



Centro di Riferimento della regione Marche per la sorveglianza delle infezioni da batteri enteropatogeni Laboratorio di Tolentino (CRRep)

Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2015 nella Regione Marche.

Data on isolates of enteric bacteria from human clinical cases, animals, food and environment samples, in the year 2015 in Marche (Italy)

Monica Staffolani, Laura Medici, Maira Napoleoni, Stefano Fisichella.

Abstract. In this report, data on strains of enteropathogenic bacteria isolated from human clinical cases, animals, food and environment in the year 2015 in the Marche region are reported. A total of 82 *Salmonella*, 13 *Campylobacter*, isolates from cases of human infection are sent to CRRep of Tolentino. A total of 251 *Salmonella*, 10 *Campylobacter*, and 1 strain of *Citrobacter freundii* isolated from cases of non-human origin are reported to CRRep. With regard to isolates of human origin, the frequency, the distribution in different age groups, the rate of hospitalization, the source of isolation, the probable association with food are detailed. The isolates of non-human origin are divided by origin and source of isolation. This report also shows results of antimicrobial susceptibility testing performed on all strains of *Salmonella*.

Riassunto. In questo report vengono mostrati i dati relativi agli stipiti di batteri enteropatogeni isolati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2015 nella regione Marche. Un totale di 82 *Salmonelle* e 13 *Campylobacter* isolati da casi di infezione umana, sono pervenuti al CRRep di Tolentino. In ambito non umano un totale di 251 *Salmonelle*, 10 *Campylobacter* e 1 ceppo di *Citrobacter freundii* sono stati inviati al CRRep. Relativamente agli isolamenti di origine umana vengono descritti la frequenza, la distribuzione nelle varie fasce di età, il tasso di ospedalizzazione, la matrice di isolamento e la probabile associazione con alimenti. Gli isolati di origine non umana sono suddivisi per origine e per matrice di isolamento. Vengono inoltre riportati i risultati degli antibiogrammi effettuati su tutti i ceppi di *Salmonella*.

Introduzione

Nel corso del 2015 sono stati notificati dai Laboratori periferici al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CRRep) di Tolentino 357 isolamenti, di cui 333 appartenenti al genere *Salmonella*, e 24 appartenenti ad altri generi di enterobatteri patogeni (Tab. 1 e Tab. 2). Rispetto al 2014 il numero di salmonelle notificate da fonte umana ha subito variazioni significative (da 123 a 82). Il numero di salmonelle isolate da fonti non umane è diminuito in parte per il fatto che durante il 2014 era in corso un progetto di ricerca sulle salmonelle isolate da campioni prelevati presso due mattatoi, uno situato in Umbria ed uno situato nelle Marche. Il numero di stipiti appartenenti al genere *Campylobacter* ha subito un decremento rispetto al 2014 relativo solo ai ceppi di origine umana (da 34 a 13).

Tab. 1 - Stipiti notificati al Centro di Riferimento Regionale nel 2015

Stipiti	N.	%	%2014
<i>Salmonella spp.</i>	333	93,3	90,6
<i>Campylobacter spp.</i>	23	6,4	8,1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,3	0,2
Totale	357	100,0	100,0

Tab. 2 - Stipiti suddivisi per origine

Stipiti	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	TOTALE
Origine umana	82	13	-	95
Origine veterinaria	251	10	1	262
Totale	333	23	1	357

1. Enteropatogeni di origine umana

Dalla Tab. 3 si evince che quasi tutte le strutture ospedaliere della Regione provvedono alla notifica dei ceppi di *Salmonella*, mentre i ceppi di *Campylobacter* vengono inviati da un ridotto numero di laboratori che rappresentano gli stessi del 2014 (vedi anche paragrafo 1.2). Non si segnalano nel 2015 ceppi provenienti da laboratori privati non ospedalieri.

Tab. 3 - Numero di isolamenti distinti per struttura

Laboratorio	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
Ospedale Fano	15	6
Ospedale Ancona	12	3
Ospedale Jesi	8	-

INRCA Ancona	8	-
Ospedale Fabriano	7	-
Ospedale Osimo	7	-
Ospedale San Severino Marche	6	-
Ospedale Fermo	6	-
Ospedale Macerata	5	2
Ospedale Ascoli Piceno	5	-
Ospedale Civitanova Marche	1	-
Ospedale Senigallia	1	1
Azienda Ospedaliera Pesaro	1	1
Totale	82	13

1.1 Salmonelle di origine umana

In Tab. 4 è riportato l'elenco dei sierotipi di *Salmonella* isolati da casi clinici umani.

Tabella n. 4 - Distribuzione dei sierotipi di origine umana

Sierotipo	N.	%	% 2014
Typhimurium var. monofasica	37	45,1	36,6
Enteritidis	9	11,0	12,2
Typhimurium	6	7,3	27,6
Infantis	3	3,7	0,8
Veneziana	3	3,7	-
Stanley	3	2,4	-
Poona	3	3,7	-
Bredeney	2	2,4	-
Coeln	2	2,4	-
Stanleyville	2	2,4	1,6
Muenchen	2	2,4	-
Bovismorbificans	1	1,2	-
Rissen	1	1,2	1,6
Goettingen	1	1,2	-
Hadar	1	1,2	-
IIIb 53:z52:z53	1	1,2	-
Kottbus	1	1,2	-
Montevideo	1	1,2	-
Napoli	1	1,2	0,8

Pomona	1	1,2	0,8
Potsdam	1	1,2	-
Totale	82	100,0	-

Si segnala innanzitutto un forte trend negativo degli ultimi 3 anni relativo al numero totale di ceppi di Salmonella di origine umana pervenuti al CRRep ed isolati nella regione Marche. Infatti, nel 2013 erano 177, nel 2014 erano 123, mentre nel 2015 sono pervenuti 82 stipiti. Tale calo in parte è dovuto all'assenza di focolai epidemici rilevanti negli ultimi 2 anni.

Ai primi 3 posti della classifica dei sierotipi di origine umana riscontrati nella regione, compaiono gli stessi sierotipi degli ultimi anni così come accade a livello nazionale: Typhimurium var. monofasica, Typhimurium ed Enteritidis.

Degno di nota l'aumento di frequenza del sierotipo Infantis, non tanto per l'aumento di frequenza, quanto per il fatto che si tratta di 3 ceppi multiresistenti con fenotipo ESBL resistenti a ben 8 molecole. Tali ceppi sono stati inviati al CRAB (Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico resistenza) che ha potuto dimostrare la resistenza ai più importanti antibiotici per il trattamento delle infezioni umane (ceftazidime, cefotaxime e ciprofloxacina) e l'appartenenza dei 3 ceppi ad un unico clone emergente di Salmonella Infantis recentemente apparso in Italia ed in Europa (*Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing Salmonella Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014*. Franco A., Leekitcharoenphon P., Feltrin F., Alba P., Cordaro G., Iurescia M., Tolli R., D'Incau M., Staffolani M., Di Giannatale E., Hendriksen RS., Battisti A. (PLoS One 2015 Dec 30;10(12) pag 1-15). In particolare due dei tre ceppi di S. Infantis sono stati isolati da una stessa paziente di 71 anni, ma si tratta di prelievi di diversa natura (feci ed urine) e distanziati di 23 giorni l'uno dall'altro. L'altro stipite di S. Infantis è stato isolato dalle feci di un bambino di 2 anni. Altri sierotipi da segnalare per la loro bassissima frequenza tra quelli isolati nella regione sono il sierotipo Veneziana, solitamente tipico delle acque superficiali, Poona, isolato da 3 bambini nel mese di agosto di cui due residenti nello stesso comune e il sierotipo 111b 53:z52:z53 appartenente alla sottospecie *S. enterica subsp. diarizonae* che rappresenta una sottospecie generalmente isolabile da fonti non umane, ma piuttosto ambientali. Non si segnalano per quest'anno casi di salmonelle tifoidee.

La Tabella n. 5 riporta la distribuzione degli isolamenti umani di *Salmonella* per classe di età. I valori riscontrati in questo anno si discostano da quelli dell'anno precedente per le due fasce di età 15-64 e maggiore di 64 in quanto la frequenza della prima è molto diminuita mentre la frequenza della seconda ha fatto registrare un discreto aumento.

Tabella n. 5 - Distribuzione degli isolamenti umani per classe di età.

Età (in anni)	N.	%	% Totale
			2014
< 1	3	3,7	4,1
1 – 5	30	36,6	34,9
6-14	17	20,7	17,9
15 – 64	9	11,0	26,0
> 64	23	28,0	13,0
Non noto	0	-	-
Totale	82	100,0	100,0

La quasi totalità dei ceppi di *Salmonella* è stata isolata da feci, ad esclusione di 3 campioni di urine, un campione di feci e sangue isolati dal medesimo paziente ed un campione di liquido pleurico (Tab. 6). Il ceppo isolato da sangue e feci è stato isolato da un anziano di 82 anni ed appartiene al sierotipo Typhimurium var. monofasica, mentre dal liquido pleurico di una donna di 81 anni è stata isolato un ceppo di S. Typhimurium.

Tabella n. 6 – Matrici di isolamento

Matrice	N.	%
Feci	77	93,9
Urine	3	3,7
Feci e sangue	1	1,2
Liquido pleurico	1	1,2
Totale	82	100,0

Il trend della frequenza di ospedalizzazione degli ultimi 3 anni è in aumento e si sta avvicinando alla media nazionale (45%). Infatti, nel 2013 era pari al 33,9%, nel 2014 era salita al 39,8% e nel 2015 è risultata pari al 43,9% (Tab. 7). Ancora presenti casi di pazienti per i quali non è noto lo stato di ricovero.

Tabella n. 7 – Ospedalizzazione

Ospedalizzazione	N.	%
Si	36	43,9
No	32	39,0
Non noto	14	17,1
Totale	82	100,0

Nel 2015 non si segnalano focolai epidemici degni di nota, e non sono pervenute schede di notifica che indicavano il coinvolgimento di alimenti contaminati.

Riguardo la motivazione della richiesta per l'esame della coprocoltura (Tab. 8), come di consueto, anche se in calo rispetto all'anno precedente, nella maggioranza dei casi (58,8%) risulta non nota mentre aumenta la frequenza dei casi legati ad un'infezione acuta (dal 17,9% al 24,4%). Riguardo i 10 casi indicati con la motivazione di "inchiesta epidemiologica" si tratta di casi apparentemente non collegati tra loro e provenienti da due ospedali, quello di Fabriano (6 casi) e quello di Fano (4 casi).

Tabella n. 8 – Motivo associato alla richiesta dell'esame

Motivo esame	N.	%
Non noto	48	58,8
Infezione acuta	20	24,4
Inchiesta epidemiologica	10	12,2
Controllo	4	4,9
Totale	82	100,0

Nel 2015 non sono stati segnalati casi clinici associati a viaggi nei trenta giorni precedenti l'esame coprologico.

1.1.1 Elettroforesi in campo pulsato (PFGE)

I ceppi batterici di salmonella di origine umana sono stati in gran parte sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE) eseguita con l'enzima XbaI, una tecnica molecolare di riferimento per il genere Salmonella usata da alcuni anni allo scopo di subtipizzare gli stipiti appartenenti allo stesso sierotipo, che sta rimpiazzando ormai la tecnica della fagotipizzazione. I dati che si ottengono sono utili per alimentare un database europeo che fa parte della rete "PULS-Net Europe" in cui sono contenuti i dati relativi ai "pulsotipi" di salmonella circolanti in Italia ed Europa. Tra gli scopi della tecnica rientra anche la possibilità di svelare "cluster" epidemici che possono rimanere nascosti per svariati motivi (mancata notifica dei medici di base, cluster epidemico diffuso su un ampio territorio ecc.). Infatti, tra la fine del 2015 e l'inizio del 2016 (le date del prelievo fecale hanno coperto un arco di tempo di 15 giorni) sono pervenuti presso il CRRep, 5 ceppi di Salmonella appartenenti alla variante monofasica di S. Typhimurium con lo stesso profilo di antibiotico

resistenza (Ampicillina, Streptomicina, Sulfonamidi, Tetraciclina) isolati da persone di diversa età, residenti nel comune di Ancona, recatisi negli ospedali di Ancona ed Osimo. Il primo caso era riferito ad un bambino di 9 anni, il secondo caso ad un anziano da cui la salmonella è stata isolata anche da emocoltura, il terzo caso ad un giovane di 20 anni, il quarto da un anziano ed il quinto era relativo ad una signora adulta. Non è noto se le 5 persone avessero legami di parentela o avessero consumato pasti in comune nei giorni precedenti l'esame diagnostico, ma l'esito della PFGE dimostra che i 5 ceppi di Salmonella appartengono allo steso pulstotipo (Xbal.0096) per cui è molto probabile che si tratti di un cluster epidemico circoscritto nell'arco di circa 2 settimane nel comune di Ancona.

Tale pulstotipo è stato riscontrato nel 2015 e 2014 tra i ceppi di origine umana, non solo tra stipiti di Salmonella Typhimurium var. monofasica, ma sporadicamente anche tra stipiti di Salmonella Typhimurium in quanto questo pulstotipo risulta essere comune tra i due sierotipi, tuttavia non risulta essere il pulstotipo più frequente nella regione negli ultimi 2 anni.

1.2 *Campylobacter* di origine umana

Così come il numero di ceppi di Salmonella di origine umana, anche i casi di origine umana di *Campylobacter* risultano in calo passando da 34 a 13 ceppi. Questi ultimi sono stati spediti da 5 ospedali (Tab.9).

Riguardo le fasce di età, la maggioranza dei casi rientra nelle fasce di età maggiori, da 15 anni in poi, mentre pochi casi si registrano tra i bambini al di sotto dei 14 anni (Tab.9 bis). In circa la metà dei casi è stato richiesto ricovero ospedaliero. Non sono state rilevate associazioni con il consumo di alimenti sospetti.

Tabella n. 9- Distribuzione degli isolati di *Campylobacter* per laboratorio di origine e specie

Laboratorio	Totale	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i>
Azienda Ospedaliera Pesaro		1	-
Ospedale Fano		5	1
Ospedale Macerata		2	-
Ospedale Senigallia		1	-
Ospedale Ancona		3	-
Totale		12	1

Tabella n. 9 bis - Distribuzione degli isolamenti umani per classe d'età.

Età (in anni)	N.	%
< 1	-	-
1 – 5	2	15,4
6-14	3	7,7
15 – 64	5	38,5
> 64	3	38,4
Non noto	-	-
Totale	13	100,0

2. Enteropatogeni di origine non umana

La quasi totalità di enterobatteri di origine non umana, è rappresentata da ceppi di *Salmonella* ed in minima parte da ceppi di *Campylobacter spp.* e altri enterobatteri (Tab.10).

Tab. 10 - Numero di isolamenti di origine non umana distinti per struttura

Strutture	Totale	Salmonella	Citrobacter freundii	Campylobacter		
				jejuni	coli	spp.
IZSUM	137	127	-	5	5	-
Laboratori privati	88	87	1	-	-	-
ARPAM	37	37	-	-	-	-
Totale	262	251	1	10		

Nell'anno in esame, come già accennato, il numero dei ceppi di Salmonella di origine umana ha subito un netto calo, tuttavia il numero dei ceppi di origine non umana è aumentato in modo significativo. Infatti, rispetto all'anno 2014, sono aumentati sia gli stipiti provenienti dalle sezioni dell'IZSUM (137 contro 97), sia quelli provenienti dai laboratori privati (88 contro 42), mentre i ceppi spediti dall'ARPAM sono rimasti pressoché invariati (37 contro 41). In dettaglio, riguardo i ceppi provenienti dall'IZSUM, il contributo più importante che rappresenta una novità del 2015, è relativo ai campionamenti ufficiali eseguiti presso i mattatoi suini delle province di Ancona, Pesaro e Fermo. In relazione ai ceppi provenienti dai laboratori privati, occorre sottolineare anche in questo caso il contributo dei campionamenti in autocontrollo eseguiti presso i mattatoi suini, ma anche e soprattutto, numerosi campionamenti relativi ad allevamenti di polli da ingrasso e laboratori di trasformazione delle carni avicole.

Riguardo le fonti di isolamento degli stipiti di *Campylobacter spp.*, ad eccezione di 2 ceppi di *C. jejuni* isolati da campioni di carne di tacchino, gli altri 8 ceppi sono stati isolati da carne fresca di pollo nell'ambito dell'autocontrollo condotto presso alcune strutture di ristorazione collettiva della provincia di Pesaro-Urbino, mentre lo stipite di *Citrobacter freundii* è stato isolato da un laboratorio privato da una carcassa suina.

2.1 Salmonelle di origine non umana

I ceppi di *Salmonella* di origine non umana sono suddivisi per origine alimentare, animale o ambientale (Tab. 10 bis). A differenza del 2014, la categoria maggiormente rappresentata è quella degli alimenti, seguita da quella dei ceppi ambientali ed infine da quelli animali.

Tab. 10 bis – Isolamenti di *Salmonella* distinti per origine degli isolati

Origine	N°	%	% 2014
Alimenti	163	62,2	28,9
Ambiente	52	19,8	16,1
Animali	36	13,7	55,0
Totale	262	100,0	100,0

In Tabella 11 sono riportati i sierotipi di *Salmonella* isolati da animali, alimenti, ambiente e la relativa frequenza.

Tab. 11 – Sierotipi di *Salmonella* di origine non umana

Sierotipo	Alimento	Ambiente	Animale	N°	%
Infantis	46	6	8	60	23,9
Typhimurium var. monofasica	36	2	2	40	15,9
Derby	22	-	1	23	9,2
Kentucky	-	1	16	17	6,8
Rissen	14	1	-	15	6,0
Typhimurium	4	9	1	14	5,6
Veneziana	3	10	1	14	5,6
Napoli	4	4	-	8	3,2
Stanleyville	1	6	-	7	2,8
61:k:1,5,7	5	-	1	6	2,4
Montevideo	1	1	2	4	1,6
Agona	2	-	1	3	1,2
Mbandaka	3	-	-	3	1,2
Newport	2	1	-	3	1,2
Abaetetuba	2	-	-	2	0,8
Bredeney	2	-	-	2	0,8
Cerro	-	2	-	2	0,8
Coeln	1	1	-	2	0,8
Give	1	1	-	2	0,8
Kedougou	2	-	-	2	0,8

Poona	2	-	-	2	0,8
Senftenberg	2	-	-	2	0,8
4,5,12:i-	-	1	-	1	0,4
50:l,v:z35	1	-	-	1	0,4
50:r:1,5,7	1	-	-	1	0,4
Abortusovis	-	-	1	1	0,4
Braenderup	1	-	-	1	0,4
Eboko	-	1	-	1	0,4
Enteritidis	-	-	1	1	0,4
Farmingdale	-	1	-	1	0,4
Gallinarum	-	-	1	1	0,4
II 42:z:1,5	-	1	-	1	0,4
IIIb 38:l,v:z35	-	1	-	1	0,4
IIIb 53:z52:z53	-	1	-	1	0,4
Lezennes	-	1	-	1	0,4
Minnesota	1	-	-	1	0,4
Panama	1	-	-	1	0,4
Schwarzengrund	1	-	-	1	0,4
Stachus	1	-	-	1	0,4
Stanley	1	-	-	1	0,4
Totale	163	52	36	251	100,0

Rispetto all'anno 2014, l'anno 2015 vede cambiamenti significativi nella tabella relativa ai sierotipi di Salmonella di origine non umana. Innanzi tutto al primo posto non compare più Typhimurium var. monofasica ma, per la prima volta, compare il sierotipo Infantis che l'anno scorso rappresentava solo l' 8,9% con 15 isolamenti. Tra questi 60 ceppi isolati, 48 presentano il fenotipo ESBL e, riguardo la fonte di isolamento, gran parte proviene da carne di pollo, tamponi ambientali eseguiti presso allevamenti di polli da ingrasso o feci di pollo mentre, in minoranza, sono stati isolati da carne di tacchino, vongole e murici. I sierotipi al secondo e terzo posto sono Typhimurium var. monofasica e Derby che erano presenti ai primi posti della classifica anche nel 2014. Rimane costante anche la frequenza del sierotipo Typhimurium, mentre S. Enteritidis che nel 2014 aveva raggiunto la frequenza del 4,7%, quest'anno arriva appena allo 0,4%.

2.1.1 Salmonelle isolate da animali

Nella tabella 12 è riportata la distribuzione dei sierotipi di salmonelle isolate da animali suddivisi per specie di origine.

Tab. 12 – Distribuzione per specie dei sierotipi isolati da animali

Sierotipo	pollo	Ovino	Piccione	N°	%
Kentucky	16	-	-	16	44,4
Infantis	8	-	-	8	22,2
Montevideo	2	-	-	2	5,6
Typhimurium var. monofasica	2	-	-	2	5,6
61:k:1,5,7	-	1	-	1	2,8
Abortusovis	-	1	-	1	2,8
Agona	1	-	-	1	2,8
Derby	1	-	-	1	2,8
Enteritidis	1	-	-	1	2,8
Gallinarum	1	-	-	1	2,8
Typhimurium	0	-	1	1	2,8
Veneziana	1	-	-	1	2,8
Totale	33	2	1	36	100,0

Come negli anni passati, il principale serbatoio delle salmonelle isolate da animali rimane il pollo e la maggior parte di queste è stata isolata nell'ambito del "Piano di controllo per *Salmonella* nelle galline ovaiole". Tuttavia, rispetto al 2014, al primo posto in frequenza compare per la prima volta il sierotipo Kentucky che, nel 2014, rappresentava solo il 5,7%. Si ricorda a tal proposito che in Europa si assiste dal 2013 alla circolazione di uno o più cloni di *S. Kentucky* multiresistenti diffusi per lo più nel tacchino, ma i ceppi isolati nella regione da fonte animale non presentano questa caratteristica (EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014*. EFSA Journal 2015;13(12):4329, 191 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329).

Si segnala tra i ceppi isolati da ovini uno stipite di *Salmonella Abortusovis* isolato da un aborto di pecora allevata in un allevamento di Fermo e un ceppo di *Salmonella* 61:k:1,5,7, sierotipo tipico degli ovini, nonché il riscontro di una *S. Gallinarum* presso un allevamento di galline ovaiole.

2.1.2 Salmonelle isolate da alimenti

Nelle tabelle 13 sono mostrate le distribuzioni dei sierotipi di Salmonella isolate da matrici alimentari in cui sono incluse anche quelle isolate da carcasse suine al mattatoio.

Tab. 13 – Distribuzione per matrice alimentare dei sierotipi isolati da alimenti

Sierotipo	carne suino	carne pollo	Prodotti ittici	carne pollo-tacchino	mangime	carne tacchino	Latte/derivati	carne bovino	carne specie non nota	Erbe/spezie	ortofrutta	N°	%
Infantis	-	34	7	5	-	2	-	-	-	-	-	48	29,4
Typhimurium var. monofasica	30	1		1	-	-	-	2	1	-	-	35	21,5
Derby	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	12,9
Rissen	10	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	14	8,6
61:k:1,5,7	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	5	3,1
Napoli	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2,5
Typhimurium	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4	2,5
Mbandaka	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	1,8
Veneziana	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,8
Abaetetuba	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,2
Agona	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2	1,2
Bredeney	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,2
Kedougou	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,2
Newport	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	1,2
Poona	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1,2
Senftenberg	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2	1,2
50:l,v:z35	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
50:r:1,5,7	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Braenderup	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Coeln	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Give	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Minnesota	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Montevideo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Panama	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Schwarzengrund	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Stachus	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Stanley	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Stanleyville	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,6
Totale	74	38	24	7	6	4	4	3	1	1	1	163	100,0

Rispetto al 2014 il numero di stipti isolati da matrici alimentari è aumentato passando da 82 a 163. Inoltre, come negli ultimi anni ad eccezione del 2013 in cui predominavano le salmonelle da prodotti ittici, al primo posto tra le matrici alimentari risultano essere di

nuovo le carni di suino con un incremento notevole rispetto al 2014 (da 42 a 74 stipiti) al quale contribuiscono certamente gli stipiti isolati presso i mattatoi suini. Riguardo gli isolamenti da carne di pollo, sono notevolmente aumentati a causa del clone emergente di Salmonella Infantis di cui si è parlato sopra. Gli stipiti isolati da mangimi, solitamente di raro riscontro nella regione, quest'anno sono aumentati, provengono tutti dalla provincia di Fermo e non sono apparentemente correlati tra loro in quanto appartenenti pressoché tutti a sierotipi diversi. I quattro ceppi di S. 61:k:1,5,7, sono stati isolati da 3 campioni di latte di pecora e da un formaggio confezionato con lo stesso latte proveniente dal medesimo allevamento di ovini nel mese di febbraio 2015. Il ceppo di S. Typhimurium isolato da frutta ha origine da un prelievo al dettaglio, mentre il ceppo di S. Poona derivato da erbe/spezie, è stato isolato da un campione di pepe campionato in autocontrollo presso un esercizio di ristorazione collettiva.

Tab. 13a - Sierotipi isolati da carne suina		N°
Sierotipo		
Typhimurium var. monofasica		30
Derby		21
Rissen		10
Typhimurium		2
Mbandaka		2
Abaetetuba		2
Bredeney		2
Kedougou		2
Give		1
Montevideo		1
Panama		1
Totale		74

Tab. 13b - Sierotipi isolati da carne di pollo

Sierotipo	N°
Infantis	34
Typhimurium var. monofasica	1
Newport	1
Coeln	1
Schwarzengrund	1
Totale	38

Tab. 13c - Sierotipi isolati da prodotti ittici

Sierotipo	N°
Infantis	7
Napoli	4
Rissen	3
Veneziana	3
61:k:1,5,7	1
Typhimurium	1
Poona	1
50:l,v:z35	1
50:r:1,5,7	1
Stachus	1
Stanleyville	1
Totale	18

2.1.3 Salmonelle isolate da matrici ambientali

Le Salmonelle isolate da matrici ambientali sono rappresentate nella tabella 14 suddivise per sierotipo e fonte di isolamento.

Tabella n. 14 - Sierotipi di *Salmonella* di origine ambientale

Sierotipo	acqua fiume	tamponi allevamento pollo	acqua lago	acque di falda	tamponi mattatoio suino	tamponi allevamento tacchino	N°	%
Veneziana	8	-	2	-	-	-	10	19,2
Typhimurium	6	2	-	-	-	1	9	17,3
Infantis	-	6	-	-	-	-	6	11,5
Stanleyville	6	-	-	-	-	-	6	11,5
Napoli	3	-	-	1	-	-	4	7,7
Cerro	-	2	-	-	-	-	2	3,8
Typhimurium var. monofasica	-	-	-	-	2	-	2	3,8
4,5,12:i-	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Coeln	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Eboko	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Farmingdale	-	-	-	1	-	-	1	1,9
Give	1	-	-	-	-	-	1	1,9
II 42:z:1,5	-	-	1	-	-	-	1	1,9

IIIb 38:l,v:z35	-	-	-	1	-	-	1	1,9
IIIb 53:z52:z53	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Kentucky	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Lezennes	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Montevideo	-	1	-	-	-	-	1	1,9
Newport	1	-	-	-	-	-	1	1,9
Rissen	-	-	-	-	1	-	1	1,9
Totale	31	11	3	3	3	1	52	100,0

Al primo posto in frequenza appare quest'anno S. Veneziana, mentre la variante monofasica di S. Typhimurium, che occupava il primo posto nel 2014 scende al 7° posto. Riguardo i ceppi isolati dalle acque fluviali della provincia di Pesaro-Urbino, occorre segnalare un ceppo di S. Kentucky multi resistente con resistenza ai fluorochinoloni (Acido nalidixico e Ciprofloxacina) ricordando quanto detto sopra in merito ai cloni multi resistenti di questo sierotipo circolanti in Europa. Non sono stati isolati nel 2015 stipiti da acque potabili, mentre, invece, sono degne di nota le positività per Salmonella riscontrate in acqua di lago ed acqua di falda. In dettaglio, si tratta dello stesso lago situato in provincia di Macerata campionato in 3 mesi diversi e dello stesso sito di prelievo di acqua di falda della provincia di Pesaro campionato anch'esso in mesi diversi. Poiché tali ceppi di Salmonella appartengono a sierotipi diversi, si presume l'esistenza di una fonte di contaminazione duratura nel tempo.

3. Antibiotico resistenza nei ceppi di *Salmonella*

Tutti i ceppi di *Salmonella* pervenuti al Centro sono stati saggiati per valutare la sensibilità agli antibiotici secondo le linee guida del CLSI (*Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, January 2010, M100-S20*).

Tabella n. 15 – Risultati degli antibiogrammi effettuati sui ceppi di *Salmonella* spp.

** antibiotico saggiato solo su ceppi di origine non umana

Antibiotico	S	I	R
	%	%	%
Acido nalidixico	68,4	1,5	30,1
Ampicillina	54,6	0,0	45,4
Cefotaxime	83,6	0,3	16,1
Ciprofloxacina	97,3	1,5	1,2

Cloramfenicolo	92,8	0,3	6,9
Genatamicina	95,2	0,6	4,2
Kanamicina	82,4	0,3	17,3
Streptomicina	55,8	10,4	33,7
Sulfonamidi	50,7	0,3	49,0
Tetraciclina	52,2	0,3	47,5
Trimethopim - sulfametossazolo	74,6	0,3	25,1
Ceftazidime	93,1	4,5	2,4
Colistina**	100,0	0,0	0,0
Cefalotina	78,8	1,5	19,7
Amoxicillina - acido clavulanico	95,5	2,4	2,1

Nella tabella 15 sono riportati i risultati degli antibiogrammi effettuati, con indicazione delle percentuali di ceppi sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) a ciascun antibiotico saggiato.

Tabella n. 16- Diffusione della multiresistenza nei ceppi di *Salmonella*.

Numero di resistenze	Numero di ceppi	%
0	109	32,5
1	47	14,0
2	11	3,3
3	25	7,5
>4	143	42,7
Totale	335	100,0

Solitamente le classi di antibiotici verso cui la quasi totalità delle salmonelle presenta sensibilità sono le cefalosporine di terza generazione (cefotaxime e ceftazidime) e i fluorochinoloni (ciprofloxacina), che rappresentano le classi di antibiotici più efficaci in terapia umana. Nel 2015 sono stati trovati ceppi resistenti ad entrambe le classi, mentre permane la sensibilità al 100% per la colistina.

In particolare si nota un trend positivo negli ultimi 3 anni dei ceppi resistenti al cefotaxime (nel 2013 era pari all' 1,7%, nel 2014 al 5,5% e nel 2015 è arrivata al 16,1%), dovuto alle salmonelle *Infantis* con fenotipo ESBL di cui si è parlato ampiamente nei paragrafi 1.1 e 2.1, alcune delle quali sono anche resistenti contemporaneamente al ceftazidime. In relazione alla classe dei fluorochinoloni è da sottolineare l'aumento della percentuale di ceppi resistenti all'acido nalidixico che passa dal 17,1% (2014) al 30,1% (2015) ascrivibile in gran parte al sierotipo *Infantis*, ma anche al sierotipo *Kentucky* isolato nell'ambito del piano di sorveglianza delle galline ovaiole. Sono anche da menzionare 4 stipiti resistenti alla ciprofloxacina: tra i ceppi di origine non umana due ceppi di *S. Infantis* ed un ceppo di *S. Kentucky* già descritto nel paragrafo 2.1.3. e tra i ceppi di origine umana uno stipite di *S. Stanley* resistente sia all'acido nalidixico che alla ciprofloxacina.

Per multiresistenza si intende la presenza di resistenza in un singolo ceppo di almeno 4 molecole. Ovviamente, per i motivi sopra riportati, anche la frequenza della multiresistenza ha subito variazioni degne di nota passando dal 34,6% (2014) al 42,7% (2015).

4. Antibiotico resistenza nei ceppi di *Campylobacter*

Dal 2015 il CRRep ha iniziato un rapporto di collaborazione con il Laboratorio Nazionale Riferimento per *Campylobacter* di Teramo nel quale si prevede l'invio degli stipiti di *Campylobacter* isolati sia da campioni di origine veterinaria che umana. Tra le analisi a cui vengono sottoposti tali ceppi ci sono il test di sensibilità agli antibiotici con la tecnica della microdiluzione in brodo, l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) eseguita con l'enzima *SmaI* e la Multi Locus Sequence Typing (MLST).

Sono disponibili gli esiti del test di sensibilità agli antibiotici (Tab.17) condotto su un totale di 23 ceppi (14 di origine umana e 9 di origine non umana) in gran parte coincidenti con i ceppi i cui dati sono stati presentati nei precedenti paragrafi. I risultati non sono stati distinti per specie di appartenenza (18 ceppi di *C. jejuni* e 5 di *C. coli*) in quanto non sono state riscontrate differenze significative in termini di antibiotico resistenza.

Tabella n. 17 – Risultati degli antibiogrammi effettuati su ceppi di *Campylobacter* spp.

Antibiotico	S	I	R
	%	%	%
Acido nalidixico	0,0	0,0	100,0
Ciprofloxacina	21,7	0,0	78,3
Eritromicina	8,7	39,1	30,4
Gentamicina	100,0	0,0	0,0
Streptomina	82,6	13,0	4,3
Tetraciclina	21,7	0,0	78,3

Come noto, gli antibiotici più importanti dal punto di vista clinico per il genere *Campylobacter* e monitorati a livello europeo (*EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013 EFSA Journal 2015;13(2):403*), sono Acido nalidixico, Ciprofloxacina ed Eritromicina. Il primo è uno dei chinoloni più usati nel settore veterinario e, la presenza di resistenza, è un indice di possibile sviluppo di resistenza ai fluorochinoloni usati in terapia umana (Ciprofloxacina), mentre il secondo e il terzo sono i farmaci di elezione usati nella pratica clinica contro infezioni severe da *Campylobacter*. Il quadro che emerge dai risultati della tabella non è incoraggiante, in quanto la percentuale di resistenza all'acido nalidixico e alla ciprofloxacina è molto elevata, mentre riguardo l'eritromicina, che presenta una frequenza di resistenza più bassa, si nota una percentuale di risultati intermedi insolitamente alta.

5. Elettroforesi in campo pulsato (PFGE) e Multi Locus Sequence Typing (MLST) nei ceppi di *Campylobacter*

E' importante ricordare che la tecnica della PFGE, a differenza di quanto avviene per *Salmonella*, non è la tecnica di elezione per la sub tipizzazione di *Campylobacter* spp. in quanto dotata di basso potere discriminante. Per tale motivo spesso viene affiancata ad altre tecniche molecolari che consentono di ottenere un quadro più dettagliato ed aumentare il potere discriminante all'interno delle singole specie di *C. jejuni* e *C. coli*. Una di queste è la Multi Locus Sequence Typing (MLST) eseguita presso il Laboratorio Nazionale Riferimento per *Campylobacter* di Teramo eseguita solo per i ceppi di origine umana. In tabella 18 e sono mostrati i risultati disponibili sia della PFGE che della MLST.

Tabella n. 18 – Risultati della PFGE e MLST eseguite su ceppi di *Campylobacter* spp.

Specie	Origine	N° ceppo	PULSOTIPO	MLST
coli	alimentare	49618	DBBS16.0318	//
coli	alimentare	20269	DBBS16.0319	//
jejuni	alimentare	20319	DBDS16.0317	//
jejuni	alimentare	24162	DBDS16.0320	//
coli	alimentare	28854	DBBS16.0418	//
coli	alimentare	30825	DBBS16.0012	//
jejuni	alimentare	47075	DBDS16.0417	//
jejuni	alimentare	47662	DBDS16.0419	//
jejuni	alimentare	51350	DBDS16.0320	//
jejuni	umana	52515	DBDS16.0316	400ST-353complex
jejuni	umana	55700	DBBS16.0272	48ST-48complex
jejuni	umana	2774	DBDS16.0321	4717ST
jejuni	umana	4614	DBDS16.0427	1510ST-607complex
coli	umana	6743	DBDS16.0322	1445ST-828complex
jejuni	umana	7469	DBDS16.0314	//
jejuni	umana	14289	DBDS16.0425	2116ST-353complex
jejuni	umana	22998	DBDS16.0464	21ST-21complex
jejuni	umana	29648	DBDS16.0318	//
jejuni	umana	29650	DBDS16.0418	775ST-52complex
jejuni	umana	31517	DBDS16.0007	2116ST-353complex
jejuni	umana	33339	DBDS16.0256	2844ST-460complex
jejuni	umana	34024	DBDS16.0478	2229ST-353complex
jejuni	umana	45430	DBDS16.0009	NF

Dalla tabella si evince che i ceppi testati appartengono a pulsotipi diversi, invece, riguardo i risultati della MLST, sono emersi due ceppi con lo stesso profilo (2116ST-353complex) appartenenti a pulsotipi diversi (DBDS16.0425 e DBDS16.0007) ma con coefficiente di similarità del 90%, indice di possibile correlazione. Si tratta di due stipti di *C. jejuni* di origine umana isolati a distanza di 4 mesi uno dall'altro da un soggetto di 24 anni ed un bambino di 10 anni, apparentemente non correlati tra loro e residenti nella città di Ancona.



Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2015 nella Regione Marche. by Staffolani M., et al., 2016, is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	