al.*, 2000). Sono antibiotici ad ampio spettro che, interferendo con l'azione delle topoisomerasi, inibiscono la sintesi batterica di acidi nucleici. Vengono utilizzati sia in medicina umana che veterinaria (Hopkins *et al.*, 2005).

La resistenza ai chinoloni in *Salmonella* viene in genere acquisita spontaneamente in

seguito all'insorgenza di mutazioni nei geni delle topoisomerasi (DNA girasi e DNA topoisomerasi IV), all'aumentata espressione di pompe di efflusso attivo o alla ridotta espressione di porine nella membrana esterna. In più, la recente scoperta di resistenza mediata da plasmide può determinare il trasferimento orizzontale di resistenza ai fluorochinoloni tra i ceppi batterici (Hopkins *et al.*, 2005).

La DNA girasi e la DNA topoisomerasi IV sono due topoisomerasi di tipo II, le cui subunità polipeptidiche sono codificate rispettivamente dai geni *gyrA* e *gyrB* e dai geni *parC* e *parE* (Stevenson *et al.*, 2007).

Entrambi gli enzimi sono coinvolti nel processo di replicazione del DNA e sono dunque essenziali per le cellule batteriche, mentre la loro assenza nelle cellule umane rende i fluorochinoloni agenti chemioterapici selettivi.

I fluorochinoloni interagiscono con il complesso enzima-DNA inducendo cambi conformazionali che inibiscono l'attività della girasi e della topoisomerasi IV e quindi la sintesi del DNA, portando alla rapida morte delle cellule batteriche.

La resistenza ai fluorochinoloni è causata principalmente da mutazioni puntiformi che risultano come sostituzioni aminoacidiche all'interno delle subunità GyrA, GyrB, ParC o ParE (Hopkins *et al.*, 2005).

La maggior parte delle mutazioni descritte finora sono localizzate in una regione dei geni *gyrA* e *gyrB* chiamata *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR), che nei prodotti genici risulta essere compresa tra gli amminoacidi Ala-67 e Gln-106 di GyrA, e tra Asp-426 e Lys-447 di Gyr B (Heddle and Maxwell, 2002; Yoshida *et al.*, 1991; Friedman and Drlica, 2001; Wain *et al.*, 1997).

Le mutazioni appaiono più frequentemente al codone 83 e 87 di GyrA, dove sono situati i residui coinvolti nell'interazione con i chinoloni, una serina (Ser83) e un acido aspartico (Asp87) (figura 1.6 e 1.7). Una singola mutazione al codone 83 o 87 di GyrA è sufficiente per determinare alti livelli di resistenza all'acido nalidixico, mentre due mutazioni sono necessarie per raggiungere alti livelli di resistenza ai fluorochinoloni (ciprofloxacina) (Ruiz *et al.*, 1997). I cambiamenti amminoacidici da Ser83 a Phe, Tyr, o Ala, oppure da Asp87 a Gly, Asn, Lys o Tyr, sono quelli più frequentemente osservati nei ceppi di *Salmonella* (tabella 1.2) (Cloeckaert and Chaslus-Dancla, 2001).

La DNA topoisomerasi è meno sensibile ai chinoloni della DNA girasi, ed è perciò un bersaglio secondario di questi antibiotici nei batteri Gram-negativi (Khodursky *et al.*, 1995; Peng and Mariani, 1993).

Data l'omologia tra le subunità della DNA girasi e topoisomerasi IV, i codoni 83, 81 e

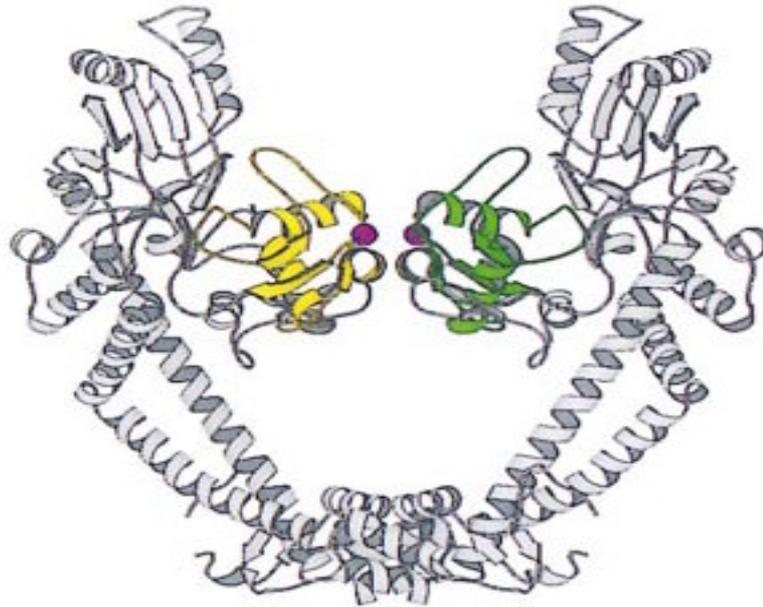
87 nella QRDR di *gyrA* corrispondono ai codoni 78, 80 e 84 in *parC* (Kumagai *et al.*, 1996).

Le mutazioni al codone 80 di *parC* sono quelle riscontrate con maggior frequenza, ma sono state identificate anche mutazioni al di fuori della QRDR, in particolare la sostituzione di Thr con Ser al codone 57 (tabella 1.2) (Ling *et al.*, 2003).

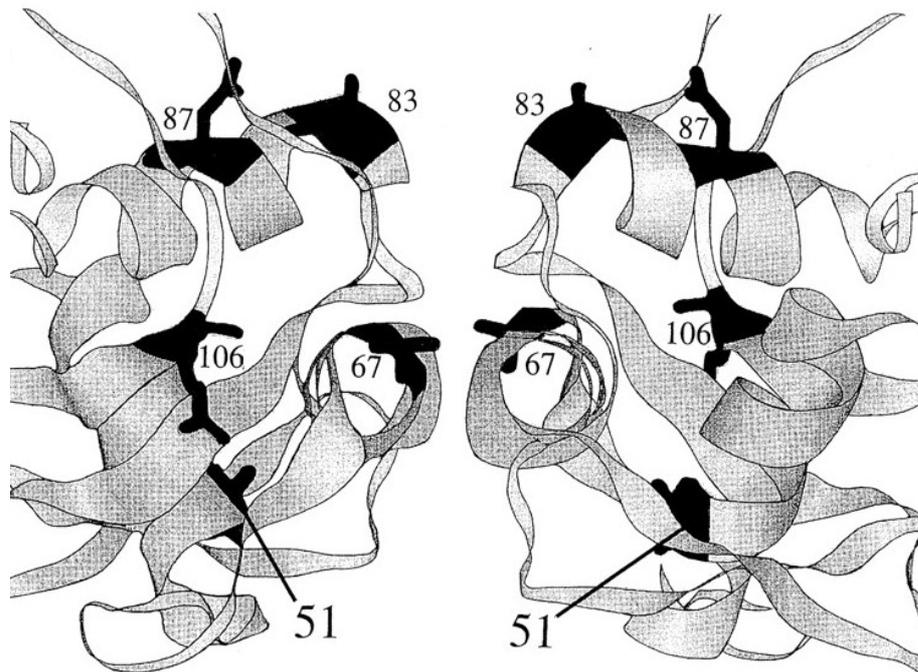
**Tabella 1.2.** Sostituzioni amminoacidiche più frequentemente osservate nelle subunità delle topoisomerasi GyrA e ParC di ceppi di *Salmonella enterica*.

<b>Gene</b>	<b>Codone</b>	<b>Sostituzione amminoacidica</b>
<i>gyrA</i>	Ser83	Tyr
		Phe
		Ala
	Asp87	Asn
		Gly
		Tyr
		Lys
<i>parC</i>	Tyr57	Ser
	Thr66	Ile
	Gly78	Asp
	Ser80	Arg

**Figura 1.6.** Interazione tra le molecole di chinolone e il dimero GyrA.



**Figura 1.7.** Ingrandimento della regione del dimero GyrA coinvolta nell'interazione con i chinoloni; sono evidenziate le posizioni in cui si verificano i cambiamenti aminoacidici che conferiscono resistenza ai chinoloni.



Questo tipo di resistenza non può essere soggetta a trasferimento orizzontale, ma viene selezionata positivamente dall'uso di chinoloni (Cloeckaert and Chaslus-Dancla, 2001).

Il primo caso di trasmissione orizzontale della resistenza ai chinoloni è stato descritto nel 1998 (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Fino ad allora si credeva infatti che la resistenza fosse dovuta esclusivamente a mutazioni nei geni codificanti per gli enzimi bersaglio o a meccanismi incidenti sull'accumulazione di questi antibiotici (Jacoby, 2005). Il locus responsabile di resistenza mediata da plasmide, chiamato *qnrA*, è stato identificato nel plasmide coniugativo di un isolato clinico di *Klebsiella pneumoniae* e codifica per una proteina appartenente alla *pentapeptide repeat family* che ha la funzione di proteggere le topoisomerasi di tipo II come la DNA girasi e la topoisomerasi IV. Più tardi si è scoperto che il gene è situato all'interno di un integrone di classe I insieme ad altre cassette di resistenza (Wang *et al.*, 2003; Tran and Jacoby, 2002). Il gene *qnrA* conferisce ai ceppi che lo possiedono bassi livelli di resistenza all'acido nalidixico e ai fluorochinoloni (ciprofloxacina) e la sua presenza facilita la selezione di mutazioni cromosomali che determinano più alti livelli di resistenza (Martinez-Martinez *et al.*, 1998).

Negli ultimi anni sono stati identificati altri geni plasmidici che codificano per due

proteine appartenenti alla *pentapeptide repeat family*, QnrB e QnrS (Nordmann and Poirel, 2005).

### **Resistenza ai beta-lattamici**

Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, e in particolare le cefalosporine di III<sup>a</sup> generazione, sono farmaci di prima scelta per il trattamento delle salmonellosi nei bambini, nei quali l'uso dei fluorochinoloni è controindicato a causa della loro concentrazione nelle cartilagini delle ossa in accrescimento, dove sono causa di artropatie (Fey *et al.*, 2000). Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici agiscono interferendo con la sintesi della parete batterica.

La resistenza batterica ai  $\beta$ -lattamici può essere attribuita perlomeno a tre diversi meccanismi:

- inaccessibilità al bersaglio dell'antibiotico;
- alterazione del bersaglio dell'antibiotico;
- inattivazione dell'antibiotico da parte di  $\beta$ -lattamasi (Li and Nikaido, 2004;

Livermore, 1995; Poole, 2004).

Tra questi, il meccanismo di resistenza predominante nei batteri Gram-negativi è dato

dalla produzione di  $\beta$ -lattamasi cromosomali o plasmidiche, che disattivano gli antibiotici bersaglio idrolizzando i quattro anelli  $\beta$ -lattamici associati (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995).

Fino ad oggi sono state identificate più di 400  $\beta$ -lattamasi e nuove continuano a comparire rapidamente in tutto il mondo (Jacoby and Munoz-Price, 2005; Miriagou *et al.*, 2004).

Le  $\beta$ -lattamasi vengono classificate in quattro classi molecolari (classi Ambler A-D) e quattro diversi gruppi funzionali (gruppi Bush 1-4) con molteplici sottogruppi (Bush *et al.*, 1995).

La resistenza alle cefalosporine di III<sup>a</sup> generazione può essere mediata dalle  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC (cefalosporinasi), dalle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) di classe A (derivati TEM, SHV e la famiglia CTX-M), oppure dalle ESBL di classe D come OXA (Bradford, 2001).

Sembrerebbe che ogni  $\beta$ -lattamico possa essere potenzialmente idrolizzato da una  $\beta$ -lattamasi esistente, anche se i  $\beta$ -lattamici di nuova generazione sono progettati per essere più stabili all'inattivazione (Li *et al.*, 2007).

Nel genoma di ceppi di *Salmonella* multiresistenti come *S. Typhimurium* DT104,

spesso isolati da alimenti di origine animale, sono stati identificati geni codificanti per  $\beta$ -lattamasi che includono PSE-1 e OXA-30, principalmente attive contro penicilline e cefalosporine di I<sup>a</sup> e II<sup>a</sup> generazione (Antunes *et al.*, 2004; Boyd and Mulvey 2006; Brinas *et al.*, 2005; Gebreyes and Thakur, 2005). Questi geni sono localizzati nelle *Salmonella genomic island* (SGI1) insieme a geni di resistenza ad aminoglicosidi (*aadA2*), cloramfenicolo (*floR*), sulfonamidi (*sulI*) e tetracicline (*tetR* e *tetA*). Tali geni sono associati ad integroni che li rendono facilmente trasferibili tra le specie enteriche (Carattoli *et al.*, 2002). Le SGI1 e loro varianti sono distribuite non solo in *S. Typhimurium* ma anche in altri sierotipi di *S. enterica* (Levings *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2006).

## SCOPO DEL LAVORO

Le infezioni enteriche causate da batteri appartenenti al genere *Salmonella* costituiscono un grave problema economico e sanitario sia nei Paesi Industrializzati che nei Paesi in Via di Sviluppo, dove rappresentano una delle più frequenti cause di mortalità infantile.

Gli effetti sulla salute pubblica sono legati sia alla trasmissione animale-uomo della malattia (zoonosi), sia alle tossinfezioni alimentari associate al consumo di derivati animali.

I patogeni enterici come *Salmonella* sono spesso multiresistenti agli antibiotici e questo crea notevoli problemi per l'attuazione di appropriate misure terapeutiche; per questo motivo l'emergente resistenza ai fluorochinoloni e alle cefalosporine ad ampio spettro, i farmaci di prima scelta per il trattamento delle salmonellosi, è di massima importanza per la salute pubblica.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare ceppi di *Salmonella enterica* isolati da alimenti in due Paesi del Nord Africa, Marocco e Libia, sia per analizzare le relazioni genetiche tra i vari isolati e determinare quali siano i sierotipi di *Salmonella*

più diffusi, sia per monitorare la circolazione delle resistenze antibiotiche, con particolare attenzione ai fluorochinoloni e alle cefalosporine ad ampio spettro.

A questo fine sono state utilizzate tecniche di caratterizzazione fenotipica, come la sierotipizzazione e il test di sensibilità agli antibiotici, insieme a tecniche di caratterizzazione genotipica, come la *polymerase chain reaction* (PCR) e la *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE).

La sierotipizzazione ha consentito di individuare i principali sierotipi di *Salmonella* presenti negli alimenti esaminati, mentre la PFGE ha consentito di analizzare la variabilità genomica esistente tra i diversi sierotipi e all'interno di ognuno di essi, in modo da poter effettuare un'indagine epidemiologica.

La PCR ha consentito di esaminare a livello molecolare i meccanismi di antibiotico resistenza e gli elementi genetici responsabili dell'acquisizione e della trasmissione di geni di antibiotico resistenza, per poter individuare i determinanti genetici più frequenti nei ceppi oggetto di studio.

Le informazioni raccolte potranno essere utili ai fini del monitoraggio e della prevenzione della disseminazione dell'antibiotico resistenza.

## **MATERIALI E METODI**

### **Raccolta dei ceppi**

I ceppi di *Salmonella enterica* oggetto di questo studio sono stati isolati in varie città del Marocco da campioni di cibo raccolti tra marzo 2002 e dicembre 2005, e a Benghazi in Libia nel 2003, da carne di pollo.

La ricerca di *Salmonella* nei campioni di cibo è stata effettuata seguendo il metodo operativo standard (ISO 1993), che prevede quattro fasi:

1. pre-arricchimento
2. arricchimento
3. isolamento
4. identificazione e conferma.

Nella prima fase, 25 g di ogni campione sono stati inoculati in 225 ml di brodo di pre-arricchimento non selettivo (acqua peptonata tamponata) con successiva omogeneizzazione e incubazione a 37°C per 16-20 ore.

Nella seconda fase, è stata effettuata la semina contemporanea di 1 ml di pre-

arricchimento in 10 ml di brodo di arricchimento *Selenite-Cystine medium* ( SC ) con incubazione a 37°C per 7 ore, e di 0.1 ml di pre-arricchimento in 10 ml di *Rappaport Vassiliadis medium* (RV) con incubazione a 42°C per 7 ore.

Le brodocolture ottenute sono state seminate su terreni agarizzati selettivo/differenziali (XLD Agar + EKM) e incubate a 37°C per 24 ore.

Le colonie lattosio-negative sono state sottoposte al test biochimico API 20E (Sanofi Diagnostics Pasteur) per l'identificazione di *Salmonella*. Il sierotipo è stato identificato mediante test di agglutinazione con specifici antisieri (Popoff and Le Minor, 1997). La formula antigenica è stata determinata in accordo con lo schema di Kauffman-White (Kauffman, 1972).

### **Test di sensibilità agli antibiotici**

Nei ceppi di *Salmonella* isolati è stata testata la sensibilità a diverse classi di antibiotici, sia  $\beta$ -lattamici che non  $\beta$ -lattamici, come indicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) per la determinazione di antibiotico-resistenza negli Enterobatteri (tabella 2.1).

**Tabella 2.1.** Antibiotici testati

	<b>classe</b>	<b>sottoclasse</b>	<b>Nome generico</b>
<b>Beta lattamici</b>	penicilline	aminopenicilline	ampicillina (Amp)
	$\beta$ -lattamici/inibitori $\beta$ -lattamasi		amoxicillina+acido clavulanico(Amc)
	cefemi	cefalosporine di 1 <sup>a</sup> generazione	cefazolina (Cef)
		cefalosporine di 3 <sup>a</sup> generazione	ceftriaxone (Cro)
	monbactamici		aztreonam (Atm)
<b>non Beta lattamici</b>	aminoglicosidi		gentamicina (Gm) kanamicina (K) streptomicina (Str)
			netilmicina (Net)
	chinoloni	chinoloni	acido nalidixico (Na)
		fluorochinoloni	ciprofloxacina (Cip)
	inibitori della via del folato		trimetoprim-sulfametoxazolo (Sxt)
	fenicoli		cloramfenicolo (C)
	tetracicline		tetraciclina (Tet)

L'analisi di suscettibilità è stata effettuata con il metodo Kirby-Bauer (disc diffusion test): le colonie batteriche sono state stemperate in soluzione fisiologica (NaCl 0.85% Medium API) fino a raggiungere la densità di 0.5 Mc Farland ( $1 \times 10^8$  CFU); utilizzando tamponi sterili le sospensioni sono state seminate su piastre di Mueller-Hinton agar (tre-quattro volte roteando la piastra di  $60^\circ$ ) su cui sono stati successivamente depositi i dischetti di antibiotico a concentrazione nota (Bio-Rad). Le piastre sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 16-18 ore prima di effettuare la lettura.

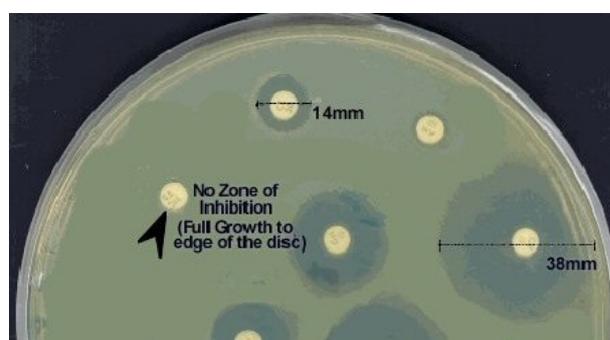
In base al diametro dell'alone di inibizione, confrontato con i diametri di riferimento

CLSI, i ceppi sono stati definiti sensibili (S), intermedi (I) o resistenti (R) agli antibiotici testati (tabella 2.2, figura 2.1).

**Tabella 2.2.** Diametri dell'alone di inibizione (in mm) indicati dal CLSI per gli Enterobatteri

Antibiotico	concentrazione dischetto	Diametro dell'alone di inibizione		
		Resistente	Intermedio	Sensibile
ampicillina	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
amoxicillina+acido clavulanico	20/10 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
cefazolina	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
ceftriaxone	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
aztreonam	30 µg	≤ 15	16-21	≥ 22
gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
kanamicina	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
streptomicina	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
netilmicina	30 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
acido nalidixico	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
trimetoprim-sulfametoxazolo	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
cloramfenicolo	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19

**Figura 2.1** Antibiogramma Kirby-Bauer



### **Analisi del profilo plasmidico**

Il DNA plasmidico è stato estratto da tutti gli isolati di *Salmonella* utilizzando il metodo di lisi alcalina (Kado and Liu, 1981). I campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0.75% a 90V per 3 h, usando come buffer TAE 1X. Come standard di peso molecolare, sono stati impiegati i plasmidi di peso molecolare noto estratti dai ceppi *E. coli* di riferimento V517 e 39R861 (Macrina *et al.*, 1978).

### **Esperimenti di coniugazione**

Allo scopo di definire l'eventuale trasmissibilità della resistenza antibiotica mediante trasferimento plasmidico, sono stati effettuati esperimenti di coniugazione su filtro utilizzando come ricevente un ceppo *Escherichia coli* K12 resistente a kanamicina e privo di plasmidi (Kariuki *et al.*, 2000).

### ***Polymerase chain reaction (PCR)***

Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte con apparecchiatura Hybaid PCR-Express utilizzando preparazioni di DNA cromosomale ottenute secondo il protocollo di Ausubel *et al.* I *primers* utilizzati sono elencati in tabella 3.3.

## **Identificazione di sequenze integrone**

I ceppi di *Salmonella* che presentavano resistenza antibiotica multipla sono stati saggiati per la presenza di integroni mediante PCR con primers specifici per il gene dell'integrasi di classe I *intII*, con le seguenti condizioni di amplificazione: 95°C per 1', 62°C per 1', 72°C per 1', per un totale di 30 cicli (Ploy *et al.*, 2000).

L'analisi della regione variabile dell'integrone di classe I è stata effettuata con la coppia di primers 5'CS e 3'CS, con le seguenti condizioni di amplificazione: 94°C per 30'', 55°C per 30'', 72°C per 3', per un totale di 30 cicli. (Ploy *et al.*, 2000; Carattoli *et al.*, 2002).

## **Amplificazione dei geni *gyrA* e *parC* e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)**

Nei ceppi che presentavano resistenza ad acido nalidixico e ciprofloxacina sono state ricercate mutazioni puntiformi nella *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR) dei geni della DNA girasi e DNA topoisomerasi IV; le regioni geniche d'interesse sono state amplificate attraverso PCR con primers GyrA e ParC (Kariuki *et al.*, 2004).

Le condizioni di amplificazione sono state: 94°C per 30'', 55°C per 30'', and 72°C per 30'', per un totale di 30 cicli.

Per evidenziare mutazioni puntiformi in corrispondenza del codone 83 di GyrA e del codone 80 di ParC, gli ampliconi ottenuti, di 630 bp (GyrA) e 413 bp (ParC), sono stati digeriti con 2.5 U degli enzimi *HinfI* e *HaeII*, rispettivamente (Ozeki *et al.*, 1997). Le bande risultanti dalla digestione sono state evidenziate mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

La presenza di mutazioni è stata confermata mediante completo sequenziamento dei prodotti di amplificazione (BMR-CRIBI, Padova) precedentemente purificati (QIAquick PCR purification Kit).

Per l'analisi delle sequenze ottenute si è fatto ricorso al programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) allo scopo di allinearle a quelle depositate per il ceppo di sierotipo Typhimurium LT2 (numero di accesso NC003197.1), e determinare la natura della sostituzione amminoacidica avvenuta.

### **Ricerca di geni *qnr***

Nei ceppi di *Salmonella* in cui si è riscontrata sia la presenza di plasmidi che la resistenza ad acido nalidixico e ciprofloxacina, è stata eseguita la PCR per l'amplificazione dei geni *qnrA*, *qnrB*, e *qnrS* (Gay *et al.*, 2006).

Le condizioni di amplificazione sono state: 94°C per 45'', 53°C per 45'', e 72°C per 60'', per un totale di 32 cicli.

### **Ricerca di geni codificanti per $\beta$ -lattamasi**

I ceppi di *Salmonella* che mostravano un fenotipo di resistenza ad antibiotici  $\beta$ -lattamici sono stati ulteriormente caratterizzati mediante PCR per l'identificazione dei geni TEM, SHV, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9, che codificano per  $\beta$ -lattamasi a spettro limitato e ad ampio spettro, particolarmente diffuse nei batteri di origine animale (Nagano *et al.*, 2003).

I prodotti di PCR sono stati successivamente sequenziati (BMR-CRIBI, Padova) e analizzati con BLAST.

**Tabella 3.3.** Coppie di primers utilizzate per le reazioni di PCR

<b>primers</b>	<b>sequenza nucleotidica</b>	<b>referenza</b>
<b>intI1</b>	5-ACATGTGATGGCGACGCACGA-3 5-ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA-3	Ploy 2000
<b>CS 5' 3'</b>	5-GGCATCCAAGCAGCAAG-3 5-AAGCAGACTTGACCTGA-3	Carattoli 2002
<b>GyrA</b>	5-ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACACCG-3 5-TTCCATCAGCCCTTCAATGCTGATGTCTTC-3	Kariuki 2004
<b>ParC</b>	5-ATGAGCGATATGGCAGAGCG-3 5-TGACCGAGTTCGCTTAACAG-3	
<b>QnrA</b>	5-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3 5-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3	Gay 2006
<b>QnrB</b>	5-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3 5-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3	
<b>QnrS</b>	5-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3 5-TAAATTGGCACCTGTAGGC-3	
<b>blaTEM</b>	5-CCGTGTCGCCCTTATTCC-3 5-AGGCACCTATCTCAGCGA-3	Nagano 2003
<b>blaSHV</b>	5-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3 5-TTATGGCGTTACCTTTGACC-3	
<b>blaCTX-M1</b>	5-CGGTGCTGAAGAAAAGTG-3 5-TACCCAGCGTCAGATTAC-3	
<b>blaCTX-M2</b>	5-ACGCTACCCCTGCTATTT-3 5-CCTTTCCGCCTTCTGCTC-3	
<b>blaCTX-M9</b>	5-GCAGATAATACGCAGGTG-3 5-CGCCGTGGTGGTGTCTCT-3	

### **Analisi della *Salmonella Genomic Island 1***

Nei ceppi di *S. Typhimurim* che presentavano resistenza ad Amp, Amc, C, Tet, Str, Su e nei quali si era riscontrata la presenza di due integroni di classe I, sono state eseguite una serie di reazioni di PCR per stabilire se i geni di resistenza fossero localizzati nella

SGI1 e dunque caratterizzarla. I primers utilizzati sono riportati in tabella 3.4 (Carattoli 2002). Le condizioni di amplificazione utilizzate sono: 94°C per 30'', 55°C per 30'', 72°C per 3', per un totale di 30 cicli.

**Tabella 3.4.** Coppie di primers utilizzate per l'analisi della Salmonella Genomic Island 1

primers		sequenza nucleotidica	dimensione amplificato
DR-FW		5-GGGCAAAGCGCAGCTATTAG-3	
S004-RV	PCR1	5-CCCGCAGGGTAAGTAATG-3	3245 bp
S011-FW		5-CGCCGGCTCCAAAGGAAATGG-3	
S014-RV	PCR2	5-AATTTCTCATCGTCTAGC-3	3078 bp
S022-FW		5-CGCTGCAAGCACAATGATGA-3	
S024-RV	PCR3	5-GGTACGGTATCGCCTAAGTG-3	3610 bp
S026-FW		5-TCGGGTAATCTCAGCAGAGC-3	
int-RV	PCR4	5-GGGCATGGTGGCTGAAGGACC-3	2225 bp
flo-FW		5-ATGACCACCACACGCCCCG-3	
flo-RV	PCR5	5-CTAGACGACTGGCGACTTC-3	1196 bp
tetR-FW		5-CTGCTGATCGTGGGTCT-3	
tetA-RV	PCR6	5-TTGCGAATGGTCTGCGT-3	1124 bp
aadA2-FW		5-GAGCGCCATCTGGAATCAACG-3	
ORF5-RV	PCR7	5-CCGAACGTTTCGGAGGCTCCT-3	11673 bp
S044-FW		5-ACCAGAGAGAGTTATCGAGC-3	
DR-RV	PCR8	5-CACGAAAAGGAGACGATGAGA-3	2552 bp
strAF		5-AGCAGAGCGCGCCTTCGCTG-3	
strAR		5-CCAAAGCCCACTTCACCGAC-3	684 bp

### ***Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)***

Lo studio delle relazioni genetiche tra i ceppi batterici in esame è stato eseguito mediante analisi di macrorestrizione del DNA genomico con elettroforesi su gel in campo pulsato (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), secondo il protocollo Pulse Net con alcune modificazioni: i batteri vengono risospesi in *Cell Suspension Buffer* (Tris 100mM, EDTA 100mM, pH 8) sino ad ottenere una densità ottica di 0.50-0.55 a 600 nm. Si aggiungono 8U di proteinasi K (Invitrogen); si miscela con agarosio al 2% (*Low Melting Point agarose*, Gibco) in rapporto 1:1 e si dispensa negli stampi (*plug-molds*, Bio-Rad).

Una volta solidificati, i blocchetti di agarosio contenenti il DNA batterico (*plugs*) vengono incubati per 2h a 55°C in *Cell Lysis Buffer* (Tris 50mM, EDTA 50mM, Sarkosyl 1%, 3U Proteinasi K, pH8). Si effettuano successivamente due lavaggi con acqua distillata e tre ulteriori lavaggi con TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8), a 55°C.

Le *plugs* vengono digerite con 24U dell'enzima *XbaI* (Promega) a 37°C per almeno 4 ore. Le bande risultanti dalla macrorestrizione vengono separate su gel di agarosio all'1% (*Pulsed Field Certified Agarose*, Bio-Rad) utilizzando l'apparato CHEF-DR III

(Bio-Rad) con le seguenti condizioni: switch time 2.2-63.8 s, angolo 120°, 6V/cm (200V), per 22 h. Il buffer utilizzato per la corsa è TBE 0.5X con sistema di raffreddamento a 14°C.

*Salmonella* Braenderup H9812 è stata utilizzata come standard universale di riferimento per il peso molecolare delle bande (Hunter *et al.*, 2004).

I pattern di macrorestrizione, o pulsotipi, sono stati paragonati mediante l'uso del software Gel Compar II versione 5.0 (Applied Maths), utilizzando per il raggruppamento il coefficiente di Dice e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), con ottimizzazione pari ad 1% e tolleranza pari a 0.5%.

## RISULTATI

### **Prevalenza di *Salmonella* nei campioni di cibo analizzati**

La presenza di *Salmonella enterica* è stata riscontrata nell'1% dei 10.877 campioni di cibo esaminati in Marocco. In totale sono stati isolati  $n=105$  ceppi appartenenti alla sottospecie I *enterica*, ad eccezione di un unico ceppo appartenente alla sottospecie II *salamae*. La maggior parte dei ceppi sono stati isolati da campioni prelevati nei mattatoi (71%) ed in minor percentuale da molluschi (9%). I sierotipi identificati e la relativa fonte di isolamento sono riportati in tabella 3.1.

Sono stati identificati 16 diversi sierotipi dei quali i più rappresentati erano *S. Infantis* (23.8%), *S. Bredeney* (12.4%), *S. Blokley* (10.5%), *S. Typhimurium* (8.6%) e *S. M'Bandaka* (7.6%); gli altri sierotipi erano presenti in percentuale variabile dal 6.7% all'1% (figura 3.1).

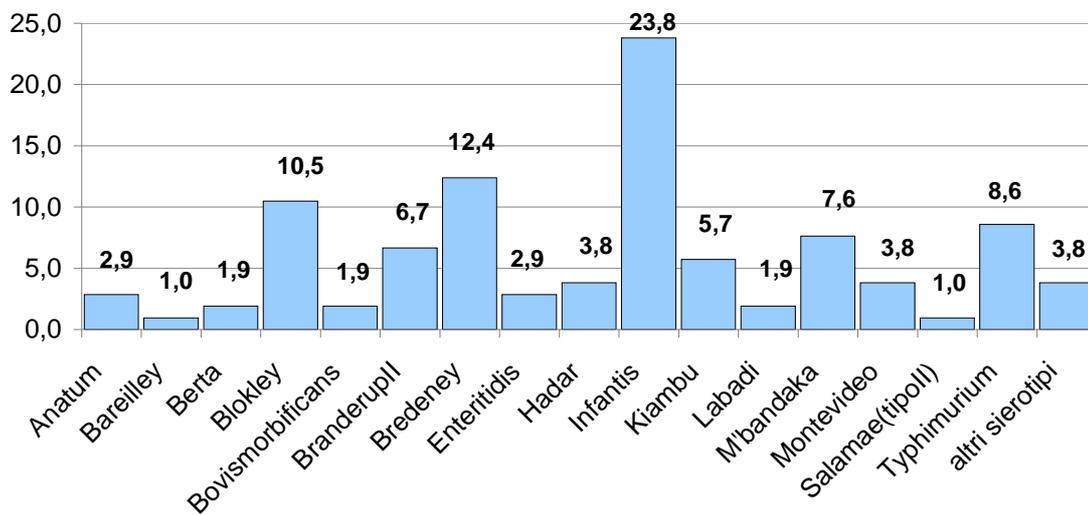
Tutti i sierotipi identificati sono stati isolati prevalentemente da campioni provenienti da mattatoi, ad eccezione di *Blokley* e *Hadar*, isolati anche da molluschi, e dei sierotipi *Bareilley*, *Berta* e *Salamae*, isolati da campioni di carne, mentre il sierotipo *Typhimurium* è stato isolato da varie matrici alimentari.

**Tabella 3.1.** Prevalenza dei sierotipi di *Salmonella enterica* nelle diverse matrici alimentari

Sierotipo	Matrici alimentari														totale
	Bouayeaux	Chnek	Salsiccia bovina	Carne macinata	Molluschi	Pasticcerie	Carne di pollo	Ventrigli di pollo	Carne cruda	Salsicce artigianali	Spezie	Pastifici	Mattatoi	acqua	
Anatum				1									2		3
Bareilley									1						1
Berta				1				1							2
Blokley					5			3		1			2		11
Bovismorbificans													2		2
BraenderupII													7		7
Bredeney												1	12		13
Enteritidis	1												2		3
Hadar					3		1								4
Infantis						1					1		22	1	25
Kiambu													6		6
Labadi					1								1		2
M'Bandaka													8		8
Montevideo													4		4
<i>Salamae</i> (tipoII)							1								1
Typhimurium	1	1	1		1								5		9
altri sierotipi*						2							2		4
<b>totale</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>75</b>	<b>1</b>	<b>105</b>

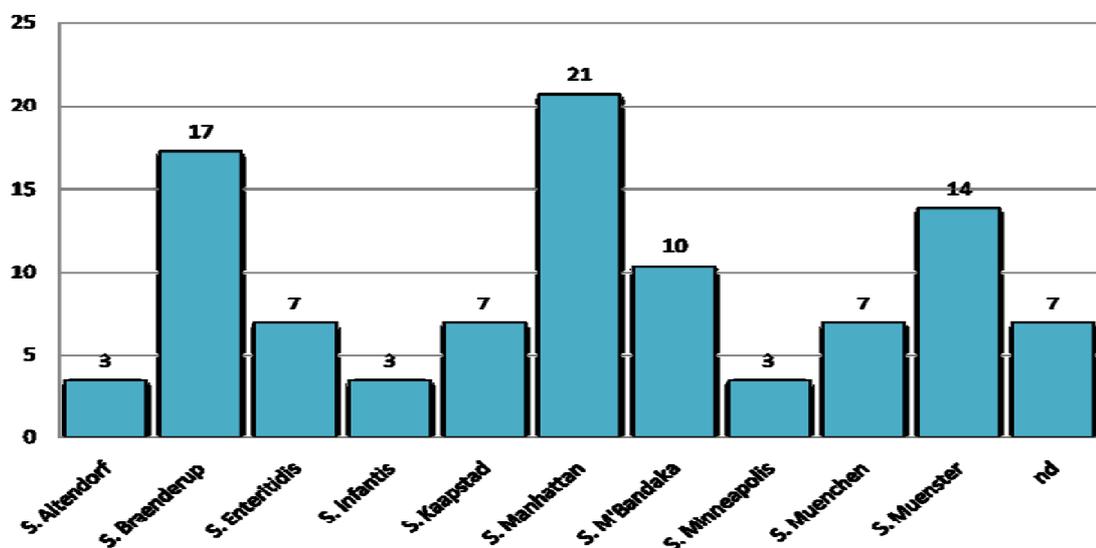
\*Sierotipi di *Salmonella* per i quali non è stata possibile l'attribuzione ad un gruppo

**Figura 3.1.** Percentuale dei sierotipi di *Salmonella enterica* identificati in Marocco



Tutti i ceppi di *Salmonella enterica* isolati in Libia provenivano da pollame. Tra i 29 ceppi isolati, sono stati identificati 10 diversi sierotipi. I più rappresentati erano *S. Manhattan* (21%) e *S. Braenderup* (17%), seguiti da *S. Muenster* (14%) e *M'Bandaka* (10%) e da altri sierotipi presenti in percentuale inferiore e variabile dal 7 al 3% (figura 3.2).

**Figura 3.2** Percentuale dei sierotipi di *Salmonella enterica* identificati in Libia



### Test di sensibilità agli antibiotici

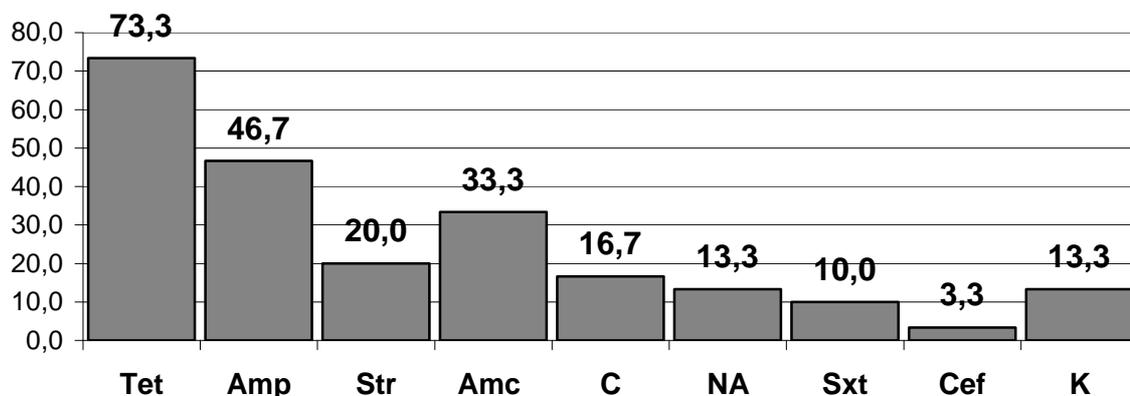
Il 71% dei 105 ceppi di *Salmonella enterica* provenienti dal Marocco è risultato sensibile a tutti i 14 antibiotici testati (tabella 2.1), mentre il 28% era resistente ad almeno un antibiotico.

In generale, i ceppi hanno mostrato di essere resistenti sia ad antibiotici  $\beta$ -lattamici che non  $\beta$ -lattamici, e sono state riscontrate resistenze nei confronti di tutte le classi di antibiotici testate, ad eccezione delle cefalosporine di terza generazione (ceftriaxone e aztreonam) e dei fluorochinoloni (ciprofloxacina).

In particolare tra i ceppi resistenti, il 73.3% era resistente alla tetraciclina e comprendeva i sierotipi Typhimurium ( $n=5$ ), Hadar ( $n=4$ ), Blokley e Infantis ( $n=3$ ), M'Bandaka ( $n=2$ ); il 46.7% era resistente all'ampicillina e comprendeva i sierotipi Typhimurium ( $n=6$ ), Hadar ( $n=2$ ), Infantis, M'Bandaka e Enteritidis ( $n=1$ ); il 33.3% era resistente ad amoxicillina+acido clavulanico e comprendeva i sierotipi Typhimurium ( $n=6$ ) e Hadar ( $n=1$ ). Le resistenze a cloramfenicolo e acido nalidixico erano limitate rispettivamente al sierotipo Typhimurium ( $n=5$ ) e Hadar ( $n=4$ ). Le resistenze a kanamicina, trimetoprim-sulfametoxazolo, streptomina e cefazolina erano presenti in percentuale inferiore e distribuite tra i sierotipi M'Bandaka, Blokley, Hadar, Typhimurium (figura 3.3, tabella 3.2).

I sierotipi Bredeney, Kiambu, Bovismorbificans, Anatum, Berta, Bareilley, Labadi e *S. salamae* non hanno mostrato alcun fenotipo di resistenza (tabella 3.2).

**Figura 3.3.** Resistenze antibiotiche (%) riscontrate nei ceppi di *Salmonella enterica* isolati in Marocco



**Tabella 3.2** Distribuzione delle resistenze agli antibiotici nei diversi sierotipi di *Salmonella* isolati in Marocco

sierotipo	n (%) di resistenti ai diversi antibiotici								
	Amp	Amc	C	Sxt	Str	Tet	Cef	Na	K
Anatum (n=3)									
Bareilley (n=1)									
Berta (n=2)									
Blokley (n=11)				3(27%)		3(27%)			
Bovismorbificans(n=2)									
BraenderupII (n=7)						1(14%)			
Bredeney (n=13)									
Enteritidis (n=3)	1 (33%)					1(33%)			
Hadar (n=4)	2 (50%)	1(25%)			1(25%)	4(100%)	1(25%)	4(100%)	
Infantis (n=25)	1 (4%)					3 (12%)			
Kiambu (n=6)									
Labadi (n=2)									
M'Bandaka (n=8)	1 (12%)					2 (25%)			
Montevideo(n=4)									1(25%)
Salamae (tipoII) (n=1)									
Typhimurium (n=9)	6 (66%)	6 (66%)	5(55%)		5(55%)	5 (55%)			
altri sierotipi*(n=4)	3(100%)	3(100%)				3(100%)			
<b>totale (n=105)</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

Nel 53% dei ceppi resistenti si sono riscontrate resistenze multiple (da 2 a 6 antibiotici), in particolare nel sierotipo Typhimurium (n=6), ma anche nei sierotipi Blokley, Enteritidis, Hadar, Infantis, M'Bandaka.

I pattern di resistenza multipla riscontrati nei vari sierotipi sono riassunti in tabella 3.3.

**Tabella 3.3.** Pattern di resistenza multipla riscontrati nei diversi sierotipi di *Salmonella enterica* isolati in Marocco

pattern di resistenza	Blokley	Enteritidis	Hadar	M'Bandaka	Typhimurium	altri sierotipi*	totale
Amp I, Tet I		1		1			2
Amp I, Amc					1		1
Amp, Amc, C, Tet, Str, Su					5		5
Amp, Amc, Cef, Na, Tet, Str			1				1
Amp, Amc, Tet						3	3
Amp, Na, Tet			1				1
Na, Tet			2				2
Sxt, Tet I	1						1
<b>totale complessivo</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>16</b>

\*Sierotipi di *Salmonella* per i quali non è stata possibile l'attribuzione ad un gruppo

il 17% dei 29 ceppi isolati in Libia, era sensibile a tutti gli antibiotici testati, mentre

l'82% era resistente ad almeno uno dei 14 antibiotici testati.

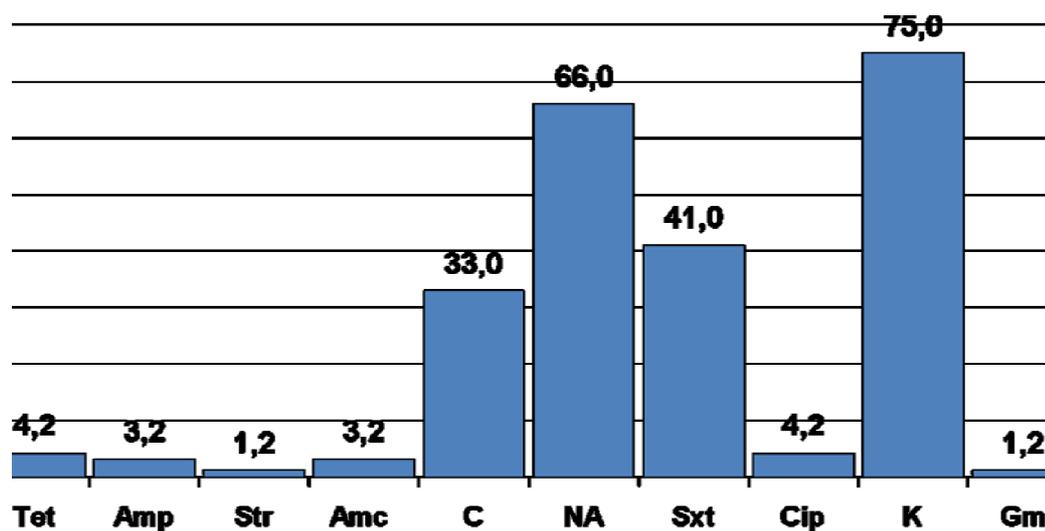
In generale, i ceppi hanno mostrato di essere resistenti sia ad antibiotici  $\beta$ -lattamici che non  $\beta$ -lattamici, e sono state riscontrate resistenze nei confronti di tutte le classi di antibiotici testate, ad eccezione delle cefalosporine.

In particolare tra i ceppi resistenti, il 75% era resistente alla kanamicina e comprendeva i sierotipi Manhattan ( $n=6$ ), Braenderup ( $n=4$ ), M'Bandaka ( $n=3$ ), Kaapstad e Muenster

( $n=2$ ), Altendorf ( $n=1$ ); il 66% era resistente all'acido nalidixico e comprendeva i sierotipi Manhattan ( $n=6$ ), Braenderup ( $n=4$ ), Kaapstad ( $n=2$ ) Altendorf e Minneapolis ( $n=1$ ); il 41% era resistente al trimetoprim-sulfametoxazolo e comprendeva i sierotipi Muenchen e Kaapstad ( $n=2$ ), Braenderup Minneapolis e Altendorf ( $n=1$ ); il 33% era resistente al cloramfenicolo e comprendeva i sierotipi Manhattan ( $n=6$ ), Muenchen, ( $n=2$ ); le altre resistenze sono state riscontrate nei confronti di ciprofloxacina, amoxicillina+acido clavulanico, ampicillina, gentamicina, tetraciclina e streptomicina in percentuale variabile tra il 16% e il 4% (tabella 3.4, figura 3.4).

Nei sierotipi Enteritidis e Infantis non è stato riscontrato alcun fenotipo di resistenza.

**Figura 3.4.** Resistenze antibiotiche (%) riscontrate nei ceppi di *Salmonella enterica* isolati in Libia



Il 79% dei ceppi resistenti ha mostrato resistenze associate a più antibiotici (da 2 a 5). I

diversi pattern di resistenza sono riassunti in tabella 3.4.

**Tabella 3.4.** Pattern di resistenza e profilo plasmidico dei diversi sierotipi di *Salmonella enterica* isolati in Libia

Sierotipo	totale	resistenze antibiotiche	Plasmidi
Muenchen	1	Amp, Amc C, Sxt,	100 MDa; 4.5, 4, 3.5, 3, 2.3 kb
Manhattan	1	Na, C, Cip I, K, St, Tet	5.3, 4.5 kb
Manhattan	5	Na, C, K	5.8, 5.6, 4.5, 4 kb
Enteritidis	2	-	50 kb
Kaapstad	2	Na, Sxt, K I	6.3 kb
Braenderup	1	K I	6.3, 2.1 kb
Braenderup	1	Na, Sxt, Amc I, K I	6.3, 2.1 kb
Braenderup	1	Na, Cip I, Sxt, K I	6.3, 5.8, 2.5, 2.1 kb
Braenderup	1	Na, Sxt, K I	7.2, 4.5, 2.1 kb
Braenderup	1	Na, Sxt	7.2, 4.5, 3, 2.1 kb
Muenchen	1	Amp, C, Sxt	98 MDa; 36kb, 4.5, 4, 3.5, 2.3 kb
Minneapolis	1	Na, Cip I, Gm, Sxt, T I	98 MDa; 2.7 kb
Altendorf	1	Na, Cip I, Sxt, Amc I, K I	98 MDa; 6.3, 6, 4.5, 4, 3.5, 2.3, 2.1 kb
Muenster	2	K I	-
M'Bandaka	2	K I	-
M'Bandaka	1	K I, T I	-
altri sierotipi*	1	Na	-
altri sierotipi*	1	Na, T I	-

\*Sierotipi di *Salmonella* per i quali non è stata possibile l'attribuzione ad un gruppo

### Analisi del profilo plasmidico

La presenza di uno o più plasmidi è stata riscontrata nel 36% ( $n=38$ ) dei 105 ceppi di *Salmonella* isolati in Marocco. Tra questi, il 68% dei ceppi possedeva un unico plasmide, il 23% aveva 2 plasmidi, il 5% 3 plasmidi e infine il 2% aveva 4 plasmidi. La maggior parte dei ceppi possedeva plasmidi ad alto peso molecolare, da 90 kb (47%),

50 kb (18%) o 63 kb (16%). Il 34% dei ceppi possedeva plasmidi a basso peso molecolare, variabile tra 10 e 2.1 kb.

Il 68% ( $n=26$ ) dei ceppi possessori di plasmidi era resistente ad almeno un antibiotico, mentre il restante 32% ( $n=12$ ) era sensibile a tutti gli antibiotici testati. Il 13% ( $n=4$ ) degli isolati resistenti invece non possedeva plasmidi.

La distribuzione di plasmidi all'interno dei diversi sierotipi era variabile, e la loro presenza è stata identificata con maggior frequenza nei serovars Typhimurim (21%), Blokley (18%), Braenderup II (13%), M'Bandaka (10%) e Hadar (4%). La distribuzione nei sierotipi Kiambu, Enteritidis, Anatum, Bredeney e Montevideo variava invece tra il 5% e il 2%. Al contrario in alcuni sierotipi quali Infantis, Bovismorbificans, Berta, Labadi, Bareilley e *S. Salamae* non è stata riscontrata la presenza di plasmidi.

I dati relativi all'analisi del contenuto plasmidico sono riassunti in tabella 3.5.

**Tabella 3.5.** Profilo plasmidico e pattern di resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati in Marocco

Sierotipo	Antibiotico-resistenze	Plasmidi	totale
Anatum	-	50 kb	1
Blokley	-	50 kb	1
		63; 4 kb	1
	Sxt	50; 6.3; 3.5 kb	1
		6.3 kb	1
	Sxt, Tet I	6.3; 3.5 kb	1
	Tet I	63 kb	2
BranderupII	-	90 kb	1
	K I	90 kb	3
	Tet I	90; 50 kb	1
Bredeney	-	50 kb	1
Enteritidis	-	63 kb	1
	Amp I, Tet I	63 kb	1
Hadar	Amp, Amc, Cef, Na, Tet, Str	8; 4; 2.5; 2.1 kb	1
	Amp, Na, Tet	8; 2.5, 2.1 kb	1
	Na, Tet	2.1 kb	1
		63; 1.5 kb	1
Infantis	Amp	-	1
	Tet I	-	3
Kiambu	-	2.1 kb	2
M'Bandaka	-	90; 50 kb	1
	Amp I, Tet I	90 kb	1
	-	90 kb	1
	Tet I	90; 54 kb	1
Montevideo	K I	90 kb	1
altri sierotipi*	Amp, Amc, Tet	10; 2.7 kb	3
Typhimurium	-	90 kb	2
	Amp I, Amc	90 kb	1
	Amp, Amc, C, Tet, Str, Su	90 kb	5

\*Sierotipi di *Salmonella* per i quali non è stata possibile l'attribuzione ad un gruppo

L'analisi del contenuto plasmidico è stata effettuata anche negli isolati di *Salmonella* provenienti dalla Libia. In questo caso, il 65% ( $n=19$ ) dei ceppi possedeva plasmidi in

numero variabile da 1 a 8 per ceppo con varie combinazioni. La combinazione di 4 plasmidi era la prevalente, presente nel 37% dei ceppi; 2, 3, 6 e 8 plasmidi erano presenti in percentuale variabile dal 15% al 5%. Il 21% dei ceppi possedeva un unico plasmide.

La percentuale dei plasmidi a basso peso molecolare, da 7.2 a 2.1 kb (89%), era decisamente superiore a quella dei plasmidi ad alto peso molecolare, da 100 MDa a 36 kb, (31%) (tabella 3.4).

La presenza di plasmidi è stata riscontrata in tutti i sierotipi isolati, ad eccezione di Infantis, M'Bandaka e Muenster.

### **Esperimenti di coniugazione**

Con l'intento di correlare le resistenze antibiotiche e il loro eventuale trasferimento attraverso i plasmidi, gli isolati sono stati sottoposti ad esperimenti di coniugazione batterica.

Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando come donatori gli isolati multiresistenti con plasmidi sia ad alto che a basso peso molecolare, provenienti dal Marocco e dalla Libia, e come ricevente il ceppo di *E. coli* K12 resistente a kanamicina. Nessuno dei

ceppi analizzati ha trasferito le proprie resistenze antibiotiche nei ceppi di *E. coli* riceventi.

### **Identificazione di integroni classe I**

Negli isolati di *Salmonella* provenienti dal Marocco è stata riscontrata la presenza di integroni di classe I in 5 ceppi appartenenti al sierotipo Typhimurium che mostravano lo stesso profilo di resistenza ad Amp, Amc, C, Tet, Str, Su. Ciascun ceppo possedeva due integroni di 1000 e 1200 bp.

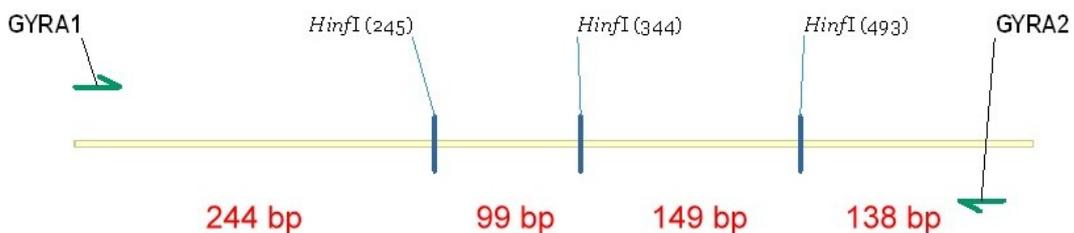
Negli isolati provenienti dalla Libia si è riscontrata la presenza di un integrone di classe I di 2000 bp in un ceppo di *S. Muenchen* con profilo di resistenza Amp, Amc, C, Sxt. In un ceppo di *S. Minneapolis* con profilo di resistenza Amc, Na, Cip, Sxt, K si è riscontrata la presenza dell'integrone di classe I, ma l'amplificazione con i primers CS 5'3'è risultata negativa, indicando che in questo caso non erano presenti cassette geniche.

## Studio dei meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni

La presenza di mutazioni nei geni *gyrA* e *parC* nei ceppi di *Salmonella* resistenti all'acido nalidixico è stata ricercata analizzando gli amplificati ottenuti con i primers GyrA e ParC tramite RFLP rispettivamente con gli enzimi *HinfI* e *HaeII*.

Quando il gene *gyrA wild-type* viene amplificato con i primers GyrA1 e GyrA2, il prodotto di PCR presenta quattro siti di restrizione dell'enzima *HinfI*, uno dei quali in corrispondenza della regione codificante per Ser-83. La digestione con *HinfI* dell'amplicone da 630 bp genera 4 frammenti di 244, 99, 149 e 138 bp (figura 3.5).

**Figura 3.5.** Mappa di restizione con *HinfI* del prodotto di PCR con primers GyrA



Nel caso in cui il DNA amplificato contenga una mutazione in corrispondenza di Ser-83, viene a mancare uno dei siti di taglio per l'enzima e la digestione genera 3 frammenti di 343, 149 e 138 bp. Per cui, si assume che il gene amplificato abbia in

questo caso la mutazione al codone 83.

Analogamente, quando il gene *parC* *wild-type* viene l'amplificato con primers ParC1 e ParC2, il prodotto di PCR di 413 bp contiene 4 siti di restrizione dell'enzima *Hae*II, uno dei quali in corrispondenza del sito Ser-80. La digestione con *Hae*II genera 4 frammenti da 21, 108, 131 e 153 bp (figura 3.6).

**Figura 3.6.** Mappa di restizione con *Hae*II del prodotto di PCR con primers ParC



Nel caso di mutazioni puntiformi in corrispondenza di Ser-80, venendo a mancare un sito di restizione, la digestione produce invece 3 frammenti da 284, 108 e 21 bp.

L'analisi tramite RFLP dei prodotti di PCR con primers GyrA e ParC ha permesso di rilevare una mutazione puntiforme nel codone 83 di GyrA in 6 ceppi di *Salmonella* isolati in Libia resistenti ad acido nalidixico, appartenenti ai sierotipi Braenderup, Minneapolis e Altendorf. Il sequenziamento dei prodotti di PCR e il confronto della

sequenza ottenuta tramite BLAST con quella del ceppo *S. Typhimurim* LT2 ha confermato la presenza della mutazione e ha consentito di determinare che nei ceppi *S. Braenderup* e *S. Altendorf* la Ser-83 è stata sostituita da Phe, mentre nel ceppo di *S. Minneapolis* la Ser-83 è stata sostituita da Tyr.

L'analisi tramite RFLP con *HaeII* non ha identificato alcuna mutazione al codone 80 di *ParC*; il sequenziamento ha infatti evidenziato che i ceppi presentavano una mutazione al codone 57, con la sostituzione di Thr con Ser (tabella 3.6).

Nei ceppi di *Salmonella* resistenti ad acido nalidixico isolati in Marocco, tutti appartenenti al sierotipo Hadar, l'analisi tramite RFLP con *HinfI* dei prodotti di PCR con *GyrA* non ha evidenziato mutazioni al codone 83. Il successivo sequenziamento ha confermato che i ceppi non possedevano la mutazione al codone 83, ma al codone 87, con la sostituzione di Asp con Asn.

Allo stesso modo, l'analisi tramite RFLP con *HaeII* dei prodotti di PCR con *ParC* ha evidenziato che i ceppi non possedevano la mutazione al codone 80, e il sequenziamento ha mostrato che era presente una mutazione al codone 57, con la sostituzione di Thr con Ser (tabella 3.7).

**Tabella 3.6** Mutazioni nei geni *gyrA* e *parC* riscontrate nei ceppi di *Salmonella* isolati in Libia

sierotipo	antibiotico resistenza	mutazioni GyrA		mutazioni ParC	
		RFLP <i>HinfI</i>	sequenza	RFLP <i>HaeII</i>	sequenza
Braenderup	Na, Sxt, Amc, K	cod 83	TCC→TTC	neg	AAC→AGC
			Ser83→Phe		Thr57→Ser
	Na, Cip <sup>a</sup> , Sxt, K	cod 83	TCC→TTC	neg	AAC→AGC
			Ser83→Phe		Thr57→Ser
Na, Sxt, K	cod 83	TCC→TTC	neg	AAC→AGC	
		Ser83→Phe		Thr57→Ser	
Na, Sxt	cod 83	TCC→TTC	neg	AAC→AGC	
		Ser83→Phe		Thr57→Ser	
Minneapolis	Na, Cip <sup>a</sup> , Gm,Sxt, Tet	cod 83	TTC→TAC	neg	AAC→AGC
			Ser83→Tyr		Thr57→Ser
Altendorf	Na, Cip <sup>a</sup> , Amc, Sxt, K	cod 83	TCC→TTC	neg	AAC→AGC
			Ser83→Phe		Thr57→Ser

<sup>a</sup> non completamente resistente

**Tabella 3.7** Mutazioni nei geni *gyrA* e *parC* riscontrate nei ceppi di *Salmonella* isolati in Marocco

sierotipo	antibiotico resistenza	mutazioni GyrA		mutazioni ParC	
		RFLP <i>HinfI</i>	sequenza	RFLP <i>HaeII</i>	sequenza
Hadar	Na, Tet	neg	GAC→AAC	neg	AAC→AGC
			Asp87→Asn		Thr57→Ser
	Na, Tet	neg	GAC→AAC	neg	AAC→AGC
			Asp87→Asn		Thr57→Ser
	Na, Tet, Amp	neg	GAC→AAC	neg	AAC→AGC
			Asp87→Asn		Thr57→Ser
	Na, Amp Amc, Cef, Tet, Str	neg	GAC→AAC	neg	AAC→AGC
			Asp87→Asn		Thr57→Ser

La resistenza ai fluorochinoloni può essere determinata anche dalla presenza di plasmidi

su cui siano presenti i geni *qnr* i quali, oltre a conferire bassi livelli di resistenza all'acido nalidixico e alla ciprofloxacina, facilitano la selezione di mutazioni cromosomali nei ceppi che li possiedono. Per questo motivo, in tutti i ceppi resistenti ad acido nalidixico e ciprofloxacina che possedevano plasmidi, è stata eseguita la PCR per l'identificazione dei geni *qnrA*, *qnrB*, o *qnrS*. La presenza di questi geni non è stata però riscontrata in nessuno dei ceppi esaminati.

#### **Ricerca di geni codificanti per $\beta$ -lattamasi tramite PCR e sequenziamento**

Tra le  $\beta$ -lattamasi ricercate, è stata riscontrata la presenza di geni TEM, codificanti per una grande famiglia di  $\beta$ -lattamasi a spettro limitato, in 4 ceppi di *Salmonella* isolati in Libia, appartenenti ai sierotipi Muenchen, Minneapolis e Altendorf, e in due ceppi di *S. Hadar* isolati in Marocco. Il sequenziamento dei prodotti di PCR e l'analisi con BLAST hanno rivelato che il gene amplificato era TEM-1.

Nessuno dei ceppi esaminati è risultato produttore di  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL).

### ***Analisi della Salmonella Genomic Island 1***

La presenza della *Salmonella Genomic Island 1* è stata riscontrata in 5 ceppi di *S. Typhimurium* multiresistenti provenienti dal Marocco. In tutti questi ceppi, le PCR con i primers per le regioni delimitanti la SGI1 (PCR 1 e 8) e per le altre regioni dell'isola genomica (PCR 2, 3 e 4) hanno dimostrato che i ceppi esaminati producevano bande identiche a quelle del ceppo di *S. Typhimurium* DT104 usato come controllo. La PCR 4 in particolare ha dimostrato che gli integroni sono localizzati all'interno della SGI, legati alla sequenza di DNA SO26. Le PCR 5 e 6 hanno dimostrato che i geni per la resistenza rispettivamente a cloramfenicolo e tetraciclina, sono localizzati all'interno della SGI1.

### ***Pulsed-Field Gel Electrophoresis***

La PFGE ha consentito di analizzare la variabilità genomica esistente tra i ceppi di *Salmonella enterica* analizzati.

Tra i ceppi isolati in Marocco sono stati identificati 38 diversi pulsotipi. In generale, si è riscontrato che ad ogni sierotipo corrisponde un pulsotipo caratteristico e diverso da

quello degli altri sierotipi.

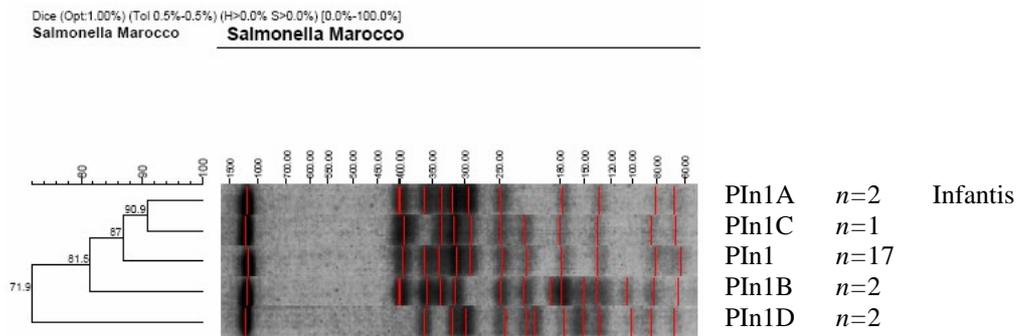
I pulsotipi dei ceppi appartenenti ad uno stesso sierotipo sono invece sovrapponibili e mostrano una elevata omologia di profilo.

Le percentuali di omologia riscontrate per ciascun sierotipo sono mostrate nei corrispondenti dendrogrammi, costruiti in seguito ad analisi dei pulsotipi con il coefficiente di Dice e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), tramite il software Gel Compar II versione 5.0 (Applied Maths), con ottimizzazione pari ad 1% e tolleranza pari a 0.5%.

In base a questa analisi, i ceppi isolati in Marocco appartenenti allo stesso sierotipo hanno mostrato un'omologia non inferiore al 69%.

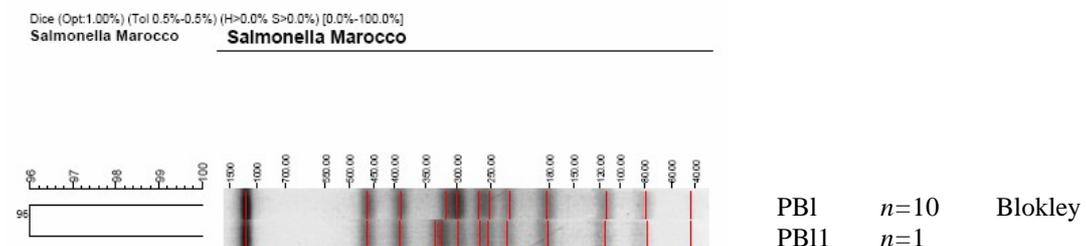
Nel 68% dei ceppi di sierotipo Infantis ( $n=25$ ) è stato identificato un pulsotipo principale (PIn1) insieme a 4 pulsotipi secondari (PIn1A-D) rappresentati in percentuale variabile dal 4% all'8%. La percentuale di omologia tra questi pulsotipi era del 71.9% (figura 3.7).

**Figura 3.7.** Analisi con Gel Compar II dei pulsotipi riscontrati nei ceppi di sierotipo Infantis



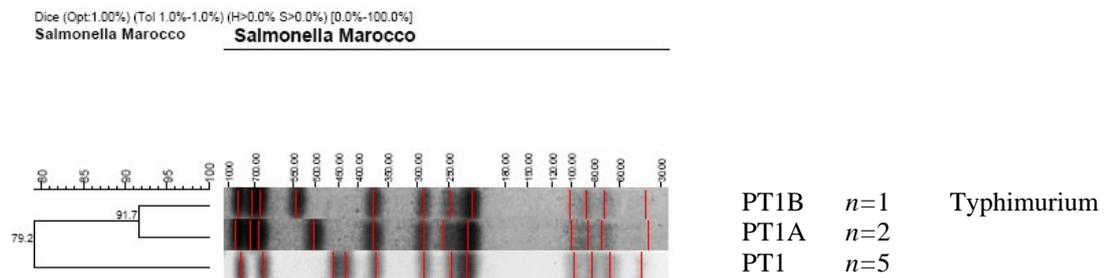
I ceppi appartenenti al sierotipo Blokley ( $n=11$ ) avevano tutti uno stesso pulsotipo (PBI), ad eccezione di un unico ceppo con profilo PB11, con omologia del 96% (figura 3.8).

**Figura 3.8.** Analisi con Gel Compar II dei pulsotipi riscontrati nei ceppi di sierotipo Blokley



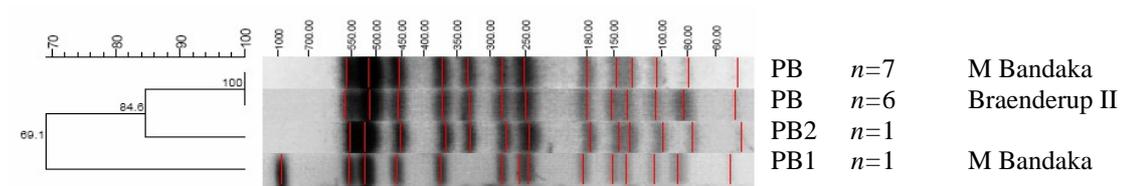
Nei ceppi di sierotipo Typhimurium ( $n=9$ ) la PFGE ha evidenziato 3 pulsotipi presenti in diversa percentuale: PT1 (55%), PT1A (22%), PT1B (11%), e mostranti una percentuale di omologia pari al 79.2% (figura 3.9).

**Figura 3.9.** Analisi con Gel Compar II dei pulsotipi riscontrati nei ceppi di sierotipo Typhimurium



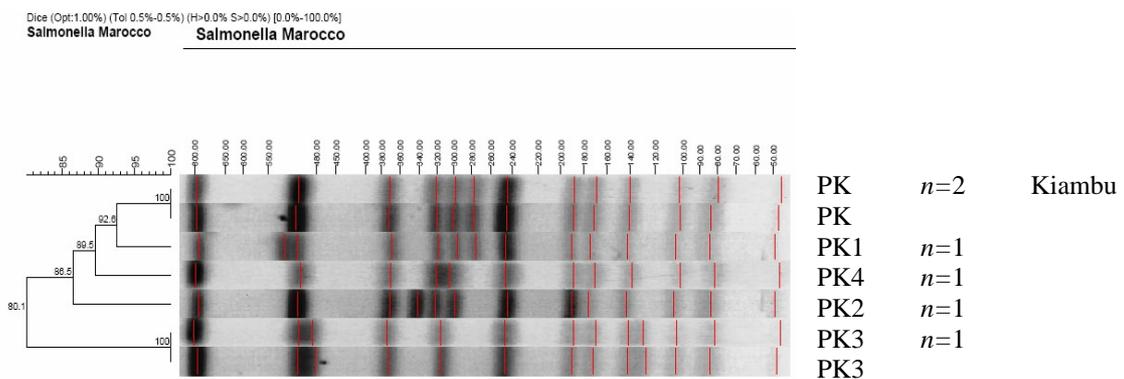
I ceppi di *S. M'Bandaka* ( $n=8$ ) hanno mostrato un pulsotipo comune (PB) e indistinguibile da quello riscontrato nei ceppi di *S. Branderup II* ( $n=7$ ), con le varianti PB1 e PB2 presenti in un unico ceppo, e con omologia pari al 69% (figura 3.10).

**Figura 3.10.** Analisi con Gel Compar II dei pulsotipi riscontrati nei ceppi di sierotipo M'Bandaka e Braenderup II



I ceppi di sierotipo Kiambu (*n*=6) mostravano tutti dei pulsotipi differenti (PK1-4) ad eccezione di due ceppi (PK), con omologia pari all'80%.

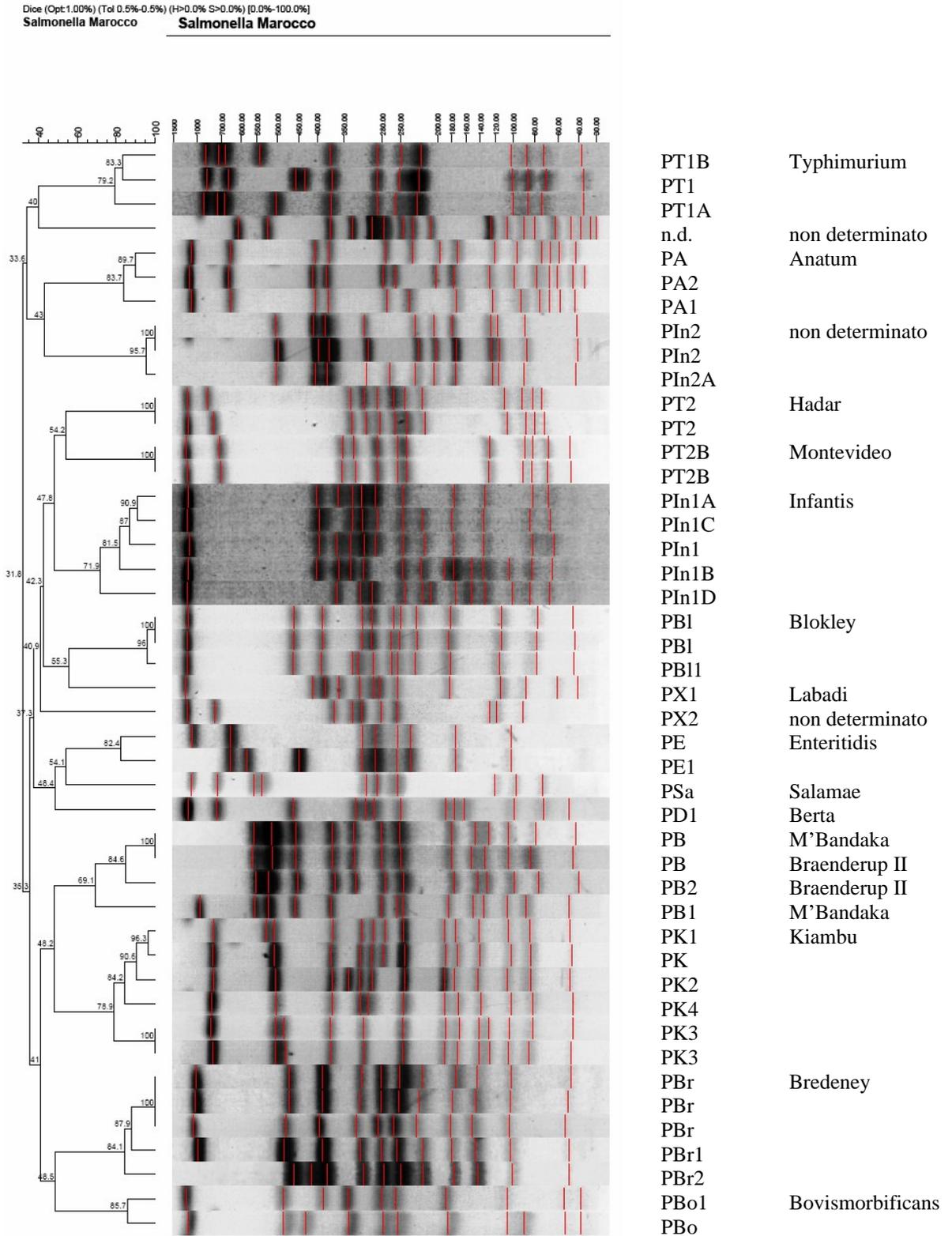
**Figura 3.11.** Analisi con Gel Compar II dei pulsotipi riscontrati nei ceppi di sierotipo Kiambu



I profili relativi a tutti i 38 diversi pulsotipi identificati e le rispettive percentuali di

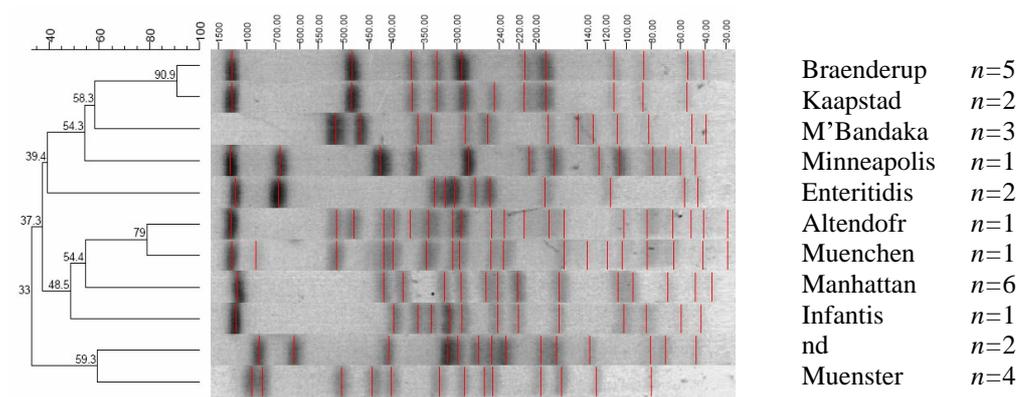
omologia sono riportati in figura 3.12

**Figura 3.12.** Analisi con Gel Compar II di tutti i diversi pulsotipi riscontrati nei ceppi di *Salmonella* isolati in Marocco



La PFGE nei ceppi isolati in Libia ha evidenziato che tutti i ceppi appartenenti allo stesso sierotipo avevano anche lo stesso pulsotipo. I profili relativi agli 11 pulsotipi identificati e le rispettive percentuali di omologia sono riportati in figura 3.13.

**Figura 3.13.** Analisi con Gel Compar II di tutti i diversi pulsotipi riscontrati nei ceppi di *Salmonella* isolati in Libia



## DISCUSSIONE

Le salmonelle non tifoidi sono considerate uno dei principali patogeni responsabili di zoonosi sia nei Paesi Industrializzati che nei Paesi in Via di Sviluppo. Nel continente Africano rappresentano infatti una delle principali cause di malattia nei bambini al di sotto dei 5 anni, nei quali sono anche causa di elevata mortalità (Kariuki *et al.*, 2006).

In questi paesi il fenomeno della resistenza ai più comuni antibiotici aggiunge un'ulteriore difficoltà al controllo delle malattie infettive.

L'aumento dei viaggi internazionali e le attuali metodologie di produzione e distribuzione degli alimenti hanno un ruolo importante nella frequenza delle infezioni alimentari. In seguito al processo di espansione dei mercati, si è assistito negli ultimi anni ad un intensificarsi dell'importazione di prodotti alimentari di origine animale dai PVS. Sono già stati descritti casi di epidemie internazionali di *Salmonella* legati al consumo di alimenti importati (Killalea *et al.*, 1996; Werber *et al.*, 2005); per questo motivo è necessaria la distribuzione, a livello internazionale, di dati accurati sulla diffusione di resistenza agli antibiotici e di particolari cloni circolanti (Butaye *et al.*,

2006). Infatti, nonostante gli alimenti importati siano stati riconosciuti come un'importante causa di salmonellosi in tutto il mondo, sono disponibili scarse informazioni in relazione al fenotipo e al genotipo di antibiotico resistenza degli isolati che ne sono responsabili (Butaye *et al.*, 2006).

### **Prevalenza di *Salmonella***

I ceppi di *Salmonella* oggetto di questo studio sono stati isolati da campioni di alimenti prelevati in due Stati dell'Africa Settentrionale, il Marocco e la Libia.

Nei campioni analizzati in Marocco la presenza di *Salmonella* è stata riscontrata nell'1% dei casi, valore non trascurabile dal momento che questo patogeno viene trasmesso principalmente attraverso cibi contaminati e la sua presenza in alimenti di origine animale può avere importanti implicazioni per la salute pubblica. Dall'analisi batteriologica dei campioni risulta evidente la presenza di *Salmonella* in un gran numero di prodotti alimentari (tabella 3.1). Per quanto riguarda la provenienza dei campioni, quelli prelevati dai mattatoi sono risultati maggiormente contaminati, seguiti dai frutti di mare e dalle carni di avicole. Questi dati confermano quanto riportato in

bibliografia, infatti in uno studio compiuto in Senegal la prevalenza di *Salmonella* nei mattatoi, in campioni di carne di manzo, era del 43% (Stevens *et al.*, 2006), nel nord della Thailandia la prevalenza nei mattatoi, in campioni di carne suina, era del 28% (Padungtod and Kaneene, 2006), mentre in Etiopia la prevalenza di *Salmonella* in maiali macellati era del 18.8% (Molla *et al.*, 2006).

La presenza di *Salmonella* in carcasse di animali macellati è generalmente conseguente a contaminazione fecale ed è direttamente proporzionale all'entità dell'infezione e alle carenze igieniche in fase di macellazione (Rondanelli *et al.*, 2005).

I campioni analizzati in Libia provenivano da carne avicola. Questa tipologia di prodotti alimentari rappresenta un frequente veicolo di trasmissione di *Salmonella* ed è maggiormente implicata nell'insorgenza di tossinfezioni alimentari rispetto ad altri alimenti di origine animale (Antunes *et al.*, 2003). La contaminazione delle carni avicole dipende principalmente dalle modalità di allevamento e di trasporto degli animali, dove il sovraffollamento favorisce la diffusione dei microrganismi in modo rapido. Nel corso della macellazione si possono inoltre verificare fenomeni di contaminazione crociata (Graziani *et al.*, 2005).

Tra i 16 diversi sierotipi isolati in Marocco, il più rappresentato era Infantis, seguito da

Bredeney, Blokley, Typhimurium, M'Bandaka, Braenderup, e Kiambu (figura 3.1).

Infantis è tra i 10 più comuni sierotipi di *Salmonella* isolati in Europa (European Food Safety Authority, 2004; Galanis *et al.*, 2006) ed è endemico in Finlandia negli animali in produzione dal 1970 (Lindqvist and Pelkonen, 2007); Bredeney ha un'ampia distribuzione geografica e recentemente è diventato il terzo sierotipo isolato in Irlanda (Cormican *et al.*, 2002).

I sierotipi più isolati in Libia erano invece Manhattan, Braenderup e Muenster (figura 3.2). In Francia nel 2005 è stato registrato un insolito aumento di isolati di *S. Manhattan* causato dalla contaminazione di carne di maiale (Noel *et al.*, 2006) e *S. Braenderup*, è riportata come uno dei sierotipi per i quali si è osservato un insolito aumento durante il 2007 (Gill and Threlfall, 2007).

In genere i sierotipi di *Salmonella* maggiormente isolati sono rappresentati da Enteritidis e Typhimurium; quest'ultimo in particolare viene riscontrato più frequentemente tra gli isolati non umani (Galanis *et al.*, 2006; Guerri *et al.*, 2004). Al contrario nel nostro studio *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* rappresentavano solo una percentuale minore degli isolati in Marocco, rispettivamente del 2.9% e del 8.6%, mentre in Libia era presente esclusivamente Enteritidis, con una prevalenza del 6.8%.

## **Antibiotico resistenza**

L'identificazione di ceppi di *Salmonella* antibiotico-resistenti negli alimenti di origine animale desta preoccupazioni legate al fallimento del trattamento terapeutico delle salmonellosi, dal momento che ceppi antibiotico-resistenti possono causare una patologia prolungata o più grave rispetto a ceppi sensibili (Butaye *et al.*, 2006). La terapia antibiotica è essenziale nei casi di salmonellosi grave o sistemica, oppure nel caso in cui la malattia colpisca anziani, bambini o soggetti immunodepressi (Ruiz *et al.*, 2004).

La maggior parte degli studi finora effettuati sull'antibiotico resistenza di *Salmonella* sono stati condotti su isolati da casi clinici dell'uomo e degli animali (Guerra *et al.*, 2000; Randall *et al.*, 2004), mentre gli studi sui campioni isolati da alimenti sono rari e limitati ad alcuni prodotti; per questo motivo sono disponibili pochi dati sull'antibiotico resistenza dei patogeni legati al cibo come *Salmonella* (Miko *et al.*, 2006).

Il presente lavoro ha cercato di approfondire le conoscenze sull'argomento e di determinare le resistenze maggiormente diffuse nei ceppi di *Salmonella* isolati da campioni di cibo.

Dall'analisi effettuata è emerso che il 28% dei ceppi isolati in Marocco e l'82% di quelli isolati in Libia erano resistenti ad uno o più antibiotici, con un'elevata percentuale di multiresistenti, dove per multiresistenza si intende resistenza simultanea a 2 o più antibiotici (tabella 3.3 e 3.4). Questo dato conferma l'incremento di multiresistenza osservato negli ultimi anni dall'esame di isolati di *Salmonella* provenienti da varie regioni (Butaye *et al.*, 2006).

L'alta frequenza di ceppi multiresistenti potrebbe essere un'indicazione dell'uso improprio di questi farmaci in medicina umana e veterinaria, sia in Marocco che in Libia. Infatti, come rilevato da studi precedenti (Zhao *et al.*, 2005), l'uso di dosi inadeguate di antibiotici, o il loro utilizzo nei mangimi animali come promotori della crescita, ha contribuito all'insorgenza di resistenze nei patogeni enterici quali *Salmonella*. Nei PVS questo problema è particolarmente evidente a causa della mancanza di trattamenti appropriati e per la scarsa qualità degli antibiotici utilizzati (Molla *et al.*, 2006). L'estensione del commercio mondiale di alimenti e la trasmissione di ceppi resistenti attraverso il cibo sottolinea il potenziale impatto che l'uso locale di antibiotici può avere sulla salute dei consumatori in tutto il mondo (Butaye *et al.*, 2006).

I fenotipi di multiresistenza tra gli isolati del Marocco sono stati osservati

prevalentemente in *S. Typhimurium* e Hadar (37% e 25%), ma anche nei sierotipi Blokley, M'Bandaka e Enteritidis. Questo dato conferma *Typhimurium* come uno tra i sierotipi nei quali viene riscontrata maggiore incidenza di multiresistenza (Butaye *et al.*, 2006).

Nei ceppi isolati in Libia la multiresistenza era particolarmente diffusa all'interno dei sierotipi Manhattan, Braenderup, Kaapstad, Altendorf e Minneapolis.

Tra le resistenze riscontrate nei ceppi del Marocco la più frequente era quella nei confronti di tetraciclina e ampicillina mentre non sono state riscontrate resistenze nei confronti di farmaci di ultima generazione quali fluorochinoloni e cefalosporine di terza generazione (figura 3.3).

La resistenza alla tetraciclina era prevedibile, dal momento che si tratta di uno dei più comuni antibiotici utilizzati in medicina umana e veterinaria, e dati simili sono stati riscontrati in studi analoghi (Molla *et al.*, 2006; Farrington *et al.* 2001; Gebreyes *et al.*, 2004).

Nei ceppi Libici al contrario la resistenza più diffusa era data dalla kanamicina (75%), seguita dall'acido nalidixico (66%). Uno studio condotto in Germania indica appunto le carni avicole come il più grande serbatoio per i ceppi di *Salmonella* resistenti ai

chinoloni (Malorny *et al.*, 2003). La resistenza all'acido nalidixico è degna di nota, dal momento che la terapia con fluorochinoloni non ha esito positivo in pazienti con infezioni da salmonelle acido nalidixico resistenti (Crump *et al.*, 2003; Piddock, 2002).

Il fatto che molti degli isolati resistenti ai chinoloni avessero anche ridotta sensibilità alla ciprofloxacina indica che questi ceppi hanno compiuto il primo passo verso lo sviluppo di resistenza ai fluorochinoloni. Dal momento che non abbiamo a disposizione informazioni relative all'uso di fluorochinoloni nelle aree da cui provengono i ceppi, è difficile stabilire un'associazione tra le resistenze osservate e l'uso di questi antibiotici.

Diversi studi suggeriscono però che l'uso di fluorochinoloni in medicina veterinaria contribuisce all'insorgenza e alla disseminazione di resistenza all'acido nalidixico (Angulo *et al.*, 2004).

Dal momento che *S. Enteritidis* è uno dei sierotipi che causa il maggior numero di salmonellosi nell'uomo e negli animali, ci si aspetterebbe di riscontrare un elevato grado di resistenze negli isolati di questo sierotipo, soprattutto tra quelli provenienti da pollame, in cui la trasmissione del patogeno avviene sia per via orizzontale che verticale.

Al contrario, i ceppi di *S. Enteritidis* isolati in Libia da carne avicola sono risultati

sensibili a tutti gli antibiotici da noi testati, confermando quanto riscontrato da altri autori (Butaye *et al.*, 2006).

Benché sia chiaro che la pressione selettiva esercitata dagli antibiotici svolga un ruolo importante nell'epidemiologia delle salmonelle multiresistenti, l'ampiezza di questo ruolo deve ancora essere esattamente determinata, dal momento che possono essere implicati altri fattori (isole di patogenicità, plasmidi di virulenza, fimbrie etc.) (Butaye *et al.*, 2006).

### **Determinanti di resistenza**

La caratterizzazione molecolare dei meccanismi di resistenza consente di individuare i determinanti genetici più comuni e frequenti nelle popolazioni multiresistenti di batteri.

In *Salmonella* l'elevata diffusione di resistenza è dovuta principalmente al trasferimento orizzontale, attraverso elementi mobili di DNA quali plasmidi e integroni (Barnaud *et al.*, 1998; Carattoli, 2003).

La presenza di plasmidi è stata riscontrata nell'84% degli isolati resistenti (tabella 3.4 e 3.5), ma i ripetuti tentativi di trasferire la resistenza attraverso questi elementi mobili

sono falliti, indicando che probabilmente si tratta di plasmidi non coniugativi.

Gli integroni promuovono l'acquisizione dei geni di resistenza e rappresentano in *Salmonella* uno dei principali veicoli di trasmissione delle resistenze (Antunes *et al.*, 2004).

La presenza di integroni di classe I è stata riscontrata nel 31% degli isolati multiresistenti provenienti dal Marocco, tutti appartenenti al sierotipo Typhimurium e nell'11% di quelli provenienti dalla Libia. Questo dato conferma l'associazione tra fenotipo di multiresistenza e presenza di integroni di classe I, già riscontrata in *Salmonella* da altri autori (Antunes *et al.*, 2004; Gebreyes *et al.*, 2004).

Una delle maggiori preoccupazioni riguardo questi elementi genetici è la potenziale diffusione dei geni di resistenza tra batteri patogeni e l'acquisizione di nuove resistenze (Gebreyes *et al.*, 2004).

Nel genoma dei ceppi di *S. Typhimurium* isolati in Marocco è stata inoltre riscontrata la presenza della *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), caratteristica dei ceppi multiresistenti di *S. Typhimurium* che appartengono al fagotipo definitivo 104 (DT 104), ampiamente diffusi in tutto il mondo (Guerri *et al.*, 2004).

Tra i ceppi di *Salmonella* è particolarmente preoccupante il potenziale sviluppo di ceppi

resistenti a cefalosporine di III<sup>a</sup> generazione e fluorochinoloni, data l'importanza di questi farmaci nel trattamento delle infezioni rispettivamente nei bambini e negli adulti.

La ricerca di determinanti genetici responsabili della resistenza ad antibiotici  $\beta$ -lattamici ha condotto all'identificazione di TEM-1 in 4 ceppi di *Salmonella* isolati in Libia, appartenenti ai sierotipi Muenchen, Minneapolis e Altendorf e in due ceppi di *S. Hadar* isolati in Marocco. TEM-1 è stato infatti riportato come il più frequente tipo di  $\beta$ -lattamasi riscontrato in ceppi di *Salmonella* resistenti all'ampicillina isolati da animali (Tzouvelekis *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Nessuno dei ceppi è risultato invece produttore di  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro.

Lo studio dei meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni ha portato all'identificazione, in tutti i ceppi resistenti all'acido nalidixico provenienti sia dalla Libia che dal Marocco, di una doppia mutazione puntiforme nei geni *gyrA* e *parC* (tabella 3.5 e 3.6).

Le mutazioni al codone 83 e 87 di *gyrA* da noi riscontrate sono tra quelle più comunemente identificate come responsabili di resistenza all'acido nalidixico e ridotta sensibilità alla ciprofloxacina (Hopkins *et al.*, 2005; Allen and Poppe, 2002).

Il 30% dei ceppi resistenti all'acido nalidixico avevano anche ridotta sensibilità alla ciprofloxacina, confermando che la resistenza ai chinoloni può essere un buon

indicatore di ridotta sensibilità ai fluorochinoloni (Malorny *et al.*, 2003, Schroeter *et al.*, 2004).

La ricerca di *qnr* nei ceppi resistenti all'acido nalidixico ha dato esito negativo, a conferma di quanto riportato in bibliografia; infatti, nonostante la resistenza ai chinoloni mediata da plasmide sia sempre più spesso osservata in isolati umani, non è ancora stata identificata in batteri di origine animale (Ellington and Woodforr, 2006; Li, 2005; Gay *et al.*, 2006). È comunque di fondamentale importanza monitorare l'evoluzione di questo tipo di resistenza, visto che la diffusione dei geni *qnr* tramite plasmidi potrebbe ulteriormente favorire la diffusione di resistenza ai fluorochinoloni, con importanti implicazioni per la salute pubblica (Gay *et al.*, 2006).

Nonostante la maggior parte delle  $\beta$ -lattamasi conosciute fino ad oggi derivino da isolati clinici di origine umana (Bradford, 2001; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Livermore, 1995), si osserva una crescente resistenza ai  $\beta$ -lattamici nei batteri di origine animale, con conseguente ampliamento del serbatoio di resistenza a questi farmaci.

Per questo motivo sono necessari ulteriori studi che, oltre a riportare la produzione qualitativa di  $\beta$ -lattamasi, includano la caratterizzazione fenotipica e genotipica dei batteri di origine animale resistenti  $\beta$ -lattamici (Li *et al.*, 2007).

## **PFGE**

La PFGE è la tecnica maggiormente utilizzata per lo studio delle relazioni genetiche tra i ceppi di *Salmonella* e il suo utilizzo è stato ampiamente raccomandato per l'elevato potere discriminatorio rispetto ad altri metodi di tipizzazione molecolare, come dimostrato dalla sua applicazione in studi epidemiologici precedenti (Tenover *et al.*, 1995; Liebana *et al.*, 2001). In seguito a standardizzazione dei protocolli, i risultati della PFGE possono infatti essere riprodotti tra diversi laboratori (Gaul *et al.*, 2007).

Nel presente lavoro la PFGE è stata utilizzata per stabilire le relazioni genetiche tra i ceppi esaminati e ha chiaramente discriminato 49 pulsotipi differenti, confermando questa tecnica un affidabile marker molecolare per studi epidemiologici. Inoltre in alcuni casi è risultata determinante per stabilire il sierotipo degli isolati. Infatti, come dimostrato da altri autori, la PFGE può essere un'alternativa quando non sia possibile sierotipizzare gli isolati con i metodi convenzionali (Gaul *et al.*, 2007).

Grazie all'utilizzo del software Gel Compar II è stato inoltre possibile stabilire la percentuale di omologia tra i ceppi esaminati. È stato riscontrato che all'interno dei singoli sierotipi l'omologia non era inferiore al 69%; questo dato è paragonabile ai

risultati ottenuti da Gaul, che ha riscontrato una percentuale minima di omologia del 70% tra ceppi di *Salmonella* appartenenti ad uno stesso sierotipo.

Nonostante l'approfondimento dell'indagine svolta nel presente lavoro, non sono a disposizione un numero sufficiente di dati riguardanti la tipizzazione molecolare di ceppi di *Salmonella* isolati in Marocco o Libia; perciò non è stato possibile un adeguato confronto tra i ceppi al fine di stabilire le prevalenze di particolari cloni circolanti nei singoli paesi.

## CONCLUSIONI

Il lavoro di ricerca svolto in questa tesi rappresenta un primo interessante approccio all'applicazione di criteri scientifici e metodologie innovative all'attività di monitoraggio di ceppi di *Salmonella* a trasmissione alimentare isolati in Paesi in Via di Sviluppo quali Marocco e Libia.

I dati raccolti permettono di affermare che la prevalenza di *Salmonella* negli alimenti di origine animale era pari all'1% dei campioni analizzati. I prodotti maggiormente contaminati sono risultati quelli provenienti dai mattatoi, i frutti di mare e le carni avicole.

La valutazione della resistenza agli antibiotici dei ceppi di *Salmonella* isolati dalle matrici alimentari ha dimostrato la presenza di resistenze a uno o più antibiotici nel 40% dei ceppi analizzati.

Questo studio conferma il ruolo degli alimenti di origine animale come riserva di ceppi di *Salmonella enterica* anche multiresistenti e sottolinea la necessità di un continuo monitoraggio di tali patogeni che rappresentano una tra le principali cause di infezioni

legate al cibo.

Inoltre tra le resistenze riscontrate quella all'acido nalidixico rappresenta un importante fattore di rischio per la salute umana, a causa dei numerosi fallimenti terapeutici nelle infezioni causate da ceppi resistenti a questo farmaco.

I risultati riscontrati rappresentano una base fondamentale per ulteriori approfondimenti e per la pianificazione di strategie di prevenzione e sistemi di monitoraggio che in questi Paesi sono piuttosto scarsi se non inesistenti.

Questo lavoro di ricerca assume particolare importanza alla luce delle continue movimentazioni di alimenti all'interno di un mercato sempre più globale ed ai crescenti interessi economici e commerciali di importazione ed esportazione tra vari Paesi del Mediterraneo.

Il nostro studio rappresenta inoltre un valido strumento per contribuire all'acquisizione di conoscenze relative alla qualità e sicurezza degli alimenti in relazione ai crescenti flussi turistici in questi Paesi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allen, K.J., Poppe, C., 2002. Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Microb Drug Resist.* 8, 375-383.
2. Allerberger, F., Liesegang, A., Grif, K. et. al., 2002. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. *Eurosurv.* 7(4), 65-70.
3. Angulo, F.J., Nargund, V.N., Chiller, T.C., 2004. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 51, 374-379.
4. Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2004. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 54, 429-434.
5. Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N., 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* 82, 97-103.
6. Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R. E. (ed), 1996. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, New York.
7. Bager, F., Helmuth, R., 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Vet Res.* 32, 285-290.
8. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A., 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 2352-2358.

9. Barrow, P.A., Huggins, M.B., Lovell, M.A., 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect Immun.* 62, 4602-4610.
10. Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 412, 149-158.
11. Bhan, M.K., Bahl, R., Bhatnagar, S., 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet.* 366, 749-762.
12. Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R., 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 183, 5725-5732.
13. Boyd, D.A., Mulvey, M.R., 2006. OXA-1 is OXA-30 is OXA-1. *J Antimicrob Chemother.* 58, 224-225.
14. Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L., Mulvey, M.R., 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 189, 285-291.
15. Brackelsberg, C.A., Nolan, L.K., Brown J., 1997. Characterization of *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Typhimurium (Copenhagen) Isolates from cattle. *Vet Res Com.* 21,409-420.
16. Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14, 933-951, table of contents.
17. Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 38, 2465-2467.
18. Briggs, C.E., Fratamico, P.M., 1999. Molecular characterization of an

- antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 846-849.
19. Brinas, L., Lantero, M., de Diego, I., Alvarez, M., Zarazaga, M., Torres, C., 2005. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.* 56, 1107-1110.
  20. Bush, L.M., Calmon, J., Johnson, C.C., 1995. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. *Infect Dis Clin North Am.* 9, 653-686.
  21. Butaye, P., Michael, G.B., Schwarz, S., Barrett, T.J., Brisabois, A., White, D.G., 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect.* 8, 1891-1897.
  22. Carattoli, A., 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 32, 243-259.
  23. Carattoli, A., 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol.* 5, 113-122
  24. Carattoli, A., Filetici, E., Villa, L., Dionisi, A.M., Ricci, A., Luzzi, I., 2002. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 2821-2828.
  25. Cloeckaert, A., Chaslus-Dancla, E., 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet Res.* 32, 291-300.
  26. Collazo, C.M., Galan, J.E., 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review. *Gene.* 192, 51-59.
  27. Cormican, M., DeLappe, N., O'Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S., Daly, M., Fitzgerald, M., Moore, J., 2002. *Salmonella enterica* serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland. *Appl Environ Microbiol.* 68, 181-186.

28. Crump, J.A., Barrett, T.J., Nelson, J.T., Angulo, F.J., 2003. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for non-Typhi salmonellae. *Clin Infect Dis.* 37, 75-81.
29. Darwin, K.H., Miller, V.L., 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev.* 12, 405-428
30. Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., Cloeckert, A., 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol.* 55, 1911-1924.
31. Edsall, G., Gaines, S., Landy, M., Tigertt, W.D., Sprinz, H., Trapani, R.J., Mandel, A.D., Benenson, A.S., 1960. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. *J Exp Med.* 112, 143-166.
32. Ehrbar, K., Friebel, A., Miller, S.I., Hardt, W.D., 2003. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1. *J Bacteriol.* 185, 6950-6967.
33. Ellington, M.J., Woodford, N., 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother.* 57, 1026-1029.
34. European Food Safety Authority: Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. *The EFSA Journal* 2006:310.
35. Farrington, L.A., Harvey, R.B., Buckley, S.A., Droleskey, R.E., Nisbet, D.J., Inskip, P.D., 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market-age swine. *J Food Prot.* 64, 1496-1502.
36. Fey, P.D., Safranek, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C., Bradford, P.A., Angulo, F.J., Hinrichs, S.H., 2000. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med.* 342, 1242-1249

37. Friedman, S.M., Lu, T., Drlica, K., 2001. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2378-2380.
38. Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis.* 12, 381-388.
39. Gaul, S.B., Wedel, S., Erdman, M.M., Harris, D.L., Harris, I.T., Ferris, K.E., Hoffman, L., 2007. Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved XbaI fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol.* 45, 472-476.
40. Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. and Hooper, D.C., 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-*typhi* serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.* 43, 297-304.
41. Gebreyes, W.A., Davies, P.R., Turkson, P.K., Morrow, W.E., Funk, J.A., Altier, C., Thakur, S., 2004. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. *J Food Prot.* 67, 698-705.
42. Gebreyes, W.A., Thakur, S., 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 503-511.
43. Gill, N., Threlfall, J., Enter-net Quarterly *Salmonella* Report April-June 2007/2
44. Graziani, C., Galetta, P., Busani, L., Dionisi, A.M., Filetici, E., Ricci, A., Caprioli, A., Luzzi, I., 2005. Le infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. *Rapporti ISTISAN.* 05/27, 49.
45. Groisman, E.A., Blanc-Potard, A. B. and Uchiya, K., 1999. Pathogenicity

- islands and the evolution of *Salmonella* virulence. In J.B. Kaper and J. Hacker (ed): Pathogenicity islands and other mobile virulence elements, American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., pp. 127-150.
46. Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza, M.C., 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2166-2169.
  47. Guerri, M.L., Aladuena, A., Echeita, A., Rotger, R., 2004. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Int J Antimicrob Agents.* 24, 327-333.
  48. Gunn, J.S., Ernst, R.K., McCoy, A.J., Miller, S.I., 2000. Constitutive mutations of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator *phoP*. *Infect Immun.* 68, 3758-3762.
  49. Heddle, J., Maxwell, A., 2002. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 1805-1815.
  50. Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* May;25(5), 358-373.
  51. Hueck, C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 379-433.
  52. 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.
  53. Jacoby, G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2, S120-126
  54. Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S., 2005. The new beta-lactamases. *N Engl J*

Med. 352, 380-391.

55. Kado, C. I. and Liu, S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145, 1365-1373.
56. Kariuki, S., Gilks, C., Revathi, G. *et al.*, 2000. Genotypic analysis of multidrug - resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi, Kenya. *Emerg Infect Dis*; 6:649-651.
57. Kariuki, S., Revathi, G., Kariuki, N., Kiiru, J., Mwituria, J., Muyodi, J., Githinji, J. W., Kagendo, D., Munyalo, A., and Hart, C. A., 2006. Invasive multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa: zoonotic or anthroponotic transmission? *J. Med. Microbiol.* 55, 585–591.
58. Karuiki, S., Revathi, G, Muyodi, J., Mwituria, J., Munyalo, A., Mirza, S. and Hart, C.A., 2004. Characterisation of Multi-Resistant Typhoid outbreaks in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1477-1482.
59. Kauffman, F., 1972. Serological diagnostics of salmonella species Copenhagen: Munksgaard.
60. Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R., 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 11801-11805.
61. Killalea, D., Ward, L.R., Roberts, D., de Louvois, J., Sufi, F., Stuart, J.M., Wall, P.G., Susman, M., Schwieger, M., Sanderson, P.J., Fisher, I.S., Mead, P.S., Gill, O.N., Bartlett, C.L., Rowe, B., 1996. International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella agona* infection from a ready to eat savoury snack--I: England and Wales and the United States. *BMJ.* 313, 1105-1107.
62. Kumagai, Y., Kato, J.I., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., Ikeda, H., 1996. Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV parC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 40, 710-714.
63. Lemarchand, K., Lebaron, P., 2002. Influence of mutation frequency on the

- persistence of *Salmonella enterica* serotypes in natural waters. *FEMS Microbiol Ecol.* 41, 125-131.
64. Levings, R.S., Lightfoot, D., Partridge, S.R., Hall, R.M., Djordjevic, S.P., 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J Bacteriol.* 187, 4401-4409.
  65. Li, X.Z., 2005. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 25, 453-463.
  66. Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L., 2007. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121, 197-214.
  67. Li, X.Z., Nikaido, H., 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 64, 159-204.
  68. Liebana, E., Guns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol.* 39, 3609-3616.
  69. Lindqvist, N., Pelkonen, S., 2007. Genetic surveillance of endemic bovine *Salmonella* *Infantis* infection. *Acta Vet Scand.* 49, 15.
  70. Ling, J.M., Chan, E.W., Lam, A.W., Cheng, A.F., 2003. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 3567-3573.
  71. Livermore, D.M., 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8, 557-584.
  72. Lucas, R.L., Lostroh, C.P., DiRusso, C.C., Spector, M.P., Wanner, B.L., Lee, C.A., 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* 182, 1872-1882.

73. Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.J., McCoven, S.M., 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*. 1, 417–420.
74. Maguire, A.J., Brown, D.F., Gray, J.J., Desselberger, U., 2001. Rapid screening technique for class 1 integrons in Enterobacteriaceae and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother*. 45, 1022-1029.
75. Malorny, B., Schroeter, A., Guerra, B., Helmuth, R., 2003. Incidence of quinolone resistance in strains of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. *Vet Rec*. 153, 643-648.
76. Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoef, J., Jones, M.E., 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 43, 686-689.
77. Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 351, 797-799.
78. Melloul, A.A., Hassani, L., Rafouk, L., 2001. *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World J Microbiol & Biotech*. 17, 207-209.
79. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R., 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 56, 1025-1033.
80. Miriagou, V., Tassios, P.T., Legakis, N.J., Tzouveleki, L.S., 2004. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents*. 23, 547-555.
81. Molla, B., Berhanu, A., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Kleer, J., Hildebrandt, G., 2006. Multidrug resistance and distribution of *Salmonella* serovars in slaughtered pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 53, 28-33.

82. Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckert, A., 2006. The genetics of Salmonella genomic island 1. *Microbes Infect.* 8, 1915-1922.
83. Nagano, N., Shibata, N., Saitou, Y., Nagano, Y. and Arakawa, Y., 2003. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type  $\beta$ -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5530-5536.
84. Nnalue, N.A., 1991. Relevance of inoculation route to virulence of three *Salmonella* spp. strains in mice. *Microb Pathog.* 11, 11-18.
85. Noel, H., Dominguez, M., Weill, F.X., Brisabois, A., Duchazeaubeneix, C., Kerouanton, A., Delmas, G., Pihier, N., Couturier, E., 2006. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Manhattan infection associated with meat products, France, 2005. *Euro Surveill.* 11, 270-273.
86. Nordmann, P., Poirel, L., 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 56, 463-469.
87. Normark, B.H., Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med.* 252, 91-106.
88. Ozeki, S., Deguchi, T., Yasuda, M. *et al.*, 1997. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 35, 2315-2319.
89. Padungtod, P., Kaneene, J.B., 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int J Food Microbiol.* 108, 346-354.
90. Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Guilloteau, L., Buzoni-Gatel, D., Oswald, I.P., Pepin, M., Kaeffer, B., Berthon, P., et al., 1990. Experimental ovine salmonellosis (*Salmonella abortusovis*): pathogenesis and vaccination. *Res Microbiol.* 141, 945-953.
91. Parry, C.M., 2003. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr*

Opin Infect Dis. 16, 467-472.

92. Partridge, S.R., Brown, H.J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 1263-1270.
93. Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 3014-3020.
94. Peng, H., Marians, K.J., 1993. Escherichia coli topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem.* 268, 24481-24490.
95. Piddock, L.J., 2002. Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 3-16.
96. Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P. *et al.*, 2000. Molecular characterisation of integrons in Acinetobacter baumannii: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2684-2688.
97. Poole, K., 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 10, 12-26.
98. Popoff, M.Y. and Le Minor, L., 1997. Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars, 7<sup>th</sup> Revision. Paris, France: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur.
99. Rabsch, W., Tschape, H., Baumler, A.J., 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect.* 3, 237-247.
100. Randall, L.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, L.J., Woodward, M.J., 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of Salmonella enterica isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 53, 208-216.
101. Reporter R., 2003. Reptile-associated salmonellosis-selected states, 1998-

2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 52, 1206-1209

102. Rondanelli, E.G., Fabbi, M., Marone, P., 2005. Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Selecta Medica.
103. Ruiz, J., Castro, D., Goni, P., Santamaria, J.A., Borrego, J.J., Vila, J., 1997. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of Salmonella serotype Typhimurium. J Med Microbiol. 46, 623-628.
104. Ruiz, M., Rodriguez, J.C., Escribano, I., Royo, G., 2004. Available options in the management of non-typhi Salmonella. Expert Opin Pharmacother. 5, 1737-1743.
105. Santos, R.L., Zhang, S., Tsois, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G., Baumler, A.J., 2001. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect. 3, 1335-1344.
106. Schroeter, A., Hoog, B., Helmuth, R., 2004. Resistance of Salmonella isolates in Germany. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51, 389-392.
107. Slauch, J., Taylor, R., Maloy, S., 1997. Survival in a cruel world: how Vibrio cholerae and Salmonella respond to an unwilling host. Genes Dev. 11, 1761-1774.
108. Smith, H.W., Jones, J.E., 1967. Observations on experimental oral infection with Salmonella dublin in calves and Salmonella choleraesuis in pigs. J Pathol Bacteriol. 93, 141-156.
109. Stevens, A., Kabore, Y., Perrier-Gros-Claude, J.D., Millemann, Y., Brisabois, A., Catteau, M., Cavin, J.F., Dufour, B., 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). Int J Food Microbiol. 110, 178-186.
110. Stevenson, J.E., Gay, K., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M., Angulo, F.J., 2007. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi Salmonella enterica isolates in the United States from 1996 to 2003. Antimicrob Agents

Chemother. 51, 195-197.

111. Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* 3, 1669-1683.
112. Tauxe, R.V., Pavia, A.T., 1998. *Bacterial infection of humans: epidemiology and control*, Plenum Medical Book Co., New York.
113. 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, 2233-2239.
114. Tran, J.H., Jacoby, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 5638-5642.
115. Tzouvelekis, L.S., Lukova, V., Tassios, P.T., Fluit, A.C., Jones, R.N., Legakis, N.J., 2003. Resistance to beta-lactams among blood isolates of *Salmonella* spp. in European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-98. *Clin Microbiol Infect.* 9, 149-152.
116. Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D.J., Olsen, J.E., 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125, 229-255.
117. Wain, J., Hoa, N.T., Chinh, N.T., Vinh, H., Everett, M.J., Diep, T.S., Day, N.P., Solomon, T., White, N.J., Piddock, L.J., Parry, C.M., 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis.* 25, 1404-1410.
118. Wallis, T.S., Galyov, E.E., 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 36, 997-1005.
119. Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D.C., 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 2242-2248.

120. Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., Hauri, A.M., Roggentin, P., Prager, R., Fisher, I.S., Behnke, S.C., Bartelt, E., Weise, E., Ellis, A., Siitonen, A., Andersson, Y., Tschape, H., Kramer, M.H., Ammon, A., 2005. International outbreak of Salmonella Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Dis.* 5, 7.
121. White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., 2001. Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteraceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2658-2661.
122. Wilcock, B.P., Schwartz, K., 1992. Salmonellosis. In: Leman AD, Straw BE (Ed.). *Diseases of Swine*. Ames:7th ed. Iowa State University Press;. p. 570-583.
123. Wray, C., Sojka, W.J., 1977. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. *J Dairy Res.* 44, 383-425.
124. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., Nakamura, S., 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35, 1647-1650.
125. Zavanella, M., 2001. *Tipizzare le Salmonelle*. Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia.
126. Zhao, S., Fedorka-Cray, P.J., Friedman, S., McDermott, P.F., Walker, R.D., Qaiyumi, S., Foley, S.L., Hubert, S.K., Ayers, S., English, L., Dargatz, D.A., Salamone, B., White, D.G., 2005. Characterization of Salmonella Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Foodborne Pathog Dis.* 2, 169-181.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il Dott. Andrea Piana e la D.ssa Bianca Are dell'Istituto di Igiene di Sassari per il contributo alla sierotipizzazione dei ceppi.

Ringrazio la D.ssa Anna Maria Dionisi del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma per l'aiuto nell'interpretazione dei profili di PFGE.

Ringrazio il mio tutor, Prof. Salvatore Rubino, e tutti i colleghi della Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica del Dipartimento di Scienze Biomediche. In modo particolare ringrazio la D.ssa Bianca Paglietti.