



## **Monitoraggio e caratterizzazione molecolare di ceppi di Salmonella enterica produttori di ESBL (Extended Spectrum $\beta$ -Lattamase) nella regione Marche (2008-2011) - Monitoring and molecular characterization of ESBL producing strains of Salmonella enterica in Marche region (2008-2011).**

*Staffolani M., Medici L., Campanari S., Franco A., Di Matteo P., Fisichella S.*

**Abstract** The purpose of this study is to report the data about the presence of ESBL producing strains of Salmonella among isolates from routine activity of CRRep in Marche region during 2008-July 2011 period. By preliminary antimicrobial susceptibility testing, and confirmation ESBL tests, 14 strains belonged to 9 different serovars were identified and a rate of 1% (14/1368) was obtained with the presence of two ESBL genes: SHV-12 e CTX-M-1.

**Riassunto.** Obiettivo di questo lavoro è mostrare i dati relativi alla presenza di ceppi di Salmonella produttrici di ESBL tra gli isolati provenienti dall'attività routinaria del CRRep (Centro di Riferimento Regionale per gli enterobatteri patogeni) della regione Marche nel periodo compreso tra il 2008 e luglio-2011. Attraverso test preliminari di sensibilità agli antibiotici, e test di conferma per il fenotipo ESBL, sono stati identificati 14 stipiti appartenenti a 9 sierotipi diversi ed è stata ricavata una frequenza percentuale pari all'1% (14/1368) con la presenza di due geni ESBL: SHV-12 e CTX-M-1.

### **Introduzione**

A livello mondiale la frequenza dei ceppi appartenenti al genere Salmonella enterica resistenti alle cefalosporine di ultima generazione isolati da casi umani è aumentato dalla fine degli anni '90 (Zhao et al., 2001). Il fenomeno sta creando una notevole allerta sanitaria poiché queste cefalosporine rappresentano farmaci di prima scelta per la cura di infezioni gravi sostenute da Salmonella soprattutto nel bambino e nell'anziano. In maggioranza tali salmonelle possiedono  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) appartenenti alle famiglie TEM, SHV, CTX-M.

### **Metodi.**

**Sierotipizzazione:** Per la determinazione del sierotipo è stata seguita l'ultima edizione dello schema di Kauffman White (2007 ed n°9) mediante l'utilizzo di sieri del commercio (SSI, Denmark). Saggio di sensibilità agli antimicrobici: è stato effettuato con la tecnica della diffusione in agar secondo le linee guida CLSI (CLSI. January 2007), utilizzando dischetti antimicrobici del commercio (OXOID). Ampicillina (A) 10 mg, Cloramfenicolo (C) 30 mg, Cefotaxime (CAZ) 30 mg, Streptomicina (S) 10 mg, Sulfonamidi (Su) 300 mg, Tetraciclina (T) 30 mg, Acido nalidixico (Nal) 30 mg, Cefotaxime (Ctx) 30 mg, Ciprofloxacina (Cip) 5 mg, Gentamicina (Gm) 10 mg, Kanamicina (Kan) 30 mg, Amoxicillina-acido clavulanico (Amc) 30 mg, Trimethoprim-Sulfametossazolo (Sxt) 1.25/23.75 mg e Cefalotina (Kf) 30 mg. Per i ceppi di origine non umana sono stati saggiati in aggiunta altri 2 antibiotici: Colistina (Cl) 10 mg ed Enrofloxacin (Enr) 5 mg.

**Screening per ESBL:** il monitoraggio dei ceppi di Salmonella potenzialmente produttori di ESBL è stato eseguito tramite il metodo del doppio disco (Shah et al., 2004). Più in dettaglio l'antibiogramma eseguito di routine con 14 o 16 dischi come sopra illustrato prevede il posizionamento del disco di AMC tra il disco di CTX e quello di CAZ. Se uno dei due aloni di inibizione presenta un diametro inferiore alla soglia di sensibilità, oppure valori di bassa sensibilità (CAZ 19-22 mm e CTX 24-27 mm), con o senza la caratteristica forma che evidenzia la sinergia tra AMC e le cefalosporine di terza generazione (figura 1), il ceppo viene sottoposto a conferma per ESBL.

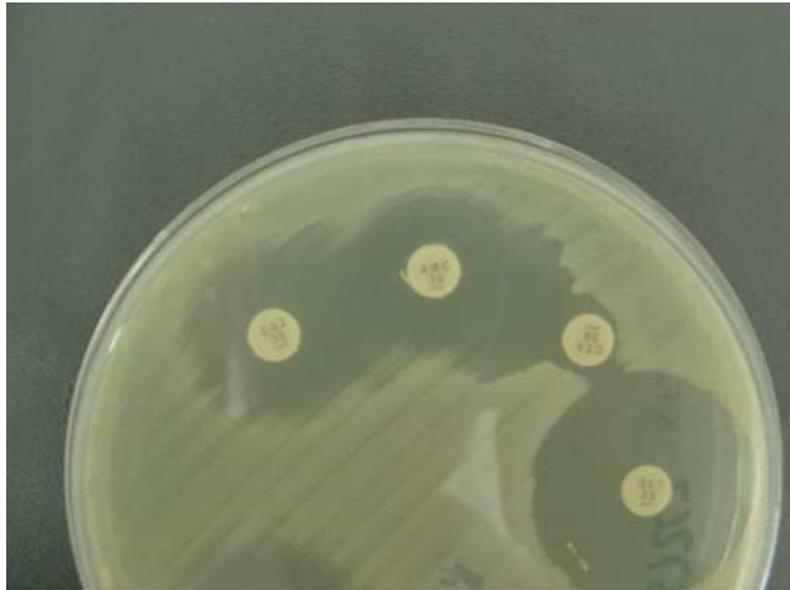


Figura 1: Evidente sinergia tra AMC e le cefalosporine di terza generazione

*Conferma del fenotipo ESBL e caratterizzazione molecolare:* gli isolati che presentavano un profilo fenotipico compatibile con ESBL sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRAB), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana. Presso il CRAB gli isolati sono stati sottoposti al test di conferma fenotipico secondo standard CLSI.

La conferma genotipica è avvenuta mediante saggio di PCR per i geni blaCTX-M, blaSHV, blaOXA e, qualora ritenuto opportuno, blaAmpC (Carattoli et al., 2005). Gli ampliconi ottenuti blaSHV-, blaCTX-M sono stati sequenziati e la sequenza nucleotidica ottenuta è stata comparata con quella depositata nel database BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information website.

## Risultati

Presso il CRRep di Macerata dal 2005, è in atto un monitoraggio continuo per la presenza del fenotipo ESBL tra i ceppi di enterobatteri patogeni, in larga prevalenza salmonelle, sottoposti in modo sistematico ad antibiogramma. In un periodo precedente a quello considerato nello studio (2005-2007), erano stati isolati i primi 9 stipiti di salmonella potenzialmente portatori di enzimi ESBL. Il fenotipo è stato confermato con la PCR per 6 stipiti isolati nel 2005-2006 di cui 5 di sierotipo Livingstone, probabilmente appartenenti allo stesso clone isolati presso uno stabilimento di produzione di carni avicole, ed un ceppo di variante monofasica di *S. Typhimurium* (4,(5),12:i:-) isolato da feci di pollo (Atti - ISSN 0393-5620 ISTISAN Congressi 07/C5). Nell'anno 2007 non è stato isolato alcun ceppo. Nel periodo considerato nel presente studio (2008-luglio 2011) su un totale di 1368 salmonelle sottoposte ad antibiogramma, sono stati isolati per la conferma del fenotipo ESBL 14 stipiti, appartenenti a 9 sierotipi diversi (tab 1): 8 da campioni di varia natura prelevati presso allevamenti di pollo (dal 2009 prelevati nell'ambito del Piano Nazionale di Controllo dei polli da carne), 3 da casi clinici (campioni di feci umane), 2 da acqua di fiume ed uno da carne fresca di specie mista. Di questi 14 stipiti, sono stati confermati per la presenza del fenotipo ESBL tutti i ceppi pari all'1% (14/1368) dei ceppi saggiati. Sono stati rilevati due geni ESBL: SHV-12 e CTX-M-1.

## Conclusioni

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza in *Salmonella* legato alla presenza degli enzimi ESBL, sta diventando un problema sempre più serio. Attualmente il fenomeno risulta più diffuso nei paesi dell'Asia (Jabeen et al., 2010) e dell'Africa (Beyene et al., 2011; Naas et al., 2011), mentre in

Europa la segnalazione di salmonelle con fenotipo ESBL rimane ancora relativamente rara (Meakins et al., 2008; Pardos de la Gándara et al., 2011). Autori spagnoli recentemente hanno rilevato una percentuale pari a 0.24% su 2092 ceppi di Salmonella di origine umana isolati nel 2001-2008 in una zona ad alta prevalenza (Riaño et al., 2009). Anche se nello studio presentato non sono emersi legami tra i sierotipi isolati nell'uomo e quelli isolati nei ceppi di origine animale, tuttavia la trasmissione clonale della multiresistenza dall'animale all'uomo è stata dimostrata (Riaño et al., 2009) e più volte è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento del pollame come serbatoio per questi batteri (Weill et al., 2004). Considerando che spesso le salmonelle con fenotipo ESBL risultano più virulente e che frequentemente coinvolgono comunità ospedaliere, riteniamo sia importante effettuare una sorveglianza della circolazione delle salmonelle resistenti alle cefalosporine di terza e quarta generazione sia negli animali che nell'ambiente.

<b>Tabella 1 - Caratteristiche dei ceppi analizzati</b>							
<b>Ceppo</b>	<b>Numero</b>	<b>Anno</b>	<b>Sierotipo</b>	<b>Specie</b>	<b>Matrice di isolamento</b>	<b>Profilo AbR</b>	<b>Gene presente</b>
21800/1/08	1	2008	Livingstone	pollo	tampone ambientale	ANalKf	blaSHV-12
21800/2/08	2	2008	Livingstone	pollo	tampone ambientale	ASSuNalGmKf	bla CTX-M gruppo 1
21800/3/08	3	2008	Virchow	pollo	tampone ambientale	ANalCtxKf	bla CTX-M gruppo 1
22285/08	4	2008	Virchow	pollo	pelle	ANalCtxKf	bla CTX-M gruppo 1
33273/08	5	2008	Derby	uomo	feci	ASSuTGmKfKanAmcSxt	bla CTX-M gruppo 1
37247/08	6	2008	Enteritidis	uomo	feci	ACtxKf	bla CTX-M gruppo 1
48596/L1/08	7	2008	Senftenberg	pollo	Lettiera	ACtxKf	bla CTX-M gruppo 1
48596/L1/08	7	2008	Senftenberg	pollo	Lettiera	ACtxKf	bla CTX-M gruppo 1
53875/08	8	2008	Typhimurium	uomo	feci	ACSSuTCtxKf	bla CTX-M gruppo 1
45472/09	9	2009	Rissen	mista	Carne lavorata	ASuTCtxKfSxt	bla CTX-M gruppo 1
55152/09	10	2009	Livingstone	pollo	Soprascarpe	ASSuNalCtxGmKfCaz	blaSHV-12
3287/10	11	2010	Kottbus	/	acqua di fiume	ASuKfCaz	blaSHV-12
23034/10	12	2010	Agama	/	acqua di fiume	ACSSuKfCtx	bla CTX-M gruppo 1
14279/11	13	2011	Livingstone	pollo	Soprascarpe	ASSuNalGmKfCaz	blaSHV-12
30271/11	14	2011	Virchow	pollo	Soprascarpe	ANalCtxKf	bla CTX-M gruppo 1

## **Bibliografia**

Atti 3° Workshop di epidemiologia veterinaria - ISSN 0393-5620 ISTISAN Congressi 07/C5: pag.104.

Beyene G, Nair S, Asrat D, Mengistu Y, Engers H, Wain J. (2011). Multidrug resistant Salmonella Concord is a major cause of salmonellosis in children in Ethiopia. *J Infect Dev Ctries.* 1;5(1):23-33.

Carattoli A, S. Lovari, A. Franco, G. Cordaro, P. Di Matteo and Antonio Battisti. (2005). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 833-835.

CLSI. January 2007, M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement.

Jabeen K, Zafar A, Irfan S, Khan E, Mehraj V, Hasan R. (2010). Increase in isolation of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant non typhoidal Salmonellae in Pakistan. *BMC Inf Dis*, (10): 101.

Meakins S, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, Luzzi I, Schneider F, Wannett W, Coia J, Echeita A, Threlfall EJ; Enter-net participants. (2008).

Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal Salmonella isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist.* 14(1):31-5.

Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, Nordmann P. (2011). Outbreak of Salmonella enterica serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* ;38(2):135-9. Epub 2011 Jun 11.

Pardos de la Gándara M, Seral C, Castillo García J, Rubio Calvo C, Weill FX. (2011). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing Salmonella enterica isolates in Saragossa, Spain (2001-2008). *Microb Drug Resist.* ;17(2):207-13. Epub 2011 Jan 16.

Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Alvarez P, Vinué L, Lantero M, Moreno MA, Zarazaga M, Torres C. (2009). Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Salmonella enterica in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect.*;15(3):292-5. Epub 2009 Jan 27.

Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A (2004). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol.*; 30(1):25-32.

Weill FX, Lailler R, Praud K, Kérouanton A, Fabre L, Brisabois A, Grimont PA, Cloeckaert A. (2004). Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of Salmonella enterica serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol.*;42(12):5767-73.

Zhao S, White DG, McDermott PF, Friedman S, English L, Ayers S, Meng J, Maurer JJ, Holland R, Walker RD. (2001). Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in Escherichia coli and Salmonella isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents and Chemother.* dec.2001: 3647-3650.



Monitoraggio e caratterizzazione molecolare di ceppi di Salmonella enterica produttori di ESBL (Extended Spectrum  $\beta$ -Lattamase) nella regione Marche (2008-2011) by Staffolani M., et al., 2011 is licensed under a Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

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