

L'attività del Centro di Riferimento per la Tipizzazione delle Salmonelle in Piemonte

Ilaria Crespi, Vesselina Kroumova, Gian Lorenzo Molinari, Stefano Andreoni, Vittorio Quaglia, Giacomo Fortina

Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, U.O.A. di Microbiologia, Novara

INTRODUZIONE

Il primo isolamento di *Salmonella* non *typhi* risale al 1901 quando Schottmuller isola alcuni ceppi batterici che, pur non causando febbre di origine enterica, determinavano una gastroenterite (4). Dopo quella prima segnalazione se ne sono succedute molte altre che hanno dimostrato, senza ombra di dubbio, la diffusione ubiquitaria di questo microorganismo (5). La situazione epidemiologica delle salmonelle mostra una loro larghissima diffusione in tutte le aree geografiche. In particolare negli Stati Uniti, ad esempio, sono ritenute responsabili di circa il 40% delle tossinfezioni alimentari, questo dato è supportato da una loro diffusione molto elevata nella popolazione (17). La situazione europea, se le segnalazioni sono corrette, mostra dati migliori con circa 10 casi di salmonellosi ogni 100.000 abitanti in Danimarca, 43 in Svezia, 46 in Gran Bretagna e solo 20 in Italia (17).

Anche per ciò che riguarda i sierotipi una comunicazione del PHLS (14) segnala nel 1999 come sierotipo prevalente in Italia la *Salmonella enteritidis* seguita dalla *typhimurium* e poi, a distanza dalla *infantis*. Tuttavia Ida Luzzi et al. nel 2004, indicano che dal 2001 in poi il sierotipo *typhimurium* è divenuto quello più diffuso nel nostro paese (11).

MATERIALI E METODI

Proseguendo l'attività di Centro di Riferimento Regionale per la sierotipizzazione delle salmonelle, anche nel 2004 è continuata presso il nostro Laboratorio la raccolta e la tipizzazione delle Salmonelle inviate dai vari centri piemontesi.

Come già noto, il progetto prevede l'invio a Novara, da parte di tutti i Laboratori della Regione Piemonte, dei ceppi di *Salmonella* da loro isolati in campioni di materiale biologico umano per la tipizzazione di specie.

Ogni ceppo batterico deve essere accompagnato da una scheda di sorveglianza "ENTERNET-Italia", nella quale vengono richieste:

- Origine e caratteristiche del campione biologico
- Dati anagrafici del paziente ed eventuali cause sospette (viaggi, alimenti...)
- Identificazione microbiologica e sensibilità agli antibiotici.

Il Centro di Riferimento effettua la sierotipizza-

zione secondo le linee guida (2) che consistono nella reazione sierologia mediante agglutinazione rapida su vetrino.

L'intero percorso per la tipizzazione sierologia comprende diverse tappe:

1. agglutinazione somatica O
2. agglutinazione flagellare H (1° agglutinazione)
3. eventuale separazione fase flagellare 1 e 2
4. agglutinazione flagellare H (2° agglutinazione)

L'agglutinazione somatica "O", quella flagellare "H", l'eventuale separazione e la seconda agglutinazione flagellare "H" sono state eseguite seguendo le indicazioni presenti nella letteratura (17). I terreni utilizzati sono stati AGAR SS e MULLER HINTON della ditta BIOLIFE.

Gli antisieri, della ditta BIOTEST, sono stati utilizzati secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

Possono essere a volte necessarie alcune prove biochimiche per distinguere tra loro Salmonelle sierologicamente non differenziabili. Queste sono state effettuate seguendo le indicazioni presenti nella letteratura unanimemente riconosciute (2).

Inoltre vengono saggiati tutti gli antibiotici del protocollo, alcuni dei quali utilizzati in terapia, altri meno utilizzati dal punto di vista clinico, ma che possono tuttavia rivestire un notevole significato da un punto di vista epidemiologico.

L'antibiogramma viene eseguito con il metodo KIRBY-BAUER seguendo le indicazioni dettate dall'NCCLS (13). Dopo incubazione in termostato vengono misurati i diametri delle zone di inibizione alla crescita visibili attorno ai dischetti. I diametri vengono poi confrontati con le tavole di lettura dettate dall'NCCLS e il microorganismo viene definito sensibile, intermedio o resistente in base a tali tabelle (13).

Tutti i dati vengono mensilmente trasmessi all'Istituto Superiore di Sanità tramite la rete ENTERNET.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo ultimo anno, l'attività di raccolta dei ceppi di *Salmonella* può, finalmente, ritenersi soddisfacente con un coinvolgimento che ha interessato praticamente tutto il Piemonte (figura I).

Le Salmonelle inviate nel periodo aprile 2001-dicembre 2004 sono state in totale 1547, delle quali 94 nell'anno 2001, 288 nell'anno 2002, 482

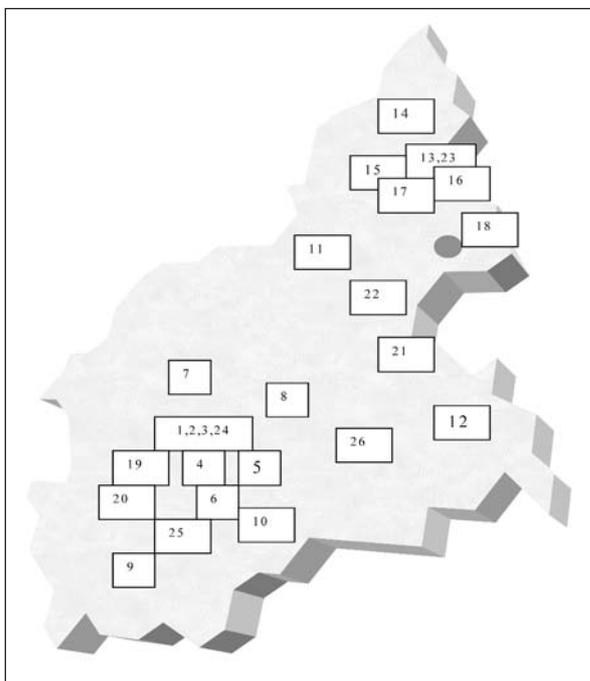


Figura I. Per la legenda vedi nota a fine lavoro

nel 2003 e 683 nel 2004, con un continuo aumento negli invii, dato che dimostra la buona accettazione dell’iniziativa (tabella 1).

Dallo stesso grafico risulta ugualmente chiaro, anche se in parte mascherato dal continuo aumento dei ceppi inviati, l’andamento ciclico degli isolamenti con una prevalenza nel periodo estivo.

Le due salmonelle isolate con maggior frequenza sono risultate essere *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, isolate rispettivamente nel 40.56% e nel 30.86% dei casi.

In particolare, per quanto riguarda la *S. enteritidis* bisogna sottolineare che il netto aumento verificatosi nell’anno 2003, confermato anche a livello nazionale dal lavoro di I. Luzzi et al. (11), non è continuato nel 2004, come alcuni dati epidemiologici internazionali potevano far supporre. In questo anno la percentuale di isolamento è stata praticamente sovrapponibile a quella del 2003 e

questo contrariamente ad altre situazioni europee anche a noi vicine (1) in cui la *S. enteritidis* rappresenta il sierotipo più diffuso, o come in Bosnia dove questo sierotipo raggiunge percentuali molto elevate (16). Nel nostro caso la *S. enteritidis*, pur largamente presente, si conferma come frequenza di isolamento il secondo sierotipo.

Per quello che riguarda la *S. typhimurium* essa si conferma, come detto, la salmonella maggiormente diffusa benché con percentuali in continua diminuzione rispetto agli anni precedenti attestandosi nell’anno 2004 al 40.56%.

Nell’anno 2004 vi è inoltre da segnalare la presenza di nuovi isolamenti con percentuali significative per tre particolari sierotipi: *S. rissen*, *S. london* e *S. napoli*, anche se per questo ultimo sierotipo un primo aumento si era già evidenziato nell’anno 2003.

Per questi tre sierotipi si possono escludere episodi epidemici anche limitati. È tuttavia interessante notare che per la *S. rissen* è evidente una sua prevalente collocazione nell’area di Torino e Cuneo con due sole eccezioni che, inoltre, mostrano un pannello di resistenza del tutto diverso. Per la *S. napoli* la zona di isolamento è quasi solo legata al Piemonte nord-orientale con un’unica eccezione. In questo caso è interessante segnalare una nota del 2004 nella quale veniva evidenziata una presenza significativa di questo sierotipo raro nell’area di Varese e del lago Maggiore, sponda lombarda, (8) area del tutto contigua a quella piemontese dove è stata riscontrata la presenza della *S. napoli*. Per la *S. london* invece non si evidenzia alcuna localizzazione geografica particolare.

Di seguito viene riportata la tabella (tabella 2) illustrante le salmonelle più isolate, la loro percentuale e la suddivisione nei quattro anni considerati.

Bisogna sottolineare come nel 2004 siano stati isolati 53 sierotipi diversi, di cui ben 27 riscontrati per la prima volta dall’inizio dell’attività del nostro Centro ed esattamente: Branderup, Charlottenburg, Djugu, Duisburg, Farsta, Fayed, Fyris, Give, Glostrup, Goettingen, Gombe, Isangi, Jukestown, Lagos, Larochele, Linderburg, Litchfield, Liverpool, Mondovideo, Newland, Paratyphi b, Putten, Sao, Typhi, Urbana, Victoria, Westpark. Da notare inoltre che i sierotipi di salmonella isolati nel corso di questi quattro anni sono stati in totale 69.

Per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici, si può affermare che salmonelle diverse da *typhimurium* ed *enteritidis*, continuano a mantenere una sensibilità pressoché totale nei confronti dei

Tabella I

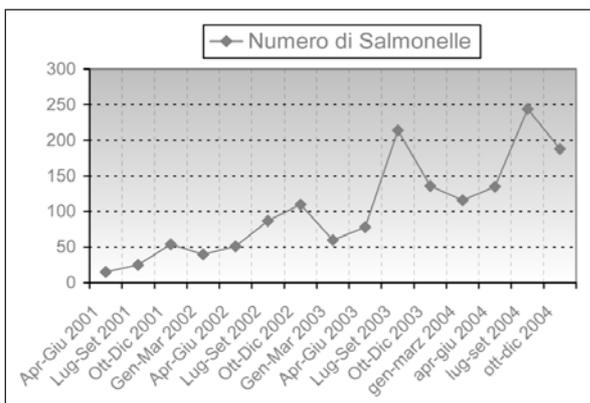


Tabella 2. Percentuale di Salmonelle isolate nel periodo 2001-2004

	2001	%	2002	%	2003	%	2004	%	TOTALE	%
<i>S. typhimurium</i>	44	46.81	164	56.94	230	47.72	277	40.56	715	46.22
<i>S. enteritidis</i>	21	22.35	65	22.57	154	31.95	211	30.86	451	29.15
<i>S. derby</i>	0	0	5	1.74	18	3.73	26	3.82	49	3.18
<i>S. infantis</i>	8	8.51	4	1.39	5	1.04	14	2.05	31	2.00
<i>S. muenchen</i>	0	0	1	0.35	9	1.96	14	2.05	24	1.55
<i>S. bredeney</i>	3	3.20	5	1.74	7	1.45	8	1.18	23	1.48
<i>S. rissen</i>	0	0	2	0.69	0	0	16	2.35	18	1.16
<i>S. napolì</i>	0	0	1	0.35	7	1.52	10	1.45	18	1.16
<i>S. thompson</i>	6	6.39	2	0.69	4	0.83	5	0.75	17	1.09
<i>S. london</i>	1	1.06	1	0.35	2	0.43	11	1.60	15	0.97
<i>S. heidelberg</i>	1	1.06	5	1.74	7	1.45	1	0.16	14	0.92
<i>S. livingstone</i>	0	0	2	0.69	1	0.22	7	1.00	10	0.66
<i>S. kottbus</i>	0	0	0	0	5	1.09	6	0.86	11	0.71
<i>S. panama</i>	1	1.06	1	0.35	0	0	5	0.75	7	0.45
<i>S. agona</i>	0	0	2	0.69	0	0	4	0.58	6	0.38
Non tipizzate	/	/	/	/	3	0.62	0	0	3	0.20
In corso di tipizzazione	/	/	/	/	/	/	1	0.16	1	0.06
No salmonella	/	/	/	/	/	/	5	0.75	5	0.32
ALTRE*	11	11.68	38	13.19	54	11.21	62	9.08	129	8.34
TOTALE	94	100	288	100	482	100	683	100	1547	100

ALTRE*	2001	%	2002	%	2003	%	2004	%	TOTALE	%
<i>S. albania</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. blockley</i>	1	1.06	0	0	2	0.43	1	0.15	4	0.26
<i>S. bovismorbificans</i>	0	0	1	0.35	3	0.65	2	0.29	6	0.38
<i>S. brandenburg</i>	0	0	2	0.69	3	0.65	3	0.44	8	0.52
<i>S. branderup</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. brazzaville</i>	1	1.06	0	0	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. caledon</i>	0	0	2	0.69	0	0	0	0	2	0.13
<i>S. charlottenburg</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.13
<i>S. corvallis</i>	0	0	0	0	2	0.43	0	0	2	0.13
<i>S. djugu</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. duisburg</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. essen</i>	0	0	1	0.35	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. farsta</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. fayed</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.13
<i>S. fyris</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.13
<i>S. gabon</i>	1	1.06	1	0.35	2	0.43	2	0.29	6	0.38
<i>S. give</i>	0	0	0	0	0	0	3	0.44	3	0.19
<i>S. glostrup</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. gloucester</i>	0	0	2	0.69	2	0.43	1	0.15	5	0.32
<i>S. goettingen</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.13
<i>S. goldcoast</i>	0	0	0	0	1	0.22	1	0.15	2	0.13
<i>S. gombe</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.13
<i>S. hadar</i>	0	0	3	1.04	1	0.22	2	0.29	6	0.38
<i>S. isangi</i>	0	0	0	0	0	0	3	0.44	3	0.19
<i>S. jukestown</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. kedougou</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. kimuenza</i>	4	4.26	1	0.35	0	0	0	0	5	0.32
<i>S. kisii</i>	0	0	3	1.04	0	0	0	0	3	0.19
<i>S. kotu</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. lagos</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. larochele</i>	0	0	0	0	0	0	4	0.58	4	0.26
<i>S. lindrik</i>	1	1.06	0	0	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. linderburg</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. litchfield</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. liverpool</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. loanda</i>	0	0	1	0.35	1	0.22	0	0	2	0.13
<i>S. mamdaka</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. manhattan</i>	0	0	0	0	2	0.43	0	0	2	0.13
<i>S. meleagridis</i>	1	1.06	0	0	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. mission</i>	0	0	2	0.69	0	0	0	0	2	0.13

ALTRE*	2001	%	2002	%	2003	%	2004	%	TOTALE	%
<i>S. mondovideo</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. mons</i>	0	0	2	0.69	0	0	0	0	2	0.13
<i>S. newland</i>	0	0	0	0	0	0	3	0.44	3	0.19
<i>S. newport</i>	0	0	0	0	2	0.43	1	0.15	1	0.06
<i>S. paratyphi b</i>	0	0	0	0	0	0	3	0.44	3	0.19
<i>S. planckendael</i>	0	0	1	0.35	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. putten</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. saintpaul</i>	0	0	0	0	1	0.22	1	0.15	2	0.13
<i>S. sao</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. schwarzengrund</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. typhi</i>	0	0	0	0	0	0	2	0.29	2	0.17
<i>S. urbana</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. veneziana</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. victoria</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. virchow</i>	0	0	4	1.39	0	0	4	0.58	8	0.52
<i>S. waramuenda</i>	0	0	1	0.35	0	0	0	0	1	0.06
<i>S. westpark</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.15	1	0.06
<i>S. winston</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06
<i>S. yarm</i>	0	0	0	0	1	0.22	0	0	1	0.06

vari antibiotici e che soltanto sporadicamente possono comparire resistenze che riguardano al massimo uno o pochi antibiotici. Da segnalare relativamente alla *S. enteritidis* il riscontro di 11 ceppi, il 6% del totale, resistenti ad Ac. Nalidixico.

I dati più interessanti sono però riferiti a *S. typhimurium* che presenta i maggiori casi di resistenza singola o multipla.

Delle 277 *S. typhimurium* isolate nel 2004, soltanto 26 sono risultate sensibili a tutti gli antibiotici saggiati, mentre ben 251 (90.6%) si sono dimostrate resistenti ad almeno 1 antibiotico. Vedi Tabella 3.

Tabella 3. Antibiotico-resistenze di *S. typhimurium* isolate nel 2004

AM										9	3.60
TE										15	5.97
TE	GM									1	0.40
AM	KF									2	0.80
AM	TE									66	26.29
AM	AMC	KF								4	1.59
AM	TE	NA								8	3.19
AM	TE	GM								10	3.97
AM	TE	C								11	4.38
AM	TE	AMC								2	0.80
AM	TE	KF								2	0.80
AM	TE	SXT								10	3.97
AM	TE	SXT	C							12	4.78
AM	TE	C	AMC							15	5.97
AM	TE	NA	C							4	1.59
AM	TE	GM	KF							1	0.40
AM	TE	C	AMC	KF						4	1.59
AM	TE	C	AMC	SXT						5	2.00
AM	TE	NA	C	AMC						1	0.40
AM	TE	C	AMC	GM						2	0.80
AM	TE	C	KF	SXT						2	0.80
AM	TE	AMC	SXT	KF						5	2.00
AM	TE	C	AMC	KF	SXT					2	0.80
AM	TE	C	NA	CIP	KF					1	0.40
AM	TE	CTX	NA	CIP	AMC	SXT	KF			1	0.40
AM	TE	C	Altri tipi di resist.							17	6.77
Altri tipi di resist.										39	15.54
TOTALE										251	100

Di particolare interesse è risultata inoltre la presenza contemporanea di resistenza ad Ampicillina, Tetraciclina e Cloramfenicolo.

Infatti più lavori (6, 12) hanno evidenziato una diffusione di *S. typhimurium*, spesso positiva al fago DT104 con almeno cinque resistenze e precisamente Ampicillina, Tetraciclina, Cloramfenicolo, Sulfamidici e Streptomicina.

Per questo motivo abbiamo preso in considerazione i ceppi che mostravano tale resistenza.

Questi sono risultati essere 76 su un totale di 277, pari al 27.4%.

Gli stessi sono stati successivamente testati anche nei confronti di sulfisoxazole e streptomicina. I risultati così ottenuti hanno mostrato la presenza di una pentaresistenza in 68 ceppi su 76, pari al 24.5% di tutte le *S. Typhimurium*.

Tale percentuale appare estremamente elevata e sicuramente meritevole di ulteriori approfondimenti. In questo senso sono in corso contatti con l'Istituto Superiore di Sanità per la fagotipizzazione di tali ceppi che potrebbero rappresentare, vista la letteratura a riguardo, un problema di tipo epidemiologico.

Infatti sembra che questo particolare biotipo abbia la capacità di divenire dominante rispetto agli altri portando come conseguenza un importante aumento delle resistenze che a volte si estendono anche a numerose altre molecole (12).

In definitiva, dai dati sopra riportati emerge come le infezioni umane da Salmonella siano ancora oggi un problema reale anche nella nostra regione e conseguentemente viene con più forza ribadita l'importanza di un'attenta sorveglianza epidemiologica come strumento di prevenzione di eventuali episodi epidemici.

BIBLIOGRAFIA

1. Biendo M, Laurans G, Thomas D, et al. Regional dissemination of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* is season dependent. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003; 9: 360-9.
2. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella, and Salmonella* "Manual Clinical Microbiology" Murray PR. et al. 8th Edition 2003 pg. 654-71.
3. Caprioli A, Luzzi I, Tozzi AE, Galetta P, Lana S, Bella A. Rapporto annuale sugli isolamenti di *Salmonella* segnalati al sistema di sorveglianza ENTER-NET Italia - I.S.S. Anno 2002.
4. Chart H. The pathogenicity of strains of *Salmonella paratyphi* B and *Salmonella Java*. *Journal of Applied Microbiology* 2003; 94: 340-8.
5. Drager H. *Salmonellosen*. Sprinter Verlag, leipzig Rep Fed Ted 1975.
6. Efrain M, Wierzba KR, Angulo FJ, Barrett TJ. *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990 and 1995. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; 8 (4).
7. Gaithersburg MD. AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis 17th ed. 2000 Isenberg HD "Clinical Microbiology Procedures Handbook" 1992; 1.
8. Gramegna M, Pavan A, Macchi L, et al. Napoli in Lombardia: lavori epidemiologici in corso per un sierotipo emergente. Workshop ENTERNET 2004. Roma.
9. Le Minor L, Richard C. "Méthodes de laboratoire pour l'identification des Enterobactéries" Ed. Institut Pasteur, Paris, 1993.
10. Le Minor L. Genus III. *Salmonella*. In Krieg NR, Holt JG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984; 1: 427-58.
11. Luzzi I, Dionisi AM, Filatici E, et al. Le infezioni da *Salmonelle* in Italia. Workshop ENTERNET 2004. Roma.
12. Mulvey MR, Boyd D, Cloeckart A, Ahmed R, Lai-King Ng. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella paratyphi* B dT, Canada. *Emerging infectious diseases* 2004; 10 (7).
13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, fourteenth Informational Supplement. NCCLS January 2004. M100-S14. vol 24 n° 1. replaced M100-S13.
14. PHLS (Public Health Laboratory Service). Rapporto annuale sugli isolamenti di *Salmonella* isoalti dal sistema ENTERNET. Italia 1999.
15. Tozzi AE, Caprioli A, Luzzi I, et al. Rapporto annuale sugli isolamenti di *Salmonella* segnalati al sistema di sorveglianza ENTER-NET Italia. Istituto Superiore di Sanità Roma - 2001.
16. Uzunovic-Kamberovic, *Salmonella enteritidis* in Bosnia and Herzegovina. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2004; 10: 1031-3.
17. Zavanella M. Tipizzare le *Salmonella*. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche. Brescia 2001.

Si ringraziano per la collaborazione:

1. Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista - TORINO
2. Presidio Ospedaliero Oftalmico - TORINO
3. Ospedale Amedeo di Savoia - TORINO
4. Ospedale S. Croce - MONCALIERI (TO)
5. Ospedale Maggiore - CHIERI (TO)
6. Ospedale S. Lorenzo - CARMAGNOLA (TO)
7. Dipartimento di Prevenzione - Ospedale CIRIÈ (TO)
8. Ospedale CHIVASSO (TO)
9. Ospedale S. Croce e Carle - CUNEO
10. Ospedali ALBA e BRA (CN)
11. Dipartimento di prevenzione - Ospedale BIELLA
12. Ospedale S. Antonio e Biagio ALESSANDRIA
13. Ospedale VERBANIA
14. Ospedale S. Biagio - DOMODOSSOLA (VB)
15. Presidio Ospedaliero OMEGNA (VB)
16. Centro Medico Riabilitazione - VERUNO (NO)
17. Ospedale BORGOMANERO (NO)
18. Ospedale S. Rocco - GALLIATE (NO)
19. Ospedale Rivoli (TO)
20. Ospedale Civile E. Agnelli PINEROLO (TO)
21. Ospedale Santo Spirito CASALE
22. Ospedale VERCELLI
23. Istituto auxologico italiano VERBANIA
24. CTO TORINO
25. Ospedale di Savigliano (TO)
26. ASTI

Giacomo Fortina

A.O. Maggiore della Carità
 U.O.A. di Microbiologia
 C.so Mazzini 18; 28100 Novara
 Tel.: 0321 3733375; Fax: 0321 3733240
giacomo.fortina@maggioreosp.novara.it